



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	L型アミノ酸トランスポーター1及び(プロ)レニン受容体が常染色体優性多発性嚢胞腎の嚢胞形成に与える影響の解析
Author(s)	大寺, 紗夜
Description	配架番号 : 2574
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14171号
Issue Date	2020-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14171
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95751
Type	doctoral thesis
File Information	Sayo_Otera.pdf



学 位 論 文

L 型アミノ酸トランスポーター1 及び (プロ)レニン受容体が 常染色体優性多発性嚢胞腎の嚢胞形成に 与える影響の解析

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

2020 年 6 月

北 海 道 大 学

大 寺 紗 夜

学 位 論 文

L 型アミノ酸トランスポーター1 及び (プロ)レニン受容体が 常染色体優性多発性嚢胞腎の嚢胞形成に 与える影響の解析

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

2020 年 6 月

北 海 道 大 学

大 寺 紗 夜

目 次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
要旨.....	2
略語表.....	5
緒言.....	7
第一章 (プロ)レニン受容体が常染色体優性多発性嚢胞腎の嚢胞形成に与える影響	
1.1 緒言.....	10
1.2 実験方法.....	11
1.2.1 腎限局型 <i>Pkd1</i> 及び <i>Atp6ap2</i> ノックアウトマウスの検討.....	11
1.2.1.1 腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスの作製.....	11
1.2.1.2 マウス表現型の解析.....	11
1.2.1.3 病理組織学的評価.....	12
1.2.1.4 アポトーシスの解析.....	12
1.2.1.5 統計学的解析.....	12
1.2.2 薬剤誘導型 <i>Pkd1</i> 及び <i>Atp6ap2</i> ノックアウトマウスの検討.....	13
1.2.2.1 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの作製.....	13
1.2.2.2 マウス表現型の解析.....	13
1.2.2.3 病理組織学的評価.....	13
1.2.2.4 統計学的解析.....	14
1.3 実験結果.....	15
1.3.1 腎限局型 <i>Pkd1</i> 及び <i>Atp6ap2</i> ノックアウトマウスの検討.....	15
1.3.1.1 マウス表現型.....	15
1.3.1.2 アポトーシスの解析.....	21
1.3.2 薬剤誘導型 <i>Pkd1</i> 及び <i>Atp6ap2</i> ノックアウトマウスの検討.....	22
1.3.2.1 早期欠失群の生存率.....	22
1.3.2.2 早期欠失群のマウス表現型.....	23
1.3.2.3 晩期欠失群のマウス表現型.....	32
1.4 考察.....	35

第二章 L 型アミノ酸トランスポーター1 が常染色体優性多発性嚢胞腎の嚢胞形成に与える影響

2.1 緒言.....	38
2.2 実験方法.....	41
2.2.1 腎限局型 <i>Pkd1</i> 及び <i>Slc7a5</i> ノックアウトマウスの検討.....	41
2.2.1.1 腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスの作製.....	41
2.2.1.2 マウス表現型の解析.....	41
2.2.1.3 生化学検査.....	41
2.2.1.4 病理組織学的評価.....	42
2.2.1.5 免疫組織染色 (酵素抗体法).....	42
2.2.1.6 細胞増殖及びアポトーシスの解析.....	42
2.2.1.7 ウェスタンブロッティング法による組織タンパク発現の解析.....	43
2.2.1.8 選択的 MEK1/2 阻害薬投与実験.....	44
2.2.1.9 統計学的解析.....	44
2.2.2 選択的 LAT1 阻害薬投与実験.....	45
2.2.2.1 薬剤誘導型 <i>Pkd1</i> コンディショナルノックアウトマウスの作製.....	45
2.2.2.2 選択的 LAT1 阻害薬投与.....	45
2.2.2.3 マウス表現型の解析.....	45
2.2.2.4 生化学検査.....	46
2.2.2.5 病理組織学的評価.....	46
2.2.2.6 免疫組織染色 (酵素抗体法).....	46
2.2.2.7 細胞増殖及びアポトーシスの解析.....	46
2.2.2.8 ウェスタンブロッティング法による組織タンパク発現の解析.....	47
2.2.2.9 統計学的解析.....	48
2.3 実験結果.....	49
2.3.1 腎限局型 <i>Pkd1</i> 及び <i>Slc7a5</i> ノックアウトマウスの検討.....	49
2.3.1.1 マウス表現型の解析及び生化学検査.....	49
2.3.1.2 細胞増殖及びアポトーシスの解析.....	58
2.3.1.3 細胞シグナル経路の解析.....	63
2.3.1.4 MAPK/ERK 経路抑制による嚢胞形成への影響.....	73
2.3.2 選択的 LAT1 阻害薬投与実験.....	79
2.3.2.1 マウス表現型の解析及び生化学検査.....	79
2.3.2.2 細胞増殖及びアポトーシスの解析.....	90
2.3.2.3 細胞シグナル経路の解析.....	95
2.4 考察.....	103

総括および結論.....	108
謝辞.....	110
利益相反.....	110
引用文献.....	111

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。

Sayo Takeda-Otera, Saori Nishio, Toru Kimura, Junya Yamamoto, Daigo Nakazawa, Hiroyuki Sakurai, Tatsuya Atsumi

SLC7A5 Ablation Accelerates Cyst Formation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Model Mice

Journal of the American Society of Nephrology, 2020

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Sayo Takeda, Saori Nishio, Toru Kimura, Junya Yamamoto, Daigo Nakazawa, Hiroyuki Sakurai, Tatsuya Atsumi

The effect of L-type amino acid transporter 1 in the cyst formation of model mice for polycystic kidney disease

The 56st European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association Congress, 15st June 2019, Budapest, Hungary.

要旨

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

<第一章> (プロ) レニン受容体が ADPKD の嚢胞形成に与える影響

【背景と目的】ADPKD の嚢胞増悪の機序に重要な Wnt/ β カテニン経路に着目した。Wnt/ β カテニン経路の Wnt 受容体は 1 回膜貫通タンパクである (Pro)renin receptor ((P)RR) とプロトンポンプである V-ATPase より形成される。Makita らの先行研究により、バフィロマイシンによる V-ATPase の阻害は Wnt/ β カテニン経路の抑制を介し腎嚢胞の形成を抑制させることが明らかになり、Wnt/ β カテニン経路の抑制は ADPKD の新たな治療になる可能性が示唆された。V-ATPase 阻害薬は有害性が臨床応用において問題となるため、(P)RR に着目し、(P)RR と嚢胞形成の関連について検証した。

【材料と方法】胎生期より目的遺伝子を除去する *Ksp-Cre* を用いて *Pkd1* 及び (P)RR の細胞内ドメインである *Atp6ap2* のダブルノックアウトマウスを作製し、生後 11 日目に腎表現型の解析を行った。また、任意の時期に Polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) を投与することで目的遺伝子を除去する *Mx1-Cre* を用いて *Pkd1* 及び *Atp6ap2* のダブルノックアウトマウスを作製し、嚢胞の形成速度が速い早期欠失群 (pI-pC を生後 8 日から 6 日間投与) と、嚢胞の形成速度が比較的遅く成人 ADPKD により近いモデルである晚期欠失群 (pI-pC を生後 15 日目から 6 日間投与) に分けて、生存率を評価し、それぞれ生後 19 日と生後 22 週の腎及び肝の表現型を検討した。

【結果】*Ksp-Cre* により *Atp6ap2* のみを欠失させたマウスでは、髄質の尿細管障害や水腎症を呈した。*Pkd1* ノックアウトによる嚢胞形成の程度は、*Atp6ap2* 欠失の有無によって有意な差はなかった。*Mx1-Cre* による薬剤誘導型ノックアウトマウスでは、早期欠失群の *Atp6ap2* 欠失群は、生後 20 日前後で死亡した。死亡前の生後 19 日に解剖した結果は、*Atp6ap2* の欠失の有無によって肝腎嚢胞の形成に有意な差は認めなかった。晚期欠失群は、*Atp6ap2* 欠失群において長期間生存可能な個体を認めたが、*Atp6ap2* 野生型の嚢胞腎マウスにおいて腎嚢胞の形成が十分ではなかった。

【考察】*Atp6ap2* がネフロン形成に必須であり、*Ksp-Cre* を用いて *Atp6ap2* をノックアウトすると腎の発育に悪影響を及ぼしたため、同モデルでは嚢胞形成への *Atp6ap2* の影響を検討することは困難であると考えられた。薬剤誘導型ノックアウトマウスでも、早期欠失群の

Atp6ap2 ノックアウトは有害であった。晩期欠失群は *Atp6ap2* 欠失の有害性は緩和されたが、*Atp6ap2* 野生型の嚢胞腎マウスにおいて腎嚢胞の形成が十分ではなく、嚢胞腎モデルマウスとして解析ができず、嚢胞進展機序を解析するモデルとしては適切ではなかった。

【結論】胎生期や成長期での *Atp6ap2* のノックアウトは臓器の発育形成に有害である。嚢胞形成と *Atp6ap2* との関連を検証するためには *Pkd1*^{-/-}細胞における *Atp6ap2* ノックダウンや薬剤による抑制など、異なる手法を用いることが必要である。

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

【背景と目的】L型アミノ酸トランスポーター1 (L-type amino acid transporter 1: LAT1) は、*SLC7A5* の遺伝子産物であり、主に必須アミノ酸の輸送に携わる膜貫通タンパクで様々なヒト癌組織に発現していることが知られている。さらに、癌細胞において LAT1 阻害薬は mTOR 経路の抑制により抗腫瘍効果をもつことが複数報告されており、新規抗腫瘍薬として期待されている。ADPKD の嚢胞上皮細胞にも LAT1 が発現していることが報告されているが、嚢胞形成における LAT1 の役割は明らかではない。また、LAT1 阻害薬の ADPKD における効果は不明である。そこで、LAT1 の嚢胞形成における役割の解明と、LAT1 阻害薬の有効性について検証した。

【材料と方法】*Ksp-Cre* を用いて *Pkd1* 及び *Slc7a5* のダブルノックアウトマウスを作製し、生後 11 日目の腎の表現型について解析した。さらに、摘出した腎検体を用いて免疫組織染色を行い細胞増殖やアポトーシスを評価した。また、免疫組織染色、ウェスタンブロッティングを行い、細胞シグナル経路の変化について検証した。また、pI-pC を生後 5 日目より 6 日間投与した、*Mx1-Cre* による *Pkd1* ノックアウトマウスに選択的 LAT1 阻害薬である JPH203 を隔日投与し、生後 35 日目で評価する短期投与群と生後 56 日目で評価する長期投与群に分けて、腎及び肝表現型を評価した。

【結果】ADPKD モデルマウスにおける *Slc7a5* 欠失群は、*Slc7a5* 野生型に比較して嚢胞が増大し、アミノ酸枯渇を感知し活性化する General control non-derepressible-2/activating transcription factor 4 (GCN2/ATF4) 経路が活性化していた。また、同時に MAPK/ERK 経路も亢進していた。選択的 LAT1 阻害薬の投与実験では、JPH203 短期投与群において有意に腎嚢胞の形成が抑制され、mTOR 経路が抑制されていたが、GCN2/ATF4 経路や MAPK/ERK 経路の活性化は認めなかった。JPH203 長期投与群では、Placebo 群と比較して腎及び肝嚢胞の形成に有意な差は得られなかった。

【考察】*Pkd1* 及び *Slc7a5* のダブルノックアウトマウスの解析により、GCN2/ATF4 経路と MAPK/ERK 経路が活性化され、アミノ酸枯渇に対するストレス応答により嚢胞が増大する新たなメカニズムが明らかになった。また、LAT1 阻害薬の短期投与により、mTOR 経路の抑制を介して腎嚢胞の形成が抑制されたため、アミノ酸枯渇ストレスを誘導しない程度で LAT1 を阻害することは、ADPKD の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。今後、

LAT1 阻害薬の適切な投与量や投与方法の検討が必要である。

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

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
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATF4	Activating transcription factor 4
BPB	Bromophenol blue
BUN	Blood urea nitrogen
BW	Body weight
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eIF2	Eukaryotic initiation factor 2
GCN2	General control non-derepressible-2
HE	Hematoxylin-Eosin
HRP	Horseradish peroxidase
LAT1	L-type amino acid transporter 1
LKB1	Liver kinase B1
LW/BW	Liver weight/ body weight ratio
MAPK/ERK	Mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PC1	Polycystin-1
PC2	Polycystin-2
PFA	Paraformaldehyde
pI-pC	Polyinosinic-polycytidylic acid
(P)RR	(Pro) renin receptor
p70S6K	p70 S6 kinase
RAS	Renin-angiotensin system

SDS	Sodium dodecyl sulfate
S6RP	S6 ribosomal protein
TBS	Tris-buffered saline
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
vs.	Versus
2KW/BW	Bilateral kidney weight/ body weight ratio

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る。加齢と共に発生, 進行する嚢胞により, 両側腎臓は腫大し, 70 歳までに約半数が末期腎不全に至る。また, ADPKD は高血圧, 多発肝嚢胞, 脳動脈瘤, 心臓弁膜症などの腎外病変を合併する。さらに, 嚢胞感染や脳動脈瘤破裂などの致死的な合併症を呈することがあり, 早期診断や適切な加療が重要な疾患である (Torres et al., 2007) 。ADPKD の原因遺伝子として第 16 染色体短腕に存在する *PKD1* 遺伝子と第 4 染色体長腕に存在する *PKD2* 遺伝子が同定されており, 85%が *PKD1* 遺伝子の変異 (Wilson, 2004), 15%が *PKD2* 遺伝子の変異とされている (Mochizuki et al., 1996)。 *PKD1* の遺伝子産物である Polycystin-1 (PC1) と *PKD2* の遺伝子産物である Polycystin-2 (PC2) は, 腎の尿細管上皮細胞の繊毛に局在する膜貫通タンパクとして PC 複合体を形成する。PC1 は尿流や Shear stress などの刺激の受容体として働く機能を持ち, PC2 はカルシウムイオンチャネルとして働く (Nauli et al., 2003)。PC1 により尿流の刺激が感知されると PC2 を介してカルシウムが細胞内に流入し, 適切に細胞内カルシウム濃度が維持され尿細管径が調節される。ADPKD では, PC1 または PC2 の機能異常により嚢胞が形成されと考えられている (Yoder et al., 2002)。

また, ADPKD では PC1 や PC2 の異常により嚢胞上皮細胞内のカルシウム濃度が低値であることにより, 細胞内の Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) が増加することが知られている (Torres and Harris, 2014) 。増加した cAMP はその下流の Mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) 経路 (Nagao et al., 2003) および Mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路 (Kotsis et al., 2013) を活性化させ, 他の Wnt/ β カテニン経路等の細胞増殖に関連したシグナル経路も関わることで (Saadi-Kheddouci et al., 2001), 尿細管上皮細胞の増殖が促され嚢胞が形成される。

現在, ADPKD において進行を抑制する治療として, 降圧治療や, バゾプレシン受容体を介した cAMP の分泌を抑制するために積極的な飲水が励行されている。しかし, これらの治療は腎機能進行を抑制するエビデンスは十分ではなく, 実臨床で用いられる根本的 ADPKD 治療薬は, バゾプレシン V2 受容体拮抗薬であるトルバプタンのみである。トルバプタンは, 腎嚢胞増大抑制効果および腎機能障害進行抑制効果があることが示されているが (Torres et al., 2012) , 日常生活に影響する多尿の副作用や, 嚢胞増大速度が一定以上の速い群に適応が限られることなどの問題があり, 更なる病態の解明や新たな薬剤の開発が求められている。

第一章では, ADPKD の嚢胞増悪の機序に重要であるとされている Wnt/ β カテニン経路に着目した (Wuebben and Schmidt-Ott, 2011)。Wnt/ β カテニン経路において重要な Wnt 受容

体は 1 回膜貫通タンパクである(Pro) renin receptor ((P)RR) とプロトンポンプである V-ATPase より形成されているが(Nguyen, 2011), Makita らの先行研究により, Bafilomycin A1 による V-ATPase の阻害は Wnt/ β カテニン経路の抑制を介して腎嚢胞の形成が抑制されることが明らかになった(Makita, submitted). 即ち, Wnt/ β カテニン経路の抑制は新たな ADPKD の治療メカニズムになる可能性が示唆された. V-ATPase 阻害薬はその有害性が臨床応用において問題となるために, Wnt/ β カテニン経路において重要な構成因子の一つである(P)RRに着目した. (P)RRの抑制が, ADPKDの嚢胞形成を抑制させると仮説を立て, *Pkd1* 及び(P)RRの細胞内ドメインである *Atp6ap2* のコンディショナルノックアウトマウスを作製し, 腎表現型について解析を行った.

第二章では, Yamamoto ら(Yamamoto et al., 2017) による先行研究で明らかにされた分枝鎖アミノ酸の負荷が mTOR 経路及び MAPK/ERK 経路の活性化を介して嚢胞形成を悪化させるメカニズムに, L 型アミノ酸トランスポーター1 (L-type amino acid transporter 1: LAT1) が関与していることに着目した. LAT1 は, *SLC7A5* の遺伝子産物であり, 主に必須アミノ酸の輸送に携わる膜貫通タンパクで様々なヒト癌組織に発現していることが知られている(Hayashi and Anzai, 2017). さらに, 癌細胞において LAT1 阻害薬は mTOR 経路の抑制により抗腫瘍効果をもつことが複数報告されており, 新規抗腫瘍薬として期待されている(Rosilio et al., 2015). Yamamoto ら(Yamamoto et al., 2017) により, ADPKD の嚢胞上皮細胞にも LAT1 が高発現していることが明らかにされたが, 嚢胞形成における LAT1 の役割は明らかになってはおらず, また, LAT1 阻害薬が ADPKD においても治療効果を有するかどうかは不明である. そこで本研究では, *Pkd1* 及び *Slc7a5* の腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスを作製し, ADPKD モデルマウスにおいて嚢胞上皮における LAT1 欠失が嚢胞形成へ与える影響を評価した. さらに, 選択的 LAT1 阻害薬である JPH203 を薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスに投与し, Placebo 群と比較検討することで JPH203 の嚢胞抑制効果について検討した.

第一章

(プロ)レニン受容体が
常染色体優性多発性嚢胞腎の嚢胞形成に
与える影響

1.1 緒言

ADPKDは進行する腎嚢胞のために腎不全に至る重要な遺伝性腎疾患であるが、病状の進行を抑制する確立した唯一の治療はトルバプタンであり、病態の解明や新規治療薬の開発が求められている。ADPKDの特徴となる病態は尿管上皮細胞の増殖による嚢胞形成や嚢胞液の貯留であるが、本章では、細胞増殖に関与する Wnt/ β カテニン経路 (Wuebkens and Schmidt-Ott, 2011)に着目し検討した。

近年、Wnt/ β カテニン経路の Wnt 受容体は、1 回膜貫通タンパクである(Pro)renin receptor ((P)RR) とプロトンポンプである V-ATPase が、複合体を形成して存在することが明らかになった(Nguyen, 2011)。((P)RR の細胞内ドメインは Atp6ap2 と呼ばれ、この領域は V-ATPase のアクセサリタンパクとして同定された(Stransky et al., 2016)。Wnt/ β カテニン経路の活性化には、((P)RR を介した V-ATPase による液性変化が重要であり複合的に機能していると考えられている。

先行研究として Makita らは (Makita, submitted), 腎特異的コンディショナルノックアウトマウスの *Pkd1*^{flax/flax}: *KSP-Cre* マウスに対し V-ATPase 阻害薬である Bafilomycin A1 を投与し、嚢胞形成に対する影響を検討した。この検討では、Bafilomycin A1 の投与により腎表現型として嚢胞形成が抑制され、免疫組織染色で嚢胞上皮細胞での Atp6ap2 の抑制が確認され、ウェスタンブロッティング法では Wnt/ β カテニン経路の抑制も認められたことから、V-ATPase 阻害薬は Wnt/ β カテニン経路の抑制を介し嚢胞形成を抑制し、ADPKD の新規治療薬となる可能性が示唆された。しかし、Bafilomycin A1 はその毒性が問題となり、臨床応用が困難であることが懸念されたため、本研究では Wnt 受容体の構成因子である((P)RR)に着目した。((P)RR は Wnt/ β カテニン経路に関連して細胞増殖や器官形成に関与する他にも、Renin-angiotensin system (RAS) においてレニンやその前駆体である(プロ)レニンの受容体として機能したり、V-ATPase と共役してオートファジーに関与したりすることが報告され(Xu et al., 2016)、多彩な生理機能を持つことが明らかになってきた。しかし、ADPKD において、RAS の亢進が嚢胞増大や高血圧、線維化に関与することや(Saigusa et al., 2015)、オートファジーの抑制が嚢胞増大に関与する(Zhu et al., 2017)ことは報告されているが、((P)RR が ADPKD の病態や嚢胞形成に対してどのように影響しているかを検討した報告はない。

そこで、ADPKD において、((P)RR)を抑制すると Wnt/ β カテニン経路の抑制を介して嚢胞の形成が抑制されると仮説をたて、ADPKD における嚢胞形成と((P)RR)との関連を明らかにするために、*Pkd1* 及び *Atp6ap2* のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。

1.2 実験方法

1.2.1 腎限局型 *Pkd1* 及び *Atp6ap2* ノックアウトマウスの検討

1.2.1.1 腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスの作製

Shibazaki ら(Shibazaki et al., 2008) が作製した腎限局型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスである *Pkd1^{fllox/+}:Ksp-Cre* マウスと東京女子医科大学高血圧・内分泌内科 市原淳弘教授より供与された *Atp6ap2^{fllox/fllox}* マウスを交配させ, *Pkd1^{fllox/+}:Atp6ap2^{fllox/Y}:Ksp-Cre* マウス (雄) 及び *Pkd1^{fllox/+}:Atp6ap2^{fllox/+}:Ksp-Cre* マウス (雌) を作製した. さらに, これらのマウスを交配させて, ダブルノックアウトマウスである *Pkd1^{fllox/fllox}:Atp6ap2^{fllox/fllox or fllox/Y}:Ksp-Cre* マウスを作製した. 以下, *Pkd1* が欠失し嚢胞を形成するマウスを Cystic 群と表す. Cystic 群のコントロールとして, *Atp6ap2* が野生型である *Pkd1^{fllox/fllox}:Atp6ap2^{+/+ or +/Y}:Ksp-Cre* マウスを使用し, *Atp6ap2* ヘテロとして *Pkd1^{fllox/fllox}:Atp6ap2^{fllox/+}:Ksp-Cre* マウスを用いた. また, 嚢胞を形成しない (non-Cystic) マウスにおける *Atp6ap2* ノックアウトの影響を評価するため, *Pkd1^{fllox/+}:Atp6ap2^{fllox/fllox or fllox/Y}:Ksp-Cre* または *Pkd1^{+/+}:Atp6ap2^{fllox/fllox or fllox/Y}:Ksp-Cre* マウスを作製した. Cystic 群と同様に, non-Cystic 群においても *Atp6ap2* の野生型及びヘテロ群も作製した. マウスの飼育環境は, 室温 25.0 °C 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 (承認番号: 15-0109). これらのノックアウトマウスは, 生後 11 日目に屠殺解剖し, 下記に記す腎の表現型の解析を行った.

1.2.1.2 マウス表現型の解析

マウスの表現型の解析として, 体重, 腎重量を測定し, 腎重量体重比 (Bilateral kidney weight/ body weight ratio: 2KW/BW) を用いて比較検討した. また, 病理組織像を用いて腎臓組織の横断面面積における嚢胞面積の占める割合と定義される Cystic Index を測定した. Cystic Index は WinRoof (Mitani corporation) を用いて測定した.

1.2.1.3 病理組織学的評価

生後 11 日目の屠殺解剖の際に 4 % Paraformaldehyde (PFA) にて還流固定を行い、腎臓を摘出した。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-X710, KEYENCE) にて病理組織標本を観察し、組織像を撮影した。

1.2.1.4 アポトーシスの解析

アポトーシスの解析のため、生後 11 日目に摘出した腎臓のパラフィン包埋切片を用いて Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色を行った。TUNEL 染色は MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) を用いて、使用説明書に準じて施行した。核を染める 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色には、VECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories) を用いた。

1.2.1.5 統計学的解析

全てのデータは、Mean±SEM で表記した。3 群間以上の検討では Kruskal-Wallis 検定を行い、その後に Dunn の多重比較検定にて群間比較を行い p 値を算出した。GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software) を使用した。 p 値が 0.05 未満を有意とした。

1.2.2 薬剤誘導型 *Pkd1* 及び *Atp6ap2* ノックアウトマウスの検討

1.2.2.1 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの作製

Pkd1^{fllox/fllox} マウス (Shibazaki et al., 2008) と *Mx1-Cre* マウス (The Jackson Laboratory) を交配し, *Pkd1*^{fllox/fllox}: *Mx1-Cre* マウスを作製した. さらに, *Pkd1*^{fllox/fllox}: *Mx1-Cre* マウスを *Atp6ap2*^{fllox/fllox} マウスと交配し, *Pkd1*^{fllox/+}: *Atp6ap2*^{fllox/Y}: *Mx1-Cre* マウス(雄)及び *Pkd1*^{fllox/+}: *Atp6ap2*^{fllox/+}: *Mx1-Cre* マウス(雌)を作製した. そして, これらのマウス同士を交配することで, *Pkd1*^{fllox/fllox}: *Atp6ap2*^{fllox/fllox or fllox/Y}: *Mx1-Cre* マウスを得た. 以下, *Pkd1* が欠失し嚢胞を形成するマウスを Cystic 群と表す. Cystic 群のコントロールとして, *Pkd1*^{fllox/fllox}: *Atp6ap2*^{+/+ or +/Y}: *Mx1-Cre* マウスを作製した. また, 腎限局型コンディショナルノックアウトマウスと同様に, non-Cystic 群の *Atp6ap2* 野生型, ヘテロ群, 欠失群も作製した. *Mx1-Cre* は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* 遺伝子を発現させ, *Pkd1* 及び *Atp6ap2* を任意の時期で欠失できる. 生後 8 日目(早期欠失群) 及び生後 15 日目 (晩期欠失群) より 10µg/g (Body weight: BW) の pI-pC を連続 6 日間腹腔内投与した. 早期欠失群は生後 19 日目で, 晩期欠失群は生後 22 週齢で屠殺解剖した. マウスの飼育環境は, 室温 25.0 °C 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 (承認番号:15-0109).

1.2.2.2 マウス表現型の解析

マウスの表現型の解析として, 体重, 腎重量, 肝重量を測定し, 2KW/BW, 肝重量体重比 (Liver weight/ body weight ration : 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組織及び肝臓組織の横断面面積における嚢胞面積の占める割合と定義される Cystic Index を測定した. Cystic Index は WinRoof (Mitani corporation) を用いて測定した.

1.2.2.3 病理組織学的評価

生後 19 日目及び生後 22 週齢で屠殺解剖の際に 4 % PFA にて還流固定を行い, 腎臓及び肝臓を摘出した. パラフィン包埋切片を作成し, HE 染色を行った. 光学顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE) にて病理組織標本を観察し, 組織像を撮影した.

1.2.2.4 統計学的解析

全てのデータは, Mean $\pm$ SEM で表記した. 2 群間の検定では Mann-Whitney 検定を行い, 3 群間の検定では Kruskal-Wallis 検定後に Dunn の多重比較検定を行い p 値を算出した. また, 生存分析においては Log-rank 検定を行った. GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software) を使用した. p 値が 0.05 未満を有意とした.

1.3 実験結果

1.3.1 腎限局型 *Pkd1* 及び *Atp6ap2* ノックアウトマウスの検討

1.3.1.1 マウス表現型

生後 11 日目の腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスにおける, non-Cystic 群の代表的な腎組織横断面像を下記に示す. *Atp6ap2* ヘテロ群は腎の形態に明らかな変化を呈さなかったが, *Atp6ap2* 欠失群では髓質の尿細管の形成異常や水腎症を呈していた (図 1). 強拡大による観察では, *Atp6ap2* 欠失群において, 髓質の尿細管の内腔開大や尿細管上皮細胞の核断片化を認め, 尿細管障害を認めた (図 2). Cystic 群においては, *Atp6ap2* 野生型と比較して、ヘテロ群及び欠失群で腎の嚢胞形成に明らかな差は認めず、いずれの群も嚢胞形成は著明であった (図 3). また、生後 11 日齢のマウス体重に関しては non-Cystic 群において、野生型に比較して *Atp6ap2* ヘテロ群は有意に体重が多かったが、欠失群は差がなかった (*Atp6ap2* 野生型: 5.24 ± 0.31 g vs. ヘテロ群: 6.11 ± 0.24 g, $p < 0.05$, vs. 欠失群: 5.47 ± 0.21 g) (図 4). Cystic 群において *Atp6ap2* ヘテロ群は野生型に比較して体重に差はなかったが, *Atp6ap2* 欠失群は野生型に比較して有意に体重が小さかった (*Atp6ap2* 野生型: 5.66 ± 0.29 g vs. ヘテロ群: 5.54 ± 0.21 g, vs. 欠失群: 4.64 ± 0.28 g, $p < 0.05$) (図 4). Cystic 群における 2KW/BW と Cystic Index は, *Atp6ap2* 野生型, ヘテロ群, 欠失群の各群間で有意な差は認められなかった (2KW/BW: *Atp6ap2* 野生型: 13.62 ± 0.95 % vs. ヘテロ群: 13.89 ± 1.18 %, vs. 欠失群: 13.52 ± 0.65 %) (Cystic Index: *Atp6ap2* 野生型: 76.04 ± 1.89 % vs. ヘテロ群: 69.02 ± 2.72 %, vs. 欠失群: 76.04 ± 1.66 %) (図 5).

