



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15438
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91342
Type	doctoral thesis
File Information	KIDA_Hiroaki.pdf



学位論文

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)**

2023 年 3 月

北海道大学

木田 博朗

Kida Hiroaki

学位論文

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)**

2023 年 3 月

北海道大学

木田 博朗

Kida Hiroaki

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	4 頁
緒言	6 頁
実験方法	9 頁
結果	18 頁
考察	47 頁
総括および結論	49 頁
謝辞	50 頁
利益相反	51 頁
引用文献	52 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。

Hiroaki Kida, Jing-Jing Jiang, Yuichiro Matsui, Ikuko Takahashi, Rie Hasebe, Daisuke Kawamura, Takeshi Endo, Hiroki Shibayama, Makoto Kondo, Yasuhiko Nishio, Kinya Nishida, Yoshihiro Matsuno, Tsukasa Oikawa, Shimpei Kubota, Shintaro Hojyo, Norimasa Iwasaki, Shigeru Hashimoto, Yuki Tanaka, and Masaaki Murakami

Dupuytren's contracture-associated SNPs increase SFRP4 expression in nonimmune cells including fibroblasts to enhance inflammation development.

International Immunology、accept 後

本研究の一部は以下の学会に発表した。

木田 博朗、松井 雄一郎、高橋 郁子、岩崎 倫政、村上 正晃

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

第36回日本整形外科学会基礎学術集会、三重県、2021年10月14 - 15日 一般口演

木田 博朗、松井 雄一郎、高橋 郁子、岩崎 倫政、村上 正晃

Analysis of disease-associated SNPs and inflammatory mechanisms in Dupuytren's contracture

第50回日本免疫学会学術集会、奈良県、2021年12月8 - 10日 ポスター

Hiroaki Kida, Yuichiro Matsui, Ikuko Takahashi, Norimasa Iwasaki, Masaaki Murakami

Analysis of disease-associated SNPs and inflammatory mechanisms in Dupuytren's contracture

Orthopaedic Research Society 2022 Annual Meeting, Tampa, February 4 - February 8, 2022, oral

木田 博朗、松井 雄一郎、高橋 郁子、岩崎 倫政、村上 正晃

Dupuytren拘縮における疾患関連SNPsと炎症誘導機構の解析

第 65 回日本手外科学会学術集会、福岡県、2022 年 4 月 14 - 15 日 一般口演

Hiroaki Kida, Yuichiro Matsui, Ikuko Takahashi, Norimasa Iwasaki, Masaaki Murakami

Analysis of Inflammatory mechanisms and a disease-associated gene in Dupuytren's Contracture

American Society for Surgery of the Hand Annual Meeting, Boston, September 29 - October 2, 2022, poster

要旨

【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 アンプを報告している。また、IL-6 アンプ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 アンプ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 アンプを活性化させ、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 アンプの存在を示すこと、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 プロモーターや NF- κ B p65 binding site の活性を測定した。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 SFRP4 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 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 プロモーターおよび NF- κ B p65 binding site の活性が有意に亢進した。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。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 と結合することがわかった。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、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 アンプが抑制された。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 アンプ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 アンプ及び 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。

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。

βTrCP	β-transducin repeat-containing protein
cDNA	complementary DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EPDR1	ependymin-related protein 1
FBS	fetal bovine serum
FLS	Fibroblast-like synoviocyte
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GWAS	Genome wide association study
HDF	Human Dermal Fibroblasts
HEK293T	Human Embryonic Kidney cells 293 T cell
IκBα	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IKK	IκB kinase
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 receptor
IP	Immunoprecipitation
JAK	Janus kinase
MCP	Metacarpophalangeal
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
PBS	Phosphate buffered saline
PIP	Proximal interphalangeal
qPCR	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
RBX1	Ring-Box 1
RIP	Receptor interacting protein
SCF complex	Skp, Cullin, F-box containing complex
SFRP4	Secreted frizzled-related protein 4
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 necrosing 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

Dupuytren 拘縮は手掌腱膜の進行性の線維性増殖を特徴とし、手指の屈曲拘縮（伸展制限）を来す慢性炎症性疾患である (Bianchi et al., 2015)。欧米では 55 歳の 22%、75 歳では 29%が Dupuytren 拘縮に罹患しており (Lanting et al., 2014)、一般に、環・小指の罹患が多く、PIP (Proximal interphalangeal) 関節および MCP (Metacarpophalangeal) 関節の可動域制限を来す (Feldman et al., 2017)。本疾患は手掌腱膜における nodule と呼ばれる結節の形成から始まり、病状の進行とともに nodule が徐々に cord とよばれる索状組織を形成し、手指の拘縮を引き起こす。これにより日常生活動作や職務において深刻な制限を生じ、患者の生活の質を低下させる (Wilburn et al., 2013)。手術以外の治療法として、局所へのコラゲナーゼ注射療法があるが、2019 年以降開発元からの国内への供給が停止しており、現在本邦では使用できない状況である。そのため本邦では、進行した症例に対する手術治療以外に有効な治療法はない。さらにコラゲナーゼ注射、手術治療ともに、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。

本疾患の病態として、線維芽細胞の異常増殖及び筋線維芽細胞への分化による細胞外基質の過剰な堆積が考えられている。また、アルコール摂取、喫煙、糖尿病、低体重、低 BMI、重労働や振動への暴露等が本疾患のリスク因子として知られている (Liss et al., 1996; Burge et al., 1997; Gudmundsson et al., 2000; Godtfredsen et al., 2004; Descatha et al., 2011)。さらに、Dupuytren 拘縮は家族内での発症が多く、遺伝的素因の関与が強く疑われている (LING, 1963)。近年、Dupuytren 拘縮におけるゲノムワイド関連解析 (Genome wide association study : GWAS) の結果、約 30 種類の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) が明らかとなっている (Dolmans et al., 2011; Becker et al., 2015; Ng et al., 2017)。しかし、詳細な病態やその分子機構は明らかとなっていない。

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)。これら正の制御因子の一つである SFRP4 (Secreted frizzled-related protein 4) は Dupuytren 拘縮に関する GWAS 解析により明らかとなった 2 つの疾患関連 SNPs (rs16879765 and rs17171229) に関与する遺伝子であった。SFRP4 は分泌性の糖タンパクであり、Wnt や frizzled receptor と結合し、Wnt signaling pathway を阻害することが知られている (Miller, 2002; Pawar et al., 2018)。しかし、Dupuytren 拘縮における SFRP4 の機能は明らかとなっていない。そこで我々は、IL-6 アンプが Dupuytren 拘縮においても存在し、疾患の発症および進行に重要な役割を果たしているとの仮説を立て、本仮説を検証するために、Dupuytren 拘縮における IL-6 アンプの存在を示すこと、さらにその分子制御機構を解明することを目的とし研究を行った。

本研究ではこれらの SNPs のリスクアレルをもつ Dupuytren 拘縮患者では、SFRP4 の発現が上昇し、炎症性疾患の進行において重要である IL-6 アンプが活性化されることを示した。また、機能的解析により非免疫細胞において SFRP4 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、SFRP4 は I κ B α 及び β TrCP 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 SFRP4 は Dupuytren 拘縮を含む様々な炎症性疾患の新たな治療標的となりうることを示されたのでここに報告する。

IL-6 amplifier (IL-6アンプ)

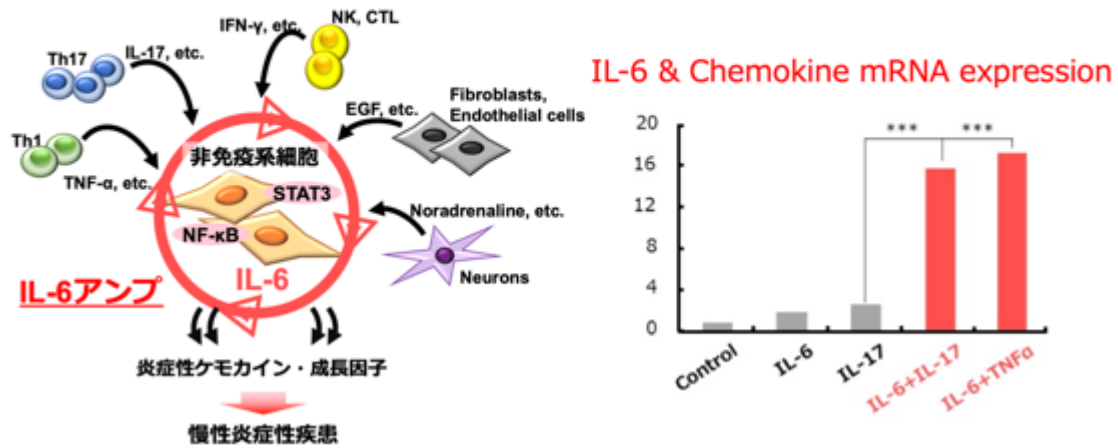


図1. IL-6 アンプの模式図

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 およびヒト皮膚線維芽細胞 (Human Dermal Fibroblasts; HDF) は、ATCC (Sumitomo Dainippon Pharma, Osaka, Japan) 、 CELLnTEC (Bern, Switzerland) 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 ; Life Technologies) に 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum ; FBS) (Thermo Scientific) 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 IL-17 (R&D Systems) 50 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 SFRP4 抗体 (ab154167、abcam)、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)、抗 SKP1 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 RBX 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 Bmi1 抗体 (Cell Signaling Technology)、horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ラビット IgG 抗体 (Southern Biotech)、抗ウサギ Alexa Fluor-488 標識抗体 (Invitrogen)

3 プラスミド

Flag タグ融合 SFRP4 発現プラスミド DNA を、次の手順で作成した。

ヒト SFRP4 をコードする cDNA はかずさ DNA 研究所より購入した。これを制限酵素処理した (Bam HI, Sal I in high buffer; Takara)。また pCMV-Tag2B ベクターも同様に制限酵素処理した。処理した SFRP4 及び pCMV-Tag2B 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、カナマイシン含有 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、カナマイシン含有 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 SFRP4 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 Cell Lysis 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、マウス由来細胞では HPRT を、ヒト由来細胞では GAPDH 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 HPRT	Forward	5'-GAAGCGAGAGAACCAGG-3'
	Reverse	5'-CC CCCACCCCAGACA-3'
Mouse IL-6	Forward	5'-GAGGAACCACCCCAACAGACC-3'
	Reverse	5'-AAG GCACACG GCAACA-3'
Mouse STAT3	Forward	5'-CACCTTGGATTGAGAGTCAAGAC-3'
	Reverse	5'-AGGAATCGGCTATATTGCTGGT-3'
Mouse CCL20	Forward	5'-CGACTGTTGCCTCTCGTACA-3'
	Reverse	5'-GAGGAGGTTACAGCCCTTT-3'
Mouse CXCL1	Forward	5'-ACCCGCTCGCTTCTCTGT-3'
	Reverse	5'-AAGGGAGCTTCAGGGTCAAG-3'
Mouse COL1	Forward	5'-GACGCCATCAAGGTCTACTG-3'
	Reverse	5'-ACGGGAATCCATCGGTCA-3'
Mouse COL3	Forward	5'- CGTAAGCACTGGTGGACAGA-3'
	Reverse	5'- CGGCTGGAAAGAAGTCTGAG-3'
Human GAPDH	Forward	5'-GAGCAACGGAGGCG-3'
	Reverse	5'-CGCCCGGAAGAGGG-3'
Human IL-6	Forward	5'-GGAGACTTGCCTGGTGAAAA-3'
	Reverse	5'-GTCAGGGGTGGTTATTGCAT-3'
Human TGF- β	Forward	5'-GGCCAGATCCTGTCCAAGC-3'
	Reverse	5'-GTGGGTTTCCACCATTAGCAC-3'
Human CCL2	Forward	5'-CAGCCAGATGCAATCAATGCC-3'
	Reverse	5'-TGGAATCCTGAACCCACTTCT-3'
Human STAT3	Forward	5'- ACCAGCAGTATAGCCGCTTC -3'
	Reverse	5'- GCCACAATCCGGGCAATCT -3'
Human SFRP4	Forward	5'-CTGCCCCATCAAGATGTTCT-3'
	Reverse	5'-CGGCTGTTTTCTTCTTGTCC-3'

