

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08603

研究課題名（和文）多発性嚢胞腎進展に対するアミノ酸の関与と治療法の解明

研究課題名（英文）Association of amino acids in autosomal dominant polycystic kidney disease progression

研究代表者

西尾 妙織（Nishio, Saori）

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、常染色体顕性多発性嚢胞腎（ADPKD）の進展におけるアミノ酸の関与を解明し、新規治療薬の開発を目指すことを目的とした。アミノ酸トランスポーターであるLAT1とPkd1のダブルノックアウトマウスの解析からは、LAT1を完全にノックアウトすると、アミノ酸枯渇を感知し活性化する経路により嚢胞が悪化してしまったが、薬剤による適度なアミノ酸の抑制では嚢胞進行を抑制するため、アミノ酸吸収を適度に阻害する薬剤を用いることが治療に結びつく事を明らかにした。LAT1阻害薬はADPKDモデルマウスで嚢胞の進行を抑制し、新規治療薬となり、かつトルバプタンとの併用治療はさらに効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADPKDは遺伝性腎疾患でも最も多く60歳までに約半数が末期腎不全に至る疾患である。治療薬は現在トルバプタンのみであるが、多飲・多尿などの副作用があり、新たな治療薬の開発が急務である。本研究でアミノ酸吸収を阻害することが治療に結びつき、かつトルバプタン併用で治療効果が増強することを明らかにした。この結果から新規治療薬の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common inherited kidney disorder characterized by progressive cyst formation in the kidneys, resulting in bilateral renal enlargement, structural damage and kidney failure. The purpose of this study was to elucidate the involvement of amino acids in the progression of ADPKD and to develop new therapeutic agents. L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is one of the transmembrane proteins to deliver essential amino acids. Analysis of Pkd1 and LAT1 double knockout mice accelerated cyst formation via amino acids sensing mechanism. However, appropriate suppression of amino acids by drugs suppresses cyst progression.

We found LAT1 inhibitor ameliorates cystogenesis. Furthermore, we found that the combination of LAT1 inhibitor and tolvaptan inhibits the progression of cysts. These treatments may become new treatments in the future.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：常染色体顕性多発性嚢胞腎 アミノ酸 LAT1 トルバプタン

### 1. 研究開始当初の背景

常染色体顕性遺伝性多発性嚢胞腎 (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、多発性嚢胞、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。本疾患の治療薬はトルバプタンしかないが、多飲・多尿の副作用もあり、新規治療薬の開発が急務である。ADPKD のモデルマウスに必須アミノ酸 (Branched Chain Amino Acids; BCAA) 投与を行い、嚢胞が悪化すること、さらに嚢胞上皮でアミノ酸トランスポーターである LAT1 の発現が更新していることを我々は明らかにしている。

### 2. 研究の目的

常染色体顕性多発性嚢胞腎 (ADPKD) の進展におけるアミノ酸の関与を解明し、新規治療薬の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) *Pkd1* と L 型アミノ酸トランスポーター 1 (L-type amino acid transporter 1: LAT1) をコードする *SLC7A5* のダブルノックアウトを解析する。

腎限局型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスである *Pkd1<sup>flox/+</sup>: Ksp-Cre* マウス (Shibazaki et al., 2008) と杏林大学薬理学教室 櫻井裕之先生より供与された *Slc7a5<sup>flox/flox</sup>* マウスを交配させ、ダブルノックアウトマウスである *Pkd1<sup>flox/flox</sup>: Slc7a5<sup>flox/flox</sup>: Ksp-Cre* マウスを作製した。これらのノックアウトマウスは、生後 11 日齢に屠殺解剖し、解析を行った。

(2) *Pkd1* ノックアウトマウスに LAT1 阻害薬の投与を行い、その効果を解析する。

*Pkd1<sup>flox/flox</sup>: Mx1-Cre* マウスに対して生後 5 日目より 10 μg/g (BW) の pl-pC を連続 6 日間腹腔内投与し、*Pkd1* をノックアウトした。LAT1 阻害薬を腹腔内に生後 12 日から 34 日まで隔日投与し生後 35 日に屠殺解剖して検討した。

(3) LAT1 阻害薬とトルバプタンの併用治療の解析

*Pkd1<sup>flox/flox</sup>: Mx1-Cre* マウスに対し LAT1 阻害薬、トルバプタン (TLV)、LAT1 阻害薬+TLV、Vehicle 群にわけて、LAT1 阻害薬に TLV 併用した効果を検討した。

