

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 山本 準也

学位論文題名

分岐鎖アミノ酸および蛋白質負荷が常染色体優性多発性嚢胞腎の
嚢胞形成に与える影響の解析

(Studies on effects of branched-chain amino acids and dietary protein loading on
cyst development of autosomal dominant polycystic kidney disease)

【背景と目的】常染色体優性多発性嚢胞腎(Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease :ADPKD)は腎臓を主体とした嚢胞形成と進行性の嚢胞増大を特徴とする遺伝性腎疾患であり,嚢胞増大と共に進行性の腎機能障害を呈し,40~60歳で末期腎不全に至る. ADPKD の原因遺伝子である *PKD1* および *PKD2* が同定され,各々の遺伝子産物である polycystin-1 および polycystin-2 は腎の尿細管上皮細胞の繊毛に局在し,尿流を感知した polycystin-1 がカルシウムイオンチャネルを有する polycystin-2 に刺激を伝達し細胞内カルシウム濃度を正常に維持することで,適切な尿細管径の調節が行われる. ADPKD では polycystin-1 または polycystin-2 の機能異常により尿細管径の調節ができなくなり,嚢胞が形成される.細胞内カルシウム濃度の低下は extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK)経路および mammalian target of rapamycin (mTOR)経路等の細胞増殖経路を活性化させることで ADPKD の嚢胞形成に関わっている.近年,ADPKD の治療薬としてバゾプレシン V2 受容体拮抗薬であるトルバプタンが使用可能になったが,制約も多く現時点ではすべての ADPKD 患者に適応できる治療ではない.そのため,レニン・アンジオテンシン系(Renin-angiotensin system :RAS)阻害薬による降圧療法や蛋白質制限が慢性腎臓病(Chronic kidney disease :CKD)全般に対してと同様に ADPKD 患者に対して行われている.しかし,これら従来治療の ADPKD の嚢胞増大・腎機能障害抑制効果に関しては一定の見解が得られていない.

本研究では日常的に食事から摂取される蛋白質および蛋白質の構成成分であるアミノ酸に着目して,アミノ酸または蛋白質の負荷が ADPKD の嚢胞形成や病態にどのような影響を与えるか調べることにした.第一章では mTOR 経路の活性化作用を持つ分岐鎖アミノ酸(Branched-chain amino acid :BCAA)に注目し,BCAA が mTOR 経路の活性化作用により ADPKD において尿細管上皮細胞および嚢胞上皮細胞の増殖を促進して,嚢胞増大を伴い ADPKD の病態を悪化させるという仮説を立てた.第二章では食事蛋白質量の変化が ADPKD の嚢胞増殖や病態をどのように修飾するかを解析した.

第一章：分岐鎖アミノ酸が常染色体優性多発性嚢胞腎の嚢胞形成に与える影響

【方法と結果】

1. ADPKD モデルマウスに対する分岐鎖アミノ酸投与実験

Polyinosinic-polycytidylic acid(pI-pC)による薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスである *Pkd1^{fllox/fllox}; Mx1-Cre* マウスを使用した.生後 14 日目から連続 6 日間 pI-pC を投与することで, *Pkd1* を欠失させた. BCAA あるいはプラセボ(コーンスターチ)を飲料水に溶解して 4 週齢から 22 週齢まで投与し,マウス表現型および細胞増殖シグナル

に与える影響を解析した。プラセボ投与群と比較して BCAA 投与群は腎および肝の嚢胞形成促進および組織線維化の促進が認められた。Ki-67 染色により BCAA 投与群において腎および肝の嚢胞上皮細胞の増殖促進を認めた。免疫組織染色およびウエスタンブロッティング法により BCAA 投与群はプラセボ群と比較して mTOR 経路だけではなく、ERK/MAPK 経路の活性化を示した。

2. マウス *Pkd1* ホモ欠失尿細管上皮細胞に対するロイシン添加実験

マウス由来 *Pkd1* ホモ欠失(*Pkd1*^{-/-})尿細管上皮細胞株に対して BCAA の中でも強い生理作用を持つロイシンを添加により生じる細胞増殖の変化や増殖シグナルの変化を解析した。ロイシンの添加により *Pkd1*^{-/-}尿細管上皮細胞の増殖は促進され、ロイシンによる mTOR 経路および ERK/MAPK 経路の活性化が確認された。一方、対照群として用意した *Pkd1*^{+/+}尿細管上皮細胞ではロイシン添加による細胞増殖促進は認められなかった。mTOR 阻害薬である rapamycin, ERK/MAPK 阻害薬である PD98059 および U0126 は標的経路を阻害することで、ロイシンにより誘導された *Pkd1*^{-/-}尿細管上皮細胞の増殖を抑制した。

第二章：蛋白質負荷が常染色体優性多発性嚢胞腎に与える影響

【方法と結果】第一章と同様に *Pkd1*^{flox/flox}: *Mx1-Cre* マウスを使用して、生後 14 日目から連続 6 日間 pI-pC を投与して、*Pkd1* を欠失させた。マウス飼料の蛋白質量の多寡により高蛋白食群、普通蛋白食群、低蛋白食群の 3 群に割り付けして、4 週齢から 22 週齢まで飼育し、マウス表現型を中心に解析した。高蛋白質群は他の 2 群と比較して、腎および肝の嚢胞形成促進および組織線維化の促進が認められたが、一方で低蛋白質群では普通蛋白群と比較して嚢胞増大抑制効果および組織線維化の抑制は認められなかった。

高蛋白質群では腎局所の RAS 活性を反映するとされる尿中アンジオテンシノーゲンの排泄量が他群と比較して高値であり、低蛋白質群では普通蛋白群と比較して血液の酸化ストレスが高値であった。血清アルブミン値は各群間で差を認めなかった。

【考察】第一章では BCAA が mTOR 経路だけではなく ERK/MAPK 経路も活性化させることで、ADPKD の嚢胞上皮細胞増殖を介して嚢胞形成促進に寄与することが *in vivo*, *in vitro* の両方向から示唆された。また、ADPKD 病態における mTOR 経路および ERK/MAPK 経路の重要性の再確認された。BCAA はサプリメントとして頻用される以外にも、非代償性肝硬変の低アルブミン血症改善や血液透析患者の栄養状態改善のための治療薬として用いられる。本研究の結果より、ADPKD 患者における BCAA 使用の潜在的な有害性が示唆されたため、ADPKD 患者に対する BCAA の処方メリットとデメリットを考慮した上で行う必要があると考えられた。第二章では過剰な蛋白質負荷が ADPKD において腎臓および肝臓の嚢胞形成、組織線維化を促すことが示唆された。蛋白質の構成成分はアミノ酸であるため、蛋白質負荷はアミノ酸負荷となり、第一章で示したような BCAA による嚢胞形成促進という機序の関与も考えられる。ADPKD 患者では CKD 早期の段階から過剰な蛋白摂取は避ける様に指導するべきであると考えられた。ADPKD をとりまく治療のエビデンスは未だ不足している状況であり、本研究を発展させることで、ADPKD における望ましい栄養の在り方について言及できる可能性がある。

【結論】BCAA 投与および蛋白質過剰負荷は ADPKD の嚢胞形成促進・組織線維化の促進により病態悪化に寄与することが示唆された。