5 ヒト SFRP4 に対する small interfering RNA (siRNA)を用いた遺伝子ノックダウン

H4 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-SFRP4 (1: s1720, 2: s1721, Ambion), human si-p65 (SASI_Hs01_00171090; Sigma-Aldrich) and 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 ヒトおよびマウス SFRP4 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 BC-1 細胞および HDF 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 を含むウイルス粒子 non-target shRNA, Sigma Mission SHC002V; SFRP4 shRNA-1, TRCN0000034490, CCAGATATGATGGTGCAAGAA; and SFRP4 shRNA-2, TRCN0000034491, CAGTCCTAAGAAGAACATCAA Sigma-Aldrich for BC1-cells and non-target shRNA, Sigma Mission SHC002V; SFRP4 shRNA-1, TRCN0000014488, CGACCTAATATGTGCATTGTA; and SFRP4 shRNA-2, TRCN0000014492, GCCAGTCCCAAGAAGAACATT; Sigma-Aldrich for HDF) 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 (5 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、すべて 10 cm 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、1 ml の PBS とセルスクレーパー (住友ベークライト) 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。全細胞成分分画の抽出には高塩濃度の細胞溶解バッファー (NaCl 600 mM) を用いて細胞を溶解した後、十分な vortex を行い、超音波処理 (30 秒間隔で 5 分間 $\times$ 2 回) を行い、15,000rpm、20 分間で遠心を行なった後、細胞残渣を除いた上清を全細胞成分分画として回収した。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。まず、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、2% Bovine serum albumin; BSA, Sigma-Aldrich)あるいは Block ACE (雪印メグミルク株式会社)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、day 1, 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 SFRP4 に特異的な siRNA、NF-κB 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 μl に siRNA 9.4 μl と生理食塩水あるいはイミキモド 5.0 μl 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ヤリパーで計測し、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 で遠心した後に上清を回収し、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 $\times$ 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い行った。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)、SFRP4 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 -RE/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 SFRP4 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 SFRP4 の局在評価のため、HDF を使用し shRNA を用いた SFRP4 ノックダウン

細胞およびコントロール細胞にを作出し、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℃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 SFRP4 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 ヒト手掌腱膜検体採取及び SFRP4 SNP シーケンス

北海道大学病院および共同研究施設において、手掌腱膜切除術を受けた Dupuytren 拘縮患者の病的手掌腱膜、及び対照群として手根管開放術を受けた手根管症候群患者の手掌腱膜組織を採取した。なお、全例において個々の患者からインフォームド・コンセントを取得しており、また本研究は北海道大学病院の倫理委員会によって承認された自主臨床研究『Dupuytren(デュピュイトラン)拘縮におけるインテグリンの関与 (臨床研究番号 自 015-0130)』の一環として実施した。

採取した組織の一部を速やかに分割切除し、DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出されたゲノム DNA に対して、SFRP4 の近傍にある 2 種類の疾患関連 SNPs (rs16879765, rs17171229) のアレルを確認する目的で PCR を施行した。使用したプライマーの配列は表 1 に示してある。KOD Fx (東洋紡ライフサイエンス) を用いて PCR を行い、SNP 前後 400 bp 程度の塩基長を増幅させた後に、PCR 産物を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した。精製した PCR 産物に対して BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス PCR を行なった。

表 1 SNP シーケンスに用いたプライマー配列

SNP	Sequence	
rs16879765	Forward	5'-GCCTCCACTTAGGTCTGCAG-3'
	Reverse	5'-GCTGTGGACATGGGTGTACA-3'
rs17171229	Forward	5'-GCCTCCACTTAGGTCTGCAG-3'
	Reverse	5'-GCTGTGGACATGGGTGTACA-3'

15 ヒト手掌腱膜由来線維芽細胞の培養

Dupuytren 拘縮または対照群手根管症候群の手掌腱膜を採取した後、PBS により 3 回洗浄し、周囲に付随する脂肪組織を除去した。その後、手掌腱膜組織を 1-3mm 厚、5mm 長に切り分け、組織片を 10 cm dish に配置し、滅菌した顕微鏡用スライドガラスにとり上から覆った。10% FBS および 1% penicillin/streptomycin/添加 DMEM を 10ml 加え 37°Cかつ 5% CO₂ の条件下で放置し、培地は 3 日毎に交換した。細胞の組織片からの十分量の細胞遊走がみられた後、スライドガラス及び組織片を除去し、PBS により線維芽細胞を洗浄し、0.5 g/L trypsin and 0.53 mmol /L EDTA (Nacalai Tesque)を用いて細胞を収集した。その後、新たな 10 cm dish に移動した後、10% FBS 添加 DMEM により培養し、実験に用いた。

16 ヒト手掌腱膜組織を用いた免疫組織化学染色

パラフィンに包埋された Dupuytren 拘縮または手根管症候群患者の手掌腱膜検体からミクロトームにより 4 µm 厚で切り出した切片を 40°Cの蒸留水上に浮遊させた後、スライドガラスに切片を移し一昼夜乾燥させた。キシレンで脱パラフィンを行なった後、無水エタノールで検体を完全脱水させた。超純水で洗浄した後、抗原を賦活化する目的でクエン酸ナトリウムバッファー (pH6.0) に浸して 10 分間煮沸した。スライドガラスが室温に戻った後、超純水で洗浄し、内在性酵素を不活化するために 3%過酸化水素水で 5 分間処理した。ブロッキングは VECTASTAIN ABC KIT (Vector Laboratories)を用いた標準プロトコールで行なった。一次抗体には抗リン酸化 p65 抗体、抗リン酸化 STAT3 抗体を使用し、二次抗体にはビオチン標識抗ウサギ IgG モノクローナル抗体を使用した。発色基質としては DAB (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit、Vector Laboratories) を用いた

17 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 SFRP4 の IL-6 アンプへの関与についての検討

SFRP4 遺伝子の IL-6 アンプへの関与を明らかにするために、SFRP4 ノックダウン細胞を作製した。まず、ヒト H4 細胞に si-SFRP4 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 SFRP4 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 SFRP4 の mRNA レベルを測定してノックダウン効率を測定した (図 2)。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、SFRP4 のノックダウンにより IL-6 mRNA の発現誘導が抑制されることを確認した。

同様にマウス BC-1 細胞に SFRP4 shRNA および non-target shRNA を含むレンチウイルスを感染させ、puromycin による薬剤セクションを行い、SFRP4 ノックダウン細胞およびコントロール細胞を作出し、IL-6 と IL-17 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、同様に SFRP4 のノックダウンにより IL-6 mRNA の発現誘導が抑制されることを確認した。なお、qPCR によりマウス SFRP4 の mRNA を十分に検出できるプライマーを得られなかったため、WB により SFRP4 ノックダウンを確認した (図 3)。

次に SFRP4 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 binding site の活性をレポーターアッセイにより評価したところ、SFRP4 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 4)。

これらの結果から、SFRP4 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。

さらに *in vivo* における SFRP4 の生理学的役割について、マウスを用いた皮膚炎モデルを用いて検討した。その結果、イミキモドによる皮膚炎誘導においても SFRP4 ノックダウンにより皮膚炎の発症が有意に抑制された (図 5)。

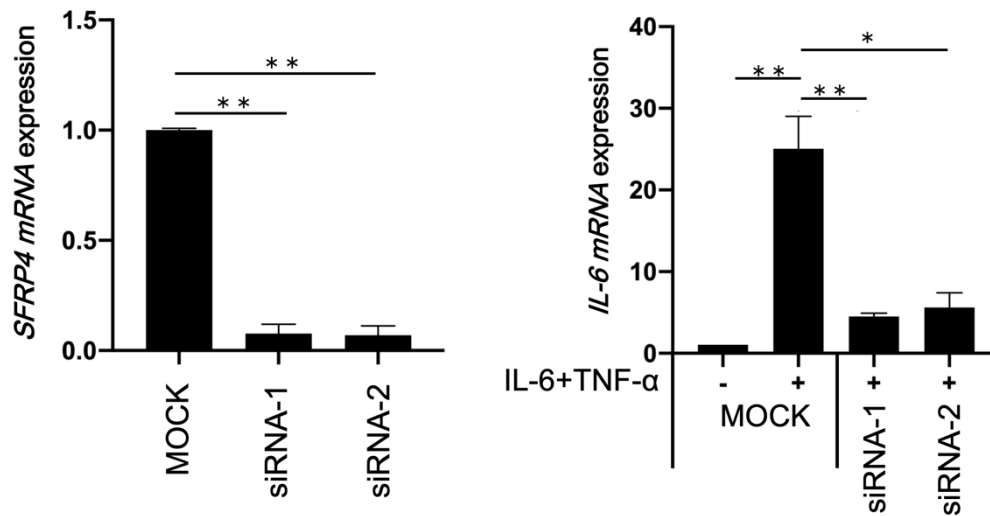


図 2. ヒト H4 細胞における SFRP4 ノックダウンによる *IL-6* mRNA 発現誘導に対する抑制効果

ヒト H4 細胞に si-SFRP4 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 SFRP4 ノックダウン細胞及びコントロール細胞 (mock) を作出した。SFRP4 の mRNA 発現量を qPCR により評価することで、SFRP4 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)。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、*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。** および*** は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.01、および 0.001 未満のものを示す。

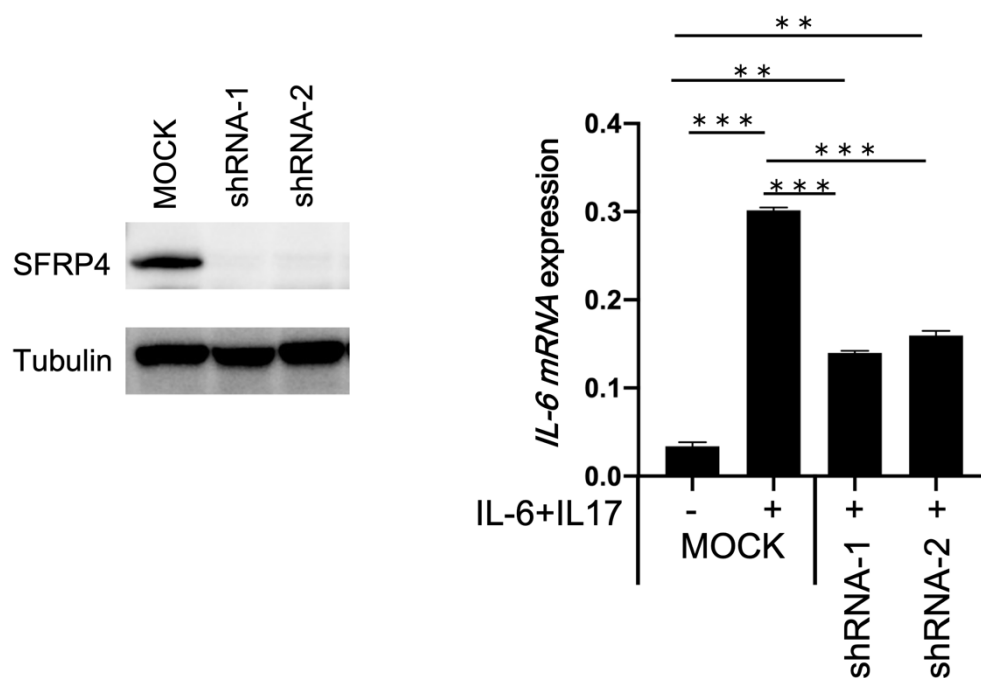


図 3. マウス BC-1 細胞における SFRP4 ノックダウンによる *IL-6* mRNA 発現誘導に対する抑制効果

Lentivirus による SFRP4 shRNA をマウス BC-1 細胞に感染させ、2 クローンの SFRP4 ノックダウン細胞株を樹立した。同様に、non-target shRNA を用いてコントロール細胞 (MOCK) も作製した。SFRP4 のノックダウンは WB により確認した (左図)。MOCK および SFRP4 ノックダウン細胞に対して IL-6 及び IL-17 で刺激した後の *IL-6* mRNA 発現量を qPCR で測定し比較した (右図)。内因性コントロールには HPRT 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。*、** 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、および 0.001 未満のものを示す。

