HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	V-ATPase阻害薬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)	牧田, 実
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：2320 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12579号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66132
Type	doctoral thesis
File Information	Minoru_Makita_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　（　要　約　）

V-ATPase 阻害薬が
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 V-ATPase inhibitor on cyst development of autosomal dominant polycystic kidney disease)

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

牧　田　実

学　位　論　文　（　要　約　）

V-ATPase 阻害薬が
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 V-ATPase inhibitor on cyst development of autosomal dominant polycystic kidney disease)

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

牧　田　実

目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・　1頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5頁

実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　6頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　17頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　21頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　23頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　24頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　25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.

Minoru Makita, Junya Yamamoto, Tasuku Nakagaki, Yasunobu Ishikawa, Saori Nishio and Tatsuya Atsumi.
V-ATPase inhibitor reduces the progression of cyst enlargement in Autosomal dominant polycystic kidney disease model mice.
J. Am. Soc. Nephrol. , submitted (2016)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 牧田実, 西尾妙織, 柴崎跡也, 渥美達也
   V-ATPase 阻害薬は多発性嚢胞腎の嚢胞形成を抑制する
   第 58 回日本腎臓学会学術総会,2015 年 6 月 7 日・名古屋市

2. 牧田実, 西尾妙織, 柴崎跡也, 渥美達也
   V-ATPase 阻害薬は多発性嚢胞腎の嚢胞形成を抑制する
   第 59 回日本腎臓学会学術総会,2016 年 6 月 19 日・横浜市

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．頻度は約1000~2000人に1人であり，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]

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[2]と第4染色体長腕に存在する *PKD2* 遺伝子[3]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,[4] 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.[5] 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.[6,7]

細胞内カルシウム濃度の低下は，cyclic adenosine monophosphate (cAMP)の増加[8-10]と，その下流に位置する extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK)経路,[10,11] mammalian target of rapamycin (mTOR)経路[12]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．また，嚢胞形成にかかわる因子として，Wnt シグナルの存在も報告されている.[13-15] Wnt シグナルのひとつである β カテニン経路は細胞の増殖や分化に関わり，Wnt 受容体やGSK3β を介して細胞内の β カテニンが蓄積し，核内に移行することによってCyclin D1 などの転写因子が働き，遺伝子発現や細胞の増殖や分化が促進する.[16] 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.[17-19] 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，[20] 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患者に適用できる治療ではなく，より効果的で副作用の少ない新たな治療薬の開発が必要となっている.

近年 Wnt 受容体が，細胞膜上でプロレニン受容体(ATP6AP2)を介して，Vacuolar adenosine triphosphatase(V-ATPase)と共存していることが明らかになった.[21] V-ATPase は全ての真核細胞のリソソームなどの内胞系に存在するほか，破骨細胞や尿細管上皮細胞の細胞膜にも存在する. V-ATPaseは，プロトン(H^+)ポンプとしてリソソーム分解に関与するほか，尿細管や膀胱において尿を酸性化し，また癌細胞において癌細胞の増殖や転移において重要な働きをする. 実際，V-ATPase は癌領域において様々な報告がされており，Wntシグナルやmtor経路，細胞死にも関連している.[22] 実際種々の腫瘍に対して V-ATPase 阻害薬により V-ATPase を抑制したところ，腫瘍増殖抑制効果を認めた報告が散見されている.[23-30]

しかし，V-ATPaseがADPKDにどのように関わっているか報告はない. 本研究では，ADPKDモデルマウスにおいて，V-ATPaseを阻害することが嚢胞形成や病態にどのような影響を与えるか解析した.

まずV-ATPase阻害薬であるBafilomycin A1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する実験を行い(実験①)，Bafilomycin A1がマウス表現型及び細胞増殖シグナルに与える影響を解析した. 表現型の解析を行ったところ，対照群に比較して腎嚢胞形成を抑制している傾向があり、肝嚢胞形成を有意に抑制していた。しかしながら Bafilomycin A1 の毒性が強く，投与方法や投与量を変更したが，継続投与は不可能であった. 実験①の結果からは Bafilomycin A1 の有用性が一部で認められるものの，その効果を最大限に生かす条件設定を検討する必要があった.

次に V-ATPase 阻害薬の有用性を確認するため，嚢胞が早期に増大する *Pkd1*・*Ksp-cre* マウスを用いてBafilomycin A1の効果を検討した(実験②). 表現型の解析を行ったところ，対照群に比較して、腎嚢胞形成の抑制を認めた. シグナル経路の解析を行ったところ，β-Catenin 経路の抑制を認めた. すなわち実験②によりADPKDにおけるV-ATPase阻害薬の有用性が示唆された.

