



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	分岐鎖アミノ酸および蛋白質負荷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)	山本, 準也
Description	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。 配架番号 : 2241 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12137号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61949
Type	doctoral thesis
File Information	Junya_Yamamoto_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

分岐鎖アミノ酸および蛋白質負荷が 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

(Studies on effects of branched-chain amino acids and dietary protein loading
on cyst development of autosomal dominant polycystic kidney disease)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

山 本 準 也

【緒言】

常染色体優性多発性嚢胞腎 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease :ADPKD) は最も頻度の多い遺伝性腎疾患であり、加齢と共に腎臓を主体とした嚢胞形成と進行性の嚢胞増大を特徴とする。ADPKD の原因遺伝子として *PKD1* 遺伝子と *PKD2* 遺伝子が同定されている。ADPKD では *PKD1* または *PKD2* の遺伝子変異のため polycystin-1 または polycystin-2 の機能異常が生じることにより、細胞内 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) の増加とその下流に位置する extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) 経路および mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路等の細胞増殖に関わる経路を活性化させることで尿細管細胞増殖を促し、ADPKD の嚢胞形成に関わっている。近年、バゾプレシン V2 受容体拮抗薬であるトルバプタンの ADPKD における腎嚢胞増大抑制効果および腎機能障害進行抑制効果が示され、トルバプタンは世界初の ADPKD 治療薬として本邦を中心に広く使用されてきている。しかし、トルバプタン本来の利尿薬としての多尿の副作用のため、常に飲水を行う必要があり患者の日常生活に大きな影響を及ぼすことや、患者の腎容積や嚢胞増大速度が一定以上でなければ臨床効果が十分認められないことから、現時点ではすべての ADPKD 患者に適応できる治療ではない。そのため、レニン・アンジオテンシン系 (Renin-angiotensin system :RAS) 阻害薬を中心とした降圧療法や蛋白質制限食による食事療法等が慢性腎臓病 (Chronic kidney disease :CKD) 全般に行われているのと同様に ADPKD 患者に対しても行われている。しかしながら、これらの従来治療が ADPKD の経過に与える影響は不明な部分も多く、嚢胞増大抑制効果および腎機能障害抑制効果に関しても一定の見解が得られていない。

本研究では日常的に食事から摂取される蛋白質および蛋白質の構成成分であるアミノ酸に着目して、アミノ酸または蛋白質の負荷が ADPKD の嚢胞形成や病態にどのような影響を与えるか調べることにした。

第一章：分岐鎖アミノ酸が常染色体優性多発性嚢胞腎の嚢胞形成に与える影響

【背景】

mTOR 経路は ADPKD における嚢胞増大に関わる主要な経路の 1 つであり、mTOR 阻害薬がヒト ADPKD や動物実験において嚢胞増大を抑制した報告が数多くされているが、現状では mTOR 阻害薬の ADPKD の臨床使用に関しては議論の余地がある。アミノ酸、特に BCAA は mTOR 経路を活性させることで、様々な全身作用を示すことが知られている。日常生活では BCAA はサプリメントとして好意的に用いられることが多いが、BCAA 投与が ADPKD に与える影響についてはわかっていない。そこで、本研究では BCAA 投与が mTOR 経路を活性化させることで、ADPKD の嚢胞上皮細胞の増殖

