

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 牧 田 実

学位論文題名

V-ATPase 阻害薬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 V-ATPase inhibitor 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)は最も頻度の多い遺伝性腎疾患であり、加齢と共に腎臓を主体とした嚢胞形成と進行性の腎機能障害を特徴とする。頻度は約 1000~2000 人に 1 人であり、70 歳で約半数が末期腎不全に至る。ADPKD では脳動脈瘤、心臓弁膜症、多発性肝嚢胞などの腎外病変も合併し、高血圧症や嚢胞増大に伴う臓器圧迫症状を呈する。ADPKD の原因遺伝子として *PKD1* 遺伝子と *PKD2* 遺伝子が同定されている、*PKD1* の遺伝子産物である polycystin-1 と *PKD2* の遺伝子産物である polycystin-2 は、腎の尿細管上皮細胞の繊毛に局在する膜貫通蛋白であり polycystin-1 が尿流を感知して、刺激を受けたカルシウムイオンチャネルである polycystin-2 が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と考えられている。ADPKD では polycystin-1 または polycystin-2 の機能異常が生じることにより、細胞内カルシウム濃度の低下が起こり、cyclic adenosine monophosphate (cAMP) の増加とその下流に位置する extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) 経路、mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路等の細胞増殖に関わる経路が活性化している。また嚢胞形成にかかわる細胞増殖因子として、Wnt シグナルの存在も報告されている。Wnt シグナルのひとつである β カテニン経路は細胞の増殖や分化に関わる経路であり、Wnt 受容体や GSK3 β を介して、細胞内の β カテニンが蓄積し、核内に移行することによって、Cyclin D1 などの転写因子が働き、遺伝子発現や細胞の増殖や分化が促進する。近年 Wnt 受容体の構造に関する報告がなされ、細胞膜上で、プロレニン受容体 (ATP6AP2) を介して、Vacuolar adenosine triphosphatase (V-ATPase) と共存していることが明らかになった。V-ATPase は全ての真核細胞のリソソームなどの内胞系に存在するほか、破骨細胞や尿細管上皮細胞の細胞膜にも存在する。V-ATPase は、プロトン(H⁺)ポンプとしてリソソーム分解に関与するほか、尿細管や膀胱において尿を酸性化し、癌細胞において、癌細胞の増殖や転移において重要な働きをする。実際、V-ATPase は癌領域において様々な報告がされており、Wnt シグナルや mTOR 経路、アポトーシスにも関連している。また種々の腫瘍に対して V-ATPase 阻害薬により V-ATPase を阻害したところ、腫瘍増殖抑制効果が認められた報告が散見されている。しかし、V-ATPase が ADPKD にどのように関わっているか報告はない。我々は V-ATPase は Wnt signal を介して、ADPKD に関与している可能性を考えた。本研究では、V-ATPase を阻害することで、嚢胞形成や病態がどのように変化するか調べた。V-ATPase 阻害薬が嚢胞形成を抑制するという仮説を立て、下記の実験を行った。

【材料と方法】実験①では、IFN 誘導体である polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) によってノックアウトされる、薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウス (*Pkd1*^{flox/flox}; *Mx1-Cre* mice) を作製し、使用した。生後 7 日目または 14 日目からの pI-pC 投与によってそれぞれ安定した表現型が得られており、治療薬投与実験が可能なヒト ADPKD のモデル動物として適している。実験①A では生後 14 日目から pI-pC 投与を行ったマウス