さらにマウス由来 *Pkd1* ホモ欠失尿細管上皮細胞株に対してBafilomycin A1を添加することにより生じる細胞増殖や増殖シグナルの変化を解析した(実験③). Bafilomycin A1により *Pkd1* ホモ欠失細胞の増殖は抑制され，細胞内シグナルの解

析では β-Catenin 経路の抑制を認めた. 本研究は実験②の結果と相反しない結果であり, β-Catenin 経路の抑制に伴い細胞増殖が抑制されることを確認できた.

以上 3 つの結果は,ADPKD において V-ATPase が嚢胞形成の病態に関わっていることを示唆し,V-ATPase 阻害薬は ADPKD の治療に有用であることを示す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
BAF	Bafilomycin A1
BUN	Blood urea nitrogen
BW	Body weight
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CKD	Chronic kidney disease
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK/MAPK	Extracellular signal-regulated kinase/ mitogen-activated protein kinase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSK3β	Glydcogen synthase kinase 3 beta
HE	Hematoxylin-Eosin
LW/BW	Liver weight/ body weight ratio
mTOR	Mammalian target of rapamycin
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PFA	Paraformaldehyde
pI-pC	Polyinosinic-polycytidylic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris-buffered saline
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
V-ATPase	Vacuolar adenosine triphosphatase
WST-8	Water Soluble Tetrazolium - 8
2KW/BW	Bilateral kidney weight/ body weight ratio

実験方法

I *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 らが樹立した *Pkd1*$^{flox/flox}$ マウスと *Mx1-Cre* マウス (The Jackson Laboratory, Maine, USA)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．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 7 日目または 14 日目より 10μg/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，餌の自由摂取下または自由母乳摂取下で飼育した．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) 腎限局型 *Pkd1* コンディクショナルノックアウトマウス

同様に *Pkd1*$^{flox/+}$*: Ksp-Cre* を交配し作成した *Pkd1*$^{flox/flox}$*: Ksp-Cre* マウスを使用した．このマウスは集合管から遠位尿細管の上皮細胞にかけて，腎限局的に *Pkd1* が欠失するマウスである(Cre-loxP 部位特異的組み替え)．Cre は胎生 11.5 日目より発現するため，他モデルに比べ早期に *Pkd1* がノックアウトされ，生後 14~17 日

目に死亡するモデルである．コントロールとしては，表現型が野生型である *Pkd1*$^{flox/+}$: *Ksp-Cre* マウスを用いた．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自由母乳摂取下で飼育した．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．

3) Bafilomycin A1 および Vehicle の投与

3-1. Bafilomycin A1 溶液及び Vehicle 溶液の作成

Bafilomycin A1 (LC Laboratories, Massachusetts, USA)は dimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて 10mg/ml になるよう溶解し，-20℃で凍結保存した．

浸透圧ポンプを用いた持続皮下投与においては，使用する分を直前に解凍し，DMSO でさらに希釈し，ポンプを埋め込む際のマウスの体重に合わせて Bafilomycin A1 として目的の投与量となるようそれぞれ濃度を調整した．Vehicle には DMSO を用いた．

また間欠的皮下投与においては，使用する分を直前に解凍し，生理食塩水でさらに希釈し，0.1mg/ml になるよう調整した．皮下投与及び腹腔内投与の Vehicle として，DMSO:生理食塩水が 1:99 となるよう溶液を作成した．

3-2. *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* マウスに対する持続的皮下投与(実験①A)

実験①A では，持続的皮下投与を目的として，ALZET Osmotic Pumps (Pump model 2006) (Alzet, California, USA) (以下，浸透圧ポンプ)を使用した．浸透圧ポンプに調整した Bafilomycin A1 溶液または Vehicle 溶液を浸透圧ポンプに充填した．その後ネンブタール腹腔内注射による麻酔下で，マウスの背中の創部を剃毛，皮切を行い，皮下腔内に浸透圧ポンプを埋め込み，創部縫合を行った．

生後 14 日目から 6 日間 pI-pC を投与したマウスに，生後 10 週目に 1 回目の浸透

圧ポンプを埋め込み，生後 16 週目に 2 回目の埋め込みを追加して行った．投与量は Bafilomycin A1 として体重 1g あたり 1.0，0.7，0.5，0.3，0.1μg/day とした．生後 22 週目に屠殺解剖し，解析を行った．

3-3. *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* マウスに対する間欠的皮下投与(実験①B)

実験①B では生後 7 日目から 6 日間 pI-pC を投与したマウスに，Bafilomycin A1 及び Vehicle を生後 14 日目から 35 日目まで，1 日 1 回，1 回 20μl/g(BW)(=Bafilomycin A1 として体重 1g あたり 2.0μg)を，背中に皮下注射した．最終注射の 2 時間後に生後 35 日目に屠殺解剖し，解析を行った．

3-4. *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Ksp-Cre* マウスに対する間欠的皮下投与(実験②A，B)

実験②A では Bafilomycin A1 及び Vehicle を生後 2 日目から 10 日目まで，1 日 1 回，1 回 10μl/g(BW) (=Bafilomycin A1 として体重 1g あたり 1.0μg)を，背中に皮下注射した．最終注射の 2 時間後に屠殺解剖し，解析を行った．

実験②B では生存日数を評価するため，生後 2 日目から死亡確認日の前日まで，実験①A と同様に皮下注射投与を行った．

4) 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, Tokyo, Japan)を用いて測定した．

5) 生化学検査

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)及び血清クレアチニン(Serum creatinine)を測定した．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, Tokyo, Japan).

