

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09679

研究課題名(和文)多発性嚢胞腎における嚢胞増悪の機序、および予後予測因子の解明

研究課題名(英文)Analysis of a factor and mechanism of cyst progression

研究代表者

西尾 妙織 (Saori, Nishio)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：90463736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)の予後を予測するバイオマーカーとして現在腎容積を使用しているが、他の因子を明らかにするためにコホート研究を行った。データ収集は終了し、遺伝子の結果も得た。今後結果を報告する予定である。また、ADPKDモデルマウスに対する必須アミノ酸を負荷する研究では、嚢胞が悪化し、嚢胞上皮にLAT1の発現が亢進していることを発見した。この結果は論文として報告済みである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADPKDはすべての患者が末期腎不全に至るわけではなく、同じ家系でも進行に差がある。予後予測因子を明らかにすることは、治療すべき患者を明確にするために非常に重要である。今回の研究で予後予測因子が明らかにできれば、今後の治療に非常に役立つ事ができる。また、ADPKDモデルマウスに必須アミノ酸を負荷することで、嚢胞が悪化することが明らかになったことで、ADPKD患者が必須アミノ酸を取り過ぎない方がよい可能性が示唆された。更に嚢胞上皮細胞にLAT1の発現が認められた。今後はLAT1をターゲットとした、治療法の開発を行っていかうと考えており、新規治療に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is characterized by the progressive development of kidney and liver cysts. In this study, I aimed to assess the predictive value of genotypic and clinical factors and to develop a prognostic algorithm to forecast the progression to ESRD in patients with ADPKD. I completed collection the clinical data and analysis of genotype. I will publish them in the near future. In addition, I analyzed the mechanism of cyst progression by administering BCAA dissolved in the drinking water to Pkd1model mice. I found Branched-chain amino acids (BCAA) accelerated both kidney and liver cysts progression by mTOR and MAPK/ERK pathways. Furthermore, I found that L-type amino acid transporter 1 (LAT-1), which is amino acid transporter, was upregulated in cyst-lining cells. These results have been published in Kidney International.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：多発性嚢胞腎 バイオマーカー アミノ酸 LAT1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

常染色体優性遺伝性多発嚢胞腎 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease : ADPKD) は遺伝性腎疾患の中で最も頻度が多く (約 1000 人に 1 人)、加齢とともに嚢胞が両腎に増加し、進行性に腎機能が障害され、60 才までに約半数が腎不全に陥る疾患であり、また高血圧、多発肝嚢胞、脳動脈瘤などさまざまな腎外症状をきたす全身疾患である。原因遺伝子としては、*PKD1* と *PKD2* が同定されている。現在 ADPKD 患者の予後予測因子として明確なものはなく、総腎容積 (TKV) が唯一予後を予測できるバイオマーカーとして使用されている。その他の予後予測因子としては、男性であること、35 才以下の診断、遺伝子異常が *PKD1*(truncating) であることなどがあるが、漠然としており臨床応用にはほど遠いのが現状である。よって、日本人に最適な臨床で使用可能なバイオマーカーを明らかにすることは非常に重要である。

ADPKD 患者は常染色体優性遺伝であるが、同一家系内でも進行速度が異なることが知られている。遺伝子が同じにも関わらず、進行速度に差がある事に関しては、食塩やカフェインの過剰摂取、喫煙、環境因子などが影響する可能性が言われている。近年、食事制限が嚢胞形成を抑制するという報告がされた (Warner G, et al. J Am Soc Nephrol. 2016)。この様に食事などの環境因子は非常に嚢胞進行において重要である可能性がある。

2. 研究の目的

(1) ADPKD の進行を予測するバイオマーカーの解析

- ①現在使用されている腎容積以外の新たなバイオマーカーを明らかにする。
- ②現在難病申請や薬物治療開始の基準となっている腎容積 750ml 以上かつ、腎容積増大速度が年間 5%以上が日本人に最適であるかを解析する。
- ③ADPKD の治療アルゴリズム作成する。

(2) 食事が ADPKD の進行に与える影響を明らかにし、ADPKD 患者の増悪を抑制する治療に結びつける。

- ①ADPKD モデルマウスに対する必須アミノ酸 (BCAA) 負荷の影響の解析する。
- ②ADPKD モデルマウスに対する高蛋白食および低タンパク食の影響の解析する。
- ③ADPKD モデルマウスに対する高リン食負荷の影響の解析をする。

