

論文内容要旨

論文題目

Deletion of nephrocystin 4 exacerbates cardiac function and survival rate in a mouse model of cardio-renal syndrome(nephrocystin 4 の機能低下は心腎症候群モデルマウスの心機能と生存率を増悪させる)

責任講座： 内科学第一講座

氏 名： 佐藤 淳耶

【内容要旨】(1,200 字以内)

心不全に腎機能障害を合併した心腎症候群の予後は極めて不良であるが、心腎症候群の遺伝的危険因子は不明である。我々は、常染色体潜性多発性嚢胞腎の原因遺伝子 *Nephrocystin 4 (NPHP4)* の遺伝子多型が、心腎症候群の遺伝的危険因子であることを報告した。NPHP4 は心臓および腎臓の発生に関与するが、成人における心・腎疾患発症に与える影響は不明である。我々は心腎症候群発症における NPHP4 の役割を解明するために、NPHP4 ノックアウトマウスを作成し、心腎症候群を誘導した。さらに、培養心筋細胞において NPHP4 をノックダウンし、Hippo 経路や Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 経路に与える影響を検討した。

【方法・結果】CRISPR/Cas9 システムを用い、*Nphp4* 遺伝子の Exon 3~8 を欠損させた NPHP4 ノックアウトマウスを作成した。心組織および腎組織の遺伝子発現解析において、NPHP4 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ、酸化的リン酸化などミトコンドリア機能関連遺伝子群の発現が有意に低下していた。横行大動脈縮窄術を施行し心腎症候群を誘導した結果、NPHP4 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて心肥大は軽度であるにも関わらず、心機能が有意に低下した。さらに、NPHP4 ノックアウトマウスは、高度な腎萎縮を示し、生存率が有意に低下した。

H9C2 培養心筋細胞において、NPHP4 はエンドソームおよび細胞膜に局在していた。IGF-1 や Angiotensin II などの心肥大刺激後早期に、NPHP4 遺伝子の mRNA 発現は変化しなかったが、細胞質内で NPHP4 蛋白が有意に増加し、エンドソームによる NPHP4 の細胞質内への移動が示唆された。免疫沈降法により、NPHP4 はユビキチン転移酵素 ITCH と相互作用することを明らかにした。ITCH は標的蛋白質にユビキチンを付加することでプロテアソームによる蛋白質分解やエンドソームによる膜蛋白質の移動を調節する。さらに、LATS2 や IGF-1 受容体は ITCH と結合する PPxY 配列を有しており、免疫沈降法を用いて ITCH が LATS2 や IGF-1 受容体と結合することを明らかにした。H9C2 培養心筋細胞において、RNA 干渉を用いて NPHP4 の発現を抑制すると、ITCH 蛋白の発現が有意に低下した。Hippo 経路は心肥大を抑制し心不全発症を惹起する。NPHP4 の発現を抑制すると、Hippo 経路の主要調節因子 LATS2 が増加し、YAP 蛋白の発現が有意に低下した。IGF-1 経路は代償性心肥大に関与する。NPHP4 の発現を抑制すると、初期エンドソームのエフェクター蛋白質である Rabaptin-5 の発現が有意に低下した。また、AKT や FOXO1 のリン酸化が有意に抑制され、筋萎縮関連遺伝子である MuRF1 の mRNA 発現が有意に亢進した。

NPHP4 の発現の抑制は、Hippo 経路を活性化し、IGF-1 経路を抑制することが示された。

【結論】NPHP4 の欠損は、圧負荷に対する代償機構の破綻やミトコンドリア機能障害による心機能低下を介して、心腎症候群の生存率を悪化させた。心筋細胞において NPHP4 は ITCH と相互作用し、Hippo 経路と IGF-1 経路を調節することを示した。NPHP4 は心臓と腎臓の形態や機能を制御する役割を担っており、心腎症候群の新たな治療標的となりうる可能性が示唆された。

2023 年 12 月 26 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 佐藤 淳耶

論文題目： Deletion of nephrocystin 4 exacerbates cardiac function and survival rate in a mouse model of cardio-renal syndrome
(nephrocystin 4 の機能低下は心腎症候群モデルマウスの心機能と生存率を増悪させる)

審査委員：主審査委員 藤 井 順 逸

副審査委員 三 井 哲 夫

副審査委員 濱 本 洋

審査終了日： 2023 年 12 月 7 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

Nephrocystin-4 (NPHP4) はネフロン癆(nephronophthisis; NPH)の原因遺伝子として同定された遺伝子ファミリーの一つである。申請者の研究室では、NPHP4 の 1 塩基多型が心腎症候群の遺伝的危険因子であることを報告しているが、NPHP4 の発現異常がどのような機序で心腎症候群を起こすかについては明確になっていない。本研究では、NPHP4 による心腎症候群発症への関与を明らかにするために、ゲノム編集により樹立した NPHP4 欠損マウスで心肥大病態モデルを作製してその病態を解析し、さらに培養心筋細胞を用いて NPHP4 の作用に関する分子機構について検討した。

ゲノム編集では、欠損するエクソンの異なる 3 系統の NPHP4 欠損マウスが得られたが、そのうちの 1 系統についてのみ繁殖が可能であったため、この系統のマウスを用いて以後の検討を行った。作出した NPHP4 欠損マウスの心臓および腎臓では、ミトコンドリアの電子伝達系を構成する複数のタンパク質の遺伝子の発現低下を認めた。横行大動脈縮窄術を施して心腎症候群の病態モデルを作製したところ、NPHP4 欠損マウスでは野生型マウスに比べて心肥大の程度は軽度であったが、心機能は低下しており、著しい腎萎縮を認めた。続いて H9C2 培養心筋細胞を用いて NPHP4 の機能について検討した。siRNA による NPHP4 のノックダウンおよび過剰発現を行い、免疫沈降法などの手法を用いて細胞内シグナル伝達経路に関する解析を行った。その結果、NPHP4 はエンドソームと細胞膜に局在し、ユビキチン転移酵素 ITCH と相互作用することが分かった。NPHP4 が ITCH に結合することで LATS2 の分解を促進し、Hippo 経路を抑制していると考えられる。一方で、NPHP4 は ITCH を介して IGF-1 受容体によるシグナル伝達経路を活性化する可能性が示唆された。

本研究では、作出した NPHP4 遺伝子欠損マウスを用いた病態解析に加えて、培養細胞を用いた検討を行い、心腎症候群の遺伝的危険因子である NPHP4 遺伝子の機能に関する新たな知見を得ている。NPHP4 については別のグループから、その欠損により精子形成が障害されて不妊となることが報告されており、本研究で樹立できなかった 2 系統の変異マウスの妊孕性の欠如との関連が危惧される。本研究で用いた系統はエクソン 3~8 を欠くが、エクソン 2 と 9 の reading frame が一致しているため、翻訳されてきた短いタンパクが表現型に影響を与えた可能性は否定できず、その関与の有無について確認が必要である。培養細胞を用いたシグナル経路の検討については、Hippo 経路と IGF-1 のシグナル伝達の関連について更なる検証を行う事で、より優れた研究に発展することが期待される。本研究では NPHP4 の機能解明に意欲的に取り組み、シグナル伝達経路について新規知見が得られていることから、博士(医学)の学位授与に値するものと判断した。(1, 200字以内)