

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08464

研究課題名(和文) 高血圧性心疾患発症における1次線毛構成タンパク質NPHP4の機能解明

研究課題名(英文) Nephrocystin-4 exacerbates cardiac function in pressure overload

研究代表者

高橋 大 (Takahashi, Hiroki)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：90400548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ネフロン癆の主原因であるNephrocystin-4 (NPHP4) は、一般住民において心血管死亡と関連することを報告した。心疾患発症におけるNPHP4の機能を解明するために、NPHP4ノックアウトマウスを作製し、胸部横行大動脈縮窄術(TAC)を施行した。NPHP4 KOマウスはミトコンドリア機能障害を示し、心機能が悪化した。また、野生型マウスと比べて生存率が有意に低率であった。NPHP4 をノックダウンすると、Hippo経路が活性化し、IGF-1刺激に対してインスリンシグナル伝達が抑制された。NPHP4は心疾患の遺伝的危険因子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患の発症には、遺伝的危険因子が関与する。我々は、本邦一般住民においてNPHP4遺伝子多型が心血管死の危険因子であることを報告した。また、本研究では、大動脈縮窄術による圧負荷に対して、野生型に比べてNPHP4ノックアウトマウスはミトコンドリア機能が悪化し、心機能や予後が悪化することを示した。更に、NPHP4はユビキチン転移酵素ITCHと相互作用し、Hippo経路やInsulin経路を調節することを示した。以上の知見を踏まえ、NPHP4の遺伝子検査が将来の心疾患発症予測につながる可能性が示唆された。今後、NPHP4に対して治療介入することで心疾患発症を予防できるか追加検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We have reported that Nephrocystin-4 (NPHP4), a major cause of nephrocystin, was associated with the cardiovascular mortality in general population. It remains undetermined the functional role of NPHP4 in the development of cardiac disease. We generated NPHP4 knockout mice using CRISPER-Cas9. Thoracic transverse aortic constriction (TAC) was performed in NPHP4 knockout mice and wild-type littermates. RNA-sequencing of heart tissue revealed the mitochondrial proteins were down-regulated in NPHP4 KO mice. NPHP4 KO mice showed exacerbated cardiac function and had a lower survival rate than wild-type littermates. Immunoprecipitation demonstrated that NPHP4 interacted with ubiquitin E3 ligase ITCH in cardiomyocytes. Knockdown study of NPHP4 using siRNA showed an activation of Hippo pathway. Insulin signaling was inhibited in response to IGF-1 stimulation in cardiomyocytes after NPHP4 knockdown. Deficiency of NPHP4 may be the genetic risk for cardiac disease.

研究分野：Cardiology

キーワード：Nephrocystin-4 Pressure overload Hippo pathway Insulin signaling ITCH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医学の進歩にもかかわらず、心不全は未だ日本人の重要な死因である。人口の高齢化に伴い、心不全患者は増加の一途をたどっている。本邦においては高血圧性心疾患や大動脈弁狭窄症による心不全が増加している (Circ J. 2011; 75: 823-833)。左室肥大はさまざまな機序が複雑に絡み合って発症する (Pharmacology & Therapeutics. 2010; 128:191-227)。心不全の危険因子には、遺伝的危険因子と後天的危険因子が存在する。

Nephrocystin-4 (NPHP4) は、心臓、腎臓、骨格筋ならびに肝臓に高発現する (Nat Genet. 2002; 32: 300-5.)。NPHP4 は、2 つの C2 ドメインと 1 つの ASH ドメインを含む 1426 アミノ酸からなる蛋白質である (Nature communication. 2017; 8:14177. J Proteome Res. 2013; 12:260-71.)。小児や若年成人の末期腎不全の主原因であるネフロン癆の原因遺伝子として同定された (J Am Soc Nephrol. 200; 18:1855-71.)。胎生期に機械的刺激に対するセンサーとして働き、心臓の左右軸の決定や非対称性の獲得に重要な役割を担う。NPHP4 の異常では、心房中隔欠損症・心室中隔欠損症・右胸心・内臓逆位を来す (Circ Res 2012; 110: 1564-1574.)。我々は以前一般住民健診受診者を対象とした山形県高畠研究において、NPHP4 の遺伝子多型が腎障害と関連することを報告した (J Hum Genet. 2010; 55: 791-5.)。また、非翻訳領域の遺伝子多型 (rs12058375) が一般住民において心血管死と関連することや、心腎症候群と関連するハプロタイプを報告した (Heart and Vessels. 2022; 37: 673-682) 。腎障害は、交感神経活性やレニン・アンジオテンシン・アルドステロンシステムなどを介して高血圧性心疾患の発症に関与する (J Am Coll Cardiol. 2008; 52: 1527-1539) 。しかし、予後と関連した遺伝子多型 (rs12058375) の違いでは明らかな腎障害に有意差がなかった。イントロンバリエーションであることから NPHP4 の転写に影響している可能性がある。そこで、NPHP4 は腎障害を介して高血圧性心疾患発症に寄与するのみならず、心臓組織における NPHP4 が直接影響する機序があると考えた。