3. 研究の方法

(1) ADPKD の進行を予測するバイオマーカーの解析

- ①コホート研究の実施
- ②患者登録と臨床情報の収集
- ③遺伝子解析
- ④データの解析

①②旭川医科大学、北見赤十字病院と共同研究とし、それぞれの施設で倫理審査で承認後、症例登録を開始し、計 255 例の患者を登録した。カルテ情報、検査結果、腎容積などについて情報収集をおこなった。

③大塚製薬株式会社との共同研究とし、徳島研究所 基盤技術センターにて解析を行った。

④データを JMP Pro 14 を用いて行った。

(2) 食事が ADPKD の進行に与える影響を明らかにし、ADPKD 患者の増悪を抑制する治療に結びつける。

- ①ADPKD モデルマウスに対する必須アミノ酸 (BCAA) 負荷の影響の解析を行った。
- ②ADPKD モデルマウスに対する高蛋白食および低タンパク食の影響の解析を行った。
Pkd1^{lox/lox}:*MX1-Cre* マウスに BCAA あるいは蛋白調整食を負荷し、病理組織学的検討、シグナル経路を明らかにするために免疫組織染色、ウェスタンブロッティング法などを使用し解析を行った。
- ③ADPKD モデルマウスに対する高リン食負荷の影響の解析を行った。
Pkd1 ヘテロマウスに高リン食を与え、嚢胞形成機序について解析を行った。

4. 研究成果

(1) ADPKD の進行を予測するバイオマーカーの解析

255 例の臨床情報、検査結果、腎容積のデータ収集が終了し、解析を行っている。また、測定したマーカーとの関連を解析し、今後、論文の形で投稿する予定である。

(2) 食事が ADPKD の進行に与える影響を明らかにし、ADPKD 患者の増悪を抑制する治療に結びつける。

- ①ADPKD モデルマウスに対する必須アミノ酸 (BCAA) 負荷の影響の解析

BCAA 製剤はマウス飲料水に溶解し、20 mg/mL の濃度になる様に調整し、*Pkd1^{flox/flox}: Mx1-Cre* マウス (Cystic) 4 週齢より 22 週齢まで自由飲水行動下で投与し、22 週齢で屠殺解剖し解析を行った。腎臓、肝臓とも BCAA 投与群でより多くの嚢胞形成を認めていた (図 1a)。腎重量・体重比は *Pkd1^{flox/flox}: Mx1-Cre* マウスにおいて BCAA 投与群がプラセボ投与群と比較して有意に高値であった (図 1b)。腎臓および肝臓組織横断面面積における嚢胞面積の占める割合と定義される Cystic Index は BCAA 投与群がプラセボ群と比較して有意に高値であり (BCAA 27.5±5.42 % vs プラセボ 9.29±1.61 %, $p<0.01$)、肝の Cystic Index も同様に BCAA 群において有意に高値であった (BCAA 22.8±3.38 % vs プラセボ 9.60±2.97 %, $p<0.01$) (図 1c)。組織線維化の評価のために *Pkd1^{flox/flox}: Mx1-Cre* マウスの腎臓および肝臓に対して Elastica-Masson 染色を施行した (図 2)。腎臓・肝臓いずれにおいても嚢胞周囲の間質線維化が顕著であった。

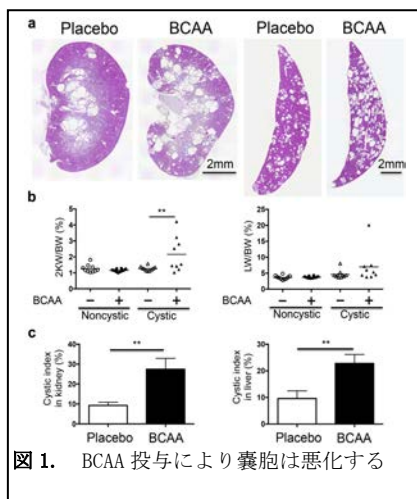


図 1. BCAA 投与により嚢胞は悪化する

マウス腎臓抽出蛋白を用いたウエスタンブロッティングによる解析では、mTOR 経路および MAPK 経路が BCAA 投与群において活性化していた。BCAA 負荷が嚢胞を悪化させる原因を明らかにするため、アミノ酸トランスポーターの解析を行ったところ、嚢胞壁には L-type amino acid