6) 病理組織学的評価

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)染色を行った．光学顕微鏡 (BZ 9000 :KEYENCE, Osaka, Japan)にて病理組織標本を観察し，組織像を撮影した.

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 1%ウシ血清アルブミンで 60 分ブロッキングを行った後に，抗 β-Catenin 抗体 (Sigma-Aldrich)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, California, USA)にて暗所室温 60 分処理

した．核を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)(Invitrogen, California, USA)で15分処理した後，Fluoromount (Diagnostic BioSystems, USA) を用いて封入した.

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, Nagoya, Japan)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, Indiana, USA)および脱リン酸化酵素阻害薬 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)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 ℃，15,000 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, California, USA)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, 85 ℃・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, California, USA)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, Pennsylvania, USA)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, California, USA)にて発光させ, ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare, Tokyo, Japan)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, 抗リン酸化 GSK3 β抗体, 抗 GSK3α β抗体 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA), 抗 β-Catenin 抗体, 抗 ATP6AP2 抗体 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan), 抗 Cyclin D1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA), 抗 GAPDH 抗体(Abcam, Tokyo, Japan)を使用した.

9-3. 蛋白発現量の定量

可視化した蛋白のバンドの濃度は ImageJ software (NIH, Maryland, USA)を使用して半定量化し, GAPDH のバンド濃度で補正した.

10) 統計学的解析

群間比較にはMann-Whitney U test, 生存率の比較にはLog-rank testにて解析を行った. 解析にはJMP Pro version 12 for Windowsを用い, p値が0.05未満をもって有意とした.

Ⅱ *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 Somlo 教授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, Massachusetts, USA）[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．細胞は Dulbecco 改変イーグル培地/F-12（Gibco, California, USA）に 3 % ウシ胎児血清（Biosera, Missouri, USA），2 nM トリヨードサイロニン（Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan），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, California, USA），10 U/mL マウスインターフェロン-γ，5 mL/L ペニシリン-ストレプトマイシンおよび 50 U/mL ナイスタチン懸濁液（Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan）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，2 回以上継代した上で使用した．

2) 培養細胞数の計測と WST-8 assay（実験③）

実験③では 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, Schaffhausen, Switzerland）に播種した．37 ℃，5 % CO_2 で 48 時間培養後に，細胞数カウントに進む場合は 0.25 %トリプシン（Gibco, California, USA）で剥離し，細胞蛋白抽出の場合はセルリフター（TPP, Schaffhausen, Switzerland）で剥離回

収した．回収した総細胞数は Cellometor Auto (Nexcelom Bioscience, Massachusetts, USA)で自動計測し，細胞増殖能の指標とした．

Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いて Water Soluble Tetrazolium (WST)-8 assay による細胞増殖を検討した．1well あたり 1×10^4 個/100µl(培養液)となるよう 96 well plate(Falcon, New York, USA)に播種した．37 ℃，5 % CO_2 で 24 時間培養後に，CCK-8 溶液を 10µl ずつ添加し，37 ℃，5 % CO_2 で 1 時間呈色反応後に，マイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度を測定した．

3) 蛍光免疫細胞染色

6.5×10^3 個の細胞を 1.7 mL の培養液で懸濁し，4 ウエルのチャンバースライド(BD Biosciences, California, USA)に播種した．37 ℃，5 % CO_2 で 48 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，terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)染色を MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit II を用いて行った．封入する前に核を DAPI で染色した．

4) Bafilomycin A1 の添加

Bafilomycin A1 は dimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて 10mg/ml になるよう溶解し，-20℃で凍結保存した．使用直前に必要分を解凍し，DMSO で任意の濃度になるようにそれぞれ希釈し，培養液 10ml あたりそれぞれ 6.23μl ずつ添加して使用した．Vehicle は DMSO とした．

5) ウエスタンブロット法による細胞タンパク発現の解析

5-1.　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および脱リン酸化酵素阻害薬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 ℃, 15,000 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.

5-2.　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 にて発光させ, ImageQuant LAS4000 を使用しバンドを可視化した. なお, 一次抗体として抗β-Catenin 抗体, 抗 Cyclin D1 抗体, 抗 GAPDH 抗体を使用した.

