



Title	DEAD-Box helicase 6分子による炎症誘導の分子機構
Author(s)	内藤, 正一郎
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15908号
Issue Date	2024-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k15908
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/92136
Type	theses (doctoral)
File Information	NAITO_Seichiro.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

DEAD-Box helicase 6 分子による炎症誘導の分子機構
(Analysis of the molecular mechanism of inflammation
induction by DEAD-Box helicase 6)

2024 年 3 月

北海道大学

内藤 正一郎

Naito Seiichiro

学位論文

DEAD-Box helicase 6 分子による炎症誘導の分子機構
(Analysis of the molecular mechanism of inflammation
induction by DEAD-Box helicase 6)

2024 年 3 月

北海道大学

内藤 正一郎

Naito Seiichiro

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
実験方法	11 頁
結果	19 頁
考察	34 頁
総括および結論	37 頁
謝辞	38 頁
利益相反	39 頁
引用文献	40 頁

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Seiichiro Naito, Hiroki Tanaka, Jing-Jing Jiang, Masato Tarumi, Ari Hashimoto, Yuki Tanaka, Kaoru Murakami, Simpei I. Kubota, Shintaro Hojo, Shigeru Hashimoto, and Masaaki Murakami.

DDX6 is involved in the pathogenesis of inflammatory diseases via NF- κ B activation
Biochemical and Biophysical Research Communications (accepted)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

要旨

【背景と目的】

全身性強皮症は全身組織の線維化と血管障害を特徴とする膠原病性疾患であり、皮膚硬化・消化管症状等により生活の質が低下するのみならず、肺線維症・肺高血圧症や腎クリーゼといった重篤な疾患を合併するなど、多彩な症状を引き起こす。病態としては血管障害及び免疫系が関与し最終的に異常な線維化が起こると考えられているが、完全には解明されていない。そのため、治療は疾患修飾療法および対症療法が主体であり、根治的治療法は未だ開発に至っていない。近年ゲノムワイド関連解析により、本疾患における複数の疾患関連 SNPs、およびその関連遺伝子が報告されており、多くは免疫・細胞死などに関与する遺伝子だが、一部はその分子機序が明らかではない遺伝子群がある。

これまでに、我々のグループでは組織非免疫細胞において Interleukin-6 (IL-6)-Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)シグナルと Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)シグナルの同時活性化により NF- κ B が過剰に活性化し、サイトカイン・ケモカイン・増殖因子が相乗的に産生される炎症増幅機構である『IL-6 アンブ (炎症回路)』を報告している。本研究では、我々のグループが 2013 年に報告した非免疫系細胞における 1000 以上の IL-6 アンブ制御遺伝子と、既報の強皮症の疾患関連遺伝子のデータを組み合わせて、疾患に関与するメカニズムが未だ解明されていない DEAD-box helicase ファミリーメンバー、DDX6 を選択して解析した。

DEAD-box helicase ファミリーは、アミノ酸配列 Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) を含む保存されたモチーフを共有するファミリータンパク質群である。これらのタンパク質は RNA 二重鎖を一本鎖にほどく作用を持つ RNA helicase であり、RNA 代謝に重要な役割を果たしている。その一員である DDX6 は当初、messenger RNA(mRNA)が分解される過程で重要なステップであるデキャッピング(mRNA 5'キャップ構造の除去)を促進する翻訳抑制因子として同定された。その他、これまでの研究から、DDX6 は micro RNA を介した RNA 分解や翻訳阻害、RNA co-sensor として Retinoic acid inducible gene-I (RIG-I)のシグナル伝達を亢進する作用を持ち、またストレス顆粒形成、相分離などの生物学的現象に関与することが明らかになっている。様々な細胞プロセスへの関与を示唆する証拠がある一方で、DDX6 が炎症性疾患と関連する作用機序は未だ確立していない。

本研究の目的は、DDX6 の IL-6 アンブ活性化との関連性を明らかにし、その分子機序を解明することである。

【対象と方法】

IL-6 アンブにおける DDX6 の機能を確認するため、siRNA を用いて DDX6 ノックダウン細胞を作出し、IL-6 と Tumor necrosing factor- α (TNF α)の同時刺激下において

誘導される IL-6 や各種ケモカインの messenger RNA (mRNA) 発現を quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) で解析した。また、DDX6 complementary DNA (cDNA) を挿入したプラスミドを作製して過剰発現系を構築し、IL-6 プロモーターや NF- κ B p65 response element を用いてレポーター活性を測定した。また、DDX6 のヘリカーゼ活性が IL-6 アンブに關与するかを検討するため、ヘリカーゼ活性を失活させた DDX6 変異体を用いてレポーターアッセイを行った。次に、同様の現象が in vivo でも觀察されるかを確認するため、imiquimod により誘導される皮膚炎マウスモデルを用いて DDX6 のノックダウン実験を行った。

また、DDX6 を過剰発現させた細胞を用い、免疫沈降法を行うことで DDX6 と結合する分子の探索を行った。さらに、分子メカニズムを絞り込むため、DDX6 ノックダウン細胞に対しサイトカイン刺激を行い、ウェスタンブロットティングおよび免疫細胞染色を用いてシグナルパスウェイに關わる分子の動態を評価した。

【結果】

siRNA 法により DDX6 の発現制御を行った細胞に、TNF- α と IL-6 による IL-6 アンブ刺激をしたところ、IL-6 の mRNA 発現は低下した。一方で、DDX6 を過剰発現した細胞では IL-6 プロモーターおよび NF- κ B p65 response element の活性が有意に亢進した。さらに、ヘリカーゼ活性を失活させた DDX6 変異体についても野生型 DDX6 と同様に NF- κ B p65 response element の活性を有意に亢進させた。また、マウス皮膚炎モデルにおいても DDX6 のノックダウンにより炎症は抑制された。DDX6 過剰発現系を用いた免疫沈降法により、DDX6 は I κ B α , SKP1, p65 と結合することを見出した。

ウェスタンブロットティングの結果、DDX6 ノックダウン細胞において I κ B α のリン酸化および分解、NF- κ B Ser536 のリン酸化が抑制された。さらに DDX6 ノックダウン細胞を免疫蛍光染色により觀察したところ、NF- κ B p65 の核内移行が抑制された。

【考察】

本研究では、(i) 非免疫細胞において DDX6 の発現を抑制することにより IL-6 アンブの活性化が抑制されること、(ii) DDX6 を強制発現させると IL-6 アンブの活性化が亢進すること、(iii) DDX6 を siRNA により抑制することで imiquimod 処理により C57BL/6 マウスで誘導される NF- κ B を介した炎症反応が抑制されること、(iv) DDX6 は NF- κ B 経路分子、特に I κ B α , SKP1, p65 と強い親和性を持って結合すること、(v) DDX6 ノックダウンにより、NF- κ B 核内移行に關与するプロセスが阻害されること、以上を明らかにした。我々は DDX6 の RNA ヘリカーゼ活性失活変異体を構築し、NF- κ B 応答エレメント上でのレポーター活性を解析した。その結果、DDX6 は RNA ヘリカーゼ活性に關係なく、NF- κ B 応答エレメント上のレポーター活性を増強

することが示され、DDX6が I κ B α 、SKP1、p65 などシグナル伝達分子と結合するアダプター分子として機能していることが示唆された。

このことから DDX6 は NF- κ B 経路における I κ B α 分解及び NF- κ B 核内移行を促進すると仮説を立て、予想通り DDX6 knockdown によって I κ B α 分解及び NF- κ B 核内移行が抑制された。今後は NF- κ B 核内移行後の転写活性の制御など、NF- κ B 経路におけるその他のメカニズムへの関与について検討する必要がある。

【結論】

DDX6 は NF- κ B 経路を介して IL-6 アンプを活性化し、炎症を増悪させる可能性が示唆された。DDX6 は NF- κ B 経路分子に直接結合し、I κ B α 分解及び NF- κ B 核内移行という一連の NF- κ B シグナル伝達における分子間の介在タンパク質として働き、NF- κ B 経路活性化に関与している可能性が考えられた。

略語表

本文中、および図中で使用した略語は以下の通りである。

cDNA	complementary DNA
cIAP1/2	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2
DDX6	Dead-Box helicase 6
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EPDR1	ependymin-related protein 1
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GWAS	Genome wide association study
HDF	Human dermal fibroblast
HEK293T	Human Embryonic Kidney cells 293 T cell
HSF	Human synovial fibroblast
I κ B α	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IKK	I κ B kinase
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 receptor
IL-17	Interleukin-17
IP	Immunoprecipitation
JAK	Janus kinase
LUBAC	Linear UBiquitin Assembly Complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
NEMO	NF- κ B Essential MOdulator
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
p-body	Processing body
PBS	Phosphate buffered saline
qPCR	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
RBX1	Ring-Box 1
RIG-I	Retinoic acid inducible gene-I
RIP	Receptor interacting protein
RNAi	ribonucleic acid interference
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid

SKP1	S-phase kinase associated protein 1
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TLR7	Toll-like receptor 7
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain
TRAF2	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
WB	Western blotting

緒言

全身性強皮症は皮膚や内臓の線維化と血管障害を特徴とする、免疫介在性の膠原病性疾患である (Denton and Khanna, 2017)。欧米では、全身性強皮症の有病率は10万人に7.2-44.3人と推定されている (Bergamasco et al., 2019)。皮膚硬化を主症状とし、末梢血管障害としてレイノー症状や手指尖端の潰瘍が出現する。また消化管、腎、肺、心臓などの全身臓器に病変が出現し、それぞれ逆流性食道炎・吸収不良・便秘・下痢・イレウス、腎クリーゼ、肺線維症・肺高血圧症、心筋障害・心外膜炎・不整脈など、多彩な症状が出現する。皮膚硬化の範囲で2つの病型に分けられ、皮膚硬化が四肢末梢及び顔面に止まり、体幹や肘や膝より中枢側には病変が出現しない限局皮膚硬化型全身性強皮症(limited cutaneous systemic sclerosis; lcSSc)と、肘や膝、体幹を含む全身に皮膚硬化が出現するびまん皮膚硬化型全身性強皮症(diffuse cutaneous systemic sclerosis; dcSSc)がある。

