



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	自然免疫応答を活性化する新規リガンドとしての環状ADPRの同定 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	石, 姝珣
Description	配架番号 : 2700
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14959号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85828
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SHI_Shuxun_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 石 姝 珣

	主査	教授	福原 崇介
審査担当者	副査	教授	小林 弘一
	副査	教授	氏家 英之

学 位 論 文 題 名

自然免疫応答を活性化する新規リガンドとしての環状 ADPR の同定
(Identification of Cyclic ADP-Ribose as a Novel Ligand for Innate Immune Activation)

審査にあたり、まず副査の小林教授から cADPR の interferon (IFN) の誘導性について質問があった。本研究では使用した cADPR 刺激の濃度は生体内 cADPR 濃度と比べて、同程度のレベルかと質問された。申請者は、定常状態血清での cADPR はおよそ 10 pmol/ml で、組織による濃度は違うが、10 pmol~100 pmol で検出でき、本研究で使用した濃度は生体内 cADPR 濃度や既報の論文で使用した濃度を参考にし、特に生体で再現不可能な濃度で実験を行ってはいないと答えた。また、プライマリー細胞において IFN- β の誘導性は THP-1 におけるそれと比べて低く見えるが、これは enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)で正しく評価できているのかと質問された。申請者はがん細胞系と比べると、確かにプライマリー細胞は応答性が低いように見えるが、コントロールと比べると、cADPR 依存的に IFN を誘導することが確認でき、使用した ELISA キットは 1.2 pg/ml まで正確に測定できるので、これは評価できる結果であると答えた。また、cADPR が活性化する自然免疫シグナル経路の探索に関わる質問があった。経路を特定するために、様々な遺伝子をノックダウン (KD) し検証しているが、MAVS や DDX41 に関して、KD によって IFN- β の誘導にも影響があったことについてどう考えるかと質問された。申請者は、まず、MAVS に関しては、定常状態でも weak interferon の産生に関与している報告があったので、KD のよってこちらに影響を与えたのではないかと十分考えられる。そして、DDX41 に関しては、cGAMP との結合性が報告され、KD によって DDX41 と結合する分の cGAMP が他のターゲットに結合し、見かけ上は IFN をより強く誘導するように見える可能性が存在すると回答した。

副査の氏家先生からプルダウンアッセイの結果から見ると、バイオセンサーにおいても、DNA に 1 対 1 で cADPR を添加する場合、プルダウンアッセイのバッファーを用いた方が cADPR と cGAS の結合能が向上するのではないかと質問があった。申請者は、プルダウンアッセイとバイオセンサーのバッファーはそれぞれの実験に対して、DNA との会合性を調べる論文を参考にして適

切な組成で使用したが、cADPR に対して最適な組成とはいえない。そのため、他のバッファー条件で会合性が強くなる可能性が考えられるので、バッファー組成を改善すれば、より適正な解離定数を得られるだろうと答えた。また、競合実験から考えると、cADPR は外因性の DNA が誘導する IFN の産生を抑制するような作用を持つ可能性について質問された。申請者は、この点において、確かに外因性 DNA の存在下における cADPR は DNA と競合して、IFN- β の産生を抑制する機能を持つように見えるが、IFNs は非感染時の定常状態においてもわずかに誘導され生体防御に重要であることが知られており、その発現が微量なレベルで制御されている可能性も考えられると述べた。また、本研究で HCoEpiC 細胞を使った理由について質問があった。申請者は、生体内において cADPR は腸を含む異なる臓器で検出されており、cADPR は腸上皮細胞に作用している可能性が十分考えられるので、腸上皮細胞においても確認したと回答した。

最後は主査の福原教授より、cGAS 欠損細胞で IFN- β の誘導は著しく減少したことから、その他の遺伝子も siRNA で KD するだけでなく、欠損した細胞においても確認することは考えたのかと質問された。申請者は、siRNA で KD すると KD 効率に差が現れる可能性がある点からすると、欠損した細胞で確認した方がいいと考えており、まずは cGAS 欠損細胞を優先的に作成したが、その他の遺伝子の欠損細胞についても作成中であると説明した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。