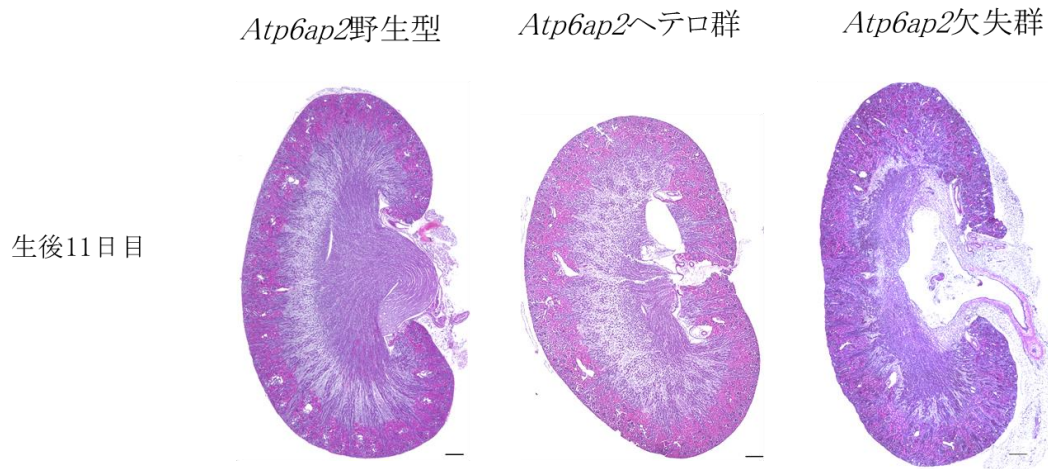


図 1: 腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスにおける non-Cystic 群の腎臓の HE 染色像 (弱拡大像)

生後 11 日目の non-Cystic 群のマウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作製し, HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大で観察した. non-Cystic 群における *Atp6ap2* 野生型 (左), ヘテロ群 (中央), 欠失群 (右) の代表的な腎組織横断面像を弱拡大で示す. *Atp6ap2* 欠失群では, 髄質の尿細管障害を認め, 水腎症を呈していた. スケール: 200 μ m.

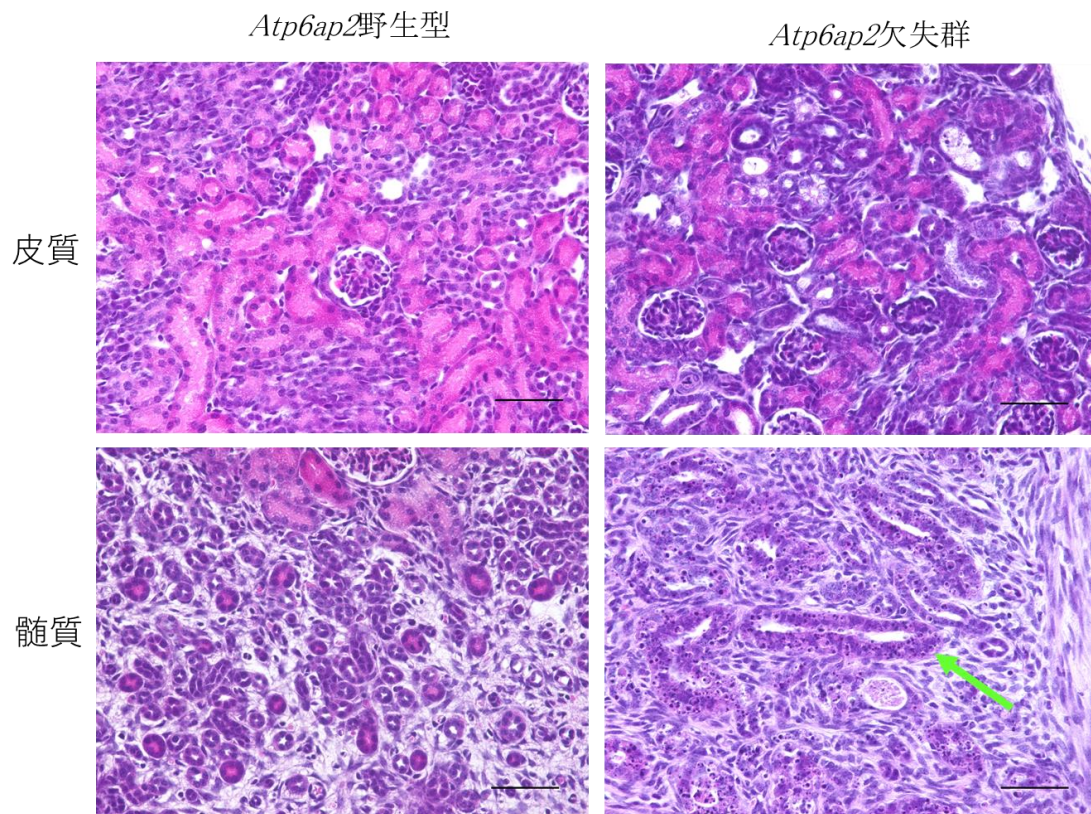


図 2: 腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスにおける non-Cystic 群の腎臓の HE 染色像 (強拡大像)

生後 11 日目の non-Cystic 群のマウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作製し, HE 染色を行い腎の表現型について強拡大で観察した. non-Cystic 群における *Atp6ap2* 野生型 (左), 欠失群 (右) の代表的な腎組織横断面像を強拡大で示す. *Atp6ap2* 欠失群では, 皮質の形成異常は目立たなかったが, 髓質の尿細管において, 内腔の開大, 尿細管上皮細胞の核の断片化を認めた. (右下). スケール: 50 μ m.

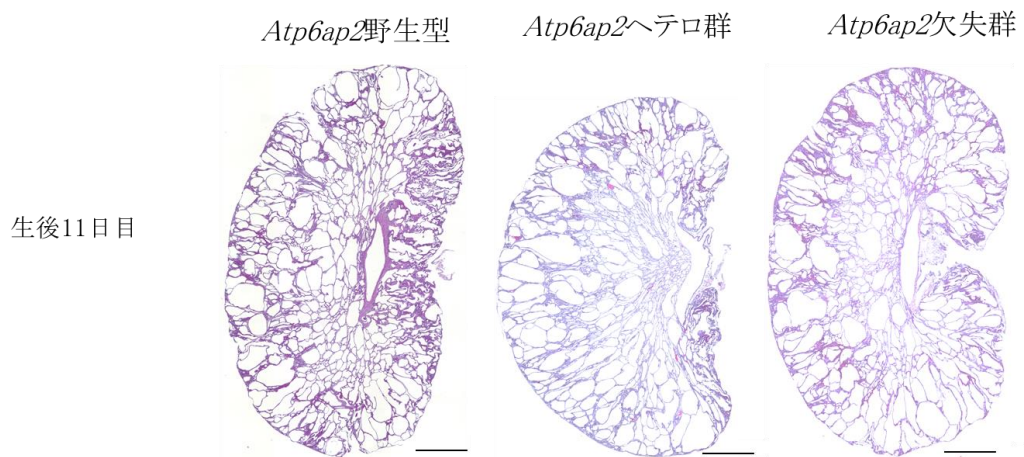


図3:腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスにおける Cystic 群の腎臓の HE 染色像

生後 11 日目の Cystic 群のマウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大で観察した。Cystic 群における *Atp6ap2* 野生型 (左), ヘテロ群 (中央), 欠失群 (右) の代表的な腎組織横断面像を示す。 *Atp6ap2* ヘテロ群及び欠失群では, 野生型と比較して腎の嚢胞形成に明らかな差を認めず, いずれの群も嚢胞形成は著明であった。スケール: 1mm.

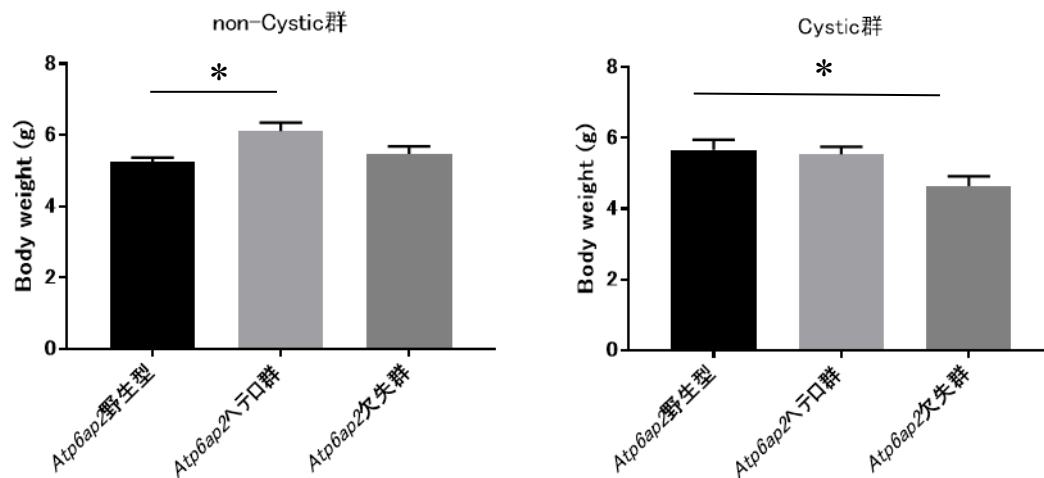


図 4:腎局限型コンディショナルダブルノックアウトマウスにおける, non-Cystic 群及び Cystic 群の体重

non-Cystic 群と Cystic 群のマウスにおいて, 解剖屠殺直前に体重を測定し各群間の有意差検定を行った. non-Cystic 群 (左) 及び Cystic 群 (右) における *Atp6p2* 野生型, ヘテロ群, 欠失群の体重について示す. non-Cystic 群において, 野生型に比較して *Atp6ap2* ヘテロ群は有意に体重が多かったが, 欠失群は差がなかった. Cystic 群において *Atp6ap2* 欠失群は野生型に比較して有意に体重が小さかった. non-Cystic 群: *Atp6ap2* 野生型 N=10, ヘテロ群 N=10, 欠失群 N=10, Cystic 群: *Atp6ap2* 野生型 N=10, ヘテロ群 N=10, 欠失群 N=10. * $p<0.05$.

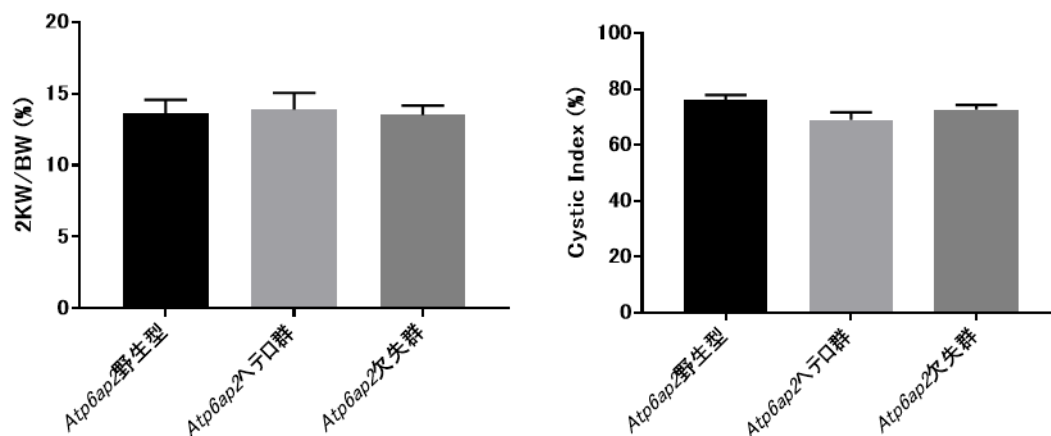


図 5: 腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスにおける Cystic 群の 2KW/BW と Cystic Index

嚢胞形成の評価のため, Cystic 群の 2KW/BW 及び Cystic Index を測定し, 各群間で比較検討した. Cystic 群の 2KW/BW と Cystic Index において, *Atp6ap2* ヘテロ群及び欠失群は, 野生型に比較して有意な差を認めなかった. 2KW/BW: *Atp6ap2* 野生型 N=10, ヘテロ群 N=10, 欠失群 N=10, Cystic Index: *Atp6ap2* 野生型 N=10, ヘテロ群 N=9, 欠失群 N=10.

1.3.1.2 アポトーシスの解析

non-Cystic 群の *Atp6ap2* 欠失群において、髄質の尿細管上皮細胞で核の断片化が認められたことからアポトーシスが関与していることが疑われた。そこで、TUNEL 染色を行ったところ、non-Cystic 群の *Atp6ap2* 欠失群の髄質で著明なアポトーシスの亢進が認められた。Cystic 群では *Atp6ap2* 欠失群でアポトーシスの明らかな亢進は認められなかった。(図 6)

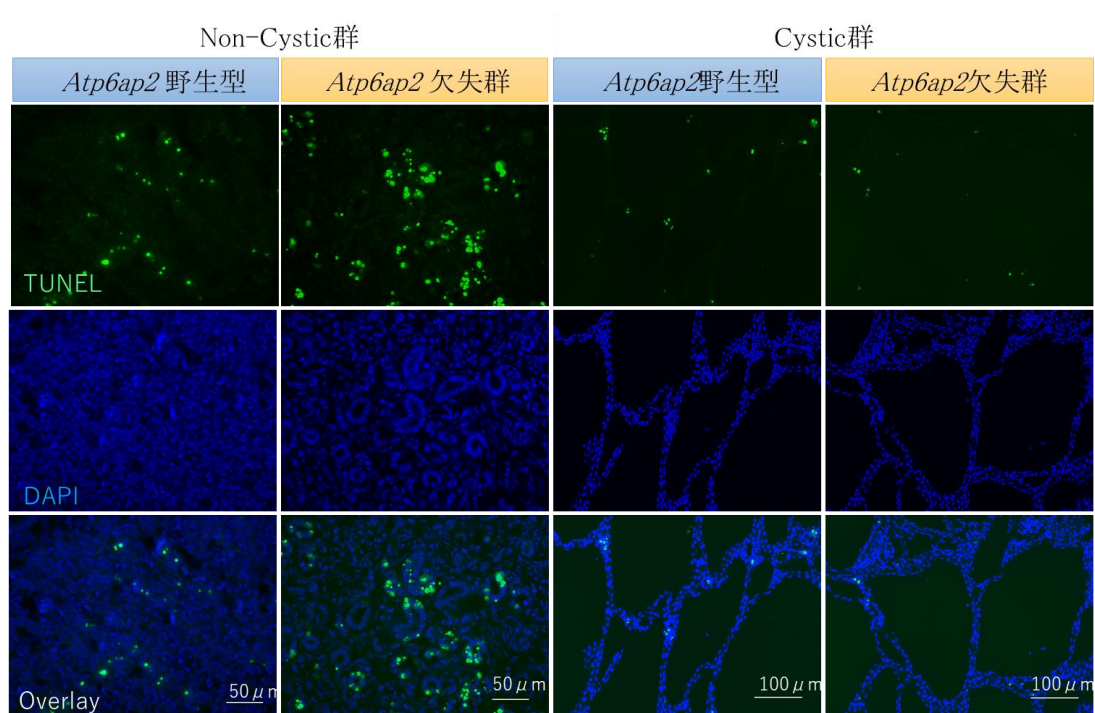


図 6: 腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスにおける non-Cystic 群と Cystic 群のアポトーシスの関与

non-Cystic 群と Cystic 群の腎組織切片を用いて TUNEL 染色を行い、染色される核(緑)の数を観察した。non-Cystic 群の *Atp6ap2* 欠失群において、髄質でアポトーシスが亢進していた。Cystic 群の *Atp6ap2* 欠失群は明らかなアポトーシスの増加を認めなかった。

1.3.2 薬剤誘導型 *Pkd1* 及び *Atp6ap2* ノックアウトマウスの検討

1.3.2.1 早期欠失群の生存率

pI-pC を生後 8 日目より投与した早期欠失群は, non-Cystic 群および Cystic 群共に, *Atp6ap2* 欠失群において生後 20 日目前後より死亡するマウスが多く, *Atp6ap2* 野生型よりも有意に予後が不良であった ($p<0.0001$, $p=0.0001$) (図 7).

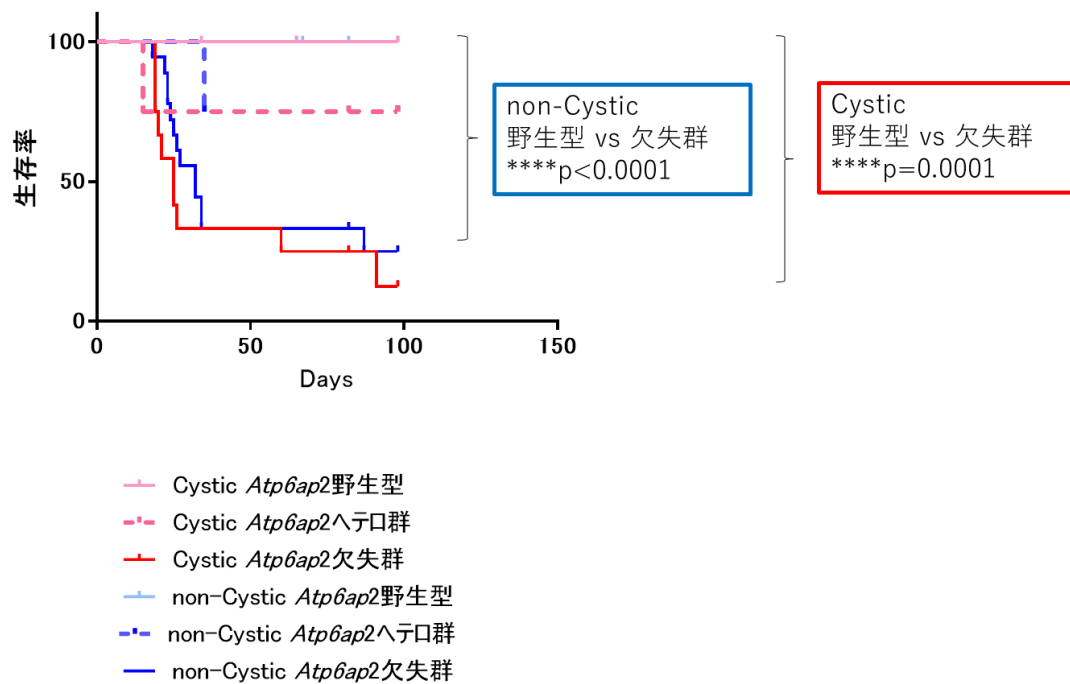


図 7: 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスにおける早期欠失群の生存曲線

薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスを作製して生存日数を観察し, 生存曲線を作製した. non-Cystic 群と Cystic 群共に *Atp6ap2* 欠失群において早期に死亡し, 有意に生命予後が不良であった. non-Cystic 群: *Atp6ap2* 野生型 $N=13$, ヘテロ群 $N=4$, 欠失群 $N=12$. Cystic 群: *Atp6ap2* 野生型 $N=6$, ヘテロ群 $N=4$, 欠失群 $N=11$. **** $p\leq 0.0001$.

1.3.2.2 早期欠失群のマウス表現型

早期欠失群において, *Atp6ap2* 欠失群が生後 20 日前後で死亡するため, *Atp6ap2* 野生型と欠失群の表現型の比較のため生後 19 日に屠殺解剖した. 解剖時に開腹した際の肉眼的所見は, とくに Cystic 群の *Atp6ap2* 欠失群で, 血性または白色混濁の腹水の貯留, 腸管の浮腫と癒着が見られ, 肝の発育は小さく表面が粗造であるなどの異常所見がみられた (図 8). 腎及び肝の表現型に関しては, 死亡率に有意差のあった *Atp6ap2* 野生型と欠失群との比較をした. non-Cystic 群に関しては, *Atp6ap2* 野生群と欠失群で腎, 肝共に表現型に大きな差を認めず (図 9,10), Cystic 群に関しては, 腎嚢胞及び肝嚢胞の形成の程度に明らかな差は無かった(図 11,12). non-Cystic 群は解析数が少ないが, *Atp6ap2* 野生型と欠失群で体重に有意な差はなく(*Atp6ap2* 野生型: 7.97 ± 0.37 g vs. 欠失群: 7.94 ± 0.88 g), Cystic 群も両群間で体重に有意な差は認めなかった (*Atp6ap2* 野生型: 8.27 ± 0.29 g vs. 欠失群: 7.49 ± 0.38 g) (図 13). Cystic 群における腎の評価である 2KW/BW 並びに腎 Cystic Index においては, *Atp6ap2* 野生型と欠失群で有意な差を認めなかった (2KW/BW: *Atp6ap2* 野生型: 1.54 ± 0.12 % vs. 欠失群: 1.39 ± 0.08 %) (Cystic Index: *Atp6ap2* 野生型 5.78 ± 1.27 % vs. 欠失群: 6.98 ± 0.86 %) (図 14). Cystic 群における肝の評価では, LW/BW で *Atp6ap2* 野生型に比較して欠失群で有意に増大していた (*Atp6ap2* 野生型: 3.17 ± 0.09 % vs. 欠失群: 3.78 ± 0.17 %, $p < 0.05$). 肝 Cystic Index に関しては, *Atp6ap2* 欠失群で大きい傾向にあったが, *Atp6ap2* 野生型と有意な差は無かった (*Atp6ap2* 野生型 1.93 ± 1.02 % vs. 欠失群: 3.90 ± 1.08 %) (図 15).

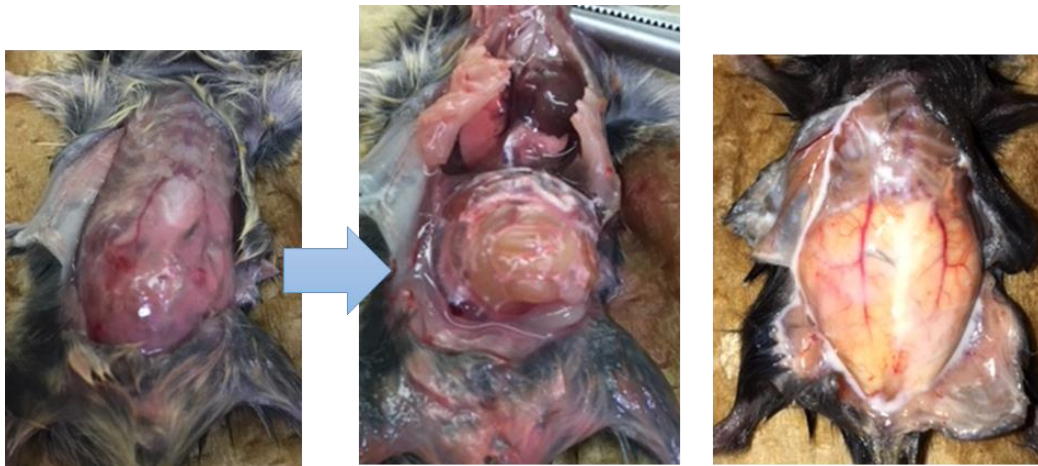


図 8:薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの早期欠失群の *Atp6ap2* 欠失群における解剖時の肉眼的所見

生後 19 日に早期欠失群のマウスを屠殺解剖し腹部臓器の異常所見について観察した. Cystic 群の *Atp6ap2* 欠失群の開腹時の所見を示す. 開腹時に血性または白色に混濁した腹水を認め, 腸管の浮腫や癒着などの異常所見が認められた.

*Atp6ap2*野生型

*Atp6ap2*欠失群

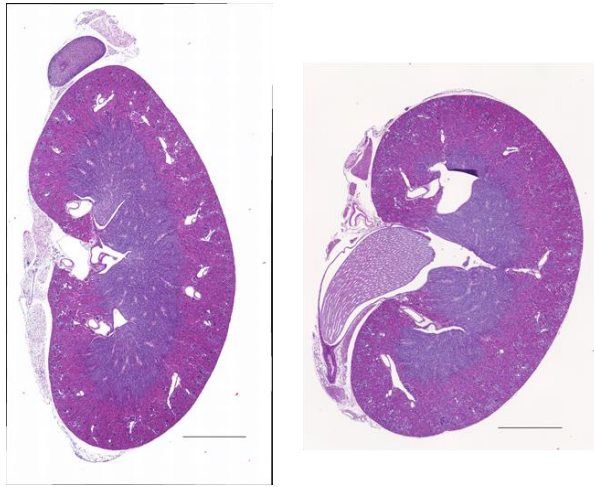
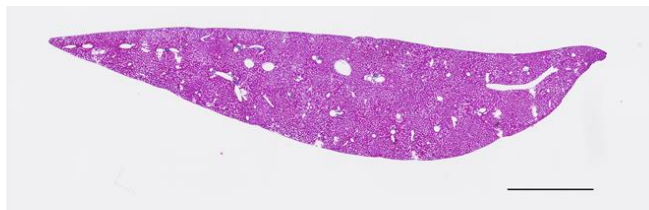


図 9: 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの早期欠失群における non-Cystic 群の腎臓の HE 染色像

生後 19 日目の non-Cystic 群のマウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作製し, HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大で観察した. non-Cystic 群における *Atp6ap2* 野生型 (左), 欠失群 (右) の代表的な腎組織横断面像を弱拡大で示す. 両群間で腎表現型に明らかな差は無かった. スケール: 1mm.

*Atp6ap2*野生型



*Atp6ap2*欠失群

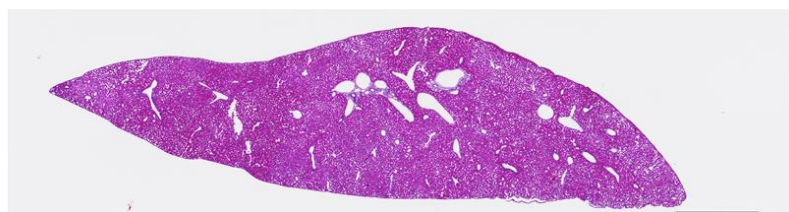
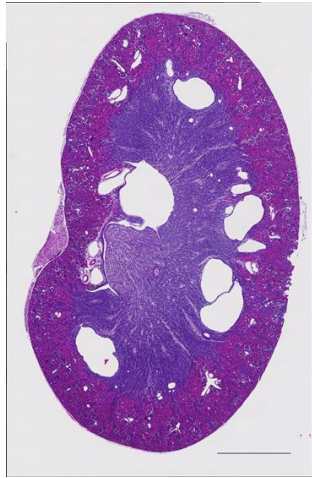


図 10: 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの早期欠失群における non-Cystic 群の肝臓の HE 染色像

生後 19 日目の non-Cystic 群のマウスより摘出した肝を用いてパラフィン包埋切片を作製し, HE 染色を行い肝の表現型について弱拡大で観察した. non-Cystic 群における *Atp6ap2* 野生型 (左), 欠失群 (右) の代表的な肝組織横断面像を弱拡大で示す. 両群間で肝表現型に明らかな差は無かった. スケール: 1mm.

*Atp6ap2*野生型



*Atp6ap2*欠失群

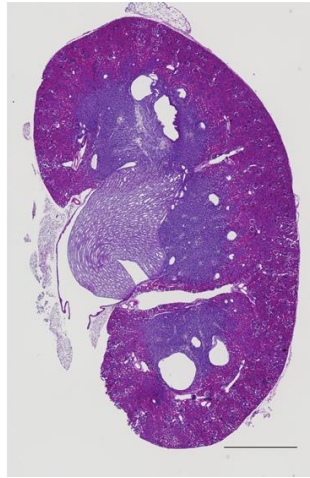
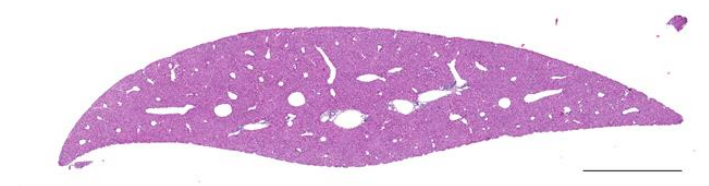


図 11: 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの早期欠失群における Cystic 群の腎臓の HE 染色像

生後 19 日目の Cystic 群のマウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大で観察した。Cystic 群における *Atp6ap2* 野生型 (左)、欠失群 (右) の代表的な腎組織横断面像を弱拡大で示す。両群間で嚢胞形成の程度に明らかな差は無かった。スケール: 1mm.

*Atp6ap2*野生型



*Atp6ap2*欠失群

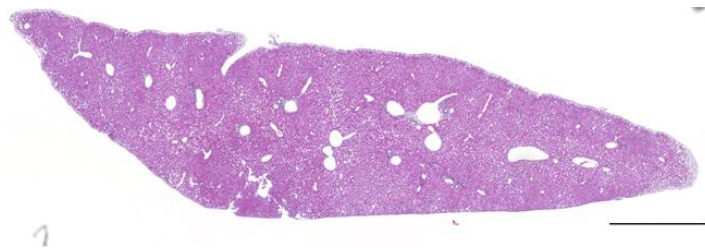


図 12: 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの早期欠失群における Cystic 群の肝臓の HE 染色像

生後 19 日目の Cystic 群のマウスより摘出した肝を用いてパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色を行い肝の表現型について弱拡大で観察した。Cystic 群における *Atp6ap2* 野生型 (左)、欠失群 (右) の代表的な肝組織横断面像を弱拡大で示す。両群間共に、肝嚢胞の程度に明らかな差は無く、嚢胞の形成は乏しかった。スケール: 1mm.

