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
Author(s)	山本, 準也
Description	配架番号：2241
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12137号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12137
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64640
Type	doctoral thesis
File Information	Junya_Yamamoto.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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

学　位　論　文

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

目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・　1頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　3頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5頁

第一章　　分岐鎖アミノ酸が常染色体優性多発性嚢胞腎に与える影響

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　8頁

実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　9頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　16頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　39頁

第二章　　蛋白質負荷が常染色体優性多発性嚢胞腎に与える影響

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　42頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　43頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　45頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　59頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　61頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　63頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　64頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿した.

1. Junya Yamamoto, Saori Nishio, Yasunobu Ishikawa, Tasuku Nakagaki, Michio Sata, and Tatsuya Atsumi
   Branched-chain Amino Acids Enhance Cyst Development in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease.
   J. Am. Soc. Nephrol. , submit (2015)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 山本準也, 石川康暢, 中垣祐, 柴崎跡也, 西尾妙織, 佐田通夫, 渥美達也
   分岐鎖アミノ酸は ADPKD モデルマウスにおいて嚢胞形成を促進する
   第 56 回日本腎臓学会学術総会, 2013 年 5 月 10 日・東京都

2. Junya Yamamoto, Yasunobu Ishikawa, Tasuku Nakagaki, Sekiya Shibazaki, Saori Nishio, Michio Sata, and Tatsuya Atsumi
   Branched-chain amino acid supplementation accelerates cyst growth in a mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease.
   The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology, 15th May 2014, Tokyo, Japan.

3. Junya Yamamoto, Yasunobu Ishikawa, Tasuku Nakagaki, Sekiya Shibazaki, Saori Nishio, and Tatsuya Atsumi
   Branched-chain amino acid supplementation accelerates cyst growth in a mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease.
   The 51st ERA-EDTA Congress, 1st June 2014, Amsterdam, Netherlands.

4. 山本準也, 石川康暢, 中垣祐, 柴崎跡也, 西尾妙織, 渥美達也
   分岐鎖アミノ酸製剤は多発性嚢胞腎の嚢胞形成を促進する
   第 57 回日本腎臓学会学術総会, 2014 年 7 月 4 日・横浜市

5. Junya Yamamoto, Saori Nishio, Daigo Nakazawa, Tasuku Nakagaki, Sekiya Shibazaki, and Tatsuya Atsumi
Dietary protein loading modulates disease progression in an orthologous mouse model of ADPKD.
The 52nd ERA-EDTA Congress, 29th May 2015, London, United Kingdom.

6. 山本準也, 西尾妙織, 柴崎跡也, 渥美達也
分岐鎖アミノ酸による多発性嚢胞腎の嚢胞形成促進機序の解析
第 58 回日本腎臓学会学術総会, 2015 年 6 月 7 日・名古屋市

7. Junya Yamamoto, Saori Nishio, Tasuku Nakagaki, and Tatsuya Atsumi
Leucine stimulates the proliferation of *Pkd1*-null renal epithelial cells via ERK/MAPK and mTOR pathway.
American Society of Nephrology, Kidney Week 2015, 5th November 2015 San Diego, U.S.A.

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．嚢胞増大と共に進行性の腎機能障害を呈するようになり，40〜60 歳で末期腎不全に至る．ADPKD では脳動脈瘤，心臓弁膜症，多発性肝嚢胞などの腎外病変も合併し，高血圧症や嚢胞増大に伴う臓器圧迫症状を呈する．[1,2] ADPKD の原因遺伝子として第 16 染色体短腕に存在する *PKD1* 遺伝子 [3,4] と第 4 染色体長腕に存在する *PKD2* 遺伝子 [5] が同定されている．*PKD1* の遺伝子産物である polycystin-1 と *PKD2* の遺伝子産物である polycystin-2 は腎の尿細管上皮細胞の繊毛に局在する膜貫通蛋白であり，[6] polycystin-1 が尿流を感知して，刺激を受けたカルシウムイオンチャネルである polycystin-2 が細胞内カルシウム濃度を正常に維持することで，適切な尿細管径の調節が行われると考えられている．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尿細管径の調節ができなくなり，嚢胞が形成される．[7] また，ADPKD の遺伝学的発症機序としてツーヒット説があり，両親由来の 2 本の *PKD* 遺伝子のうち，正常である１本の *PKD* 遺伝子に後天的に体細胞変異が生じることで，*PKD* 遺伝子の機能が完全に喪失し，初めて嚢胞が形成されると考えられている．[8,9]

細胞内カルシウム濃度の低下は cyclic adenosine monophosphate (cAMP)の増加 [10–12] とその下流に位置する extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK)経路 [13,14] および mammalian target of rapamycin (mTOR)経路 [15] 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．これらの増殖に関わる経路を標的とした薬剤が ADPKD の治療薬となることが期待され，数多くの報告がされてきた．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，[16] 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た.

第一章では ADPKD の嚢胞形成に関わる経路の 1 つである mTOR 経路の活性化作用を持つ分岐鎖アミノ酸 (Branched-chain amino acid :BCAA)に注目し, BCAA が mTOR 経路の活性化作用により ADPKD において尿細管上皮細胞および尿細管上皮細胞由来である嚢胞上皮細胞の増殖を介して嚢胞増大を伴い ADPKD 病態の悪化に寄与するという仮説を立てた. 最初に動物実験としてヒト ADPKD に最も相同性の高いモデルとされる *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスを用いて BCAA 投与実験を行い, BCAA がマウス表現型および細胞増殖シグナルに与える影響を解析した. 対照群として設定したコーンスターチを主成分としたプラセボ投与群と比較して BCAA 投与群は腎および肝の嚢胞形成促進および組織線維化の促進が認められた. シグナル経路の解析の結果, BCAA 投与群はプラセボ群に比較して mTOR 経路だけではなく, ERK/MAPK 経路の活性化を示した. 次にマウス由来 *Pkd1* ホモ欠失尿細管上皮細胞株に対して BCAA の中でも強い生理作用を持つとされるロイシンを添加することにより生じる細胞増殖の変化や増殖シグナルの変化を解析した. ロイシンの添加により *Pkd1* ホモ欠失細胞の増殖は促進され, 動物実験同様にロイシンによる mTOR 経路および ERK/MAPK 経路の活性化が確認された. 本研究により ADPKD 病態における mTOR 経路および ERK/MAPK 経路の重要性の確認および ADPKD に対する BCAA の潜在的な有害性が示唆された.

第二章ではより臨床に直結する課題として, 食事の蛋白質量の多寡が ADPKD の病態を修飾するかを検討した. 第一章の結果と BCAA が食事蛋白質に一定の割合で含まれている事実より, 蛋白質負荷は嚢胞増大を伴い ADPKD 病態を悪化させ, 逆に蛋白質制限は嚢胞増大抑制効果により ADPKD の病期進行を抑制するという仮説を立てた. 第一章と同様に *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスを用いて, マウス飼料の蛋白質量の多寡により高蛋白食群, 普通蛋白食群, 低蛋白食群の 3 群に割り付けして, 一定期間飼育後に屠殺解剖して主にマウス表現型を中心に解析した. 高蛋白質群は他の 2 群と比較して, 腎および肝の嚢胞形成促進および組織線維化の促進が認められたが, 一方で低蛋白質群における普通蛋白群と比較した嚢胞増大抑制効果は認められなかった. 本研究の結果は ADPKD における蛋白質制限の有用性を支持するものではなかったが, 過剰な蛋白質摂取の有害性を確認することができた.

以上の 2 つの報告は ADPKD においてアミノ酸負荷および蛋白質負荷という新たな視点を与えると共に, BCAA サプリメント摂取の在り方に問題提起するものであると考えられた.

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ADPKD	Autosomal dominant polycystic kidney disease
AGT	Angiotensinogen
ALT	Alanine aminotransferase
BAP	Biological anti-oxidant potential
BCAA	Branched-chain amino acid
BPB	Bromophenol blue
BUN	Blood urea nitrogen
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CKD	Chronic kidney disease
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
d-ROM	Diacron-reactive oxygen metabolites
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Elastica-Masson
ERK/MAPK	Extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase
HE	Hematoxylin-Eosin
HPD	High protein diet
HRP	Horseradish peroxidase
LPD	Low protein diet
LW/BW	Liver weight/ body weight ratio
MEK	Mitogen activated protein kinase/extracellular regulated kinase kinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NPD	Normal protein diet
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PFA	Paraformaldehyde
pI-pC	Polyinosinic-polycytidylic acid

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
RAS	Renin-angiotensin system
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris-buffered saline
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
vs	Versus
2KW/BW	Bilateral kidney weight/ body weight ratio

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

緒言

ADPKD では polycystin-1 または polycystin-2 の機能異常による細胞内 cAMP 濃度が高まる事により, 細胞増殖に関わる種々のシグナル経路の活性化が起こる. 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, 健常者の尿細管上皮細胞ではほとんど mTOR が活性化していないのに対して, ADPKD 患者の腎嚢胞上皮細胞では活性型 mTOR が強く発現していることが示されている.[15] mTOR はセリンスレオニンキナーゼであり, mTORC1 複合体と mTORC2 複合体という全く異なる 2 つの複合体が存在している. 中でも mTORC1 複合体はインスリン等の成長因子, ストレス, 栄養状態等の影響を受けて, 細胞の成長, 腫瘍の増殖, オートファジーを調節するという役割を担っている.[17,18] Rapamycin (別名：Sirolimus)は mTORC1 複合体に作用することで mTOR 経路を阻害する薬剤であり, Rapamycin の誘導体 (ラパログ)である Everolimus 等と共に, 腎細胞癌の抗腫瘍薬, 薬剤溶出性冠動脈ステントの細胞増殖抑制薬, 臓器移植の際の免疫抑制剤として既に臨床の場で使用されている. 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,[19-25] 嚢胞増大抑制効果が認められないという報告や,[26] 嚢胞増大は抑制したが, 腎機能低下抑制効果はないという報告もあるため,[27] 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.[28]

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.[29,30] BCAA はロイシン, イソロイシン, バリンの 3 つのアミノ酸の総称であり, ロイシンを主とした BCAA の生理作用は筋肉, 肝臓, 脂肪組織等で示されてきた.[31-35] BCAA が mTOR を活性化させる機序についてはまだ完全に解明されていないが, アミノ酸刺激を mTOR に伝達する分子の候補は上がっている.[36-38]

我々の日常生活では 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. In vivo 実験では *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* マウスに対して BCAA 投与を行い, 特定の時期に屠殺解剖し, 腎および肝の嚢胞形成, 組織線維化の程度の評価や免疫染色による細胞増殖およびアポトーシスの評価や mTOR 経路を含めた ADPKD において増殖に関与するシグナル経路の評価を免疫染色およびウエスタンブロッティング法で行った. 次に in vitro 実験としてマウス由来 *Pkd1* ホモ欠失尿細管上皮細胞株を用いたロイシン添加培養実験を施行した. ロイシン添加による尿細管細胞増殖の変化や mTOR 経路を含めた増殖シグナルの変化を解析した.

実験方法

< In vivo 実験>

1) 薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウス

Shibazaki らが作製した *Pkd1*$^{flox/flox}$ マウス[39] 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 μg/g (BW)の pI-pC を連続 6 日間腹腔内投与した. マウスの飼育環境は, 室温 25.0 ℃の空調のもと 8 時から 18 時までを明期とした明暗サイクルにて自由運動および飲料, 餌の自由摂取下で飼育した. 動物実験は北海道大学動物実験に関する規程に従って行った.

2) BCAA 製剤およびプラセボの投与

BCAA 製剤およびプラセボ製剤はリーベンス社/生活文化舎から提供頂いたものを使用した. 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.

3) マウス表現型の解析

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 を評価した. Cystic Index は WinRooF (Mitani corporation)を用いて測定した.

4) 生化学検査

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 (SRL). 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).

5) 病理組織学的評価, 組織線維化評価

22 週齢の屠殺解剖の際に 4 % paraformaldehyde (PFA)にて還流固定を行い, 腎臓および肝臓を摘出した. パラフィン包埋切片を作成し, Hematoxylin-Eosin (HE)染色および Elastica-Masson (EM)染色を行った. 光学顕微鏡 (BZ 9000 :KEYENCE)にて病理組織標本を観察し, 組織像を撮影した. EM 染色にて腎臓および肝臓の線維化領域の面積を WinROOF (Mitani corporation)を用いて測定し, 嚢胞面積を除外した組織横断面面積に対する割合として表示した.

6) 免疫組織染色 (酵素抗体法)

パラフィン切片をレモゾールとエタノールで脱パラフィンし, Phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄後, 0.6 %過酸化水素加メタノールを追加して内因性ペルオキシダーゼを除去した. その後 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)に標本を浸し, microwave で 500 W・5 分間の加熱を 3 回行い, 抗原賦活化処理を行った. 標本は 10% ヤギ血清にて 60 分ブロッキングを行った後, 抗リン酸化 mTOR(Ser2448)抗体および抗リン酸化 ERK(Thr202/Tyr204) 抗体 (Cell Signaling Technology)にて 4 ℃ overnight でインキュベートした. その後, ビオチン標識二次抗体 (Nichirei Biosciences)にて室温 60 分処理し, horseradish peroxidase (HRP)標識ストレプトアビジンを 15 分反応させ, 洗浄後に 3,3'-diaminobenzidine (DAB)で発色した. その後, ヘマトキシレンで対比染色させた.

7) 免疫組織染色 (蛍光抗体法)

組織を 4 % PFA にて overnight 固定し, 30 %スクロースに浸した. その後 OCT compound (Sakura, Tokyo, Japan)に包埋し, 液体窒素で凍結した. 凍結切片作成後は 10%ヤギ血清で 60 分ブロッキングを行った後に, 抗 Ki-67 抗体 (Cell Signaling Technology)で 4 ℃ overnight でインキュベートした. その後, Alexa-Fluor 594 標識二次

抗体 (Life Technologies)にて暗所室温 60 分処理した. VECTASHIELD (Vector Laboratories)にて封入する際に核を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で染色した.

8) PCNA 染色および TUNEL 染色

嚢胞上皮細胞の増殖の評価として，酵素抗体法に基づき proliferating cell nuclear antigen (PCNA)染色を行い, 嚢胞上皮細胞における PCNA 陽性の割合を腎嚢胞および肝嚢胞において計算した. Invtirogen 社の PCNA キットを使用した. アポトーシスの解析では terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)染色を行い，嚢胞上皮細胞における TUNEL 陽性の割合を腎嚢胞および肝嚢胞において計算した. TUNEL 染色は MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit II (MBL)を用いた.

9) ウエスタンブロット法による組織タンパク発現の解析

9-1. 組織蛋白質抽出と蛋白質濃度測定

マウスより摘出した腎臓を蛋白分解酵素阻害薬 (Roche Life Science)および脱リン酸化酵素阻害薬 (Sigma-Aldrich)を添加した蛋白抽出用緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA)内でホモジナイズ後，4 ℃，15000 rpm，5 分間の遠心分離を施行し，上清を蛋白抽出液として使用した. DC protein Assay キット(Bio-Rad Laboratories)用いて，蛋白抽出液の蛋白濃度を定量した. 抽出液の 1/5 量の 6×サンプルバッファー (0.25 M Tris-HCl(pH 6.8), 30 %グリセロール, 10 % Sodium dodecyl sulfate (SDS), 9.3 % dithiothreitol (DTT), 0.2 % bromophenol blue (BPB))を添加し，95 ℃・5 分間で熱変性させ，電気泳動用のサンプルに調整した.

9-2. 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

10% ポリアクリルアミドゲルを作成し, 1 ウエルあたり 100 μg の蛋白質量になるようにサンプルを注入し, 泳動槽にて 100 V の定電圧設定で電気泳動を行った. 電気泳動で分離したゲル中の蛋白はセミドライ式ブロッティング装置 (Bio-Rad Laboratories)を用いて 2 mA/m^2 の定電流設定で，事前にメタノールに浸し親水化処理を行ったポリフッ化ビニリデンメンブレンに転写した. 5 %スキムミルクを含む TBS-T (Tris-buffered saline :TBS, 0.05% Tween-20)にて 60 分ブロッキングを行った後に，各一次抗体を 4 ℃ over night で反応させた. TBS-T でメンブレンを洗浄し, HRP 標識二次抗体 (Jackson Immuno Research)で室温 60 分反応させた. TBS-T で 3 回洗浄後, Super Signal

West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific)にて発光させ, ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare)を使用しバンドを可視化した. なお, 一次抗体として抗リン酸化mTOR (Ser2448)抗体, 抗mTOR抗体, 抗リン酸化ERK (Thr202/Try204)抗体, 抗ERK抗体 (以上はすべてCell Signaling Technologyより購入), 抗β-actin抗体(Santa Cruz Biotechnology)を使用した.

9-3. リン酸化蛋白発現量の定量

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.

