

機関番号：32653

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590940

研究課題名 (和文) 多発性嚢胞腎モデル動物の作製と薬効評価システムの確立

研究課題名 (英文) Generation of animal models and establishment of the drug-efficacy evaluation system in polycystic kidney disease.

研究代表者

望月 俊雄 (MOCHIZUKI TOSHIO)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：00277120

研究成果の概要 (和文)：

本研究において、*Pkd2* 遺伝子欠失変異体によるトランスジェニックメダカではその繁殖の問題から薬効評価はできなかったが、生後 1 週から投与開始した薬剤誘起性の *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウス (早期嚢胞形成群) では嚢胞形成が顕著であり、mTOR 阻害薬を用いた薬剤投与実験を行うことができた。本マウスが多発性嚢胞腎における薬効評価を行うことが可能なモデル動物の一つとなることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, the efficacy evaluation system in the transgenic medaka induced by deletion mutation of *Pkd2* gene was not able to be established because of the problem of the breeding. However, in interferon-inducible *Pkd1* conditional knockout mice, in which interferon was started at one week after birth as an early cyst formation group, remarkable cyst formation was observed. It was possible to evaluate the efficacy of mTOR inhibitor for cystic formation in these *Pkd1* conditional knockout mice. It was suggested that these mice would be one of the model animals which could perform an efficacy evaluation system for treatment in polycystic kidney diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腎臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：多発性嚢胞腎、ADPKD、PKD1、PKD2、PKD1 ノックアウトマウス、トランスジェニックメダカ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝性腎疾患の中で常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) は最も頻度の高い疾患であり、本邦の透析患者原因疾患の 2-3 % を占める。ADPKD に対する根本的治療法はなく、嚢胞が大きくなるにつれ、進行性に腎

機能が低下し腎不全に至るという難治性の疾患である。

(2) 国内外において ADPKD の研究は原因遺伝子の発見以来急速に進んでおり、*PKD1* および *PKD2* 遺伝子のつくる蛋白 (それぞれポリシスチン 1 およびポリシスチン 2) は、

それぞれ尿管細胞の繊毛 (cilia) での流速センサー、Ca イオンチャンネルとして機能している。その機能喪失は尿管径の調節を破壊させ、径の増大、嚢胞形成につながるものと考えられている。(3) ヒトではヘテロ接合体 (PKD+/-) である患者の腎尿管細胞の一部に PKD 遺伝子の体細胞変異が起こり、その機能が喪失し (細胞レベルでは PKD-/-)、嚢胞が形成される。しかしマウスではヘテロ接合体では嚢胞はほとんど形成されず、ホモ接合体では胎生致死であった。ある特殊な *Pkd2* ノックアウトマウスは、胎生致死を逃れるが、嚢胞形成の程度は個体によりさまざまであり、薬剤投与研究において正確な結果を導けるかどうか疑問である。このようにヒト ADPKD のモデル動物として確立されたものはない。

(4) 病態解明が進んでいく中で、効果の期待される薬剤が登場してきており、その薬効評価をするに値するモデル動物の作製は急務であり、本研究はその目的を果たすべく研究と位置づけできるものと考えている。(5) 研究者は致死でない *Pkd* ノックアウトキメラマウスを作製し、嚢胞形成機序を詳細に解析し報告した (*J Clin Invest.* 114: 910-918, 2005)。しかし病態解析においては非常に有用であったが、そのキメラ率によって個々の表現型が異なるため、薬効評価には使用不可能であった。2 年前より薬効評価可能な動物モデルとして①テロメレース欠損マウスと *Pkd1* ヘテロ接合体との交配ならびに②*Pkd2* 遺伝子欠失変異体を導入したトランスジェニックメダカの作製を試みてきた。現在のところ、①に関しては、嚢胞形成はみられるもののモデルとしては十分ではなかったが、②に関しては、モデルとなりうる多発性嚢胞腎の表現型を得た。

(6) そこで今回私たちは、マウスに関しては、新たに薬剤誘起性のコンディショナルノックアウトマウスを使用することとし、メダカに関しては、トランスジェニックメダカの表現型を解析し、さらに薬効評価システムの確立を目的に研究を進展させていくこととした。

## 2. 研究の目的

常染色体多発性嚢胞腎 (ADPKD) のモデル動物として、*Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスならびに *Pkd2* 遺伝子欠失変異体導入トランスジェニックメダカを作製・解析し、それを用いた薬効評価システムを確立することがこの研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) *Pkd1* コンディショナルノックアウト