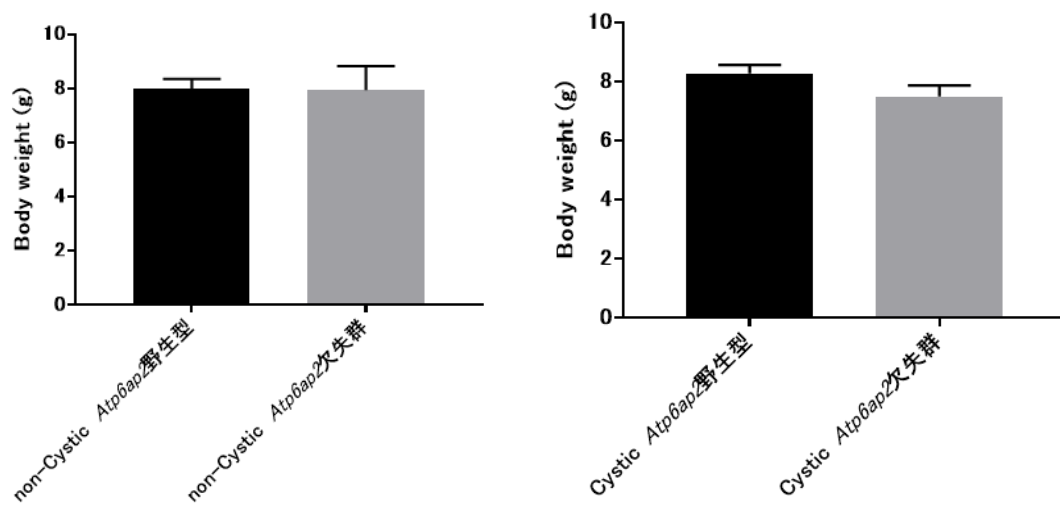


図 13: 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの早期欠失群における, non-Cystic 群及び Cystic 群の体重

non-Cystic 群と Cystic 群のマウスにおいて, 解剖屠殺直前に体重を測定し各群間の有意差検定を行った. non-Cystic 群 (左) 及び Cystic 群 (右) 共に, *Atp6ap2* 野生型と欠失群の体重の間に有意な差はなかった. non-Cystic 群: *Atp6ap2* 野生型 N=3, 欠失群 N=2, Cystic 群: *Atp6ap2* 野生型 N=6, 欠失群 N=8.

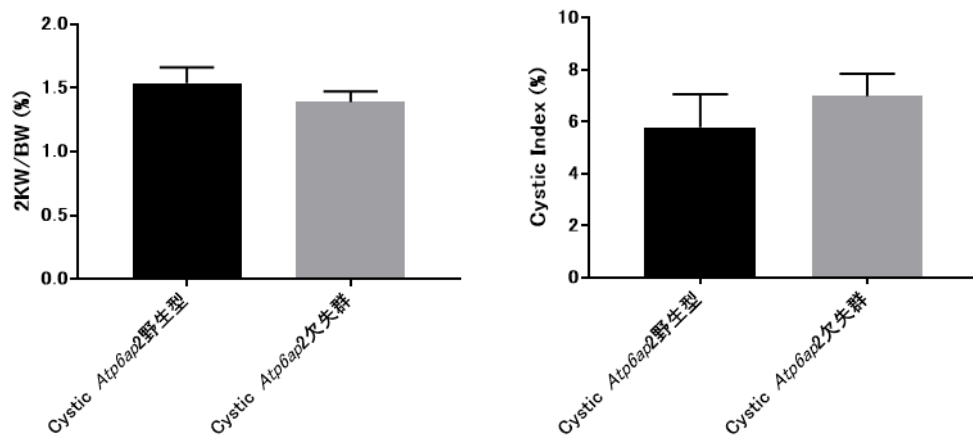


図 14:薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの早期欠失群における,

Cystic 群の 2KW/BW と腎 Cystic Index

腎嚢胞形成の評価のため, Cystic 群の 2KW/BW 及び腎 Cystic Index を測定し比較検討した. Cystic 群 の 2KW/BW と腎 Cystic Index において, *Atp6ap2* 野生型に比較して欠失群は有意な差を認めなかった. 2KW/BW: *Atp6ap2* 野生型 N=6, 欠失群 N=8, Cystic Index:*Atp6ap2* 野生型 N=6, 欠失群 N=8

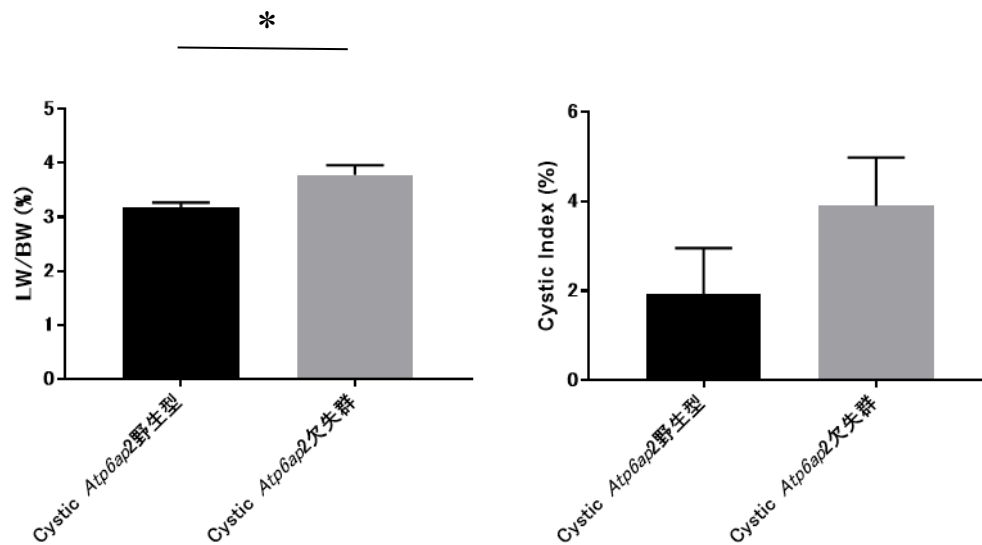


図 15: 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの早期欠失群における, Cystic 群の LW/BW と肝 Cystic Index

肝嚢胞形成の評価のため, Cystic 群の LW/BW 及び肝 Cystic Index を測定し比較検討した. LW/BW は, *Atp6ap2* 野生型に比較して欠失群で有意に増大していた. 肝 Cystic Index では, *Atp6ap2* 欠失群で大きい傾向にあったが有意な差は無かった. LW/BW: *Atp6ap2* 野生型 N=5, 欠失群 N=8, Cystic Index: *Atp6ap2* 野生型 N=6, 欠失群 N=8. * $p < 0.05$.

1.3.2.3 晩期欠失群のマウス表現型

早期欠失群では、腹腔内臓器を中心に臓器の発育に障害があり、腎嚢胞及び肝嚢胞の形成にも *Atp6ap2* 欠失による有意差を認めなかったことから、晩期欠失群での生存と表現型を確認した。pI-pC を生後 15 日目で投与した晩期欠失群は、non-Cystic 群の *Atp6ap2* 欠失群で 14 匹中 7 匹が 33 日以降に死亡し、Cystic 群の *Atp6ap2* 欠失群で 11 匹中 5 匹が生後 29 日目で死亡した。生存したものは 22 週齢で屠殺解剖したが、Cystic 群のコントロールである *Atp6ap2* 野生型のマウスにおいて腎嚢胞の形成が不十分であり、嚢胞腎モデルとして確立しなかった (図 16)。なお、解析数は少ないが、*Atp6ap2* 野生型は肝嚢胞の形成は著明であり、欠失群で少ない傾向にあった (図 17)。

以上より、晩期欠失群の pI-pC の投与条件では長期生存が可能な個体があり *Atp6ap2* 欠失の有害性が緩和された一方で、腎嚢胞の形成が不十分であり嚢胞腎モデルマウスとしては不適であった。これらの結果より、*Atp6ap2* の早期欠失による有害性を減少させ、*Pkd1* の欠失による嚢胞の形成を促進させるために、pI-pC を生後 10 日目から投与することも試みたが、non-Cystic 及び Cystic に関わらず生後 20 日前後で *Atp6ap2* 欠失群のマウスが死亡したため、*Mx1-Cre* マウスを用いたダブルノックアウトマウスの確立は困難と考え、同検討を中断した。

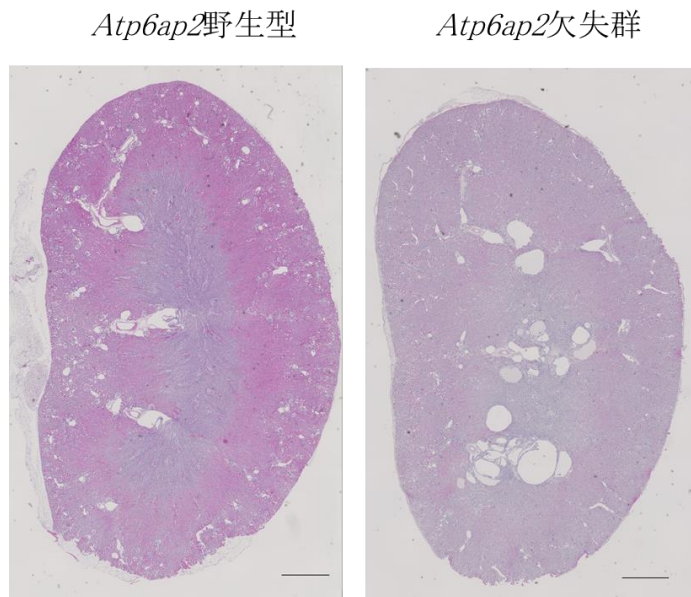
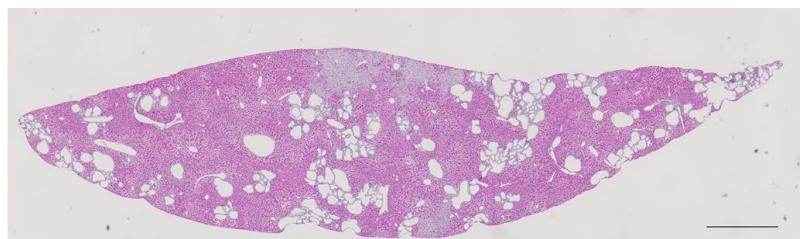


図 16: 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの晩期欠失群における Cystic 群の腎臓の HE 染色像

生後 22 週令の Cystic 群のマウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大で観察した。Cystic 群における *Atp6ap2* 野生型 (左)、欠失群 (右) の代表的な腎組織横断面像を弱拡大で示す。 *Atp6ap2* 野生型において、腎嚢胞の形成が不十分であった。スケール: 1mm.

*Atp6ap2*野生型



*Atp6ap2*欠失群

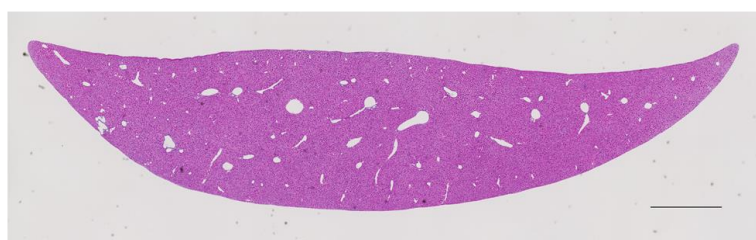


図 17: 薬剤誘導型コンディショナルダブルノックアウトマウスの晩期欠失群における Cystic 群の肝臓の HE 染色像

生後 22 週令の Cystic 群のマウスより摘出した肝を用いてパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色を行い肝の表現型について弱拡大で観察した。Cystic 群における *Atp6ap2* 野生型 (左)、欠失群 (右) の代表的な肝組織横断面像を弱拡大で示す。 *Atp6ap2* 野生型で嚢胞形成が多く、 *Atp6ap2* 欠失群で嚢胞形成が抑制される傾向にあった。スケール: 1mm.

1.4 考察

本研究では、(P)RR の抑制により ADPKD の嚢胞が抑制するという仮説を立てて、腎限局型及び薬剤誘導型 *Pkd1* 及び *Atp6ap2* コンディショナルノックアウトマウスを作製した。しかし、*Ksp-Cre* による胎生期からの腎限局の *Atp6ap2* のノックアウトでは、髄質の尿細管でアポトーシスが誘導され、水腎症の発症も認められた。さらに、*Mx1-Cre* による成長期での *Atp6ap2* のノックアウトは、確認した範囲では特に、腸管を中心とした腹腔内臓器の障害が目立ち、早期に死亡するマウスも多く認められた。これは、*Atp6ap2* が器官の発育形成に必須なタンパクであるためであり(Song et al., 2016, Ramkumar and Kohan, 2016)、成長期での *Atp6ap2* の欠失は器官の発育形成に有害であると考えられた。特に、ネフロン発育形成にも、(P)RR は必須であることが報告されており、既報においても尿管芽での(P)RR ノックアウトマウスは尿管芽の分枝が減少しアポトーシスが亢進されたことが報告されている(Song et al., 2013)。本研究の解剖で摘出できた組織の所見からは、*Atp6ap2* の欠失で腎嚢胞や肝嚢胞の形成に有意な差は示されず、また、*Atp6ap2* 欠失の有害性により嚢胞形成への影響を評価することは困難であると考えられた。

また、本研究で用いた *Mx1-Cre* を用いた薬剤誘導型コンディショナルノックアウトマウスの問題点としては、表現型の個体差が大きい点がある。晩期欠失群において比較的早期に死亡する群や長期生存が可能な群に分かれたことも、*Atp6ap2* の全身で起こるランダムなノックアウトの程度に影響したと考えられた。さらに、このモデルマウスの嚢胞形成の程度は、pI-pC による *Pkd1* の欠失される時期や程度に左右され、特に、生後 14 日以降の *Pkd1* ノックアウトでは肝嚢胞の形成は著明となるが、腎嚢胞の形成は乏しいことが報告されている(Leuenroth et al., 2010)。 *Atp6ap2* の早期欠失の有害な影響を減少させるためにノックアウトの時期を遅らせる晩期欠失群も作製したが、既報通り腎嚢胞の形成は不十分であり、目的とした *Pkd1* 及び *Atp6ap2* のダブルノックアウトマウスの確立は困難であった。

本研究で着目した(P)RR 及び Wnt/ β カテニン経路は、膵癌(Shibayama et al., 2015)や大腸癌(Wang et al., 2019)、神経膠腫(Kouchi et al., 2017)等の癌の進行に関連すると報告されている。特に、膵癌患者血清で可溶性(P)RR が高値であり、膵癌組織においても(P)RR の発現が亢進されていることが明らかになり、膵癌細胞で *Atp6ap2* をノックダウンすることで Wnt/ β カテニン経路を抑制し、膵癌細胞の増殖を抑えられることが報告されている(Shibayama et al., 2015)。従って、(P)RR は器官形成に重要な因子であることから、ノックアウト以外の手法で(P)RR を抑制することができれば、Wnt/ β カテニン経路の亢進が関与している病態に対し、治療効果を発揮する可能性がある。本研究の手法では、ADPKD における(P)RR 抑制効果を検証することはできなかったが、今後、*Pkd1*^{-/-}細胞で

の *Atp6ap2* のノックダウンや、薬剤などの手法で(P)RR の抑制を行うことで、ADPKD の病態に対する影響を検討できる可能性があり、今後更なる検討を要する。

第二章

L 型アミノ酸トランスポーター1 が 常染色体優性多発性嚢胞腎の嚢胞形成に 与える影響

2.1 緒言

第一章では、ADPKD の病態に関連する Wnt/ β カテニン経路に着目し Atp6ap2 の遺伝的抑制効果を検討することで、ADPKD における(P)RR の役割を明らかにすることを試みた。しかし、ADPKD の病態には、Wnt/ β カテニン経路のみならず、MAPK/ERK 経路(Nagao et al., 2003)や mTOR 経路(Kotsis et al., 2013)など、複数の細胞シグナル経路が活性化していることが報告されており、多面的な角度から病態を解明することは、ADPKD の治療的戦略を検討するうえで重要である。そこで第二章では、ADPKD に深く係わる mTOR 経路がアミノ酸感知機構に関与する(Efeyan et al, 2015)ことに着目し、アミノ酸供給と ADPKD との関連を明らかにするために、アミノ酸輸送体の L 型アミノ酸トランスポーター1 (L-type amino acid transporter 1: LAT1)が ADPKD の嚢胞形成に与える影響について検討した。

慢性腎臓病患者に対するタンパク制限食の効果を検討したメタ解析において、タンパク制限食により腎死が減少したことが報告され、腎保護療法の一つとしてタンパク制限食が推奨されている(Fouque and Laville, 2009)。しかし、ADPKD 患者においては、タンパク制限食の腎機能障害進行を抑制するエビデンスは十分ではなく、積極的に推奨はされていない。一方で、ADPKD モデル動物を用いた研究では、食事療法が病状の進行抑制に有効であったという複数の報告があり、食事制限が潜在的に ADPKD の治療的介入になる可能性が示唆されている(Maditz et al., 2013)。DBA/2FG-*pcy* マウス(Tomobe et al., 1994)及び Han:SPRD-*cy* ラット(Ogborn and Sareen, 1995)を用いたタンパク制限の有効性を検討する研究では、嚢胞の進行抑制効果が示されており、さらに総カロリーを 10-40%減量させた食事では、*Pkd1*^{RC/RC} マウスや *Pkd2*^{WS25/-} マウスにおいて mTOR 経路の抑制や Liver kinase B1 (LKB1)/AMP-activated protein kinase (AMPK) 経路の亢進を介して嚢胞形成を抑制させることが示された(Warner et al., 2016)。一方、Yamamoto ら(Yamamoto et al., 2017)による先行研究において、必須アミノ酸である分岐鎖アミノ酸の負荷が、*Pkd1*^{flx/flx}: *Mx1*^{Cre} マウスの嚢胞形成を mTOR 経路及び MAPK/ERK 経路の亢進を介して進行させることが明らかになった。すなわち、これらの検討により ADPKD の病態が栄養状態による代謝経路の変動と密接に係わることが示唆された。しかし、栄養状態により嚢胞形成が調整される正確なメカニズムは十分に解明されていない。

そこで、本研究では、腎嚢胞上皮細胞に高発現していることが明らかになったアミノ酸輸送体である LAT1(Yamamoto et al., 2017)に着目した。LAT1 は、SLC7A5 遺伝子にコードされている 12 回膜貫通型のタンパクであり、1 回膜貫通タンパクである 4F2hc と結合し、中性アミノ酸輸送体として機能する。その発現の調節メカニズムは未だ明らかになっていないものの、多くのヒト癌組織で高発現していることが知られている(Hayashi and Anzai, 2017, Scalise et al., 2018)。また、ヒト癌組織における LAT1 の発現レベルは癌患者の予後と関連していることも報告されており(Ichinoe et al., 2011,

Yanagisawa et al., 2012), ヒト癌の発生と進行に伴う代謝需要の増加と LAT1 の発現レベルが関連していることが推察されている. 以上のことから, LAT1 は新規抗腫瘍薬の標的タンパクとして注目されており, 選択的 LAT1 阻害薬による mTOR 経路の抑制を介した抗腫瘍効果が複数報告されている(Rosilio et al., 2015, Enomoto et al., 2019, Choi et al., 2017). そして興味深いことに, ADPKD モデルマウスの腎嚢胞上皮細胞では, 正常細胞に普遍的に発現している L-type amino acid transporter 2 と比較して, LAT1 が優位に発現していることが明らかになり(Yamamoto et al., 2017), 嚢胞形成に深く関与していることが推察された. しかし, ADPKD の嚢胞形成における LAT1 の役割は明らかになっておらず, ADPKD における選択的 LAT1 阻害薬の有効性も不明である. そこで本研究では, 腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスである *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスを作製し, 嚢胞腎モデルマウスにおいて, 遺伝的に LAT1 を欠失させることで嚢胞形成における LAT1 の役割を検討した.

そして, 作製した *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスは, コントロールである *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスよりも腎嚢胞が増大することが明らかになったことから, 一つの仮説を立てた. LAT1 は, 腎嚢胞上皮細胞に有意に発現しているアミノ酸トランスポーターであるために(Yamamoto et al., 2017), 今回作製した *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスは, 嚢胞上皮細胞内へのアミノ酸の取り込みが不足することでアミノ酸欠乏ストレスに暴露されており, それが嚢胞増大のメカニズムに関連しているのではないかと, という仮説である. 哺乳類細胞では, 細胞内のアミノ酸レベルを感知する機構として代表的な細胞シグナル経路が二つ知られている. 嚢胞増大にも深く係わり, アミノ酸の充足を感知し同化作用により細胞の成長や増殖に寄与する mTOR 経路とアミノ酸枯渇を感知しストレス応答として活性化する General control non-derepressible-2/activating transcription factor 4 (GCN2/ATF4) 経路である(Efeyan et al., 2015, Gallinetti et al., 2013). さらに, 興味深いことに GCN2/ATF4 経路は, 栄養の需要が高まることでアミノ酸欠乏状態にある癌組織において, 腫瘍細胞の生存や増殖に重要であるという報告もある (Ye et al., 2010). そして, ヒト皮膚線維芽細胞ではアミノ酸欠乏状態に陥ると MAPK/ERK 経路が亢進することが示されており (Franchi-Gazzola et al., 1999), 細胞を取り巻くアミノ酸レベルが変化すると, 細胞シグナル経路が影響されることが報告されている.

そこで, 今回 *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスの嚢胞増大の機序には, このアミノ酸感知機構, 特に GCN2/ATF4 経路の亢進や MAPK/ERK 経路の亢進が寄与していると仮説を立て, 免疫組織染色およびウェスタンブロッティング法で検討した.

最後に, 選択的 LAT1 阻害薬である JPH203 を薬剤誘導型コンディショナルノックアウトマウスである *Pkd1^{fllox/fllox}: Mx-1 Cre* マウスに投与し, ADPKD の嚢胞形成抑制効果について検討した. これらのマウスを特定時期に屠殺解剖し, 摘出した嚢胞腎組織を用いて組織学的な検討を行い, 免疫組織染色で細胞増殖やアポトーシスを評価した. また, 選択的 LAT1

阻害薬の短期投与群において腎嚢胞形成の縮小効果を得られたため、細胞増殖シグナル経路として mTOR 経路及び GCN2/ATF4 経路, MAPK/ERK 経路の免疫組織染色及びウェスタンブロッティング法を行い嚢胞形成抑制のメカニズムを検討した.

2.2 実験方法

2.2.1 腎限局型 *Pkd1* 及び *Slc7a5* ノックアウトマウスの検討

2.2.1.1 腎限局型コンディショナルダブルノックアウトマウスの作製

Shibazaki らが作製した腎限局型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスである *Pkd1^{fllox/+}:Ksp-Cre* マウス (Shibazaki et al., 2008) と杏林大学薬理学教室 櫻井裕之先生より供与された *Slc7a5^{fllox/fllox}* マウスを交配させ、*Pkd1^{fllox/+}:Slc7a5^{fllox/+}:Ksp-Cre* マウスを作製した。さらに、*Pkd1^{fllox/+}:Slc7a5^{fllox/+}:Ksp-Cre* マウス同士を交配させて、ダブルノックアウトマウスである *Pkd1^{fllox/fllox}:Slc7a5^{fllox/fllox}:Ksp-Cre* マウスを作製した。以下、*Pkd1* が欠失し嚢胞を形成するマウスを Cystic 群と表す。*Slc7a5* 野生型である *Pkd1^{fllox/fllox}:Slc7a5^{+/+}:Ksp-Cre* マウスは、Cystic 群のコントロールとして使用した。また、嚢胞を形成しない (non-Cystic) マウスにおける *Slc7a5* ノックアウトの影響を評価するため、*Pkd1^{fllox/+}:Slc7a5^{fllox/fllox}:Ksp-Cre* または *Pkd1^{+/+}:Slc7a5^{fllox/fllox}:Ksp-Cre* マウスも作製した。なお、non-Cystic マウスのコントロールとして、*Ksp-Cre* を持たないマウスや、*Pkd1^{fllox/+}:Slc7a5^{+/+}:Ksp-Cre* マウス、*Pkd1^{+/+}:Slc7a5^{+/+}:Ksp-Cre* マウスを使用した。マウスの飼育環境は、室温 25.0 °C 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 (承認番号:15-0109)。これらのノックアウトマウスは、生後 8 日齢または生後 11 日齢に屠殺解剖し、下記に記す腎の表現型や免疫組織染色、ウェスタンブロッティング法等により解析を行った。

2.2.1.2 マウス表現型の解析

マウスの表現型の解析として、生後 11 日齢で体重、腎重量を測定し、2KW/BW を用いて比較検討した。また、病理組織像を用いて腎臓組織の横断面面積における嚢胞面積の占める割合と定義される Cystic Index を評価した。Cystic Index は WinRoof (Mitani corporation) を用いて測定した。

2.2.1.3 生化学検査

生後 11 日齢で屠殺解剖する際に右心房より採血を行い、尿素窒素測定用キットである UN-ML (serotec Co., Ltd.) を用いて血清尿素窒素 (Blood urea nitrogen: BUN) を測定した。

2.2.1.4 病理組織学的評価

生後 11 日齢で屠殺解剖する際に 4 % PFA にて還流固定を行い、腎臓を摘出した。パラフィン包埋切片を作成し、HE 染色を行った。光学顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE) にて病理組織標本を観察し、組織像を撮影した。

2.2.1.5 免疫組織染色 (酵素抗体法)

前述の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、マイクロウェーブを 500 W の出力で 5 分間作動させる操作を 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 分間ブロッキングを行った後、一次抗体として、抗リン酸化 mTOR (Ser2448) 抗体, 抗リン酸化 S6 ribosomal protein (S6RP) (Ser235/236) 抗体, 抗リン酸化 ERK (Thr202/Tyr204) 抗体, 抗リン酸化 Eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) α (Ser51) 抗体 (以上 Cell Signaling Technology), 抗リン酸化 General control non-derepressible-2 (GCN2) (Thr899) 抗体 (Bioss) を用いて 4 °Cで一晩反応させた。その後、ビオチン標識二次抗体 (Nichirei Biosciences) にて室温 60 分間処理し、Horseradish peroxidase (HRP) 標識streptavidinを 15 分間反応させ、洗浄後に 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) で発色した。その後、ヘマトキシリンで対比染色した。

2.2.1.6 細胞増殖及びアポトーシスの解析

生後 8 日齢及び生後 11 日齢で屠殺解剖し摘出した腎組織を用いて、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) 染色を行った。腎嚢胞上皮細胞 10000 個に対する PCNA 陽性細胞数として示した。染色においては、抗 PCNA 抗体 (Sigma-Aldrich) およびヒストファインマウスステインキット (ニチレイバイオサイエンス) を使用した。生後 11 日齢で屠殺解剖して摘出した腎組織を用いて、アポトーシスの解析として TUNEL 染色を行った。腎嚢胞上皮細胞 10000 個に対する TUNEL 陽性細胞数を示した。TUNEL 染色はMEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.)を用い、核を染める DAPI 染色には、VECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories) を用いた。

2.2.1.7 ウェスタンブロッティング法による組織タンパク発現の解析

1) 組織タンパク抽出とタンパク濃度測定

生後 11 日齢で摘出した腎臓をタンパク分解酵素阻害薬 (Roche Life Science) および脱リン酸化酵素阻害薬 (Sigma-Aldrich) を添加したタンパク抽出用緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) 内でホモジナイズ後, 4 °C, 15000 rpm, 5 分間の遠心分離を施行し, 上清をタンパク抽出液として使用した. なお, Activating transcription factor 4 (ATF4) の検討においては, 前述のタンパク抽出用緩衝液として RIPA バッファー (25 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)) (Thermo scientific) を用いてタンパク抽出液を得た. DC protein Assay キット (Bio-Rad Laboratories) を用いて, タンパク抽出液のタンパク濃度を定量した. 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 % SDS, 9.3 % dithiothreitol (DTT), 0.2 % bromophenol blue (BPB)) を添加し, 85 °Cで 5 分間加熱処理し, 電気泳動用のサンプルに調整した.

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 ウェルあたり 100 µg のタンパク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タンパク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/m² 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% Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate) にて 60 分間ブロッキングを行った後に, 各一次抗体を 4 °Cで一晩反応させた. 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 分間反応させた. 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 p70 S6 kinase (p70S6K) (Thr389) 抗体, 抗 p70S6K 抗体, 抗リン酸化 ERK (Thr202/Try204) 抗体, 抗 ERK 抗体, 抗リン酸化 eIF2α 抗体 (Ser51), 抗 eIF2α 抗体, 抗 ATF4 抗体, 抗リン酸化 AMPKα (Thr172) 抗体, 抗 AMPKα 抗体 (以上 Cell Signaling Technology), 抗 Actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 LAT1 抗体 (杏林大学) を使用した.