2. 研究の目的

上記を踏まえ、NPHP4 は心不全発症における遺伝的危険因子と仮説を立てた。本研究の目的は、高血圧性心疾患発症における NPHP4 の機能を解明することである。

3. 研究の方法

心筋細胞において、核、細胞質、細胞膜を分離して蛋白質を抽出し NPHP4 の局在を調べた。心筋細胞肥大刺激に対する NPHP4 の蛋白質発現の変化を検討した。心筋細胞培養を行い、NPHP4 がインスリンシグナルや Hippo 経路に与える影響を検討した。免疫沈降法を用いて相互作用する蛋白質として ITCH を同定した。NPHP4 ノックアウトマウスを作成した。大動脈縮窄術を施行し、心機能や予後に与える影響を検討した。RNA sequence を行い、大きく変動する遺伝子や遺伝子群を同定した。

4. 研究成果

NPHP4 は心筋細胞において細胞膜とエンドソームに局在する

NPHP4 は胎生期の心臓において 1 次線毛に局在し、メカノセンサーとして働く。近年、成体において心筋細胞には 1 次線毛が欠失していることが報告された (Circulation. 2019, 139, 2342-

57)。過去に NPHP4 は 1 次線毛基底体、核および細胞質に局在すると報告されているが、心筋細胞での局在は報告がない (Nat Genet. 2007;39:882-888. J Cell Biol. 2015;211:963-973. J Biol Chem. 2012;287:25370-25380.)。そこで、NPHP4 の局在を検討した。H9C2 細胞から細胞質と核蛋白を抽出し、Western blotting で発現を比較したところ、細胞質には存在するが核には存在しなかった。また、細胞膜と核を分離したところ、細胞膜には存在するが、核では検出できなかった。エンドソーム抽出キットを用いて、蛋白質を抽出したところ、エンドソームで高発現していた。蛍光免疫染色を行い、NPHP4 が初期エンドソームのマーカーである EEA1 と同様のパターンで局在していることを確認した。以上から、NPHP4 は細胞膜とエンドソームに局在することが示された。

NPHP4 はリガンド刺激に対して細胞膜から細胞質に Translocation する

心筋細胞に対して Wnt3a (25 ng/mL) で刺激すると 30 分後に蛋白レベルでの発現が亢進した。同様に AngII (1 μ M) で刺激した場合も 30 分後に蛋白質レベルで発現が亢進した。一方、mRNA レベルでの発現には変化を認めなかった。TNF 刺激 (0.1 μ g/mL) や IGF1 刺激 (1 ng/mL) を加えた場合には、1 時間後に蛋白質発現が亢進した。他方、H₂O₂ 刺激に対しては、蛋白質発現に変化を認めなかった。以上から、リガンド刺激に対して、NPHP4 はエンドソームを構成し細胞質内にトランスロケーションする可能性が示唆された。

心筋細胞において NPHP4 knockdown がインスリンシグナルに与える影響

H9C2 細胞に対して siRNA を用いて NPHP4 を Knockdown した。IGF1 で刺激したところ、Akt や GSK3 のリン酸化が抑制された。また、Nppb と MuRF の mRNA 発現が亢進した。インスリンシグナルに拮抗することが示唆された。IGF1 は、心保護的に働く作用があるが、心筋線維芽細胞から分泌される。そこで、心筋線維芽細胞に対して NPHP4 を knockdown し IGF1 の発現を検証した。線維芽細胞における IGF1 の mRNA レベルでの発現は変化しなかった。