膠原病性疾患の中では最も死亡率が高い疾患の一つとされていたが (Elhai et al., 2012)、近年の治療の進歩に伴い、その生存率は改善傾向であり、5年生存率はdcSScにおいて1990年代は65%に留まっていたが、2000年代には84%まで上昇している (Nihtyanova et al., 2010)。

全身性強皮症の治療は、各臓器病変の進行抑制による機能障害の軽減・生命予後改善が目標となっている。全身性強皮症の進行自体を遅らせる疾患修飾療法として、間質性肺疾患合併症例に対してInterleukin-6 (IL-6)受容体阻害薬トシリズマブや抗CD20モノクローナル抗体リツキシマブといった分子標的薬やシクロホスファミド、ミコフェノール酸モフェチルといった免疫抑制薬が使用される。また、各臓器病変への対症療法として、レイノー症状に対するジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬や皮膚潰瘍に対するプロスタサイクリン製剤、肺高血圧症に対する肺血管拡張薬、逆流性食道炎に対するプロトンポンプインヒビター、腎クリーゼに対するACE阻害薬などが挙げられる。しかしながら現在のところ全身性強皮症の根治的治療は確立されておらず、本疾患のさらなる病態解明と、より特異的な治療法が望まれる。

本疾患の病態は完全には解明されていないが、血管障害、自然免疫および獲得免疫系の異常が関与し、最終的に組織における異常な線維化がおこると考えられている。また、素因となる遺伝子変異やエピジェネティックな変化と、2次的な環境因子が相互作用し、その発症に影響を及ぼしている可能性が高い。

環境因子として、シリカ・溶剤・農薬・エポキシ樹脂などの暴露が潜在因子として挙げられており (Rubio-Rivas et al., 2017)、これらの環境因子がエピジェネティックな修飾を介して、遺伝的感受性が高い個体において疾患発症を引き起こすとされる。

遺伝的素因を探索する研究として、近年、強皮症におけるゲノムワイド関連解析 (Genome wide association study : GWAS) の結果、70 種類を超える一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) が明らかとなっている (Lopez-Isac et al., 2019)。その内の多くは免疫系や細胞死、線維化に関わる分子だが、一部の分子については詳細な機能や全身性強皮症に関与する分子機構が明らかになっていない (Ota and Kuwana, 2021)。

我々は自己免疫疾患を始めとした様々な疾患における慢性炎症誘導機構として『IL-6 アンプ (炎症回路)』を同定している (Ogura et al., 2008; Murakami et al., 2019)。この機構は、非免疫細胞において Nuclear factor-kappa B kinase (NF- κ B) 経路と Signal transducers and activator of transcription 3 (STAT3) 経路が同時に活性化することにより NF- κ B 経路が過剰に活性化され、種々の炎症性サイトカイン、ケモカイン、増殖因子を含む炎症回路標的遺伝子群が相乗的に過剰発現し、免疫細胞浸潤によって恒常性が破綻し慢性炎症が引き起こされるものである。そして本機構はサイトカイン誘導性関節炎モデル、多発性硬化症モデル、移植片慢性拒絶モデル等の疾患モデル及び様々な炎症性疾患における臨床検体において存在していることが明らかとなっている (図 1) (Ogura et al., 2008; Murakami et al., 2011, 2013; Arima et al., 2012, 2015; Lee et al., 2013; Arima et al., 2017; Lee et al., 2012, 2013; Atsumi et al., 2014, 2017; Harada et al., 2015; Meng et al., 2016; Okuyama et al., 2018; Tanaka et al., 2018, 2019; Stofkova et al., 2019; Fujita et al., 2019; Ota et al., 2020; Takada et al., 2020; Higuchi et al., 2020; Shimoyama et al., 2021)。さらに我々は、RNAi を基盤としたゲノムワイドスクリーニングを行い、IL-6 アンプに関する約 1200 種類の正の制御因子及び約 500 種類の標的遺伝子を同定した (Ogura et al., 2008; Murakami et al., 2013)。

これにより同定された IL-6 アンプの正の制御因子群と、強皮症 GWAS で判明した疾患関連遺伝子の中で強皮症の病態に対する分子機序が解明されていない遺伝子群を照らし合わせ、共通した遺伝子として DDX6 (Dead-Box helicase 6) が挙げられた。

DDX6 は DEAD-box (D-E-A-D はアミノ酸配列 Asp-Glu-Ala-Asp を示す) helicase family のメンバーであり、機能として、DDX6 knockdown により P-body(細胞質に特徴的にみられる、RNA-タンパク質複合体により形成される粒子用の構造で、mRNA の貯蔵、分解、翻訳抑制、miRNA を介した silencing に関与している)が形成されなくなることが報告されており、DDX6 が P-body 形成に中心的な役割を持つと考えられている (Serman et al., 2007)。また、t(11; 14)(q23;q32)転座を持つ B 細胞リンパ腫では DDX6 の変異は認めないが発現が増加しており (Akao et al., 1995)、ヒト大腸癌検体において DDX6 が過剰発現していることなどが報告されており (Nakagawa et al., 1999)、腫瘍形成への関与が示唆されている。

しかしながら、これまで慢性炎症に対する DDX6 の直接的な関与は示されていない。

本研究において、DDX6 が IL-6 アンブに関与し、強皮症等の慢性炎症性疾患の発症に寄与するという仮説を立て、本仮説を検証するために、IL-6 アンブにおける DDX6 の分子制御機構を解明することを目的とし研究を行った。

本研究では、機能的解析により非免疫細胞において DDX6 が NF- κ B の核内移行を促進し、IL-6 や種々のケモカインの発現に関わることを示した。さらに、DDX6 は I κ B α と直接結合することで NF- κ B 経路を活性化し、炎症を惹起していた。これらのことから、非免疫細胞における DDX6 を介した IL-6 アンブ活性化が強皮症の病態形成に関与することが示唆されたのでここに報告する。

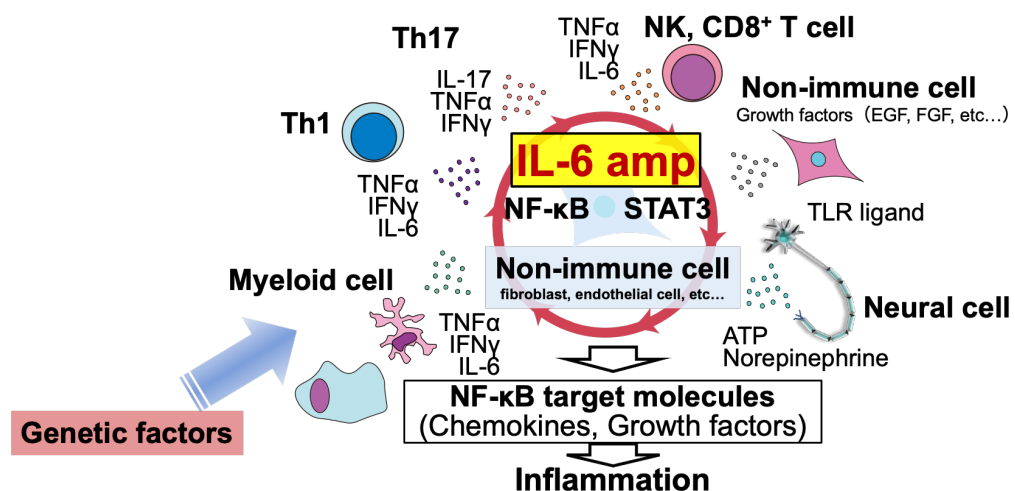


図1. IL-6 アンプの模式図

非免疫細胞においてNF-κBとSTAT3の同時に活性化によりNF-κBの過剰な活性化が引き起こされ、種々の炎症性サイトカイン、ケモカイン、増殖因子が大量に発現することで恒常性が破綻し慢性炎症性疾患が引き起こされる。(Ogura et al., 2008; Lee et al., 2012, 2013; Murakami et al., 2013; Atsumi et al., 2014, 2017; Harada et al., 2015; Meng et al., 2016)より一部改変。

実験方法

1 細胞と刺激条件

ヒト脳腫瘍細胞 H4 は、ATCC (Sumitomo Dainippon Pharma, Osaka, Japan)よりそれぞれ購入した。また、マウス 1 型コラーゲン陽性血管内皮細胞 (BC-1) は大阪大学 宮坂氏より譲渡を受けた。いずれの細胞も Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco)に 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum ; FBS) (CORNING)を添加したものをを用いて、37°Cかつ 5% CO₂ の条件下において継代、培養した。また培養に使用した器具類はすべてオートクレーブによる滅菌処理を施し、すべての操作をクリーンベンチ内で無菌的に行った。実験により、以下のサイトカイン刺激を行った。2 時間の血清飢餓処理の後、ヒト IL-6 (Toray Industries) 100 ng/mL 及び可溶性ヒト IL-6 受容体 (Toray Industries) 100 ng/mL、マウスもしくはヒト TNF- α (PeproTech) 50 ng/mL で刺激した。

2 抗体

以下に示す抗体は western blotting (WB)、免疫沈降法 (immunoprecipitation ; IP)、蛍光組織化学染色、免疫組織化学染色 (immunohistochemistry ; IHC)、および免疫細胞染色 (Immunocytochemistry ; IC)に用いた。

抗 DDX6 抗体 (14632-1-AP、Proteintech)、抗 p65 抗体 (C-20、Santa Cruz)、抗リン酸化 p65 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗リン酸化 STAT3 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 FLAG M2 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗リン酸化 I κ B α 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 I κ B α 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 α -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 TRADD 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 TRAF2 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 RIP 抗体 (Cell Signaling Technology)、Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)(Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) 、 Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)

3 プラスミド

Flag タグ融合 DDX6 発現プラスミド DNA を、次の手順で作成した。

ヒト DDX6 をコードする cDNA は human fetal brain より制限酵素を付加し cloning を行った。これを制限酵素処理し (Bam HI, Sal I in high buffer; Takara)。また pEF-BOS-Ex ベクターも同様に制限酵素処理した。処理した DDX6 及び pEF-BOS-Ex を Ligation high Ver 2 (TOYOBO) を用いて Ligation し、コンピテントセル (ECOS DH5, NIPPON GENE) に Transfection した後、Ampicillin 含有 LB 培地に植え付け、37°Cで一晩培養した。