5-3. 蛋白発現量の定量

可視化した蛋白のバンドの濃度は ImageJ software を使用して半定量化し，GAPDH のバンド濃度で補正した.

6) 統計学的解析

Mann-Whitney U test にて群間比較を行った. 解析には JMP Pro version 12 for Windows を用い，p 値が 0.05 未満をもって有意とした.

結果

Ⅰ 実験①: *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* マウスへの Bafilomycin A1 の投与

1) 実験①A: 浸透圧ポンプを用いた Bafilomycin A1 の持続皮下投与

生後 14 日目から 6 日間 pI-pC を投与した *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* (Cystic)マウスに, Bafilomycin A1 として体重 1g あたり 0.3μg/day を, 10 週目から 22 週目まで浸透圧ポンプにより持続皮下投与した. 表現型の解析(体重, 腎重量体重比, 肝重量体重比, 腎と肝の Cystic index, BUN, 血清 Creatinine)では, Bafilomycin 群(n=3)と Vehicle 群(n=4)の間で有意な差を認めなかった.

2) 実験①B: Bafilomycin A1 の間欠的皮下投与

生後 7 日目から 6 日間 pI-pC を投与した *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Mx1-Cre* (Cystic)マウスに, Bafilomycin A1 として体重 1g あたり 2.0μg/day を, 1 日 1 回, 14 日目から 35 日目まで背中に皮下注射投与した. Bafilomycin A1 投与群(n=9)と Vehicle 投与群(n=11)の表現型を解析した. 体重, 腎重量体重比, 腎の Cystic Index, 肝重量体重比は有意差を認めなかったが, 肝の Cystic Index は Bafilomycin A1 群で有意に低下していた.

Ⅱ 実験②: *Pkd1*$^{flox/flox}$: *Ksp-Cre* マウスへの Bafilomycin A1 の投与

1) 実験②A: 表現型, 腎機能

Pkd1$^{flox/flox}$: *Ksp-Cre* (Cystic)マウス及び *Pkd1*$^{flox/+}$: *Ksp-Cre* (Non-cystic)マウスに対し, Bafilomycin A1 として体重 1g あたり 1.0μg/day を, 1 日 1 回, 生後 2 日目から 10 日目まで背中に皮下注射投与した. Bafilomycin A1 投与群と Vehicle 投与群の表現型を解析した(各 n=10). 体重は各群の間で差は認めなかった. 腎重量体重比は Cystic マウスにおいて, コントロールである Non-cystic マウスより有意に増加していた. Cystic マウス同士の比較では Bafilomycin A1 投与群の方が Vehicle 投与群より有意に腎重量体重比, 腎の Cystic index が低下していた. 腎機能を表す BUN, Creatinine は Non-cystic マウスに比べ Cystic マウスで高値であったが, Cystic マウス同士及び Non-cystic マウス同士の比較では Bafilomycin A1 投与による差を認めなかった.

2) 実験②A: ATP6AP2 の抑制

Bafilomycin A1 が V-ATPase を抑制していることを確認するため, V-ATPase の付属蛋白である ATP6AP2 蛋白の発現を, Cystic マウスの腎臓を用いて免疫染色あるいはウエスタンブロッティング法で評価した(各 n=4). ウエスタンブロッティング法において標的蛋白の発現を GAPDH の発現量で補正したところ, ATP6AP2/GAPDH は Non-cystic マウスに比べ Cystic マウスで有意に高値であり, Cystic マウス群同士で比べると Bafilomycin A1 投与群で低値であった.

3) 実験②A: 嚢胞上皮細胞における細胞増殖とアポトーシス

次に Cystic マウスの腎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. 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 陽性率は Bafilomycin A1 投与群で有意に低下していた. TUNEL 陽性率は両群間に有意差を認めなかった.

4) 実験②A: 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 経路の寄与を検討するため活性型であるリン酸化 mTOR (p-mTOR)蛋白を, ERK/MAPK 経路の寄与を検討するためリン酸化 ERK (p-ERK)蛋白を, それぞれウエスタンブロッティング法で評価した.

p-ERK/GAPDH は Non-cystic マウスに比べ Cystic マウスで有意に高値であったが, Cystic マウス群同士で比べると Vehicle 投与群と Bafilomycin A1 投与群間で有意差を認めなかった. p-mTOR/GAPDH は, 各群間で有意差を認めなかった.

5) 実験②A: β-Catenin 経路の解析

ADPKD の嚢胞増大, 細胞増殖に関わる経路として β-Catenin 経路の寄与を検討するため, Cystic マウスにおいて, β-Catenin の免疫染色を行った. また β-Catenin 経路の蛋白であるリン酸化 GSK3β 蛋白, β-Catenin 蛋白及び Cyclin D1 を, ウエスタンブロッティング法で評価した.