を促し、嚢胞増大を促進させるという仮説を立てた。

【実験方法】

<In vivo 実験>

Pkd1^{flox/flox} マウスと *Mx1-Cre* マウス (The Jackson Laboratory) を交配し, *Pkd1*^{flox/+}: *Mx1-Cre* マウスを作製した. さらに, *Pkd1*^{flox/+}: *Mx1-Cre* マウスを *Pkd1*^{flox/flox} マウスと交配し, *Pkd1*^{flox/flox}: *Mx1-Cre* マウスを作製した. コントロールとしては, 表現型が野生型である *Pkd1*^{flox/flox} マウス (*Cre* 遺伝子を発現していない) を用いた. インターフェロン γ の産生を誘導する polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) を用いてインターフェロン応答性の *Mx1* 遺伝子の下流で *Cre* 遺伝子が発現し, *Pkd1* が任意の時期で欠失できるようにした (*Cre-loxP* 部位特異的組み替え). *Pkd1*^{flox/flox}: *Mx1-Cre* マウスに対して生後 14 日目より 10 μ g/g (BW) の pI-pC を連続 6 日間腹腔内投与した. 飲料, 餌の自由摂取下で飼育した. 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, 4 週齢より 22 週齢まで自由飲水行動下で投与した. BCAA 製剤の組成は 1 g あたりロイシン 0.4 g, イソロイシン 0.2 g, バリン 0.2 g であり, プラセボ製剤はコーンスターチが主成分であった. 22 週齢で屠殺解剖し, 解析を行った. マウス表現型の解析として, 体重, 腎重量, 肝重量を測定し, 腎重量・体重比 (bilateral kidney weight/ body weight ratio :2KW/BW), 肝重量・体重比 (liver weight/ body weight ratio :LW/BW) を用いて比較検討した. また, 病理組織像を用いて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 および Elastica-Masson 染色による組織線維化を評価した. 22 週齢の屠殺解剖の際に右心房より採血を行い, 血清尿素窒素 (Blood urea nitrogen :BUN), アラニン・アミノトランスフェラーゼ (Alanine Aminotransferase :ALT), を測定した. 同時に血漿ロイシン, イソロイシン, バリン濃度を液体クロマトグラフィー質量分析法によって測定した (SRL). 腎臓および肝臓のパラフィン切片および凍結切片を用いて, リン酸化 mTOR(Ser2448), リン酸化 ERK(Thr202/Tyr204), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色, Ki-67 染色および terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色を行った. また, マウス腎臓の蛋白抽出液を用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびブロッティングを行い, リン酸化 mTOR (Ser2448), リン酸化 ERK (Thr202/Tyr204) の発現量を評価した. 可視化したリン酸化蛋白のバンドの濃度は ImageJ software (NIH) を使用して半定量化し, リン酸化蛋白と非リン酸化蛋白の総和である総蛋白のバンド濃度で補正した. 統計学的解析は Student の t 検定または一元配置分散分析 one-way analysis of variance (ANOVA) 後の Tukey または Dunnett の多重比較検定にて群間比較を行い, p 値が 0.05 未満をもって有意とした.

<In vitro 実験>

マウス由来近位尿細管細胞株である *Pkd1* ホモ欠失細胞株 (*Pkd1*^{-/-}細胞) とコントロ

ールとしての *Pkd1* ヘテロ欠失細胞株 (*Pkd1*^{+/-}細胞)は Yale 大学より提供していただいた。細胞は Dulbecco 改変イーグル培地/F-12 (Gibco) に 3 %ウシ胎児血清 (Biosera), 2 nM トリヨードサイロニン (Sigma-Aldrich), 5 µg/mL インスリン, 5 µg/mL トランスフェリン, 5 ng/mL 亜セレン酸ナトリウム(BD Biosciences), 10 U/mL マウスインターフェロン-γ (Sigma-Aldrich), 5 mL/L ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich)および 50 U/mL ナイスタチン懸濁液(Sigma-Aldrich) 添加したものを培地として 37 °C , 5 % CO₂の環境で培養および継代した。3×10⁵個の細胞を 10 mL の培養液で懸濁し, 100 mm の培養皿 (TPP, Switzerland)に播種した。37 °C, 5 % CO₂で 72 時間培養後に培養皿の細胞を顕微鏡 (IX71 :Olympus)で位相差観察または 0.25 %トリプシン (Gibco)で剥離回収した。回収した総細胞数は Cellometer Auto (Nexcelom Bioscience)で自動計測し, 細胞増殖能の指標とした。次に5×10⁴個の細胞を 500 µL の培養液で懸濁し, 4 ウェルのチャンバースライド (BD Biosciences)に播種した。37 °C, 5 % CO₂で 24 時間培養後に細胞を固定し, Ki-67 抗体による蛍光免疫染色を行い細胞増殖能の評価を行った。続いて, ロイシン負荷による細胞内シグナルの変化を評価するために, 培養細胞に対して Earle の緩衝塩類溶液 (Sigma-Aldrich)にビタミン溶液(Sigma-Aldrich, #R7256)を添加した培養液の中で 37 °C, 5 % CO₂の条件で 2 時間のアミノ酸枯渇処理をした。その後, 同培養液中のロイシンを任意の濃度に設定し, 30 分培養した。回収した蛋白抽出液により SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびブロッティングを行い, リン酸化 p70S6K (Thr389) リン酸化 ERK (Thr202/Try204)の発現量を評価した。可視化したリン酸化蛋白のバンドの濃度は ImageJ software (NIH)を使用して半定量化し, リン酸化蛋白と非リン酸化蛋白の総和である総蛋白のバンド濃度で補正した。また, 阻害薬を用いた実験においては ERK/MAPK 経路の阻害は ERK の上流に位置する Mitogen activated protein kinase/extracellular regulated kinase kinase (MEK)の阻害にて行い, MEK1 阻害薬である PD98059 を 10 µM, MEK1/2 阻害薬である U0126 を 10 µM で使用した。mTOR 阻害薬としては rapamycin を 50 nM で使用した。統計学的解析は Student の t 検定または一元配置分散分析 one-way analysis of variance (ANOVA)後の Tukey または Dunnett の多重比較検定にて群間比較を行い, p 値が 0.05 未満をもって有意とした。