発生したコロニーを pick up して、Ampicillin 含有 LB 培養液に懸濁し、再度 37°C で一昼夜培養した。

GenElute™ Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich) を用いて、培養液から Flag タグ融合 DDX6 発現プラスミド DNA を抽出した。なお、抽出した DNA は BigDye Direct Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いた標準プロトコールで、シーケンスが正しいことを確認した。

4 quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

各種細胞は、96 well plate に 1×10^4 個/well で播種して一晩培養した。翌日、実験により先に記載した条件で細胞刺激を行った後、SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO) を用いた標準プロトコールで mRNA を抽出し、M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用いた標準プロトコールで cDNA を作成した。

標的 mRNA レベルは、ABI Prism7300 fast real-time PCR system (Applied Biosystems) と SYBR Green FAST qPCR master mix (KAPA Biosystems) を用い、初期熱変性 94°C・10 分、熱変性 94°C 15 秒、アニーリング/伸長反応 60°C 60 秒 x 40 サイクルのプロトコールで qPCR を行った。内在性コントロールとして、ヒト由来細胞では *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) を使用した。なお、用いたプライマー配列は表 1 の通りである。

表1 qPCR で用いたプライマー配列の一覧

Gene	Sequence	
Mouse <i>HPRT</i>	Forward	5'-GAAGCGAGAGAACCAGG-3'
	Reverse	5'-CC CCCACCCCAGACA-3'
Mouse <i>IL-6</i>	Forward	5'-GAGGAACCACCCCAACAGACC-3'
	Reverse	5'-AAG GCACACG GCAACA-3'
Mouse <i>STAT3</i>	Forward	5'-CACCTTGGATTGAGAGTCAAGAC-3'
	Reverse	5'-AGGAATCGGCTATATTGCTGGT-3'
Mouse <i>CCL20</i>	Forward	5'-CGACTGTTGCCTCTCGTACA-3'
	Reverse	5'-GAGGAGGTTACAGCCCTTT-3'
Mouse <i>CXCL1</i>	Forward	5'-ACCCGCTCGCTTCTCTGT-3'
	Reverse	5'-AAGGGAGCTTCAGGGTCAAG-3'
Mouse <i>DDX6</i>	Forward	5'-CGAAATGGCTTATGCCGCAA-3'
	Reverse	5'-AGATGACCAAAGCGACCTGA-3'
Human <i>GAPDH</i>	Forward	5'-GAGCAACGGAGGCG-3'
	Reverse	5'-CGCCCGGAAGAGGG-3'
Human <i>IL-6</i>	Forward	5'-GGAGACTTGCCTGGTGAAAA-3'
	Reverse	5'-GTCAGGGGTGGTTATTGCAT-3'
Human <i>CCL2</i>	Forward	5'-CAGCCAGATGCAATCAATGCC-3'
	Reverse	5'-TGGAATCCTGAACCCACTTCT-3'
Human <i>STAT3</i>	Forward	5'-ACCAGCAGTATAGCCGCTTC -3'
	Reverse	5'-GCCACAATCCGGGCAATCT -3'
Human <i>DDX6</i>	Forward	5'-CCGAAATGGCTTATGCCGCAATC-3'
	Reverse	5'-GGAGATAGGTCTCTGCCAGCTT-3'

5 ヒト DDX6 に対する small interfering RNA (siRNA)を用いた遺伝子ノックダウン

H4(ヒト神経膠腫由来細胞株)、Human dermal fibroblast(HDF)、または Human synovial fibroblast(HSF)細胞を 96-well plate に 1×10^4 個/well で播種し、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いて siRNA (5 μ M) 0.5 μ l をトランスフェクションした。使用した siRNA は以下のとおりである。human si-*DDX6* (1: s4011, 2: s4012, Invitrogen)、human si-*p65* (SASI_Hs01_00171090; Sigma-Aldrich) 及び human si-nontarget (Sigma Mission SIC-001s; Sigma-Aldrich)。トランスフェクションした細胞は、37°C 5% CO₂ 下で 48 時間培養し、サイトカイン刺激後に qPCR を行った。

6 ヒト DDX6 に対する short hairpin RNA (shRNA)を用いた遺伝子ノックダウン

96-well plate に H4 細胞を 1.5×10^3 個/well で播種し 24 時間培養した。目的の遺伝子に対する shRNA を含むウィルス粒子 non-target shRNA, Sigma Mission SHC002V; *DDX6* shRNA-1, TRCN0000074695, CCCACTAGAGAACTTGCTCTA; and *DDX6* shRNA-2, TRCN0000074697, GAGCCTGTAGAAGATGAGAAA for H4 cells) を氷上で緩徐に解凍し、multiplicity of infection (MOI)が約 50 程度になるように polybrene (8 μ g/ml) を加えた DMEM で調整して、40 μ l/well ずつ細胞に添加した。37°C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した後、puromycin (1 μ g/ml) を加えた DMEM を 100 μ l ずつ加えて 3 日間培養した。この薬剤選択により生存した細胞を一過性のノックダウン細胞株とし、培養条件を 24-well plate、12-well plate、および 100 mm dish へと段階的にスケールアップさせながら、puromycin 含有 DMEM でさらに 3-4 日間培養かつ薬剤選択を行なった。この過程で確立したクローンについて WB を行い、目的遺伝子のノックダウン効率の検証を行い、安定ノックダウン細胞株として以降の実験に用いた。

7 Western blotting (WB)

WB に用いる細胞は、10 cm dish または 6-well dish に播種して培養した。必要に応じてサイトカインで刺激した後に細胞を氷上に置き、培養液を吸引除去した後に氷冷した Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、適量の PBS とセルスクレーパー (BIOLOGIX) を用いて細胞を回収した。1,500 rpm、4°C、5 分間の遠心により上清を除き、細胞ペレットを適切なバッファーで溶解処理した。すべての工程において、細胞溶解バッファーには 1/100 量の protease inhibitor (Sigma Aldrich)、phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma Aldrich)、および phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma Aldrich) を添加した。得られたサンプルは全て 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer で 95°C、5 分間煮沸させ、氷冷後に WB に供試した。5-12%濃度勾配の SDS-PAGE ゲル (和光純薬工業) で Bio-Rad のウェットウエスタンブロットシステムを用いてポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、泳動分離したタンパク

質を Immobilon®-P (Millipore) に転写した。転写膜は、5% Bovine serum albumin; BSA, Nacalai tesque)あるいは5% Skim milk を用いて1時間ブロックした。その後、標的分子に対する一次抗体反応を12時間、続く HRP 標識した二次抗体反応を1時間行った。全細胞分画および細胞質分画の内部コントロールとして、tubulin に対する抗体を用いた。一次抗体、二次抗体を加えた後は TBS-T (Tris-Buffered Saline with Tween 20)液で5分間3回洗浄し、Chemi-Lumi One L for HRP (nacalai tesque)、または Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher)を用いた基質反応を行った。反応後、現像機 FPM100 (富士メディカルフィルム)を用いて化学発光産物をフィルムに感光させタンパク質バンドの検出を行った。

8 マウス

実験に使用したマウス (C57BL/6)は日本 SLC 株式会社より購入して用いた。マウスは北海道大学遺伝子病制御研究所において室温管理された specific-pathogen-free ルームで飼育した。動物の取り扱いについては「北海道大学動物実験に関する規定」に則り、北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて行った。実験には開始時に6-8週齢のマウスを用いた。

9 皮膚炎モデルと炎症スコアの評価

皮膚炎モデルにおける炎症スコアは、既報にある評価方法に従って行った (Kanada et al., 2011)。マウスの耳に siRNA を耳の表裏に塗布し (day 0)、その後、day1, 2, および3において、Toll-like receptor 7 (TLR7) アゴニストであるイミキモド (Mochida Pharmaceuticals, Japan) とともに *DDX6* に特異的な siRNA、NF- κ B *p65* に特異的な siRNA、あるいは non-target siRNA (Dharmacon, SMARTpool)を塗布した。なお、塗布にあたっては、クリーム (Johnson and Johnson) 5.6 μ l に siRNA 9.4 μ l と生理食塩水あるいはイミキモド 5.0 μ l を混合した液を用いた。皮膚炎は耳の皮膚の厚さをマイクロキャリパーで計測し、元の厚さからの変化量で評価した。

10 免疫沈降法 (Immunoprecipitation Assay : IP)

IP に用いる細胞はすべて 10 cm dish に播種、培養した。バッファーで溶解されたサンプルはプロテイン G セファロースビーズ (Pharmacia)をサンプル 1mg タンパク質相当量に対して 10 μ g 添加し、4°C下で1時間緩徐に転倒混和しプレクリアを行った。その後、9,000 rpm、1分間、4°Cで遠心した後上清を回収し、目的に応じて FLAG ビーズ (Sigma Aldrich) を加えて2時間4°C下で緩徐に転倒混和した。サンプルとビーズ・抗体複合体は24時間、4°Cで混和した後、細胞溶解バッファーで5回洗浄した。IP 後において、FLAG 融合タンパク質は3×FLAG ペプチド (Sigma Aldrich)を

用いて溶出し、プロテイン G セファロースビーズは 2-メルカプトエタノールを含む SDS sample buffer で 95°C、5 分間煮沸し溶出した。溶出液は WB に供試し、その際に全細胞分画サンプルの一部を IP の input として用いた。

