



Title	L型アミノ酸トランスポーター1及び(プロ)レニン受容体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 [全文の要約]
Author(s)	大寺, 紗夜
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14171号
Issue Date	2020-06-30
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/78913">http://hdl.handle.net/2115/78913</a>
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。
Note(URL)	<a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
File Information	Sayo_Otera_summary.pdf



[Instructions for use](#)

# 学 位 論 文 (要約)

## L 型アミノ酸トランスポーター1 及び (プロ)レニン受容体が 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

(The role of L-type amino acid transporter 1 and (pro) renin receptor in  
cyst formation of autosomal dominant polycystic kidney disease)

2020 年 6 月

北 海 道 大 学

大 寺 紗 夜



# 学 位 論 文 (要約)

L 型アミノ酸トランスポーター1 及び  
(プロ)レニン受容体が  
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

(The role of L-type amino acid transporter 1 and (pro) renin receptor in  
cyst formation of autosomal dominant polycystic kidney disease)

2020 年 6 月

北 海 道 大 学

大 寺 紗 夜

## 【緒言】

常染色体優性多発性嚢胞腎 (Autosomal dominant polycystic kidney disease; ADPKD) は *PKD1* または *PKD2* を原因遺伝子とする最も頻度の多い遺伝性腎疾患である。加齢と共に発生, 進行する嚢胞により, 両側腎臓は腫大し, 70 歳までに約半数が末期腎不全に至る。現在, ADPKD において臨床で用いられる治療薬は, バズブレシン V2 受容体拮抗薬のトルバプタンのみであり, 更なる病態の解明や新規薬剤の開発が求められている。

第一章では, ADPKD の嚢胞増悪の機序に重要であるとされている Wnt/ $\beta$  カテニン経路に着目した。Wnt/ $\beta$  カテニン経路の抑制は新たな ADPKD の治療に繋がる可能性があるが, Wnt/ $\beta$  カテニン経路の重要な構成因子の一つである(プロ)レニン受容体 ((Pro) renin receptor; (P)RR)) が ADPKD の病態や嚢胞形成に対してどのように影響しているかを検討した報告はない。(P)RR の抑制が, ADPKD の嚢胞形成を抑制させると仮説を立て, *Pkd1* 及び(P)RR の細胞内ドメインである *Atp6ap2* のコンディショナルノックアウトマウスを作製し, 腎表現型について解析を行った。

第二章では, 先行研究で明らかにされた分枝鎖アミノ酸の負荷が Mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路及び Mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK)経路の活性化を介して嚢胞形成を悪化させるメカニズムに, L 型アミノ酸トランスポーター1 (L-type amino acid transporter 1: LAT1) が関与していることに着目した。LAT1 は, *SLC7A5* の遺伝子産物であり, 主に必須アミノ酸の輸送に携わる膜貫通タンパクで様々なヒト癌組織に発現していることが知られている。さらに, 癌細胞において LAT1 阻害薬は mTOR 経路の抑制により抗腫瘍効果をもつことが複数報告されており, 新規抗腫瘍薬として期待されている。腎嚢胞上皮細胞にも LAT1 が高発現していることが明らかにされているが, 嚢胞形成における LAT1 の役割は明らかになってはおらず, また, LAT1 阻害薬が ADPKD においても治療効果を有するかどうかは不明である。そこで本研究では, *Pkd1* 及び *Slc7a5* の腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスを作製し, ADPKD モデルマウスにおいて嚢胞上皮における LAT1 欠失が嚢胞形成へ与える影響を評価した。さらに, 選択的 LAT1 阻害薬である JPH203 を薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスに投与し, Placebo 群と比較検討することで JPH203 の嚢胞抑制効果について検討した。

<第一章> (プロ)レニン受容体が ADPKD の嚢胞形成に与える影響

## 【目的】

*Pkd1* 及び *Atp6ap2* の腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスを作製し, ADPKD の嚢胞形成と(P)RR との関連を明らかにする。