### マウス

予備実験の段階で作製した、米国エール大学より譲渡された *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスとインターフェロン誘起性 Mx-1 プロモーターを有する Cre recombinase トランスジェニックマウスとを交配したマウスを用いて、インターフェロン誘起性のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。

① インターフェロン誘導法の検討: インターフェロン誘導には合成二重鎖 RNA である polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) を用いた。その投与量ならびに投与時期により嚢胞形成の程度が異なるため、初めにその投与量・投与時期を検討した。予備実験において生後 1~4 週での投与量を既に検討しており、この時期はマウスの個体差が大きく、投与量を一定にすると嚢胞形成も大きくばらつくことを確認しており、今回は投与量を体重あたりに換算して行った。また投与方法は腹腔内投与としているが、誤差が出ないように極細の注射針を使用した。具体的には pI-pC 投与量を 10  $\mu$ g/kg、20  $\mu$ g/kg、30  $\mu$ g/kg、投与時期を生後 1 週、2 週、4 週、投与期間はいずれも 5 日間とした。

② 解析方法: その表現型の比較、ゲノム DNA を用いたサザンブロット解析によるノックアウト率の試算を行った。投与量、投与時期により嚢胞形成にかなりの差が認められることが予想されるため、今回は嚢胞形成の著しい早期嚢胞形成群とヒト ADPKD のような後期嚢胞形成群を得ることを目標とした。確立した早期嚢胞形成群と後期嚢胞形成群に対して以下の解析を行った。表現型の観察 (体重測定、腹部膨満など)、生化学的検査 (血清尿素窒素、血清クレアチニンの経時的な測定)、肉眼的解析 (腎臓、肝臓、膵臓などでの嚢胞形成について経時的解析)、組織学的解析 (HE 染色、Masson-trichrome 染色を行い嚢胞の形態ならびに間質の変化について検討、尿管セグメントの同定)、特殊染色による組織学的解析 (細胞増殖 (PCNA 染色)、アポトーシス (TUNEL 染色) についての検討) を行った。

③ 薬剤投与実験: mTOR 阻害薬である everolimus を嚢胞が顕著であった早期嚢胞形成群を用いてその投与実験を行った。

### (2) *Pkd2* 遺伝子欠失変異体によるトランスジェニックメダカ

作製した *Pkd2* C 末端欠失変異体 (エクソン 12-15 の欠失) による多発性嚢胞腎形成トランスジェニックメダカの解析を行

った。

#### ①メダカ *Pkd2* 遺伝子欠失変異体の表現型の解析

生直後、生後1週後、2週後、4週後に解剖し、前腎、中腎での組織学的検索を行う。嚢胞形成がどの段階で発生し、どのように発達していくか、経時的な観察を行う。組織学的な解析として、尿細管セグメントの確認（近位尿細管、遠位尿細管、集合管）を行った。

#### ②ドキシサイクリンによる暴露による影響の解析

EF1 $\alpha$ 系と Tet-On 誘導系の表現型の違いを確認するため、EF1 $\alpha$ 系のメダカをドキシサイクリンに暴露した。

### 4. 研究成果

#### (1) *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウス

薬剤誘起性の *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスでは、インターフェロン誘導に polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) を用いた。その投与量・投与時期を検討した結果、投与量は10 $\mu$ g/kgとし、投与時期を生後1週から投与開始した群において、投与後4週で嚢胞形成が著しく起こることが判明し、それを早期嚢胞形成群とした。一方、投与量は10 $\mu$ g/kgで生後2週で投与開始した群において投与後4週では嚢胞は非常に少なかったが、約6ヶ月後にはヒトADPKDのような嚢胞が腎臓ならびに肝臓に認められ、これを後期嚢胞形成群とした。この両群において、その組織学的解析を進めた。生後1週から投与開始した早期嚢胞形成群と生後2週で投与開始した後期嚢胞形成群を生後7週で比較した。早期嚢胞形成群で腎重量・体重比8 $\pm$ 2.8%、Cystic index 59 $\pm$ 5.9%、血液尿素窒素155 $\pm$ 54mg/dl、嚢胞上皮細胞のBrdU取り込み率 6.4 $\pm$ 0.4%であったのに対して、後期嚢胞形成群では腎重量・体重比1.7 $\pm$ 0.2%、Cystic index 3.6 $\pm$ 1.3%、血液尿素窒素25.5 $\pm$ 2.1mg/dl、嚢胞上皮細胞のBrdU取り込み率 4.2 $\pm$ 0.8%であり、早期嚢胞形成群において腎嚢胞形成が顕著であった。次にmTOR阻害薬であるeverolimusを嚢胞が顕著であった早期嚢胞形成群を用いてその投与実験を行った。薬剤投与群で腎重量・体重比3.6 $\pm$ 1.9%、Cystic index 31 $\pm$ 15%、血液尿素窒素 74 $\pm$ 38mg/dl、嚢胞上皮細胞のBrdU取り込み率1.3%でいずれも非投与群に比較し、著明に抑制された。肝臓についての検討では、肝重量体重比に有意差はなかったが、非投与群のCystic index 17 $\pm$ 6.4%に対し薬剤投与群のそれは7.0 $\pm$ 1.9%と有意に嚢胞形成が抑制されていた。嚢胞上皮細胞のBrdU取り込み率は3%で非投与群(11%)に比べ