11 Luciferase Reporter Assay

レポーター活性の測定は、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて標準プロトコールに従って行った。96-well plate に 2×10^4 cells/well で播種した HEK293T 細胞を 24 時間培養した後、PEI (Polyethylenimine) を用いて pEF-BOS (Mock)、DDX6 発現プラスミドを 100 ng/well で導入、加えて pGL4.32 [luc2P/ NF- κ B-RE/Hygro] (4.5 ng/well、Promega)、pGL4.32 [luc2P/ IL-6 -promoter/Hygro] (4.5 ng/well、Promega)、および pGL4.74 [hRluc/TK] (0.25 ng/well、Promega) を導入した。各遺伝子導入を導入してから 24 時間培養後に培養液を除去し、ヒト TNF- α (50 ng/ml) を含有した培養液で 6 時間刺激した。PBS で細胞を洗浄し、Passive lysis buffer (40 μ l/well) を加えて 4°C で 20 分間穏やかに振盪して細胞を溶解した。その後、その細胞溶解液 5 μ l と発光基質 25 μ l を混合し、ホタルルシフェラーゼ活性をルミノメーター (GloMax®-Multi Detection System、Promega) で測定した。なお、細胞間の導入効率の補正のために、遺伝子導入の際に同時に導入した pGL4.32 由来のウミシイタケルシフェラーゼ活性を内部コントロールとし、これとの比を算出して NF- κ B あるいは IL-6 ルシフェラーゼ活性とした。

12 共焦点レーザー顕微鏡による細胞内タンパク局在の観察

TNF- α 刺激による p65 の核内移行を確認するため、BC-1 細胞を使用して shRNA を用いた DDX6 ノックダウン細胞およびコントロール細胞を作成し、TNF- α 50 ng/ml で 0 分、15 分、および 30 分間刺激した。刺激後の細胞は 4% パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、Perm/Wash solution (Cytofix/Cytoperm kit、BD Biosciences) で透過処理を施した後に、2% FBS で 30 分間ブロックした。次に、一次抗体として抗 p65 抗体を 1 時間反応させ、細胞を洗浄して余分な一次抗体を除いた後、二次抗体として抗ウサギ Alexa Fluor-488 標識抗体と Hoechst 33342 nuclear stain で 30 分間反応させた。また細胞内の DDX6 の局在評価のため、BC1 を使用し shRNA を用いた DDX6 ノックダウン細胞およびコントロール細胞を作成し、4% パラホルムアルデヒド、100%メタノールおよびメタノール・アセトン混合固定液 (100%メタノール:アセトン=1:1) を用いて、4% パラホルムアルデヒドでは 10 分間、その他の固定法については -20°C で 15 分間固定し、4% パラホルムアルデヒド固定においては Perm/Wash solution による透過処理を施した後、2% FBS により 1 時間ブロッキングを行った。次に、一次抗体として抗 DDX6 抗体を 1 時間反応させ、細胞を洗浄した後、二次抗体として抗ウサギ

Alexa Fluor-488 標識抗体を 30 分間反応させ、Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories)を用いて封入を行った。

これらの細胞内タンパク質の局在について、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM980, Carl Zeiss) を用いて観察を行った。

13 統計処理

実験データは平均値±標準誤差 (Mean±SEM)で示した。本研究では、2 群間の有意差検定に Student's *t* 検定を用いた。3 群間以上の有意差検定には analysis of variance (ANOVA) 検定を用いた。p 値は 0.05 未満のものを有意とし、**p* < 0.05、***p* < 0.01、および****p* < 0.001 で示した。

結果

1 DDX6のIL-6アンプへの関与についての検討

DDX6 遺伝子の IL-6 アンプへの関与を明らかにするために、DDX6 ノックダウン細胞を作製した。まず、H4 細胞(ヒト神経膠腫由来細胞株)に si-DDX6 あるいは si-nontarget をトランスフェクションさせることにより DDX6 ノックダウン細胞及びコントロール細胞 (Mock) を作出した。これらの細胞は、qPCR により DDX6 mRNA レベルを測定してノックダウン効率を測定した (図 2 左図上段)。また WB により DDX6 ノックダウン細胞において DDX6 タンパク質発現が抑制されることも確認した。

IL-6 アンプへの関与について IL-6 と TNF- α のサイトカイン刺激により誘導される IL-6 mRNA 発現量を qPCR 法で測定し、DDX6 のノックダウンにより、NF- κ B p65 ノックダウン細胞(si-p65)と同等に IL-6 mRNA の発現誘導が抑制されることを確認した。

皮膚や関節滑膜での炎症に対する DDX6 の関与を間接的に検討する目的で、同様に Human dermal fibroblast (HDF)及び Human synovial fibroblast (HSF)に si-DDX6 あるいは si-nontarget (Mock)をトランスフェクションさせ、IL-6 と TNF α のサイトカイン刺激により誘導される IL-6 mRNA 発現量を qPCR 法で測定したところ、HDF における siDDX6-2 については有意差はつかなかったものの IL-6 発現が低下する傾向にあり、その他については、H4 細胞と同様に有意に IL-6 mRNA 発現が抑制された。DDX6 のノックダウン効率については qPCR により確認を行った (図 3)。

これにより、複数のヒト非免疫細胞株において、DDX6 knockdown が同様の効果を表すことが示された。

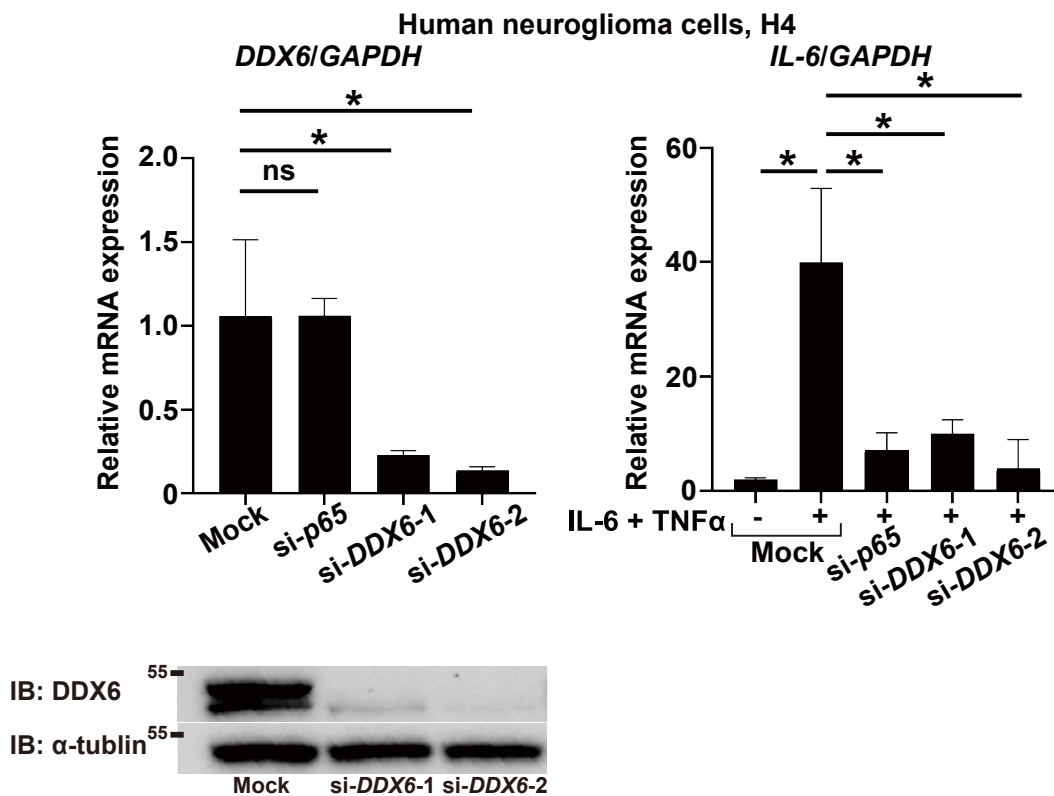


図2. ヒト H4 細胞における *DDX6* ノックダウンによる *IL-6* mRNA 発現誘導に対する抑制効果

ヒト H4 細胞に si-*DDX6* あるいは non-targeting siRNA をトランスフェクションさせることにより *DDX6* ノックダウン細胞及びコントロール細胞 (mock) を作出した。*DDX6* の mRNA 発現量を qPCR により評価することで、*DDX6* ノックダウンを確認した (左図上段)。また WB により *DDX6* ノックダウン細胞においてタンパク質発現が抑制されることを確認した(左図下段)

これらの細胞を IL-6 及び TNF- α で刺激し、IL-6 の mRNA 発現量を qPCR により評価した (右図)。データは3回の実験結果の平均値と標準誤差を、内在性コントロールとしての *GAPDH* に対する相対値で示し、*は、t 検定で比較した際の p 値が 0.05 未満のものを示す。