10) 統計学的解析

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>

1) マウス由来尿細管上皮細胞株の培養

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. これら2つの細胞株はそれぞれ単一の H2Kb-tsA58 トランスジェニックマウス由来 (Charles river)[40] の不死化遺伝子を有する単一の *Pkd1*$^{flox/-}$マウス個体より作成されており, *Pkd1*$^{-/-}$細胞はその後の Cre リコンビナーゼを有するプラスミドの一過性トランスフェクションにより作成された.[39] 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 ℃ , 5 % CO_2 の環境で培養および継代した. なお, 以下の実験では凍結保存していた細胞株を解凍後, 1 回以上継代した上で使用した.

2) 培養細胞観察と培養細胞数の計測

3×10^5 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 ℃, 5 % CO_2 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 Cellometor Auto (Nexcelom Bioscience)で自動計測し, 細胞増殖能の指標とした.

3) 蛍光免疫細胞染色

5×10^4 個の細胞を 500 μL の培養液で懸濁し, 4 ウエルのチャンバースライド (BD Biosciences)に播種した. 37 ℃, 5 % CO_2 で 24 時間培養後に 4 % PFA にて 15 分固定し, 冷 70 % メタノールで 4 分浸透処理した. その後, 10 %ヤギ血清で 60 分ブロッキングを行った後に, 抗 Ki-67 抗体 (Cell Signaling Technology)で 4 ℃ overnight でインキュベートした. 次に Alexa-Fluor 594 標識二次抗体 (Life Technologies)にて暗所室温 60 分処理した. VECTASHIELD (Vector Laboratories)で封入する際に核を DAPI で染色した.

4) アミノ酸枯渇処理

培養細胞のアミノ酸を枯渇させるために, 既報を参照して[41,42] 細胞を 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 ℃, 5 % CO_2 の条件で 2 時間処理した.

5) ロイシンおよび各種阻害薬の使用

ロイシンは L-leucine (Sigma-Aldrich)を任意の濃度になるように各種培養液に添加して使用した. 阻害薬は Dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解し, 各種培養液で一定の濃度になるように希釈して使用した. 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. (阻害薬はすべて Cell Signaling Technology より購入)

6) ウエスタンブロット法による細胞タンパク発現の解析

6-1. 細胞蛋白質抽出と蛋白質濃度測定

回収した細胞は蛋白分解酵素阻害薬 (Roche Life Science)および脱リン酸化酵素阻害薬 (Sigma-Aldrich)を添加した蛋白抽出用緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA)内でホモジナイズ後，4 ℃，15000 rpm，5 分間の遠心分離を施行し，上清を蛋白抽出液として使用した. DC protein Assay キット (Bio-Rad Laboratories)用いて, 蛋白抽出液の蛋白濃度を定量した. 抽出液の 1/5 量の (0.25 M Tris-HCl(pH 6.8), 30 %グリセロール, 10 % SDS, 9.3 % DTT, 0.2 % BPB)を添加し, 95 ℃・5 分間で熱変性させ，電気泳動用のサンプルに調整した.

6-2. 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

10 %ポリアクリルアミドゲルを作成し, 1 ウエルあたり 50 μg の蛋白質量になるようにサンプルを注入し, 泳動槽にて 100 V の定電圧設定で電気泳動を行った. 電気泳動で分離したゲル中の蛋白はセミドライ式ブロッティング装置 (Bio-Rad Laboratories)を用いて 2 mA/m^2 の定電流設定で, 事前にメタノールに浸し親水化処理を行ったポリフッ化ビニリデンメンブレンに転写した. 5 %スキムミルクを含む TBS-T にて 60 分

ブロッキングを行った後に, 各一次抗体を4 ℃ over night で反応させた. TBS-T でメンブレンを洗浄し, HRP 標識二次抗体 (Jackson Immuno Research)で室温 60 分反応させた. TBS-T で 3 回洗浄後, Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific)にて発光させ, ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare)を使用しバンドを可視化した. なお, 一次抗体として抗リン酸化 p70S6K (Thr389)抗体, 抗 p70S6K 抗体, 抗リン酸化 ERK(Thr202/Try204)抗体, 抗 ERK 抗体 (以上すべて Cell Signaling Technology より購入), 抗 β-actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)を使用した.

6-3. リン酸化蛋白発現量の定量

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.

7) 統計学的解析

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

< In vivo 実験>

1)　表現型,　腎機能および肝機能

22 週齢のマウス体重は各群の間で差は認めなかった (図 1A). *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* (Cystic)マウスにおいて各群を代表する腎組織および肝組織の横断面像を下記に示す (図 1B). 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 (図 1C). 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±3.38 % vs 9.60±2.97 %, p<0.01) (図 1D). 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 (図 1E). ALT に関して有意差は認めなかった (図 1F). なお, コントロールとしての *Pkd1*$^{flox/flox}$ (non-cystic)マウスの表現型に関してはBCAA 投与群とプラセボ群の間に差は認めなかった. 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 (図 1G).

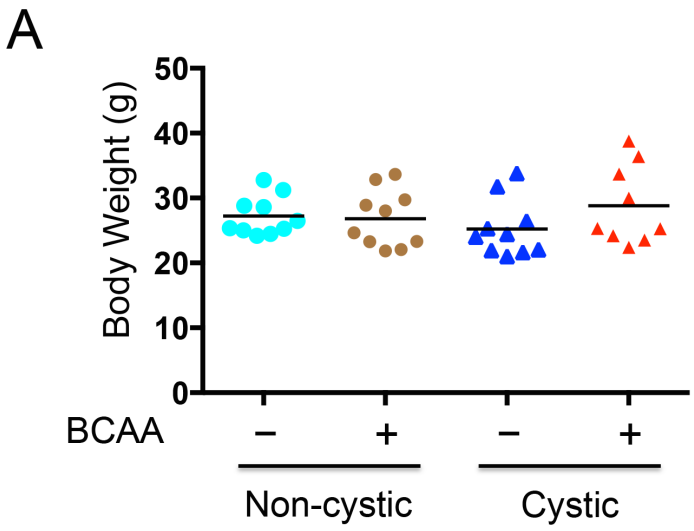

図 1A：22 週齢における各群のマウス体重

解剖屠殺直前にマウス体重を測定した. 各群の間に有意差を認めない. N=9-10.

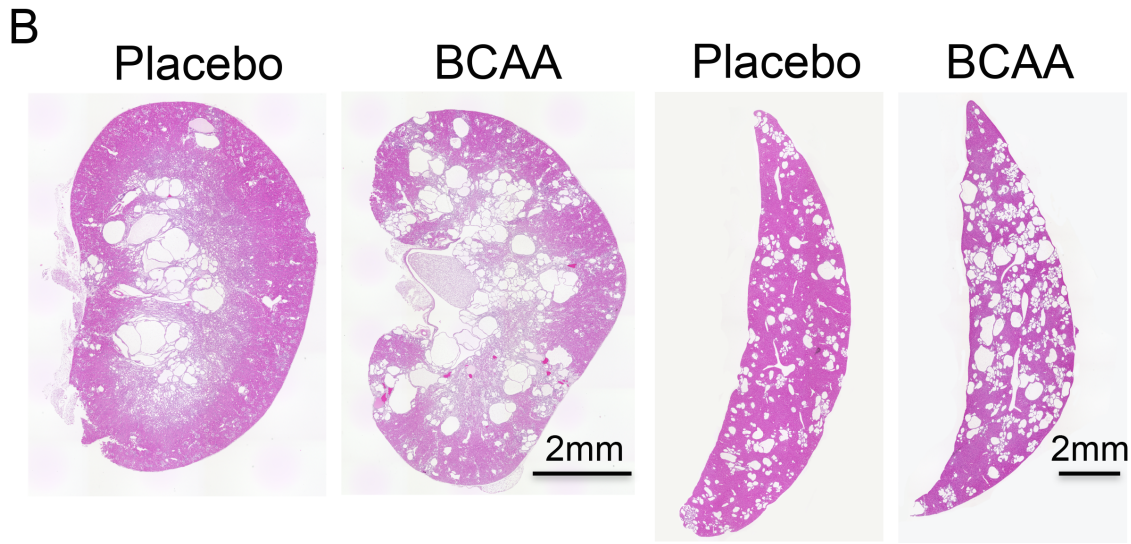

図 1B： *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* (cystic)マウスの腎臓(左)および肝臓(右)の HE 染色像

各群の代表的な組織横断面像を示す. BCAA を投与された cystic マウスはプラセボを投与された cystic マウスと比較して腎臓・肝臓においてより多くの嚢胞形成を認める.

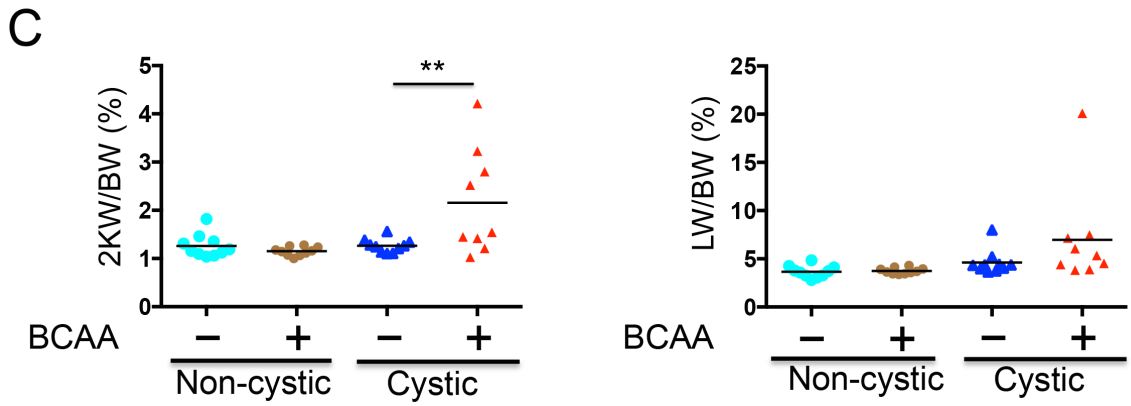

図 1C：マウス腎重量・体重比(2KW/BW)，　肝重量・体重比(LW/BW)

腎重量・体重比は BCAA を投与された cystic マウスでプラセボを投与された cystic マウスと比較して有意に高値であった．肝重量・体重比に関しては有意差を認めなかった．N=9-10, ***p*<0.01.

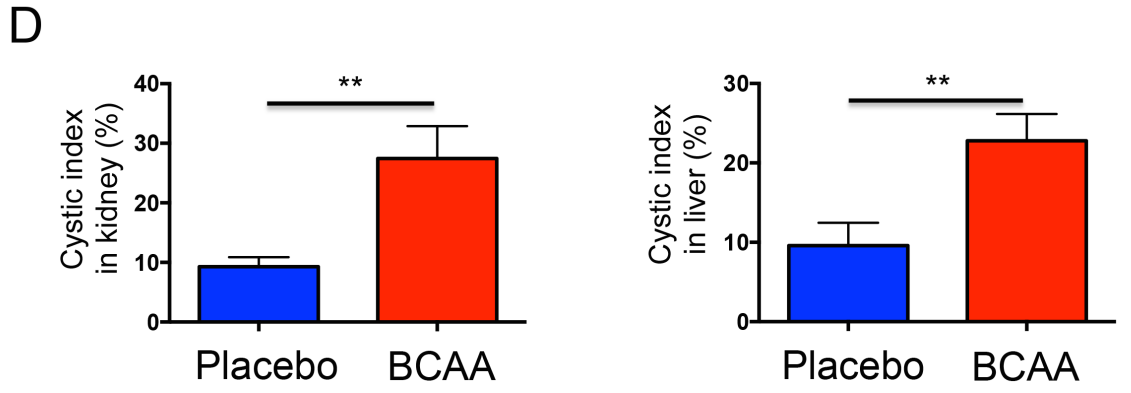

図 1D：*Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* (cystic)マウスの腎 Cystic index と肝 Cystic index

腎 Cystic index および肝 Cystic index はいずれも BCAA を投与された cystic マウスにおいて有意に高値であった．平均値±標準誤差, N=9-10, ***p*<0.01.

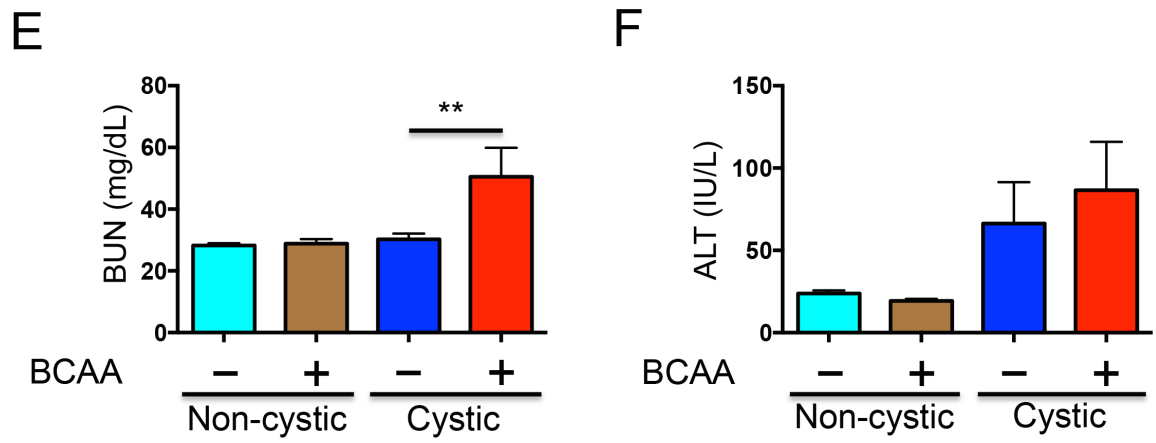

図 1E, 1F：22 週齢における各群のマウス腎機能(BUN)(図 1E), および肝機能(ALT)(図 1F)

BUN は BCAA を投与された cystic マウスでプラセボを投与された cystic マウスで有意に高値であった. ALT に関しては有意差を認めなかった. 平均値±標準誤差, N=9-10, $^{**}p<0.01$.

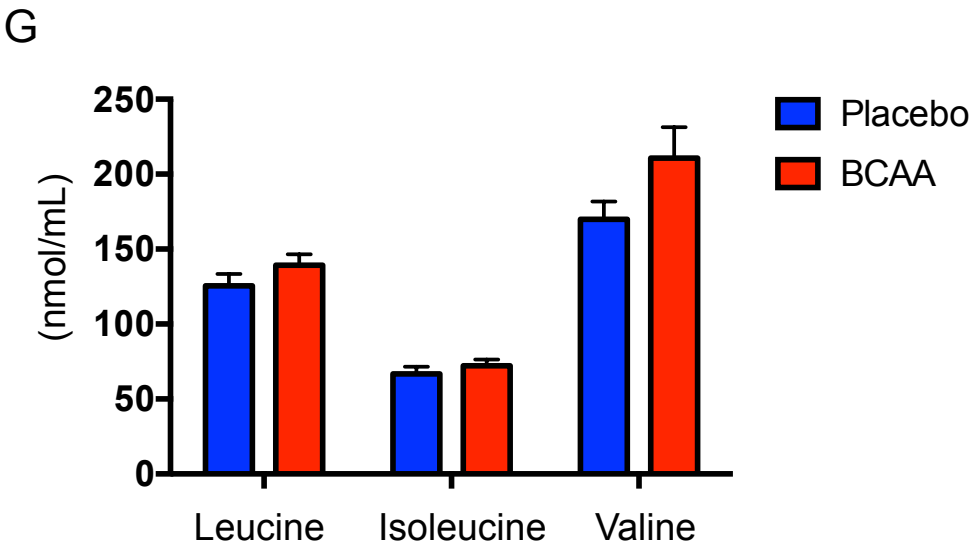

図 1G：*Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* (cystic)マウスの血液中の BCAA 濃度

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示す. いずれの BCAA 濃度に関しても BCAA 投与群とプラセボ投与群の間で有意差を認めない. 平均値±標準誤差, N=7-8.

2)　腎臓および肝臓における組織線維化

組織線維化の評価のために *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* (cystic)マウスの腎臓および肝臓に対して EM 染色を施行した (図 2A). 腎臓・肝臓いずれにおいても嚢胞周囲の間質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±1.58 % vs プラセボ 2.33±0.37 %, p<0.01), 肝線維化面積 (BCAA 6.48±0.72 % vs プラセボ 2.46±0.52 %, p<0.001)いずれにおいても有意に高値を示した (図 2B).