β-Catenin/GAPDH, p-GSK3β/GAPDH 及び Cyclin D1/GAPDH は Non-cystic マウスに比べ Cystic マウスで有意に高値であった. Cystic マウス群同士で比べると Bafilomycin A1 投与群で低値であった.

6) 実験②B: 生存日数の解析

Bafilomycin A1 が生存率に与える影響を検討するため, Cystic マウスに対して生後生 2 日目から死亡確認前日まで Bafilomycin A1 の皮下注を行った. 生存日数に有意差を認めなかった.

Ⅲ 実験③：*Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞株へのBafilomycin A1の投与

1）実験③：Bafilomycin A1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，DMSOを添加した培養液またはBafilomycin A1を添加した培養液にて，培養皿上で48時間培養後に，細胞を剥離回収し総細胞数を計測した．*Pkd1*$^{+/-}$及び *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞共に，Bafilomycin A1濃度依存的に細胞数の減少を認めた．*Pkd1*$^{+/-}$細胞は5nMより濃い濃度で，*Pkd1*$^{-/-}$細胞は2nMより濃い濃度で有意に細胞増殖の抑制を認めた．

細胞増殖能を検討するため，*Pkd1*$^{-/-}$細胞及び *Pkd1*$^{+/-}$に対してWST-8 assayを行った．*Pkd1*$^{+/-}$細胞に比べ *Pkd1*$^{-/-}$細胞で有意に吸光度の増加を認めた．*Pkd1*$^{+/-}$細胞と *Pkd1*$^{-/-}$細胞共にBafilomycin A1濃度依存性に吸光度の減少を認めた．*Pkd1*$^{+/-}$細胞では培養液のBafilomycin A1濃度が5nMより高濃度で培養した群で，*Pkd1*$^{-/-}$細胞では培養液のBafilomycin A1濃度が2nMより高濃度で培養した群で，有意に吸光度の減少を認めた．

2）実験③：Bafilomycin A1添加による細胞内β-Catenin経路の変化

β-Catenin経路の関与を確認するため，3×10^5個の *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞を，DMSOを添加した培養液またはBafilomycin A1を添加した培養液にて，培養皿上で48時間培養後に，細胞を剥離回収し，細胞抽出蛋白を用いてウエスタンブロッティング法で評価した(各n=4)．

標的蛋白の発現をGAPDHの発現量で補正したところ，β-Catenin/GAPDH，Cyclin D1/GAPDHはともにBafilomycin A1投与群で抑制されていた．

考察

本研究の結果より，Bafilomycin A1 は *Pkd1*$^{flox/flox}$*:Ksp-Cre* mice において，腎嚢胞形成抑制効果を持つことが明らかにされた．嚢胞形成に関わる因子として，尿細管上皮細胞の増殖,[31] アポトーシス [32] などが報告されているため，増殖能の評価として PCNA 染色を，アポトーシスの評価として TUNEL 染色を行った．尿細管上皮細胞において，PCNA 陽性細胞の数が，Bafilomycin A1 により減少していることから，増殖が抑えられたため，嚢胞形成を抑制したと考えた．また，観察されたアポトーシスは変化なく，嚢胞形成の抑制とアポトーシスとの関連は見出せなかった．

次に，増殖が抑制されていることから，現在嚢胞形成に重要であると報告のある増殖シグナルの解析として，MAPK[10,11]，mTOR 経路 [12] の解析を行ったが，Bafilomycin A1 投与群とコントロール群有意な差は認めなかった．ATP6AP2 は V-ATPase の V0 ドメインに付随する分子量 8-9 kDa の蛋白である．Bafilomycin A1 により，ATP6AP2 が抑制されていることが確認されたことから，*in vivo* において Bafilomycin A1 は投与量として十分であったと考えられた．ATP6AP2 と共存する Wnt 受容体から派生する Wnt シグナルの一つである β-Catenin 経路が抑制されていることから，Bafilomycin A1 は β-Catenin 経路の抑制が嚢胞形成を抑制したと考えた．

V-ATPase は癌領域において様々な報告がされており，Wnt シグナル，mTOR 経路などに関与している他，アポトーシスや癌の浸潤・転移にも関連している．[22] V-ATPase inhibitor には多くの薬剤があり，Bafilomycin A1 は古典的な V-ATPase の一つである．[33] V-ATPase は様々な種類があり，ユビキタスに存在するものや，特定のサブユニットを持つ，細胞特異的なものがある．[34,35] Bafilomycin A1 は V-ATPase の V0 subunit c を阻害すると言われている．[33] V0 subunit c はユビキタスに存在するものを含めほぼ全ての種類の V-ATPase の構成蛋白であるため，Bafilomycin A1 は多くの臓器で様々な効果を持つ．Bafilomycin A1 は種々の癌において抗癌剤作用を持つことが報告されており,[23-30] これは β-Catenin 経路を抑制することによる癌抑制効果とされている．[36,37] これらの報告は本研究の結果と矛盾しないものと考えられる．