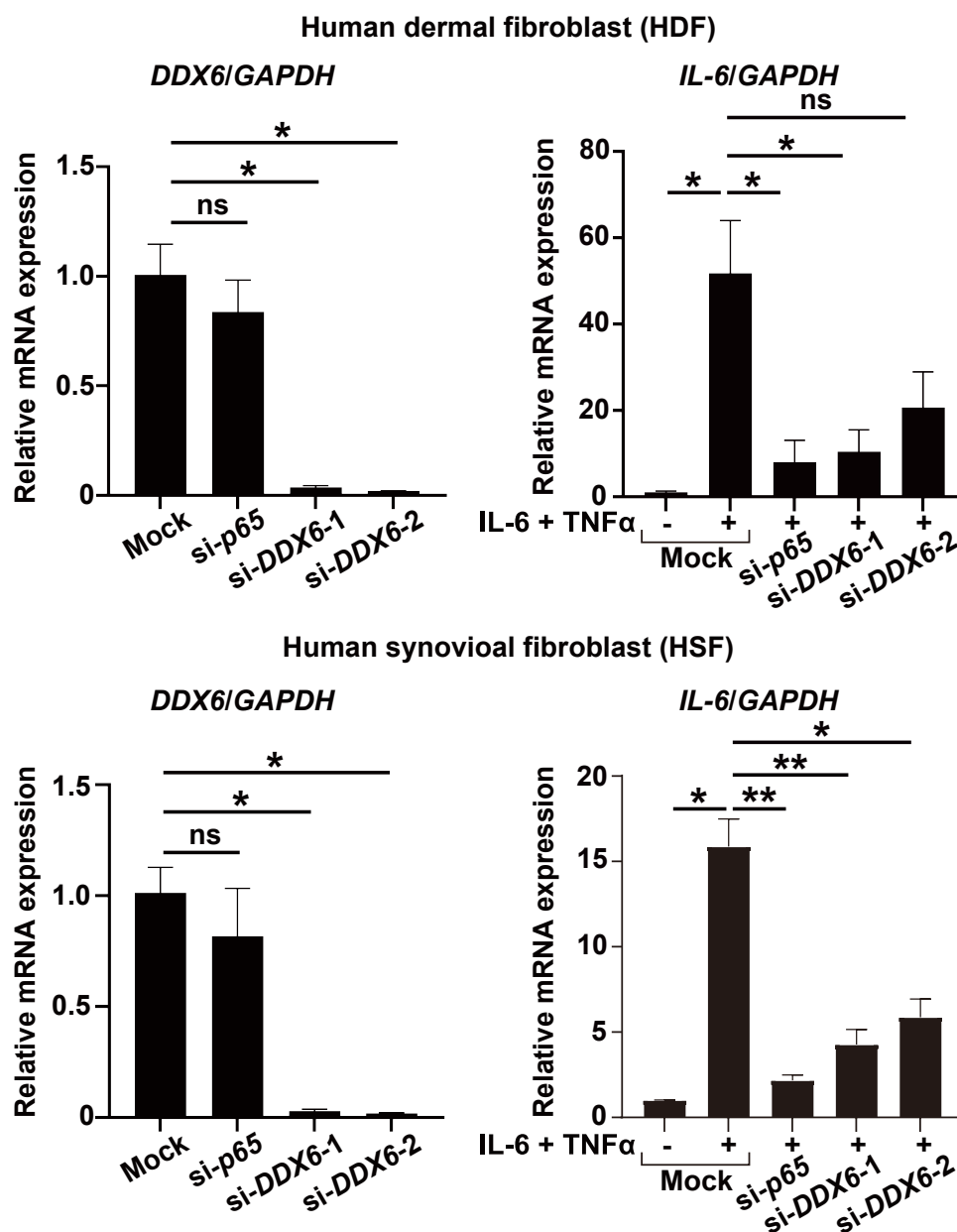


図3. HDF、HSF 細胞における DDX6 ノックダウンによる *IL-6* mRNA 発現誘導に対する抑制効果

ヒト HDF/HSF 細胞に si-DDX6 あるいは non-targeting siRNA をトランスフェクションさせることにより DDX6 ノックダウン細胞及びコントロール細胞 (mock) を作出した。DDX6 の mRNA 発現量を qPCR により評価することで、DDX6 ノックダウンを確認した (左図)。これらの細胞を IL-6 及び TNF- α で刺激し、IL-6 の mRNA 発現量を qPCR により評価した (右図)。内因性コントロールには GAPDH を用いた。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。*、**は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05、0.01 未満のものを示す。

2 DDX6 の NF- κ B 経路への関与の同定

次に DDX6 が NF- κ B 経路と STAT3 経路のいずれに強く関与するかを検討するため、qPCR を行った。具体的には、先に作成した siRNA による *DDX6* ノックダウン細胞およびコントロール細胞 (Mock) に対して IL-6 と TNF- α のサイトカイン刺激を行い、NF- κ B 経路の標的遺伝子である *CCL2* と、STAT3 経路の標的遺伝子である *STAT3* (Narimatsu et al., 2001) の mRNA レベルを qPCR にて測定した。結果、siRNA によるノックダウン細胞では、コントロール細胞 (Mock) に比して NF- κ B 経路の標的遺伝子の発現が有意に抑制された。一方で STAT3 経路の標的遺伝子の発現には変化が見られなかった (図 4)。以上から、DDX6 は NF- κ B 経路に関与すると考えられた。

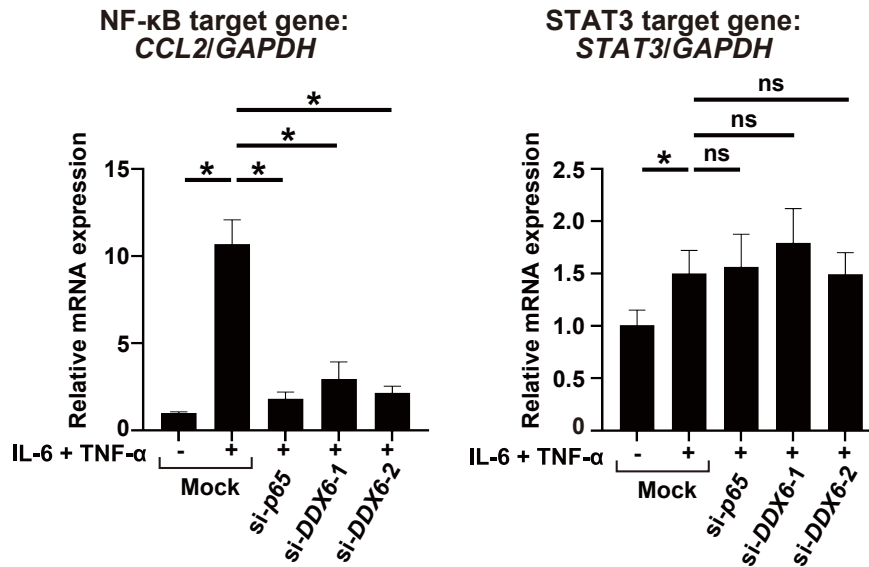


図 4. DDX6 ノックダウン細胞におけるサイトカイン刺激後の CCL2、STAT3 mRNA 発現量の変化

DDX6 siRNA によりノックダウンした H4 細胞を TNF- α と IL-6 で 3 時間共刺激し、細胞を溶解後に RNA を回収した。回収した RNA を qPCR に供試し、CCL2 (左図)および STAT3 mRNA (右図)の発現量を評価した。CCL2 の発現量は NF- κ B 経路の活性化に伴って増強されるのに対し、STAT3 の発現は JAK-STAT 経路の活性化で制御される。データは 3 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。*は、t 検定で比較した際の p 値が 0.05 未満のものを示す。

3 DDX6 過剰発現が NF- κ B 転写活性に与える影響の検討

次に DDX6 の過剰発現下における *IL-6* プロモーターおよび NF- κ B p65 response element の活性をレポーターアッセイにより評価したところ、*DDX6* 遺伝子導入によりいずれの活性も亢進することがわかった (図 5)。

これらの結果から、DDX6 は *IL-6* アンプ活性化において重要な役割を示していることが示唆された。

また DDX6 の *IL-6* アンプ活性化作用について、DDX6 が本来持つ helicase 活性が必要かどうか検討を行うため、DDX6 の helicase 活性が失活しているとされる変異体 (DDX6 E247Q) (Qi et al., 2012) を mutagenesis により作成した。この変異した DDX6 遺伝子を導入し、NF- κ B response element の活性を評価したところ野生型 DDX6 と同程度に、NF- κ B response element の活性が亢進した(図 6)。以上から、DDX6 の helicase 活性を失活させても *IL-6* アンプ活性化作用は失われないことを確認した。

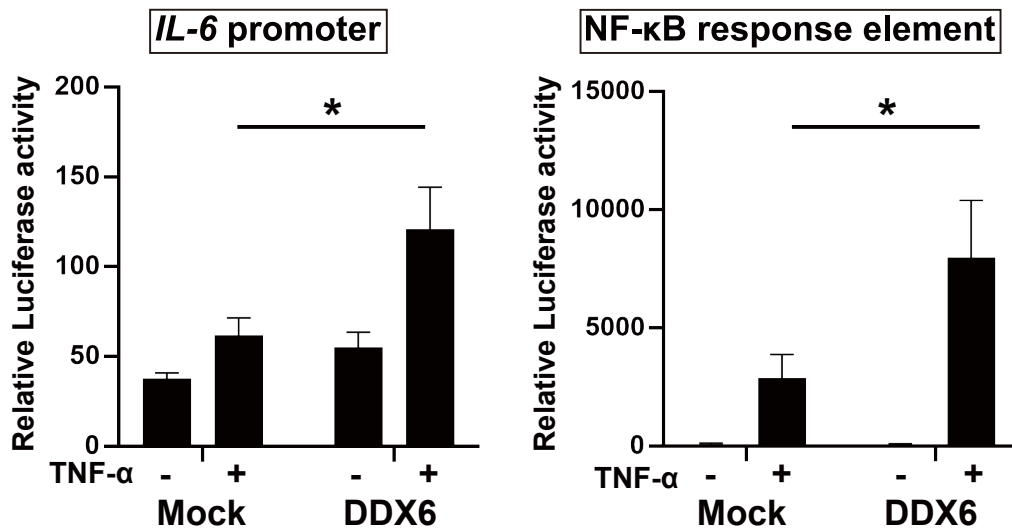


図 5. DDX6 を強制発現させた HEK293T 細胞でのレポーターアッセイ

HEK293T 細胞へ DDX6 発現プラスミドをトランスフェクションし、TNF- α 刺激後の *IL-6* プロモーター (左図) および NF- κ B response element (右図) の活性の変化を dual luciferase assay により評価した。

これらは、ホタルルシフェラーゼ活性に対するウミシイタケルシフェラーゼ活性 (内部コントロール) で補正し算出した。データは 4 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。* は、t 検定で比較した際の p 値が 0.05 未満のものを示す。

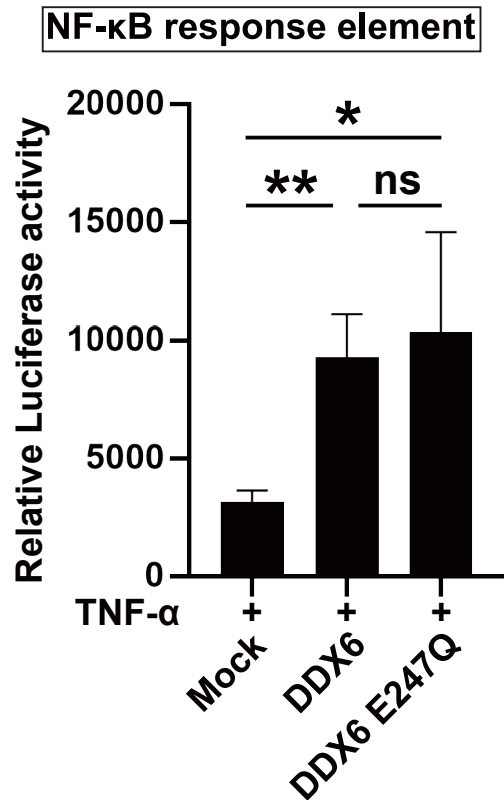


図 6. DDX6 の helicase 活性の有無による IL-6 アンプへの影響の検討

HEK293T 細胞へ、helicase 活性を失活させた DDX6(DDX6 E247Q)発現プラスミドをトランスフェクションし、TNF- α 刺激後の NF- κ B response element の活性の変化を dual luciferase assay により評価した。