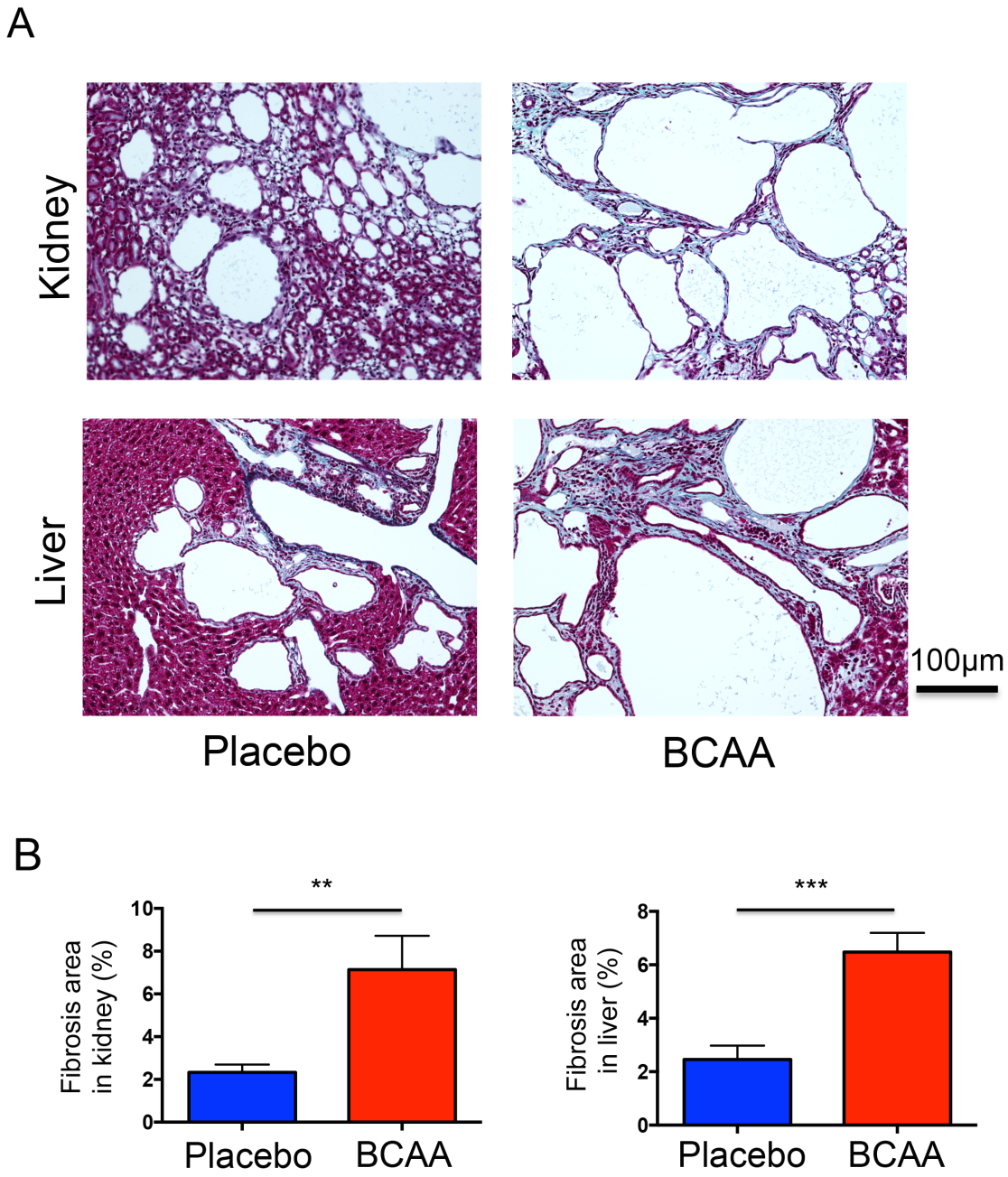

図 2：*Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* (cystic)マウスの腎臓および肝臓の間質線維化の評価

(A) Cystic マウスの腎臓および肝臓の EM 染色の代表的な組織像
青色に染色されている部分が線維化領域を示す.

(B) 嚢胞を除いた組織横断面面積における線維化領域の占める割合
腎臓および肝臓いずれにおいても BCAA を投与された cystic マウスにおいて有意な間質線維化の促進が認められた. 平均値±標準誤差, N=9-10, **p<0.01, ***p<0.001.

3)　嚢胞上皮細胞における細胞増殖とアポトーシス

腎臓および肝臓の嚢胞上皮細胞における細胞増殖の評価として PCNA 染色と Ki-67 蛍光免疫組織染色を, 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 (図 3A, 3C, 3E). 嚢胞上皮細胞における各種陽性の割合を腎嚢胞および肝嚢胞においてそれぞれ算出した. 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 (図 3B). 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 (図 3D). 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 (図 3F).

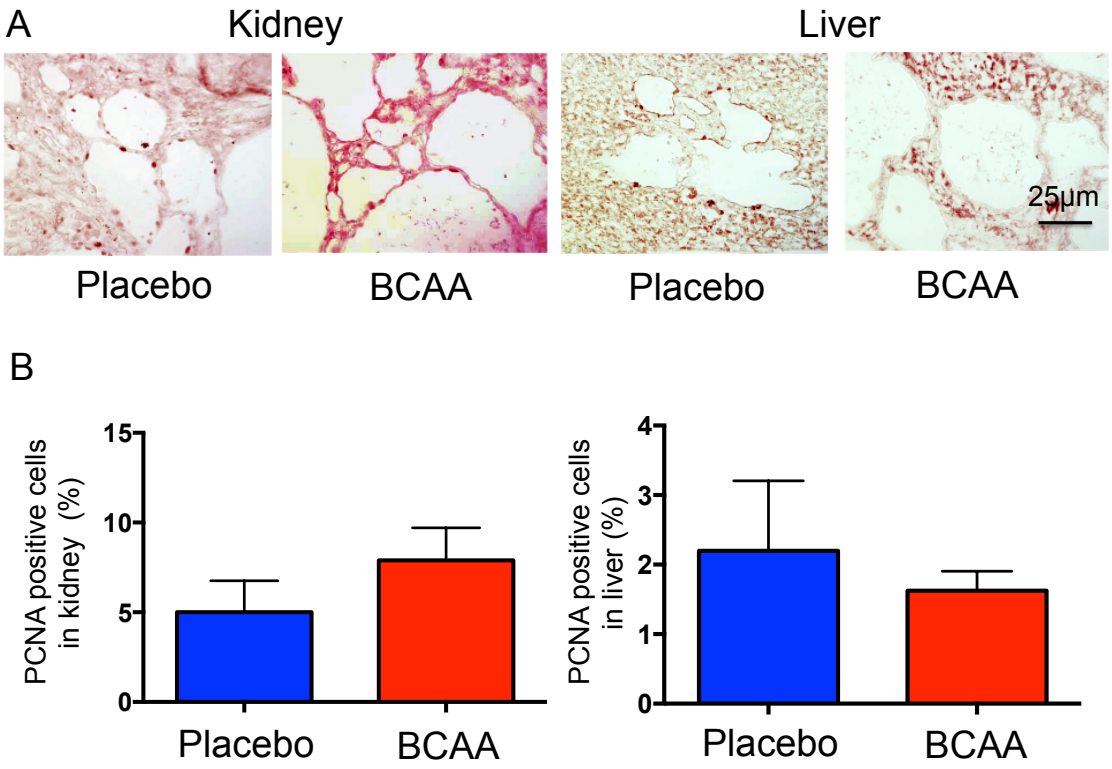

図 3A, 3B：PCNA 染色による嚢胞上皮細胞の細胞増殖能の評価

(A) Cystic マウスの腎臓および肝臓における酵素抗体法による代表的な PCNA 染色像
茶色に染まる細胞が PCNA 陽性細胞を示す.

(B) 嚢胞上皮細胞における PCNA 陽性細胞数の割合
腎臓, 肝臓いずれにおいても PCNA 陽性細胞率に有意差は認めなかった.
平均値±標準誤差, N=4-6.

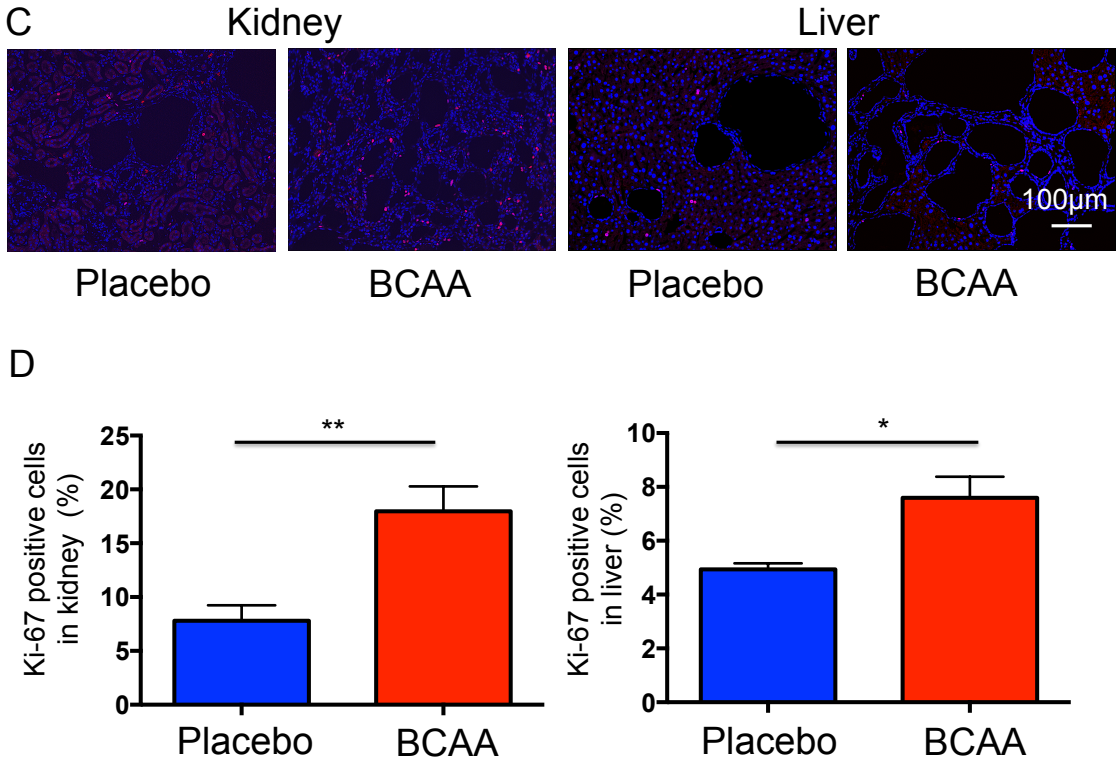

図 3C, 3D：Ki-67 染色による嚢胞上皮細胞の細胞増殖能の評価

(C) Cystic マウスの腎臓および肝臓における蛍光抗体法による代表的な Ki-67 染色像 Ki-67 陽性細胞 (赤色), DAPI (青).

(D) 嚢胞上皮細胞における Ki-67 陽性細胞数の割合

腎臓, 肝臓いずれにおいても BCAA 投与群において Ki-67 陽性率が有意に高値であった. 平均値±標準誤差, N=5, **p*<0.05, ***p*<0.01.

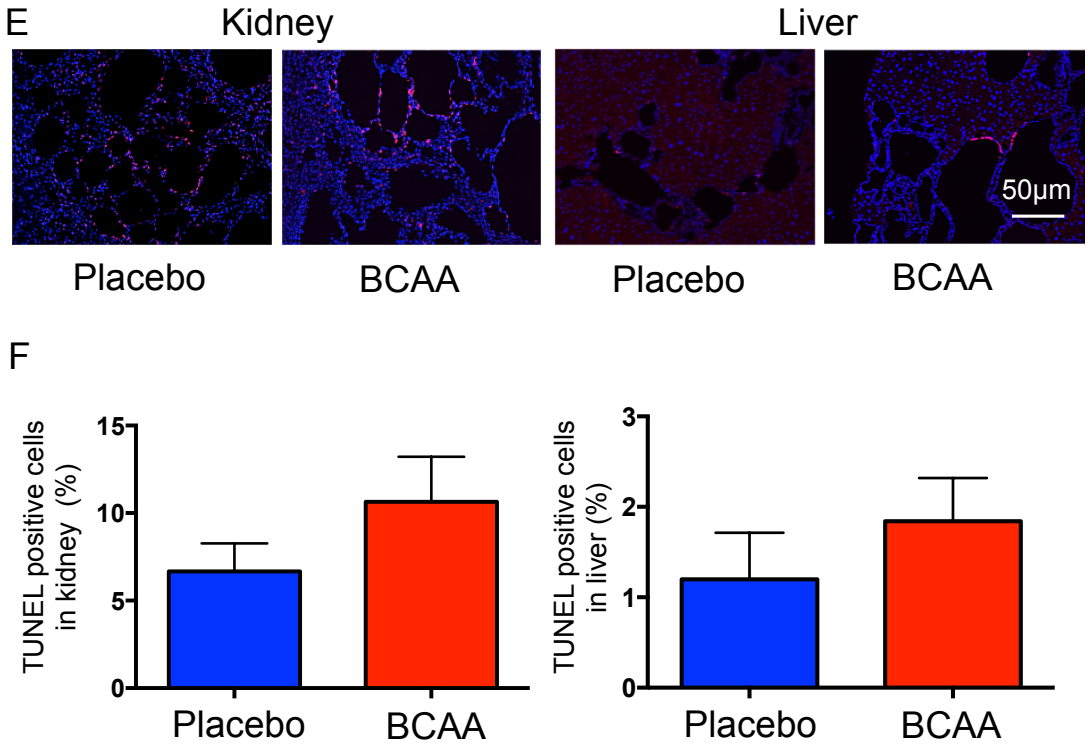

図 3E, 3F：TUNEL 染色による嚢胞上皮細胞のアポトーシスの評価

(E) Cystic マウスの腎臓および肝臓における蛍光抗体法による代表的な TUNEL 染色像 TUNEL 陽性細胞 (赤色), DAPI (青).

(F) 嚢胞上皮細胞における TUNEL 陽性細胞数の割合

腎臓, 肝臓いずれにおいても TUNEL 陽性細胞数は BCAA 投与群で多い傾向があったが, 有意差は見られなかった. 平均値±標準誤差, N=5-6.

4)　細胞増殖シグナル経路の解析

ADPKD の嚢胞増大, 細胞増殖に関わる経路として重要である mTOR 経路と ERK/MAPK 経路の寄与を検討するために, 活性型であるリン酸化 mTOR (p-mTOR)蛋白とリン酸化 ERK (p-ERK)蛋白を免疫組織染色およびウエスタンブロッティング法で評価した. 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 (図 4A, 4B). マウス腎臓抽出蛋白を用いたウエスタンブロッティングによる解析では, 標的リン酸化蛋白の発現を標的総蛋白の発現量で補正したところ, p-mTOR/mTOR および p-ERK/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 (図 4C).

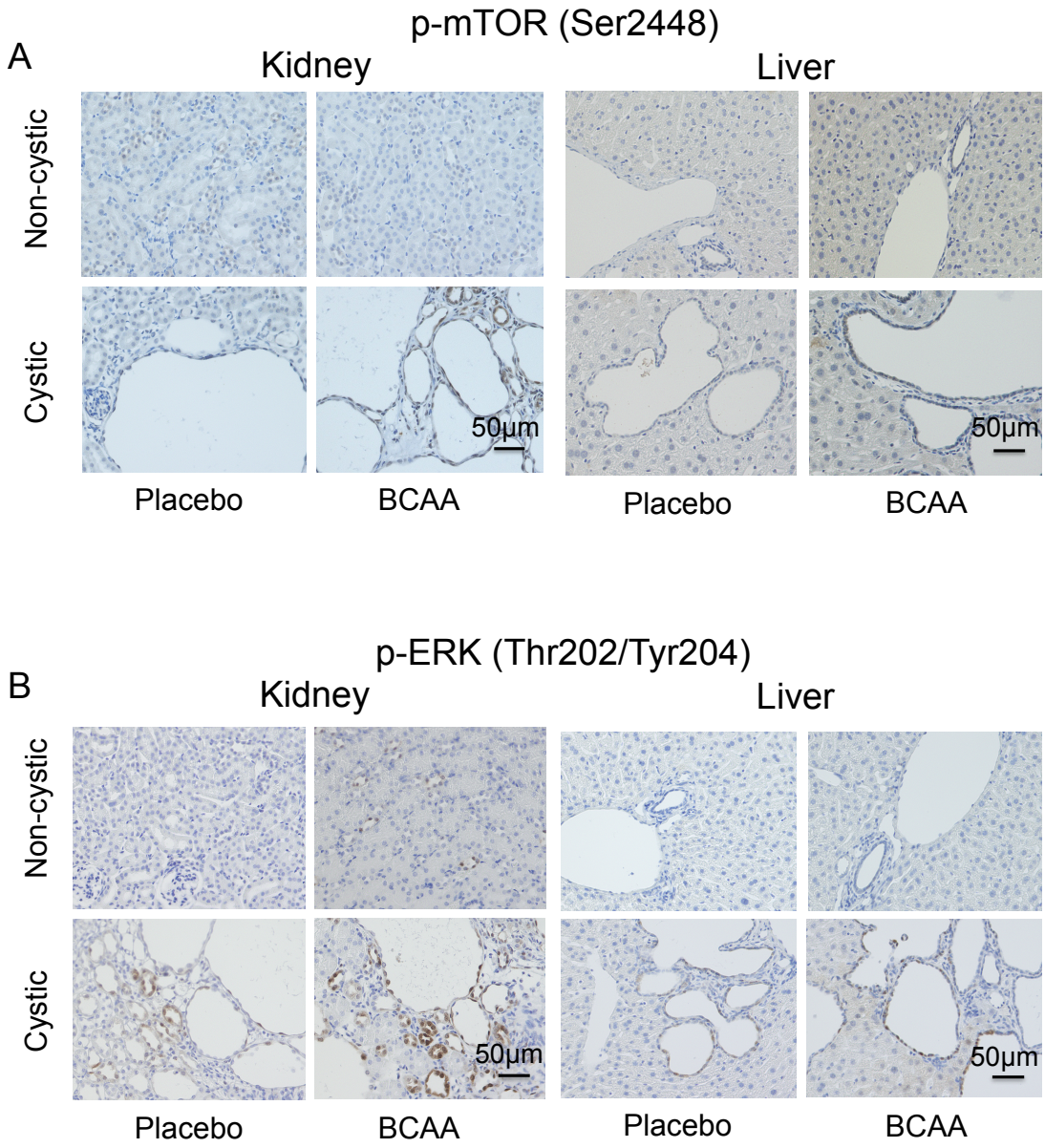

図 4A, 4B：p-mTOR および p-ERK の免疫組織染色

(A) 腎臓および肝臓における代表的な p-mTOR 染色像

(B) 腎臓および肝臓における代表的な p-ERK 染色像

BCAA 投与マウスの腎嚢胞上皮および肝嚢胞上皮で p-mTOR および p-ERK がプラセボ投与マウスと比較して多く染色される傾向があった.