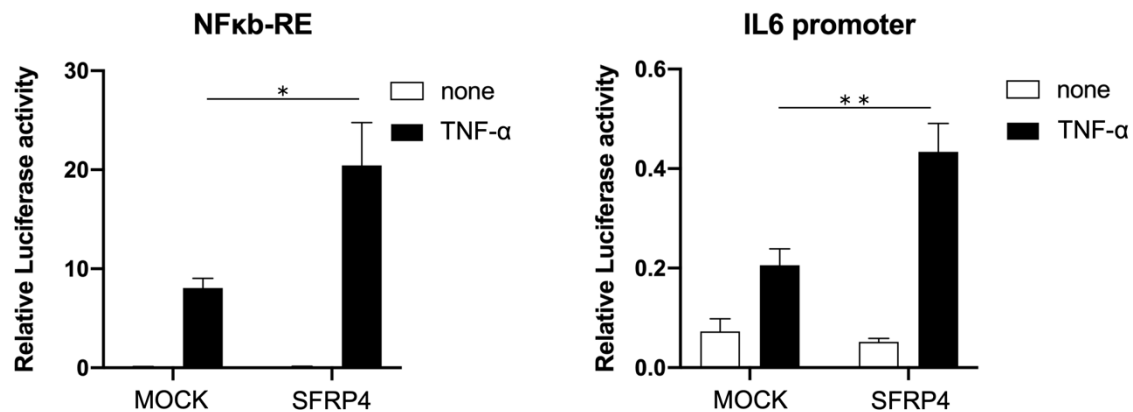


図 4. SFRP4 を強制発現させた HEK293T 細胞でのレポーターアッセイ

HEK293T 細胞へ SFRP4 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 p65 binding site (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。*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。

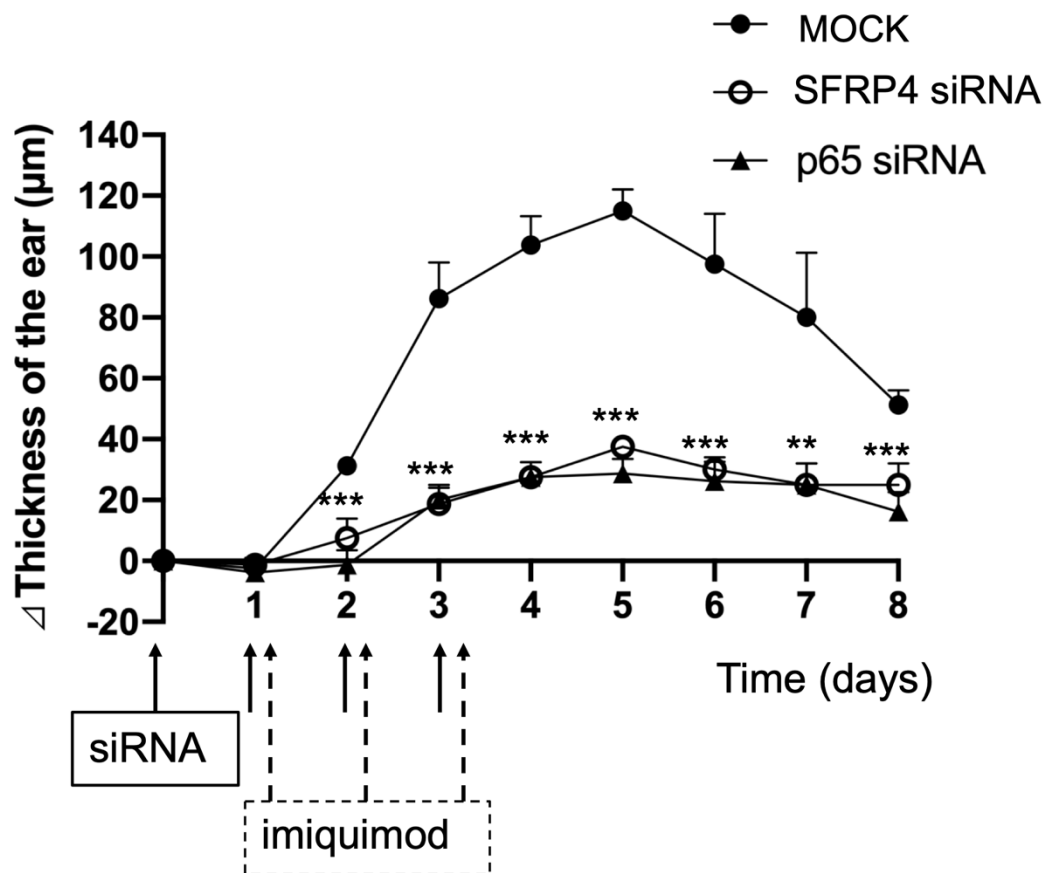


図5 皮膚炎モデルマウスの炎症活性における SFRP4 の役割

マウスの耳に non-target siRNA および SFRP4 siRNA、p65 siRNA を day 0、day 1 および day 2 に注入し、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。

2 SFRP4 と線維化関連因子についての検討

様々な疾患において慢性炎症は線維化をもたらすことが知られており (Wynn et al., 2012)、線維化の過程における主要なエフェクターの一つである TGF- β は Dupuytren 拘縮においても、線維芽細胞に作用し細胞外基質の堆積をもたらす、線維化に寄与することが知られている (Kloen et al., 1999; Krause et al., 2011)。そこで、SFRP4 のノックダウンに伴う IL-6 アンプの抑制に伴い、細胞における TGF- β 発現も抑制されるのではないかと考え、前述の実験と同様に siRNA を用いてヒト H4 細胞において SFRP4 をノックダウンし、IL-6 と TNF- α によるサイトカイン刺激を加え、TGF- β の発現を qPCR 法で測定した。しかし、サイトカイン刺激により TGF- β 発現は変化せず、また SFRP4 のノックダウンによる発現変化もみられなかった (図 6)。これについては、サイトカイン刺激の時間や、RNA 抽出のタイミング等の実験条件を検討し、炎症による TGF- β 発現が促進することを確認できる実験系を確立した上で、再度検討する必要があると考えられた。また、Dupuytren 拘縮の組織では、健常組織と比較し 3 型コラーゲン (COL3)/1 型コラーゲン (COL1) 比が上昇することが知られており、3 型コラーゲンの堆積がその病態において重要な役割を果たしていると考えられる (Bazin et al., 1980; Brickley-Parsonset al., 1981)。そこで、前述の実験と同様に shRNA により SFRP4 をノックダウンしたマウス BC-1 細胞を用いて、IL-6 と IL-17 によるサイトカイン刺激を行い 1 型および 3 型コラーゲンの発現を qPCR 法で測定した。その結果、いずれもサイトカイン刺激による有意な発現の変化はなかったが、SFRP4 のノックダウンにより 1 型コラーゲンの発現は変化していない一方で、3 型コラーゲンの発現は低下していた (図 7)。これにより、SFRP4 は平常状態の細胞における 3 型コラーゲンの発現に影響している可能性が示唆された。

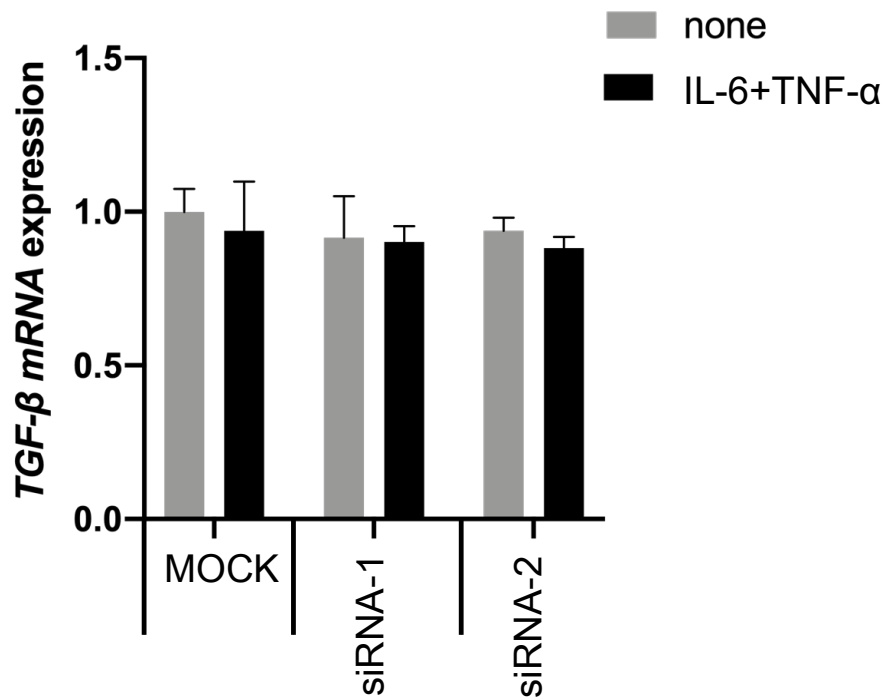


図 6. ヒト H4 細胞における SFRP4 ノックダウンによる TGF- β 発現の評価

図 2 と同じ、ヒト H4 細胞に si-SFRP4 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 SFRP4 ノックダウン細胞及びコントロール細胞 (MOCK) を用いた。これらの細胞を IL-6 及び TNF- α で刺激し、TGF- β の mRNA 発現量を qPCR により評価した。灰色および黒色の棒グラフは、それぞれサイトカイン刺激無しおよび有りを示す。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た。

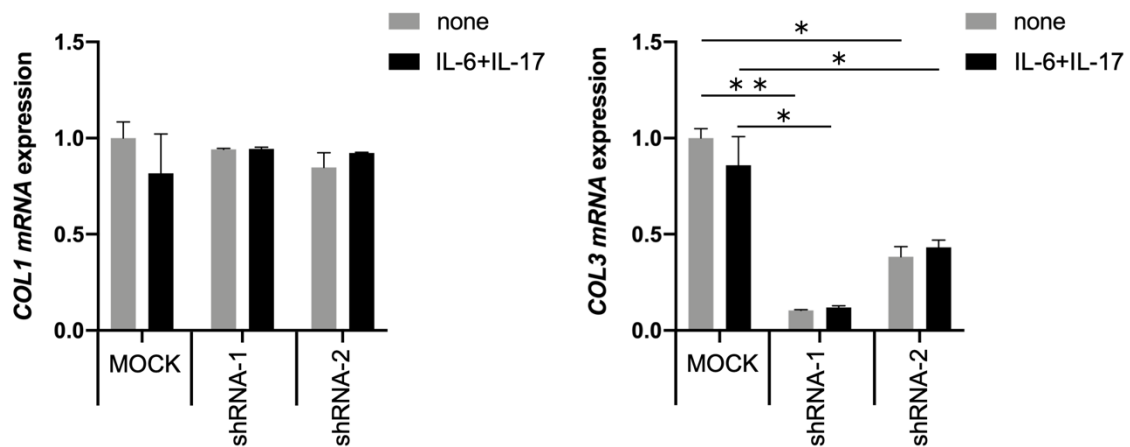


図7. マウス BC-1 細胞における SFRP4 ノックダウンによる 1 型および 3 型コラーゲン発現の評価

図3と同じ、shRNA を用いて SFRP4 をノックダウンしたマウス BC-1 細胞および non-target shRNA を用いたコントロール細胞 (MOCK) を使用した。これらの細胞に対して IL-6 及び IL-17 で刺激した後の 1 型 (左図) および 3 型 (右図) コラーゲンの mRNA 発現量を qPCR で測定し比較した。灰色および黒色の棒グラフは、それぞれサイトカイン刺激無しおよび有りを示す。内因性コントロールには HPRT 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。*および**は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.05 および 0.01 未満のものを示す。

3 SFRP4 の NF- κ B 経路への関与の同定

次に SFRP4 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 または shRNA による SFRP4 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 または IL-17 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 及び CXCL1 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および shRNA によるノックダウン細胞ともに、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 8、9)。