これらは、ホタルルシフェラーゼ活性に対するウミシイタケルシフェラーゼ活性 (内部コントロール)で補正し算出した。データは 4 回の実験結果の平均値と標準誤差を示す。*および** は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05、0.01 未満のものを示す。

4 *in vivo* における DDX6 の生理学的役割についての検討

in vivo における DDX6 の生理学的役割について、これまでの当研究室の研究から IL-6 アンブの関与が示されているマウス皮膚炎モデルを用いて検討を行った。TRL7 アゴニストであるイミキモドをマウスの耳に塗布し炎症をおこし、数日で出現する炎症性変化 (耳の腫脹・発赤・落屑) について観察を行い、炎症の程度について耳の厚さを測定することで代替的に半定量評価を行った。当該モデルに対して *si-DDX6* を塗布することで *positive control* である *si-p65* と同程度に耳の肥厚を抑制し、炎症が抑制されていることが示唆された。

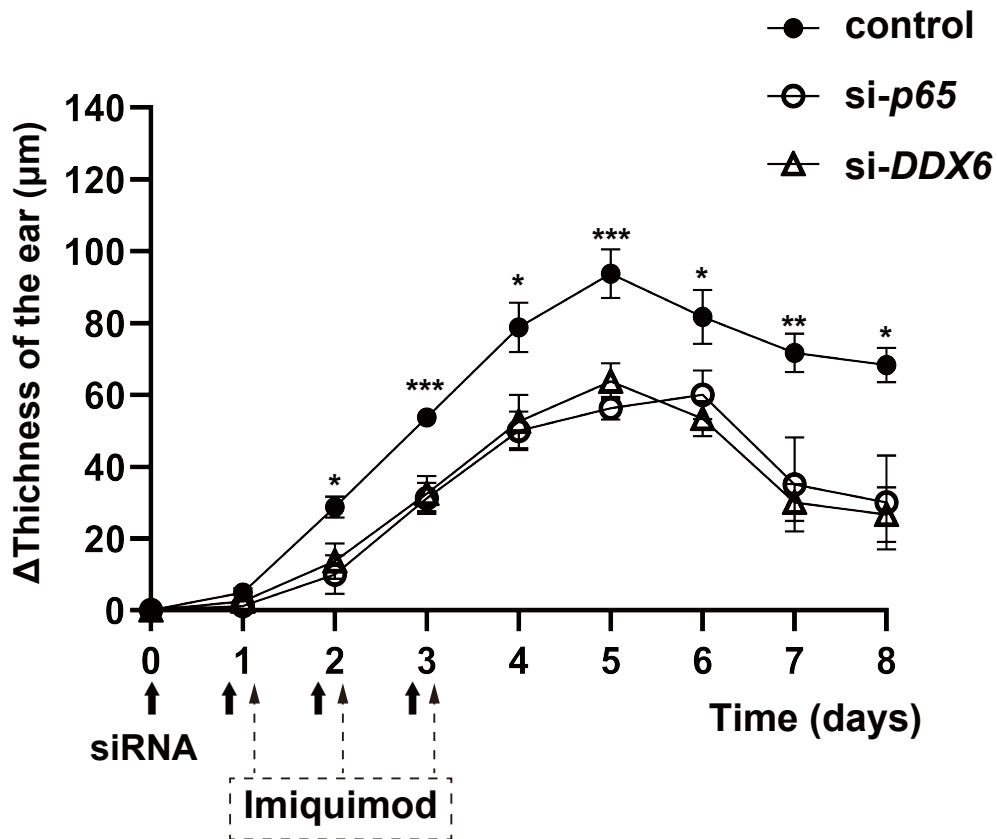


図7. 皮膚炎モデルマウスの炎症活性における DDX6 の役割

マウスの耳に non-target siRNA および DDX6 siRNA (si-DDX6)、p65 siRNA (si-p65)を day 0、day 1、day 2 および day 3 に塗布し、day 1、day 2、および day 3 にイミキモドを塗布し、各個体における耳の肥厚をマイクロキャリパーで測定することによって皮膚炎病態を定量評価した。各群 n=6 でデータは平均値と標準誤差を示す。** および *** は p 値がそれぞれ 0.01 および 0.001 未満のものを示す。

5 DDX6はI κ B α 、SKP1、p65と結合する

これまでの結果から、DDX6がNF- κ B経路において機能していると推測された。そこで、本節ではDDX6が結合するNF- κ B経路関連分子について調べた。

一般的にTNF- α がTNFR1 (Tumor necrosis factor receptor 1) に結合すると、TNFR1受容体は細胞質領域にあるデスドメインを介して三量体化し、この凝集によってtumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD) アダプタータンパク質の局在化が起こる。さらに、TRADDによって誘導されたReceptor Interacting Protein (RIP) が凝集する。そしてTRADDは、アダプター分子の1つであるTumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF2) と結合し、さらにTRAF2はCellular Inhibitor of Apoptosis 1 and 2 (cIAP1/2)をリクルートし、TNFR1複合体Iを形成する。

これにより下流のIKK (I κ B kinase)複合体が活性化され、I κ B α (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha) の32番目及び36番目のSerine残基がリン酸化される (Brenner et al., 2015)。

リン酸化されたI κ B α はCullin1 (Cul1)、 β -transducin repeat-containing protein (β TrCP)、Skp1 (S-phase kinase associated protein 1)、RBX1 (Ring-Box 1)から構成されるSkp, Cullin, F-box containing complex (SCF complex) と結合することでユビキチン化を受け、26Sプロテアソームにより分解される。

定常状態では細胞質内でI κ B α と結合し非活性化状態で存在するNF- κ B p65分子は、I κ B α が分解されることで536番目のSerine (Ser536) リン酸化を受け活性化し、核局在シグナルが露出することにより核内へ移行して転写活性を有するようになる (Ghosh and Hayden, 2008)。

我々はDDX6が上記NF- κ B経路のいずれの段階で関与するかを確認するため、HEK293T細胞にFLAGタグを融合させたDDX6を強制発現させ、その細胞溶解液を抗FLAGビーズで免疫沈降に供試し、得られた沈降物を用いてNF- κ B経路に関わる分子についてWBを施行したところ、DDX6はI κ B α 、SKP1、p65と強い親和性を持って結合し、またIKK α についても親和性は弱い結合する結果であった(図8)。

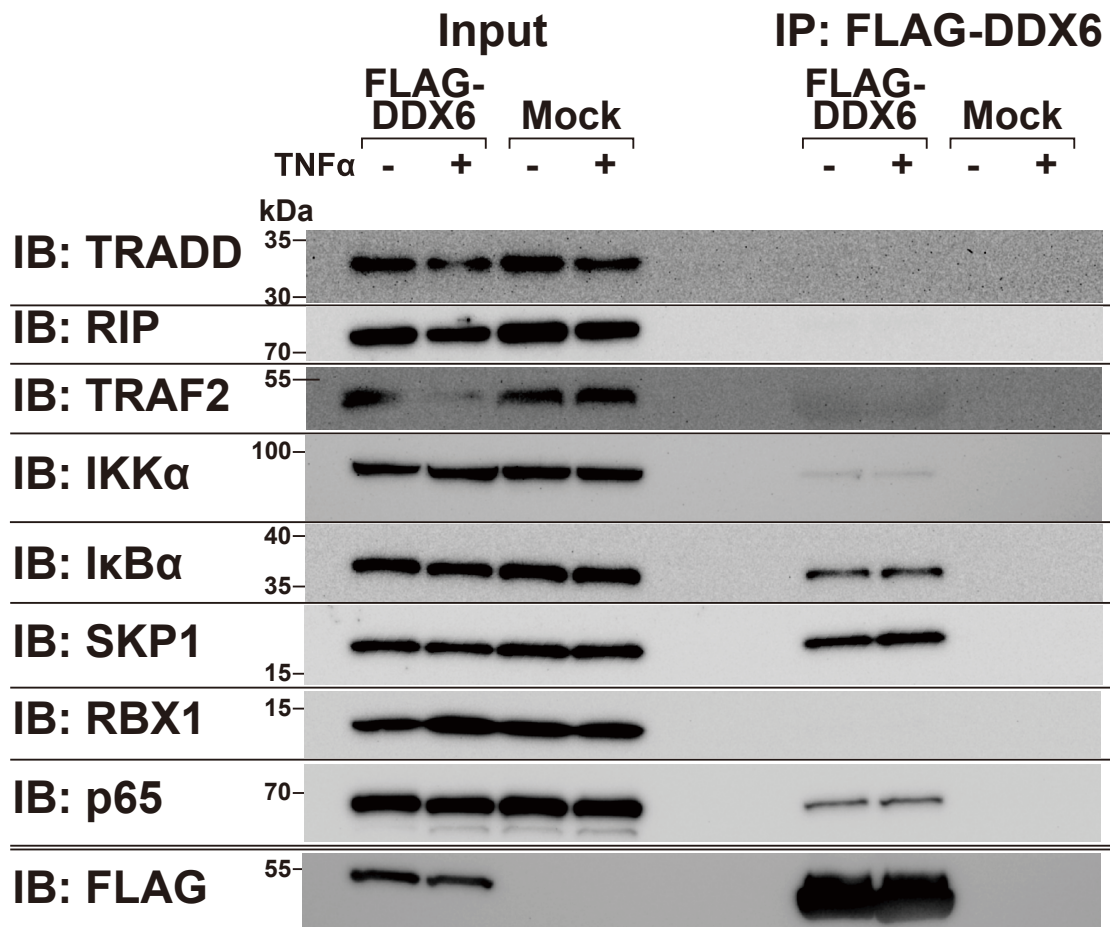


図 8. 免疫沈降法による DDX6 結合分子の探索

HEK293T 細胞に DDX6-FLAG を過剰発現させ、細胞溶解液を抗 FLAG ビーズで免疫沈し、NF-κB 経路の上流分子との結合を調べた。複数回施行したデータのうち、代表的なデータを示す。