3) タンパク発現量の定量

可視化したタンパクのバンドの濃度は Image J software (National Institutes of Health) を使用して定量化し、各検体を各々の Actin タンパク発現量で補正した。リン酸化タンパクに関しては、リン酸化タンパクと非リン酸化タンパクの総和である総タンパク発現量においても補正した。

2.2.1.8 選択的 MEK1/2 阻害薬投与実験

Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre マウスにおける、MAPK/ERK 経路抑制による嚢胞形成への影響を検討するため、MAPK 経路の酵素である MEK1 及び MEK2 の選択的阻害薬である U0126 (Sigma-Aldrich) の投与実験を行った。*Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスに対して、生理食塩水で希釈した 20% Dimethyl sulfoxide (DMSO) を溶媒とする U0126 (32µg/g (BW)) を生後 5 日から 9 日まで腹腔内投与した。コントロール群に対しては、溶媒である 20% DMSO を生後 5 日から 9 日まで腹腔内投与した。両群のマウスは、生後 9 日齢で屠殺解剖して腎を摘出し、MEK1/2 抑制や細胞内シグナル経路を確認するためにウェスタンブロッティング法を行った。また、病理組織学的検討のため、前述のように生後 11 日齢で屠殺解剖する際に 4 % PFA で還流固定を行い、腎臓を摘出した。その後、パラフィン包埋切片を作成し、HE 染色を行った。

また、*Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{+/-}: Ksp-Cre* マウスにおける U0126 投与による嚢胞形成への影響も確認するため、U0126 及び溶媒の 20% DMSO をそれぞれ同条件で腹腔内投与し、生後 11 日齢で病理組織学的検討を行った。

2.2.1.9 統計学的解析

全てのデータは、Mean±SEM で表記した。*p* 値は Mann-Whitney 検定を行い算出し、GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software) を使用した。*p* 値が 0.05 未満を有意とした。

2.2.2 選択的 LAT1 阻害薬投与実験

2.2.2.1 薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスの作製

Pkd1^{flax/flax} マウス (Shibazaki et al., 2008) と *Mx1-Cre* マウス (The Jackson Laboratory) を交配し, *Pkd1*^{flax/+}:*Mx1-Cre* マウスを作製した. さらに, *Pkd1*^{flax/+}:*Mx1-Cre* マウスを *Pkd1*^{flax/flax} マウスと交配し, *Pkd1*^{flax/flax}:*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 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* 遺伝子を発現させ, *Pkd1* を任意の時期で欠失させた. *Pkd1*^{flax/flax}:*Mx1-Cre* マウスに対して生後 5 日目より 10μg/g (BW) の pI-pC を連続 6 日間腹腔内投与した. コントロールとして使用した non-Cystic マウスには *Cre* のない *Pkd1*^{flax/flax} マウスを用いた. マウスの飼育環境は, 室温 25.0 °C 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(承認番号:15-0109).

2.2.2.2 選択的 LAT1 阻害薬投与

LAT1 阻害による嚢胞形成への影響を検討するために, pI-pC で生後 5 日目より *Pkd1* を欠失させた *Pkd1*^{flax/flax}:*Mx1-Cre* マウスを用いて, 選択的 LAT1 阻害薬である JPH203 (J-Pharma Co., Ltd.) の投与実験を行った. JPH203 及び Placebo として投与した Cyclodextrin は杏林大学薬理学教室 櫻井裕之先生により供与された. 50μg/g (BW) の JPH203 を生後 12 日から 34 日まで腹腔内に隔日投与し, 生後 35 日に屠殺解剖して腎と肝の表現型を Placebo 群と比較検討する短期投与群と, 同量の JPH203 を生後 12 日から 54 日まで腹腔内に隔日投与し, 生後 56 日に屠殺解剖して腎と肝の表現型を Placebo 群と比較検討する長期投与群に分けて検討した.

2.2.2.3 マウス表現型の解析

マウスの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. また, 病理組織像を用いて腎臓組織及び肝臓組織の横断面面積における嚢胞面積の占める割合と定義される Cystic Index を評価した. Cystic Index は WinRoof (Mitani corporation) を用いて測定した.

2.2.2.4 生化学検査

生後 35 日齢及び生後 56 日齢で屠殺解剖する際に右心房より採血を行い、尿素窒素測定用キットである UN-ML(serotec Co., Ltd.) を用いて BUN を測定した。なお、同じ日齢で屠殺した non-Cystic マウスにおいても、同様の手順で BUN を測定した。

2.2.2.5 病理組織学的評価

生後 35 日齢及び生後 56 日齢で屠殺解剖する際に 4 % PFA にて還流固定を行い、腎臓及び肝臓を摘出した。パラフィン包埋切片を作成し、HE 染色を行った。光学顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE) にて病理組織標本を観察し、組織像を撮影した。

2.2.2.6 免疫組織染色 (酵素抗体法)

パラフィン切片を前述と同様に脱パラフィンし、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、マイクロウェーブを 500 W の出力で 5 分間作動させる操作を 3 回を行い抗原賦活化処理を行い、10%ヤギ血清にて 60 分間ブロッキングを行ったのち、抗リン酸化 S6RP (Ser235/236) 抗体、抗リン酸化 ERK (Thr202/Tyr204) 抗体 (以上 Cell Signaling Technology), 抗リン酸化 GCN2 (Thr899)抗体 (Bioss)にて 4 °C で一晩反応させた。その後、ビオチン標識二次抗体 (Nichirei Biosciences) にて室温 60 分間処理し、HRP 標識streptavidinを 15 分間反応させ、洗浄後に DAB で発色した。最後にヘマトキシリンで対比染色した。

2.2.2.7 細胞増殖及びアポトーシスの解析

嚢胞上皮細胞の増殖の評価として、酵素抗体法に基づき PCNA 染色を行った。全腎嚢胞上皮細胞数に対する PCNA 陽性細胞数の割合(%)として示した。染色においては、抗 PCNA 抗体 (Sigma-Aldrich) およびヒストファインマウスステインキット (ニチレイバイオサイエンス) を使用した。アポトーシスの解析では TUNEL 染色を行い、全腎嚢胞上皮細胞に対する TUNEL 陽性細胞数の割合(%)として示した。TUNEL 染色は MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) を用い、DAPI 染色には、VECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories) を用いた。

2.2.2.8 ウェスタンブロッティング法による組織タンパク発現の解析

1) 組織タンパク抽出とタンパク濃度測定

マウスより摘出した腎臓をタンパク分解酵素阻害薬 (Roche Life Science) および脱リン酸化酵素阻害薬 (Sigma-Aldrich) を添加したタンパク抽出用緩衝液 (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 °C, 15000 rpm, 5 分間の遠心分離を施行し, 上清をタンパク抽出液として使用した. DC protein Assay キット (Bio-Rad Laboratories) を用いて, タンパク抽出液のタンパク濃度を定量した. 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 % SDS, 9.3 % DTT, 0.2 % BPB) を添加し, 85 °Cで 5 分間加熱処理し, 電気泳動用のサンプルに調整した.

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 ウェルあたり 100 μ g のタンパク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タンパク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/m² 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. なお, リン酸化 mTOR 及び mTOR の検出においては, 7.5%アクリルアミドゲルを使用し, タンク式ブロッティング装置 (Bio-Rad Laboratories) を用いて 100V の定電圧設定で転写した. 転写後は 5 % スキムミルクを含む TBS-T にて 60 分間ブロッキングを行った後に, 各一次抗体を 4 °C で一晩反応させた. 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 分間反応させた. 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. 一次抗体としては, 抗リン酸化 mTOR (Ser2448) 抗体, 抗 mTOR 抗体, 抗リン酸化 p70S6K (Thr389) 抗体, 抗 p70S6K 抗体, 抗リン酸化 S6RP 抗体, 抗 S6RP 抗体, 抗リン酸化 ERK (Thr202/Try204) 抗体, 抗 ERK 抗体, 抗リン酸化 eIF2 α 抗体, 抗 eIF2 α 抗体 (以上すべて Cell Signaling Technology より購入), 抗 Actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を使用した.

3) タンパク発現量の定量

可視化したタンパクのバンドの濃度は Image J software (National Institutes of Health) を使用して定量化し, 各検体を各々の Actin タンパク発現量で補正した. リン酸化タンパクに関しては, リン酸化タンパクと非リン酸化タンパクの総和である総タンパク発現量においても補正した.

2.2.2.9 統計学的解析

全てのデータは, Mean $\pm$ SEM で表記した. p 値は Mann-Whitney 検定を行い算出し, GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software) を使用した. p 値が 0.05 未満を有意とした.

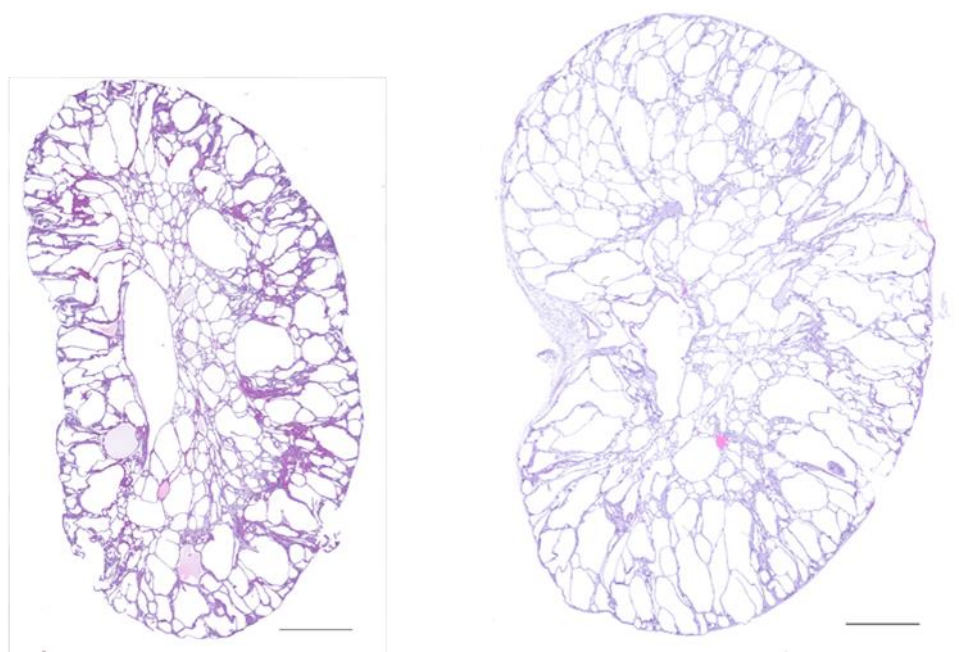
2.3 実験結果

2.3.1 腎限局型 *Pkd1* 及び *Slc7a5* ノックアウトマウスの検討

2.3.1.1 マウス表現型の解析及び生化学検査

生後 11 日齢の Cystic 群で *Slc7a5* がワイルドタイプである *Pkd1^{flox/flox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウス (*Slc7a5* 野生型) と, *Slc7a5* がノックアウトされている *Pkd1^{flox/flox}: Slc7a5^{flox/flox}: Ksp-Cre* マウス (*Slc7a5* 欠失群) において, 各群を代表する腎組織の横断面像を下記に示す (図 18). 両群とも, 嚢胞の形成は著しく認められたが, 特に *Pkd1^{flox/flox}: Slc7a5^{flox/flox}: Ksp-Cre* マウスにおいて腎は腫大していた. 生後 11 日齢のマウス体重に関しては Cystic 群の各群の間で差は認めなかった (*Slc7a5* 野生型: 5.60 ± 0.18 g vs. *Slc7a5* 欠失群: 5.75 ± 0.14 g) (図 19). しかし, 2KW/BW は, *Pkd1^{flox/flox}: Slc7a5^{flox/flox}: Ksp-Cre* マウスで有意に高値であり (*Slc7a5* 野生型: 13.05 ± 0.85 % vs. *Slc7a5* 欠失群: 15.52 ± 0.64 %, $p < 0.05$) (図 20), Cystic Index も同群で有意に大きかった (*Slc7a5* 野生型: 65.8 ± 1.62 % vs. *Slc7a5* 欠失群: 73.1 ± 1.79 %, $p < 0.01$) (図 21). 腎機能に関しては, BUN は両群間で有意な差は認めなかった (*Slc7a5* 野生型: 206.8 ± 24.4 mg/dl vs. *Slc7a5* 欠失群: 200.8 ± 22.6 mg/dl) (図 22). なお, non-Cystic 群における *Slc7a5* ノックアウトの影響に関しては, *Slc7a5* 欠失群と *Slc7a5* 野生型の間で体重に差はなく (図 23), 発育や繁殖に影響は認められなかった. また, 腎の形成においても *Slc7a5* 欠失群で明らかな異常は呈さなかった (図 24).

さらに, *Slc7a5* のノックアウトにより LAT1 の発現が抑制されていることを確かめるために, non-Cystic 群と Cystic 群の *Slc7a5* 野生型及び欠失群についてウェスタンブロッティング法を行った (図 25). LAT1 の発現は, non-Cystic 群の *Slc7a5* 野生型及び欠失群共に, Cystic 群の *Slc7a5* 野生型に比較して少なかった. Cystic 群の *Slc7a5* 欠失群では LAT1 はほぼ発現していないことが確かめられた.



Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre

Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre

図 18:腎限局型 *Pkd1* 及び *Slc7a5* ダブルノックアウトマウスの腎臓の HE 染色像

生後 11 日齢の *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスと、コントロールである *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作成し、HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大で観察した。*Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウス (右) と、コントロールである *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウス (左) の代表的な組織横断面像を示す。*Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスの腎は、コントロールに比較して腫大している。スケール:1mm.

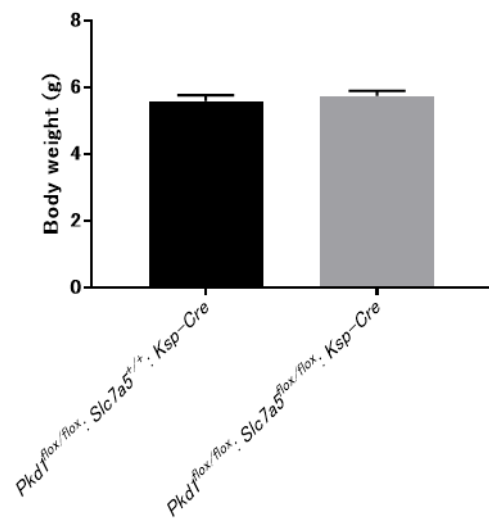


図 19: 生後 11 日齢における Cystic 群の体重

Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre マウスと、コントロールである *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウスにおいて、解剖屠殺する直前に体重を測定し各群間の有意差検定を行った。各群の間に有意差を認めなかった。 *Slc7a5* 野生型: N=12, *Slc7a5* 欠失群: N=13.

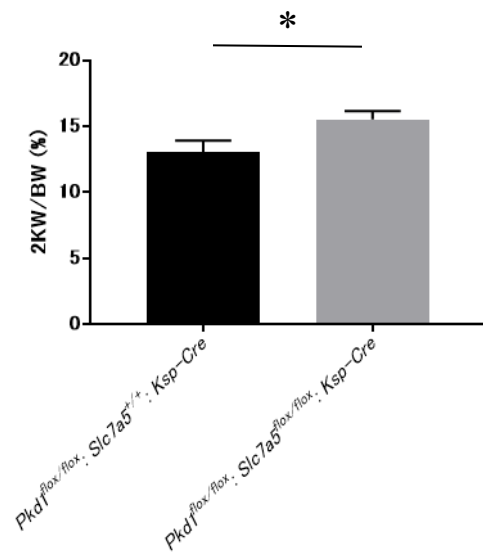


図 20: 生後 11 日齢における Cystic 群の 2KW/BW

腎嚢胞形成の評価のため, Cystic 群の 2KW/BW を算出し, 各群間で比較検討した. 2KW/BW は, *Pkd1^{lox/lox}; Slc7a5^{lox/lox}; Ksp-Cre* マウスにおいて有意に高値であった. *Slc7a5* 野生型: N=12, *Slc7a5* 欠失群: N=13. * $p < 0.05$.

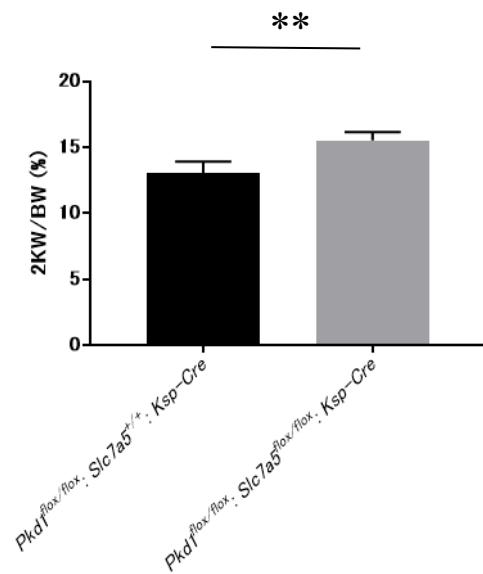


図 21: 生後 11 日齢における Cystic 群の Cystic index

腎嚢胞形成の評価のため, Cystic 群の腎 Cystic Index を測定し, 各群間で比較検討した.

Cystic index は, *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスにおいて, 有意に高値であった.

Slc7a5 野生型: N=12, *Slc7a5* 欠失群: N=13. ** $p < 0.01$.

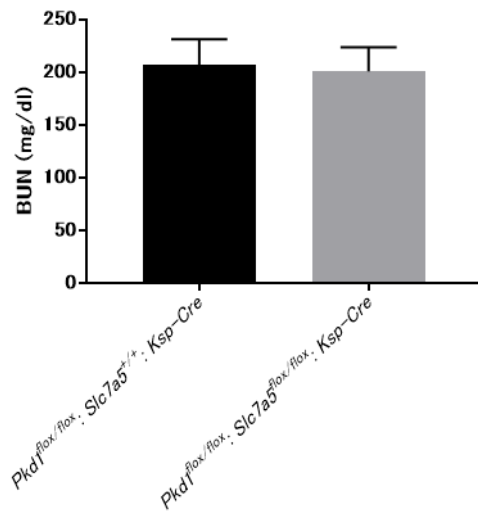


図 22: 生後 11 日齢における Cystic 群の腎機能 (BUN)

Cystic 群の各群のマウスより採取した血清を用いて BUN を測定し、各群間で比較検討した。BUN は *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスの両群間で有意な差を認めなかった。 *Slc7a5* 野生型: N=7, *Slc7a5* 欠失群: N=8.

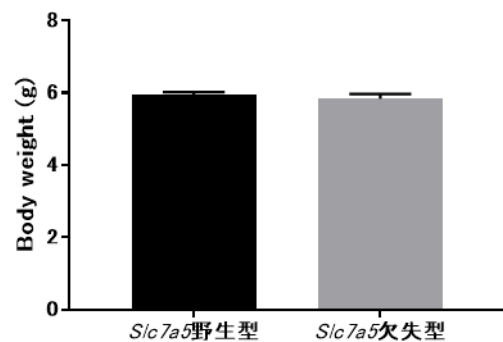


図 23: non-Cystic マウスにおける *Slc7a5* のノックアウトの影響 (体重)

生後 11 日齢の non-Cystic 群の各群のマウスを解剖屠殺する直前に体重を測定し、各群間で比較検討した. non-Cystic マウスにおける *Slc7a5* 野生型と *Slc7a5* 欠失群の両群間で体重に差を認めなかった. *Slc7a5* 野生型: N=8, *Slc7a5* 欠失群: N=8.

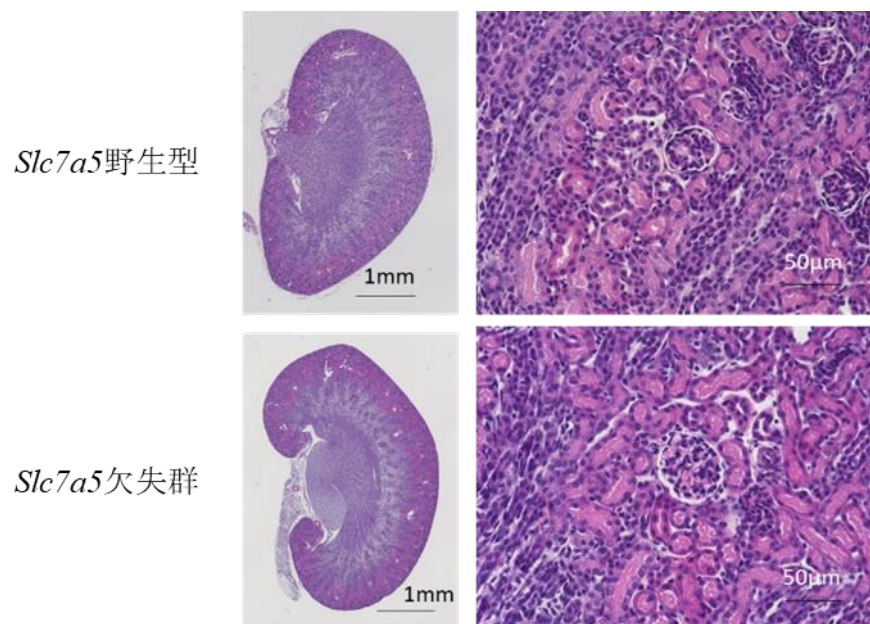


図 24: non-Cystic マウスにおける *Slc7a5* ノックアウトの影響（組織学的所見: HE 染色）

生後 11 日齢の non-Cystic マウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作成し, HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大及び強拡大で観察した. non-Cystic 群の *Slc7a5* 野生型 (上) と *Slc7a5* 欠失群 (下) の代表的な組織横断面像と拡大図を示す. *Slc7a5* 野生型と *Slc7a5* 欠失群の両群間で腎の形成に差を認めなかった.

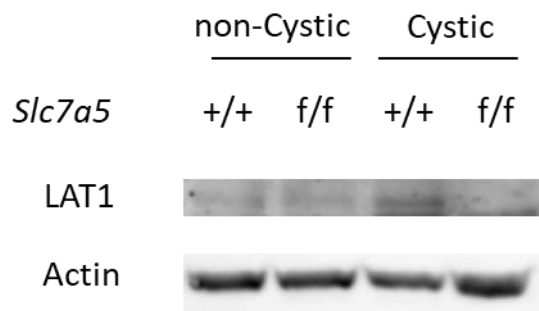


図 25: non-Cystic 群と Cystic 群の LAT1 の発現

生後 11 日齢の non-Cystic 群と Cystic 群のマウスから摘出した腎よりタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法により LAT1 のタンパク発現量を評価した。LAT1 の発現は、non-Cystic 群の *Slc7a5* 野生型及び欠失群共に、Cystic 群の *Slc7a5* 野生型に比較して少なかった。Cystic 群の *Slc7a5* 欠失群では LAT1 はほぼ発現していないことが確かめられた。

2.3.1.2 細胞増殖及びアポトーシスの解析

腎嚢胞上皮細胞における細胞増殖の評価として PCNA 染色を，腎嚢胞上皮細胞のアポトーシスの評価として TUNEL 染色を施行した (図 26, 27). 嚢胞上皮細胞 10000 個あたりにおける各種陽性細胞数をそれぞれ計測した. 生後 8 日齢における PCNA 染色では，*Pkd1^{flx/flx}:Slc7a5^{flx/flx}:Ksp-Cre* マウスにおいて PCNA 陽性細胞数は有意に多かった (*Slc7a5* 野生型:1605±423.1 個 vs *Slc7a5* 欠失群:3652±169.2 個, $p<0.01$). 生後 11 日齢における PCNA 陽性細胞数は *Pkd1^{flx/flx}:Slc7a5^{flx/flx}:Ksp-Cre* マウスで多い傾向にあるものの，*Pkd1^{flx/flx}:Slc7a5^{+/+}:Ksp-Cre* マウスと有意差はなかった (*Slc7a5* 野生型:2729±358.8 個 vs *Slc7a5* 欠失群:3318±391.9 個) (図 28). 一方，TUNEL 陽性細胞数は，*Pkd1^{flx/flx}:Slc7a5^{flx/flx}:Ksp-Cre* マウス群で有意に多かった (*Slc7a5* 野生型: 41.1±7.8 個 vs *Slc7a5* 欠失群: 86.1±19.3 個, $p<0.05$). (図 29).

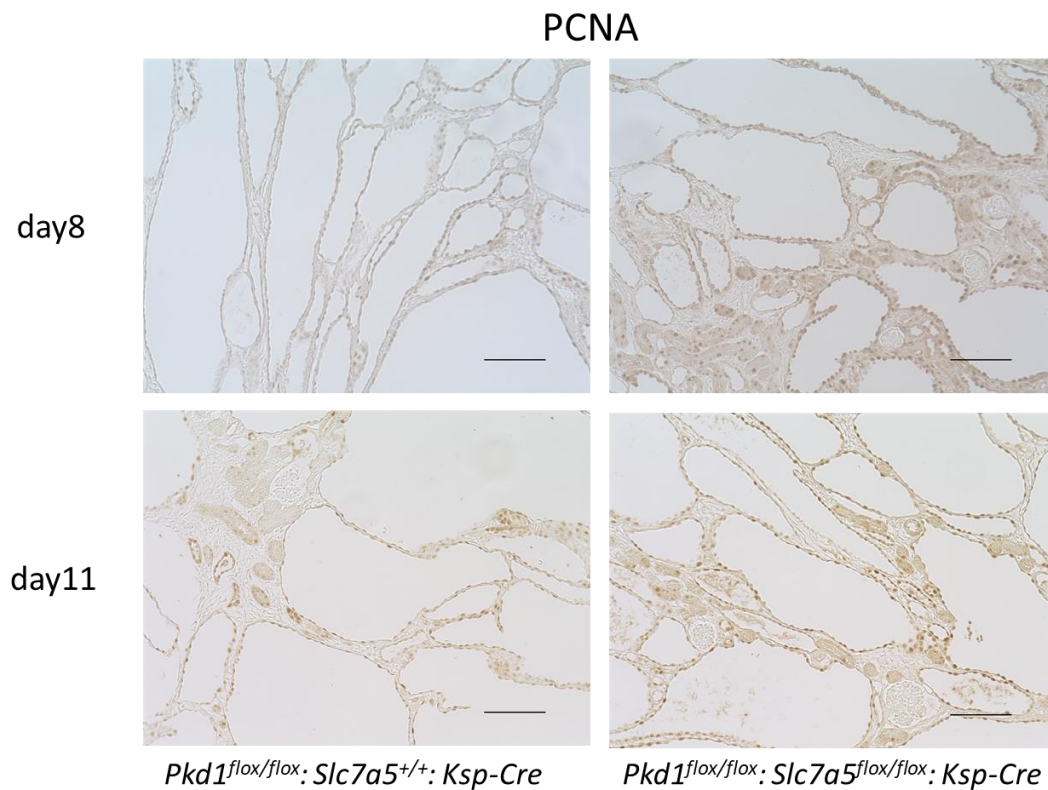


図 26 : PCNA 染色による腎嚢胞上皮細胞の細胞増殖能の評価

生後 8 日齢及び生後 11 日齢の *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウスと *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスより得た腎組織切片を用いて PCNA 染色を行った. 嚢胞上皮細胞における茶色に染まる PCNA 陽性細胞を観察した. 各群の代表的な PCNA 染色像を提示する. スケール : 100 μ m.

TUNEL

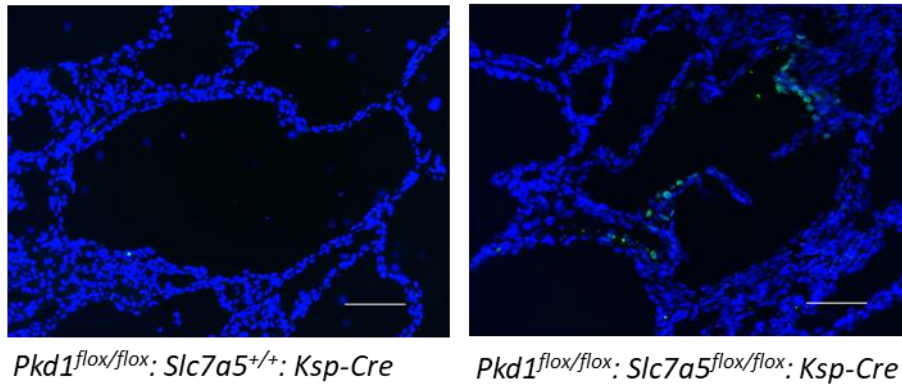


図 27 : TUNEL 染色による腎嚢胞上皮細胞のアポトーシスの評価

生後 11 日齢の *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスより得た腎組織切片を用いて TUNEL 染色を行った. 嚢胞上皮細胞における緑色に染まる TUNEL 陽性細胞を観察した. 各群の代表的な TUNEL 染色像を提示する. スケール : 100 μ m.