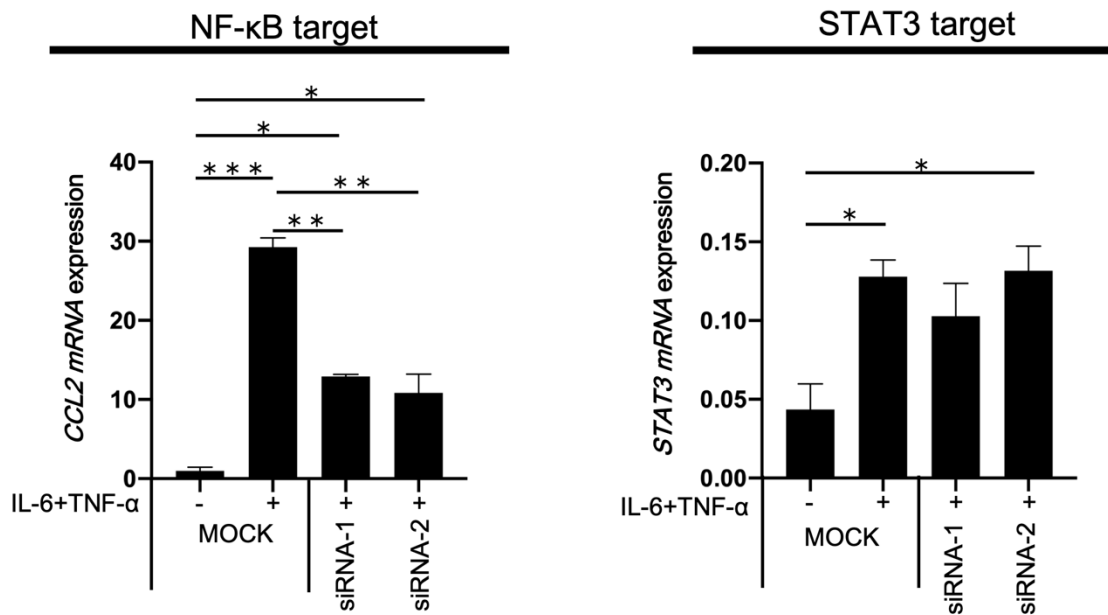


図 8. SFRP4 ノックダウン細胞におけるサイトカイン刺激後の CCL2、STAT3 mRNA 発現量の変化

SFRP4 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。*、** 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、および 0.001 未満のものを示す。

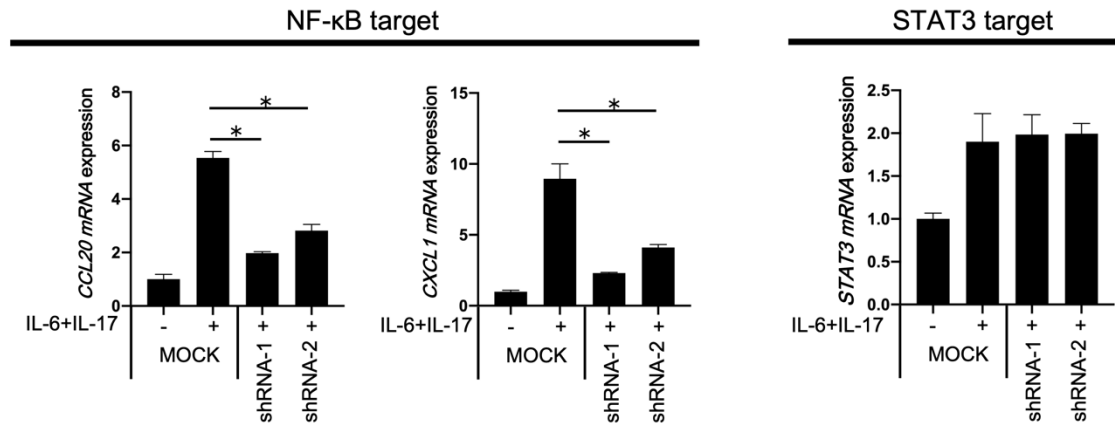


図 9. SFRP4 ノックダウン細胞におけるサイトカイン刺激後の CCL2、STAT3 mRNA 発現量の変化

SFRP4 shRNA によりノックダウンしたマウス BC-1 細胞を IL-17 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、CCL20 (左図)および STAT3 mRNA (右図)の発現量を評価した。CCL2, CCL20 の発現量は NF-κB 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。

4 SFRP4はNF- κ B経路においてI κ B α のリン酸化および分解の過程よりも上流で作用する

SFRP4は分泌性タンパク質であるが、細胞質内にも存在することが知られている (Ng et al., 2017; Pawar et al., 2018)。我々はSFRP4は細胞質内において機能していると仮説を立て、どのようにNF- κ B経路に関与しているかについて検討した。NF- κ B経路はIL-1、IL-17、あるいはTNF- α など様々な炎症性サイトカインにより活性化することが知られている。NF- κ B経路において転写活性を有する重要な分子の一つがp65分子である。p65は細胞質ではI κ B α (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha) と結合して非活性化状態で存在するが、先述したようなサイトカイン刺激によりIKK (I κ B kinase) 複合体のリン酸化を経てI κ B α がリン酸化され、プロテアソーム系により分解される。I κ B α が分解されたp65分子は536番目のセリン (Ser536) のリン酸化により活性化し、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 et al., 2008)。そこでまず、shRNAによりSFRP4をノックダウンしたHDFをTNF- α で0、5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、SFRP4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た (図10)。また同様にSFRP4をノックダウンしたBC-1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、p65の核内移行が抑制されていることがわかった (図11)。これらの結果は、SFRP4がNF- κ B経路においてI κ B α のリン酸化および分解の過程よりも上流で作用している可能性を示している。

なお、免疫細胞染色によりSFRP4の細胞質内における詳細な局在について評価するため、予備実験として先と同じくshRNAによりSFRP4をノックダウンしたHDFおよびnon-target shRNAを用いたコントロール細胞 (MOCK)を用いて、抗SFRP4抗体を使用し免疫細胞染色を行い、共焦点顕微鏡により観察した。最適な観察条件を検討するため、複数の細胞固定方法を用いて実験を行ったが、いずれもノックダウン細胞に特異的な染色像は得られず、現時点でSFRP4の詳細な局在評価には至らなかった (図12)。今後、SFRP4に特異的な染色による詳細な局在評価のため、抗体をより希釈して使用する、他の抗SFRP4抗体を用いるといった追加検討が必要と考えた。

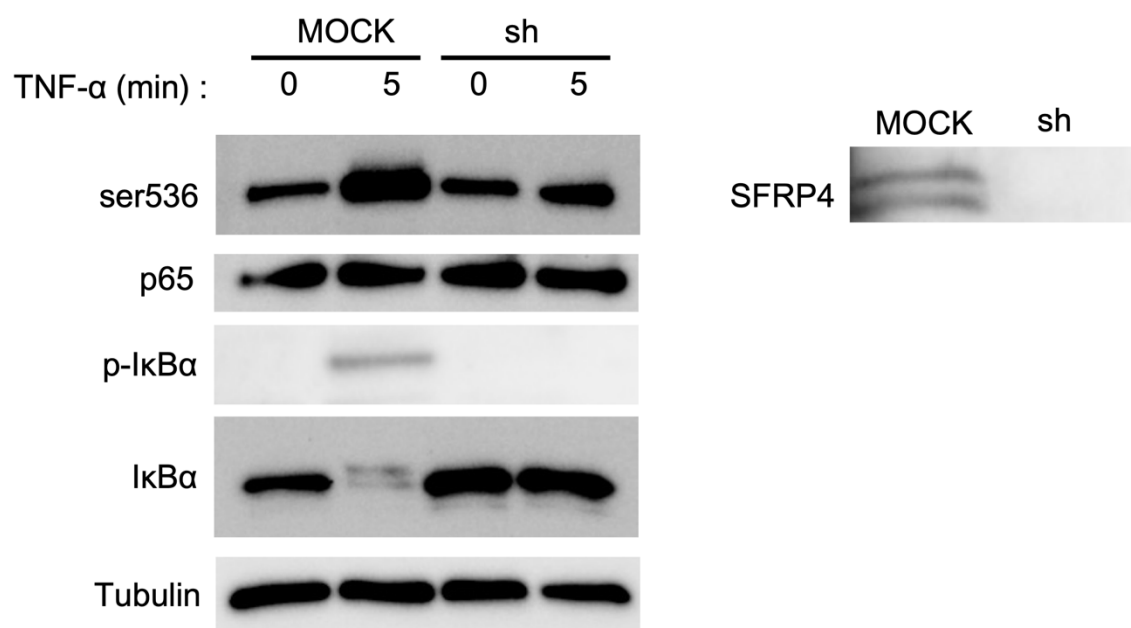


図 10. SFRP4 ノックダウンによる TNF- α 刺激依存的な I κ B α および Ser536 への影響
 SFRP4 をノックダウンした HDF およびコントロール細胞を 10 cm dish で培養し、TNF- α で 0、5 分間刺激した後に細胞を溶解した。細胞溶解物を WB に供試し、刺激依存的な I κ B α のリン酸化・分解および Ser536 のリン酸化を評価した。図は複数回行った実験のうち代表的なデータを示す。

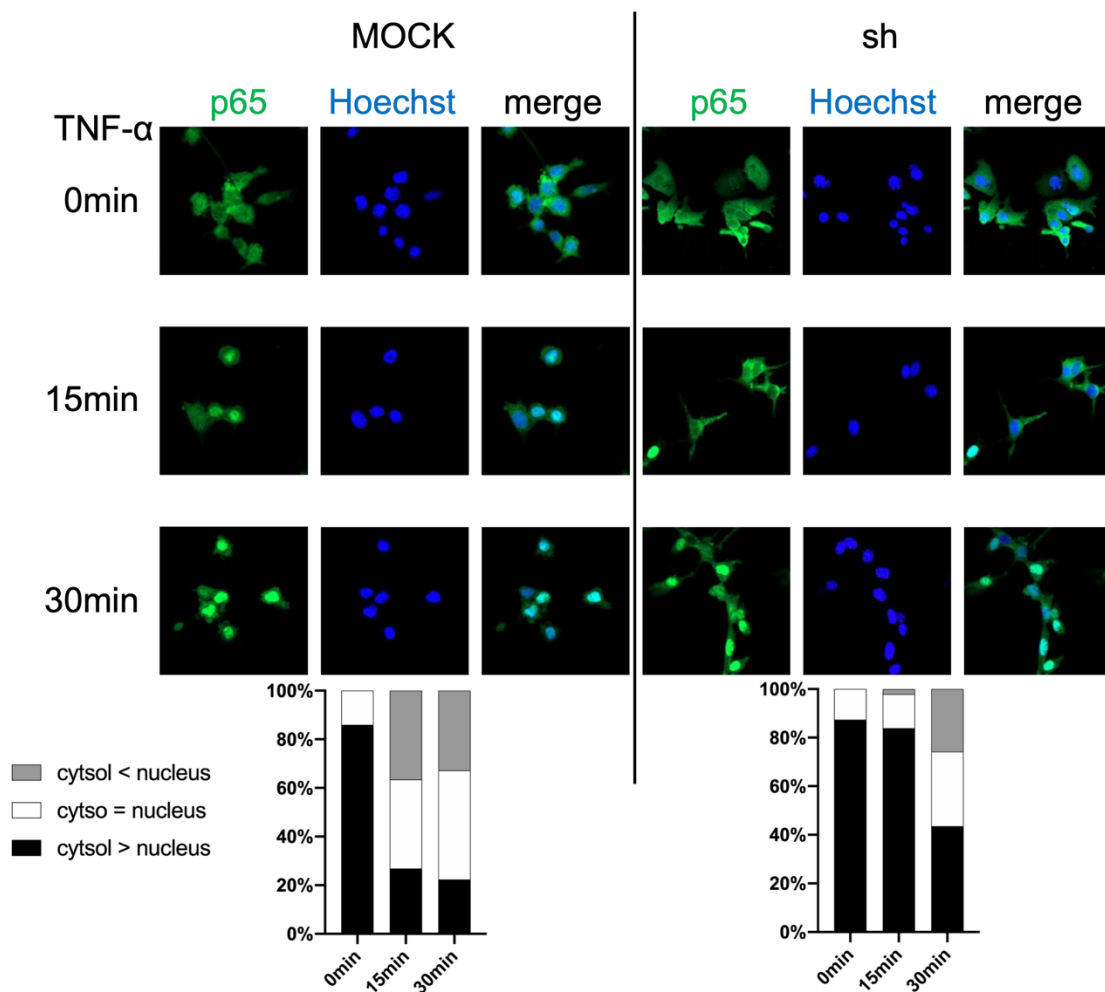


図 11. SFRP4 ノックダウンによる p65 の核内移行の変化

(上図) BC-1 に対して shRNA を用いて SFRP4 ノックダウン細胞およびコントロール細胞 (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、共焦点顕微鏡で p65 の核内移行を観察した。

(下図) (上図)の結果について、各サンプルにつき 500 個以上の細胞について p65 の核内移行の有無を計測した。図は複数回行った実験のうち代表的なデータを示す。