に、体重 1g 当たり Bafilomycin A1 として 0.1~1.0 μ g/day の投与量となるよう、皮下に浸透圧ポンプを埋め込み 10 週目から 22 週目まで薬剤の持続投与を行った。22 週齢で屠殺し、体重、腎重量体重比、肝重量体重比、Cystic Index (腎・肝)を測定した。実験①B では生後 7 日目から pI-pC 投与を行ったマウスに、体重 1g 当たり Bafilomycin A1 として 2.0 μ g/day の投与量となるよう、14 日目から 35 日目まで 1 日 1 回、皮下注射を行った。22 週齢で屠殺し、体重、腎重量体重比、肝重量体重比、Cystic Index (腎・肝)を測定した。実験②では胎生期に腎限局型にノックアウトされるコンベクショナルノックアウトマウス (*Pkd1*^{flox/flox}; *Ksp-Cre* mice)を作成し、使用した。腎のみに嚢胞形成が起きる早期発症モデルであり、安定した表現型が得られている。実験②A では体重 1g 当たり Bafilomycin A1 として 1.0 μ g/day の投与量となるよう、2 日目から 10 日目まで 1 日 1 回、皮下注射を行った。22 週齢で屠殺し、体重、腎重量体重比、Cystic Index (腎)、BUN を測定した。摘出した腎組織を用いて PCNA 染色や TUNEL 染色、 β -Catenin 染色、ATP6AP2 染色を行った。また、全腎を用いた Western blotting では ATP6AP2 や mTOR 経路、ERK/MAPK 経路、 β -Catenin 経路の蛋白発現量を測定した。実験②B では②A と同様に 2 日目から皮下注射を死亡前日まで行い、生存率を評価した。実験③ではマウス由来 *Pkd1* ホモ欠失尿細管上皮細胞株を用いて Bafilomycin A1 を 1~10nM となるよう培養液に添加し、24 時間または 48 時間培養し、回収した。細胞数カウントや CCK-8 assay による細胞増殖能の評価を行い、Western blotting により β -Catenin 経路の変化を解析した。

【結果】実験①A では体重 1g 当たり 0.3 μ g/day より高濃度の投与量で皮下組織の壊死が起こり投与継続は不可能であった。0.3 μ g/day 投与群と Vehicle (DMSO) 投与群を比較したところ、体重、腎重量体重比、肝重量体重比、Cystic Index (腎・肝)の有意差を認めなかった。実験①B では体重、腎重量体重比、肝重量体重比、Cystic Index (腎)の有意差を認めなかったが、Cystic Index (肝)は Vehicle (1%DMSO+99%生理食塩水) 投与群に比べて Bafilomycin A1 投与群で有意に低値であった。実験②A では、Vehicle (1%DMSO+99%生理食塩水) 投与群に比べて Bafilomycin A1 投与群で、腎重量体重比、Cystic Index (腎)が有意に低値であり、体重や腎機能 (BUN) の有意差を認めなかった。V-ATPase の付属蛋白である ATP6AP2 の免疫染色や Western blotting では、それぞれ蛋白発現の低下を認め、Bafilomycin A1 の効果を確認した。PCNA 染色では嚢胞壁の尿細管上皮細胞の PCNA 陽性細胞率の低下を認め、TUNEL 染色では有意差を認めなかった。細胞増殖シグナルの変化を確認するため Western blotting でリン酸化 ERK、リン酸化 mTOR の発現を評価したが有意差は認めず、リン酸化 GSK3 β 、 β -Catenin、Cyclin D1 の有意な発現低下を認めた。実験②B では、生存率に有意差を認めなかった。実験③では、細胞カウントによる増殖細胞数、CCK-8 assay による細胞増殖能ともに、Bafilomycin A1 濃度依存性に低下を認め、Vehicle (DMSO) 投与群に比べ 2nM より高濃度の Bafilomycin A1 投与群で有意であった。Western blotting では、細胞内の β -Catenin、Cyclin D1 の有意な蛋白発現量低下を認めた。

【考察】本研究により、肝嚢胞や腎嚢胞に対して Bafilomycin A1 の有用性が認められた。また β -Catenin 経路を抑制することで尿細管上皮細胞の増殖を抑制し、腎嚢胞形成を抑制することが示唆された。Bafilomycin A1 の有用性は多くの癌腫で報告され、 β -Catenin 経路を抑制することも報告されており、本研究と相反しないものと考えた。しかしながら、Bafilomycin A1 は毒性が強いため動物モデルでの使用報告にとどまっており、今後は組織特異的な V-ATPase 阻害薬など、より毒性の少ない V-ATPase 阻害薬での検討が望まれる。また本研究は V-ATPase と ADPKD との関係を初めて報告するものであり、ADPKD の病態解明や創薬の契機になるものと考えられた。

【結論】V-ATPase 阻害薬は ADPKD の嚢胞形成を抑制することが示唆された。