## 【方法】

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* マウスと *Atp6ap2<sup>flox/flox</sup>* マウスを交配させ、*Pkd1<sup>flox/+</sup>: Atp6ap2<sup>flox/Y</sup>: Ksp-Cre* マウス (雄) 及び *Pkd1<sup>flox/+</sup>: Atp6ap2<sup>flox/+</sup>: Ksp-Cre* マウス (雌) を作製した。さらに、これらのマウスを交配させて、ダブルノックアウトマウスである *Pkd1<sup>flox/flox</sup>: Atp6ap2<sup>flox/flox or flox/Y</sup>: Ksp-Cre* マウスを作製した。以下、*Pkd1* が欠失し嚢胞を形成するマウスを Cystic 群と表す。Cystic 群のコントロールとして、*Atp6ap2* が野生型である *Pkd1<sup>flox/flox</sup>: Atp6ap2<sup>+/+ or +/Y</sup>: Ksp-Cre* マウスを使用し、*Atp6ap2* ヘテロとして *Pkd1<sup>flox/flox</sup>: Atp6ap2<sup>flox/+</sup>: Ksp-Cre* マウスを用いた。また、嚢胞を形成しない (non-Cystic) マウスにおける *Atp6ap2* ノックアウトの影響を評価するため、*Pkd1<sup>flox/+</sup>: Atp6ap2<sup>flox/flox or flox/Y</sup>: Ksp-Cre* または *Pkd1<sup>+/+</sup>: Atp6ap2<sup>flox/flox or flox/Y</sup>: Ksp-Cre* マウスを作製した。Cystic 群と同様に、non-Cystic 群においても *Atp6ap2* の野生型及びヘテロ群を作製した。これらのノックアウトマウスを生後 11 日目に屠殺解剖し、腎重量体重比 (Bilateral kidney weight/ body weight ratio: 2KW/BW) , 腎病理組織の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 を測定し、各群間で比較検討した。

また、任意の時期に Polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) を投与することで目的遺伝子を除去する *Mx1-Cre* を用いて、*Pkd1<sup>flox/flox</sup>: Atp6ap2<sup>flox/flox or flox/Y</sup>: Mx1-Cre* マウスも作製した。コントロールとして Cystic 群の *Atp6ap2* 野生型、*Atp6ap2* ヘテロ群も作製した。さらに、腎限局型ノックアウトマウスと同様に、non-Cystic 群の *Atp6ap2* 野生型、ヘテロ群、欠失群も作製した。嚢胞の形成速度が早い早期欠失群 (pI-pC 10 $\mu$ g/gBW を生後 8 日から 6 日間投与) と、嚢胞の形成速度が比較的遅く成人 ADPKD に近いモデルである晚期欠失群 (pI-pC 10 $\mu$ g/gBW を生後 15 日目から 6 日間投与) に分けて、生存率を評価し、それぞれ生後 19 日と生後 22 週に屠殺解剖した。マウスの表現型解析として、腎及び肝の重量体重比、Cystic Index を測定し、各群間で比較検討した。

## 【結果】

生後 11 日目の腎限局型ダブルノックアウトマウスにおける non-Cystic 群では、*Atp6ap2* ヘテロ群は腎の形態に明らかな変化を呈さなかったが、*Atp6ap2* 欠失群では髄質の尿細管上皮細胞の核が断片化して尿細管が障害されたり、水腎症を呈したりした。Cystic 群においてはいずれの群も嚢胞形成は著明であり、2KW/BW と Cystic Index は、*Atp6ap2* 野生型、ヘテロ群、欠失群の各群間で有意な差は認められず、腎の嚢胞形成に明らかな差は認めなかった (2KW/BW: *Atp6ap2* 野生型: 13.62  $\pm$  0.95 % vs. ヘテロ群: 13.89  $\pm$  1.18 %, vs. 欠失群: 13.52  $\pm$  0.65 %) (Cystic Index: *Atp6ap2* 野生型: 76.04  $\pm$  1.89 % vs. ヘテロ群: 69.02  $\pm$  2.72 %, vs. 欠失群: 76.04  $\pm$  1.66 %) .

*Mx1-Cre* による薬剤誘導型ダブルノックアウトマウスでは、早期欠失群の *Atp6ap2* 欠失群は、生後 20 日前後で死亡した。死亡前の生後 19 日に解剖した結果は、特に Cystic 群の *Atp6ap2* 欠失群で、血性腹水の貯留、腸管の浮腫と癒着が見られ腹部臓器の障害を認めた。non-Cystic 群の腎、肝に関しては、*Atp6ap2* 野生群と欠失群で表現型に大きな差を認めなかった。Cystic 群に関しては、2KW/BW 並びに腎 Cystic Index においては、*Atp6ap2* 野生型と欠失群の間に有意な差を認めず (2KW/BW: *Atp6ap2* 野生型:  $1.54 \pm 0.12\%$  vs. 欠失群:  $1.39 \pm 0.08\%$ ) (Cystic Index: *Atp6ap2* 野生型  $5.78 \pm 1.27\%$  vs. 欠失群:  $6.98 \pm 0.86\%$ ) , 肝重量体重比は *Atp6ap2* 野生型に比較して欠失群で有意に増大していたものの (*Atp6ap2* 野生型:  $3.17 \pm 0.09\%$  vs. 欠失群:  $3.78 \pm 0.17\%$ ,  $p < 0.05$ ), 肝 Cystic Index は、*Atp6ap2* 欠失群と *Atp6ap2* 野生型の間に有意な差は無かった (*Atp6ap2* 野生型  $1.93 \pm 1.02\%$  vs. 欠失群:  $3.90 \pm 1.08\%$ ) . 晩期欠失群は、*Atp6ap2* 欠失群において長期間生存可能な個体を認めたが、*Atp6ap2* 野生型の嚢胞腎マウスにおいて腎嚢胞の形成が不十分であり嚢胞腎モデルとして確立しなかった。