6 DDX6 は NF- κ B 経路における I κ B α のリン酸化および分解に関与する

DDX6 が I κ B α 、SKP1、p65 と結合することから、I κ B α Ser32/36 リン酸化・分解及び、引き続いて起こる p65 Ser536 リン酸化について評価を行った。siRNA により *DDX6* をノックダウンした H4 細胞を TNF- α で 0、5、15 分間刺激し、タンパク質を抽出した後に I κ B α や Ser536 のリン酸化または分解について WB で確認したところ、non-targeting siRNA を transfection した細胞(Mock)と比較して、*DDX6* ノックダウン細胞では I κ B α のリン酸化・分解および Ser536 のリン酸化が抑制されていた(図 9)。

また同様に *DDX6* をノックダウンした H4 細胞を TNF- α により 0、15、30 分刺激し p65 の核内移行を共焦点顕微鏡で観察したところ、上記から予想された通り、p65 の核内移行も抑制された(図 10)。これらの結果から、*DDX6* が NF- κ B 経路において I κ B α のリン酸化、分解、及び引き続いて起こる p65 核内移行の過程に関与すると考えられた。

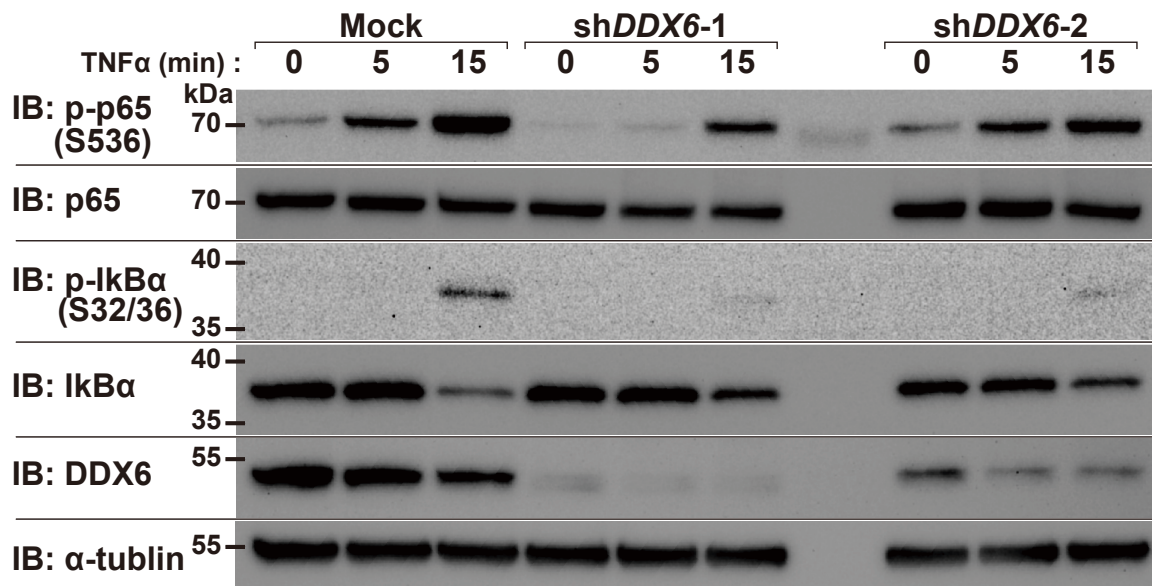


図9. DDX6 ノックダウンによる TNF- α 刺激依存的な I κ B α および Ser536 への影響

si-*DDX6* を transfection した H4 細胞 (si-*DDX6*-1、2) および non-targeting siRNA を transfection した細胞 (Mock) を 6 well dish で培養し、TNF- α で 0、15、60 分間刺激した後に細胞を溶解した。細胞溶解物を WB に供試し、刺激依存的な I κ B α のリン酸化・分解および Ser536 のリン酸化を評価した。図は複数回行った実験のうち代表的なデータを示す。

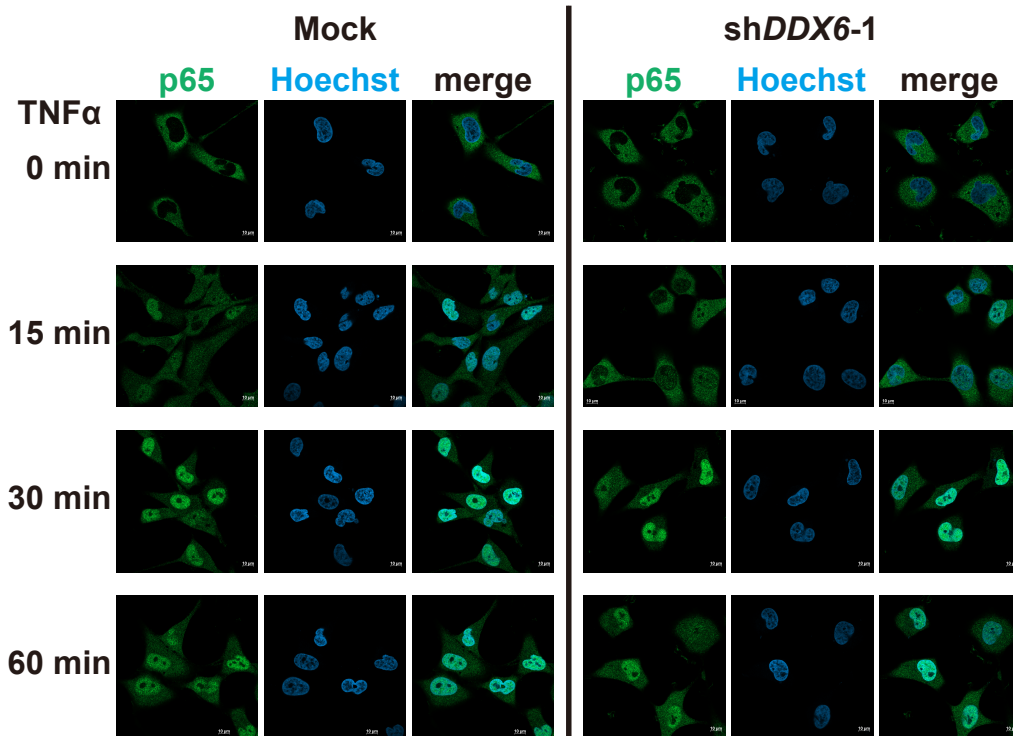


図 10. DDX6 ノックダウンによる p65 の核内移行の変化

H4 細胞に対して shRNA を用いて *DDX6* をノックダウンした細胞(shDDX6-1、2)、及び non targeting shRNA を transfection した細胞 (Mock) を作出し 24 時間血清飢餓状態で培養し、TNF- α で 0、15、30 分間刺激した後に共焦点顕微鏡で p65 の核内移行を観察した。固定には 4% パラホルムアルデヒドを使用し、p65 は間接抗体法を用いて Alexa488 で標識した。また核を標識するため DAPI で共染色を行った(紫：p65、青：DAPI)。

考察

本研究により、In vitro 実験及びマウス皮膚炎モデルを用いた解析から、DDX6 が慢性炎症誘導機構である IL-6 アンプの活性化に関与することを見出した。また NF- κ B 経路に関わる分子である I κ B α 、SKP1、p65 と結合することを確認し、予想されるメカニズムとして I κ B α リン酸、分解、p65 の核内移行という一連の反応に関与すると考えられた。

DDX6 は DEAD-box helicase family のメンバーで、当初、様々な造血器腫瘍に関連する t(11; 14)(q23;q32)転座を持つ B 細胞リンパ腫細胞株 RC-K8 からクローニングされた (Akao et al., 1991)。DDX6 mRNA は成体組織では広く発現しており、ヒトとマウスの組織でユビキタスに検出されたが、タンパク質発現についてはヒトとマウスの脳で低く、肺と筋肉では検出されなかった。(Akao et al., 1995)。DDX6 の細胞内局在について、同分子を強発現させた HEK293 細胞の観察では DDX6 は細胞質及び核に diffuse に分布し (Cougot et al., 2004)、さらに HeLa 細胞における免疫電子顕微鏡による観察から、特に P-body において細胞質と比較し 170 倍程度多く存在すると報告されている (Ernoul-Lange et al., 2012)。

P-body 形成における DDX6 の中心的な役割は Serman らによって初めて報告され、P-body 構成要素である cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB1)、GW108、DDX 6 の他複数の分子の knockdown によって p-body 形成が抑制されることを示した。さらに p-body 形成を促進する物質である亜砒素 (Wilczynska et al., 2005)を投与することで、CPEB1 や GW108 knockdown 細胞では p-body が再形成されるのに対して、DDX6 knockdown 細胞では亜砒素投与によっても p-body の再形成を認めず、このことから DDX6 が p-body 形成に必須であることが示唆されている (Serman et al., 2007)。また、DDX6 のヘリカーゼ活性は DDX6 が持つ mRNA 翻訳抑制機能に必要であることが明らかになっている (Minshall et al., 2001)。

興味深いことに、本研究においては、DDX6 のヘリカーゼ活性を失活させた変異体 (DDX6 E247Q) (Minshall et al., 2001)も野生型と同程度に NF- κ B response element 活性を上昇させた。このことから、DDX のヘリカーゼ活性は NF- κ B 経路に直接的には影響しないと推察された。

最近、Dana-Farber Cancer Institute から発表された、17,000 分子以上のヒトタンパク質における相互作用をスクリーニングして得られた 50,000 以上の 2 分子間相互作用を記したインタラクトームである HuRI において、DDX6 と TRAF2 が結合することが示されており (Luck et al., 2020) (<http://interactome-atlas.org>)、この報告を元に、当初は特に DDX6-TRAF2 連関に着目し、実際に DDX6 および TRAF2 について co-

overexpression を行うことで、両者が結合することを確認した。また FLAG-DDX6 overexpressing 細胞において抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を施行することで、TRAF2 が強免疫沈降されることを確認したが、免疫沈降実験の実験者を変更する、また WB の撮影条件を変更することで、DDX6-TRAF2 の結合親和性は弱く、むしろ I κ B α 、SKP1、p65 と強く結合することを見出した。