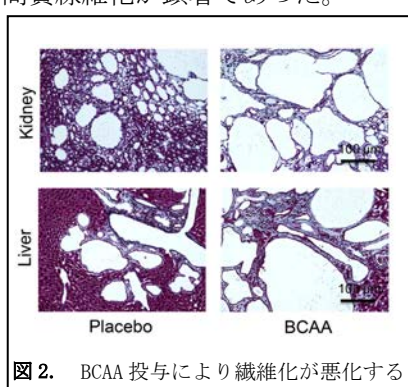


図 2. BCAA 投与により繊維化が悪化する

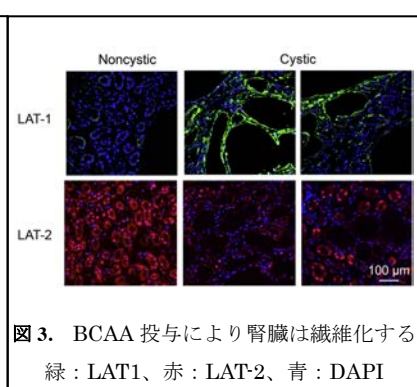


図 3. BCAA 投与により腎臓は繊維化する
緑: LAT1、赤: LAT-2、青: DAPI

transporter 1 (LAT-1) が、正常尿細管上皮には L-type amino acid transporter 2 (LAT-2) が発現していた (図 3)。LAT-1 は様々な癌細胞で発現しており、正常細胞には発現していないことが報告されており、癌細胞では LAT-1 を介して細胞がアミノ酸を取り込み、増殖していることが明らかになっている。LAT-1 阻害薬は癌治療薬としての可能性が報告されている。今後、LAT-1 阻害薬が ADPKD の治療薬となり得ないかについての検討を更に続けていく予定である。この結果は *Kidney Int.* 2017. 92(2):377-387. に報告した。

②ADPKD モデルマウスに対する蛋白負荷および蛋白制限。

Pkd1^{flox/flox}: Mx1-Cre マウスに蛋高蛋白食投与を行ったところ、BCAA 負荷時と同様に嚢胞の悪化が得られた。低タンパク食投与では嚢胞形成が改善されると予測していたが、低タンパク食群でも嚢胞増悪が見られた。この機序については①の BCAA 投与研究と関連があることがわかっており、更に解析をすすめている。

③ADPKD モデルマウスに対する高リン食負荷の影響の解析を行った。

Pkd1 ヘテロマウスに高リン食を与え半年後、1 年後での解析を行ったところ、通常食群ではほとんど嚢胞形成が見られなかったが、高リン食群にて嚢胞形成が見られた。嚢胞形成マウスを得るのに長期間かかる研究のため、解析に時間を要しているが、今後嚢胞形成機序の解析を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hattanda F, Nakazawa D, Watanabe-Kusunoki K, Kusunoki Y, Shida H, Masuda S, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A.	4. 巻 Mar 20
2. 論文標題 The presence of anti-neutrophil extracellular trap antibody in patients with microscopic polyangiitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/kez089.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Y, Fukunishi S, Nishio S, Yoshiya S, Hashimoto K, Simura Y	4. 巻 Feb 25
2. 論文標題 Evaluating the Effect of Intravenous Acetaminophen in Multimodal Analgesia After Total Hip Arthroplasty: A Randomized Controlled Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Arthroplasty.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arth.2019.02.033.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakuhara Y, Nishio S, Hattanda F, Soyama T, Takahashi B, Abo D, Mimura H	4. 巻 Feb 15
2. 論文標題 Initial experience with the use of tris-acryl gelatin microspheres for transcatheter arterial embolization for enlarged polycystic liver.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s10157-019-01714-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto J, Nishio S, Hattanda F, Nakazawa D, Kimura T, Sata M, Makita M, Ishikawa Y, Atsumi T.	4. 巻 92(2)
2. 論文標題 Branched-chain amino acids enhance cyst development in autosomal dominant polycystic kidney disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 377-387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2017.01.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nishio S
2. 発表標題 Tolvaptan for ADPKD; The latest clinical evidence and Japan's post-launch experience
3. 学会等名 ISN Frontier Meetings 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishio S
2. 発表標題 Clinical research of ADPKD in JAPAN
3. 学会等名 The 2nd International Forum on Polycystic and Rare Kidney Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西尾妙織
2. 発表標題 新しい治療への展望
3. 学会等名 48回日本腎臓学会東部学術大会 シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----