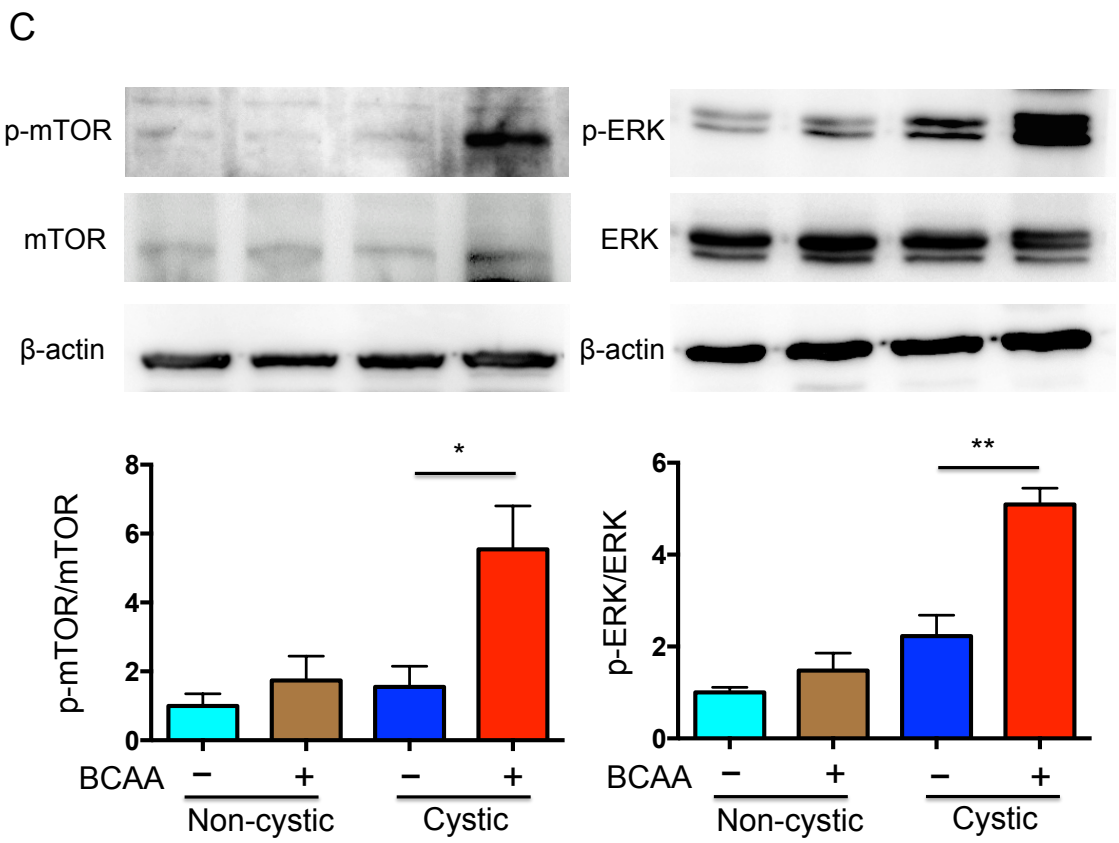

図 4C：腎蛋白抽出液による p-mTOR および p-ERK のウエスタンブロッティング

p-mTOR および p-ERK の発現量はそれぞれ総蛋白である mTOR および ERK で補正し，プラセボを投与された non-cystic マウスにおける平均値を 1 としてそれぞれ相対値で示した. Cystic マウス同士の比較ではプラセボ投与群に対して BCAA 投与群において p-mTOR/mTOR および p-ERK/ERK が有意に高値であった. 平均値±標準誤差, N=3, **p*<0.05, ***p*<0.01.

< In vitro 実験>

1)　ロイシン添加による細胞増殖能の変化

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 時間培養後に培養細胞を位相差顕微鏡で観察 (図 5A) , あるいは培養皿より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 (図5B). 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. 5×10^4 個の*Pkd1*$^{-/-}$細胞を上記同様にロイシン0.45 mMまたは7.5 mMに調整した培養液にてチャンバースライド上で24時間培養後にKi-67染色を行い, スライドを観察した (図6A). 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 (図6B).

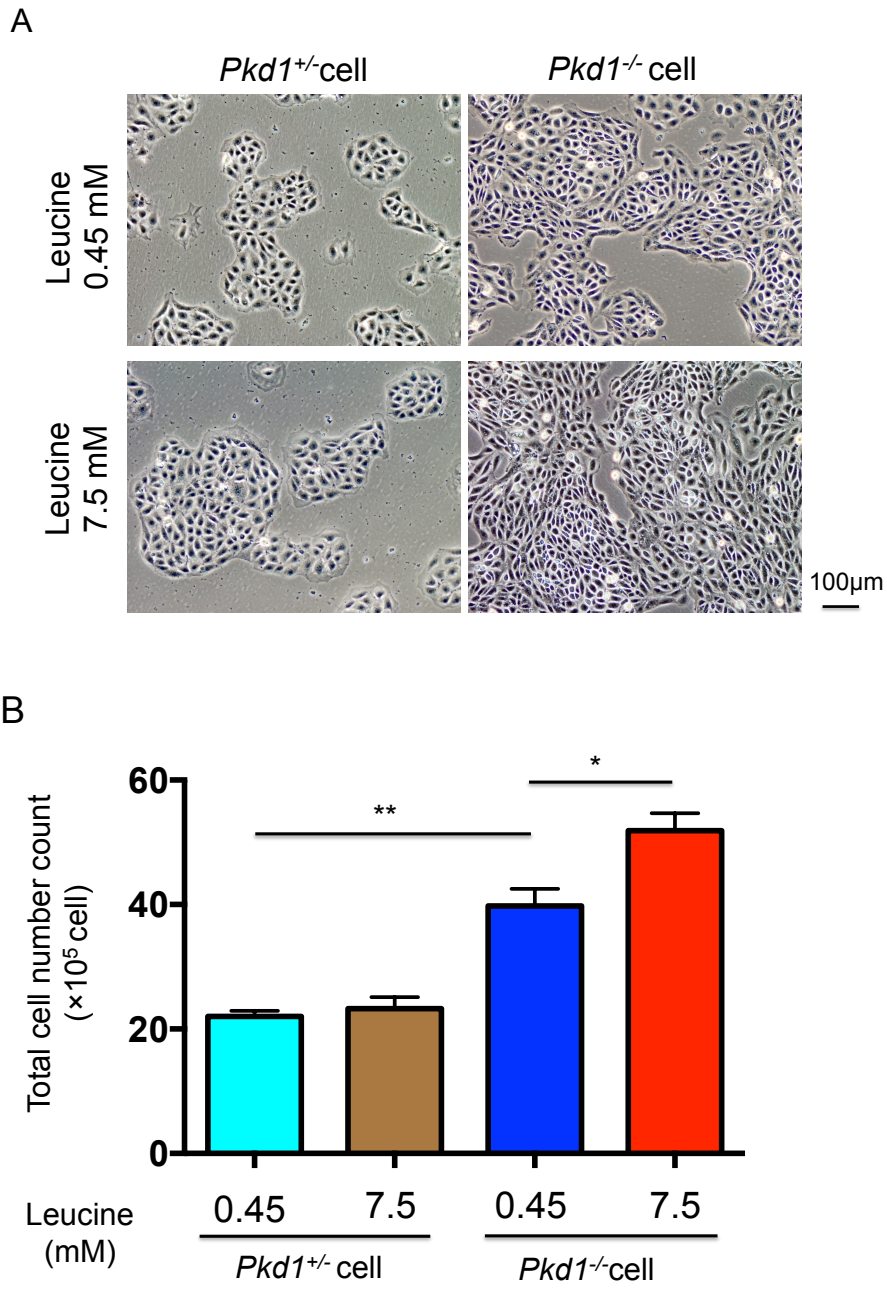

図 5：尿細管上皮細胞のロイシン濃度による細胞増殖能の変化

(A) 各尿細管上皮細胞の 72 時間培養後の位相差顕微鏡像

(B) 各尿細管上皮細胞の 72 時間培養後の総細胞数

Pkd1$^{+/-}$細胞は培養液のロイシン濃度により 72 時間培養後の細胞数に変化は見られなかったが, *Pkd1*$^{-/-}$細胞ではロイシン 7.5 mM に調整した培養液にて有意な細胞数の増加が認められた. 平均値±標準誤差, N=3, *p<0.05, **p<0.01.

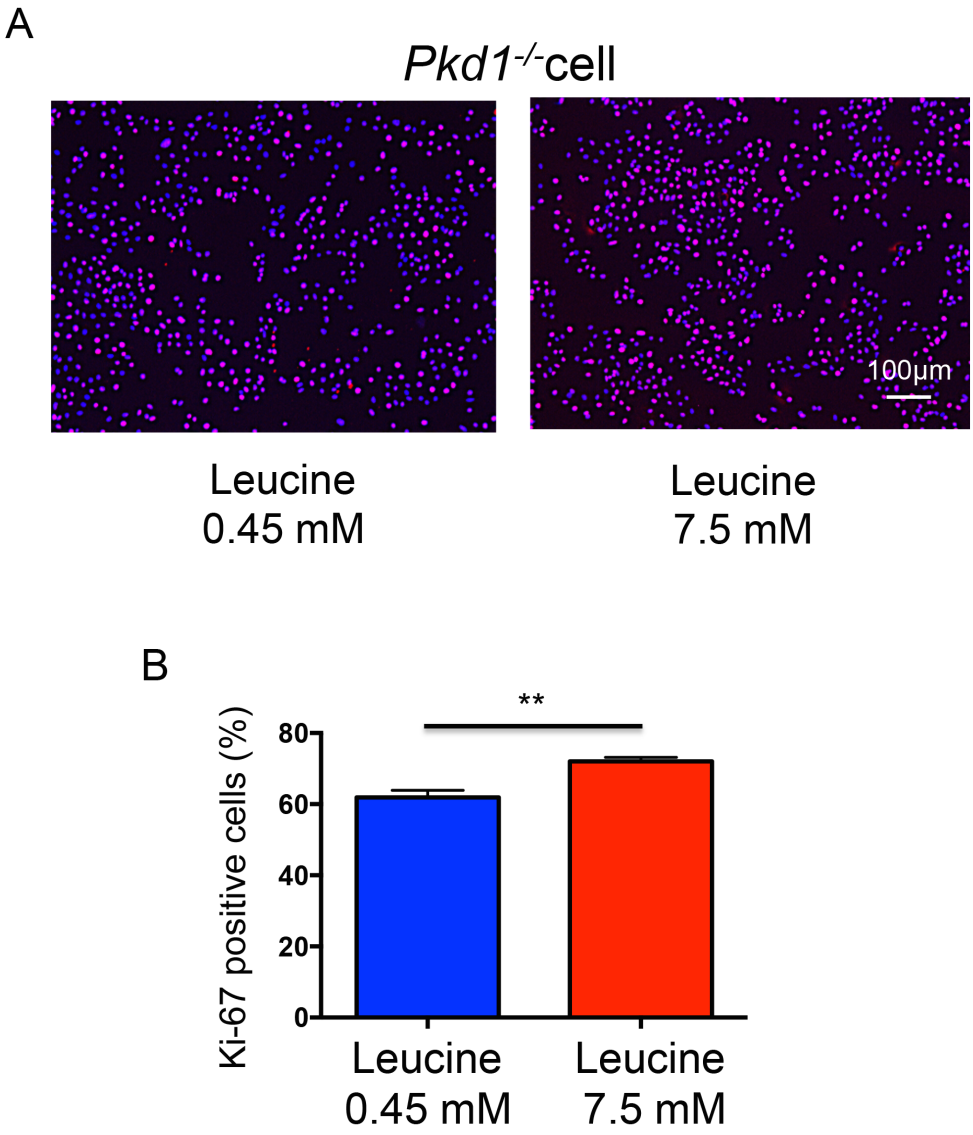

図 6：*Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞の Ki-67 染色による細胞増殖能の評価

(A) *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞の Ki-67 蛍光免疫細胞染色像

Ki-67 陽性細胞 (赤色), DAPI (青).

(B) ロイシン濃度による *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞の Ki-67 陽性率の変化

Pkd1$^{-/-}$細胞ではロイシン 7.5 mM に調整した培養液にて有意な Ki-67 陽性細胞数の増加が認められた. 平均値±標準誤差, N=4, $^{**}p<0.01$.

2) 細胞増殖シグナル経路の解析

次に 2 つの異なるプロトコールにて, ウエスタンブロッティングに用いる細胞抽出蛋白を得た.

1 つ目のプロトコールでは, 100 mm の培養皿で subconfluent の状態まで培養した *Pkd1*$^{+/-}$または *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞をアミノ酸不含有培養液にて 2 時間のアミノ酸枯渇処理を行った. その後, アミノ酸不含有培養液にロイシンを添加し, ロイシン濃度を0 〜 7.5 mMの範囲に割り付けして30分間処理した後に細胞を剥離回収し, 細胞蛋白抽出液を得た. これらの蛋白抽出液を用いたウエスタンブロッティングにて mTOR の下流に位置するp70S6Kのリン酸化 (p-p70S6K)およびp-ERKの発現を総蛋白であるp70S6KおよびERKにて補正して評価したところ, p-p70S6K/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/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 (図 7A, 7B).

2 つ目のプロトコールでは, 総細胞数計測を行う際の方法と同様に 3×10^5 個の*Pkd1*$^{-/-}$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, 蛋白抽出液を得た. この方法で得た蛋白抽出液を用いたウエスタンブロッティングでも同様に, ロイシン 7.5 mM で培養した*Pkd1*$^{-/-}$細胞にてp-p70S6K/p70S6Kおよびp-ERK/ERKの有意な上昇が確認された (図 7C).

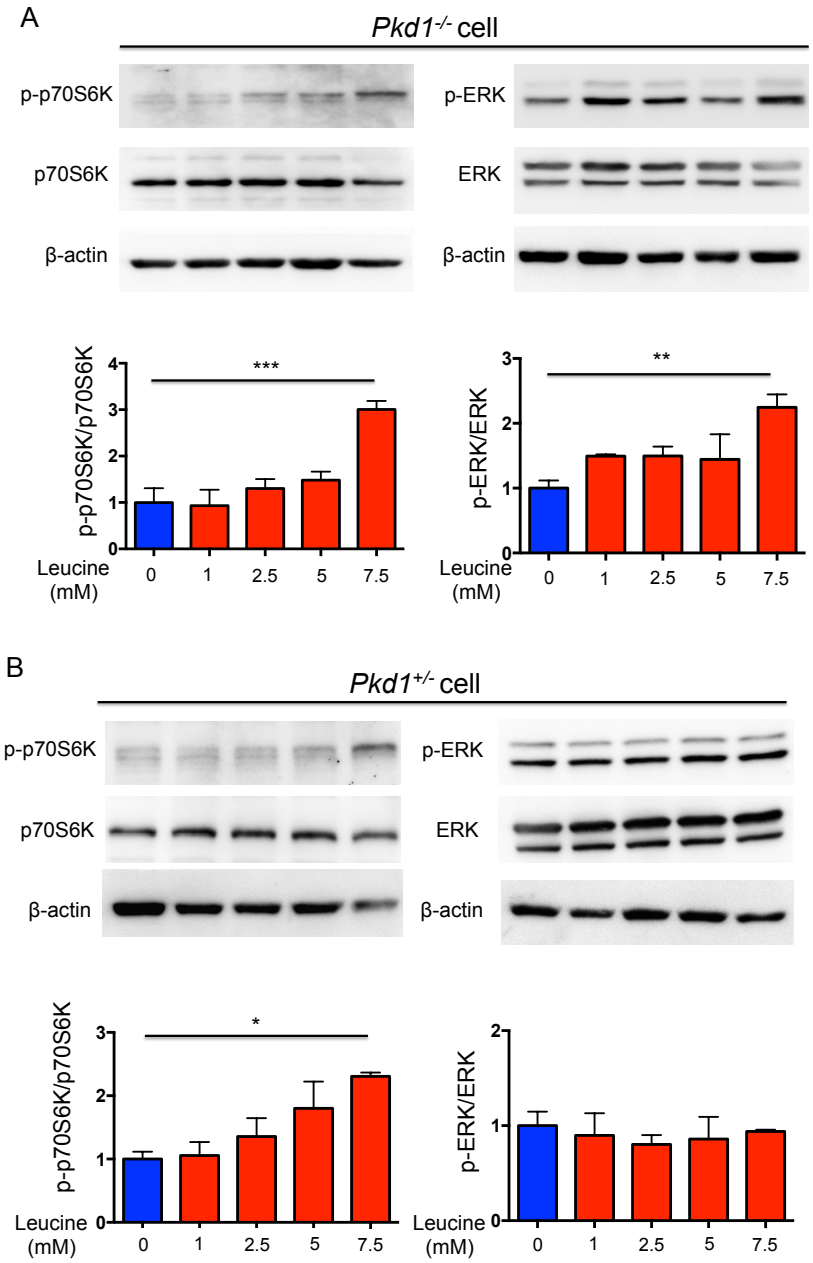

図 7A, 7B：アミノ酸枯渇処理後にロイシン添加を行った細胞蛋白抽出液による p-p70S6K および p-ERK のウエスタンブロッティング

p-p70S6K および p-ERK の発現量は総蛋白である p70S6K および ERK で補正し,ロイシン 0 mM における平均値を 1 として他を相対値で示した.