### 4. 研究成果

(1) *Pkd1* と *SLC7A5* のダブルノックアウトマウスの解析

*Pkd1* と L 型アミノ酸トランスポーター 1 (L-type amino acid transporter 1: LAT1) をコードする *SLC7A5* のダブルノックアウトマウスである *Pkd1<sup>lox/lox</sup>: Slc7a5<sup>lox/lox</sup>: ksp-cre* マウス (DKO) 群を生後 11 日目で屠殺し、解析を行った。*pkd1* のみノックアウトした SKO 群より DKO 群の方が嚢胞が悪化していた (Fig.1)。マウス体重は各群で差は認めなかった (Fig.2A)。腎重量・体重比 (2KW/BW) は DKO 群で有意に高値であり (Fig.2B)、Cystic Index も同群で有意に大きかった (Fig.2C)。腎機能に関しては、BUN は両群間で有意な差は認めなかった (Fig.2D)。KO で嚢胞が増大していた機序を解明するために、mTOR 経路について解析を行った。mTOR 経路は嚢胞増大、細胞増殖に関連することが知られており、アミノ酸感知機構の一役を担う。mTOR 経路は SKO 群で有意に亢進していた。

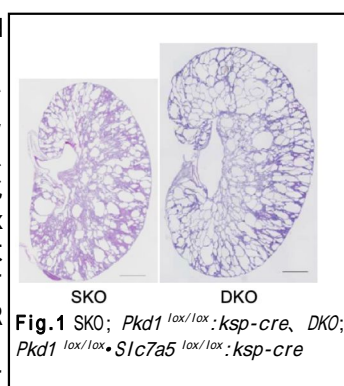


Fig.1 SKO; *Pkd1<sup>lox/lox</sup>: ksp-cre*, DKO; *Pkd1<sup>lox/lox</sup>: Slc7a5<sup>lox/lox</sup>: ksp-cre*

次に、アミノ酸枯渇を感知する GCN2/ATF4 経路の検討として、リン酸化 GCN2 及び下流のリン酸化 eIF2 の解析を行った。リン酸化 GCN2 及びリン酸化 eIF2 は SKO 群では一部の嚢胞上皮細胞で発現していたのに対し、DKO 群では広範囲の嚢胞上皮細胞で発現していた。また、ウェスタンブロッティング法では、SKO 群に比較し、DKO 群においてリン酸化 eIF2 及び ATF4 の発現が有意に亢進していた。

このことから *Pkd1* と *SLC7A5* のダブルノックアウトマウスでは LAT1 がいないために嚢胞上皮細胞のアミノ酸取り込みがないため、GCN2/ATF4 経路が活性化し嚢胞が悪化したことが明らかとなった。

これらの結果から、ADPKD においてアミノ酸バランスは非常に重要で、枯渇しても負荷しても悪化してしまい、丁度よい量でコントロールすることが、治療に結びつく可能性があることが大切である (Fig.3)。

近年肥満が嚢胞を悪化させる、あるいは ADPKD モデルマウスに食事制限をすることで、嚢胞が抑制されるなどの報告がされている。本研究により、過度のアミノ酸摂取不足が嚢胞悪化に結びつく可能性も示唆され、患者指導時の蛋白制限に関しては、制限しすぎる内容にすることが大切である事も示された。

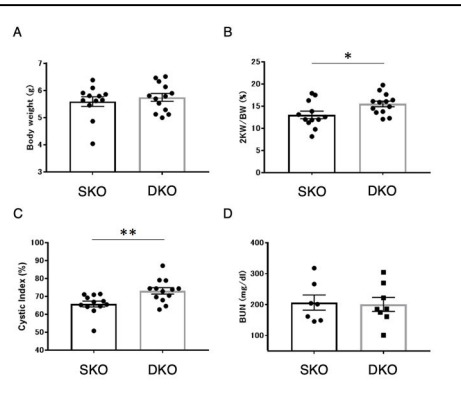


Fig.2 A: 体重, B: 腎重量・体重比(2KW/BW), C: Cystic Index, D: 尿素窒素 (BUN)