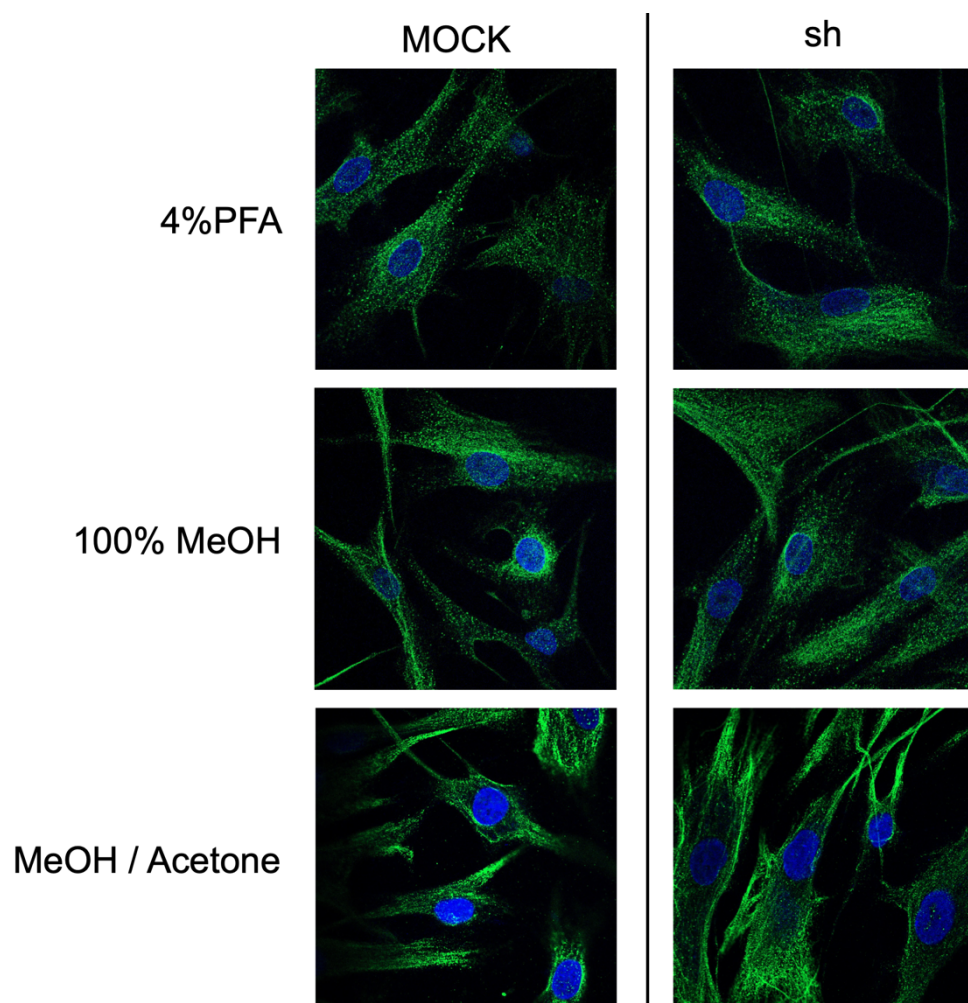


図 12. 抗 SFRP4 の抗体を用いた免疫細胞染色

HDF に対して shRNA を用いて SFRP4 ノックダウン細胞およびコントロール細胞 (MOCK) を作出し、抗 SFRP4 抗体を用いて免疫細胞染色を行った。固定には 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)を用いた。(緑 : SFRP4、青 : DAPI)

5 SFRP4 は SCF complex と結合することで I κ B α の分解に関与する

これまでの結果から、SFRP4 が NF- κ B 経路において I κ B α が分解を受ける過程よりも上流で機能していることが明らかとなった。そこで、本節では SFRP4 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 Serine (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) と複合体を形成後に下流の IKK 複合体を活性化し、I κ B α がリン酸化される。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、プロテアソームにより分解され NF- κ B 経路を活性化する。

HEK293T 細胞に FLAG タグを融合させた SFRP4 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 TNFR1 複合体および I κ B α 分解に関わる分子について WB を行った。その結果、SFRP4 は TRAF2、TRADD、RIP といった TNFR1 と関連する因子とは結合していなかった。一方で、SCF complex を構成するタンパク質の一つである β TrCP および I κ B α と結合していた (図 13)。このことから、SFRP4 は SCF complex に関連して機能する分子であることが示唆された。

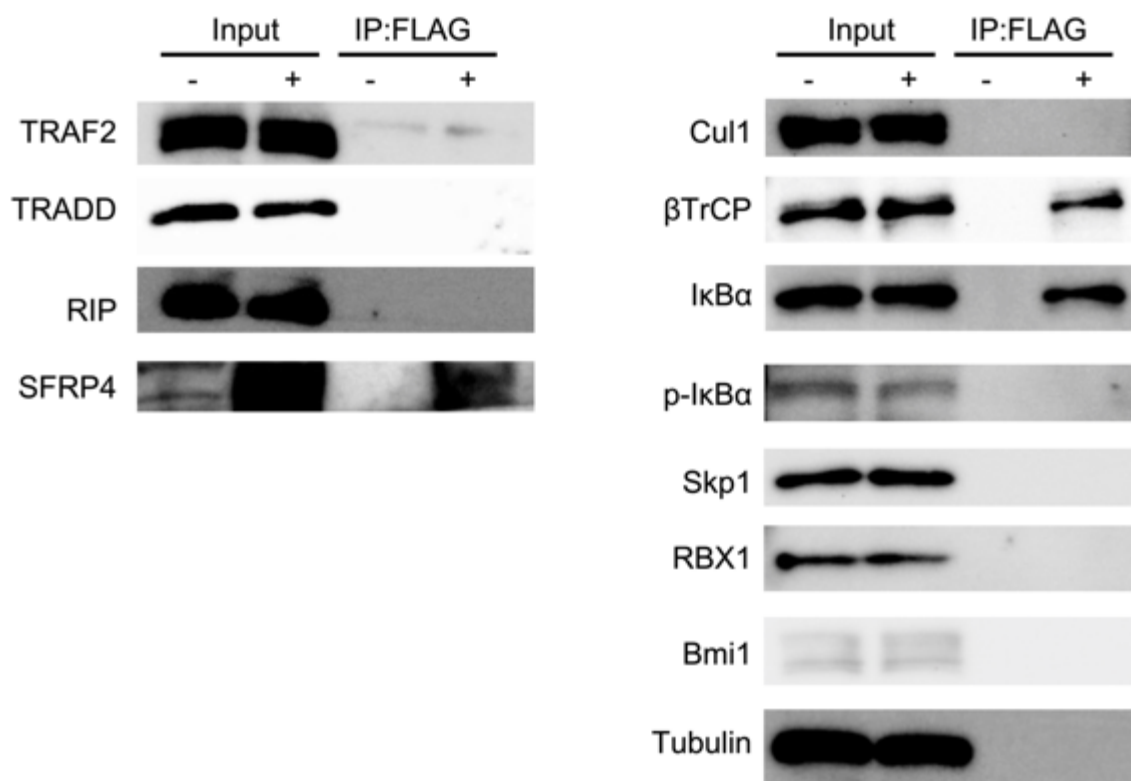


図 13. 免疫沈降法による SFRP4 結合分子の探索

HEK293T 細胞に SFRP4-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 SFRP4 はリスクアレルを保有する Dupuytren 拘縮患者において高度に発現している

次に、疾患関連 SNPs (rs16879765 and rs17171229) と SFRP4 の発現について検討した (図 14)。これら 2 種類の SNPs は SFRP4 遺伝子のコード領域中にはなく、rs16879765 は SFRP4 の約 4kb 上流で *ependymin-related protein 1* (EPDR1) 遺伝子のイントロン中に位置し、rs17171229 は SFRP4 の約 40kb 上流に位置している。まず、北海道大学病院整形外科および共同研究施設において手術を受けた 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を調べた。サンガー法により DNA シーケンスを行ったところ、これら 2 種類の SNP のリスクアレル動態は同様であり、連鎖不平衡の関係にあった。いずれの SNP も既報と同様に Dupuytren 拘縮患者においてリスクアレル保有例の割合は上昇していた (図 15) (Dolmans et al., 2011; Becker et al., 2016; Ng et al., 2017)。

これらの SNPs が Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜の線維芽細胞における SFRP4 発現に対してどのように影響しているのかを調べるため、Dupuytren 拘縮患者のサンプルを、rs16879765 および rs17171229 のリスクアレルの有無により 2 群に分けた。なお、前述の通りこれらの SNPs は連鎖不平衡にあり、一方の SNP 単独でリスクアレルを持つ症例はなかった (図 16)。Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜由来の線維芽細胞を培養し、SFRP4 の mRNA 発現を qPCR で評価し、リスクアレル保有例と非保有例で比較したところ、保有例においてその発現は有意に上昇していた (図 17)。

これらの結果から、rs16879765 および rs17171229 のリスクアレルを保有する Dupuytren 拘縮患者では、手掌腱膜における SFRP4 発現が上昇していると考えられた。

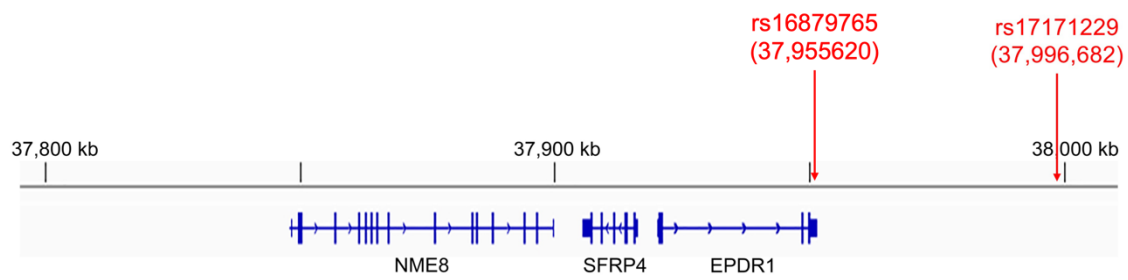


図 14. SFRP4 に関連する 2 種類の疾患関連 SNPs

2 種類の疾患関連 SNPs (rs16879765 and rs17171229) の遺伝子上の部位を示す。

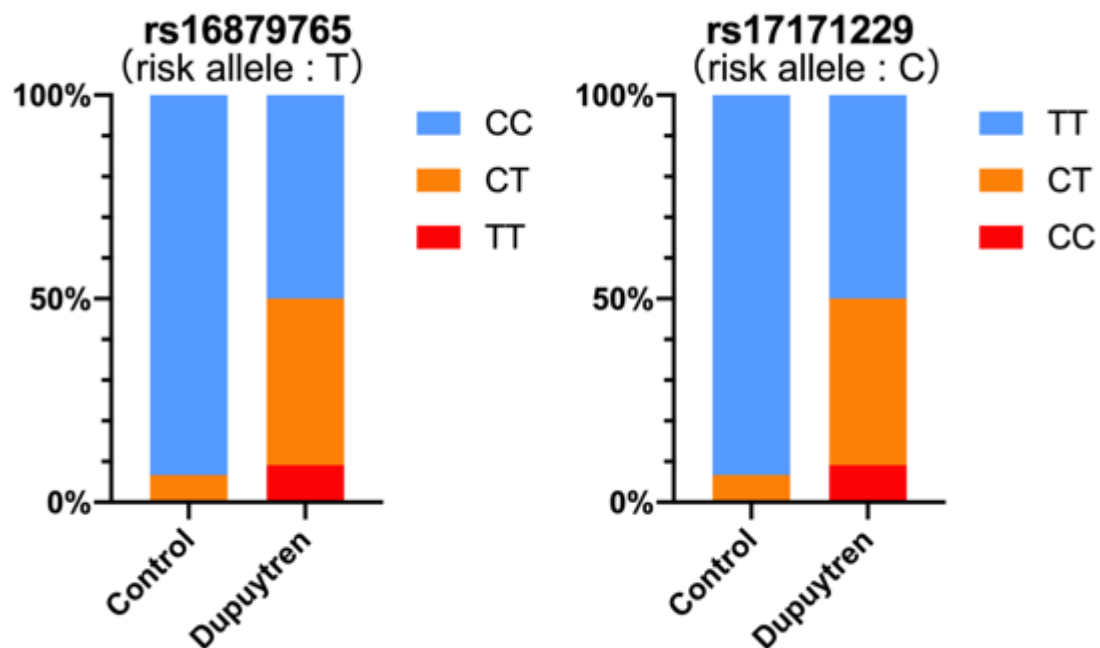


図 15. Dupuytren 拘縮患者および手根管症候群患者における SNPs (rs16879765 and rs17171229)の評価

手根管症候群 (コントロール) および Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜から抽出されたゲノム DNA を用いて、2 種類の疾患関連 SNPs (rs16879765 and rs17171229)を DNA シーケンスにより確認した。

sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
rs16879765	-	-	±	±	±	+	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	±	-	±
rs17171229	-	-	±	±	±	+	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	±	-	±