【結果】

<In vivo 実験>

Pkd1^{flox/flox}: *Mx1-Cre* (Cystic)マウスにおいて腎臓、肝臓とも BCAA 投与群でより多くの嚢胞形成を認めていた。腎重量・体重比は Cystic 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 (BCAA 2.16 % vs プラセボ 1.27 %, *p*<0.01)。肝重量・体重比では有意差は認めなかった。腎の 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 $22.8 \pm 3.38\%$ vs $9.60 \pm 2.97\%$, $p < 0.01$). 腎機能としての BUN は Cystic マウス同士の比較では BCAA 投与群で有意に高値であった. ALT に関して有意差は認めなかった. マウス 22 週齢解剖時のロイシン, イソロイシン, バリンのマウス血液中濃度を測定したが, BCAA 投与群とプラセボ投与群の間で有意差を認めなかった. 組織線維化に関しては腎臓・肝臓いずれにおいても嚢胞周囲の線維化が顕著であったが, BCAA 投与群はプラセボ投与群と比較して腎線維化面積 (BCAA $7.14 \pm 1.58\%$ vs プラセボ $2.33 \pm 0.37\%$, $p < 0.01$), 肝線維化面積 (BCAA $6.48 \pm 0.72\%$ vs プラセボ $2.46 \pm 0.52\%$, $p < 0.001$) いずれにおいても有意に高値を示した. PCNA 陽性率では腎臓および肝臓いずれにおいても有意差は認めなかった. 一方, Ki-67 陽性率では腎臓および肝臓いずれにおいてもプラセボ投与群と比較して BCAA 群で有意に高値であった. TUNEL 陽性率は BCAA 投与群で多い傾向があったが, 有意差は認めなかった. 免疫組織染色の解析では p-mTOR および p-ERK いずれも BCAA 投与の有無に関わらず, non-cystic マウスではほぼ染色されなかった. 一方で, cystic マウスでは腎臓および肝臓の嚢胞上皮に p-mTOR および p-ERK が染色され, いずれも BCAA 投与群にて多く染色されていた. ウェスタンブロッティングによる解析では, p-mTOR および p-ERK は cystic マウスの BCAA 投与群においてプラセボ群と比較して有意に高値であった.

