



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_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 木田 博朗

	主査	教授	清野 研一郎
審査担当者	副査	准教授	北村 秀光
	副査	准教授	外丸 誌野

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)

Dupuytren 拘縮の病態において、遺伝的素因や炎症の関与が報告されているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。申請者は過去に非免疫細胞における NF- κ B と STAT3 による炎症増幅機構である IL-6 アンブを報告しており、IL-6 アンブを制御する 1000 種類以上の候補遺伝子を報告している。これと、Dupuytren 拘縮における GWAS 解析による既報の疾患関連 SNPs を照らし合わせることで、IL-6 アンブの正の制御因子かつ Dupuytren 拘縮の疾患関連遺伝子(rs16879765 および rs17171229)が関与する遺伝子である SFRP4 に着目した。申請者は、SFRP4 が Dupuytren 拘縮において IL-6 アンブを活性化させ、疾患の発症および進行に携わると仮説を立てた。申請者は、まず SFRP4 をノックダウンした細胞を用いて qPCR を行うことで、SFRP4 が IL-6 アンブの中でも特に NF- κ B 経路に作用していることを示した。さらに、ウェスタンブロッティングにより、SFRP4 は NF- κ B 経路中の I κ B α の分解よりも上流に作用していることを明らかにした。そして免疫沈降法を用いることで、SFRP4 が SCF complex を構成する β TrCP および I κ B α に結合することを示し、これらを架橋することで I κ B α の分解を導き、NF- κ B 経路を促進させ、IL-6 アンブを活性化していると考えた。また当該疾患関連遺伝子(rs16879765 および rs17171229)のリスクアレル頻度は既報と同様に Dupuytren 拘縮患者において健常群より上昇しており、またリスクアレルを保有する Dupuytren 拘縮症例において、線維芽細胞中の SFRP4 の mRNA の発現が非保有例と比較し上昇していることを示した。また、免疫組織染色の結果、リスクアレルを保有する Dupuytren 拘縮症例において、リスクアレル非保有例と比較してリン酸化 NF- κ B およびリン酸化 STAT3 の染色率は上昇しており、リスクアレル保有による IL-6 アンブの活性化が示唆された。これらの結果から、Dupuytren 拘縮の当該疾患関連遺伝子(rs16879765 および rs17171229)のリスクアレル保有は、線維芽細胞中の SFRP4 発現を上昇させ、これにより β TrCP および I κ B α の架橋促進による NF- κ B 経路の活性化を生じ、その結果 IL-6 アンブの活性化が起こり、疾患の発症や進行に寄与していると考えられた。本研究の Limitation として、疾患の主病態である線維化についての実験的評価が乏しいことが挙げられ、今後疾患を模した線維化

モデルを作出することで、SFRP4 の線維化に対する機能評価が必要である。

審査にあたり、まず副査の北村准教授から、Dupuytren 拘縮に男性が多い理由およびその遺伝的要因と関連性について質問があり、申請者は現時点では男性の罹患者が多いことに対する遺伝的知見に基づいた報告はないものの、疾患のリスクファクターとして外傷があることから、男性において肉體労働による手掌腱膜の微小な蓄積を契機とした Dupuytren 拘縮が多いことによる可能性があるという回答した。さらに、SFRP4 は局所に発現するものか、あるいは全身性に発現するものかという質問に対し、申請者は全身の臓器において発現が報告されていると回答した。また、マウス皮膚炎モデルにおける、siRNA は非免疫細胞のみならず炎症性細胞における炎症抑制を見ている可能性について質問があり、申請者は、本モデルは角化細胞等の皮膚表層の細胞における炎症を主座としており、siRNA も同部に作用し、その炎症抑制作用を定量的に評価していると考ええるが、実際にはそれらの細胞における炎症の結果動員される炎症性細胞に対しても作用している可能性があり、今後炎症細胞浸潤を組織的に評価する等、詳細な評価を検討したいと回答した。

次に副査の外丸准教授から、Dupuytren 拘縮に関する既報の 29 種類の SNPs に関して、本研究において着目した 2 種類の SNPs (rs16879765 および rs17171229) 以外には、過去に報告して言う IL-6 アンブの制御遺伝子と関与するものはなかったかという質問があり、申請者は当該の 2 種類以外にはなかったと回答した。また、ノックダウン細胞を使用した実験において、H4 細胞や BC1 細胞を使用した理由について質問があり、申請者は、SFRP4 の機能を評価する上で、まず siRNA や shRNA といった手法を用いて、SFRP4 の十分なノックダウンが得られ、更に実験条件下においてサイトカイン刺激に対する反応性を顕著に確認できる細胞を優先した結果、H4 細胞や BC1 細胞を使用しており、線維芽細胞等を用いた場合に、十分なノックダウン効率が得られない、もしくは刺激による反応を確認できる条件の設定に現時点で至っていないと回答した。また、ヒト手掌腱膜の免疫組織染色の結果、どのような細胞がリン酸化 NF- κ B およびリン酸化 STAT3 の染色陽性となる傾向にあるのか、また、細胞のどの部分の染色を持って染色陽性と判断しているのかという質問に対し、申請者は、細胞核の染色をもって染色陽性と判断しており、殆どは紡錘形の線維芽細胞が染色されており、血管内皮細胞等の血管周囲に存在する細胞も染色が見られるが、これらは細胞核にとどまらない非特異的な染色であることが多く、定量的評価の際には除いていると回答した。

最後に主査の清野教授から、本研究が明らかとした事は、Dupuytren 拘縮の病態における SFRP4 による NF- κ B 経路の活性化およびそれに伴う炎症の促進と考えられるが、「IL-6 アンブ」の活性化という表現をあえて用いる意義について質問があり、申請者は、非免疫細胞における NF- κ B と STAT3 の同時活性化により定義される IL-6 アンブが存在することは、ポジティブ・フィードバックによる炎症の増幅、遷延することを示唆しており、未だ病態の大部分が明らかとなっていない本疾患において重要な意義を持つと考えるため、IL-6 アンブという表現を用いていると回答した。

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。