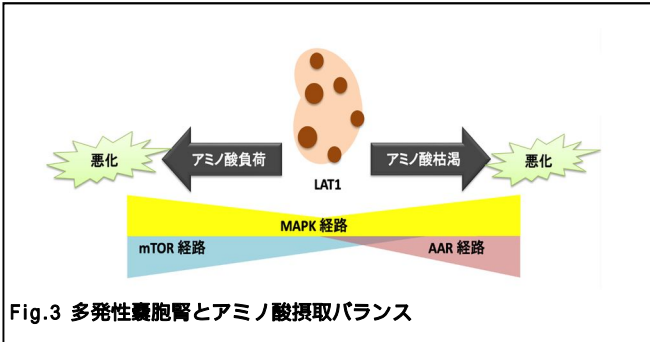


Fig.3 多発性嚢胞腎とアミノ酸摂取バランス

(2) *Pkd1* ノックアウトマウスに対する LAT1 阻害薬の投与

polyinosinic-polycytidylic acid (pl-pC) で生後 5 日目より *Pkd1* を欠失させた *Pkd1<sup>fllox/fllox</sup>; Mx1-Cre* マウスに選択的 LAT1 阻害薬を腹腔内投与し、腎及び肝嚢胞の表現型に関して vehicle 群と比較検討した。LAT1 阻害薬を生後 12 日から 34 日まで腹腔内に隔日投与し、生後 35 日に屠殺解剖した。Vehicle 群に比較して LAT1 阻害薬群では腎嚢胞の形成が抑制されていた (Fig.4)。肝臓に関しては嚢胞を抑制する効果はみられなかった

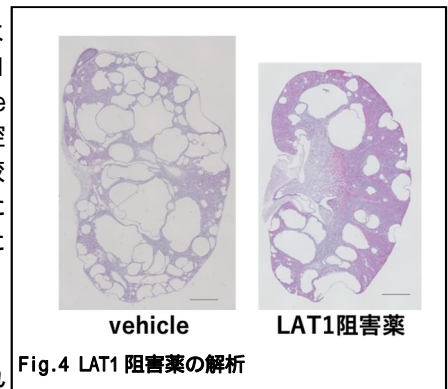


Fig.4 LAT1 阻害薬の解析

(3) LAT1 阻害薬とトルバプタンの併用実験

既に効果がある事が証明されており、広く実臨床で用いられているバソプレシン V2 阻害薬のトルバプタン (TLV) を併用する事で嚢胞抑制効果が増強するかを解析した。LAT1 阻害薬はアミノ酸を阻害することで、TLV は cAMP を抑制することで嚢胞を抑制するため、機序が違う 2 剤を併用する事で嚢胞抑制ができることを仮説として行った。Cystic Index の解析では併用療法で有意に TLV あるいは LAT1 阻害薬単独投与より明らかに低値であり、併用療法で嚢胞の進行を抑制していた。腎機能の評価である血清 Cre 値も TLV 単独より LAT1 阻害薬と TLV 併用の方が低く、腎機能悪化も抑えることができた (Fig.5)。