< In vitro 実験 >

3×10^5 個の *Pkd1*^{+/+} または *Pkd1*^{-/-} 尿細管上皮細胞を通常の培養液 (ロイシン 0.45 mM) またはロイシンを添加した培養液 (ロイシン 7.5 mM) にて培養皿上で 72 時間培養後に細胞を剥離回収し総細胞数を計測した. *Pkd1*^{+/+} 細胞では培養液のロイシン濃度による総細胞数の変化は認められなかったが, *Pkd1*^{-/-} 細胞では培養液のロイシン添加により有意な細胞数の増加が認められた. 次にロイシン添加により総細胞数の変化が見られた *Pkd1*^{-/-} 細胞に対して Ki-67 染色で細胞増殖の変化を確認した. ロイシン 7.5 mM で培養した細胞において有意に Ki-67 陽性率は高値を示した. 2 時間のアミノ酸枯渇処理を行った *Pkd1*^{+/+} または *Pkd1*^{-/-} 尿細管上皮細胞にロイシンを添加し, ロイシン濃度を 0 ~ 7.5 mM に割り付けして 30 分間処理した後に細胞を回収し, 蛋白抽出液を得た. これらの蛋白抽出液を用いたウェスタンブロッティングでは p-p70S6K は *Pkd1*^{+/+} および *Pkd1*^{-/-} 細胞いずれにおいてもロイシン濃度依存性に上昇したが, p-ERK のロイシン濃度依存的な上昇は *Pkd1*^{-/-} 細胞のみで認められた. また, 上記のロイシン添加に伴う変化が ERK/MAPK 経路と mTOR 経路の阻害することにより抑制できるか確認することにした. 初めに, 3×10^5 個の *Pkd1*^{+/+} または *Pkd1*^{-/-} 尿細管上皮細胞をロイシン 7.5 mM に調整した培養液に各種阻害薬を添加して培養した. 72 時間後に培養皿より細胞を剥離回収し総細胞数を計測した. いずれの細胞でも, 各種阻害薬はロイシン 7.5 mM 単独で培養した時と比較して有意に総細胞数を減少させた. 次に 5×10^4 個の *Pkd1*^{-/-} 細胞をロイシン濃度 7.5 mM に調整した培養液に各種阻害薬を加えた上で, チャンバー

スライドで24時間培養後にKi-67染色を施行したところ、ロイシン7.5 mM単独の条件と比較して、各種阻害薬は著しくKi-67発現を抑制した。最後に各種阻害薬が標的とした増殖経路を抑制しているかどうかを確認するために、阻害薬で処理した *Pkd1*^{-/-} 細胞の蛋白抽出液を用いて、ウエスタンブロッティングを施行した。MEK 阻害薬であるU0126は有意にp-ERKを抑制し、rapamycinは有意にp-p70S6Kを抑制した。

第二章：蛋白質負荷が常染色体優性多発性嚢胞腎の嚢胞形成に与える影響

【背景】

蛋白質制限食の腎機能障害進行抑制効果についてはこれまでにADPKD患者やADPKD患者を含めたCKD患者全体でも検討されてきたが、現時点では蛋白制限食は末期腎不全患者において尿毒素蓄積の軽減、ミネラル代謝異常の是正、代謝性アシドーシスの是正により腎代替療法までの期間を延長させる効果しか確認されていない。一方で、PKDモデルの動物実験において蛋白制限が嚢胞増大抑制効果および生存期間を延長したとの報告もあり、ADPKDにおける蛋白質制限食の是非についてはまだ結論がでていない。CKD患者において、ガイドラインでは過剰な蛋白摂取は避けることが推奨されている。しかし、蛋白質過剰摂取がADPKDの嚢胞増大に与える影響も不明である。そこで、我々はこれまでの報告と第一章の実験でBCAAがADPKDの嚢胞増大促進および組織線維化を促進させた結果を受け、アミノ酸より構成される蛋白質自体の負荷がADPKDの嚢胞形成および組織線維化を促進させ、逆に蛋白制限が嚢胞形成および組織線維化を抑制するという仮説を立てた。

【実験方法】

第一章と同様に *Pkd1*^{flax/flax}; *Mx1-Cre* マウスに対して生後14日目より10 μ g/g (BW) のpI-pCを連続6日間腹腔内投与し、*Pkd1*を欠失させた。4週齢の時点で通常のマウス飼料より、蛋白質調整飼料に切り替えて、自由摂取下で22週齢まで投与した。飼料は高蛋白質食 (High protein diet : HPD)、普通蛋白質食 (Normal protein diet : NPD)および低蛋白質食 (Low protein diet : LPD)の3種類を用意し、飼料質量あたりの蛋白質成分の割合はそれぞれ40%、21%、6%と設定した。すべての飼料は100gあたり3.5 kcalの熱量で統一しており、蛋白質はミルクカゼイン由来であり、蛋白質調整により生じる熱量の差は炭水化物であるコーンスターチの増減で補正した。22週齢の屠殺前日に専用のゲージ内で24時間蓄尿を行い、尿中AGT排泄量を測定した。尿中AGT濃度は市販のEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)キット (Immuno-Biological Laboratories)で測定した。マウス表現型の解析として、体重、腎重量、肝重量を測定し、2KW/BW、LW/BWを用いて比較検討した。病理組織像を用いて腎臓・肝臓のCystic IndexおよびElastica-Masson染色による組織線維化を評価した。22週齢の屠殺解剖の際に右心房より採血を行い、血清アルブミン、BUN、ALTをSRLに依頼して測定した。血液の酸化ス

