



Title	Dupuytren拘縮における疾患関連SNPsと炎症誘導機構の関係性の解析〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	木田, 博朗
Description	配架番号 : 2756
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15438号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89941
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KIDA_Hiroaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 木田 博朗

学 位 論 文 題 名

Dupuytren 拘縮における疾患関連 SNPs と炎症誘導機構の関係性の解析
(Analysis of disease-associated SNPs and inflammatory mechanisms in Dupuytren's contracture)

【背景と目的】 Dupuytren 拘縮は手掌腱膜の線維性増殖に伴う肥厚、短縮により手指の不可逆性の屈曲拘縮を生じる疾患であり、日常生活動作に著しい支障をきたす。リスク因子として、性別（男性）、家族歴、外傷、糖尿病、アルコール摂取等が指摘されており、またその病態に慢性炎症の関与が指摘されているが詳細は不明である。また、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いるが、具体的な病態への関与は明らかとなっていない。治療法として進行した症例に対する手術治療や、現在日本では認可されていないが、国外ではコラゲナーゼ注射が行われる場合もある。しかし、これら治療法は屈曲拘縮の残存および再発、神経損傷、屈筋腱損傷等の合併症のリスクを伴うことから、本疾患の病態解明と、より有効性・安全性の高い治療法が望まれている。我々は非免疫系細胞において、IL-6 と NF- κ B 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 アンブを報告している。また、IL-6 アンブの制御遺伝子として 1000 以上の候補遺伝子が明らかとなっており、これに既報の Dupuytren 拘縮に関するゲノムワイド関連解析のデータを組み合わせ、IL-6 アンブの正の制御因子かつ疾患関連 SNPs (rs16879765 および rs17171229) が関連する遺伝子である SFRP4 に着目した。そして、SFRP4 がデュピュイトラン拘縮において IL-6 アンブを活性化させ、その病勢を制御すると仮説を立てた。本研究の目的は、Dupuytren 拘縮における IL-6 アンブの存在を示すこと、さらにその分子制御機構を解明することである。

【対象と方法】 まず、SFRP4 の機能を確かめるため、siRNA および shRNA を用いて SFRP4 ノックダウン細胞を作出し、IL-6 をはじめとした炎症刺激下において誘導される分子の mRNA 発現を quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) で解析した。また、SFRP4 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、レポーターアッセイを用いた IL-6 や NF- κ B のプロモーター活性を測定した。また、分子メカニズムを絞り込むため、SFRP4 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関わる分子の動態を評価した。さらに、SFRP4 を過剰発現させた細胞を用い、免疫沈降法を行うことで SFRP4 と結合する分子の探索を行った。次に、同様の現象がマウスでも見られるか確かめるため、皮膚炎マウスモデルを用いて SFRP4 のノックダウン実験を行った。続いて、ヒトでの rs16879765 および rs17171229 のリスクアレルの保有率を確かめるため、Dupuytren 拘縮患者およびコントロールとして手根管症候群患者の genotyping を行い、さらに Dupuytren 拘縮患者における当該 SNPs と SFRP の関係および炎症との関連を確かめるために、手掌腱膜組織を用いた SFRP4 および NF- κ B 経路の活性化マーカーであるリン酸化 NF- κ B p65、JAK-STAT3 経路の活性化マーカーであるリン酸化 STAT3 の免疫組織化学染色および手掌腱膜由来の線維芽細胞のサイトカイン刺激下での IL-6 の mRNA 発現の評価を行った。

【結果】 SFRP4 のノックダウンを行った細胞を TNF- α と IL-6 により刺激したところ、IL-6 の mRNA 発現は低下した。一方で、SFRP4 を過剰発現した細胞では IL-6 および NF- κ B のプロモーター活性が有意に亢進した。ウェスタンブロッティングの結果、SFRP4 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ていた。さらに SFRP4 のノックダウン細胞では NF- κ B p65 の核内移行が抑制されていた。SFRP4 は免疫沈降法で Skp, Cullin, F-box containing complex (SCF complex) を構成する因子の一つである β TrCP および I κ B α といった分子と結合することがわかった。また、マウス皮膚炎モデルにおいても SFRP4 のノックダウンにより炎症は抑制された。rs16879765 および rs17171229 のリスクアレルの保有率は Dupuytren 拘縮患者においてコントロールの手根管症候群患者と比較して上昇していた。Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜を用いた免疫組織化学染色では、SFRP4、リン酸化 NF- κ B p65 およびリン酸化 STAT3 の発現は当該 SNPs のリスクアレル保有例において上昇していた。さらに Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜由来の線維芽細胞においてもサイトカイン刺激後の IL-6 の発現はリスクアレル保有例において上昇していた。

【考察】in vivo、in vitro いずれにおいても SFRP4 のノックダウンにより IL-6 アンブが抑制された。SFRP4 は β TrCP および I κ B α と結合することでこれらの分子間の架橋を形成し、NF- κ B 経路における I κ B α の SCF complex によるユビキチン化およびプロテアソームによる分解において重要な役割を果たしていると考えられた。また、リスクアレルを保有する Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜では、SFRP4 の発現が上昇していることから、rs16879765 および rs17171229 は SFRP4 を介して Dupuytren 拘縮における IL-6 アンブの活性化に寄与していると考えられた。本研究の結果、IL-6 アンブ及び SFRP4 は Dupuytren 拘縮の発症早期における治療標的となる可能性が示唆された。

【結論】Dupuytren 拘縮において rs16879765 および rs17171229 は SFRP4 を介して NF- κ B 経路を活性化し、炎症を増悪させる分子である。