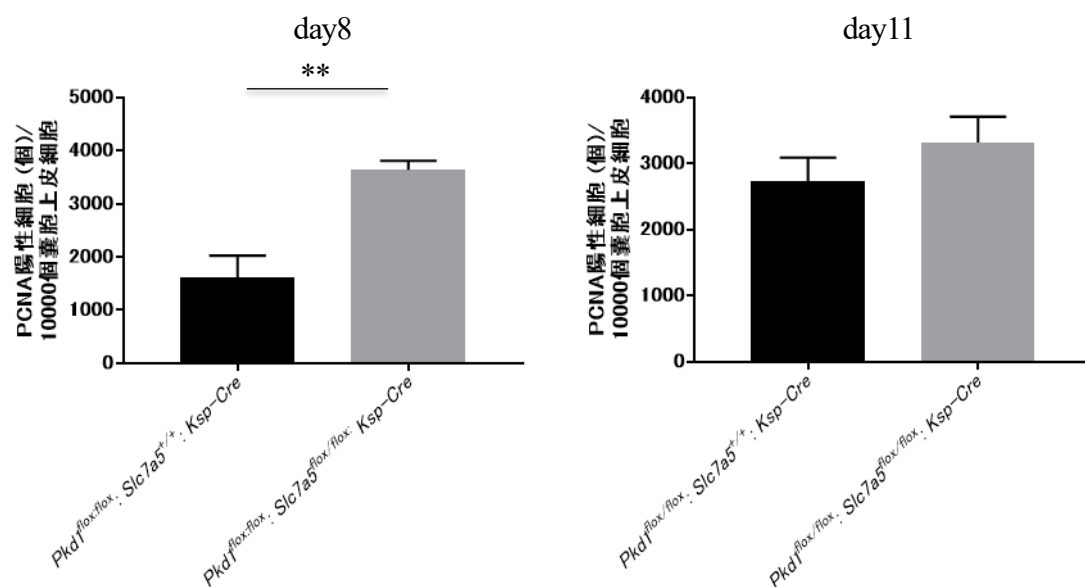


図 28：腎嚢胞上皮細胞における PCNA 陽性細胞数の比較検討

Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre マウス及び *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスにおける 10000 個の嚢胞上皮細胞に対する PCNA 陽性細胞数を計測し、比較検討した。生後 8 日齢の *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスで PCNA 陽性細胞は有意に増加していた。生後 11 日齢では両群間で有意な差は認めなかった。生後 8 日齢:*Slc7a5* 野生型:N=5, *Slc7a5* 欠失群:N=5。生後 11 日齢:*Slc7a5* 野生型:N=7, *Slc7a5* 欠失群:N=9。** $p<0.01$ 。

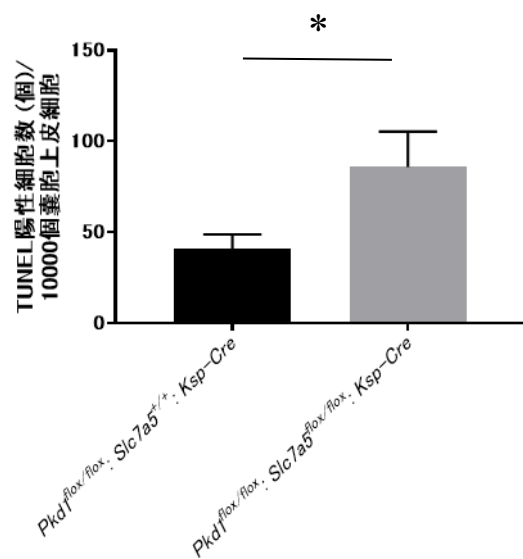


図 29：腎嚢胞上皮細胞における TUNEL 陽性細胞数の比較検討

Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre マウス及び *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスにおける 10000 個の嚢胞上皮細胞に対する TUNEL 陽性細胞数を計測し、比較検討した。*Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウスに比較して、*Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスで有意に TUNEL 陽性細胞は多かった。*Slc7a5* 野生型: N=9, *Slc7a5* 欠失群: N=9, **p*<0.05.

2.3.1.3 細胞シグナル経路の解析

まず、嚢胞増大、細胞増殖に関連することが知られており、アミノ酸感知機構の一役を担う mTOR 経路について検討した。免疫組織染色の解析では、リン酸化 mTOR 及び下流のリン酸化 S6RP を検討したが、*Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスにおいて腎嚢胞上皮で発現しているのに対し、*Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスにおいてはほぼ発現していなかった (図 30)。また、腎組織抽出タンパクを用いたウェスタンブロッティング法では、リン酸化 p70S6K 及び p70S6K は *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスで有意に発現が低下していた ($p<0.01$) (図 31)。

次に、アミノ酸枯渇を感知する GCN2/ATF4 経路の検討として、リン酸化 GCN2 及び下流のリン酸化 eIF2 α の免疫組織染色を行った。リン酸化 GCN2 及びリン酸化 eIF2 α は *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスでは一部の嚢胞上皮細胞で発現していたのに対し、*Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスでは広範囲の嚢胞上皮細胞で発現していた (図 32, 33)。また、ウェスタンブロッティング法では、*Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスに比較し、*Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスにおいてリン酸化 eIF2 α 及び ATF4 の発現が有意に亢進していた ($p<0.01$) (図 34, 35)。

続いて、細胞内のエネルギー不足を感知して活性化する AMPK 経路の関与に関してウェスタンブロッティング法により評価したが、*Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスの両群間でリン酸化 AMPK の発現量に有意な差は無かった (図 36)。

最後に、アミノ酸欠乏により活性化することが報告され、嚢胞増大や細胞増殖に関与している代表的な細胞シグナル経路である MAPK/ERK 経路に関して免疫組織染色及びウェスタンブロッティング法を行い検討した。リン酸化 ERK の免疫組織染色では、*Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスよりも *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスの嚢胞上皮細胞で広範囲に染色されていた (図 37)。また、ウェスタンブロッティング法では、*Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスに比較して *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスで有意にリン酸化 ERK の発現が亢進していた ($p<0.05$) (図 38)。

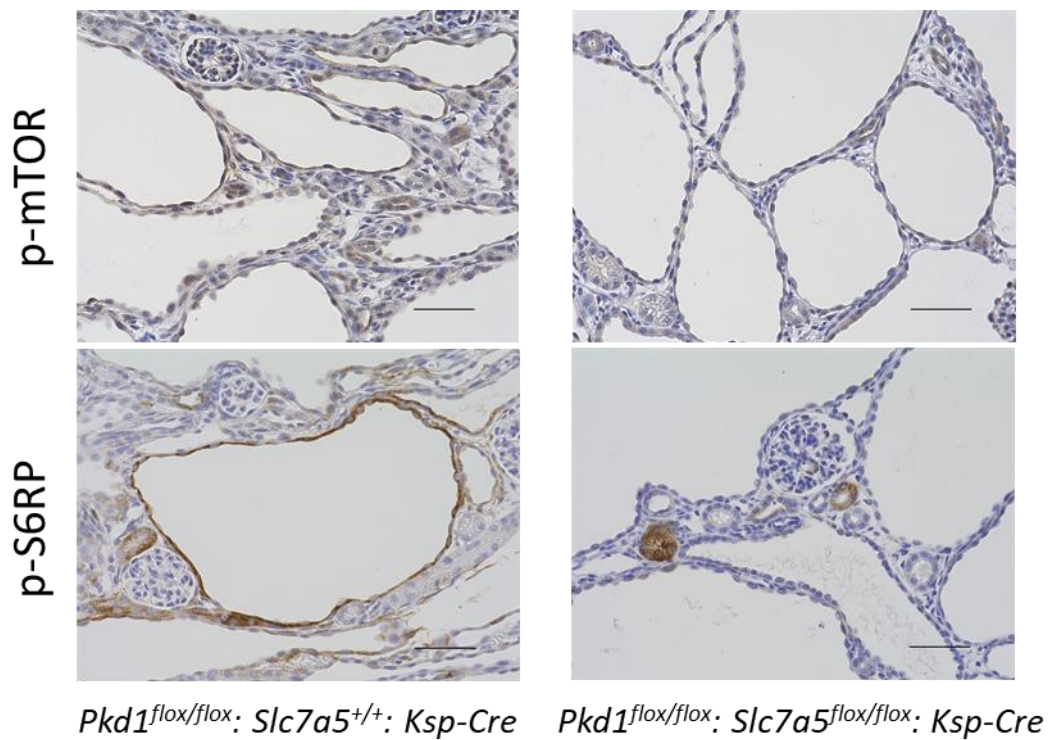


図 30:リン酸化 mTOR (p-mTOR) およびリン酸化 S6RP (p-S6RP) の免疫組織染色
 生後 11 日齢の *Pkd1^{flox/flox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1^{flox/flox}: Slc7a5^{flox/flox}: Ksp-Cre* マウスより得た腎組織切片を用いて免疫組織染色を行い、嚢胞上皮細胞上の p-mTOR や p-S6RP の発現について観察した. *Pkd1^{flox/flox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスでは、腎嚢胞上皮細胞に p-mTOR や p-S6RP が発現していたのに対し、*Pkd1^{flox/flox}: Slc7a5^{flox/flox}: Ksp-Cre* マウスではほぼ発現していなかった. スケール: 50 μ m.

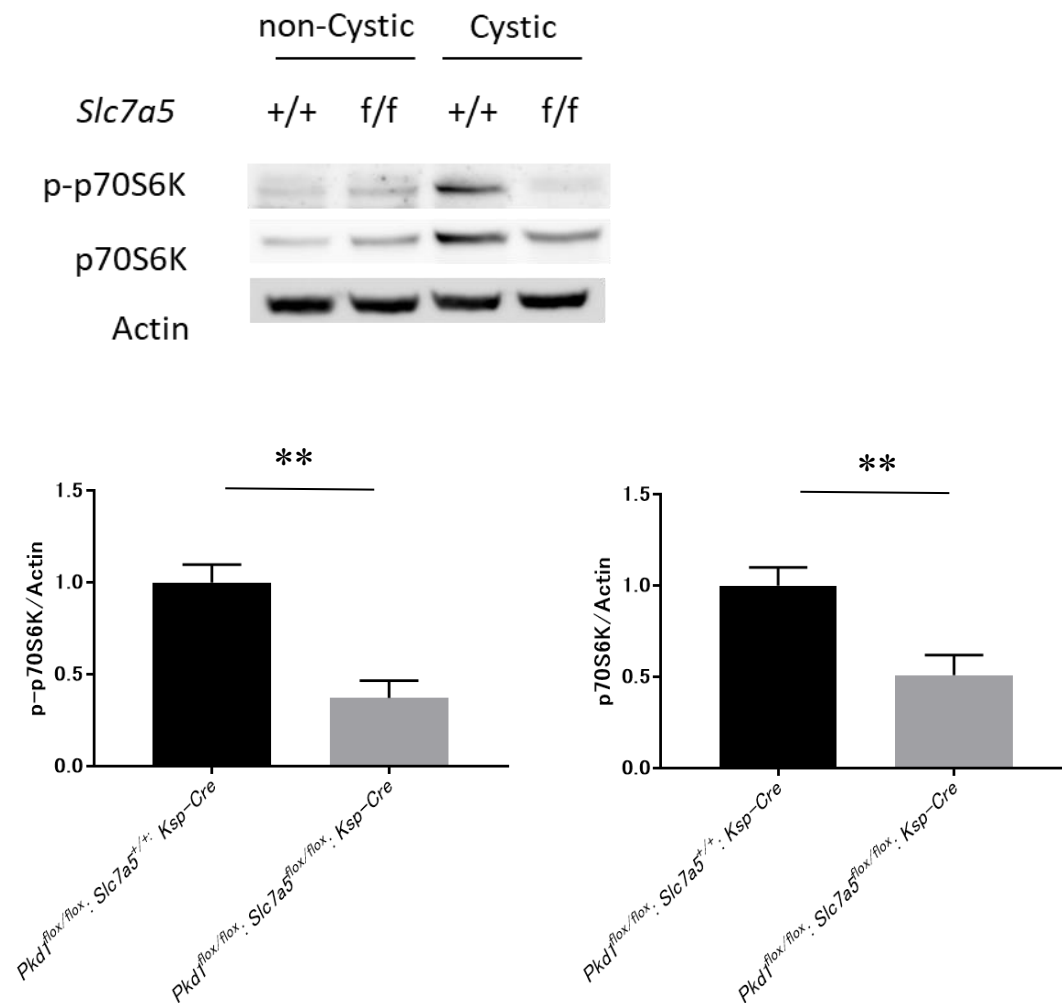


図 31:リン酸化 p70S6K (p-p70S6K) 及び p70S6K のウェスタンブロッティング法による発現量の検討

生後 11 日齢の *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/-}; Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスより得た腎組織を用いてタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法を行い mTOR 経路下流の p-p70S6K 及び p70S6K の発現量を検討した。p-p70S6K 及び p70S6K の発現量はそれぞれローディングコントロールとして用いた Actin で補正した。*Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスでは、p-p70S6K と p70S6K の発現が共に、*Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/-}; Ksp-Cre* と比較して有意に低下していた。なお、総タンパクである p70S6K を用いて補正した p-70S6K/p70S6K では両群間に差は無かった。N=5, ** $p < 0.01$ 。

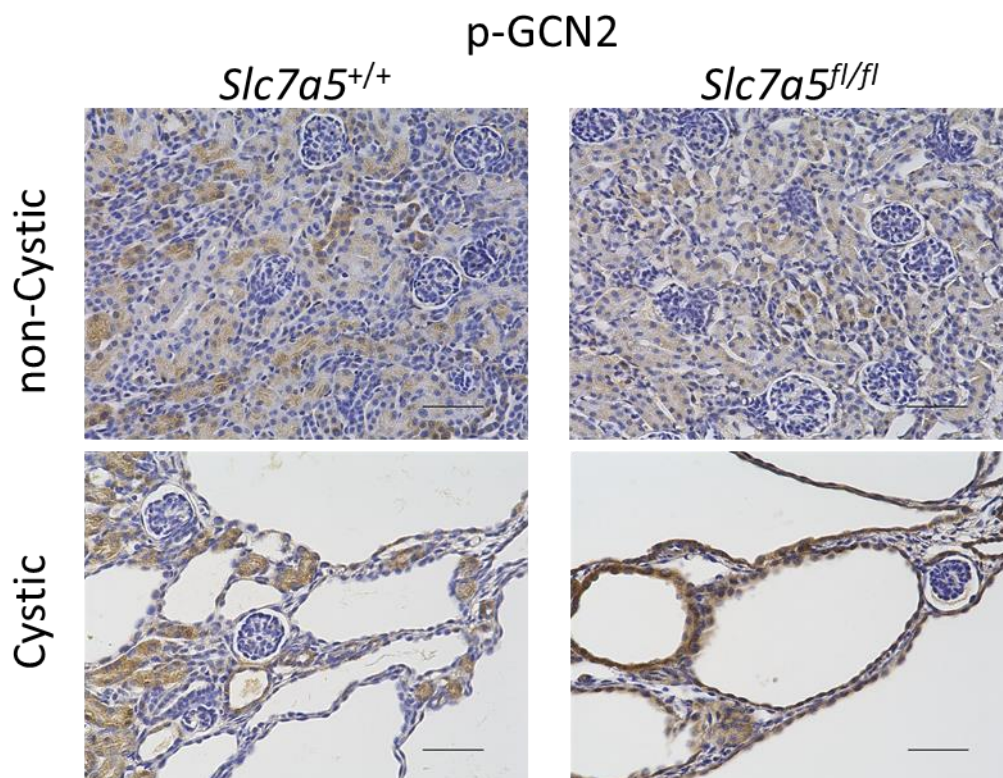


図 32 : リン酸化 GCN2 (p-GCN2) の免疫組織染色

生後 11 日齢の non-Cystic 群と Cystic 群のマウスより得た腎組織切片を用いて免疫組織染色を行い、尿細管細胞上皮や嚢胞上皮細胞上の p-GCN2 の発現について観察した. p-GCN2 は, non-Cystic 群では *Slc7a5* のノックアウトに関わらず尿細管上皮細胞で弱く発現していた. Cystic 群の p-GCN2 は *Pkd1^{flx/flx}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスの一部の嚢胞上皮細胞で発現していたのに対し, *Pkd1^{flx/flx}: Slc7a5^{flx/flx}: Ksp-Cre* マウスにおいて広範囲の嚢胞上皮細胞で発現していた. スケール: 50 μ m.

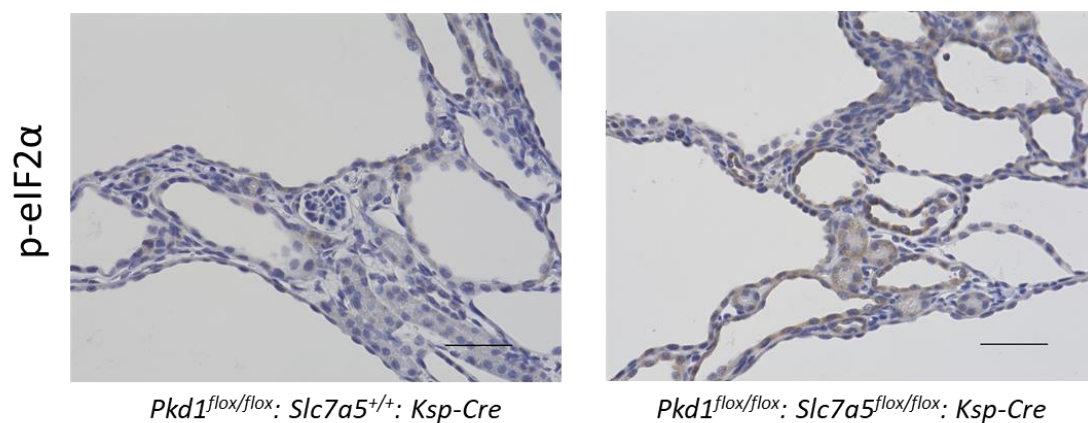


図 33 : リン酸化 eIF2α (p-eIF2α) の免疫組織染色

生後 11 日齢の Cystic 群のマウスより得た腎組織切片を用いて免疫組織染色を行い、嚢胞上皮細胞上の p-eIF2α の発現について観察した. p-eIF2α は *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウスの一部の嚢胞上皮細胞で発現していたのに対し, *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスにおいて広範囲の嚢胞上皮細胞で発現していた. スケール: 50μm

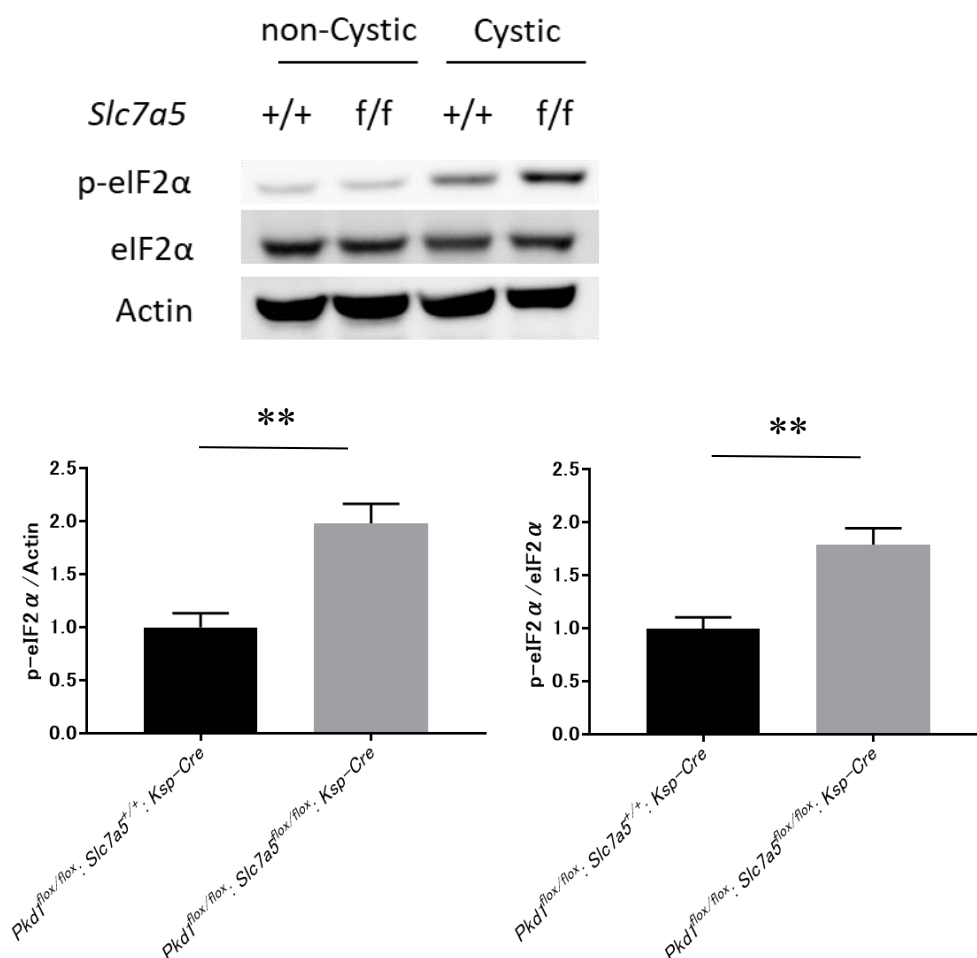


図 34 : リン酸化 eIF2 α (p-eIF2 α) のウェスタンブロッティング法による発現量の検討

生後 11 日齢の *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/-}; Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスより得た腎組織を用いてタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法を行い GCN2/ATF4 経路下流の p-eIF2 α 及び eIF2 α の発現量を検討した. p-eIF2 α をローディングコントロールの Actin 及び総タンパクである eIF2 α で補正し評価したところ、ともに *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/-}; Ksp-Cre* マウスに比較して、*Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスで有意に発現が亢進していた. N=5, ** $p<0.01$

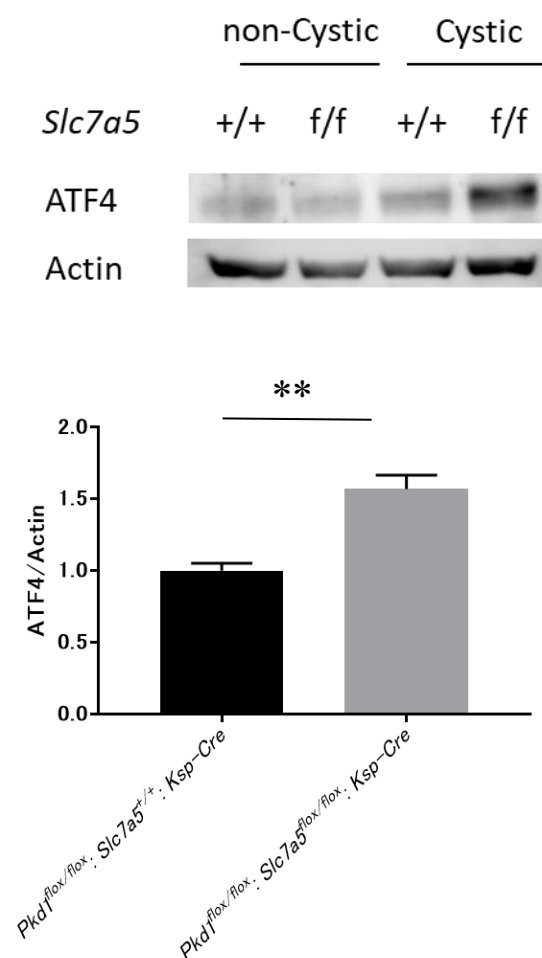


図 35 : ATF4 のウェスタンブロッティング法による発現量の検討

生後 11 日齢の *Pkd1^{lox/lox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1^{lox/lox}; Slc7a5^{lox/lox}; Ksp-Cre* マウスより得た腎組織を用いてタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法を行い GCN2/ATF4 経路下流の ATF4 の発現量を検討した. ATF4 をローディングコントロールの Actin で補正したところ, *Pkd1^{lox/lox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウスに比較して, *Pkd1^{lox/lox}; Slc7a5^{lox/lox}; Ksp-Cre* マウスで有意に発現が亢進していた. N=5, ** $p < 0.01$

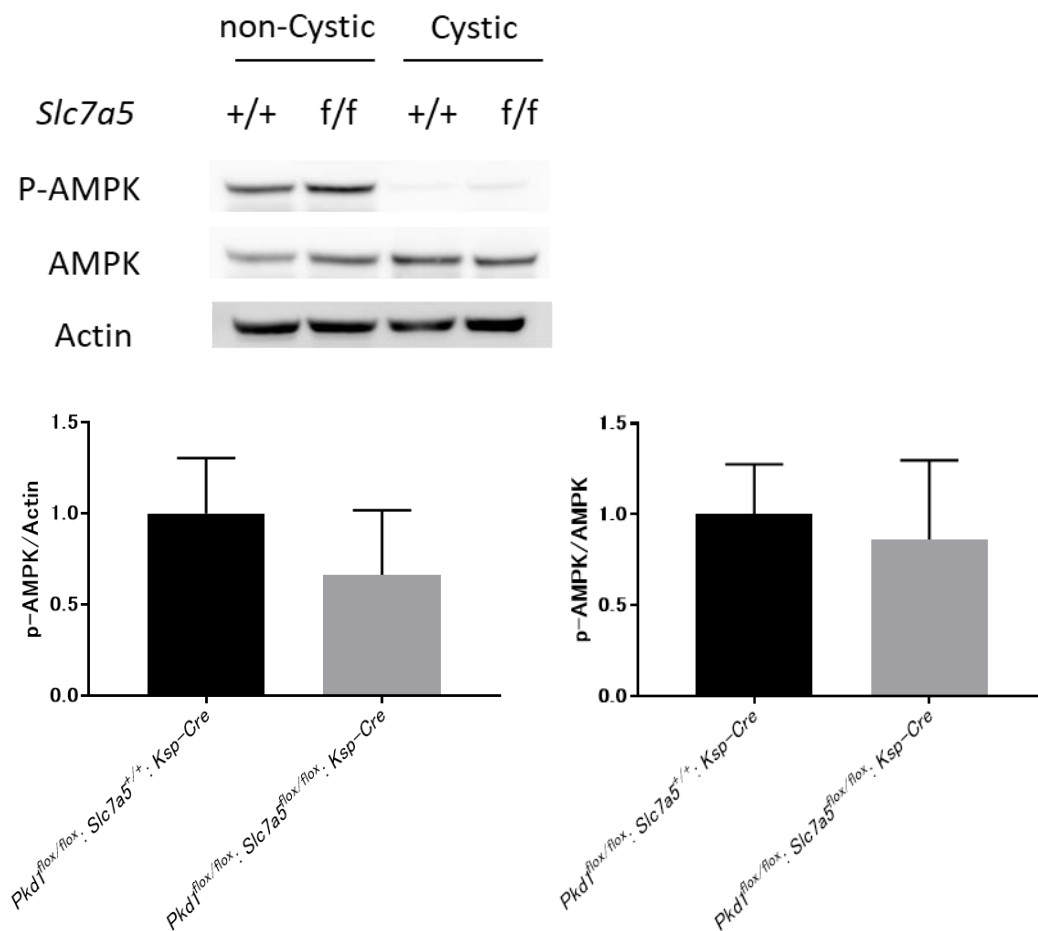
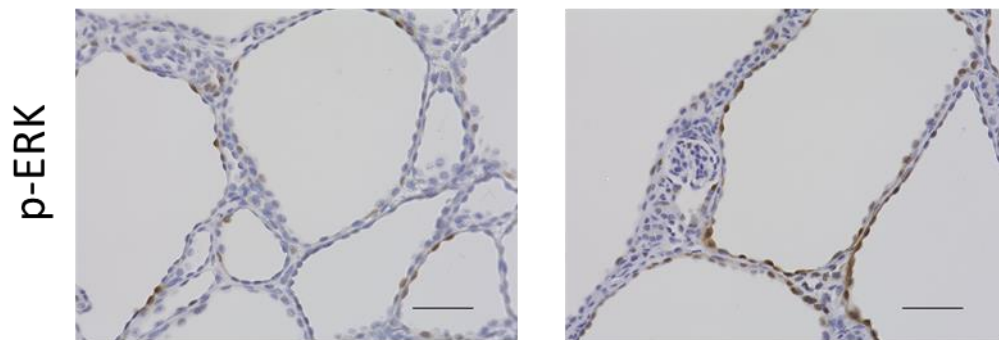


図 36:リン酸化 AMPK (p-AMPK) のウェスタンブロッティング法による発現量の検討

生後 11 日齢の *Pkd1^{flax/flax}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1^{flax/flax}; Slc7a5^{flax/flax}; Ksp-Cre* マウスより得た腎組織を用いてタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法を行い AMPK 経路の p-AMPK 及び AMPK の発現量を検討した. p-AMPK をローディングコントロールの Actin 及び総タンパクの AMPK で補正したところ, *Pkd1^{flax/flax}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1^{flax/flax}; Slc7a5^{flax/flax}; Ksp-Cre* マウスの両群間で発現量に有意差は認めなかった. N=5.



Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre*

図 37:リン酸化 ERK (p-ERK) の免疫組織染色

生後 11 日齢の Cystic 群のマウスより得た腎組織切片を用いて免疫組織染色を行い、嚢胞上皮細胞上の p-ERK の発現について観察した. p-ERK は, *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{+/+}; Ksp-Cre* マウスよりも *Pkd1^{flox/flox}; Slc7a5^{flox/flox}; Ksp-Cre* マウスの嚢胞上皮細胞で広範囲に発現していた. スケール:50μm.