実験②A において，Bafilomycin A1 の投与により MAPK の発現に有意差を認めなかったが，この結果により多発性嚢胞腎の嚢胞抑制効果は MAPK シグナルを介して

いない可能性が示唆された．V-ATPase と mTOR 経路の発現やアポトーシスの関連は複数の報告がされている．[22,38]　我々の結果においては Bafilomycin A1 により mTOR 経路やアポトーシスに有意差を認めなかった．*Pkd1*$^{flox/flox}$: *Ksp-Cre* マウスは，嚢胞が早期に増悪し，生後 2 週前後で死に至る，非常に進行が速いモデルマウスである．mTOR に関しては Cystic マウスと Non-cystic マウス間で mTOR 発現量の変化を認めず，*Pkd1*$^{flox/flox}$: *Ksp-Cre* マウスの生後 10 日目時点では mTOR 経路が嚢胞形成に寄与していないと考えられた．また，Shibazaki らの報告によると，このモデルマウスは嚢胞上皮細胞の増殖は非常にさかんであるものの，アポトーシスはごく少数しか認められていない事も報告されており，[39] 嚢胞抑制にアポトーシスの変化は関与しなかったと考えられた．

浸透圧ポンプを用いた実験①A では，嚢胞形成に差を認めなかった．嚢胞形成に差を認めなかった原因として，薬剤量が十分に投与されなかった可能性を考えた．追加予備実験で薬剤量を増量したが，解析時期より前に浸透圧ポンプが脱落することが多く，浸透圧ポンプによる Bafilomycin A1 の持続皮下投与は，困難であると判断した．

実験①B では Bafilomycin A1 の間欠的皮下投与を行い，肝嚢胞形成の抑制を認めた．肝臓においても嚢胞形成にβ-Catenin 経路の関与が指摘されており，Bafilomycin A1 のβ-Catenin 抑制作用の結果，肝嚢胞形成抑制を認めた可能性がある．腎臓においては，腎嚢胞形成に有意差はなく，腎嚢胞抑制に有効な用量の Bafilomycin A1 でなかった可能性も考えられた．Bafilomycin A1 の有効な投与量を可能とできるような，腎臓および肝臓特異的な V-ATPase の開発が望まれる．

実験③では Bafilomycin A1 の濃度依存的な細胞増殖抑制作用及びβ-Catenin 経路の抑制作用を認めた．これは *Pkd1*$^{flox/flox}$*:Ksp-Cre* mice における Bafilomycin A1 の腎嚢胞形成抑制作用が，β-Catenin 抑制によるものという結果を支持するものと考えられた．

Pkd1$^{flox/flox}$*:Mx1-Cre* mice への Bafilomycin A1 投与の結果でも示されたが，Bafilomycin A1 には毒性が強い薬剤であることが報告されている．[33] そのため，Bafilomycin A1 自体は，動物実験で頻繁に用いられてはいるが，人体への投与の報告はない．しかし，V-ATPase 阻害薬には様々な種類があり，特異的な V-ATPase のサブユニットを阻害する，組織・細胞特異的な V-ATPase 阻害薬も存在する [40-42]．今後それらを用いた検討を行うことで，V-ATPase 阻害薬は ADPKD の治療薬となりうる可能性がある．

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.

- Bafilomycin A1 投与は ADPKD モデルマウスの腎臓および肝臓の嚢胞形成を抑制する.
- Bafilomycin A1 投与は ADPKD モデルマウスの腎臓の嚢胞上皮細胞の細胞増殖を抑制する.
- Bafilomycin A1 投与は ADPKD モデルマウスの腎臓において β-Catenin 経路を抑制させる.
- Bafilomycin A1 は *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞の細胞増殖を促進させる.
- Bafilomycin A1 は *Pkd1*$^{-/-}$尿細管上皮細胞において β-Catenin 経路を抑制させる.

本研究は ADPKD と V-ATPase の関連について検討した初めての報告である. 本研究の結果より, V-ATPase 阻害薬が ADPKD に有益であることが示唆されたが, 毒性という点から, 臓器特異的な V-ATPase 阻害薬または毒性の弱い V-ATPase 阻害薬の検討が今後必要であると考える. この点は今後更なる解明の余地があると考えられた. また, Bafilomycin A1 はオートファジー阻害薬としてもよく知られている. オートファジーが ADPKD にどのように関わっているかは全く不明であり[43], 本研究を発展させることにより ADPKD の新たな病態を解明することにつながる可能性があると考えられる.

