

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08687

研究課題名(和文) 抗アミノ酸療法を用いた多発性嚢胞腎の治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategy of ADPKD by anti-amino acid treatment

研究代表者

木村 徹 (Kimura, Toru)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：30433725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は腎臓嚢胞形成が特徴で、最終的に透析を伴う末期腎不全になる場合が多い。必須アミノ酸の1つであるロイシンは、mTOR系を活性化すること、嚢胞形成過程にはmTORを介した細胞増殖が起こることが知られている。本研究で、分岐アミノ酸(BCAA)投与が腎嚢胞を悪化させることを見出した。また、腎臓における嚢胞形成が特徴である常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)やそのモデルマウスにおいて、嚢胞形成部位にアミノ酸輸送体LAT1が高発現することを明らかにした。さらにBCAA投与により肝嚢胞も悪化することから、ある種のアミノ酸輸送体が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADPKDは遺伝性の疾患のなかでも発症頻度が高く、約4000人に1人が患っていると推定されている。ADPKDは透析導入患者の約10%を占める遺伝性疾患で、特異的な治療法はなかった。近年、バソプレシン受容体拮抗薬であるトルバプタンが、腎嚢胞増大と腎機能低下を抑制することが示された。しかしながら、トルバプタンで治癒するだけでなく、さらなる治療法の開発が待たれている。ADPKDの治療法は、トルバプタン以外確立されたものはなく、新規治療薬の開発が待たれるが、その研究は緒に就いたばかりである。本研究計画が進めば、ADPKDの新たな治療法確立につながり、社会に対して大きな貢献をもたらすことは間違いない。

研究成果の概要(英文)：Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a human genetic disorder and is characterized by the progressive development of kidney and liver cysts. ADPKD patients develop progressive chronic kidney disease that can reach to end-stage kidney failure. The main pathogenic features of ADPKD are enhanced tubular-cell proliferation, fluid secretion, and cyst formation along all segments of the nephron. The mTOR cascade is one of the important pathways regulating cyst growth in ADPKD. Branched-chain amino acids (BCAAs), including leucine, play a crucial role to activate mTOR pathway. We found that the BCAA administration to ADPKD model mice led significantly greater fibrosis in both the kidney and liver. We showed increased cyst-lining cell proliferation and upregulation of mTOR and MAPK/ERK pathways in the BCAA group. We also demonstrated that the LAT1 that facilitates BCAA entry into cells is strongly expressed in cells lining the cysts.

研究分野：腎臓内科

キーワード：常染色体優性多発性嚢胞腎 アミノ酸トランスポーター アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は生体にとって必要な栄養素であるが、特に必須アミノ酸の1つであるロイシンは、細胞増殖のシグナル伝達に重要な役割を果たしている。細胞内に流入したロイシンは mTOR (mechanistic target of rapamycin) 系を活性化し、細胞増殖を促進させる。LAT1 は、当研究室により同定された、多くの必須アミノ酸を含む大型中性アミノ酸を輸送するアミノ酸輸送体である。LAT1 は、成体において胎盤、精巣、血液脳関門に発現が見られるが、特に発生初期や癌細胞に多く発現しているのが特徴である。ロイシンはこの LAT1 の代表的な基質であり、LAT1 の特異的阻害剤によってロイシンによる mTOR の活性化が抑制されることを明らかにしている (S. Ueno, T. Kimura et al. J Pharmacol Sci. 2016)。

常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) は腎臓嚢胞形成が特徴で、最終的に透析を伴う末期腎不全になる場合が多い。また ADPKD は腎臓のみならず、肝臓、脳硬膜、脾臓などにも嚢胞を併発する場合がよくみられるが、その詳細は理解されていない。ADPKD の原因遺伝子として、PKD1 および PKD2 が同定され、古くからその機能解析が行われてきた (Hughes J, et al. Nature Genet. 1995;10:151-160, Mochizuki T, et al. Science. 1996;272:1339-1342. など多数)。ADPKD 患者の約 85% が PKD1 の遺伝子変異、残り約 15% では PKD2 遺伝子変異が原因である。ADPKD は、遺伝性の疾患のなかでも発症頻度が高く、約 4,000 人に 1 人が患っていると推定されている (Higashihara E, et al. Nephron. 1998; 80: 421-427)。ADPKD は透析導入患者の約 10% を占める遺伝性疾患で、特異的な治療法はなかった。近年になってバソプレシン受容体拮抗薬であるトルバプタンが、腎嚢胞増大と腎機能低下を抑制することが示された (Trres VE et al. N Engl J Med. 2012, 367: 2407-18)。しかしながら、トルバプタンで治癒するわけではなく、バソプレシン阻害による多尿の副作用があり、さらなる治療法の開発が待たれている。腎嚢胞の成長に mTOR シグナル伝達系が関与していることから、以前からターゲットとして着目されていた。しかしながら、mTOR 阻害薬エベロリムス投与による臨床研究では、腎機能低下は抑制されなかった (Walz G et al. N Engl J Med. 2010. 363:830-40.)。ADPKD の治療法に関しては、上記のトルバプタン以外確立されたものはなく、新規治療薬の開発が待たれるが、その研究は緒に就いたばかりである。