I κ B α は I κ B protein family のメンバーで、定常状態の細胞では細胞質において NF- κ B 二量体と結合し、NF- κ B を細胞質に留めている。I κ B α は炎症性の刺激に伴い IKK 複合体によりリン酸化され、その後 SCF complex によりユビキチン化を受け、プロテアソーム系によって分解される。結果、I κ B α に結合していた NF- κ B が解放され、細胞質から核に移行し、NF- κ B ターゲット遺伝子の転写を誘導する (Ghosh and Hayden, 2008)。I κ B α は NF- κ B ターゲット遺伝子の一つであり、NF- κ B 活性化に伴い発現が上昇する。新規に合成された I κ B α は核内の NF- κ B と結合し、exportin-1 (Chromosome Region Maintenance 1 Protein Homolog: CRM1)を介した核外輸送を促進し (Johnson et al., 1999)、これが NF- κ B による転写活性化を終結させるのに重要と考えられている (Sun et al., 1993)。

SKP1 は SCF complex の主要な構成要素であり、種々の F-box protein を結合させるアダプタータンパク質として重要な役割を担う (Bai et al., 1996)。SKP1 は F-box protein family の一員である β -TrCP と結合し、 β -TrCP はリン酸化 I κ B α の destruction motif を認識して結合し (Yaron et al., 1998)、これにより I κ B α は SCF complex によってユビキチン化され、その後 26S プロテアソームによる分解を受ける。また、SKP1 との結合に重要な F-box モチーフを欠損した β -TrCP 変異体を強発現させると I κ B α ユビキチン化・分解、及びその後の NF- κ B 活性化が抑制されることが報告されている (Spencer et al., 1999; Winston et al., 1999)。

今回 DDX6 が I κ B α 及び SKP1 と結合し、さらに shRNA を用いた *DDX6* knockdown 実験から DDX6 が I κ B α 分解及びリン酸化、引き続いて起こる NF- κ B 核内移行が抑制されたことから、DDX6 が I κ B α と SKP1 のアダプター分子として働き、SCF complex による I κ B α のユビキチン化及び分解に促進的に働いている可能性があると考えられる。

本研究では、DDX6 の発現を抑制することにより、IL-6 と TNF- α のサイトカイン刺激による NF- κ B 標的遺伝子の発現が抑制され、また DDX6 過剰発現により IL-6 プロモーター活性が上昇した。このことから、DDX6 が NF- κ B 経路を介して、慢性炎症の誘因となりうる種々の炎症性サイトカイン、ケモカインを過剰産生させる可能性が推察される。

本研究の限界として、各分子における結合ドメインを解明できていないこと、また DDX6 と各分子が細胞内で核または細胞質のいずれの画分でより多く結合しているかを特定できていないことが挙げられる。DDX6 は細胞質のみならず核内にも存在していることから、核内において I κ B α や p65 と結合し、その機能に関与している可能性が考えられ、こちらについては更なる検討が必要である。

また、DDX6 が SCF complex による I κ B α ユビキチン化を促進する可能性については、今後 DDX6 knockdown 細胞における I κ B α ユビキチン化の程度の検討などを行っていきたいと考えている。

さらに、今回は TNF α 刺激による検討のみであったが、DDX6 knockdown により NF- κ B シグナリングにおける I κ B α 以下の反応を抑制していたことから、TNF α のみならず、その他の IL-1 β 受容体や TLR 受容体を介した NF- κ B 経路の賦活化にも関与している可能性が考えられ、今後 IL-1 β や Lipopolysaccharide 等その他の刺激における DDX6 の関与も検討していきたい。

総括および結論

- DDX6 は NF- κ B 経路を活性化する。
- DDX6 のノックダウンは、*in vitro*、*in vivo* ともにサイトカイン刺激による炎症活性を有意に抑制する。
- DDX6 の helicase 活性は NF- κ B 経路活性化に関与しないと考えられる。
- DDX6 は I κ B α 、SKP1、p65 と結合する。
- DDX6 は I κ B α リン酸化、分解及び p65 リン酸化、核内移行に関与する。

本研究では、RNA helicase として P-body 形成、及び mRNA の貯蔵、翻訳抑制、分解への寄与また腫瘍の進行や抑制、RNA ウイルスにおける遺伝子発現の制御に関与する機能を持つとされている DDX6 について、炎症の増幅に寄与するという新たな機能を明らかにした。これまで炎症との関連は明らかとなっていなかった DDX6 が、その helicase 活性とは関係なく NF- κ B 経路を賦活化し炎症性サイトカイン等の過剰産生に繋がる重要な分子であるという可能性を示した。

しかしながらその分子メカニズムは完全には解明できておらず、更なる検討の余地がある。

本分子は強皮症、さらには関節リウマチ・全身性エリテマトーデスといった慢性炎症性疾患の疾患感受性遺伝子として挙げられており、今後ヒト検体における DDX6 の発現や機能解析を行うことで、これらの慢性炎症性疾患の発症や進行について新たな機序を解明できる可能性があると考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 安斉俊久教授に謝意を表します。

本研究全般にわたり直接ご指導ご鞭撻賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学 村上正晃教授に深く感謝いたします。また、直接のご指導を頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学 准教授・橋本茂先生、准教授・北條慎太郎先生、特任講師・蔣菁菁先生、特任講師・田中宏樹先生に心から感謝いたします。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました、北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室および北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野のすべてのみなさまに、心より御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Akao Y, Marukawa O, Morikawa H, Nakao K, Kamei M, Hachiya T, and Tsujimoto Y. (1995). The rck/p54 candidate proto-oncogene product is a 54-kilodalton D-E-A-D box protein differentially expressed in human and mouse tissues. *Cancer Res*, 55, 3444-3449.

Akao Y, Seto M, Takahashi T, Kubonishi I, Miyoshi I, Nakazawa S, Tsujimoto Y, Croce C M, and Ueda R. (1991). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of a B-cell lymphoma with the t(11;14)(q23;q32) translocation. *Cancer Res*, 51, 1574-1576.

Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper J W, and Elledge S J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 86, 263-274.

Bergamasco A, Hartmann N, Wallace L, and Verpillat P. (2019). Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Clin Epidemiol*, 11, 257-273.

Brenner D, Blaser H, and Mak T W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*, 15, 362-374.

Cougot N, Babajko S, and Seraphin B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol*, 165, 31-40.

Denton C P, and Khanna D. (2017). Systemic sclerosis. *Lancet*, 390, 1685-1699.

Elhai M, Meune C, Avouac J, Kahan A, and Allanore Y. (2012). Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford)*, 51, 1017-1026.

Ernault-Lange M, Bacconnais S, Harper M, Minshall N, Souquere S, Boudier T, Benard M, Andrey P, Pierron G, Kress M, et al. (2012). Multiple binding of repressed mRNAs by the P-body protein Rck/p54. *Rna*, 18, 1702-1715.

Ghosh S, and Hayden M S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 8, 837-848.

- Johnson C, Van Antwerp D, and Hope T J. (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α . *Embo j*, 18, 6682-6693.
- Lopez-Isac E, Acosta-Herrera M, Kerick M, Assassi S, Satpathy A T, Granja J, Mumbach M R, Beretta L, Simeon C P, Carreira P, et al. (2019). GWAS for systemic sclerosis identifies multiple risk loci and highlights fibrotic and vasculopathy pathways. *Nat Commun*, 10, 4955.
- Luck K, Kim D K, Lambourne L, Spirohn K, Begg B E, Bian W, Brignall R, Cafarelli T, Campos-Laborie F J, Charlotteaux B, et al. (2020). A reference map of the human binary protein interactome. *Nature*, 580, 402-408.
- Minshall N, Thom G, and Standart N. (2001). A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *Rna*, 7, 1728-1742.
- Nakagawa Y, Morikawa H, Hirata I, Shiozaki M, Matsumoto A, Maemura K, Nishikawa T, Niki M, Tanigawa N, Ikegami M, et al. (1999). Overexpression of rck/p54, a DEAD box protein, in human colorectal tumours. *Br J Cancer*; 80, 914-917.
- Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T, Nishida K, Itoh M, Kamimura D, Park S J, Mizuno K, et al. (2001). Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Mol Cell Biol*, 21, 6615-6625.
- Nihtyanova S I, Tang E C, Coghlan J G, Wells A U, Black C M, and Denton C P. (2010). Improved survival in systemic sclerosis is associated with better ascertainment of internal organ disease: a retrospective cohort study. *Qjm*, 103, 109-115.
- Ota Y, and Kuwana M. (2021). Updates on genetics in systemic sclerosis. *Inflamm Regen*, 41, 17.
- Qi M Y, Wang Z Z, Zhang Z, Shao Q, Zeng A, Li X Q, Li W Q, Wang C, Tian F J, Li Q, et al. (2012). AU-rich-element-dependent translation repression requires the cooperation of tristetraprolin and RCK/P54. *Mol Cell Biol*, 32, 913-928.
- Rubio-Rivas M, Moreno R, and Corbella X. (2017). Occupational and environmental scleroderma. Systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol*, 36, 569-582.

Serman A, Le Roy F, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, and Weil D. (2007). GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity. *Nucleic Acids Res*, 35, 4715-4727.

Spencer E, Jiang J, and Chen Z J. (1999). Signal-induced ubiquitination of IkappaBalpha by the F-box protein Slimb/beta-TrCP. *Genes Dev*, 13, 284-294.

Sun S C, Ganchi P A, Ballard D W, and Greene W C. (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, 259, 1912-1915.

Wilczynska A, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, and Weil D. (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci*, 118, 981-992.

Winston J T, Strack P, Beer-Romero P, Chu C Y, Elledge S J, and Harper J W. (1999). The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev*, 13, 270-283.

Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning A M, Andersen J S, Mann M, Mercurio F, Ben-Neriah Y. (1998). Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature*, 396, 590-594.