著明に抑制された。TUNEL陽性細胞の検討では腎臓では薬剤投与群で27.5 $\pm$ 8.6% (非投与群8.3 $\pm$ 5.1%)、肝臓では薬剤投与群で5.8 $\pm$ 2.5% (非投与群2.1 $\pm$ 0.3%)と有意にアポトーシス細胞が増加していた。このことからmTOR阻害薬が腎嚢胞のみならず肝嚢胞にも有効であり、その機序としては細胞増殖の抑制とアポトーシスの増加の関与が示唆された。

#### (2) *Pkd2* 遺伝子欠失変異体によるトランスジェニックメダカ

生後1ヶ月～5ヶ月まで1ヶ月ごとに組織学的に観察したが、嚢胞形成は経時的に増加していくことが観察された。また尿細管セグメントに関しては近位尿細管だけでなく遠位尿細管からも嚢胞が発生していることが確認された。それぞれの系統での導入遺伝子発現量の確認、嚢胞形成の解析を行った。さらに嚢胞上皮細胞における繊毛の減少・欠落が観察された。最も嚢胞形成を認めていた *Pkd2* Tet-On 誘導系は導入遺伝子数が少なく、嚢胞形成の少ない *Pkd2* EF1 $\alpha$  系で最も導入遺伝子数が多かった。この結果から導入遺伝子数のみが嚢胞形成に関与していないことが示唆された。EF1 $\alpha$ 系と Tet-On 誘導系ではドキシサイクリンによる暴露の違いを可能性として考え、EF1 $\alpha$ 系のメダカをドキシサイクリンに暴露した。その結果 *Pkd2* EF1 $\alpha$  では嚢胞形成が促進され、*Pkd2* Tet-On 誘導系が最も嚢胞形成が著明であったのはドキシサイクリンに暴露したことも一つの要因として考えられた。なお透明/*Pkd2* 遺伝子欠失変異体トランスジェニックメダカの系統化ならびに薬剤投与システムの確立に関しては、トランスジェニックメダカの繁殖が非常に悪く、今回系統化は出来なかった。遺伝子操作自体の影響も大きな要因と考えられ、飼育環境などの整備とともに今後の課題とした。

#### (3) まとめ

*Pkd2* 遺伝子欠失変異体によるトランスジェニックメダカでは繁殖に問題が生じたため、その系統化ならびに薬効評価システムの確立は出来なかった。しかし薬剤誘起性の *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスでは、実際にmTOR阻害薬の薬効評価を具体的にを行うことが出来た。ADPKDに対する治療候補薬が次々に発表される中で、本研究で用いた *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスは、その薬効評価を行うことが可能なモデル動物の一つとなることを示せたことは大いに意義のある研究であったと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計2件)

1. 江端真一、西尾妙織、石川康暢、柴崎跡也、望月俊雄、小池隆夫：薬剤誘導型 Pkd1 コンディショナルノックアウトマウスに対する mTOR 阻害薬の効果 第 52 回日本腎臓学会学術総会 2010 年 6 月 4 日 横浜市

2. 石川康暢、西尾妙織、宮本兼玄、中垣 祐、柴崎跡也、望月俊雄、小池隆夫：欠失変異体を用いた常染色体優性多発性嚢胞腎モデルメダカの解析 第 53 回日本腎臓学会学術総会 2010 年 6 月 17 日 神戸市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

望月 俊雄 (MOCHIZUKI TOSHIO)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00277120

### (2) 研究分担者

西尾 妙織 (NISHIO SAORI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：90463736