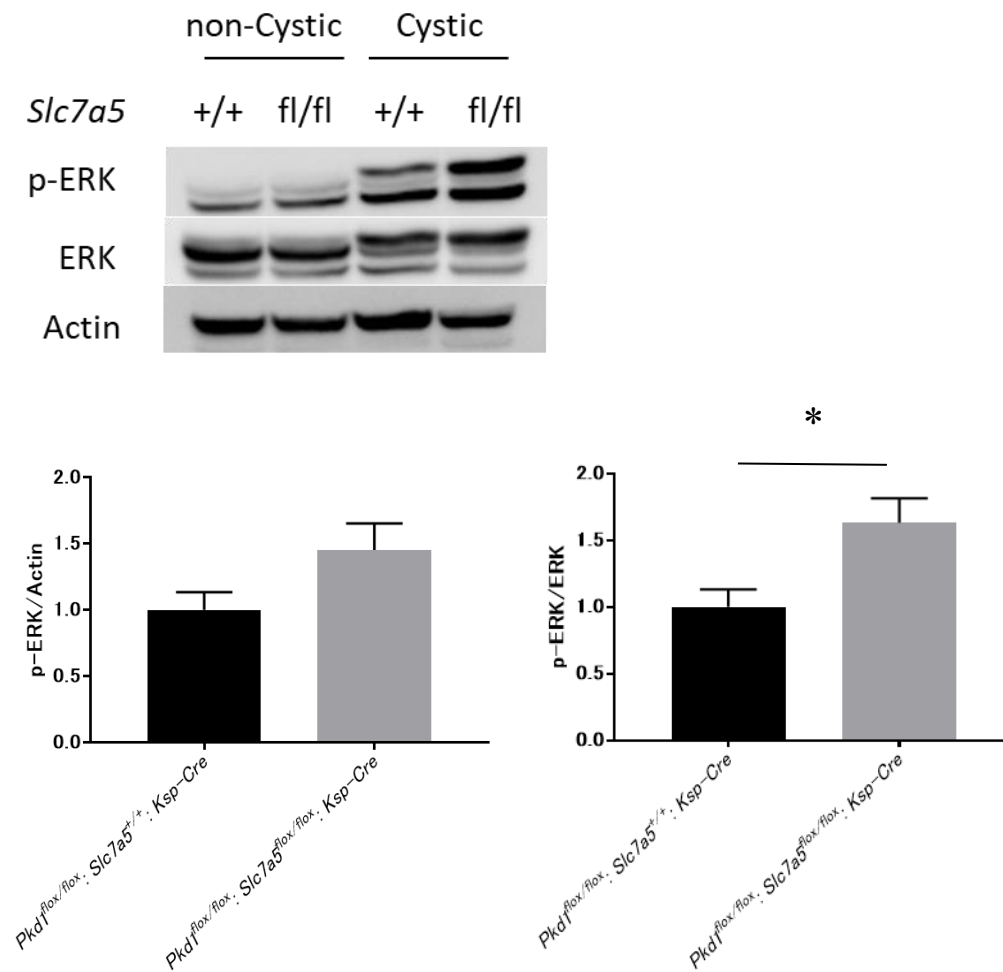


図 38:リン酸化 ERK (p-ERK) のウェスタンブロッティング法による発現量の検討

生後 11 日齢の *Pkd1*^{flox/flox}; *Slc7a5*^{+/-}; *Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1*^{flox/flox}; *Slc7a5*^{flox/flox}; *Ksp-Cre* マウスより得た腎組織を用いてタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法を行い MAPK/ERK 経路の p-ERK 及び ERK の発現量を検討した. p-ERK をローディングコントロールの Actin 及び総タンパクの ERK で補正したところ, *Pkd1*^{flox/flox}; *Slc7a5*^{+/-}; *Ksp-Cre* マウス及び *Pkd1*^{flox/flox}; *Slc7a5*^{flox/flox}; *Ksp-Cre* マウスの両群間で p-ERK/Actin は有意差が無かったが, p-ERK/ERK においては *Pkd1*^{flox/flox}; *Slc7a5*^{flox/flox}; *Ksp-Cre* マウスで有意に発現が亢進していた. N=5. **p*<0.05.

2.3.1.4 MAPK/ERK 経路抑制による嚢胞形成への影響

Pkd1^{flox/flox}:Slc7a5^{flox/flox}:Ksp-Cre マウスの嚢胞形成における MAPK/ERK 経路の影響を検討するために、選択的 MEK1/2 阻害薬である U0126 を投与する実験を行った。

Pkd1^{flox/flox}:Slc7a5^{flox/flox}:Ksp-Cre マウスに U0126 (32 μ g/g(BW))を腹腔内投与したところ、溶媒である 20% DMSO (Vehicle) 投与群と比較して、腎のサイズは縮小した (図 39)。また、Cystic Index を評価したところ、Vehicle 群と比較して U0126 投与群で有意に低値であり、嚢胞の腫大は改善した (Vehicle 群: 71.87 $\pm$ 2.23 % vs. U0126 群: 63.58 $\pm$ 2.13 %, $p<0.05$) (図 40)。さらに、*Pkd1^{flox/flox}:Slc7a5^{flox/flox}:Ksp-Cre* マウスの U0126 投与群と Vehicle 投与群のリン酸化 ERK, リン酸化 p70S6K, リン酸化 eIF2 α の発現量をウェスタンブロッティング法で検討したところ、リン酸化 ERK の発現量のみ抑制されていたが、リン酸化 p70S6K 及びリン酸化 eIF2 α の発現量は変化しておらず、MAPK/ERK 経路の抑制により、*Pkd1^{flox/flox}:Slc7a5^{flox/flox}:Ksp-Cre* マウスの腎腫大が改善されたことが確認された (図 41)。

なお、*Pkd1^{flox/flox}:Slc7a5^{+/+}:Ksp-Cre* マウスにおける U0126 投与の嚢胞形成への影響を確認するために同条件で U0126 及び Vehicle の投与を行ったが、両群間で嚢胞の大きさに明らかな差はなく(図 42), Cystic Index においても両群間で有意な差はなかった (Vehicle 群: 68.14 $\pm$ 1.59 % vs. U0126 群: 68.01 $\pm$ 1.81 %) (図 43)。

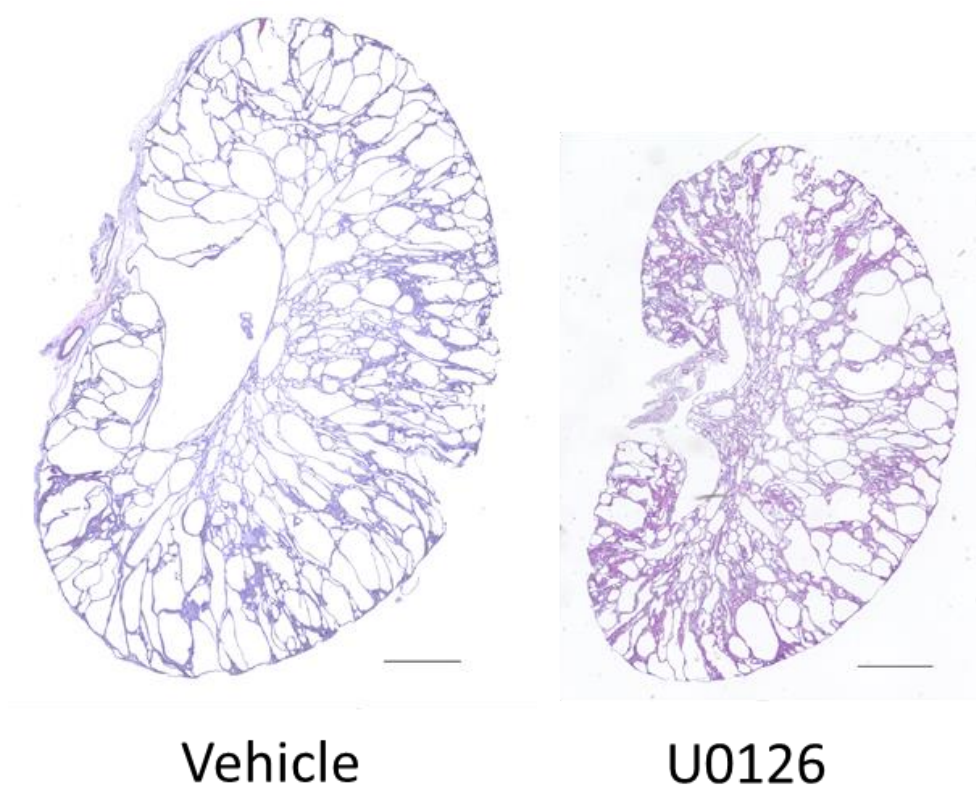


図 39: 選択的 MEK1/2 阻害薬 (U0126) を投与した *Pkd1^{flox/flox}: Slc7a5^{flox/flox}: Ksp-Cre* マウスの腎臓の HE 染色像

生後 11 日齢の U0126 及び Vehicle を投与した *Pkd1^{flox/flox}: Slc7a5^{flox/flox}: Ksp-Cre* マウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作成し、HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大で観察した。各群の代表的な腎組織の横断面像を示す。U0126 投与群は、Vehicle 投与群と比較して腎の腫大が改善された。スケール: 1mm.

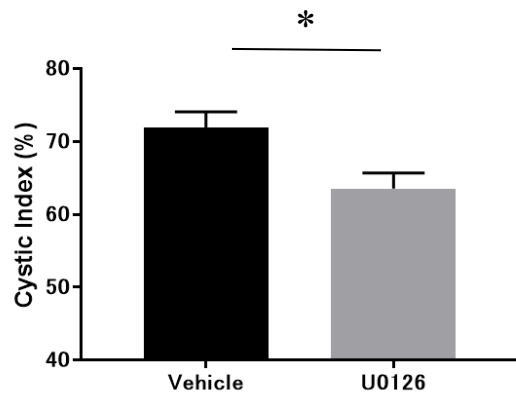


図 40: 選択的 MEK1/2 阻害薬 (U0126) 投与による *Pkd1^{flax/flax}:Slc7a5^{flax/flax}:Ksp-Cre* マウスの Cystic Index の変化

Pkd1^{flax/flax}:Slc7a5^{flax/flax}:Ksp-Cre マウスの U0126 投与群と Vehicle 投与群の Cystic Index を測定し、比較検討した。U0126 投与群では有意に低値であった。Vehicle 群: N=5, U0126 群: N=5, * $p < 0.05$.

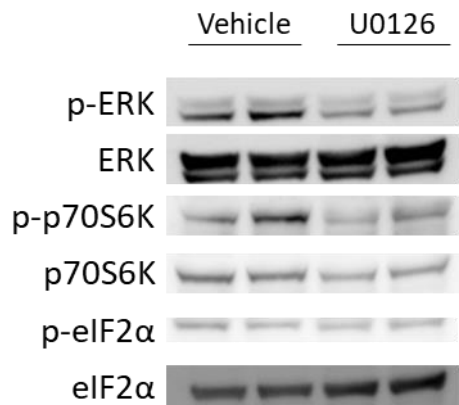


図 41: 選択的 MEK1/2 阻害薬 (U0126) 投与による *Pkd1^{flax/flax}: Slc7a5^{flax/flax}: Ksp-Cre* マウスの細胞シグナル経路の変化

Pkd1^{flax/flax}: Slc7a5^{flax/flax}: Ksp-Cre マウスの U0126 投与群と Vehicle 投与群より得た腎組織を用いてタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法を行い MAPK/ERK 経路, mTOR 経路, GCN2/ATF4 経路の代表タンパクであるリン酸化 ERK (p-ERK), ERK, リン酸化 p70S6K (p-p70S6K), p70S6K, リン酸化 eIF2α (p-eIF2α), eIF2α の発現量を評価した. U0126 投与群において p-ERK のみ抑制されていた. Vehicle 群: N=2, U0126 群: N=2.

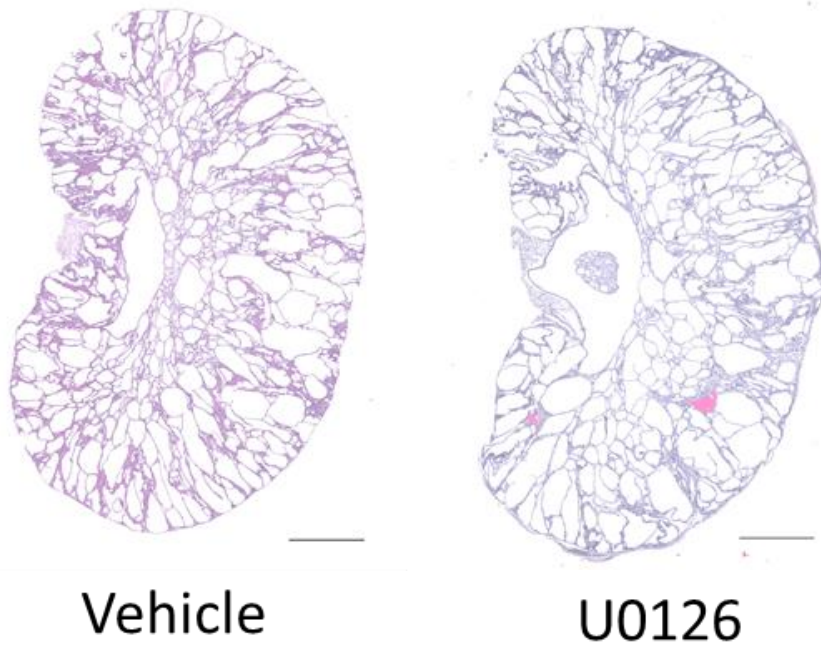


図 42: 選択的 MEK1/2 阻害薬 (U0126) を投与した $Pkd1^{flox/flox} : Slc7a5^{+/+} : Ksp-Cre$ マウスの腎臓の HE 染色像

生後 11 日齢の U0126 及び Vehicle を投与した $Pkd1^{flox/flox} : Slc7a5^{+/+} : Ksp-Cre$ マウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作成し, HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大で観察した. 各群の代表的な腎組織の横断面像を示す. U0126 投与群および Vehicle 投与群において腎の大きさに明らかな差は認めなかった. スケール: 1mm.

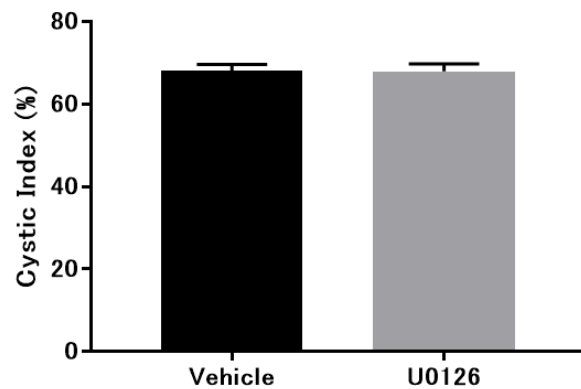


図 43: 選択的 MEK1/2 阻害薬 (U0126) 投与による *Pkd1^{flax/flax}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスの Cystic Index の変化

Pkd1^{flax/flax}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre マウスの U0126 投与群と Vehicle 投与群の Cystic Index を測定し比較検討した. 両群間で Cystic Index に有意な差はなかった. Vehicle 群: N=5, U0126 群: N=5.

2.3.2 選択的 LAT1 阻害薬投与実験

2.3.2.1 マウス表現型の解析及び生化学検査

pI-pC で生後 5 日目より *Pkd1* を欠失させた *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスに選択的 LAT1 阻害薬である JPH203 を腹腔内投与し、腎及び肝嚢胞の表現型に関して Cyclodextrin を投与した Placebo 群と比較検討した。JPH203 (50 μ g/g (BW)) を生後 12 日から 34 日まで腹腔内に隔日投与し、生後 35 日に屠殺解剖した短期投与群の代表的な腎及び肝組織の横断面像を下記に示す。Placebo 群に比較して JPH203 群では腎嚢胞の形成が抑制されていたが (図 44), 肝嚢胞に関しては嚢胞形成の程度に明らかな変化は無かった (図 45)。また、同量の JPH203 を生後 12 日から 54 日まで腹腔内に隔日投与し生後 56 日に屠殺解剖した長期投与群では、JPH203 群及び Placebo 群間で腎及び肝嚢胞の形成の程度に明らかな差を認めなかった (図 46, 47)。次に、短期投与群及び長期投与群のマウス体重について示す。短期投与群及び長期投与群のマウス体重において JPH203 群と Placebo 群で有意な差は認めなかった (短期投与群: Placebo: 17.78 $\pm$ 0.96 g vs. JPH203: 19.21 $\pm$ 0.51 g) (長期投与群: Placebo: 20.6 $\pm$ 1.64 g vs. JPH203: 21.87 $\pm$ 1.29 g) (図 48)。2KW/BW に関しては、短期及び長期投与群でともに JPH203 群で小さい傾向にあったが、Placebo 群と比較して有意な差は無かった (短期投与群: Placebo: 4.29 $\pm$ 0.39 % vs. JPH203: 3.18 $\pm$ 0.27 %) (長期投与群: Placebo: 5.20 $\pm$ 0.87 % vs. JPH203: 3.28 $\pm$ 0.5 %) (図 49)。また、腎 Cystic Index においては、短期投与群において JPH203 群で有意に小さくなった (Placebo: 52.1 $\pm$ 3.1 % vs. JPH203: 42.16 $\pm$ 3.26 %, $p<0.05$) (図 50)。しかし、長期投与群においては、JPH203 群と Placebo 群で腎 Cystic Index に有意差は無かった (Placebo: 51.6 $\pm$ 3.9 % vs. JPH203: 49.25 $\pm$ 5.48 %) (図 50)。LW/BW に関しては、短期投与群において JPH203 群で有意に小さくなったが (Placebo: 5.46 $\pm$ 0.26 % vs. JPH203: 4.25 $\pm$ 0.29 %, $p<0.05$), 肝 Cystic Index では JPH203 群と Placebo 群で有意差は無かった (Placebo: 9.37 $\pm$ 2.22 % vs. JPH203: 6.77 $\pm$ 1.44 %) (図 51, 52)。長期投与群においても同様に、LW/BW は JPH203 群で有意に小さくなったが (Placebo: 5.66 $\pm$ 0.28 % vs. JPH203: 4.82 $\pm$ 0.27 %, $p<0.05$), 肝 Cystic Index では JPH203 群と Placebo 群で有意差は無かった (Placebo: 8.71 $\pm$ 1.35 % vs. JPH203: 10.37 $\pm$ 3.41 %) (図 51, 52)。血清の生化学検査に関しては、Cystic Index で有意差のあった腎のみ施行し、BUN を測定した。短期及び長期投与群の BUN は、JPH203 群と Placebo 群共に、non-Cystic 群より有意に高値であったが、両群間で有意な差は無かった (短期投与群: Placebo: 76.07 $\pm$ 11.38 mg/dl vs. JPH203: 62.03 $\pm$ 5.89 mg/dl) (長期投与群: Placebo: 83.58 $\pm$ 15.11 mg/dl vs. JPH203: 90.34 $\pm$ 12.77 mg/dl) (図 53)。

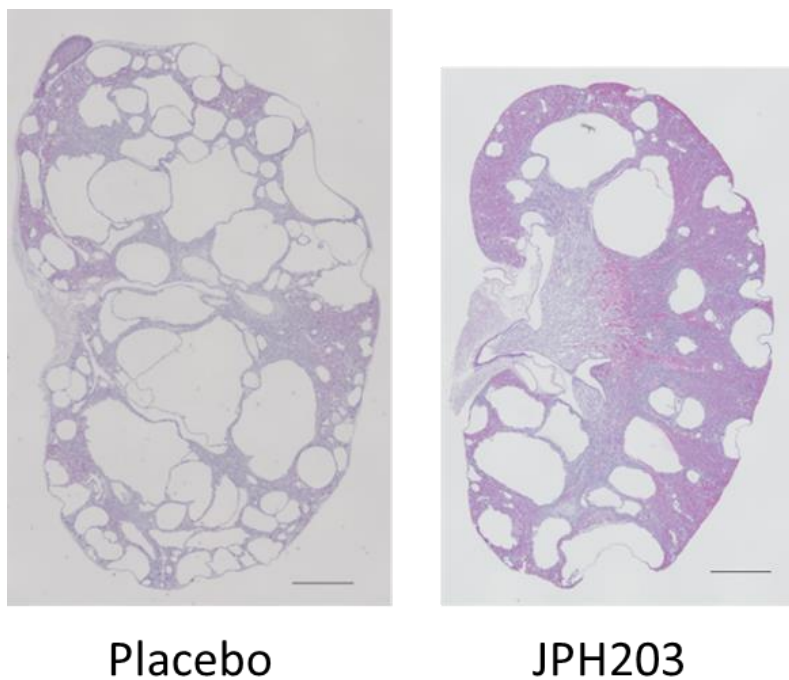
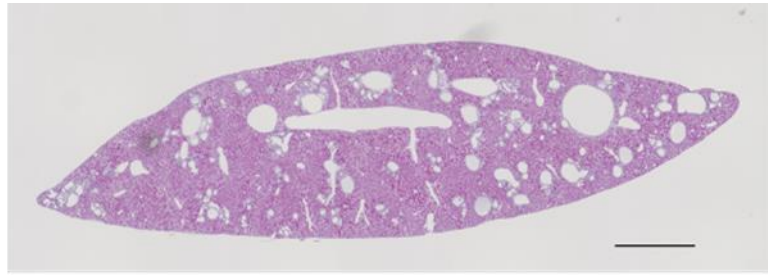


図 44 : 選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) 及び Placebo を短期投与した *Pkd1^{lox/lox}; Mx1-Cre* マウスの腎臓の HE 染色像

JPH203 及び Placebo を隔日投与された生後 35 日齢の *Pkd1^{lox/lox}; Mx1-Cre* マウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作成し, HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大で観察した. 各群の代表的な組織横断面像を示す. JPH203 群は, Placebo 群に比較して嚢胞の形成が抑制された. スケール: 1mm.

Placebo



JPH203

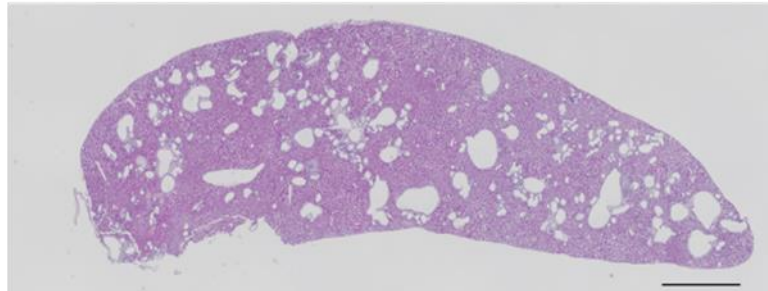


図 45 : 選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) 及び Placebo を短期投与した *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスの肝臓の HE 染色像

JPH203 及び Placebo を隔日投与された生後 35 日齢の *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスより摘出した肝を用いてパラフィン包埋切片を作成し, HE 染色を行い肝の表現型について弱拡大で観察した. 各群の代表的な組織横断面像を示す. 両群間において囊胞形成の程度に差はなかった. スケール: 1mm.

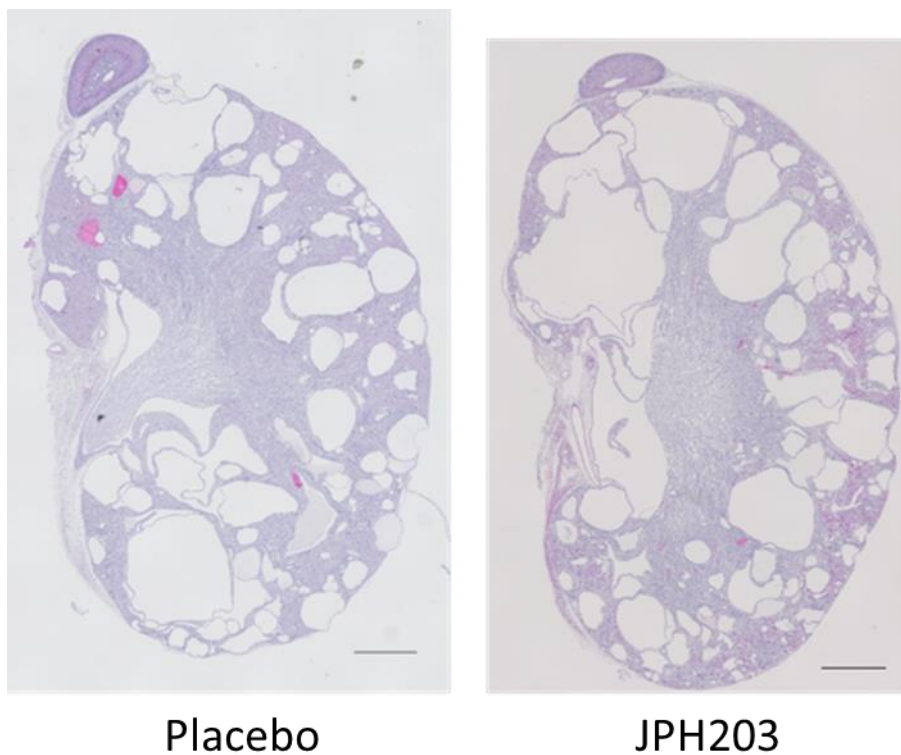
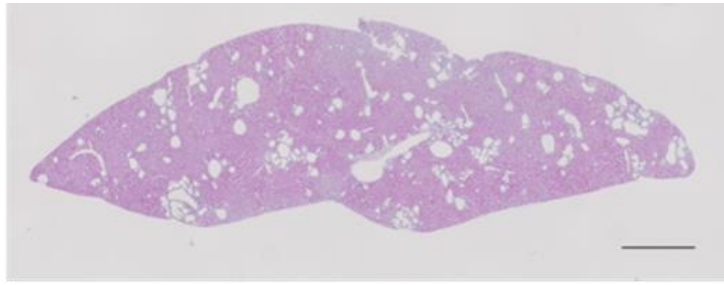


図 46：選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) 及び Placebo を長期投与した *Pkd1^{lox/lox}; Mx1-Cre* マウスの腎臓の HE 染色像

JPH203 及び Placebo を隔日投与された生後 56 日齢の *Pkd1^{lox/lox}; Mx1-Cre* マウスより摘出した腎を用いてパラフィン包埋切片を作成し、HE 染色を行い腎の表現型について弱拡大で観察した。各群の代表的な組織横断面像を示す。両群間において嚢胞形成の程度に差は無かった。スケール: 1mm.

Placebo



JPH203

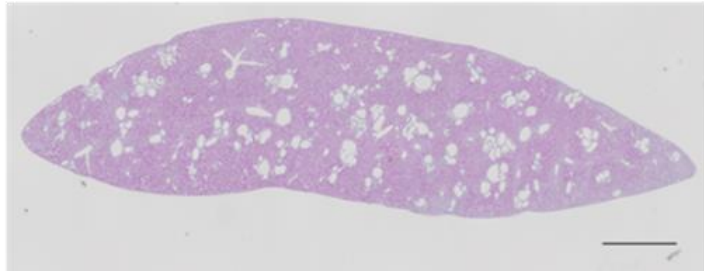


図 47：選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) 及び Placebo を長期投与した *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスの肝臓の HE 染色像

JPH203 及び Placebo を隔日投与された生後 56 日齢の *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスより摘出した肝を用いてパラフィン包埋切片を作成し, HE 染色を行い肝の表現型について弱拡大で観察した. 各群の代表的な組織横断面像を示す. 両群間において囊胞形成の程度に差は無かった. スケール: 1mm.

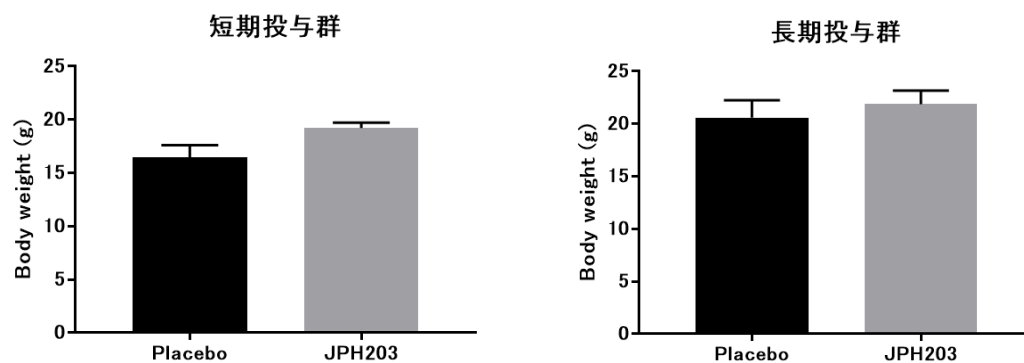


図 48: 選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) 及び Placebo を短期及び長期投与した *Pkd1^{lox/lox}; Mx1-Cre* マウスの体重

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢及び 56 日齢の *Pkd1^{lox/lox}; Mx1-Cre* マウスにおいて、解剖屠殺する直前に体重を測定し、各群間で比較検討した。短期（左）及び長期（右）投与群共に、JPH203 群と Placebo 群で体重に有意な差は認めなかった。短期投与群: Placebo 群 N=10, JPH203 群 N=9, 長期投与群: Placebo 群 N=9, JPH203 群 N=9。

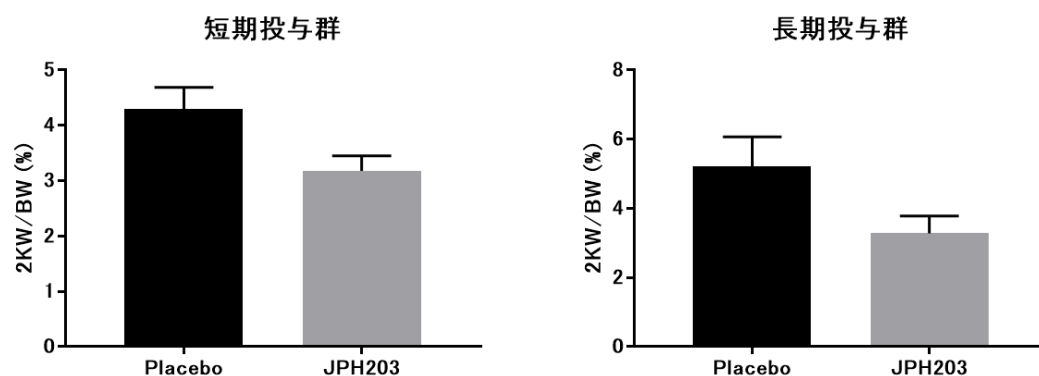


図 49: 選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) 及び Placebo を短期及び長期投与した *Pkd1^{flox/flox}: Mx1-Cre* マウスの 2KW/BW

腎嚢胞形成の評価のため, JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢及び 56 日齢の *Pkd1^{flox/flox}: Mx1-Cre* マウスの 2KW/BW を算出し, 各群間で比較検討した. 短期投与群において JPH203 群は Placebo 群と比較して 2KW/BW が小さい傾向にあったが有意差は無かった (左). また, 長期投与群において同様に両群間で 2KW/BW に有意差は無かった (右). 短期投与群: Placebo 群 N=10, JPH203 群 N=9, 長期投与群: Placebo 群 N=9, JPH203 群 N=9.

