The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | The CR9 element is a novel mechanical load-responsive enhancer that regulates natriuretic peptide genes expression |
| Author(s) | Miyashita, Yohei |
| Citation | 大阪大学, 2022, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/89475 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

# 論　文　内　容　の　要　旨
## Synopsis of Thesis

| 氏　名<br>Name | 宮下　洋平 |
|---|---|
| 論文題名<br>Title | The CR9 element is a novel mechanical load-responsive enhancer that regulates natriuretic peptide genes expression<br>（CR9は、ナトリウム利尿ペプチド遺伝子の発現を調節する新規の機械的負荷応答性エンハンサーである） |

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

心肥大や心不全による左室壁ストレスの上昇およびアントラサイクリン系抗生剤であるドキソルビシンによる心毒性に伴い血漿BNP濃度が上昇することはよく知られているが、これらの刺激によってNppb遺伝子の発現量がどのように調整されているのかについては知られていない。Nppb遺伝子のエンハンサーであるCR9が心肥大・心不全に関連する特異的な条件に応答して発現を調整できるのではないかと考え、CR9エンハンサーの活性化とNppb遺伝子発現の増加が同時に起こる病態生理学的要因と経路について解明することを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

Tg(CR9-luc)マウスに対し心肥大・心不全を誘発しうる薬剤（フェニレフリン（PE）・アドレナリン（Adr）・ドキソルビシン（Dox））を投与したところ、CR9活性、Nppb mRNAおよび血漿BNPは上昇した。一方で同様の薬剤負荷を培養心筋細胞に行うと、DoxのみNppb発現が低下し、In vivo実験の結果との相違がみられた。

培養細胞にDoxを負荷した条件下で細胞に機械的刺激（細胞の伸展および圧負荷）を加えたところ、Nppb mRNAおよび培地中のBNP濃度の上昇を認めた。次に機械的刺激がCR9活性とNppb mRNA上昇につなげるシグナル伝達経路について検討した。Csrp3遺伝子によってコードされるMLPは心筋細胞で発現するメカノセンサータンパク質の一つであるため、siRNAを用いてMLPの発現をノックダウンしたところ、CR9、Nppbともに機械的刺激環境下においても有意に低下した。

また、心筋ミオシンは Z ディスクとコスタミアに接続されているため、サルコメア内の心筋ミオシン張力がメカノセンシングとメカノトランスダクションに影響を与えるのではないかと考え、心臓ミオシンII ATPaseの特異的阻害剤であるMYK-461もしくはBDMの存在下で、機械的刺激またはアドレナリン刺激に曝露したところ、CR9,Nppbともに抑制された。

また、CR9エンハンサーが心肥大もしくは心不全の病態特異的エンハンサーであることを示すため、Nppb遺伝子の最小プロモーターとレポーター遺伝子（Luciferase）のみ（*miniPNppb*-Luc）、およびCR9、Nppb最小プロモーター、レポーター遺伝子を有する（CR9-miniPBNP-Luc）レンチウィルスベクターを作製した。機械的刺激および薬剤条件下でLuciferase活性はCR9-miniPBNP-Lucをトランスフェクトした心筋細胞でのみNppb mRNAおよびBNP濃度に比例した上昇がみられ、*miniPNppb*-Lucの場合や線維芽細胞にトランスフェクトした場合には有意な変化を認めなかった。

〔総　括(Conclusion)〕

CR9エンハンサーは、メカノセンシングおよびメカノトランスダクション経路を介して、心筋細胞における機械的負荷によって活性化される。体積過負荷または圧力過負荷のある心臓の病理学的条件では、CR9が活性化されてNppb発現がアップレギュレートされる可能性がある。

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

| | | | |
|---|---|---|---|
| （申請者氏名） | 宮下 洋平 | | |
| | （職） | | 氏　名 |
| 論文審査担当者 | 主　査 | 大阪大学教授 | 高島成二 |
| | 副　査 | 大阪大学教授 | 金井好克 |
| | 副　査 | 大阪大学教授 | 岡村康司 |

## 論文審査の結果の要旨

本研究は心不全の代表的マーカーであるBNPをコードするNppb遺伝子の発現制御機構の解明を目指したものである。先行研究にて同定された同遺伝子のエンハンサー領域であるCR9の活性に着目した研究であり下記の結果を得ている。

1．CR9活性をフェニレフリン、アドレナリン、ドキソルビシンを用いて評価すると動物実験ではいずれもエンハンサー活性が上昇したが、培養心筋細胞を用いた実験ではドキソルビシンの場合のみ活性が低下した。
2．上記の活性低下は培養心筋細胞に伸展および加圧の機械的刺激を加えることで改善した。
3．そこで心筋細胞のメカノセンシングに関与しているMLPをsiRNAを用いてノックダウンするとCR9活性は低下した。
4．またメカノトランスダクションに関与している心筋ミオシンについてATPaseの特異的阻害薬を用いるとやはりCR9活性は低下した。
5．これらの背景にはCR9配列に含まれるNkx2.5遺伝子に対する種間の保存性が高いモチーフが関与している可能性があることを示した。

以上の通り、本論文ではNppb遺伝子のエンハンサーは機械的刺激によって活性化されることを証明した。この研究は遺伝子のエピジェネティックな制御機構を生化学的に解明しただけではなく、その活性制御が今後の創薬ターゲットとなりうる展望をも切り拓くものであり博士（医学）の学位授与に値する。