

イスラム マジハール 氏の学位論文審査の要旨

論文題目

Organoids from Nephrotic Disease-Derived iPSCs Identify Impaired NEPHRIN Localization and Slit Diaphragm Formation in Kidney Podocytes
(ネフローゼ症候群患者由来の iPSC 細胞から誘導した腎臓ポドサイトにおけるネフリンの局在異常の同定)

ネフリンをコードする遺伝子 *NPHS1* の変異は先天性ネフローゼ症候群の原因となり、患者は腎糸球体ポドサイトのスリット膜形成異常によって生後から高度の蛋白尿をきたす。しかし、スリット膜再構成の手法がなかったため、この領域の研究はこれまで不十分であった。本研究は、*NPHS1* 遺伝子のミスセンス変異を有する患者からヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立し、iPS 細胞から誘導した腎臓オルガノイドを用いてスリット膜形成過程を再現することで、病態の機序を明らかにすることを目的として行われた。

既に研究室で確立された方法を用いて、*NPHS1* 遺伝子に変異 (E725D) を有する患者由来 iPS 細胞を調製し、これから腎臓オルガノイドを誘導した。このオルガノイドの表現型を、変異を有さない iPS 細胞から誘導した腎臓オルガノイドと *in vitro* および *in vivo* で比較することによって、疾患が起こるメカニズムを解析した。また、ヒト胎児腎由来の HEK293 細胞に E725D 変異を有するネフリン蛋白を過剰発現し、同様の解析を行った。さらに、患者由来 iPS 細胞の変異遺伝子を野生型遺伝子で置換することにより、疾患の表現型が回復するかについても検討した。

その結果、HEK293 細胞に変異型ネフリンを過剰発現すると、ネフリンの細胞膜への局在が明らかに障害された。この機序として、ネフリン蛋白の糖鎖修飾の減少によって変異蛋白が細胞質内に留まることによる可能性が考えられた。患者由来 iPS 細胞から誘導した腎臓オルガノイドを用いた解析では、変異型ネフリンはポドサイトにおける細胞膜への局在障害ならびにスリット膜前駆体の形成不良を呈した。さらに、*in vivo* の移植実験にて、変異を有するポドサイトでは足突起は形成されるものの、その先端へのネフリンの局在とスリット膜形成が障害された。一方、変異アミノ酸を野生型に置換することにより、ネフリン蛋白の細胞膜への局在が改善し、さらにネフリン蛋白のリン酸化、スリット膜関連蛋白との共局在、およびスリット膜形成が回復した。すなわち、この変異が病態の原因であること、その正常化で病態が改善することが示された。以上より、患者由来 iPS 細胞から誘導した腎臓オルガノイドを用いて、先天性ネフローゼ症候群におけるスリット膜形成異常の初期病態が明らかとなった。また、この系を用いることで機序解明や薬剤スクリーニングにおいて有用である可能性が示唆された。

審査では、1)ネフリン局在異常が起こるメカニズム、2)ネフリン蛋白の変異の構造活性相関、3)iPS 細胞と HEK293 細胞との共通点と差異、4)iPS 細胞クローン間での違い、5)遺伝子治療の効率、6)糖鎖修飾とアミノ酸変異および細胞膜局在との関係、7)リン酸化の意義とネフリンの機能との関係、8)ER ストレスの意義、9)今後の治療への応用、などについて質問がなされ、申請者から適切な回答と考察がなされた。

本研究は、先天性ネフローゼ症候群におけるネフリンの変異によってスリット膜形成異常が起こる機序について検討したものであり、今後のネフローゼ症候群患者における病態解明および診断・治療法進展のために重要な研究と考えられ、学位の授与に値すると評価した。

審査委員長 腎臓内科学担当教授

向山 政志