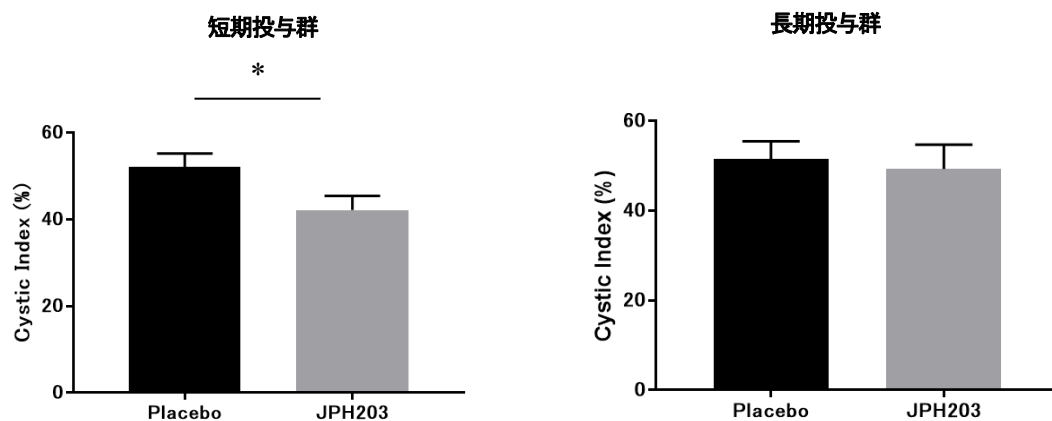


図 50: 選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) 及び Placebo を短期及び長期投与した *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスの腎 Cystic Index

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢及び 56 日齢の *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスにおいて、腎 Cystic Index を測定し比較検討した。短期投与群において JPH203 群は Placebo 群と比較して腎 Cystic Index は有意に小さかった (左)。長期投与群においては、両群間で腎 Cystic Index に有意差は無かった (右)。短期投与群: Placebo 群 N=10, JPH203 群 N=9, 長期投与群: Placebo 群 N=9, JPH203 群 N=9. *p<0.05.

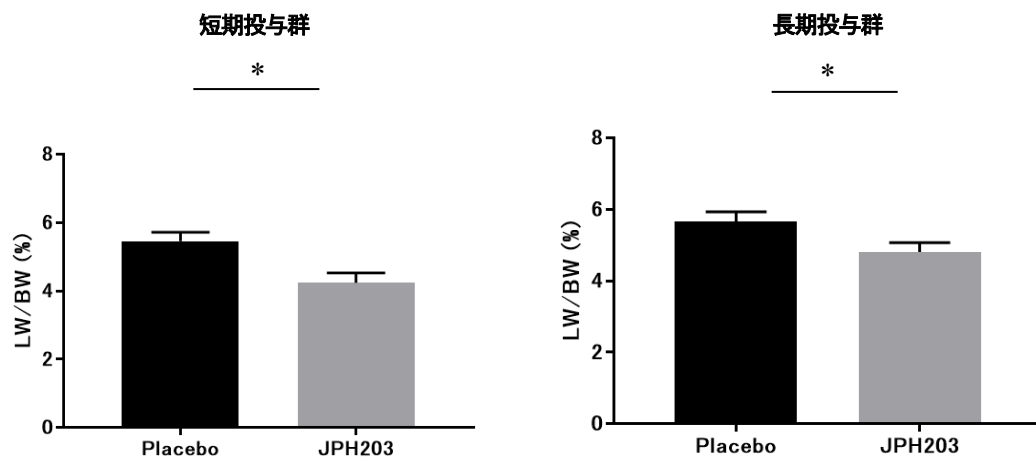


図 51: 選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) 及び Placebo を短期及び長期投与した *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスの LW/BW

肝嚢胞形成の評価のため, JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢及び 56 日齢の *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスの LW/BW を算出し, 各群間で比較検討した. 短期投与群において JPH203 群は Placebo 群と比較して LW/BW が有意に小さかった (左). また, 長期投与群においても同様に JPH203 群は Placebo 群と比較して LW/BW が有意に小さかった (右). 短期投与群: Placebo 群 N=10, JPH203 群 N=9, 長期投与群: Placebo 群 N=9, JPH203 群 N=9, *p<0.05.

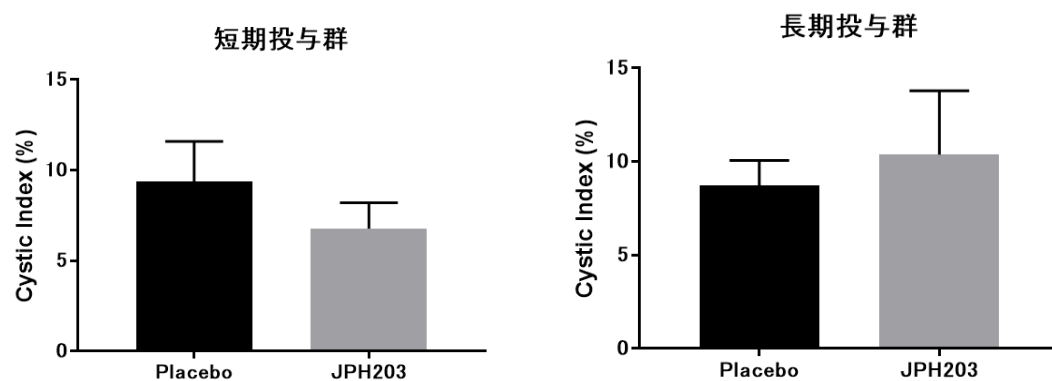


図 52: 選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) 及び Placebo を短期及び長期投与した *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスの肝 Cystic Index

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢及び 56 日齢の *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスにおいて, 肝 Cystic Index を測定し比較検討した. 短期及び長期投与群ともに, JPH203 群及び Placebo 群で肝 Cystic Index に有意差は無かった. 短期投与群: Placebo 群 N=7, JPH203 群 N=9, 長期投与群: Placebo 群 N=5, JPH203 群 N=5.

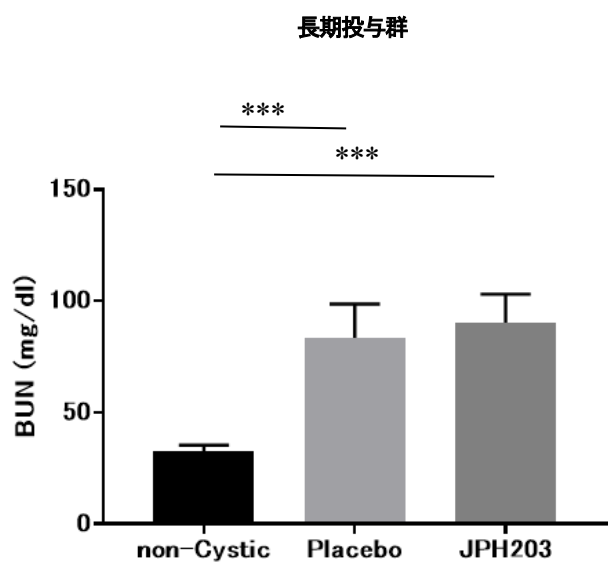
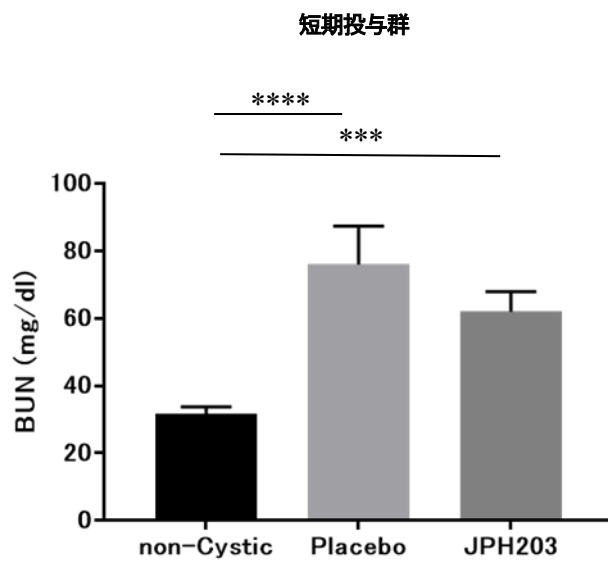


図 53: 選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) 及び Placebo を短期及び長期投与した *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスの腎機能 (BUN)

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢及び 56 日齢の *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスより採取した血清を用いて BUN を測定し、各群間で比較検討した。短期及び長期投与群ともに、JPH203 群と Placebo 群は non-Cystic 群よりも有意に BUN が高値であったが、両群間での比較では腎機能に有意な差は無かった。短期投与群: non-Cystic 群 N=9, Placebo 群 N=7, JPH203 群 N=9, 長期投与群: non-Cystic 群 N=9, Placebo 群 N=9, JPH203 群 N=9. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

2.3.2.2 細胞増殖及びアポトーシスの解析

腎嚢胞形成の抑制効果があった選択的 LAT1 阻害薬の短期投与群のマウスより得た腎組織標本を用いて、嚢胞上皮細胞における細胞増殖とアポトーシスに関して評価するために PCNA 染色及び TUNEL 染色を行った (図 54, 55). 全腎嚢胞上皮細胞あたりの各種陽性細胞数をそれぞれ計測し割合 (%) で示した. PCNA 染色では, JPH203 群で PCNA 陽性細胞の割合が少ない傾向にあったが両群間に有意差はなく(Placebo 群: $15.46 \pm 2.72\%$ vs JPH203: $12.58 \pm 1.78\%$) (図 56), TUNEL 染色では Placebo 群と比較して JPH203 群で有意に TUNEL 陽性細胞数の割合が少なかった (Placebo 群: $14.01 \pm 5.32\%$ vs JPH203: $2.48 \pm 0.97\%$, $p < 0.05$) (図 57).

PCNA

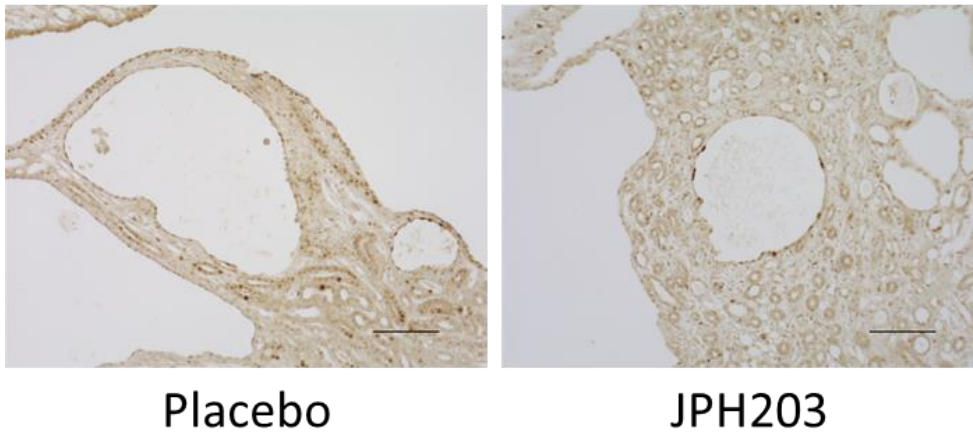


図 54 : PCNA 染色による腎嚢胞上皮細胞の細胞増殖能の評価

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢の *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスより得た腎組織切片を用いて PCNA 染色を行った. 嚢胞上皮細胞において茶色に染まる PCNA 陽性細胞を観察した. 各群の代表的な PCNA 染色像を提示する. スケール : 100 μ m.

TUNEL

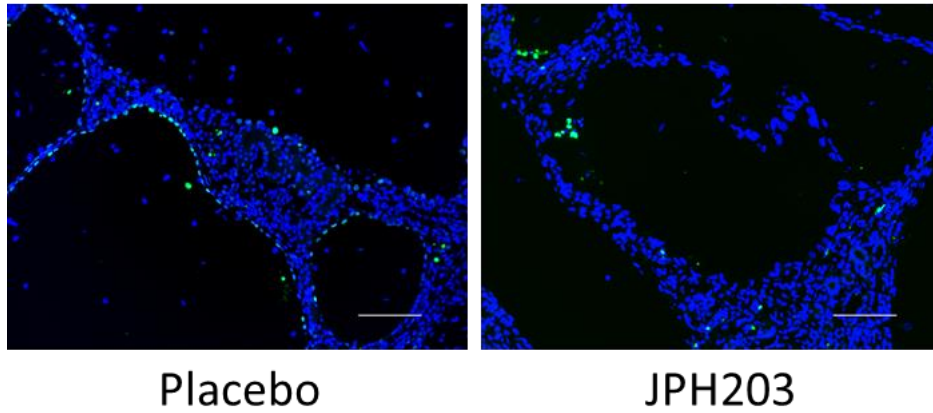


図 55 : TUNEL 染色による腎嚢胞上皮細胞のアポトーシスの評価

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢の *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスより得た腎組織切片を用いて TUNEL 染色を行った. 嚢胞上皮細胞において緑色に染まる TUNEL 陽性細胞を観察した. 各群の代表的な TUNEL 染色像を提示する. スケール : 100 μ m.

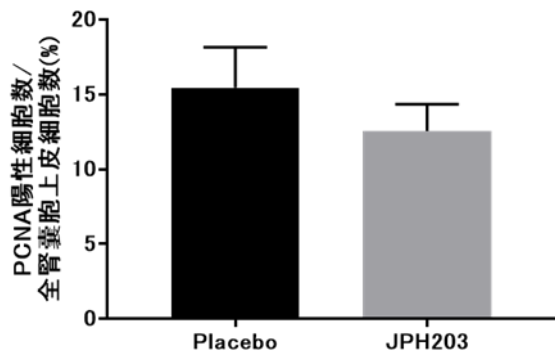


図 56 : PCNA 陽性細胞数の比較検討

JPH203 及び Placebo を短期投与した *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスの全腎嚢胞上皮細胞に対する PCNA 陽性細胞数の割合 (%) を計測した. JPH203 投与群で少ない傾向にあったものの, Placebo 群と比較して有意な差は認められなかった. Placebo 群: N=7, JPH203 群: N=10.

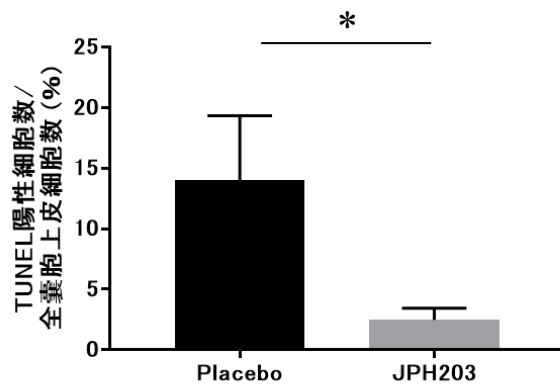


図 57 : TUNEL 陽性細胞数の比較検討

JPH203 及び Placebo を短期投与した *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスの全腎囊胞上皮細胞に対する TUNEL 陽性細胞数の割合 (%) を計測した. Placebo 群と比較し, JPH203 群で有意に TUNEL 陽性細胞が減少した. Placebo 群: N=7, JPH203 群: N=10, * $p < 0.05$.

2.3.2.3 細胞増殖シグナル経路の解析

まず, mTOR 経路の検討として免疫組織染色で下流のリン酸化 S6RP を検討したところ, Placebo 群と比較して JPH203 群で嚢胞上皮及び嚢胞基底層で発現が低下していた (図 58). また, 腎組織抽出タンパクを用いたウェスタンブロッティング法では, リン酸化 mTOR 及び mTOR の発現が JPH203 群で有意に低下していた ($p<0.05$) (図 59). 同様に, リン酸化 p70S6K 及び p70S6K の発現が JPH203 群で有意に低下していた ($p<0.05$) (図 60). 次に, MAPK/ERK 経路について免疫組織染色とウェスタンブロッティング法で検討したところ, 免疫組織染色ではリン酸化 ERK は JPH203 群と Placebo 群は同程度に嚢胞上皮細胞で発現していた (図 61). また, ウェスタンブロッティング法では JPH203 群と Placebo 群の両群間で総タンパクの ERK により補正したリン酸化 ERK の発現量に有意差は無かった (図 62). GCN2/ATF4 経路の検討として, リン酸化 GCN2 の免疫組織染色を行った. リン酸化 GCN2 は, JPH203 及び Placebo を投与された *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスにおいて, 両群共に発現している嚢胞上皮細胞は少なかった (図 63). ウェスタンブロッティング法では, リン酸化 eIF2 α について検討したが, JPH203 群と Placebo 群の両群間でリン酸化 eIF2 α の発現量に有意な差は認められなかった (図 64).

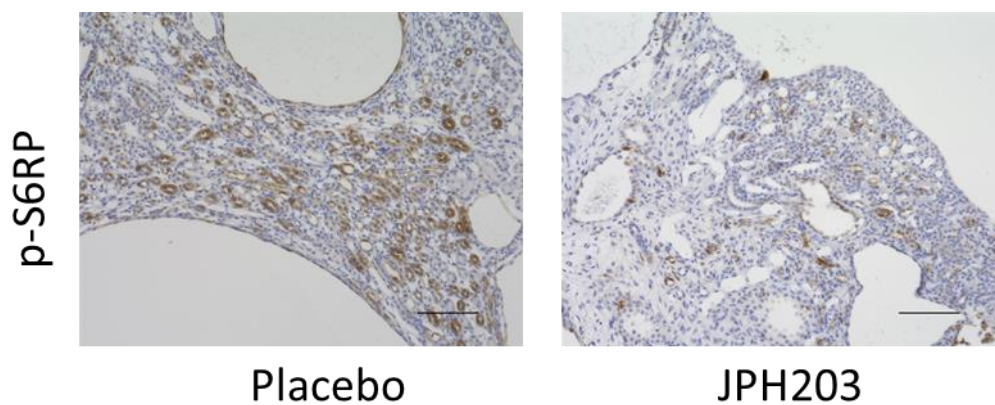


図 58:リン酸化 S6RP (p-S6RP) の免疫組織染色

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢の *Pkd1^{flax/flax}; Mxl-Cre* マウスより得た腎組織切片を用いて免疫組織染色を行い、嚢胞上皮細胞上の p-S6RP の発現について観察した. Placebo を投与した *Pkd1^{flax/flax}; Mxl-Cre* マウスでは、腎嚢胞上皮細胞で p-S6RP が発現していたのに対し、JPH203 を投与した *Pkd1^{flax/flax}; Mxl-Cre* マウスではほぼ発現していなかった. スケール:100 μ m.

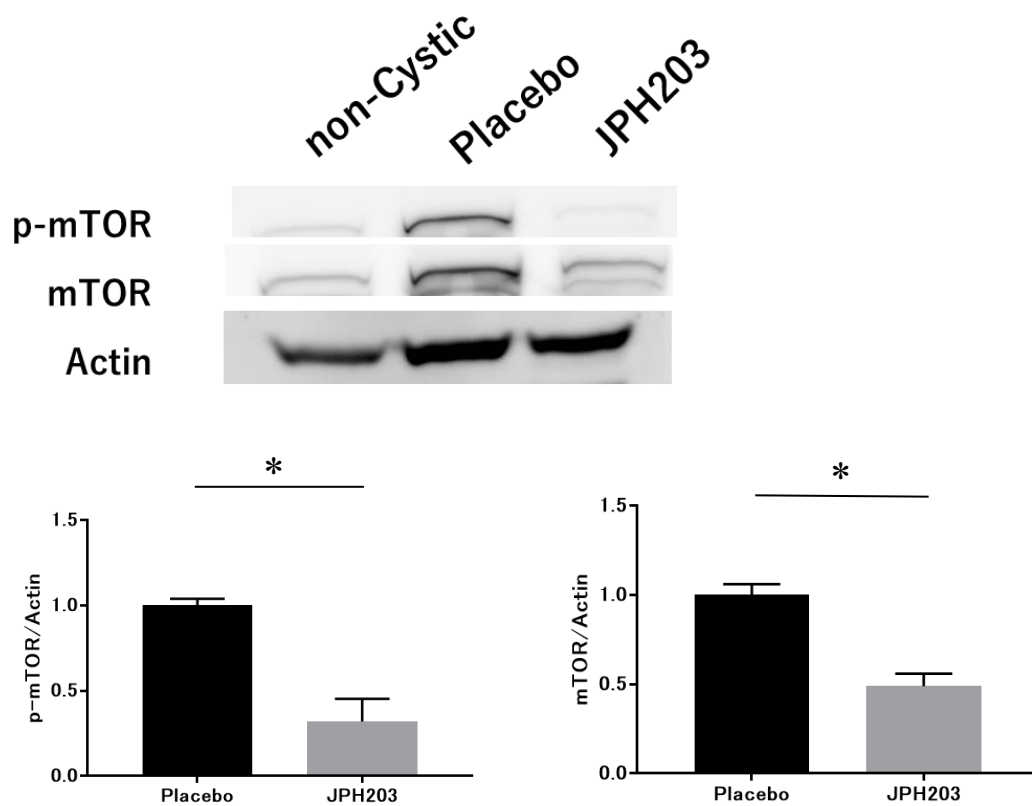


図 59:リン酸化 mTOR (p-mTOR) 及び mTOR のウェスタンブロッティング法による発現量の検討

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢の *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスより得た腎組織を用いてタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法を行い p-mTOR 及び mTOR の発現量を検討した. p-mTOR 及び mTOR の発現量はそれぞれローディングコントロールとして用いた Actin で補正し検討した. JPH203 を投与した *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスでは, p-mTOR と mTOR の発現が共に, Placebo 投与群と比較して有意に低下していた. なお, 総タンパクである mTOR を用いて補正した p-mTOR/mTOR では両群間に差は無かった. N=4, * $p < 0.05$.

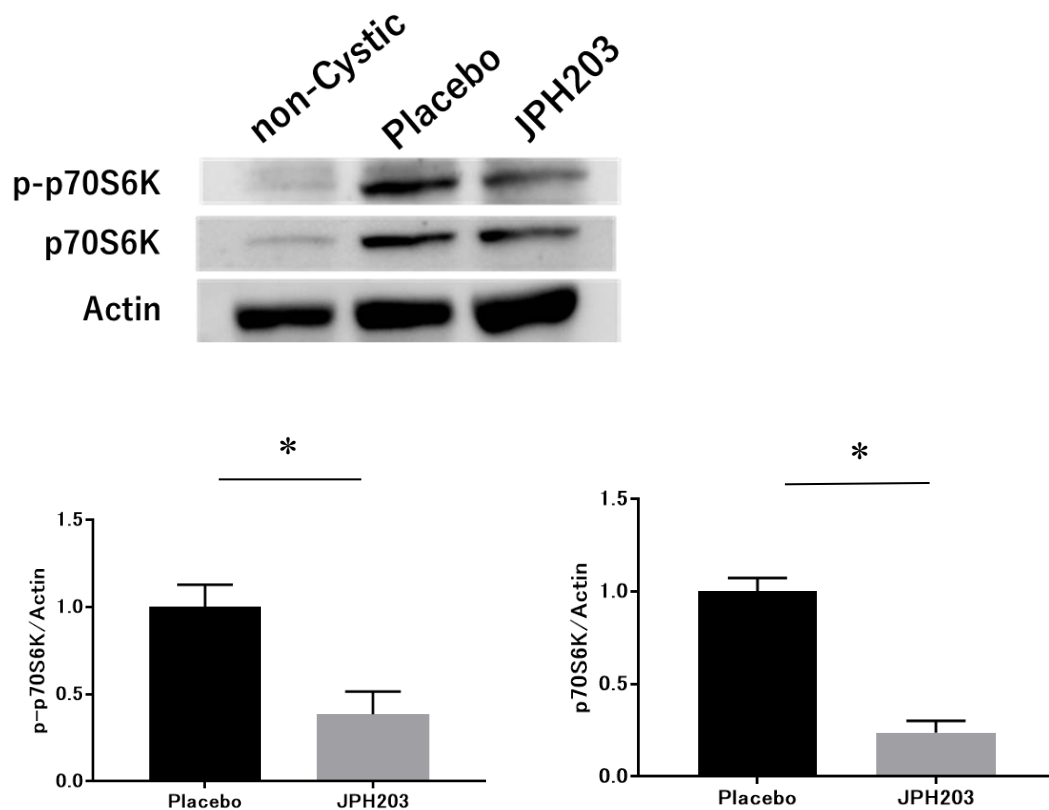


図 60:リン酸化 p70S6K (p-p70S6K) 及び p70S6K のウェスタンブロッティング法による発現量の検討

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢の *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスより得た腎組織を用いてタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法を行い mTOR 経路の下流の p-p70S6K 及び p70S6K の発現量を検討した. p-p70S6K 及び p70S6K の発現量はそれぞれローディングコントロールとして用いた Actin で補正し検討した. JPH203 を投与した *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスでは, p-p70S6K と p70S6K の発現が共に, Placebo 投与群と比較して有意に低下していた. なお, 総タンパクである p70S6K を用いて補正した p-p70S6K/p70S6K では両群間に差は無かった. N=4, * $p<0.05$.

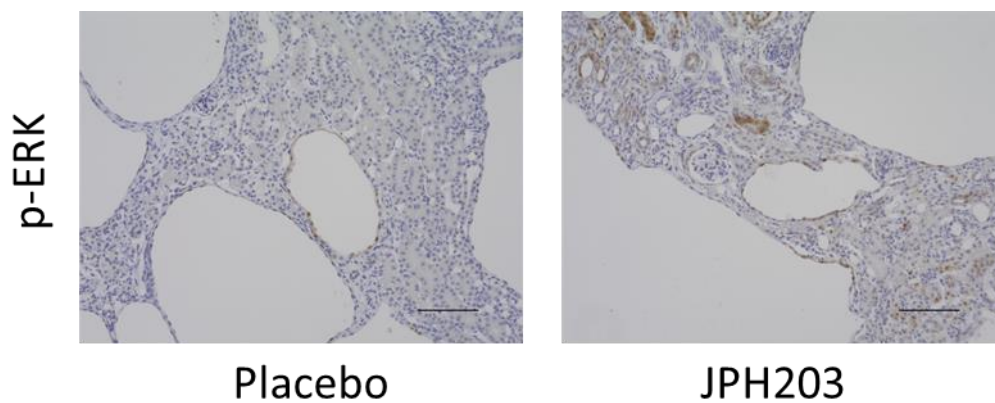


図 61:リン酸化 ERK (p-ERK) の免疫組織染色

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢の *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスより得た腎組織切片を用いて免疫組織染色を行い、嚢胞上皮細胞上の p-ERK の発現について観察した。JPH203 及び Placebo を投与された *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスにおいて、p-ERK は両群ともに同程度に腎嚢胞上皮細胞で発現していた。スケール:100 μ m.