図 16. Dupuytren 拘縮患者における SFRP4 SNPs のリスクアレルの有無

Dupuytren 拘縮の各患者における rs16879765 および rs17171229 の保有アレルを示す。
+および±は、リスクアレルをそれぞれホモおよびヘテロで有することを示している。

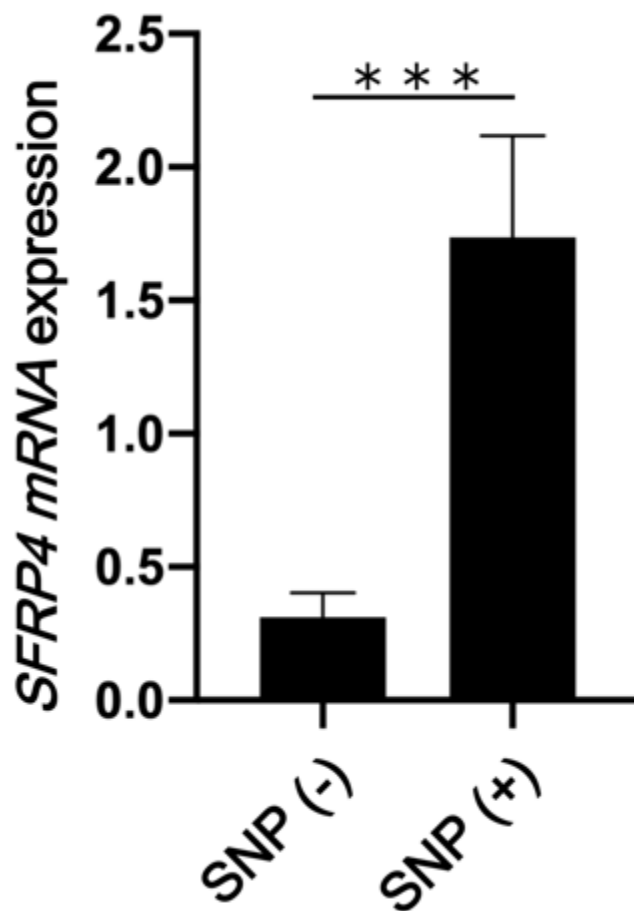


図 17. Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜由来線維芽細胞における SFRP4 の mRNA 発現の評価

Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜由来の線維芽細胞を培養し、SFRP4 の mRNA 発現を qPCR で評価し、リスクアレル保有例 (SNP (-)) と非保有例 (SNP (+)) で比較した。*** は、t 検定で比較した際の p 値が 0.001 未満であることを示す。

7 リスクアレル保有患者において、手掌腱膜の IL-6 アンプは活性化する

リスクアレルと IL-6 アンプの関係について検討した。Dupuytren 拘縮患者およびコントロールの手根管症候群患者の手掌腱膜組織で NF- κ B 経路の活性化を見るために抗リン酸化 p65 抗体 (phospho-p65 抗体)、JAK-STAT3 経路の活性化を見るために抗リン酸化 STAT3 抗体 (phospho-STAT3 抗体)を用いて IHC を行った。いずれの転写因子も刺激依存的に活性化すると核内に移行し、当該分子は特異的抗体によって核内で染色像が得られる。結果、phospho-p65、phospho-STAT3 とも Dupuytren 拘縮においてより強い染色像が見られ、さらにリスクアレル保有例において染色像が増強していた (図 18、19)。同様に、phospho-p65、phospho-STAT3 の共陽性を示す細胞 (double positive cell) の割合もリスクアレル保有例において上昇していた (図 20)。また、Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜由来の線維芽細胞を培養し、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、リスクアレル保有例においてその発現は上昇していた (図 21)。

これらの結果から、rs16879765 および rs17171229 のリスクアレルを有する患者は手掌腱膜における SFRP4 発現が上昇し、IL-6 アンプが活性化すると考えられた。

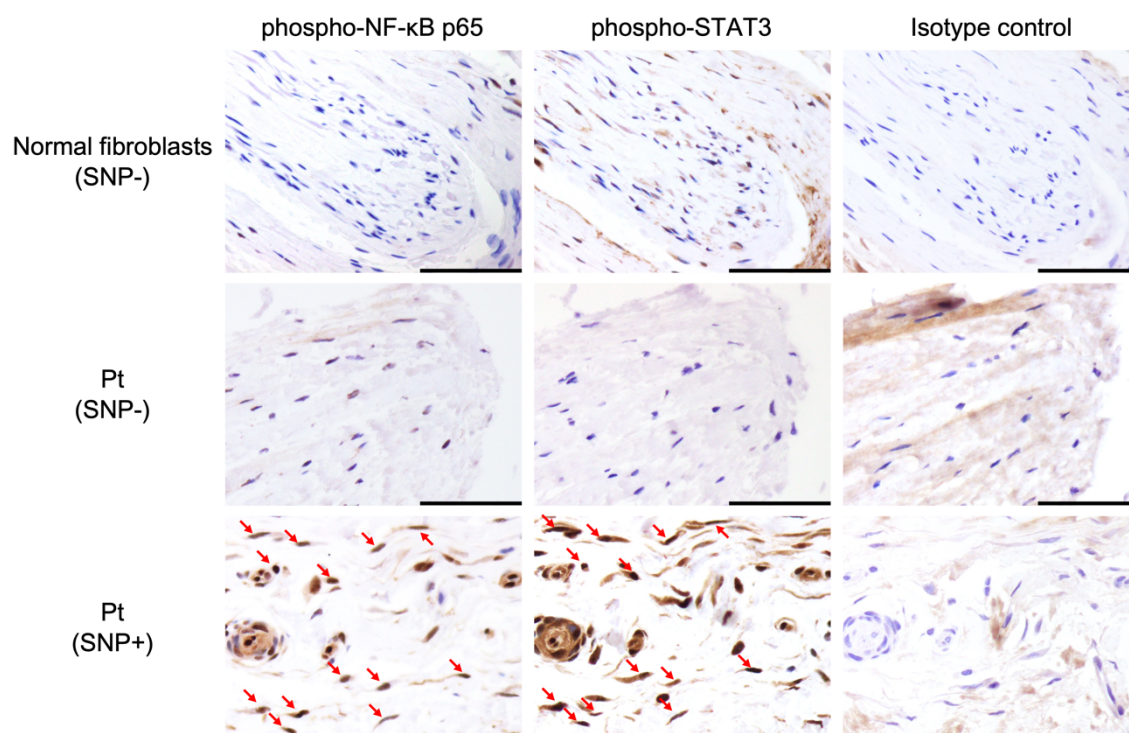


図 18. 手掌腱膜での炎症と SNPs (rs16879765 および rs17171229) の関係

手根管症候群 (Normal fibroblasts) および Dupuytren 拘縮 (Pt) の手掌腱膜におけるリン酸化 NF- κ B p65 とリン酸化 STAT3 の免疫組織化学染色を行った。赤矢印はリン酸化 p65 とリン酸化 STAT3 の両方が陽性の細胞を示す。スケールバー 100 μ m。

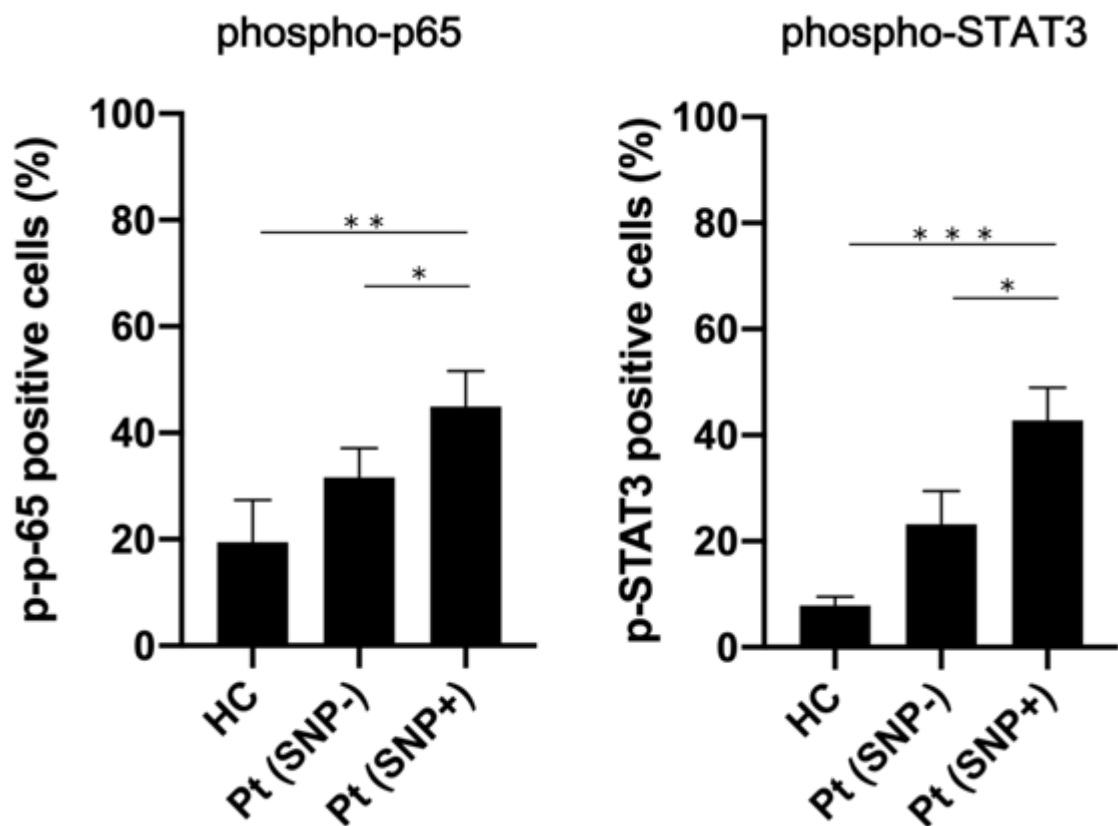


図 19. Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜組織染色におけるリン酸化 p65 とリン酸化 STAT3 の定量解析

図 15 で得られた IHC における、リン酸化 p65 とリン酸化 STAT3 の染色陽性細胞率を示す。*、** 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、および 0.001 未満のものを示す。

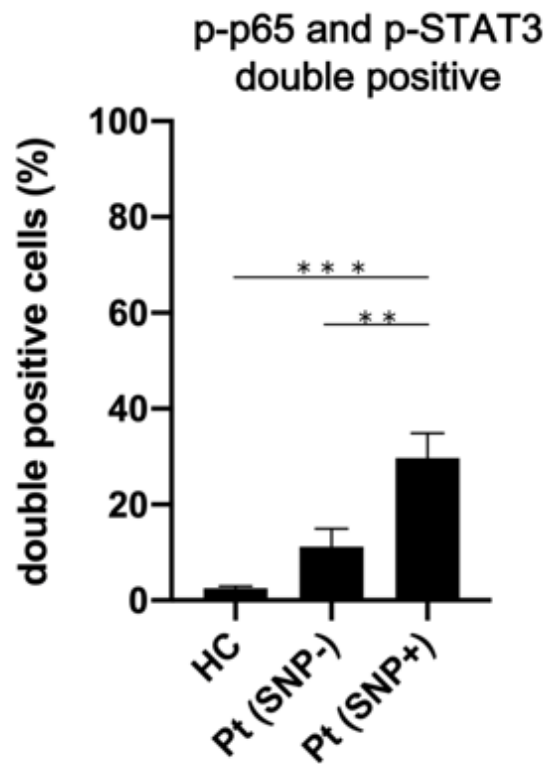


図 20. Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜組織染色におけるリン酸化 p65 とリン酸化 STAT3 の共陽性細胞の定量解析

図 15 で得られた IHC における、リン酸化 p65 とリン酸化 STAT3 の共陽性細胞の割合を示す。** および*** は、t 検定で比較した際の p 値がそれぞれ 0.01、および 0.001 未満のものを示す。