NPHP4 はユビキチン転移酵素 ITCH と相互作用する

NPHP4 の機能を検討するために、相互作用する蛋白質を検討した。NPHP4 は C2 ドメインを持つため、C2 ドメインを介して蛋白質と結合する可能性がある。我々は、HECT 型ユビキチン転移酵素である NEDD4 ファミリーが C2 ドメインを構造として持つことに注目した。免疫沈降法を行ったところ、NPHP4 は ITCH と結合することがわかった。他方、WWP2、NEDL2 ならびに SMURF2 とは免疫沈降法上は、明らかな結合は確認できなかった。また、免疫染色では、ITCH と NPHP4 が同じ局在を示した。ITCH は、エンドソーム形成に寄与することが知られており (J Biol Chem. 2004, 279, 11471-9) ITCH との相互作用に注目した。

NPHP4 と ITCH は Hippo シグナルを調節する

NPHP4 は Lats と結合し Hippo 経路を調節すると報告された (J. Cell Biol. 2011; 193: 633-42)

。他方、ITCH も Lats をユビキチン化し、分解することで Hippo 経路を調節すると報告された (Nat Commun. 2015;6:6314. Cell Cycle. 2013;12:3817-3823. Cancer Res. 2011;71:2010-2020.)。H9C2 細胞において、NPHP4 を knockdown すると、ユビキチン転移酵素 ITCH の蛋白質発現が有意に低下した。Lats1 の発現は変化しなかったが Lats2 の発現が有意に増加した。そして、YAP の発現が有意に低下した。以上から NPHP4 を knockdown すると Hippo 経路が on

になることが示された。

NPHP4 ノックアウトマウス

既報によると Exon4 の nonsense mutation を来した *Nphp4*^{nmf192/nmf192} は、腎障害は認めないものの、光受容体の変性や桿体と錐体の ERG 反応の消失、精子形成が抑制された (Hum Mol Genet. 2011;20:482-496.)。NPHP4 は Exon3 にリン酸化部位を持つ。CRISPER/Cas9 で Exon3 と Exon8 をターゲットとした。Exon3 の 19 塩基欠損、Exon8 の 88 塩基欠損および Exon3 から 8 まで欠損したマウスが得られた。Exon3 の 19 塩基欠損は、雌であり妊娠したが野生型マウスしか産仔が得られなかった。他方、Exon 8 の 88 塩基欠損は、雄で生殖能力が欠如していた。Exon3 ~ 8 欠損マウスは雌であったが、繁殖可能であり、本研究は同マウスを実験に用いた。

NPHP4 ノックアウトマウスは、8 週齢の段階で体重が野生型に比較して軽かった。他方、心臓超音波検査指標は野生型と比較して有意な差はなかった。N P H P 4 の心組織を R N A sequence で解析したところ、Differentially expressed gene として *Zbtb16* が増加し *c-Fos* が低下していた。Gene-set enrichment analysis では、エンドサイトーシス関連遺伝子が亢進し、ミトコンドリア関連遺伝子が抑制されていた。

NPHP4 ノックアウトマウスの大動脈縮窄手術後の生存率

NPHP4 ノックアウトマウスに対して大動脈縮窄手術を施行し、心機能と生存率を野生型マウスと比較した。NPHP4 ノックアウトマウスは大動脈縮窄術後 14 日、心収縮能が有意に低下した。また、大動脈縮窄手術後 28 日の生存率は、野生型に比較して有意に低率であった。

以上より、NPHP4 は心筋細胞において細胞膜とエンドソームに局在した。ユビキチン転移酵素 ITCH と相互作用し、インスリンシグナルや Hippo シグナルを調節した。NPHP4 ノックアウトマウスは、心機能が低下し生存率が悪化した。NPHP4 は、高血圧性心疾患の遺伝的危険因子であり、新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoichiro Otaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Association of Nephronophthisis 4 genetic variation with cardiorenal syndrome and cardiovascular events in Japanese general population: the Yamagata (Takahata) study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 673-682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-021-01953-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------