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，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. Consortium, T. E. P. K. D. 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, 991-994 (1994).
3. Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos S. L., Veldhuisen, B., Saris, J. J., Reynolds, D. M., Cai, Y., Gabow, P. A., Pierides A, Kimberling, W. J., Breuning M. J., Deltas, C. C., Peters, D. J. M. & Somlo, S. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272, 1339-1342 (1996).
4. Yoder, B. K. 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).
5. Nauli, S. M. Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A. E. H., Lu, W., Brown, E. M., Quinn, S. J., Ingber D. E. & Zhou, J. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* 33, 129-137 (2003).
6. 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).
7. Nishio, S., Hatano, M., Nagata, M., Horie, S., Koike, T., Tokuhisa, T., & Mochizuki, T. Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J. Clin. Invest.* 115, 910-918 (2005).
8. 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).

9. Yamaguchi, T., Pelling, J. C., Ramaswamy N. T., Eppler, J. W., Wallace, D. P., Nagao, S., L.
Rome, L. A., Sullivan, L.P. & Grantham, J. J. 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).
10. Yamaguchi, T., Nagao, S., Wallace, D.P., Belibi, F. A., Cowley, B. D., Pelliing, J. C. & Grantham,
J.J. Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. *Kidney Int.* 63, 1983-1994 (2003).
11. Nagao, S., Yamaguchi, T., Kusaka, M., Master, R. L., Takahashi, H, Cowley, B. D. & Grantham,
J. J. Renal activation of extracellular signal-regulated kinase in rats with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 63, 427-437 (2003).
12. Shillingford, J. M., Murcia, N. S., Larson, C. H., Low S. H., Hedgepeth, R., Brown, N., Flask, M.
C. A., Novick, A. C., Goldfarb, D., Kramer-Zucker, A., Walz, G., Piontek, K. B., Germino, G. G. & Weimbs. T., The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 5466-5471 (2006).
13. Benzing, T., Simons, M. & Walz, G. Wnt signaling in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc.*
Nephrol. ：18, 1389-1398 (2007).
14. Hermle, T., Petzoldt, A. G. & Simons, M. The role of proton transporters in epithelial Wnt
signaling pathways. *Pediatr Nephrol* 26, 1523-1527 (2011).
15. Wuebken, A. & Schmidt-Ott, K. M. WNT/beta-catenin signaling in polycystic kidney disease.
Kidney Int 80, 135-138 (2011).
16. 山本英樹. Wnt の脂質修飾を標的にしたがん創薬. *Lipid* 25, 384-390 (2014).
17. Bastos, A. P. & Onuchic, L. F. Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Braz J Med Biol Res* 44, 606-617 (2011).
18. Qin, S., Taglienti, M., Cai, L., Zhou, J. & Kreidberg, J. A. c-Met and NF-kappaB-dependent overexpression of Wnt7a and -7b and Pax2 promotes cystogenesis in polycystic kidney

disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23, 1309-1318 (2012).

19. Chang, M. Y. & Ong, A. C. New treatments for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol* 76, 524-535 (2013).

20. Torres, V. E. , *Chapman, A.B., Devuyst, O., Gansevoort, R. T., Grantham, J. J., Higashihara, E.,*

Perrone, R. D., Krasa, H. B., Ouyang, M, S, J. & *Czerwiec, F. S.* Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 2407-2418 (2012).

21. Nguyen, G. Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clin. Sci.* 120, 169-178 (2011).

22. Stransky, L., Cotter, K. & Forgac, M. The Function of V-ATPases in Cancer. *Physiol. Rev.* 96,

1071-1091 (2016).

23. Lim, J. H., *Park, J. W., Kim, M. S., Park, S. K., Johnson, R.S.* & *Chun Y. S.* Bafilomycin induces

the p21-mediated growth inhibition of cancer cells under hypoxic conditions by expressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol. Pharmacol.* 70, 1856-1865 (2006).

24. Wiedmann, R. M., Schwarzenberg, K. V., Palamidessi, A., Schreiner, L., Kubisch, R., Liebl, J.,

Schempp, C., Trauner, D., Vereb, G., Zahler, S., Wagner, E., Muller R., Scita, G & Vollmar, A.

M. The V-ATPase-inhibitor archazolid abrogates tumor metastasis via inhibition of endocytic activation of the Rho-GTPase Rac1. *Cancer Res.* 72, 5976-5987 (2012).

25. Hernandez-Breijo, B., Monserrat, J., Román I. D., González-Rodríguez, Á., Fernández-Moreno

M. D., Lobo, M. V. T., Valverde, Á. M., Gisbert, J. P. & Guijarr, L. G. Azathioprine desensitizes

liver cancer cells to insulin-like growth factor 1 and causes apoptosis when it is combined with bafilomycin A1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 568-578 (2013).