Pkd1$^{-/-}$細胞では p-p70S6K/p70S6K および p-ERK/ERK がロイシン濃度依存的に上昇を示し, ロイシン 7.5 mM ではロイシン 0 mM と比較して有意に高値であった. *Pkd1*$^{+/-}$細胞では p-p70S6K/p70S6K のみロイシン濃度依存的な上昇が認められた.

平均値±標準誤差, N=3, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

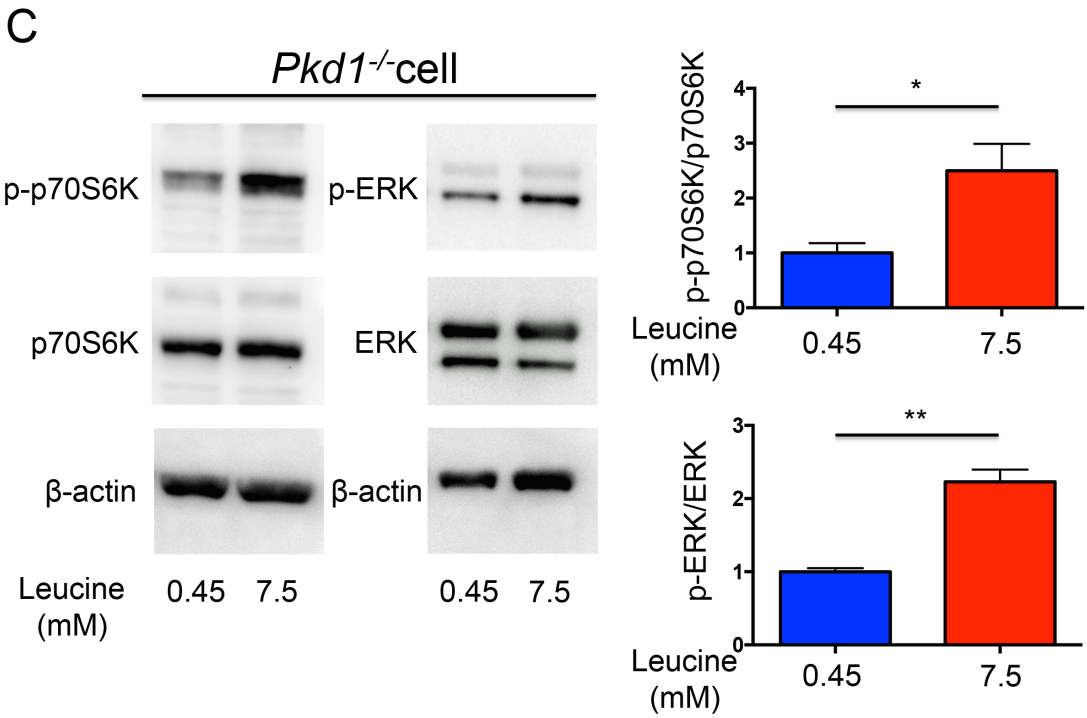

図 7C：72 時間培養後 *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞における細胞蛋白抽出液による p-p70S6K および p-ERK のウエスタンブロッティング

p-p70S6K および p-ERK の発現量は総蛋白である p70S6K および ERK で補正し,ロイシン 0.45 mM における平均値を 1 として他方を相対値で示した.

p-p70S6K/p70S6K および p-ERK/ERK はロイシン 0.45 mM で培養した細胞と比較してロイシン 7.5 mM にていずれも有意に高値であった.

平均値±標準誤差, N=3, **p*<0.05, ***p*<0.01.

3) 阻害薬による細胞増殖および細胞増殖シグナル経路の抑制

ADPKD の嚢胞形成に関与する ERK/MAPK 経路と mTOR 経路の阻害することにより，ロイシン添加により生じた細胞増殖や増殖シグナル経路の活性化が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 (図 8A).

次に *Pkd1*$^{-/-}$ 細胞において阻害薬使用下の Ki-67 染色で細胞増殖の抑制を確認した. 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, スライドを観察した. 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 (図 8B).

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. 100 mm の培養皿で subconfluent の状態まで培養した *Pkd1*$^{-/-}$ 細胞をアミノ酸不含有培養液にて 1 時間のアミノ酸枯渇処理を行った. その後, アミノ酸不含有培養液に各種阻害薬を添加し,さらに 1 時間細胞を前処置した. 最後にロイシン 7.5 mM となるようにロイシンを添加して, 30 分間処理した後に細胞を剥離回収し, 細胞蛋白抽出液を得た. 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. もう一方の MEK 阻害薬である PD98059 は p-ERK を抑制する傾向があったが統計学的有意差は認めなかった. 逆に, rapamycin は p-ERK を有意に活性化させた (図 8C).

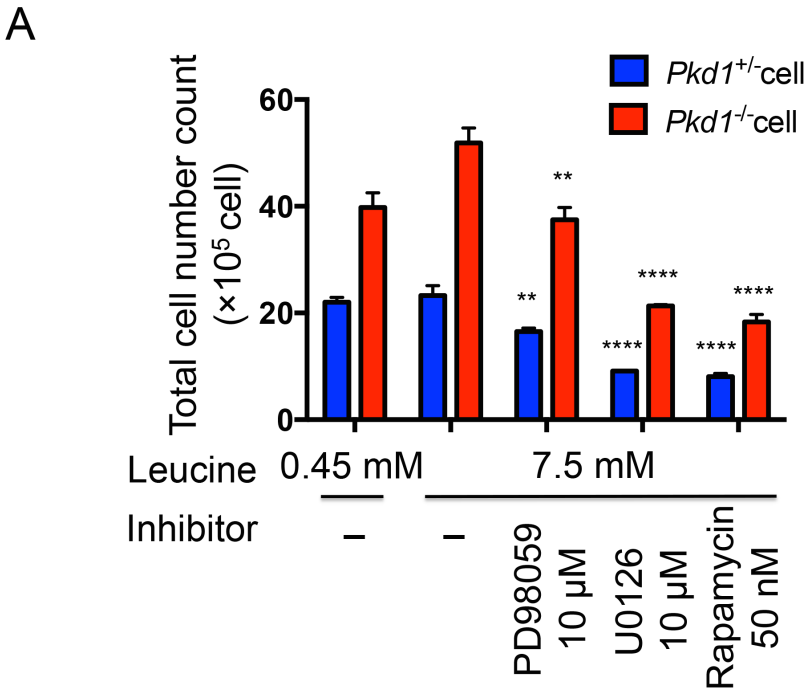

図 8A：mTOR 阻害薬および MEK 阻害薬による細胞増殖抑制効果

Pkd1$^{+/-}$および *Pkd1*$^{-/-}$細胞いずれにおいても，ロイシンと各種阻害薬の共培養群はロイシン単独培養群と比較して，72 時間培養後の総細胞数を有意に減少させた．

平均値±標準誤差，N=3，**p<0.01，****p<0.0001．

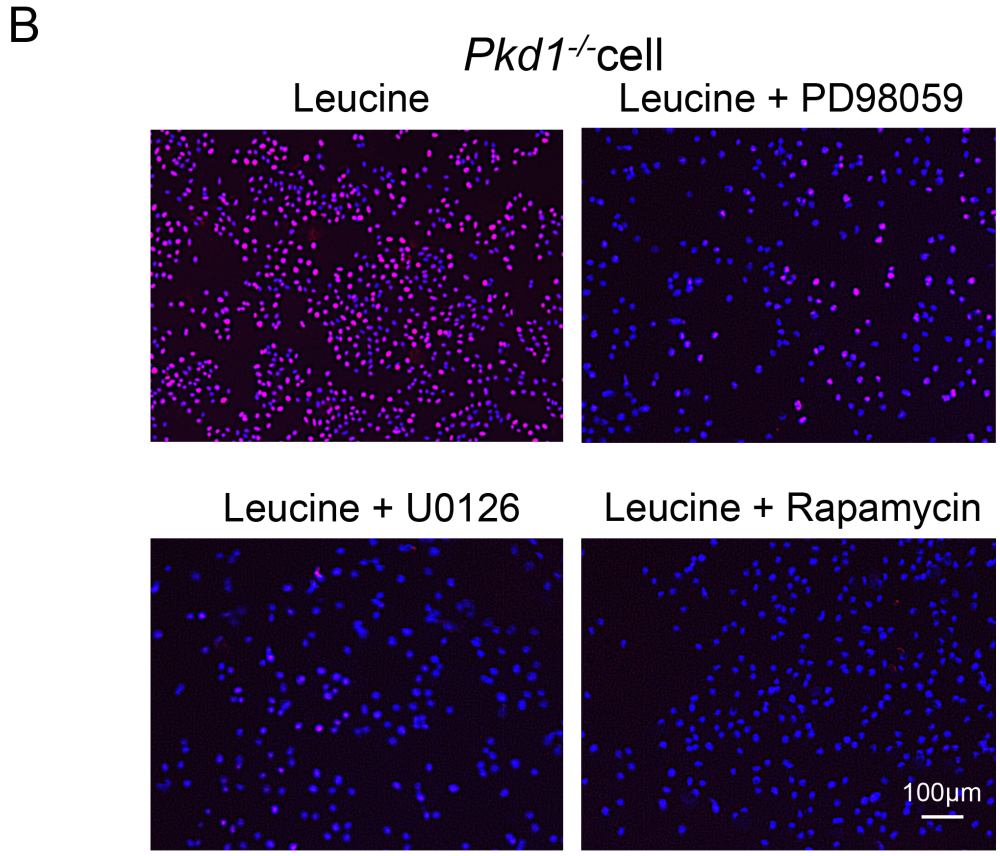

図 8B：mTOR 阻害薬および MEK 阻害薬による *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞の Ki-67 染色性の変化

Ki-67 陽性細胞 (赤色), DAPI (青).

いずれもロイシン濃度は7.5 mMに調整した. ロイシン 7.5 mMのみで培養した細胞と比較して, MEK 阻害薬あるいは rapamycin を添加した細胞では著しく Ki-67 陽性細胞が減少した.

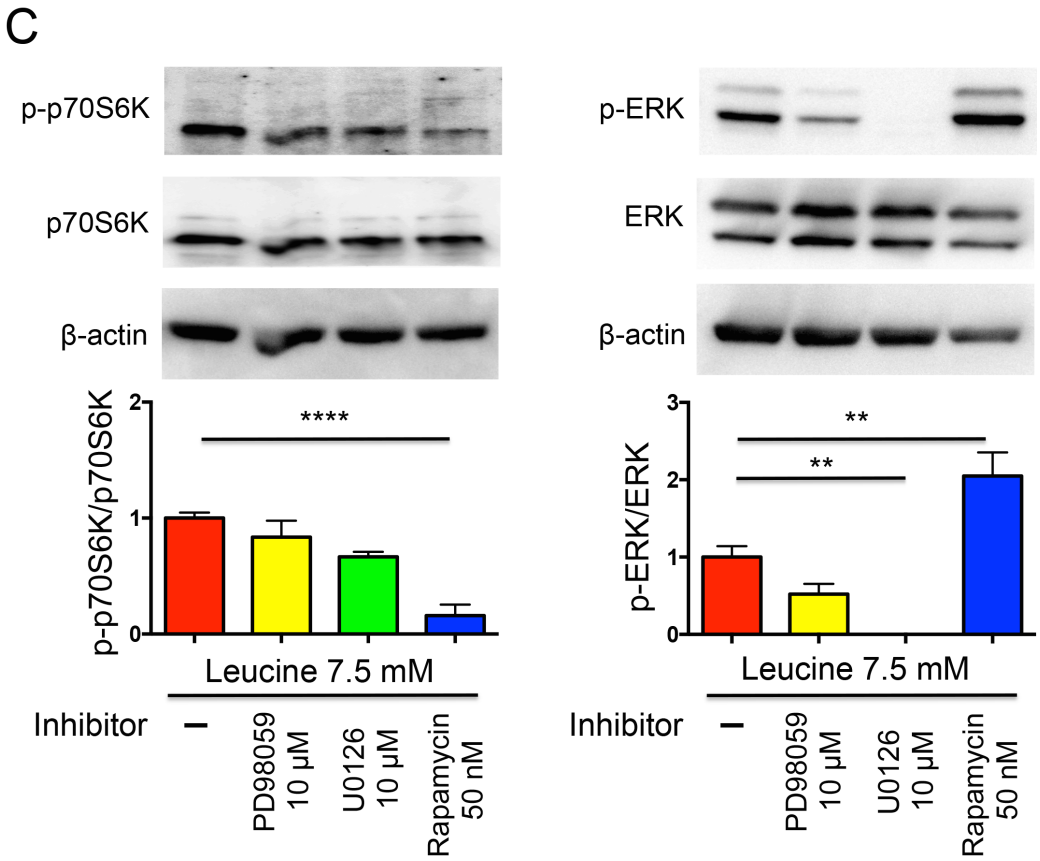

図 8C: アミノ酸枯渇処理後および阻害薬前処置を行った後にロイシン添加を行った *Pkd1*$^{-/-}$細胞蛋白抽出液による p-p70S6K および p-ERK のウエスタンブロッティング

p-p70S6K および p-ERK の発現量は総蛋白である p70S6K および ERK で補正し，ロイシン単独群における平均値を 1 として他を相対値で示した.

Pkd1$^{-/-}$細胞において U0126 は有意に p-ERK を抑制した. Rapamycin は有意に p-p70S6K を抑制し，逆に p-ERK を有意に活性化させた.

平均値±標準誤差, N=4, ***p*<0.01, *****p*<0.0001.

考察

本研究のマウス実験によりBCAA投与がADPKDにおいて腎臓および肝臓の嚢胞形成, 組織線維化を促すことが示唆された. 同時に, BCAA投与により嚢胞上皮細胞増殖の亢進と嚢胞上皮細胞におけるmTOR経路とERK/MAPK経路の活性化が確認された. mTOR経路とERK/MAPK経路はいずれもADPKDの嚢胞形成に深く関わる経路であり,[13,15] BCAA投与により嚢胞形成が促進されたのはこれらの経路の活性化によることが示された. また, 本研究の尿細管上皮細胞を用いた実験により, BCAAの成分であるロイシンが*Pkd1*$^{-/-}$細胞の増殖を促進し, mTOR経路およびERK/MAPK経路を活性化していた. この結果はBCAAがマウス実験で嚢胞形成を促進している結果を裏付けるものである.

ロイシンがmTOR経路を活性化させることは明らかであるが, ロイシンがERK/MAPK経路を活性化させる因子であるかどうかは議論の余地がある. 肝星細胞や腸管上皮細胞を用いた実験にてロイシンがERKのリン酸化を亢進させた報告[41,43]はあるが, その詳細な機序は不明である. 1つの仮説としては生体内でロイシンがインスリン分泌を促進し,[31,35] Insulin receptor substrateを介してmTOR経路だけではなく, ERK/MAPK経路を活性化させるというものである.[44] しかし, この理論では膵β細胞の存在しないin vitro実験におけるロイシンのERK/MAPKの活性化を説明できないため, BCAAがERK/MAPK経路を調節する何らかの標的分子が存在すると考えられる.

ADPKDにおける嚢胞増大に伴い, 嚢胞による腎動脈の圧迫で腎血流が低下することで, 間質の炎症と線維化が起こるとされている. しかし, 近年ADPKDにおける間質線維化や腎障害が二次的に嚢胞増大に寄与する因子であることが報告されている.[45-49] BCAA投与マウスに生じた組織線維化は腎機能悪化や嚢胞増大の更なる増悪因子になった可能性がある.