2. 研究の目的

本研究では、ADPKD におけるアミノ酸シグナルの関与とそれをターゲットとした薬剤開発を目的として検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 嚢胞形成におけるアミノ酸投与の影響

ADPKD モデルマウスに PKD1 ノックアウトマウスがある。このマウスに対して、アミノ酸の投与を行い、嚢胞の形成状態を観察する。

(2) アミノ酸輸送体の発現解析

ADPKD モデルマウスやヒト ADPKD の腎臓におけるアミノ酸輸送体の発現を、免疫蛍光染色によって確認する。ADPKD モデルマウスでは、肝嚢胞におけるアミノ酸輸送体の発現解析も行う。

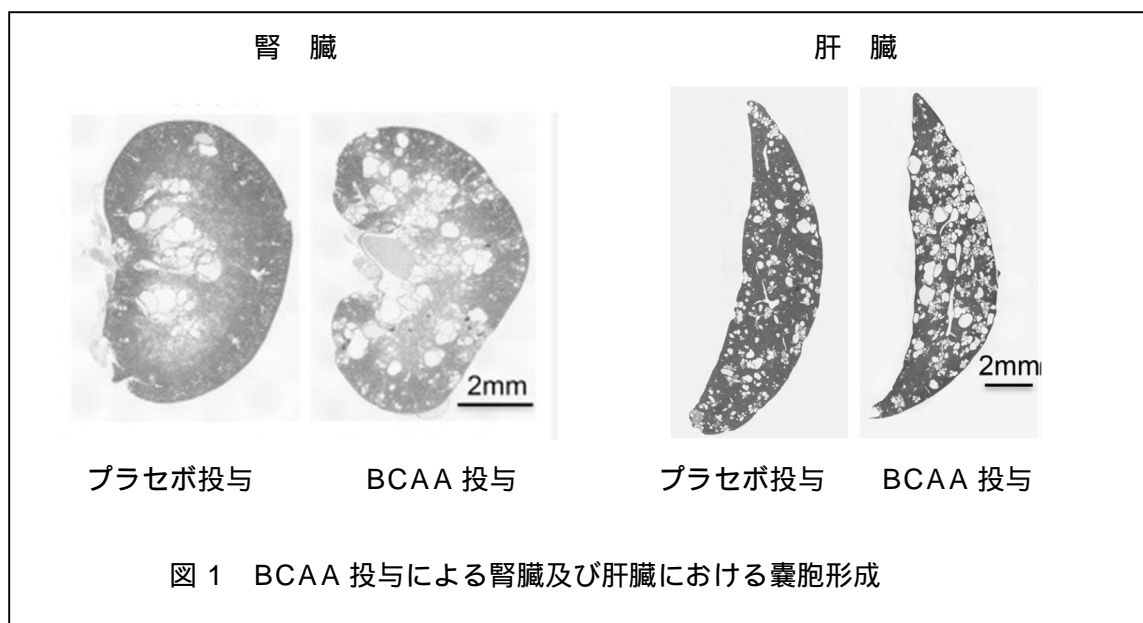
(3) 輸送体阻害による嚢胞形成の変化

確認された輸送体に関して、ロックアウトや阻害剤投与によって輸送体を阻害し、嚢胞の形成状態を観察する。

4. 研究成果

アミノ酸投与の影響

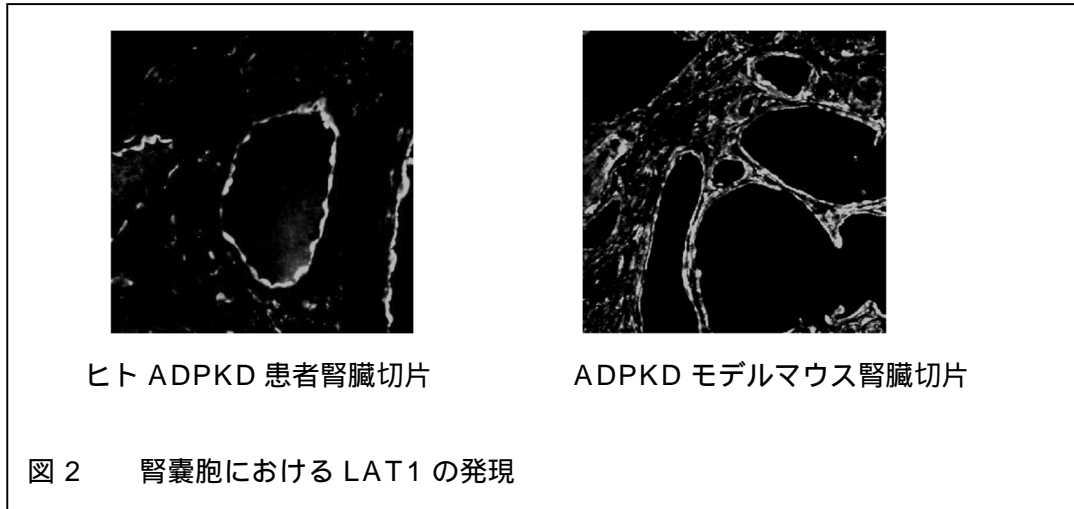
PKD1 遺伝子のロックアウトマウスは、腎臓や肝臓に嚢胞を形成する、ADPKD モデルマウスとして用いられる。BCAA (Branched Chain Amino Acid: 分岐鎖アミノ酸) は、体内でエネルギー源となる必須アミノ酸である、バリン、ロイシン、イソロイシンの総称である。ADPKD モデルマウスに対して、BCAA 分岐鎖アミノ酸を投与し、腎臓および肝臓の組織切片の観察を行った(図1)。その結果、BCAA 投与によって、腎臓においても肝臓においても、嚢胞形成が促進した。よって、アミノ酸は、嚢胞の形成や増悪過程に非常に重要な因子であると考えられた。



アミノ酸輸送体の発現

LAT1 は、当研究室により同定された、多くの必須アミノ酸を含む大型中性アミノ酸を輸送するアミノ酸輸送体である。BCAA は、この LAT1 の代表的な基質であり、LAT1 の特異的阻害剤によってロイシンによる mTOR の活性化が抑制されることを明らかにしている (S. Ueno, T. Kimura et al. J Pharmacol Sci. 2016)。図1に示した通り、ADPKD モデルマウスに BCAA を投与したところ、嚢胞形成が促進したことから、BCAA を基質とするアミノ酸輸送体の発現が示唆された。そこで、ロイシンによる mTOR の活性化に関わる輸送体 LAT1 の発現に関して検討を行った。その結果、ヒト ADPKD 患者の腎臓組織切片でも、ADPKD モデルマウス腎臓切片でも、嚢胞部位に LAT1 輸送体の発現が確認できた(図2)。これに対し、ADPKD モデルマウスにおいて、肝嚢

胞についても LAT1 発現の検討を行ったが、嚢胞部位にはその発現は確認できなかった。



BCAA 投与により肝嚢胞も悪化することから、ある種のアミノ酸輸送体が関与するはずであり、これに関しては、今後の検討課題である。

輸送体阻害による嚢胞形成

上記で示した通り、LAT1 の発現・機能上昇が腎嚢胞形成促進に関与することが考えられた。そこで、LAT1 阻害による嚢胞形成抑制効果に関して、*in vivo* での検討を行った。研究協力者の西尾沙織氏（北海道大学医学部腎臓内科・准教授）は、*cre-loxP* システムを用いた ADPKD のモデルマウスである、PKD1 コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを保持している。