26. Zhang, Q., Huanga, N., Dengc, W. Q. & Zou K. The H+/K+-ATPase inhibitory activities of Trametenolic acid B from Trametes lactinea (Berk.) Pat, and its effects on gastric cancer cells.

Fitoterapia 89, 210-217 (2013).

27. Ohba, K., Suzuki, T., Nishiyama, H., Kaneko, K., Hirose, T., Totsune, T, Sasano, H. & Takabhashi,

K. Expression of (pro)renin receptor in breast cancers and its effect on cancer cell proliferation.

Biomedical Res. 36, 117-126 (2014).

28. Schwarzenberg, V. K., Lajtos, T., Simon, L., Mullur, R., Vereb, G., Vollmar, A. M., V-ATPase

inhibition overcomes trastuzumab resistance in breast cancer. *Mol. Oncol.* 8, 9-19 (2014).

29. Ohta, T., Arakawa, H., Futagami, F., Fushida, S, Kitagawa, H, Kayahara, M, Nagakawa, T., Miwa,

K., Kurashima, K., Numata, M., Kitamura, Y., Terada, T. & Ohkuma, S., Bafilomycin A1 induces

apoptosis in the human pancreatic cancer cell line CAPAN-1. *J. Pathol.* 185, 324-330 (1998).

30. Torigoe, T., Izumi, H., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Murakami, T., Ise, T., Yoshida, Y., Tanabe,

M., Nomoto, M., Itoh, H., & Kohno, K. Enhanced expression of the human vacuolar H+-ATPase c subunit gene (ATP6L) in response to anticancer agents. *J. Boi. Chem.* 277, 36534-36543 (2002).

31. Harris, P. C. & Torres, V. E. Genetic mechanisms and signaling pathways in autosomal dominant

polycystic kidney disease. *J. Clin. Invest.* 124, 2315-2324 (2014).

32. Goilav, B. Apoptosis in polycystic kidney disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 1272-1280

(2011).

33. Huss, M. & Wieczorek, H. Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *J. Exp. Biol.* 212, 341-

346 (2009).

34. Jouret, F., Auzanneau, C., Debaix, H., Wada,G. H. S., Pretto, C., Marbaix, E., Karet, F. E.,

Courtoy, P. J. & Devuyst, O. Ubiquitous and kidney-specific subunits of vacuolar H+-ATPase are

differentially expressed during nephrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol. : JASN* 16, 3235-3246 (2005).

35. Toei, M., Saum, R. & Forgac, M. Regulation and isoform function of the V-ATPases.

Biochemistry 49, 4715-4723 (2010).

36. George, A., Leahy, H., Zhou, J. & Morin, P. J. The vacuolar-ATPase inhibitor bafilomycin and mutant VPS35 inhibit canonical Wnt signaling. *Neurobiol. Dis.* 26, 125-133 (2007).

37. Han, J., Sridevi, P., Ramirez, M., Ludwig, K. J. & Wang, J. Y. beta-Catenin-dependent lysosomal targeting of internalized tumor necrosis factor-alpha suppresses caspase-8 activation in apoptosis-resistant colon cancer cells. *Mol. Biol. cell* 24, 465-473 (2013).

38. Yuan, N., Song, L, Zhang, S., Lin, W., Cao, Y., Xu, F., Fang, Y., Wang, Z., Zhang, H., Li, X., Wang, Z,. Cai, J., Wang, J., Zhang, Y., Mao, X., Zhao, W., Hu, S., Chen, S., & Wang, J. Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100, 345-356 (2015).

39. Shibazaki, S., Yu, Z., Nishio, S., Tian, X., Thomson, R. B. Mitobe, M. Louvi, A. Velazquez, H., Ishibe, S., Cantley, L. G., Igarashi, P. & Somlo. S. Cyst formation and activation of the extracellular regulated kinase pathway after kidney specific inactivation of Pkd1. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1505-1516 (2008).

40. Yoshimoto, Y. Induction of EGF-Dependent Apoptosis by Vacuolar-Type H+-ATPase Inhibitors in A431 Cells Overexpressing the EGF Receptor. *Exp. Cell Res.* 279 (2002).

41. Niikura, K., Takeshita, N. & Takano, M. A vacuolar ATPase inhibitor, FR167356, prevents bone resorption in ovariectomized rats with high potency and specificity: potential for clinical application. *J. Bone. Miner. Res.* 20, 1579-1588 (2005).

42. Liu, B. L. & Tzeng, Y. M. Development and applications of destruxins: a review. *Biotechnol. Adv.* 30, 1242-1254 (2012).

43. Rechter, S. D., Decuypere, J. P., Ivanova. E., Heuvel L. P. V D., Smedt H, D., Levtchenko,

E. &

Mekahli, D. Autophagy in renal diseases. *Pediatr. Nephrol.* 31, 737-752 (2016).