#### 【考察】

*Atp6ap2* は器官の発育形成に必須なタンパクであるため、胎児期や成長期における *Atp6ap2* の遺伝的欠失は器官の発育形成に有害であると考えられた。特に、ネフロンの発育形成にも、(P)RR は必須であることが報告されており、*Ksp-Cre* や *Mx1-Cre* を用いた上記モデルでは、*Atp6ap2* 欠失の有害性により嚢胞形成への影響を評価することは困難であると考えられた。

#### 【結論】

胎生期や成長期での *Atp6ap2* のノックアウトは臓器の発育形成に有害であり、*Atp6ap2* と嚢胞形成との関連を検証するには、薬剤等の異なる手法を用いることが必要である。

### <第二章> L型アミノ酸トランスポーター1がADPKDの嚢胞形成に与える影響

#### 【目的】

*Pkd1* 及び *Slc7a5* の腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスを作製し、ADPKDの嚢胞形成とLAT1との関連を明らかにする。また、選択的LAT1阻害薬を嚢胞腎モデルマウスに投与し、嚢胞形成抑制効果について検証する。

#### 【方法】

*Pkd1<sup>flox/+</sup>*: *Ksp-Cre* マウス と *Slc7a5<sup>flox/flox</sup>* マウスを交配させ、*Pkd1<sup>flox/+</sup>*: *Slc7a5<sup>flox/+</sup>*:

*Ksp-Cre* マウスを作製した。さらに、*Pkd1<sup>fllox/+</sup>: Slc7a5<sup>fllox/+</sup>: Ksp-Cre* マウス同士を交配させて、ダブルノックアウトマウスである *Pkd1<sup>fllox/flox</sup>: Slc7a5<sup>fllox/flox</sup>: Ksp-Cre* マウスを作製した。*Slc7a5* 野生型である *Pkd1<sup>fllox/flox</sup>: Slc7a5<sup>+/+</sup>: Ksp-Cre* マウスは、Cystic 群のコントロールとして使用した。また、嚢胞を形成しない (non-Cystic) マウスにおける *Slc7a5* ノックアウトの影響を評価するため、*Pkd1<sup>fllox/+</sup>: Slc7a5<sup>fllox/flox</sup>: Ksp-Cre* または *Pkd1<sup>+/+</sup>: Slc7a5<sup>fllox/flox</sup>: Ksp-Cre* マウスも作製した。なお、non-Cystic マウスのコントロールとして、*Ksp-Cre* を持たないマウスや、*Pkd1<sup>fllox/+</sup>: Slc7a5<sup>+/+</sup>: Ksp-Cre* マウス、*Pkd1<sup>+/+</sup>: Slc7a5<sup>+/+</sup>: Ksp-Cre* マウスを使用した。これらのマウスを生後 11 日目に屠殺解剖し、腎の表現型について解析した。さらに、摘出した腎検体を用いて免疫組織染色を行い細胞増殖やアポトーシスを評価した。また、免疫組織染色、ウェスタンブロッティングを行い、細胞シグナル経路の変化について検証した。

選択的 LAT1 阻害薬の投与実験として、pI-pC 10 $\mu$ g/gBW を生後 5 日目より 6 日間投与した、*Pkd1<sup>fllox/flox</sup>: Mx1-Cre* マウスに選択的 LAT1 阻害薬である JPH203 を 50 $\mu$ g/g (BW) で隔日投与した。また、Placebo 群には Cyclodextrin を投与した。生後 35 日目で評価する短期投与群と生後 56 日目で評価する長期投与群に分けて、JPH203 投与群と Placebo 群の腎及び肝表現型を比較検討した。また、腎検体を用いて免疫組織染色で細胞増殖やアポトーシスを評価し、免疫組織染色とウェスタンブロッティングを行い、細胞シグナル経路の変化について検証した。

## 【結果】

生後 11 日齢の Cystic 群の腎嚢胞は、*Slc7a5* 野生型、*Slc7a5* 欠失群ともに著しく形成されたが、*Slc7a5* 欠失群 において腎はより腫大していた。2KW/BW は、*Slc7a5* 欠失群で有意に高値であり (*Slc7a5* 野生型: 13.05 $\pm$ 0.85 % vs. *Slc7a5* 欠失群: 15.52 $\pm$ 0.64 %,  $p<0.05$ )、Cystic Index も同群で有意に大きかった (*Slc7a5* 野生型: 65.8 $\pm$ 1.62 % vs. *Slc7a5* 欠失群: 73.1 $\pm$ 1.79 %,  $p<0.01$ )。なお、non-Cystic 群における *Slc7a5* ノックアウトの影響に関しては、*Slc7a5* 野生型と *Slc7a5* 欠失群の間で体重に差はなく、発育や繁殖に影響は認められなかった。また、腎の形成においても *Slc7a5* 欠失群で明らかな異常は呈さなかった。