トレスは diacron-reactive oxygen metabolites (d-ROMs) test に基づき、血液の抗酸化力は biological anti-oxidant potential (BAP) test に基づき、フリーラジカル解析装置の FREE carpe diem (Wismerll)にて評価した。統計学的解析は Student の t 検定または一元配置分散分析 one-way ANOVA 後の Tukey または Dunnett の多重比較検定にて群間比較を行い、p 値が 0.05 未満をもって有意とした。

【結果】

マウス摂餌量は 15~20 g/週の範囲で推移し、全体としては LPD 群の摂餌量が多い傾向があったが有意差はなかった。22 週齢のマウス体重は non-cystic マウス間では有意差は認めなかったが、cystic マウス間の比較では HPD 群の体重が LPD 群に対して有意に高値であった。腎重量・体重比は cystic マウスにおいて HPD 群が NPD 群と比較した有意に高値であった (HPD 1.84 % vs NPD 1.22 %, $p<0.05$)。肝重量・体重比は cystic マウスにおいて HPD 群が NPD 群および LPD 群と比較して有意に高値であった (HPD 5.62 % vs NPD 3.86 %, $p<0.01$) (HPD 5.62 % vs LPD 4.13 %, $p<0.001$)。腎の Cystic Index は HPD 群が NPD 群と比較して有意に高値であり (HPD 25.8 ± 4.63 % vs NPD 13.0 ± 2.06 %, $p<0.05$)、肝の Cystic Index は HPD 群が NPD 群および LPD 群と比較して有意に高値であった (HPD 20.0 ± 2.76 % vs NPD 10.6 ± 2.08 %, $p<0.05$)、(HPD 20.0 ± 2.76 % vs LPD 12.6 ± 1.89 %, $p<0.05$)。Cystic マウス同士の比較において BUN は HPD 群が他の群より有意に高値であり、ALT は HPD 群が NPD 群と比較して有意に高値であった。なお、栄養の指標として測定した血清アルブミンはすべての群間で有意差を認めなかった。Cystic マウスの腎臓および肝臓における組織線維化に関しては、HPD 群は NPD 群および LPD 群と比較して腎線維化面積 (HPD 15.5 ± 1.61 % vs NPD 6.83 ± 1.39 %, $p<0.001$)、(HPD 15.5 ± 1.61 % vs LPD 7.35 ± 0.82 %, $p<0.001$)、肝線維化面積 (HPD 11.7 ± 1.35 % vs NPD 5.98 ± 1.15 %, $p<0.01$)、(HPD 11.7 ± 1.35 % vs LPD 5.54 ± 0.77 %, $p<0.01$) いずれにおいても有意に高値を示した。22 週齢における尿中 AGT 排泄量は cystic マウス間では HPD 群で尿中 AGT 著明高値を示す個体が認められ、全体としても NPD 群および LPD 群との間に有意差を認めた。マウス血液検体を用いた酸化ストレス測定では non-cystic マウスおよび cystic マウスいずれも LPD 群が NPD 群に対して有意に高値を示した。

【総括および結論】

第一章の結果より、ADPKD 患者におけるサプリメントとしての BCAA 摂取の潜在的な有害性が示唆された。ADPKD の嚢胞形成に関わる主要経路として mTOR および ERK/MAPK 経路の重要性も再確認することになった。第二章では ADPKD において過剰な蛋白質摂取は嚢胞増大および組織障害進行の点から好ましくないことが確認された。他疾患の CKD 患者同様に ADPKD 患者でも早期 CKD の時期から過剰な蛋白質摂取を避けるように指導することの妥当性を支持する内容と考える。ADPKD をとりまく治療のエビデンスは未だ不足している状況であり、本研究を発展させ、栄養を通じ

て ADPKD の病態に迫る事で、トルバプタンに続く新規の ADPKD 治療薬の創薬につながると考えられた。