BCAA投与による嚢胞上皮細胞増殖およびロイシンの投与による尿細管細胞増殖の亢進がKi-67染色により確認された. PCNA染色ではBCAA投与マウスの腎嚢胞上皮細胞のPCNA細胞陽性率がプラセボ群より高い傾向があったが, 有意差はなかった. 一般にKi-67はG_0期を除くすべての細胞周期に発現しているのに対して,[50] PCNAはG1期からS期にかけて発現しているという違いがある.[51] Ki-67とPCNAの染色性の違いは報告により異なるが, Ki-67に対してPCNAの半減期が長いことからPCNA陽性率の方が高くなることが多いとされる.[52] 今回の研究で, Ki-67染色の方が検出しやすかった理由としては, 蛍光抗体法と酵素抗体法による手法の違い, PCNA染色で核を対比染色しなかったことによる核の視認性の問題, PCNA染色手技自体による抗原の染色性の低下の問題が考えられる. また, ADPKDの病態には嚢胞上皮細胞のアポトーシ

スの亢進が関わっているとされるが,[53,54] 今回の実験では BCAA 投与による明らかなアポトーシスの変化は認められなかった. ADPKD モデルマウスにおいてアポトーシスの抑制が嚢胞形成を抑制したという報告もあるが,[55] BCAA 投与での嚢胞形成促進にはアポトーシスは関与していない可能性が示唆された.

本研究の問題点としては実験で使用した *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* (Cystic)マウスの表現型の個体差の問題がある. このモデルマウスの嚢胞形成の度合いは pI-pC による *Pkd1* 欠失の程度に左右される.[56] この個体差を最小限にするために, pI-pC の投与量, 投与時期, 投与手技を厳格に統一した. 一方で, このモデルマウスを採用することでの利点もある. *Pkd1* ホモ欠失マウスは胎生期あるいは新生児期に著明な嚢胞形成と続発する臓器不全のために早期に死亡するため, 十分な介入の評価が難しいことが多い.[57] しかし, *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* マウスは生後に *Pkd1* コンディショナルノックアウトすることでヒト ADPKD に類似した緩徐な嚢胞形成を示すため, 長期の薬剤投与の効果を検討するのに適している. 更に, *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* マウスは腎臓だけではなく肝臓にも嚢胞形成を示す点で, ヒト ADPKD に類似しており, 肝臓の表現型も評価可能である点で他のモデルより優れていると考えられる.

In vitro 実験において, mTOR 阻害薬である Rapamycin および MEK 阻害薬はロイシンにより誘導された尿細管細胞増殖を抑制することを証明した. この結果は, MEK 阻害薬および mTOR 阻害薬が ADPKD の治療薬としての有用性を示唆する. しかし, これまで MEK 阻害薬の ADPKD モデルマウスへ, および mTOR 阻害薬単独での ADPKD 患者への投与で十分な効果は認めていない.[26,27,39] mTOR の阻害は p70S6K から ERK/MAPK 経路の上流にある PI3K-Ras 経路へのネガティブフィードバックの解除により ERK/MAPK 経路の活性化につながるため,[58] mTOR 阻害薬単独の細胞増殖抑制効果は十分ではなく, mTOR 阻害薬と MEK 阻害薬の併用が ADPKD の嚢胞形成抑制に有効である可能性がある.

BCAA は非代償性肝硬変の低アルブミン血症改善[59]や血液透析患者の栄養状態改善のため[60]の治療薬として, あるいは他の必須アミノ酸やケト酸と共に CKD 患者に対する厳格な蛋白制限食療法の際に使用されている.[61] 本研究の結果より, ADPKD 患者における BCAA 使用の潜在的な有害性が示されたため, 今後 ADPKD 患者に対する BCAA の処方はメリットとデメリットを十分に考慮した上で行う必要があると考えられた.

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

緒言

ADPKD の治療はトルバプタンが臨床使用可能となるまでは, 有効な治療法がほとんどない状態であり, バゾプレシン分泌の抑制による嚢胞形成・増大の抑制を期待した積極的飲水の指導と共に降圧療法, 蛋白質制限食による食事療法が CKD 患者の治療に準じて行われてきた. しかし, 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[62]ADPKD 患者を含めた CKD 患者全体でも検討されてきたが,[63,64] 腎機能障害進行抑制効果については限定的あるいは否定的な報告が多く, 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.[65] 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,[66,67] 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.[68,69] 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り, ADPKD の予後改善のためにも ADPKD に対する蛋白質過剰摂取の影響を解明することは急務である.

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. In vivo 実験として第一章と同様に *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* マウスを用いて, マウス飼料の蛋白質量の多寡により高蛋白食群, 普通蛋白食群, 低蛋白食群の 3 群に割り付けを行った. 蛋白質の多寡がマウスの血圧変動に影響するかを調べるために, 血圧を一定期間毎に測定した. 一定期間飼育後に屠殺解剖し, 腎および肝の嚢胞形成と組織線維化, 腎機能および肝機能等の表現型を評価した. 加えて ADPKD の嚢胞増大, 組織線維化および高血圧発症の促進因子である RAS 活性 [70] を評価するため, 腎局所の RAS 活性を反映するとされる [71] 尿中 angiotensinogen (AGT)を測定した. また, 飼料組成の違いにより酸化ストレス・抗酸化力に違いが生じるかについても検討した.

実験方法

1) 薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウス

第一章と同様に *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* マウスに対して生後 14 日目より 10 μg/g (BW) の pI-pC を連続 6 日間腹腔内投与し, *Pkd1* を欠失させた. マウスの飼育環境は, 室温 25.0 ℃の空調のもと8 時から18 時までを明期とした明暗サイクルにて自由運動および飲料, 餌の自由摂取下で飼育した. 動物実験は北海道大学動物実験に関する規程に従って行った.

2) マウス飼料の蛋白質調整

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. 蛋白質調整飼料は日本クレア株式会社に依頼して特注飼料として精製した. 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 100 g 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.

3) マウス摂餌量の測定

飼育ゲージ毎に供給されているマウス飼料の質量を毎週計測し, 1 週間の質量減少分をゲージの飼育マウス数で除したものをマウス 1 匹あたりの週の摂餌量としてカウントした. なお, *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* (cystic)マウスと *Pkd1*$^{flox/flox}$ (non-cystic)マウスは飼育ゲージの区別をせずに育成した.

4) 血圧の測定

本実験では, マウス収縮期血圧を 10 週齢より 22 週齢まで 4 週毎に, マウス・ラット用自動血圧計 BP-98A (Softron, Tokyo, Japan)を用いて tail-cuff 法により測定した.

5) 尿中 AGT 排泄量測定

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. 尿中 AGT 排泄量 (ng/日)＝尿中 AGT 濃度 (ng/mL)×蓄尿量 (mL)で算出した.

6) マウス表現型の解析

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および肝臓の Cystic Index を評価した. Cystic Index は WinRooF (Mitani corporation)を用いて測定した.

7) 生化学検査, 酸化ストレス・抗酸化力測定

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.

8) 病理組織学的評価, 組織線維化評価

22 週齢の屠殺解剖の際に 4 % PFA にて還流固定を行い, 腎臓および肝臓を摘出した. パラフィン包埋切片を作成し, HE 染色および EM 染色を行った. 光学顕微鏡 (BZ 9000 :KEYENCE)にて病理組織標本を観察し, 組織像を撮影した. EM 染色にて腎臓および肝臓の線維化領域の面積を WinROOF (Mitani corporation)を用いて測定し, 嚢胞面積を除外した組織横断面面積に対する割合として表示した.

9) 統計学的解析

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

1) マウス摂餌量, 表現型, 生化学検査

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 (図 9). 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 (図 10A). Cystic マウスにおいて各群を代表する腎組織および肝組織の横断面像を下記に示す (図 10B). 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 %, $p<0.001$) (図 10C). 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 %, $p<0.05$) (図 10D). 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(図 10E), ALT は HPD 群が NPD 群と比較して有意に高値であった (図 10F). 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 (図 10G).

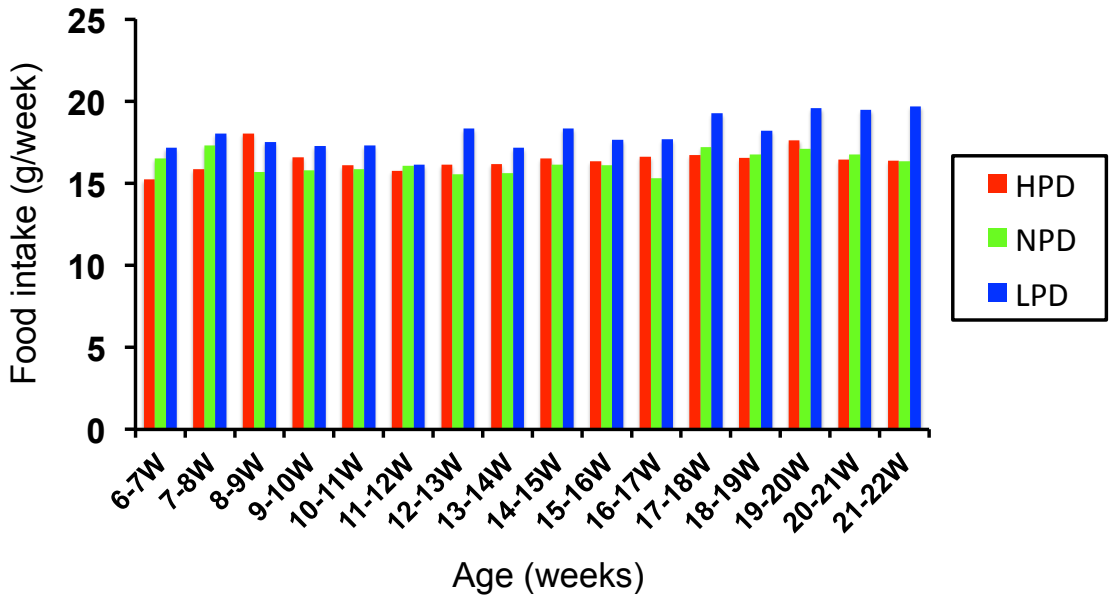

図 9：マウス摂餌量の推移

6 週齢以降の週あたりのマウス 1 匹の摂餌量の平均値を示す. N=7-9

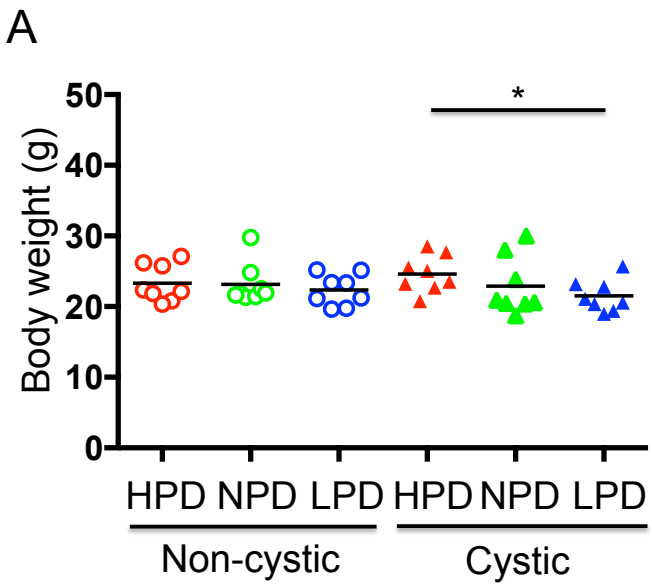

図 10A：22 週齢における各群のマウス体重

解剖屠殺直前にマウス体重を測定した. Cystic マウスの比較で HPD 群が LPD 群と比較して有意に体重が多かった. N=8, $p<0.05$.

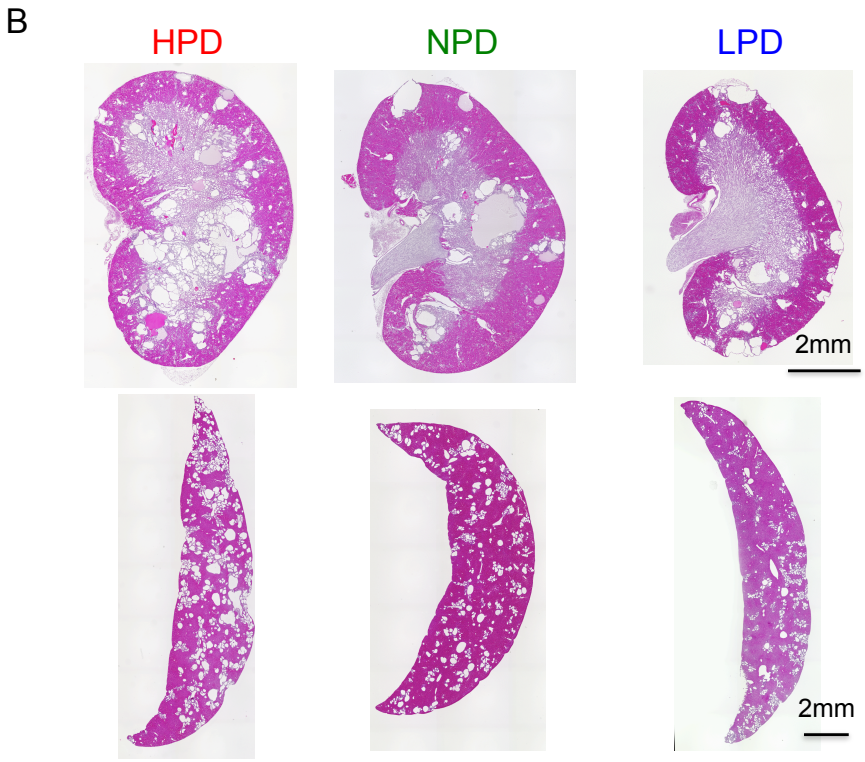

図 10B：Cystic マウスの腎臓(上段)および肝臓(下段)の HE 染色像

各群の代表的な組織横断面像を示す. Cystic マウスにおいて HPD 群は NPD 群および NPD 群と比較して腎臓・肝臓においてより多くの嚢胞形成を認める.

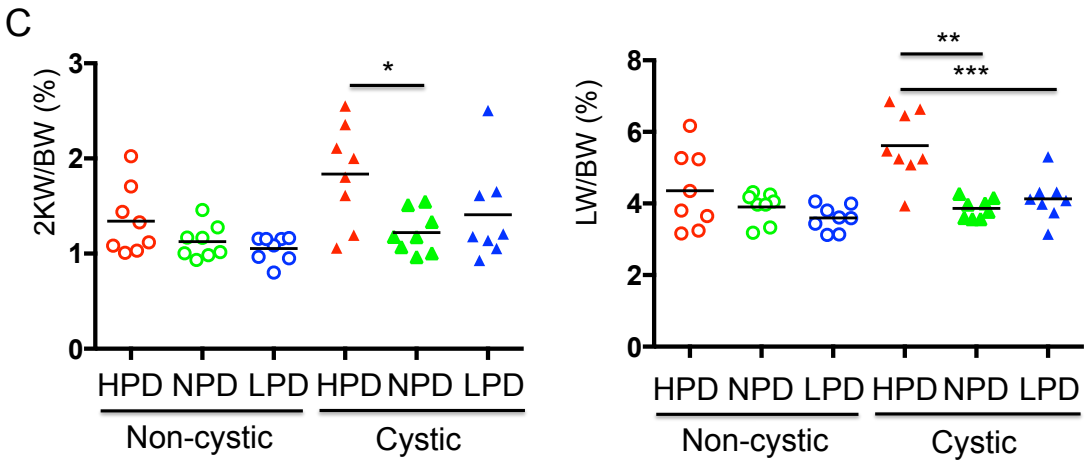

図 10C：マウス腎重量・体重比(2KW/BW), 肝重量・体重比(LW/BW)

腎重量・体重比は cystic マウス内で HPD 群が NPD 群と比較して有意に高値であった. 肝重量・体重比は cystic マウス内で HPD 群が NPD 群および LPD 群と比較して有意に高値であった. N=8, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

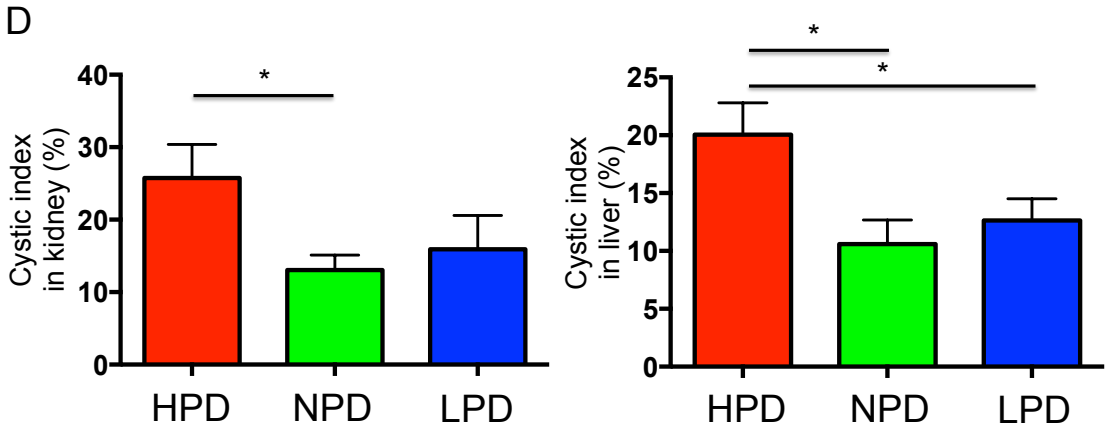

図 10D：Cystic マウスの腎 Cystic index と肝 Cystic index

腎 Cystic index は HPD 群が NPD 群と比較して有意に高値であった. 肝 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.