次に Cystic 群の腎嚢胞上皮細胞における細胞増殖の評価として PCNA 染色を施行したところ、生後 8 日齢の *Slc7a5* 欠失群において PCNA 陽性細胞数は有意に多かった (*Slc7a5* 野生型: 1605 $\pm$ 423.1 個 vs *Slc7a5* 欠失群: 3652 $\pm$ 169.2 個,  $p<0.01$ )。

また、Cystic 群の腎嚢胞上皮細胞のアポトーシスの評価として TUNEL 染色を施行したところ、TUNEL 陽性細胞数は、*Slc7a5* 欠失群で有意に多かった (*Slc7a5* 野生型: 41.1 $\pm$ 7.8 個 vs *Slc7a5* 欠失群: 86.1 $\pm$ 19.3 個,  $p<0.05$ )。

細胞シグナル経路の検討では、Cystic 群における *Slc7a5* 欠失群は、*Slc7a5* 野生型に比較して mTOR 経路が抑制されていた一方で、アミノ酸枯渇を感知し活性化する



General control non-derepressible-2/activating transcription factor 4 (GCN2/ATF4) 経路や MAPK/ERK 経路が亢進していた。

選択的 LAT1 阻害薬の投与実験では, JPH203 短期投与群において有意に腎嚢胞の形成が抑制されていたが, 肝嚢胞に関しては嚢胞形成の程度に明らかな変化は無かった. なお, 短期投与群の 2KW/BW に関しては, JPH203 群で小さい傾向にあり (短期投与群: Placebo:  $4.29 \pm 0.39$  % vs. JPH203:  $3.18 \pm 0.27$  %), 腎 Cystic Index は JPH203 群で有意に小さくなった (Placebo:  $52.1 \pm 3.1$  % vs. JPH203:  $42.16 \pm 3.26$  %,  $p < 0.05$ ). 一方, JPH203 長期投与群では, Placebo 群と比較して腎及び肝嚢胞の形成に有意な差は得られなかった。

腎嚢胞形成の抑制効果があった JPH203 短期投与群のマウスより得た腎組織標本を用いて, 嚢胞上皮細胞における細胞増殖とアポトーシスに関して評価するために PCNA 染色及び TUNEL 染色を行った. PCNA 染色では, JPH203 群で PCNA 陽性細胞の割合が少ない傾向にあったが両群間に有意差はなく (Placebo 群:  $15.46 \pm 2.72$  % vs JPH203:  $12.58 \pm 1.78$  %), TUNEL 染色では Placebo 群と比較して JPH203 群で有意に TUNEL 陽性細胞数の割合が少なかった (Placebo 群:  $14.01 \pm 5.32$  % vs JPH203:  $2.48 \pm 0.97$  %,  $p < 0.05$ ).

細胞シグナル経路の検討では, JPH203 短期投与群で有意に mTOR 経路が抑制されていたが, GCN2/ATF4 経路や MAPK/ERK 経路の活性化は認めなかった。

#### 【考察】

腎限局型 *Pkd1* 及び *Slc7a5* コンディショナルダブルノックアウトマウスの作製によって, LAT1 が腎嚢胞上皮細胞における主要なアミノ酸トランスポーターであるということ, さらに LAT1 の機能が喪失することによって起こるアミノ酸の枯渇はストレス応答を招き, GCN2/ATF4 経路及び MAPK/ERK 経路の活性化を通して ADPKD の病態を増悪させるという新たな嚢胞増大機序が明らかになった。

また, 選択的 LAT1 阻害薬の投与実験では, JPH203 の短期投与により, mTOR 経路の抑制を介して腎嚢胞の形成が抑制されたため, アミノ酸枯渇ストレスを誘導しない程度で LAT1 を阻害することは, ADPKD の新たな治療戦略となる可能性が示唆された. 今後, LAT1 阻害薬の適切な投与量や投与方法の検討が必要である。

【結論】本研究にて, 哺乳類のアミノ酸感知機構として重要な mTOR 経路及び GCN2/ATF4 経路が, MAPK/ERK 経路と関連し嚢胞の形成に影響を及ぼすことが明らかになった. また, アミノ酸の欠乏ストレスが ADPKD の嚢胞形成を促進することが示されたため, 過剰なアミノ酸制限は ADPKD に有害な可能性が示唆された。