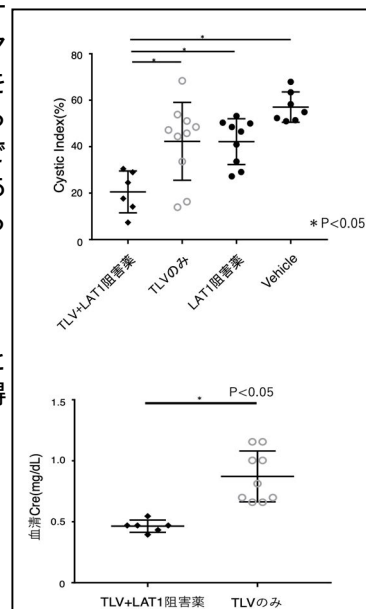


Fig.5 LAT1 阻害薬とトルバプタンの併用

本研究から LAT1 阻害薬は ADPKD の新規治療薬となり得ることを明らかにし、さらにトルバプタンの併用は有効な治療となり得る事を証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishio S, Tsuchiya K, Nakatani S, Muto S, Mochizuki T, Kawano H, Hanaoka K, Hidaka S, Ichikawa D, Ishikawa E, Uchiyama K, Koshi-Ito E, Hayashi H, Makabe S, Ogata S, Mitobe M, Sekine A, Suwabe T, Kataoka H, Kai H, Kaneko Y, Kurashige M, Seta K, Shimazu K, Hama T, Miura K, Nakanishi K	4. 巻 25(12)
2. 論文標題 A digest from evidence based Clinical Practice Guideline for Polycystic Kidney Disease 2020	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 1292-1302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02097-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe-Kusunoki K, Nakazawa D, Yamamoto J, Matsuoka N, Kaneshima N, Nakagaki T, Yamamoto R, Maoka T, Iwasaki S, Tsuji T, Fukasawa Y, Nishimoto N, Nishio S, Atsumi T	4. 巻 Apr2100(50)
2. 論文標題 Comparison of administration of single- and triple-course steroid pulse therapy combined with tonsillectomy for immunoglobulin A nephropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e27778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40620-022-01279-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiratori-Aso S, Nakazawa D, Nishio S, Ueda Y, Eguchi M, Yokoyama A, Yoshikawa J, Kudo T, Watanabe-Kusunoki K, Takeda-Otera S, Yamamoto J, Matsuoka N, Kaneshima N, Hattanda F, Iwasaki S, Tsuji T, Fukasawa Y, Atsumi T	4. 巻 Feb25
2. 論文標題 Soluble Interleukin-2 Receptor Predicts Treatment Outcome in Patients With Autoimmune Tubulointerstitial Nephritis. A Preliminary Study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Med (Lausanne) .	6. 最初と最後の頁 827388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.827388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchiyama K, Mochizuki T, Shimada Y, Nishio S, Kataoka H, Mitobe M, Tsuchiya K, Hanaoka K, Ubara Y, Suwabe T, Sekine A, Nutahara K, Tsuruya K, Ishimura E, Nakatani S, Sofue T, Tanaka S, Narita I, Maruyama S, Horie S, Muto S.	4. 巻 25(9)
2. 論文標題 Factors predicting decline in renal function and kidney volume growth in autosomal dominant polycystic kidney disease: a prospective cohort study (Japanese Polycystic Kidney Disease registry: J-PKD)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol	6. 最初と最後の頁 970-980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02068-x	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 2.Yamamoto R, Imai E, Maruyama S, Yokoyama H, Sugiyama H, Nitta K, Tsukamoto T, Uchida S, Takeda A, Sato T, Wada T, Hayashi H, Akai Y, Fukunaga M, Tsuruya K, Masutani K, Konta T, Shoji, T, Hiramatsu T, Goto S, Tamai H, Nishio S. et al	4. 巻 24
2. 論文標題 Better remission rates in elderly Japanese patients with primary membranous nephropathy in nationwide real-world practice: The Japan Nephrotic Syndrome Cohort Study (JNSCS)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol	6. 最初と最後の頁 893-909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-020-01913-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe-Kusunoki K, Nakazawa D, Kusunoki Y, Kudo T, Hattanda F, Nishio S, Masuda S, Tomaru U, Kondo T, Atsumi T, Ishizu A.	4. 巻 108
2. 論文標題 Recombinant thrombomodulin ameliorates autoimmune vasculitis via immune response regulation and tissue injury protection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Autoimmun	6. 最初と最後の頁 102390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2019.102390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto J, Nakazawa D, Nishio S, Ishikawa Y, Makita M, Kusunoki Y, Nagai S, Fujieda Y, Takahata M, Yamada K, Yamamura T, Yotsukura A, Saito M, Shimazaki M, Atsumi T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Impact of Weekly Teriparatide on the Bone and Mineral Metabolism in Hemodialysis Patients With Relatively Low Serum Parathyroid Hormone: A Pilot Study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ther Apher Dial	6. 最初と最後の頁 146-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2019.102390.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada, Y. Kamimura, D. Jiang, J. Higuchi, H. Iwami, D. Hotta, K. Tanaka, Y. Ota, M. Higuchi, M. Nishio, S. Atsumi, T. Shinohara, N. Matsuno, Y. Tsuji, T. Tanabe, T. Sasaki, H. Iwahara, N. Murakami, M.	4. 巻 32
2. 論文標題 Increased urinary exosomal SYT17 levels in chronic active antibody-mediated rejection after kidney transplantation via the IL-6 amplifier	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 653-662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa032.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto, R. Imai, E. Maruyama, S. Yokoyama, H. Sugiyama, H. Nitta, K. Tsukamoto, T. Uchida, S. Takeda, A. Sato, T. Wada, T. Hayashi, H. Akai, Y. Fukunaga, M. Tsuruya, K. Masutani, K. Kōta, T. Shoji, T. Hiramatsu, T. Goto, S. Tamai, H. Nishio, S. et al	4. 巻 24
2. 論文標題 Incidence of remission and relapse of proteinuria, end-stage kidney disease, mortality, and major outcomes in primary nephrotic syndrome: the Japan Nephrotic Syndrome Cohort Study (JNSCS)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol	6. 最初と最後の頁 526-540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-020-01864-1.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西尾妙織
2. 発表標題 多発性嚢胞腎の薬物治療・生活習慣
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西尾妙織
2. 発表標題 嚢胞性疾患-最近の治療に基づく診断と治療- ADPKDの自然経過と障害治療戦略
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------