平均値±標準誤差, N=8, **p*<0.05.

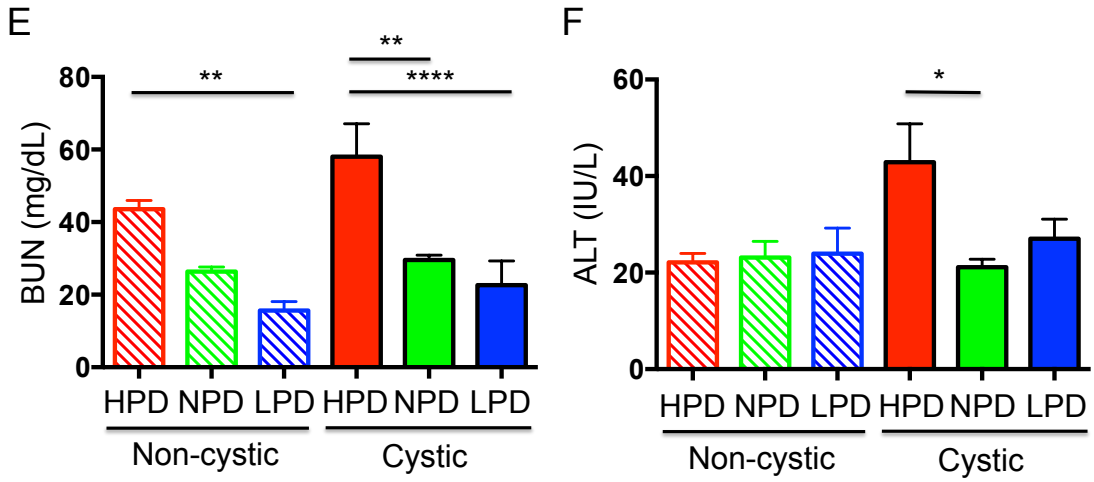

図 10E, 10F：22 週齢における各群のマウス BUN(図 10E)および ALT(図 10F)

BUN は cystic マウスの比較では HPD 群が NPD 群および LPD 群と比較して有意に高値であった. Non-cystic マウスの比較では, HPD 群が LPD 群に対して有意に高値であった. ALT は cystic マウスでは HPD 群が NPD 群に対して有意に高値であった.

平均値±標準誤差, N=8, **p*<0.05, ***p*<0.01, *****p*<0.0001.

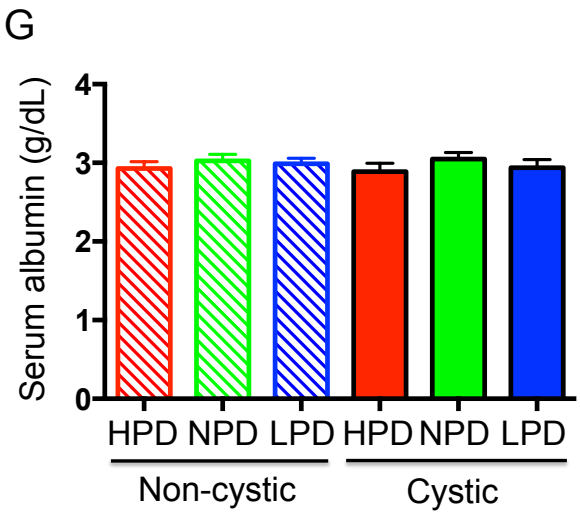

図 10G：22 週齢における各群のマウスの血清アルブミン

血清アルブミンの値に各群で有意差は見られなかった. 平均値±標準誤差, N=8.

2) マウス血圧の推移

10 週齢から 4 週毎に tail-cuff 法を用いて収縮期血圧を測定した. Non-cystic マウス間の比較では 14 週齢で HPD 群が LPD 群に対して有意に収縮期血圧が高値を示したが, 他の時期では差は認めなかった. Cystic マウス同士の比較では 14 週齢で HPD 群が NPD 群に対して, 22 週齢で HPD 群が他の群より有意に収縮期血圧が高値を示した (図 11).

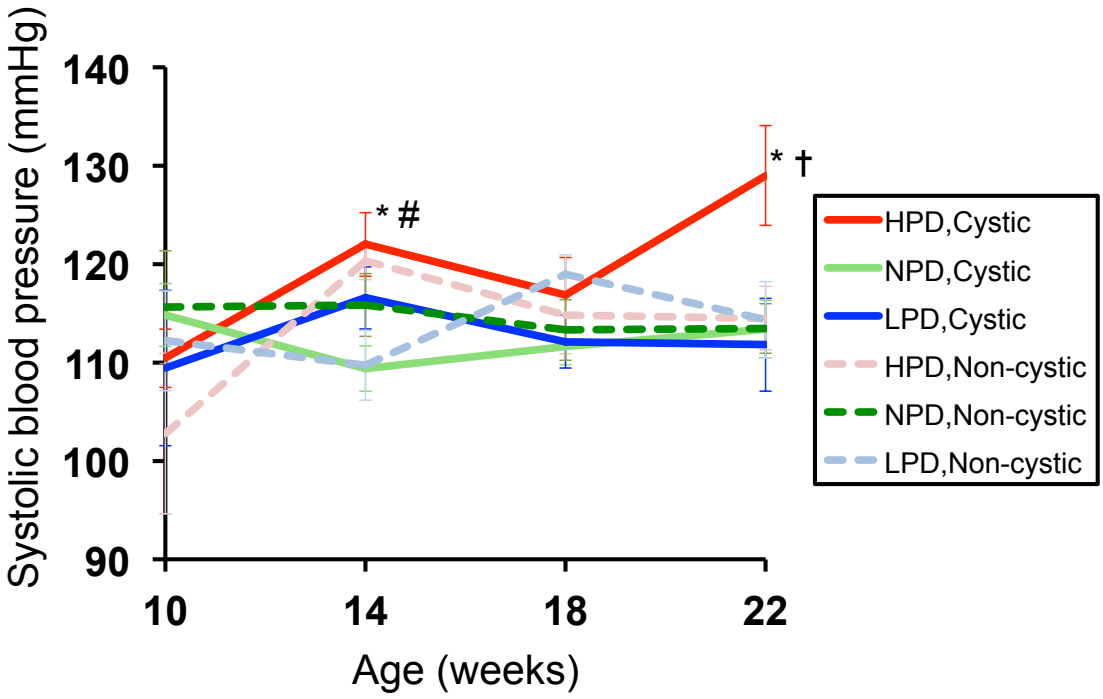

図 11：10 週齢以降の各群のマウスの収縮期血圧の推移

*は cystic マウス・HPD 群と cystic マウス・NPD 群の統計学的有意差を示す.
14 週では $p<0.001$, 22 週では $p<0.05$.

†は cystic マウス・HPD 群と cystic マウス・LPD 群の統計学的有意差を示す.
$p<0.05$.

＃は non-cystic マウス・HPD 群と non-cystic マウス・LPD 群の統計学的有意差を示す.
$p<0.05$. 平均値±標準誤差, N=4-8.

3)　腎臓および肝臓における組織線維化

組織線維化の評価のために cystic マウスの腎臓および肝臓に対して EM 染色を施行した (図 12A). 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 (図 12B).

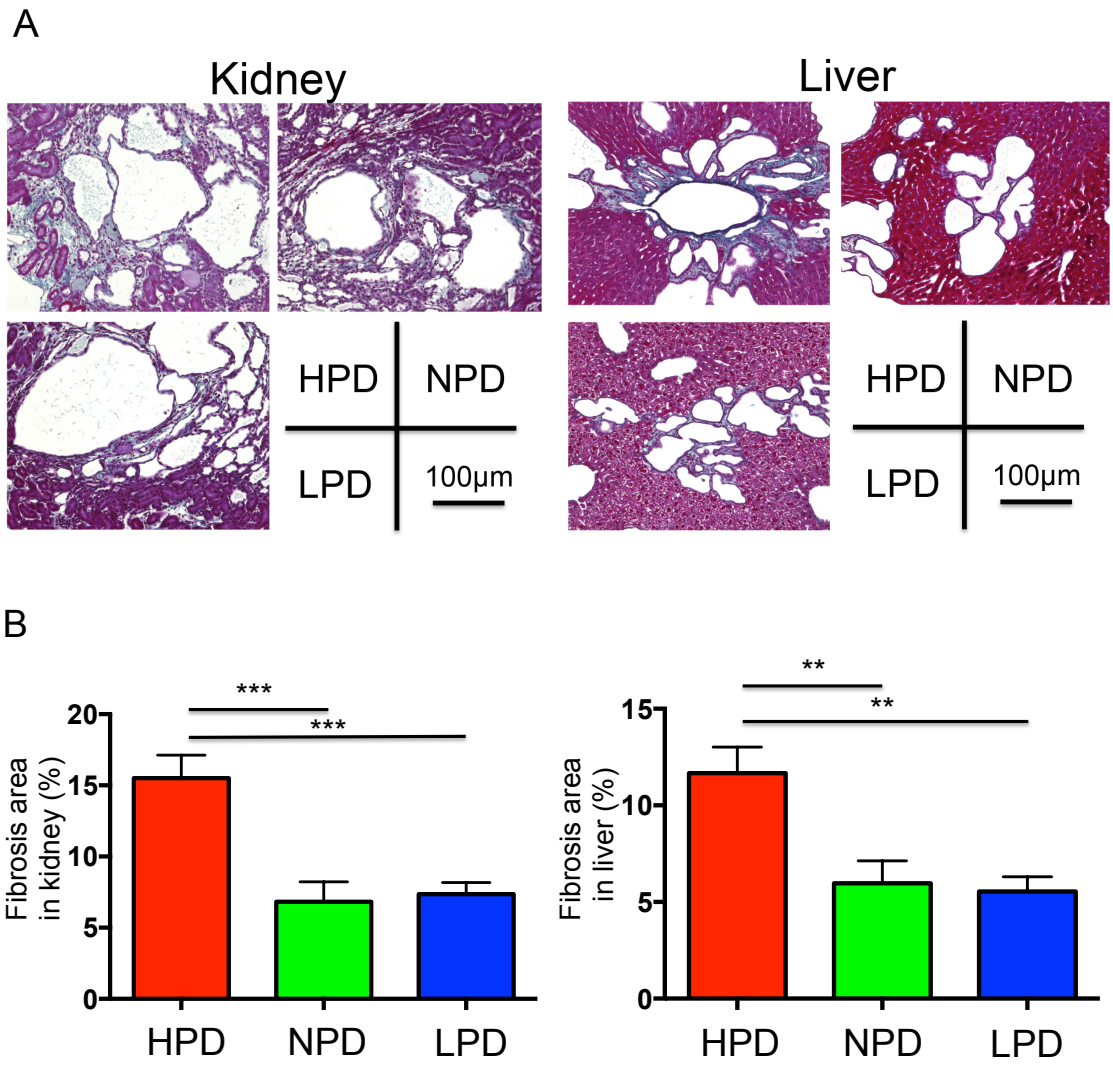

図 12：Cystic マウスの腎臓および肝臓の間質線維化の評価

(A)　Cystic マウスの腎臓および肝臓の EM 染色の代表的な組織像

青色に染色されている部分が線維化領域を示す.

(B)　嚢胞を除いた組織横断面面積における線維化領域の占める割合

腎臓および肝臓いずれにおいても HPD 群が他群と比較して有意な間質線維化の促進が認められた. 平均値±標準誤差, N=8, **p<0.01, ***p<0.001.

4) 尿中 AGT 定量

蛋白質の多寡が腎内 RAS 活性に与える影響を検討するために，22 週齢における尿中 AGT 排泄量を 24 時間蓄尿で計測した. Non-cystic マウス間では有意差は認めなかった. 一方, 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 (図 13).

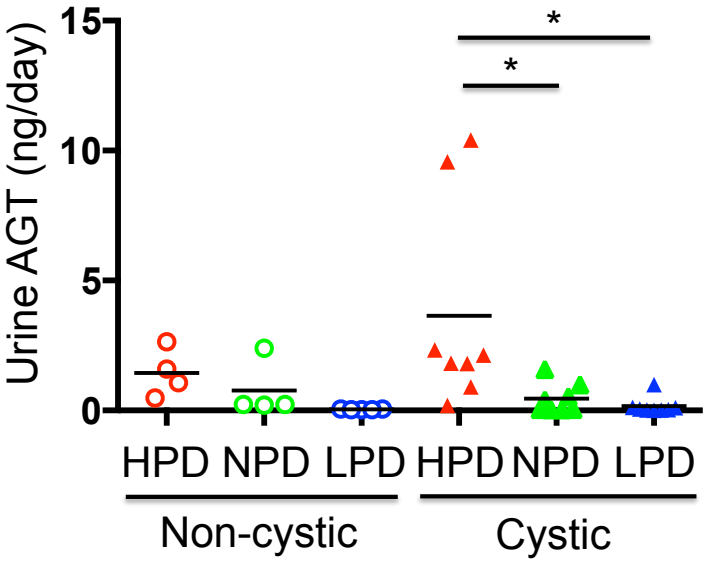

図 13：22 週齢における各群のマウスの 1 日尿中 AGT 排泄量

ELISA キットにて尿中 AGT 濃度を定量し，蓄尿量から 1 日量を計算した.
Non-cystic マウスの比較では有意差は認めない. Cystic マウスの比較では HPD 群が他の群より尿中 AGT 排泄量が有意に高値であった. N=4-8, *p<0.05.

5)　マウス血液の酸化ストレス・抗酸化力

マウス飼料に占める炭水化物および蛋白質の組成の違いによりマウスの酸化ストレス･抗酸化力に違いが生じるかについて, マウス血液検体を用いて検討した. 酸化ストレスは 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 (図 14A). 一方, 抗酸化ポテンシャルに関しては non-cystic マウスでは HPD 群が NPD 群に対して有意に高値を示したが, cystic マウスの比較では有意差を認めなかった (図 14B).

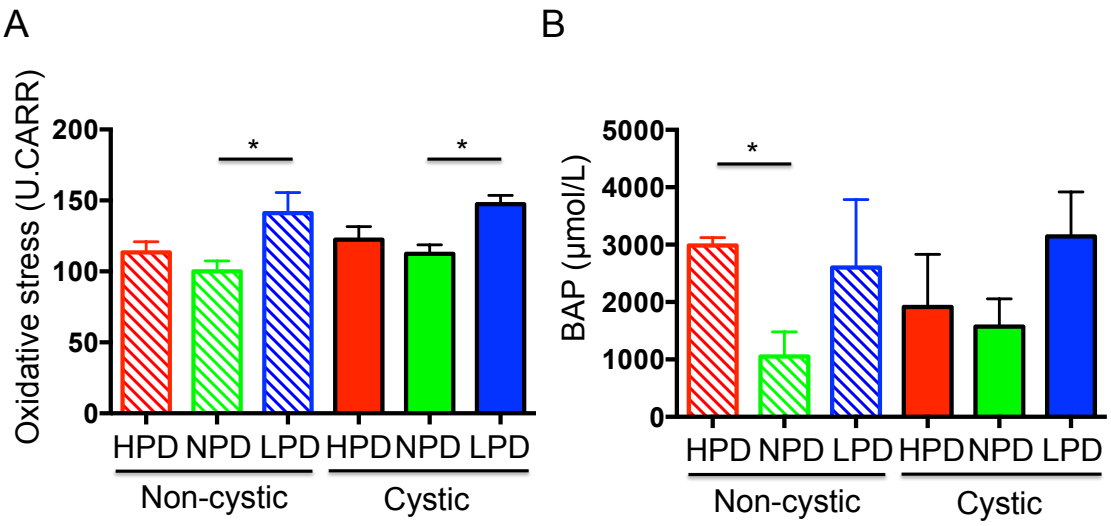

図 14：22 週齢における各群における酸化ストレスおよび抗酸化ポテンシャル
専用の機器により 22 週齢で採取したマウス血液検体を用いて測定した. 酸化ストレスは non-cystic マウスおよび cystic マウスいずれも LPD 群が NPD 群に対して有意に高値であった. 抗酸化ポテンシャル (BAP) は cystic マウスでは有意差は認めなかった.
平均値±標準誤差, N=3-5, *p<0.05.