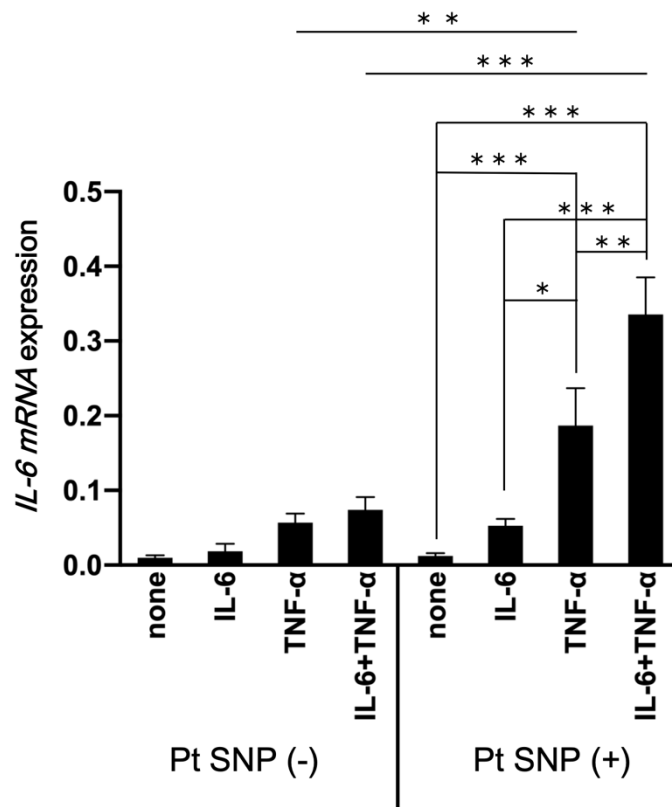


図 21. Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜由来線維芽細胞のサイトカイン刺激後の *IL-6* mRNA 発現の評価

Dupuytren 拘縮患者の手掌腱膜由来の線維芽細胞を培養し、IL-6 又は TNF- α によるサイトカイン刺激を行い IL-6 mRNA 発現量を qPCR 法で測定した。*、** 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、および 0.001 未満のものを示す。

8 SFRP4 の細胞外での作用の解析

SFRP4 は細胞内のみでなく細胞外に分泌されるタンパク質であることが知られている。そこで我々は、HDF において、予め SFRP4 リコンビナントプロテインを投与した上で、TNF- α 及び IL-6 による刺激を行い、IL-6 の mRNA の発現を qPCR により評価した (図 22)。結果、SFRP4 リコンビナントプロテインの添加により IL-6 の mRNA 発現は上昇しており、SFRP4 が細胞外においても IL-6 アンブ活性化に寄与している可能性が考えられた。

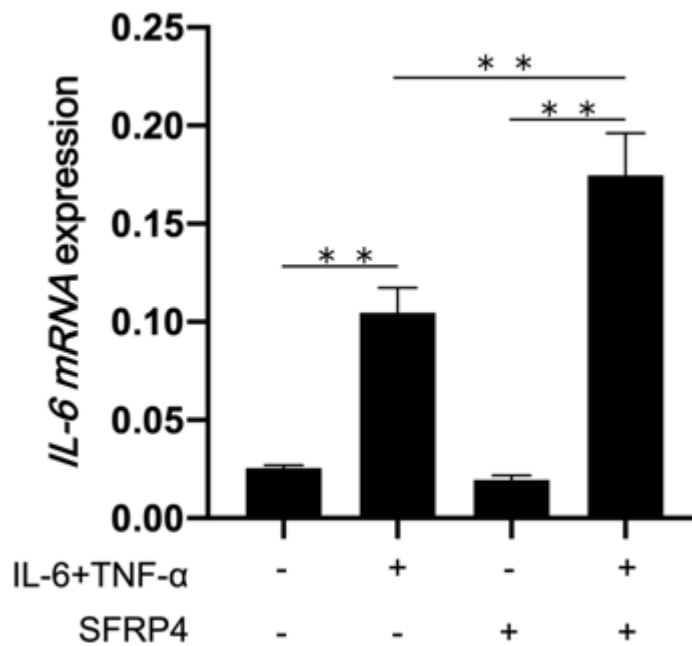


図22. SFRP4 リコンビナントプロテイン投与下でのサイトカイン刺激後の *IL-6* mRNA 発現の評価

HDF において、予め SFRP4 リコンビナントプロテインを投与した上で、TNF- α 及び IL-6 による刺激を行い、IL-6 の mRNA の発現を qPCR により評価した。**は、t 検定で比較した際の p 値が 0.01 未満のものを示す。

考察

遺伝的素因や慢性炎症はDupuytren拘縮の発症や進行に関与することが知られている (Andrew et al., 1991; Meek et al., 1999; Capstick et al., 2013; Verjee et al., 2013; Becker et al., 2015; Bianchi et al., 2015; Larsen et al., 2015; Izadi et al., 2019)。近年、GWAS 解析により Dupuytren 拘縮における複数の疾患関連 SNPs が明らかとなっているが、その詳細な機能に関する報告は未だない。本研究では、SFRP4 SNPs (rs16879765 and rs17171229) が手掌腱膜における線維芽細胞の SFRP4 の発現を促し、NF- κ B および STAT3 の同時活性化に特徴づけられる IL-6 アンブの活性化を来していることを引き起こしていることを示した。さらに、SFRP4 が I κ B α 及び β TrCP を介して SCF complex に直接結合し、p65 の核内移行を促していることを明らかにした。このように、SFRP4 は手掌腱膜の線維芽細胞を含む非免疫細胞において NF- κ B 経路を活性化する作用を持ち、Dupuytren 拘縮の病態において重要な役割を果たしていると考えられた。

我々は本研究において SFRP4 の細胞内における NF- κ B 経路の活性化作用を示したが、SFRP4 は細胞質内にとどまらず、細胞外に分泌されるタンパク質であり、細胞外においても作用している可能性が考えられた (Ng et al., 2017; Pawar et al., 2018)。SFRP4 は WNT や frizzled receptor に結合することで WNT シグナルを抑制することが知られている (Miller, 2002; Pawar et al., 2018)。実際に、SFRP4 リコンビナントプロテインを付加したところ、IL-6 アンブの活性化が見られた。rs16879765 のリスクアレルを保有する Dupuytren 拘縮症例では、手掌腱膜由来線維芽細胞の SFRP4 の分泌が低下するという報告もあるが (Ng et al., 2017)、本研究結果からは SFRP4 が細胞内だけでなく、細胞外においても NF- κ B 経路を活性化する因子として機能している可能性が示唆された。この細胞外における SFRP4 の NF- κ B 経路への作用については、今後さらなる検討が必要と考える。

本研究において、SFRP4 が β TrCP および I κ B α と直接結合することが明らかとなった。これは、SFRP4 が I κ B α に対するユビキチンリガーゼ複合体である SCF complex を構成する因子の一つである可能性を示唆している。SFRP4 は IL-6 の正の制御因子であることから、SFRP4 は IL-6 アンブが活性化する際の β TrCP および I κ B α の分子間の架橋に関わっており、NF- κ B 経路に重要である 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携わっていると考えられた。この SFRP4 の機能が Dupuytren 拘縮の病態にどのように影響しているのか、今後さらなる分子機構の解析が必要と考える。

また、Dupuytren 拘縮患者の組織を用いた検討により、SFRP4 SNPs (rs16879765 and rs17171229) のリスクアレル保有例の手掌腱膜組織では非保有例と比較し、SFRP4 の発現が上昇し、IL-6 アンブが活性化することが明らかとなった。同様に、リスクアレル保有例の手掌腱膜由来の線維芽細胞においても、非保有例と比較してより IL-6 アン

プが活性化していた。これらの結果から、SFRP4 SNPs (rs16879765 and rs17171229) は線維芽細胞における SFRP4 発現上昇を介して、炎症の進行および慢性炎症の持続をもたらし、疾患の発症や進行に関わっていると考えられた。しかし、SFRP4 SNPs (rs16879765 and rs17171229) のリスクアレルが SFRP4 発現を促進する機序は明らかとなっておらず、今後さらなる検討が必要と考える。

また、様々な疾患において慢性炎症は線維化をきたすことが明らかとなっており、その主要エフェクターである TGF- β は、Dupuytren 拘縮における線維化にも関わるということが知られている。本研究では、細胞に対して IL-6 アンプを活性化させる刺激を行った際の TGF- β の発現上昇を観察するに至らなかったが、今後条件検討を重ねることで、慢性炎症に伴う TGF- β の発現上昇およびそれに対する SFRP4 の機能解析も行う必要がある。一方、Dupuytren 拘縮に特徴的である、3 型コラーゲンの発現に関して、SFRP4 をノックダウンすることで平常状態においてその発現が抑制されていることがわかった。これは、細胞における恒常的な 3 型コラーゲンの発現についても SFRP4 が関与していることを示唆しており、引き続き検討をすすめていきたいと考える。

本研究の結果、Dupuytren 拘縮において線維芽細胞中の SFRP4 は IL-6 アンプ活性化を主体とした炎症の誘発および慢性化に寄与していると考えられ、SFRP4 SNPs (rs16879765 and rs17171229) は Dupuytren 拘縮を含む炎症性疾患の新たな治療標的となる可能性を持つと考えられた。

総括および結論

- SFRP4 は NF- κ B 経路を活性化する。
- SFRP4 は SCF complex と I κ B α の結合に作用し、I κ B α の分解に働く。
- SFRP4 のノックダウンは、*in vitro*、*in vivo* ともに炎症活性を有意に抑制する。
- SFRP4 SNPs (rs16879765 and rs17171229) のリスクアレルは Dupuytren 拘縮において健常群より保有率が高い。
- SFRP4 SNPs (rs16879765 and rs17171229) のリスクアレル保有例では SFRP4 の発現が上昇する。
- SFRP4 SNPs (rs16879765 and rs17171229) のリスクアレル保有例では手掌腱膜における炎症活性が上昇する。

本研究では、疾患関連 SNPs として同定されているがその詳細な機能が明らかとなっていなかった、SNPs (rs16879765 and rs17171229) およびその関連遺伝子である SFRP4 の Dupuytren 拘縮における機能の一端を明らかにした。Dupuytren 拘縮の病態における作用が全く明らかとなっていなかった SFRP4 が、SCF complex と I κ B α に結合することを示し、NF- κ B 経路の活性化に重要である I κ B α のユビキチン化およびプロテアソームによる分解をもたらす SCF complex の機能に携わる重要な因子である可能性を示した。さらに、SFRP4 SNPs (rs16879765 and rs17171229) のリスクアレルは Dupuytren 拘縮において健常群より保有率が上昇しており、リスクアレルを保有する Dupuytren 拘縮症例では手掌腱膜における SFRP4 の発現が上昇し、炎症活性が上昇することを示した。これらの一連の研究を通じて、これまでその詳細が明らかとなっていなかった、Dupuytren 拘縮のリスク因子としての遺伝的素因について、その一旦を解明することができた。

今後、SFRP4 の中和抗体による炎症抑制及び線維化抑制作用に関する研究等を行うことで臨床応用へ繋げることが可能になると考える。

本研究の問題点として、SFRP4 の炎症に関わる機能に限局しており、主たる病態の一つである線維化への作用を実験により十分評価できていないことが挙がる。これらについては、*in vivo* および *in vitro* における線維化モデルを確立し、SFRP4 の作用を評価することで今後解析を進めていきたいと考える。

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整形外科学教室・岩崎倫政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、北海道大学大学院歯学研究院 准教授・松井雄一郎先生に心から感謝いたします。さらに、各種研究材料を提供していただきました北海道大学大学院医学研究院整形外科学教室および北海道整形外科記念病院 近藤真先生、西尾康彦先生、手稲溪仁会病院整形外科 西田欽也先生に深く感謝いたします。

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整形外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

Andrew, J.G., Andrew, S.M., Ash, A., and Turner, B. (1991). An investigation into the role of inflammatory cells in Dupuytren's disease. *J. Hand Surg. Br.* 16, 267-271.

Arima, Y., Harada, M., Kamimura, D., Park, J.H., Kawano, F., Yull, F.E., Kawamoto, T., Iwakura, Y., Betz, U.A., Marquez, G., et al. (2012). Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* 148, 447-457.

Arima, Y., Kamimura, D., Atsumi, T., Harada, M., Kawamoto, T., Nishikawa, N., Stofkova, A., Ohki, T., Higuchi, K., Morimoto, Y., et al. (2015). A pain-mediated neural signal induces relapse in murine autoimmune encephalomyelitis, a multiple sclerosis model. *Elife* 4, 1-23.

