HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	DEAD-Box helicase 6分子による炎症誘導の分子機構［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	内藤, 正一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15908号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92135
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NAITO_Seiichiro_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　　内藤　正一郎

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

学 位 論 文 題 名

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)

申請者は、心臓血管手術後の心房細動（POAF）における心外膜脂肪組織の質的変化が及ぼす影響に関する研究について発表した。

審査にあたり、まず副査の福原教授から、当初の学位論文の報告では DDX6 が TRAF2 と結合するという報告であったが、そこから DDX6 と結合する NF-kB 経路分子の結果が変更された理由について質問があった。申請者は免疫沈降における技術的な面が一つの理由であり、また当初は DDX6 と各分子の親和性に関する検討を行っておらず、今回免疫沈降に供与した input lysate と同時に免疫沈降産物を電気泳動して WB を施行したところ TRAF2 の input からの recovery 率が非常に低く、DDX6 と TRAF2 との親和性が弱いことが判明したことが、2 つ目の理由として回答した。さらに DDX6 の P-body 形成能と NF-kB 経路に対する機能の関連について、P-body 形成が誘導される刺激が入った際、DDX6 が P-body 形成に消費されることで NF-kB 経路が抑制されるか検討をおこなったか、またはそのような報告があるかについて質問があり、申請者は検討を行っていなかったと回答した。さらに、DDX6 の knockdown と過剰発現系について使用している細胞が異なる理由について質問があり、申請者は 293T 細胞の方がプラスミドの導入効率が良いこと、また同細胞でも IL-6 及び TNFa による同時刺激で IL-6 mRNA 産生が増強する現象が確認されているため使用した旨回答があった。申請者が使用したマウス皮膚炎モデルについて siRNA の投与方法について質問があり、また DDX6 の治療効果を確かめるという点では炎症を起こした後に siRNA を投与するのも選択肢であると提案があり、申請者から、siRNA は薬剤と共に塗布していること、またマウス皮膚炎モデルは今回 DDX6 を knockdown した際に炎症が生じにくくなるか否かに主眼をおいており、治療効果の検討までには至っていないと回答した。

次に副査の氏家教授から、DDX6 分子のヘリカーゼ活性を失活させた変異体について、自身でヘリカーゼ活性が失活していることを確認したか質問があり、申請者から確認してはいないと回答があった。また、2 種類の si-DDX6 について、H4 細胞では siDDX6-2 の DDX6 knockdown 効率が良いのに対して、HDF/HSF における IL-6 mRNA 発現抑制効果が siDDX6-2 において低い理由について質問があり、申請者は H4 細胞と HDF/HSF で、

細胞種による si-DDX6 の効率に違いがあり、その影響が考えられると回答した。マウス皮膚炎モデルについて、今回強皮症に着目しているとのことで、ブレオマイシン投与による強皮症モデルを用いて実験するとなお良い旨提案があった。さらに、DDX6 に着目した経緯について質問があり、申請者より、強皮症疾患感受性遺伝子の中で強皮症に対する分子メカニズムが十分に検討されていない遺伝子を pickup し、IL-6 アンプ制御遺伝子と overlap するものの中で、より IL-６アンプの抑制効率が高い分子として DDX6 を選択したと回答があった。

主査の小林教授より、Western blotting において DDX6 が double band で出る理由について質問があり、申請者より、その理由については把握していないと回答があった。また IL-6 アンプの説明で p300 を介した STAT3-NF-kB 相互作用の話が出ていたが、p300 は

非古典経路に関連する分子であり、その他にも両分子間相互作用に関する報告があるか質問があり、申請者より、STAT3 が miRNA 発現を誘導し NF-kB 活性化に作用するという報告など、他にも複数の報告があるが、いずれも癌細胞等における報告であり、非免疫細胞における両分子の相互作用に関する報告は少なく、申請者の所属する研究室においても非免疫細胞において核内で両分子が共局在することは見出しているが、更なるメカニズムに関しては目下研究中であると回答があった。さらにヘリカーゼ活性を失活させた変異体の作成について、DDX2 の motifⅡ(wakerB motif)または motifⅢに変異を入れると(※具体的なアミノ酸変異について失念してしまい、申し訳ございません)ヘリカーゼ活性失活型 DDX6 を作成できること、今回の皮膚炎モデルマウスについて TLR7 を介したシグナリング pathway では主に IFN を中心とした反応になるため、別のモデルマウスの方がなお良いこと、DDX6 と NF-kB 経路分子の結合実験について、TRAF6 は非常に重要な分子の一つであり TRAF6 及び NEMO については interaction の確認を行うべきこと、また DDX6 knockdown 細胞に対するサイトカイン投与実験について IL-1β や RANKL, TLR リガンドを用いた実験も追加した方が良いことについてアドバイスがあった。以上より学位に相当する研究が行われたと審査員は一致した。しかしながら、学位論文については修正が必要であり、期日までに修正学位論文の提出が求められた。

期日までに修正された学位論文の提出があり、審査員全員で審査を行い修正が適切に行われた事を確認した。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。