また我々は、同様の *cre-loxP* システムを用いた LAT1 cKO マウスを作製した。そこで、両 cKO マウスを交配させ、PKD1/LAT1 ダブル cKO マウスの作出を行い、タモキシフェン投与してダブルノックアウトマウスを作製した。ADPKD 単独ノックアウトマウスと LAT1 とのダブルノックアウトマウスについて腎嚢胞の形成を観察した結果、予想に反して嚢胞形成状態の改善は見られず、逆に悪化している個体も存在した。完全に LAT1 をノックアウトすることが影響していることも考えられた。今後、阻害剤を用いた検討も必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Marunaka Kana, Fujii Naoko, Kimura Toru, Furuta Takumi, Hasegawa Hajime, Matsunaga Toshiyuki, Endo Satoshi, Ikari Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 Rescue of tight junctional localization of a claudin-16 mutant D97S by antimalarial medicine primaquine in Madin-Darby canine kidney cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46250-4	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 Kimura Toru, Tsukada Ai, Fukutomi Toshiyuki, Ichida Kimiyoshi, Ohtsuki Sumio, Sakurai Hiroyuki	4. 巻 42
2. 論文標題 Urate Transport <i>via</i> Paracellular Route across Epithelial Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 43～49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b18-00505	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 Kawada Michitsugu, Yokoi Hidenori, Kimura Toru, Matsumoto Yuma, Sakurai Hiroyuki, Matsumoto Kenji, Fujiwara Masachika, Saito Koichiro	4. 巻 71
2. 論文標題 Involvement of galanin and galanin receptor 2 in a mouse model of allergic rhinitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 83～93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2021.07.012	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	西尾 沙織 (Nishio Saori)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------