Arima, Y., Ohki, T., Nishikawa, N., Higuchi, K., Ota, M., Tanaka, Y., Nio-Kobayashi, J., Elfeky, M., Sakai, R., Mori, Y., et al. (2017). Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *Elife* 6, 1-27.

Atsumi, T., Singh, R., Sabharwal, L., Bando, H., Meng, J., Arima, Y., Yamada, M., Harada, M., Jiang, J.J., Kamimura, D., et al. (2014). Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Res.* 74, 8-14.

Atsumi, T., Suzuki, H., Jiang, J.J., Okuyama, Y., Nakagawa, I., Ota, M., Tanaka, Y., Ohki, T., Katsunuma, K., Nakajima, K., et al. (2017). Rbm10 regulates inflammation development via alternative splicing of Dnmt3b. *Int. Immunol.* 29, 581-591.

Bazin, S., Le Lous, M., Duance, V.C., Sims, T.J., Bailey, A.J., Gabbiani, G., D'Andiran, G., Pizzolato, G., Browski, A., Nicoletis, C., and Delaunay, A. (1980). Biochemistry and histology of the connective tissue of Dupuytren's disease lesions. *Eur. J. Clin. Invest.* 10, 9-16.

Becker, K., Tinschert, S., Lienert, A., Bleuler, P.E., Staub, F., Meinel, A., Rossler, J., Wach, W., Hoffmann, R., Kuhnel, F., et al. (2015). The importance of genetic susceptibility in Dupuytren's disease. *Clin. Genet.* 87, 483-487.

Becker, K., Siegert, S., Toliat, M.R., Du, J., Casper, R., Dolmans, G.H., Werker, P.M., Tinschert, S., Franke, A., Gieger, C., et al. (2016). Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies and

Network Analysis-Based Integration with Gene Expression Data Identify New Suggestive Loci and Unravel a Wnt-Centric Network Associated with Dupuytren's Disease. *PLoS One* 11,

Bianchi, E., Taurone, S., Bardella, L., Signore, A., Pompili, E., Sessa, V., Chiappetta, C., Fumagalli, L., Di Gioia, C., Pastore, F.S., et al. (2015). Involvement of pro-inflammatory cytokines and growth factors in the pathogenesis of Dupuytren's contracture: a novel target for a possible future therapeutic strategy? *Clin. Sci. (Lond.)* 129, 711-720.

Brickley-Parsons, D., Glimcher, M.J., Smith, R.J., Albin, R., and Adams, J.P. (1981). Biochemical changes in the collagen of the palmar fascia in patients with Dupuytren's disease. *J. Bone Joint Surg. Am.* 63, 787-797.

Burge, S.K., Amodei, N., Elkin, B., Catala, S., Andrew, S.R., Lane, P.A., and Seale, J.P. (1997). An evaluation of two primary care interventions for alcohol abuse among Mexican-American patients. *Addiction* 92, 1705-1716.

Capstick, R., Bragg, T., Giele, H., and Furniss, D. (2013). Sibling recurrence risk in Dupuytren's disease. *J. Hand Surg. Eur. Vol.* 38, 424-429.

Descatha, A., Jauffret, P., Chastang, J.F., Roquelaure, Y., and Leclerc, A. (2011). Should we consider Dupuytren's contracture as work-related? A review and meta-analysis of an old debate. *BMC Musculoskelet. Disord.* 12, 96.

Dolmans, G.H., Werker, P.M., Hennies, H.C., Furniss, D., Festen, E.A., Franke, L., Becker, K., van der Vlies, P., Wolffenbuttel, B.H., Tinschert, S., et al. (2011). Wnt signaling and Dupuytren's disease. *N. Engl. J. Med.* 365, 307-317.

Feldman, G., Rozen, N., and Rubin, G. (2017). Dupuytren's Contracture: Current Treatment Methods. *Isr. Med. Assoc. J.* 19, 648-650.

Fujita, M., Yamamoto, Y., Jiang, J.J., Atsumi, T., Tanaka, Y., Ohki, T., Murao, N., Funayama, E., Hayashi, T., Osawa, M., et al. (2019). NEDD4 Is Involved in Inflammation Development during Keloid Formation. *J. Invest. Dermatol.* 139, 333-341.

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

Immunol. 8, 837-848.

Godtfredsen, N.S., Lucht, H., Prescott, E., Sorensen, T.I., and Gronbaek, M. (2004). A prospective study linked both alcohol and tobacco to Dupuytren's disease. *J. Clin. Epidemiol.* 57, 858-863.

Gudmundsson, K.G., Arngrimsson, R., Sigfusson, N., Bjornsson, A., and Jonsson, T. (2000). Epidemiology of Dupuytren's disease: clinical, serological, and social assessment. The Reykjavik Study. *J. Clin. Epidemiol.* 53, 291-296.

Harada, M., Kamimura, D., Arima, Y., Kohsaka, H., Nakatsuji, Y., Nishida, M., Atsumi, T., Meng, J., Bando, H., Singh, R., et al. (2015). Temporal expression of growth factors triggered by epiregulin regulates inflammation development. *J. Immunol.* 194, 1039-1046.

Higuchi, H., Kamimura, D., Jiang, J.J., Atsumi, T., Iwami, D., Hotta, K., Harada, H., Takada, Y., Kanno-Okada, H., Hatanaka, K.C., et al. (2020). Orosomucoid 1 is involved in the development of chronic allograft rejection after kidney transplantation. *Int. Immunol.* 32, 335-346.

Izadi, D., Layton, T.B., Williams, L., McCann, F., Cabrita, M., Espirito Santo, A.I., Xie, W., Fritzsche, M., Colin-York, H., Feldmann, M., et al. (2019). Identification of TNFR2 and IL-33 as therapeutic targets in localized fibrosis. *Sci Adv* 5, 1-12.

Kanada, S., Nishiyama, C., Nakano, N., Suzuki, R., Maeda, K., Hara, M., Kitamura, N., Ogawa, H., and Okumura, K. (2011). Critical role of transcription factor PU.1 in the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells. *Blood* 117, 2211-2222.

Kloen, P. (1999). New insights in the development of Dupuytren's contracture: a review. *Br. J. Plast. Surg.* 52, 629-635.

Krause, C., Kloen, P., and Ten Dijke, P. (2011). Elevated transforming growth factor beta and mitogen-activated protein kinase pathways mediate fibrotic traits of Dupuytren's disease fibroblasts. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4, 14.

Lanting, R., Broekstra, D.C., Werker, P.M.N., and van den Heuvel, E.R. (2014). A systematic review and meta-analysis on the prevalence of Dupuytren disease in the general population of Western countries. *Plast. Reconstr. Surg.* 133, 593-603.

Larsen, S., Krogsgaard, D.G., Aagaard Larsen, L., Iachina, M., Skytthe, A., and Frederiksen, H. (2015). Genetic and environmental influences in Dupuytren's disease: a study of 30,330 Danish twin pairs. *J. Hand Surg. Eur.* Vol. 40, 171-176.

Lee, J., Nakagiri, T., Oto, T., Harada, M., Morii, E., Shintani, Y., Inoue, M., Iwakura, Y., Miyoshi, S., Okumura, M., et al. (2012). IL-6 amplifier, NF-kappaB-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses. *J. Immunol.* 189, 1928-1936.

Lee, J., Nakagiri, T., Kamimura, D., Harada, M., Oto, T., Susaki, Y., Shintani, Y., Inoue, M., Miyoshi, S., Morii, E., et al. (2013). IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *Int. Immunol.* 25, 319-332.

Ling, R.S. (1963). The Genetic Factor in Dupuytren's Disease. *J. Bone Joint Surg. Br.* 45, 709-718.

Liss, G.M., and Stock, S.R. (1996). Can Dupuytren's contracture be work-related?: review of the evidence. *Am. J. Ind. Med.* 29, 521-532.

Meek, R.M., McLellan, S., and Crossan, J.F. (1999). Dupuytren's disease. A model for the mechanism of fibrosis and its modulation by steroids. *J. Bone Joint Surg. Br.* 81, 732-738.

Meng, J., Jiang, J.J., Atsumi, T., Bando, H., Okuyama, Y., Sabharwal, L., Nakagawa, I., Higuchi, H., Ota, M., Okawara, M., et al. (2016). Breakpoint Cluster Region-Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II. *J. Immunol.* 197, 3111-3119.

Miller, J.R. (2002). The Wnts. *Genome Biol.* 3, 1-15.

Murakami, M., Okuyama, Y., Ogura, H., Asano, S., Arima, Y., Tsuruoka, M., Harada, M., Kanamoto, M., Sawa, Y., Iwakura, Y., et al. (2011). Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J. Exp. Med.* 208, 103-114.

Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J.J., Atsumi, T., et al. (2013). Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Rep.* 3, 946-959.

Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. (2019). Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity* 50, 812-831.

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.

Ng, M., Thakkar, D., Southam, L., Werker, P., Ophoff, R., Becker, K., Nothnagel, M., Franke, A., Nurnberg, P., Espirito-Santo, A.I., et al. (2017). A Genome-wide Association Study of Dupuytren Disease Reveals 17 Additional Variants Implicated in Fibrosis. *Am. J. Hum. Genet.* 101, 417-427.

Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y., and Hirano, T. (2008). Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* 29, 628-636.

Okuyama, Y., Tanaka, Y., Jiang, J.J., Kamimura, D., Nakamura, A., Ota, M., Ohki, T., Higo, D., Ogura, H., Ishii, N., et al. (2018). Bmi1 Regulates IkappaBalpha Degradation via Association with the SCF Complex. *J. Immunol.* 201, 2264-2272.

Ota, M., Tanaka, Y., Nakagawa, I., Jiang, J.J., Arima, Y., Kamimura, D., Onodera, T., Iwasaki, N., and Murakami, M. (2020). Role of Chondrocytes in the Development of Rheumatoid Arthritis Via Transmembrane Protein 147-Mediated NF-kappaB Activation. *Arthritis Rheumatol* 72, 931-942.

Pawar, N.M., and Rao, P. (2018). Secreted frizzled related protein 4 (sFRP4) update: A brief review. *Cell. Signal.* 45, 63-70.

Shimoyama, S., Nakagawa, I., Jiang, J.J., Matsumoto, I., Chiorini, J.A., Hasegawa, Y., Ohara, O., Hasebe, R., Ota, M., Uchida, M., et al. (2021). Sjogren's syndrome-associated SNPs increase GTF2I expression in salivary gland cells to enhance inflammation development. *Int. Immunol.* 33, 423-434.

Stofkova, A., Kamimura, D., Ohki, T., Ota, M., Arima, Y., and Murakami, M. (2019). Photopic light-mediated down-regulation of local alpha(1A)-adrenergic signaling protects blood-retina

barrier in experimental autoimmune uveoretinitis. *Sci. Rep.* 9, 1-15.

Takada, Y., Kamimura, D., Jiang, J.J., Higuchi, H., Iwami, D., Hotta, K., Tanaka, Y., Ota, M., Higuchi, M., Nishio, S., et al. (2020). Increased urinary exosomal SYT17 levels in chronic active antibody-mediated rejection after kidney transplantation via the IL-6 amplifier. *Int. Immunol.* 32, 653-662.

Tanaka, Y., Sabharwal, L., Ota, M., Nakagawa, I., Jiang, J.J., Arima, Y., Ogura, H., Okochi, M., Ishii, M., Kamimura, D., and Murakami, M. (2018). Presenilin 1 Regulates NF-kappaB Activation via Association with Breakpoint Cluster Region and Casein Kinase II. *J. Immunol.* 201, 2256-2263.

Tanaka, H., Arima, Y., Kamimura, D., Tanaka, Y., Takahashi, N., Uehata, T., Maeda, K., Satoh, T., Murakami, M., and Akira, S. (2019). Phosphorylation-dependent Regnase-1 release from endoplasmic reticulum is critical in IL-17 response. *J. Exp. Med.* 216, 1431-1449.

Verjee, L.S., Verhoekx, J.S., Chan, J.K., Krausgruber, T., Nicolaidou, V., Izadi, D., Davidson, D., Feldmann, M., Midwood, K.S., and Nanchahal, J. (2013). Unraveling the signaling pathways promoting fibrosis in Dupuytren's disease reveals TNF as a therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E928-937.

Wilburn, J., McKenna, S.P., Perry-Hinsley, D., and Bayat, A. (2013). The impact of Dupuytren disease on patient activity and quality of life. *J. Hand Surg. Am.* 38, 1209-1214.

Wynn, T.A., and Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* 18, 1028-1040.