考察

本研究の結果より，過剰な蛋白質摂取はADPKDにおいて腎臓および肝臓の嚢胞形成，組織線維化および臓器障害を促すことが示唆された．しかし，既報と異なり普通蛋白食に対する低蛋白食のADPKDモデルマウスにおける嚢胞増大抑制および腎機能障害抑制効果は認められなかった．

蛋白質負荷やアミノ酸負荷による腎臓の糸球体における過剰濾過 (hyperfiltration)[72,73] および尿細管糸球体フィードバック機構を介したRASの活性化[74]が報告されている．長期間の糸球体過剰濾過はADPKDだけではなくCKD全体として糸球体硬化の発症により腎不全の原因となる．ADPKDにおけるRASの活性化は高血圧発症や組織線維化だけではなく，嚢胞増大に寄与する重要な因子であることがわかっている.[70] 本実験ではcysticマウスにおいて HPD群が他の群に対して尿中AGT排泄量が多いという結果であり，蛋白質負荷による腎局所の RAS 亢進が示唆された．Cysticマウスにおいて HPD群が他群より高い収縮期血圧を示したことは，ADPKDの嚢胞形成増大および腎障害の進行の要素に加えて，蛋白質負荷によるRAS亢進が関与していた可能性がある．また，蛋白質負荷はその構成成分がアミノ酸であるため，アミノ酸負荷という側面もあり，第一章で述べたようなBCAAによる嚢胞形成促進という機序の関与も考えられる．

LPD 群が NPD 群と比較して嚢胞形成抑制や腎機能障害抑制効果を認めなかった理由としては，マウス飼料が自由摂取形式であり，実際 LPD 群の摂餌量は他群より多い傾向があったため，LPD 群における実質の蛋白制限が緩和されていたことが考えられる．また，LPDは蛋白質減少分の代わりに炭水化物が増えているため，糖質負荷が嚢胞増大や組織線維化に作用した可能性がある．*PKD1* 変異細胞におけるグルコース欠乏は細胞増殖を抑制し，ADPKDモデルマウスにおける2-deoxyglucoseによる解糖系の抑制は嚢胞形成を抑制するとの報告があり,[75] 糖質代謝と ADPKD の関連も示唆されている．また，LPD 群で他群より酸化ストレスが亢進していたことも糖質負荷の影響が考えられた．血糖変動が酸化ストレスを誘発することは糖尿病合併症の研究を中心に多く報告されている.[76] 酸化ストレスが ADPKD の病態悪化に関与していることは知られており,[77] LPD による酸化ストレス亢進が蛋白制限による効果を減弱していた可能性がある．

本研究の問題点としては，第一章同様に実験に使用した *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* マウスに生じる表現型の個体差の問題がある．この点に関しても第一章同様に pI-pC の投与手技の統一で対応した．しかし，BCAA 投与実験と同様に飼料組成の変化の影響を検討する上で，緩除な嚢胞形成を示すこのモデルマウスは適していると考えられた．ま

た, 本研究では主に表現型の評価にとどまり, ADPKD に特徴的な増殖シグナルの変化, 細胞増殖やアポトーシスの変化に関しては現時点では明らかにできておらず, また既報にもあるマウス生存期間への影響も検討できていない. これらの点に関しては今後詳細な検討を要する.

ADPKD 患者においてどのような食事療法が望ましいかは, 本研究のみで結論を出すのは難しいが, ADPKD における過剰蛋白摂取の有害性は示されたため, ADPKD 患者では CKD 早期の段階から過剰な蛋白摂取は避ける様に指導するべきと考えられた.

総括および結論

本研究全体から得られた新知見は以下の通りである.

- BCAA 投与は ADPKD モデルマウスの腎臓および肝臓の嚢胞形成を促進し, 腎臓と肝臓の組織線維化を悪化させる.
- BCAA 投与は ADPKD モデルマウスの腎臓および肝臓の嚢胞上皮細胞の細胞増殖を促進する.
- BCAA 投与は ADPKD モデルマウスの嚢胞上皮細胞において mTOR 経路と ERK/MAPK 経路を活性化させる.
- ロイシンは *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞の細胞増殖を促進させる.
- ロイシンは *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞において mTOR 経路と ERK/MAPK 経路を活性化させる.
- mTOR 阻害薬および MEK 阻害薬はロイシンで誘導された *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞の細胞増殖を抑制する.
- 過剰な蛋白質摂取は ADPKD モデルマウスの腎臓および肝臓の嚢胞形成を促進し, 腎臓と肝臓の組織線維化を悪化させる.
- 過剰な蛋白摂取は ADPKD モデルマウスの腎内 RAS 活性を亢進させる.
- 過剰な糖質負荷は ADPKD モデルマウスの酸化ストレスを亢進させる.

本研究は ADPKD と BCAA の関連について検討した初めての報告である. 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. BCAA は食事蛋白質に一定の割合で含まれていることより, 極度の BCAA 制限は実施困難かつ, BCAA の持つ本来の多面的な生理作用を阻害することで逆に健康を損なう懸念がある. しかし, 少なくとも ADPKD 患者においては今後過剰な BCAA を摂取しないように指導する必要があると考える. また, 本研究では ADPKD の嚢胞形成に関わる主要経路として mTOR および ERK/MAPK 経路に注目したが, BCAA により調節されうる他の経路の評価はできていない. BCAA が直接標的とする分子や BCAA による ERK/MAPK 経路活性化の機序は不明のままである他, in vitro においてロイシン以外の BCAA も同様に *Pkd1*$^{-/-}$尿細管細胞増殖作用を有するかは確認していないため, この点は今後更なる解明の余地があると考えられた. mTOR へのアミノ酸刺激伝達に関わる分子の 1 つとして vacuolar-type H^+-ATPase があり, Bafilomycin A1 等の特異的阻害薬の細胞増殖抑制効果が主に癌領域で報告されている. ADPKD において vacuolar-type H^+-ATPase 阻害薬がアミノ酸刺激の遮断あるいは他の経路の阻害を介して, 嚢胞形成抑制効果を示し新規治療薬となる可能

性があり，当実験室では vacuolar-type H^+-ATPase 阻害薬を用いた実験を既に開始しており今後の報告が待たれる.

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. 本研究ではマウス飼料の調整は蛋白質および炭水化物の増減で行ったが，脂質の割合はいずれの飼料でも一定であるため，今後高脂肪食が ADPKD に与える影響も併せて検討することで, ADPKD における望ましい栄養バランスに言及できる可能性がある. また，本研究では飼料の蛋白質源をミルクカゼインに統一したが，ホエイ蛋白や大豆蛋白など他の蛋白質源の場合でも，同様の結論を導けるかどうかも検討の余地がある. 問題点としては，本研究が蛋白質負荷によるマウス表現型への影響の解析に留まっており，今後は mTOR や ERK/MAPK 経路などの主要な嚢胞形成に関わる経路，細胞増殖シグナルやアポトーシスへの影響等を評価する必要がある.

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.

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂いた，北海道大学大学院医学研究科免疫・代謝内科学分野　渥美達也教授に深く感謝いたします. 本研究全般にわたり直接の御指導を頂いた同免疫・代謝内科学分野　西尾妙織診療准教授に心から感謝致します. また本研究において，アミノ酸およびプラセボ製剤を提供して下さった佐田通夫・久留米大学学長直属特命教授および尿細管細胞株を提供して下さったYale大学のStefan Somlo先生に心から感謝致します.

最後に，本研究を，陰になり日向になり支えてくれた，免疫・代謝内科学分野の全ての皆様に心よりお礼申し上げます.

引用文献

1 Torres, V. E., Harris, P. C. & Pirson, Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 369, 1287-1301 (2007).

2 Grantham, J. J. Clinical practice. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 359, 1477-1485 (2008).

3 Hughes, J. *et al.* The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat. Genet*. 10, 151-160 (1995).

4 The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* 77, 881-894 (1994).

5 Mochizuki, T. *et al.* PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272, 1339-1342 (1996).

6 Yoder, B. K., Hou, X. & Guay-Woodford, L. M. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2508-2516 (2002).

7 Nauli, S. M. *et al.* Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet*. 33, 129-137 (2003).

8 Qian, F. & Watnick, T. J. Somatic mutation as mechanism for cyst formation in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol. Genet. Metab.* 68, 237-242 (1999).

9 Nishio, S. *et al.* Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J. Clin. Invest.* 115, 910-918 (2005).

10 Hanaoka, K. & Guggino, W. B. cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 1179-1187 (2000).

11 Yamaguchi, T. *et al.* cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney Int.* 57, 1460-1471 (2000).

12 Yamaguchi, T. *et al.* Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. *Kidney Int.* 63, 1983-1994 (2003).

13 Nagao, S. *et al.* Renal activation of extracellular signal-regulated kinase in rats with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 63, 427-437 (2003).

14 Joly, D. *et al.* The polycystin 1-C-terminal fragment stimulates ERK-dependent spreading of renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 281, 26329-26339 (2006).

15 Shillingford, J. M. *et al.* The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its

inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 5466-5471 (2006).

16 Torres, V. E. *et al.* Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med*. 367, 2407-2418 (2012).

17 Fingar, D. C. & Blenis, J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151-3171 (2004).

18 Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484 (2006).

19 Qian, Q. *et al.* Sirolimus reduces polycystic liver volume in ADPKD patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 631-638 (2008).

20 Tao, Y., Kim, J., Schrier, R. W. & Edelstein, C. L. Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 46-51 (2005).

21 Wahl, P. R. *et al.* Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 598-604 (2006).

22 Wu, M. *et al.* Everolimus retards cyst growth and preserves kidney function in a rodent model for polycystic kidney disease. *Kidney Blood Press. Res.* 30, 253-259 (2007).

23 Zafar, I., Belibi, F. A., He, Z. & Edelstein, C. L. Long-term rapamycin therapy in the Han:SPRD rat model of polycystic kidney disease (PKD). *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 2349-2353 (2009).

24 Shillingford, J. M., Piontek, K. B., Germino, G. G. & Weimbs, T. Rapamycin ameliorates PKD resulting from conditional inactivation of Pkd1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 489-497 (2010).

25 Novalic, Z. *et al.* Dose-dependent effects of sirolimus on mTOR signaling and polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23, 842-853 (2012).

26 Serra, A. L. *et al.* Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 363, 820-829 (2010).

27 Walz, G. *et al.* Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 363, 830-840 (2010).

28 Torres, V. E. *et al.* Prospects for mTOR inhibitor use in patients with polycystic kidney disease and hamartomatous diseases. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 1312-1329 (2010).

29 Avruch, J. *et al.* Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E592-602 (2009).

30 Jewell, J. L., Russell, R. C. & Guan, K. L. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 133-139 (2013).

31 Lynch, C. J. *et al.* Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E503-513 (2002).

32 Crozier, S. J. *et al.* Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J. Nutr.* 135, 376-382 (2005).

33 D'Antona, G. *et al.* Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. *Cell metabolism* 12, 362-372 (2010).

34 Arakawa, M. *et al.* The effects of branched-chain amino acid granules on the accumulation of tissue triglycerides and uncoupling proteins in diet-induced obese mice. *Endocr. J.* 58, 161-170 (2011).

35 Tatpati, L. L. *et al.* The effect of branched chain amino acids on skeletal muscle mitochondrial function in young and elderly adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 894-902 (2010).

36 Sancak, Y. *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496-1501 (2008).

37 Zoncu, R. *et al.* mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* 334, 678-683 (2011).

38 Han, J. M. *et al.* Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* 149, 410-424 (2012).

39 Shibazaki, S. *et al.* Cyst formation and activation of the extracellular regulated kinase pathway after kidney specific inactivation of Pkd1. *Hum. mol. genet.* 17, 1505-1516 (2008).

40 Jat, P. S. *et al.* Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5096-5100 (1991).

41 Zhang, S. *et al.* Leucine stimulates ASCT2 amino acid transporter expression in porcine jejunal epithelial cell line (IPEC-J2) through PI3K/Akt/mTOR and ERK signaling pathways. *Amino Acids* 46, 2633-2642 (2014).

42 Nishikawa, T. *et al.* Stimulation by glutamine and proline of HGF production in hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 978-982 (2007).

43 Perez de Obanos, M. P. *et al.* Leucine stimulates procollagen alpha1(I) translation on hepatic stellate cells through ERK and PI3K/Akt/mTOR activation. *J. Cell. Physiol.* 209, 580-586 (2006).

44 Cheng, Z., Tseng, Y. & White, M. F. Insulin signaling meets mitochondria in

metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 589-598 (2010).

45 Karihaloo, A. *et al.* Macrophages promote cyst growth in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 1809-1814 (2011).

46 Swenson-Fields, K. I. *et al.* Macrophages promote polycystic kidney disease progression. *Kidney Int.* 83, 855-864 (2013).

47 Chen, L. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor promotes cyst growth in polycystic kidney disease. *J. Clin. Invest.* 125, 2399-2412 (2015).

48 Takakura, A. *et al.* Renal injury is a third hit promoting rapid development of adult polycystic kidney disease. *Hum. mol. genet.* 18, 2523-2531 (2009).

49 Leonhard, W. N. *et al.* Scattered Deletion of PKD1 in Kidneys Causes a Cystic Snowball Effect and Recapitulates Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 1322-1333 (2015).

50 Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311-322 (2000).

51 Bravo, R. & Macdonald-Bravo, H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J. Cell Biol.* 105, 1549-1554 (1987).

52 Kordek, R., Biernat, W., Alwasiak, J. & Liberski, P. P. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 immunopositivity in human astrocytic tumours. *Acta Neurochir. (Wien)* 138, 509-512; discussion 513 (1996).

53 Woo, D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N. Engl. J. Med*. 333, 18-25 (1995).

54 Lanoix, J., D'Agati, V., Szabolcs, M. & Trudel, M. Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Oncogene* 13, 1153-1160 (1996).

55 Tao, Y. *et al.* Caspase inhibition reduces tubular apoptosis and proliferation and slows disease progression in polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 6954-6959 (2005).

56 Leuenroth, S. J. *et al.* Triptolide reduces cyst formation in a neonatal to adult transition Pkd1 model of ADPKD. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25, 2187-2194 (2010).

57 Takakura, A., Contrino, L., Beck, A. W. & Zhou, J. Pkd1 inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 2351-2363 (2008).

58 Carracedo, A. *et al.* Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* 118, 3065-3074 (2008).

59 Marchesini, G. *et al.* Nutritional supplementation with branched-chain amino acids in advanced cirrhosis: a double-blind, randomized trial. *Gastroenterology* 124, 1792-1801 (2003).

60 Hiroshige, K. *et al.* Oral supplementation of branched-chain amino acid improves nutritional status in elderly patients on chronic haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 16, 1856-1862 (2001).

61 Cano, N. J., Fouque, D. & Leverve, X. M. Application of branched-chain amino acids in human pathological states: renal failure. *J. Nutr.* 136, 299S-307S (2006).

62 Klahr, S. *et al.* Dietary protein restriction, blood pressure control, and the progression of polycystic kidney disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 2037-2047 (1995).

63 Levey, A. S. *et al.* Effect of dietary protein restriction on the progression of kidney disease: long-term follow-up of the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study. *Am. J. Kidney Dis.* 48, 879-888 (2006).

64 Kasiske, B. L., Lakatua, J. D., Ma, J. Z. & Louis, T. A. A meta-analysis of the effects of dietary protein restriction on the rate of decline in renal function. *Am. J. Kidney Dis.* 31, 954-961 (1998).

65 Fouque, D. & Laville, M. Low protein diets for chronic kidney disease in non diabetic adults. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001892 (2009).

66 Tomobe, K. *et al.* Early dietary protein restriction slows disease progression and lengthens survival in mice with polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 1355-1360 (1994).

67 Ogborn, M. R. & Sareen, S. Amelioration of polycystic kidney disease by modification of dietary protein intake in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 1649-1654 (1995).

68 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 3, 1-150 (2013).

69 日本腎臓学会. 慢性腎臓病に対する食事療法基準 2014 年版. *日腎会誌* 56, 553-599 (2014).

70 Schrier, R. W. Renal volume, renin-angiotensin-aldosterone system, hypertension, and left ventricular hypertrophy in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1888-1893 (2009).

71 Kobori, H., Nishiyama, A., Harrison-Bernard, L. M. & Navar, L. G. Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension. *Hypertension* 41, 42-49 (2003).

72 Thomson, S. C., Vallon, V. & Blantz, R. C. Kidney function in early diabetes: the

tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F8-15 (2004).

73 Juraschek, S. P., Appel, L. J., Anderson, C. A. & Miller, E. R., 3rd. Effect of a high-protein diet on kidney function in healthy adults: results from the OmniHeart trial. *Am. J. Kidney Dis.* 61, 547-554 (2013).

74 Fernandez-Repollet, E., Tapia, E. & Martinez-Maldonado, M. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on altered renal hemodynamics induced by low protein diet in the rat. *J. Clin. Invest.* 80, 1045-1049 (1987).

75 Rowe, I. *et al.* Defective glucose metabolism in polycystic kidney disease identifies a new therapeutic strategy. *Nat. Med.* 19, 488-493 (2013).

76 Giacco, F. & Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 107, 1058-1070 (2010).

77 Maser, R. L., Vassmer, D., Magenheimer, B. S. & Calvet, J. P. Oxidant stress and reduced antioxidant enzyme protection in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 991-999 (2002).