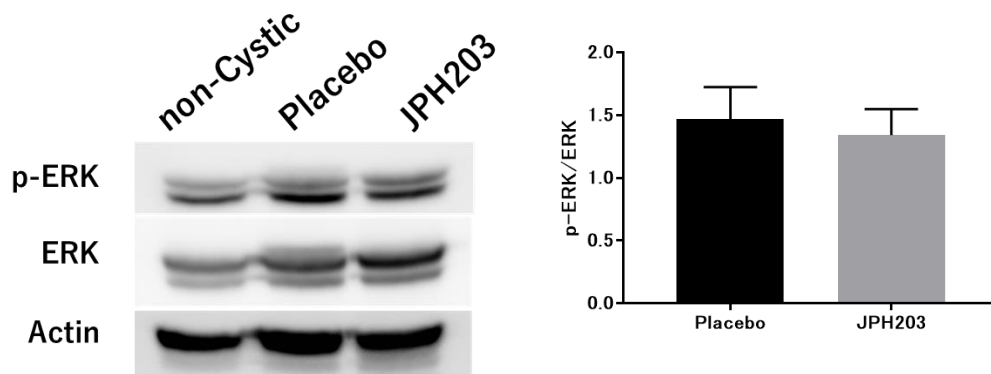


図 62:リン酸化 ERK (p-ERK) のウェスタンブロッティング法による発現量の検討

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢の *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスより得た腎組織を用いてタンパクを抽出し, ウェスタンブロッティング法を行い p-ERK 及び ERK の発現量を検討した. p-ERK の発現量は総タンパクの ERK で補正し検討した. JPH203 を投与した *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスでは, Placebo 群と比較して p-ERK の発現量に有意な差は無かった. N=4.

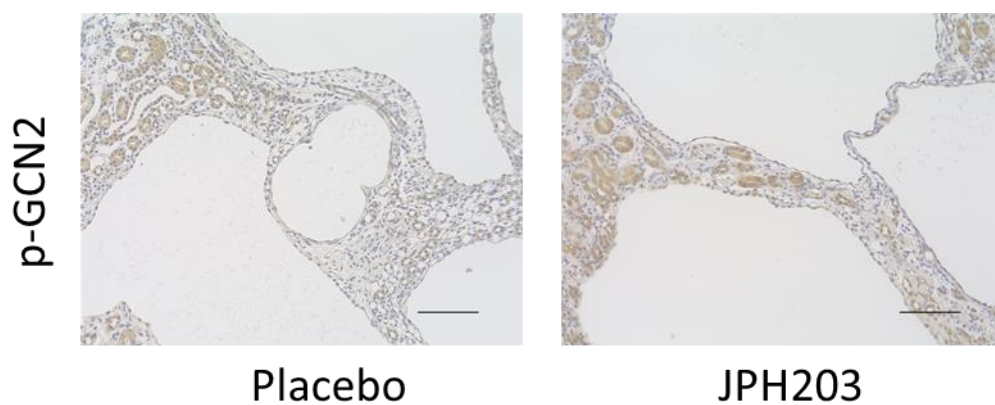


図 63:リン酸化 GCN2 (p-GCN2) の免疫組織染色

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢の *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスより得た腎組織切片を用いて免疫組織染色を行い、嚢胞上皮細胞上の p-GCN2 の発現について観察した. JPH203 及び Placebo を投与した *Pkd1^{flax/flax}; Mx1-Cre* マウスにおいて、ともに p-GCN2 が発現している腎嚢胞上皮細胞は少なかった. スケール:100 μ m

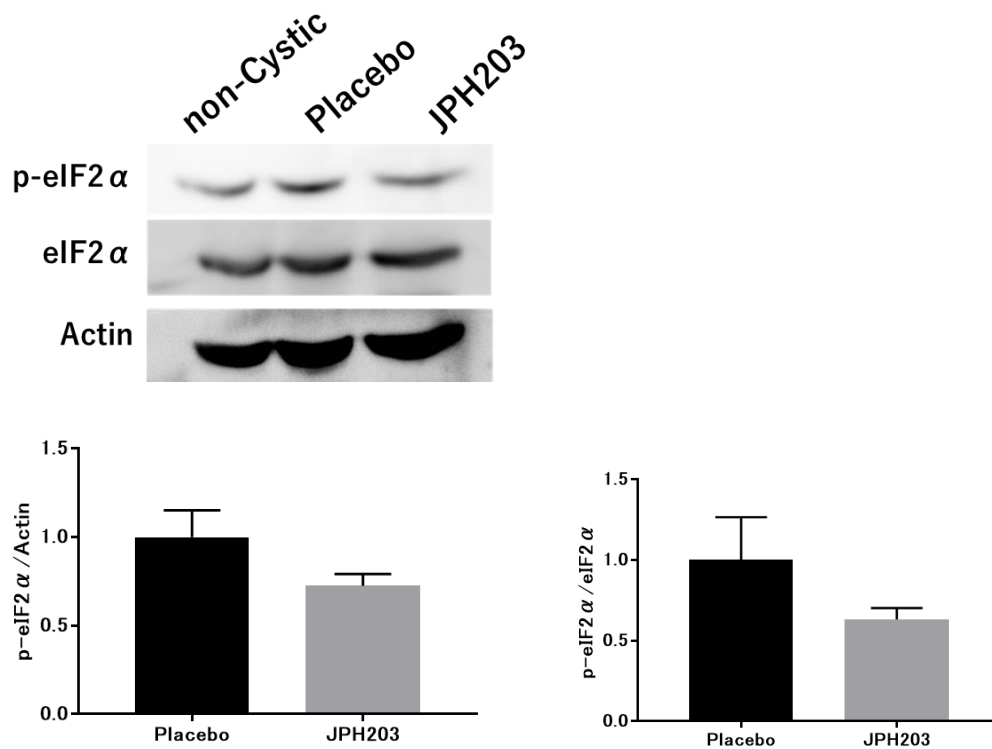


図 64:リン酸化 eIF2α (p-eIF2α) のウェスタンブロッティング法による発現量の検討

JPH203 また Placebo を投与した生後 35 日齢の *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスより得た腎組織を用いてタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法を行い GCN2/ATF4 経路の下流の p-eIF2α 及び eIF2α の発現量を検討した. p-eIF2α の発現量は総タンパクの eIF2α 及びローディングコントロールの Actin で補正し検討した. JPH203 を投与した *Pkd1^{flax/flax}: Mx1-Cre* マウスでは, Placebo 群と比較して p-eIF2α の発現量に有意な差は無かった. N=4.

2.4 考察

腎限局型 *Pkd1* 及び *Slc7a5* コンディショナルノックアウトマウスの作製とその解析により, ADPKD の腎嚢胞形成は, 栄養素の一つであるアミノ酸の欠乏ストレスにより GCN2/ATF4 経路および MAPK/ERK 経路が亢進することで, 増悪することが示された. GCN2/ATF4 経路が嚢胞増大のメカニズムに関与することを報告した既報はこれまでに無く, 新しい知見である. また, 本検討では嚢胞上皮内のアミノ酸取り込みの低下を定量的に示してはいないものの, コンディショナルダブルノックアウトマウスにおいて GCN2/ATF4 経路の亢進が認められ mTOR 経路が抑制されていたという事実は, LAT1 は腎嚢胞上皮細胞において中心的に機能するアミノ酸トランスポーターであり, LAT1 の遺伝的欠失により嚢胞上皮細胞においてアミノ酸の欠乏に至ったということを間接的に示している.

また, 嚢胞増大のメカニズムに関しては, 生後 8 日齢の *Pkd1^{flax/flax}: Slc7a5^{flax/flax}: Ksp-Cre* マウスの嚢胞上皮細胞において PCNA 陽性細胞が有意に増加していたことから, 嚢胞上皮細胞の増殖が関与していることが明らかになった. なお, 生後 11 日目の *Pkd1^{flax/flax}: Slc7a5^{flax/flax}: Ksp-Cre* マウスの嚢胞上皮細胞において, PCNA 陽性細胞数が増加傾向であるものの有意差が無かった点に関しては, 今回使用した *Pkd1^{flax/flax}: Ksp-Cre* マウスが嚢胞増大速度の速い嚢胞腎モデルマウスであり, 生後 14 日前後に腎不全で死亡するモデルであるために(Shibazaki et al., 2008), 我々が観察した生後 11 日齢には実質が残らないほどに嚢胞増大が進み, 細胞増殖が盛んではなくなっているために PCNA 染色で有意差が示されにくい可能性が推察された.

そして, 本検討で明らかになった GCN2/ATF4 経路と ADPKD との関連に関してはこれまでに報告がない. アミノ酸枯渇モデルである *Pkd1^{flax/flax}: Slc7a5^{flax/flax}: Ksp-Cre* マウスの腎嚢胞において GCN2/ATF4 経路が亢進しているのみならず, LAT1 が正常に発現し, *Pkd1* のみ欠失している *Pkd1^{flax/flax}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスにおいても, p-GCN2 や p-eIF2 α の発現が腎嚢胞上皮細胞の一部で亢進していることを本研究で初めて明らかにした. この結果により, ADPKD 嚢胞上皮細胞においても局所的にアミノ酸欠乏のストレスにさらされているということが示唆されており, 腫瘍と同様に嚢胞が増大する過程で, 相対的に局所でアミノ酸不足に陥っていることが嚢胞増悪に影響している可能性が示された.

次に, 本研究で明らかになった GCN2/ATF4 経路と MAPK/ERK 経路の連関について考察する. GCN2/ATF4 経路は前述のように哺乳類細胞においてアミノ酸感知機構の一つとしてアミノ酸欠乏に応答して亢進する代表的な経路であるが, Franchi-Gazzola ら(Franchi-Gazzola et al., 1999) によると, ヒト皮膚線維芽細胞ではアミノ酸欠乏状態に陥ると MAPK/ERK 経路が亢進することが示されており, アミノ酸枯渇状況では GCN2/ATF4 経路と MAPK/ERK 経路が相互依存の関係にあることが報告されている (Monick et al., 2006,

Sharp et al., 2006, Thiaville et al., 2008). 本研究では, *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスにおいて MAPK/ERK 経路亢進の影響を確認するために選択的 MEK1/2 阻害薬 (U0126) を用いて検証を行った. 結果は, U0126 投与群において, MAPK/ERK 経路の抑制と腎嚢胞腫大の改善が確認され, アミノ酸枯渇状況では MAPK/ERK 経路がより嚢胞の進行に影響を及ぼしていることが明らかになった. なお, 同条件の U0126 投与は, *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスの嚢胞形成を抑制し得るものではなく, *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスにおいて過剰に亢進した MAPK/ERK 経路を抑制させることを確認している. そして, mTOR 経路が抑制されているのに加えて U0126 を投与された *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスが, mTOR 経路と MAPK/ERK 経路が活性化している *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{+/+}: Ksp-Cre* マウスと同程度の嚢胞を形成したことは, GCN2/ATF4 経路を含めた別の経路が *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスの嚢胞形成を促進させている可能性を示している (図 65). このアミノ酸枯渇 ADPKD モデルにおける GCN2/ATF4 経路の嚢胞形成への影響を確認するためには, GCN2 阻害薬の投与実験などが必要であり, 今後の検討としたい.

哺乳類細胞において eIF2 α は, ウイルス感染や酸化ストレス, 小胞体ストレス, 紫外線照射, そして栄養失調などのストレスが生じると, それぞれ Protein kinase R, ER stress-activated protein kinase-like ER kinase, Heme-regulated inhibitor, GCN2 といった 4 種類の酵素によりリン酸化され, 細胞内の翻訳機能の低下や細胞内資源の保存, 遺伝子再構成の開始に関わり, ストレス耐性を発揮することが知られている (Wek et al., 2006). しかし, eIF2 α がリン酸化されると他のタンパク翻訳が抑制されるのに対して転写因子の ATF4 が優先的に発現されるようになり, 代謝や酸化還元, アポトーシスに関連した ATF3 や CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein が誘導されるようになる. 即ち, 種々のストレスに応答した結果, アポトーシスが促進される (B'Chir et al., 2014, Kilberg et al., 2009, Wek et al., 2006) さらに, ADPKD の病態において, PC1 が eIF2 α のリン酸化やアポトーシスを抑制することが報告されており (Tang et al., 2017), 今回作製した *Pkd1^{fllox/fllox}: Slc7a5^{fllox/fllox}: Ksp-Cre* マウスにおいては, PC1 の欠失のみならず, アミノ酸枯渇による GCN2/ATF4 経路の活性化によりアポトーシスが促進されたことが推察された.

以上の腎限局型 *Pkd1* 及び *Slc7a5* コンディショナルダブルノックアウトマウスの作製によって, 嚢胞形成には GCN2/ATF4 経路の活性化が関与すること, LAT1 が腎嚢胞上皮細胞における主要なアミノ酸トランスポーターであるということ, さらに LAT1 の機能が喪失することによって起こるアミノ酸の枯渇はストレス応答を招き, GCN2/ATF4 経路及び MAPK/ERK 経路の活性化を通して ADPKD の病態を増悪させるという新たな嚢胞増大機序を明らかにした. また, 現在 ADPKD の食事指導としてカロリー制限が推奨されつつあるが, 極度のアミノ酸制限は嚢胞形成を促進する可能性が示唆された.

次に、選択的 LAT1 阻害薬 (JPH203) の投与実験について考察する。多くの腫瘍細胞において、選択的 LAT1 阻害薬はアミノ酸の取り込みを阻害し、mTOR 経路を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することが報告されている(Hafliger et al., 2018 , Hayashi and Anzai, 2017, Ueno et al., 2016 , Yun et al., 2014)。前述のコンディショナルダブルノックアウトマウスの検討では、アミノ酸枯渇は腎嚢胞増大の一因となることが明らかになったため、選択的 LAT1 阻害薬による過度な LAT1 の阻害は、腎嚢胞の形成を促進させる可能性があると考えられた。しかし、本研究においては、JPH203 (50 μ g/g (BW)) を短期間で隔日投与し、LAT1 を適度に阻害することで、腫瘍細胞による既報同様に mTOR 経路の抑制を介して腎嚢胞が縮小した。また、同条件では MAPK/ERK 経路や GCN2/ATF4 経路には影響しないことを確認した。つまり、アミノ酸枯渇のストレスに暴露させない程度で LAT1 を阻害することは、mTOR 経路を抑制し、嚢胞形成抑制に繋がる可能性が示唆された。なお、長期投与群において腎嚢胞形成の抑制効果が得られなかった点については、嚢胞腎モデルマウスの腎不全や肝不全の進行に伴う JPH203 の蓄積の影響や長期間に渡る LAT1 の阻害の影響でアミノ酸枯渇ストレスを誘発させる可能性、他のトランスポーターの機能亢進によりアミノ酸取り込みが代償され JPH203 の効果が相殺された可能性が推察された。腎嚢胞抑制効果を最大限に発揮するべく、JPH203 の適切な投与量や投与期間について、更なる検討が必要である。また、本研究で用いた *Pkd1^{flax/flax}:Mxl-Cre* マウスは、肝嚢胞も形成する ADPKD モデルマウスであるが、JPH203 は肝嚢胞の抑制効果は有していなかった。肝嚢胞上皮において LAT1 が発現していることを示した報告はなく、異なる種のアミノ酸トランスポーターが関与している可能性が示唆された。ADPKD において肝嚢胞は、進行すると肝腫大を招き難治性腹水や繰り返す嚢胞感染により生命予後を左右する。現在臨床にて使用可能な唯一の治療薬であるトルバプタンも肝嚢胞には無効であり、肝嚢胞の形成を抑制する確立した治療はない。肝嚢胞上皮細胞で中心的に機能するアミノ酸トランスポーターの同定や嚢胞形成に関与する機序の解明は、肝嚢胞の新規治療の開発において重要であると考えられ、今後更なる検討が求められる。

先行研究として、Yamamoto らは分枝鎖アミノ酸の負荷により mTOR 経路及び MAPK/ERK 経路の活性化を介して嚢胞形成を促進させることを証明した (Yamamoto et al., 2017)。一方、本研究により、腎嚢胞上皮においては主に LAT1 を介してアミノ酸供給が行われ、アミノ酸の不足が起きるとアミノ酸感知機構の一つである GCN2/ATF4 経路が MAPK/ERK 経路と共に亢進し、嚢胞形成を促進させることが明らかになった。即ち、嚢胞上皮内のアミノ酸の多寡が mTOR 経路や GCN2/ATF4 経路から成るアミノ酸感知機構に感知され、嚢胞形成は調節されることが明らかになった (図 66)。アミノ酸の供給が過剰でも枯渇しても嚢胞形成が増悪するため、今後、ADPKD 患者における適切なアミノ酸摂取量やタンパク摂取量に関する更なる検討が求められる。

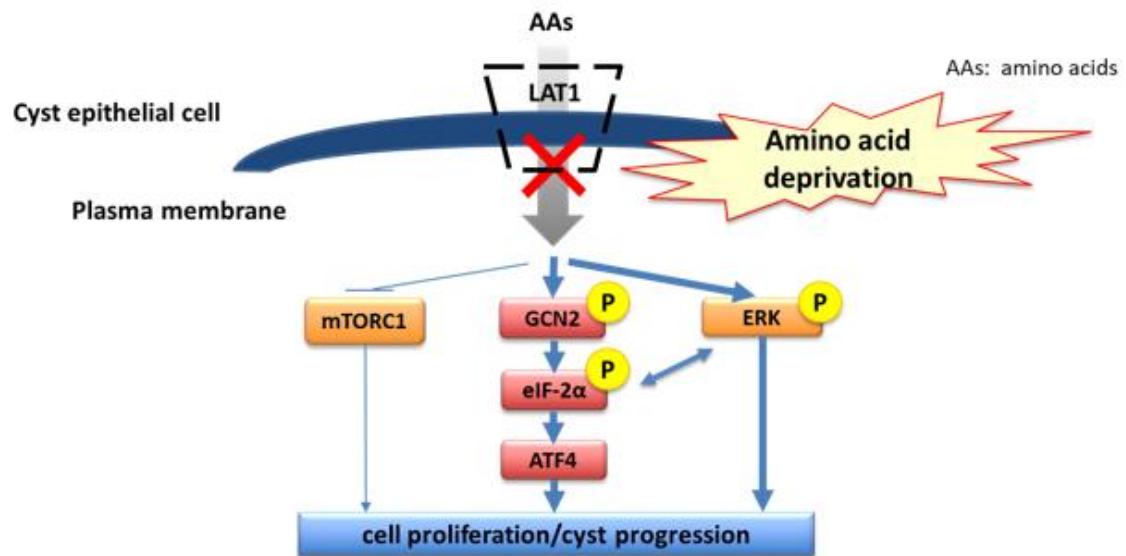


図 65 : *Pkd1^{flax/flax}: Slc7a5^{flax/flax}: Ksp-Cre* マウスにおける腎嚢胞増大の機序

Pkd1^{flax/flax}: Slc7a5^{flax/flax}: Ksp-Cre マウスでは、mTOR 経路が抑制されている一方で、GCN2/ATF4 経路と MAPK/ERK 経路の亢進が確認され、アミノ酸枯渇状態に対するストレス応答が嚢胞増大に関与していることが明らかになった。また、選択的 MEK1/2 阻害薬 (U0126) 投与実験により、嚢胞増大には MAPK/ERK 経路がより優位に影響していることが確かめられた。

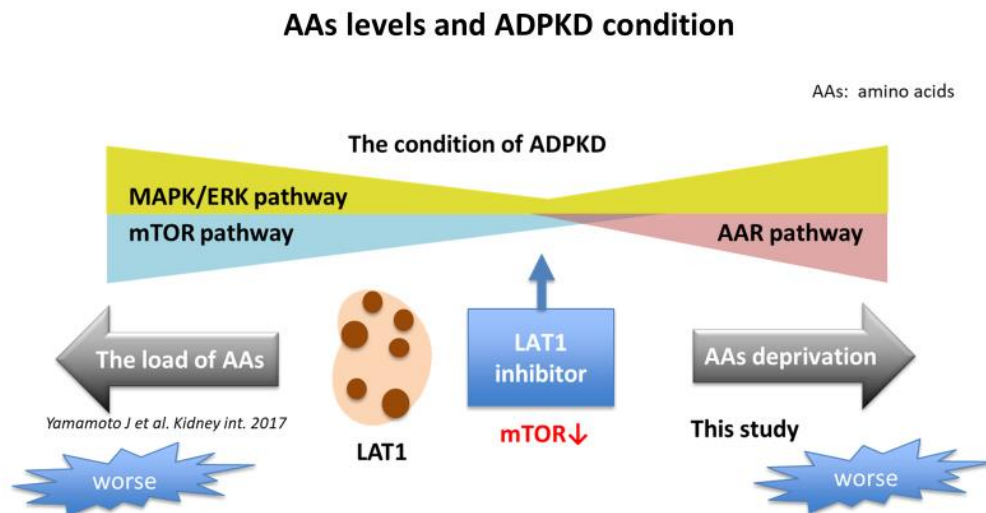


図 66 : アミノ酸多寡と ADPKD の腎嚢胞増大メカニズム

嚢胞上皮におけるアミノ酸は過剰でも欠乏してもアミノ酸感知機構により感知され、嚢胞増大に関与する. LAT1 阻害薬によるアミノ酸欠乏に至らない LAT1 の阻害は、mTOR 経路の抑制を介して嚢胞の形成を抑制する.

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。

- *Atp6ap2* を *Ksp-Cre* を用いて胎生期より腎限局的にノックアウトさせたマウスでは、アポトーシスの亢進や髄質の尿細管形成障害、水腎症の発生を招き、腎の発育形成に影響がある。
- *Atp6ap2* を *Mxl-Cre* を用いて生後 8 日目よりノックアウトさせたマウスでは、腹腔内臓器を中心として、臓器の障害が強く、*Pkd1* のノックアウトに関わらず早期に死亡する。
- *Atp6ap2* を *Mxl-Cre* を用いて生後 15 日目よりノックアウトさせたマウスでは、長期生存が可能なマウスが得られる。
- *Slc7a5* を *Ksp-Cre* を用いて胎生期より腎限局的にノックアウトさせたマウスでは、腎の発育形成に異常を示さない。
- *Pkd1* 及び *Slc7a5* の腎限局型ダブルノックアウトマウスでは、*Pkd1* のみノックアウトさせたマウスと比較して腎嚢胞の形成が促進される。
- *Pkd1* 及び *Slc7a5* の腎限局型ダブルノックアウトマウスでは、mTOR 経路が抑制されている一方、GCN2/ATF4 経路及び MAPK/ERK 経路が活性化され、アミノ酸欠乏ストレス下にあることが示唆され、両経路が嚢胞の増大に関与する。このことから腎嚢胞上皮細胞では、主に LAT1 を介してアミノ酸が供給されることが示される。
- *Pkd1^{flox/flox}:Ksp-Cre* マウスにおいても、嚢胞上皮細胞で局所的に GCN2/ATF4 経路の亢進し、嚢胞増大の過程でアミノ酸欠乏ストレスに暴露されている。
- *Pkd1* 及び *Slc7a5* の腎限局型ダブルノックアウトマウスでは、MAPK/ERK 経路がより優位に嚢胞の増大に影響する。
- アミノ酸の過剰や欠乏は、mTOR 経路や GCN2/ATF4 経路から成るアミノ酸感知機構を介して感知され、嚢胞形成が調節される。
- 選択的 LAT1 阻害薬は、mTOR 経路を阻害して腎嚢胞形成を抑制する。

本研究は ADPKD と(プロ)レニン受容体及び LAT1 と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、*Atp6ap2* を胎生期や成長期にノックアウトさせると発育に影響があり、嚢胞形成への影響を評価することは困難であったため、(プロ)レニン受容体を検討するためには同手法は不適切であった。しかし、生後 15 日以降の *Mxl-Cre* を用いてノックアウトしたマウスでは長期生存が可能であったため、*Atp6ap2* のノックアウトの時期が晩期の場合には、*Atp6ap2* の抑制が嚢胞形成に与える影響を検討できる可能性が示唆された。ADPKD において新たな治療薬が求められているため、(プロ)レニン受容体及び Wnt/

β カテニン経路に着目し新規治療の開発に生かす試みは重要であり、今後は、発育後のマウスを用いて薬剤投与を試みたり、*Pkd1*^{-/-}細胞による *Atp6ap2* ノックダウンの手法を用いたりして、検討を続けていきたい。

第二章では、LAT1 が嚢胞腎において中心的に機能するアミノ酸トランスポーターであり、さらにはアミノ酸の枯渇が GCN2/ATF4 経路及び MAPK/ERK 経路を介して嚢胞を増大させる新たなメカニズムを発見した。これまでの既報では、動物実験においてタンパク制限やカロリー制限が嚢胞腎の進行抑制に有効であることが報告されているが、過剰なアミノ酸制限が病状を悪化させる可能性もあることを示す、重要な知見であると考ええる。Yamamoto らにより、過剰なアミノ酸摂取が嚢胞を進行させることを報告していることから、アミノ酸は過剰でも欠乏でも嚢胞腎の病状を悪化させうるため、今後は ADPKD 患者にとって適切なアミノ酸摂取量を検討していく必要があると考えられた。また、選択的 LAT1 阻害薬は、mTOR 経路を阻害することで嚢胞形成を抑制する新規薬剤として使用できる可能性が示された。しかし、今回の投与条件では腎機能の改善効果はなく、長期投与により効果が減弱したことから、最適な投与条件の検討を要すると考えられた。また、他剤との併用による嚢胞抑制効果など、実臨床への応用に向けて更なる検討を重ねていく。

ADPKD の治療や病状の進展予防に関連するエビデンスは不足しており、ADPKD の未知なる病態の解明や、トルバプタンとは異なる新たな切り口で治療戦略を立てることが求められている。日常で必須となるアミノ酸摂取と ADPKD の病態が密接に関わることや LAT1 が新規治療薬のターゲットとなり得ることが本研究で明らかにされており、本研究の発展により、ADPKD 病態改善の一助になることに期待したい。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さった、北海道大学大学院医学研究院・医学院 免疫・代謝内科学教室 渥美達也教授に深く感謝致します。本研究全般にわたり直接の御指導を頂いた同免疫・代謝内科学教室 西尾妙織講師に心から感謝致します。また本研究において、*Atp6ap2*^{flax/flax} マウスを提供して下さいった東京女子医科大学高血圧・内分泌内科 市原淳弘教授、*Slc7a5*^{flax/flax} マウス及び選択的 LAT1 阻害薬を提供して下さいった杏林大学医学部薬理学教室 櫻井裕之教授、木村徹講師に心から感謝致します。

最後に、本研究を支えて下さった免疫・代謝内科学教室の全ての皆様、陰ながら見守り、応援してくれた家族に心よりお礼申し上げます。

利益相反

本研究内容に関連し、開示すべき金銭的・個人的な利害関係はありません。

引用文献

B'Chir, W., Chaveroux, C., Carraro, V., Averous, J., Maurin, A.C., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2014). Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cell. Signal.* 26, 1385-1391.

Choi, D.W., Kim, D.K., Kanai, Y., Wempe, M.F., Endou, H., and Kim, J.K. (2017). JPH203, a selective L-type amino acid transporter 1 inhibitor, induces mitochondria-dependent apoptosis in Saos2 human osteosarcoma cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 21, 599-607.

Efeyan, A., Comb, W.C., and Sabatini, D.M. (2015). Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature.* 517, 302-310.

Enomoto, K., Sato, F., Tamagawa, S., Gunduz, M., Onoda, N., Uchino, S., Muragaki, Y., and Hotomi, M. (2019). A novel therapeutic approach for anaplastic thyroid cancer through inhibition of LAT1. *Sci. Rep.* 9, 14616.

Fouque, D., and Laville, M. (2009). Low protein diets for chronic kidney disease in non diabetic adults. *Cochrane Database Syst. Rev.*, Cd001892.

Franchi-Gazzola, R., Visigalli, R., Bussolati, O., Dall'Asta, V., and Gazzola, G.C. (1999). Adaptive increase of amino acid transport system A requires ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* 274, 28922-28928.

Gallinetti, J., Harputlugil, E., and Mitchell, J.R. (2013). Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR. *Biochem. J.* 449, 1-10.

Hafliger, P., Graff, J., Rubin, M., Stooss, A., Dettmer, M.S., Altmann, K.H., Gertsch, J., and Charles, R.P. (2018). The LAT1 inhibitor JPH203 reduces growth of thyroid carcinoma in a fully immunocompetent mouse model. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37, 234.

Hayashi, K., and Anzai, N. (2017). Novel therapeutic approaches targeting L-type amino acid transporters for cancer treatment. *World J. Gastrointest. Oncol.* 9, 21-29.

Ichinoe, M., Mikami, T., Yoshida, T., Igawa, I., Tsuruta, T., Nakada, N., Anzai, N., Suzuki, Y., Endou, H., and Okayasu, I. (2011). High expression of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions. *Pathol. Int.* 61, 281-289.

Kilberg, M.S., Shan, J., and Su, N. (2009). ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 436-443.

Kotsis, F., Boehlke, C., and Kuehn, E.W. (2013). The ciliary flow sensor and polycystic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 28, 518-526.

Kouchi, M., Shibayama, Y., Ogawa, D., Miyake, K., Nishiyama, A., and Tamiya, T. (2017). (Pro)renin receptor is crucial for glioma development via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J. Neurosurg.* 127, 819-828.

Leuenroth, S.J., Bencivenga, N., Chahboune, H., Hyder, F., and Crews, C.M. (2010). Triptolide reduces cyst formation in a neonatal to adult transition Pkd1 model of ADPKD. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25, 2187-2194.

Maditz, K.H., Gigliotti, J.C., and Tou, J.C. (2013). Evidence for a role of proteins, lipids, and phytochemicals in the prevention of polycystic kidney disease progression and severity. *Nutr. Rev.* 71, 802-814.

Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., *et al.* (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science.* 272, 1339-1342.

Monick, M.M., Powers, L.S., Gross, T.J., Flaherty, D.M., Barrett, C.W., and Hunninghake, G.W. (2006). Active ERK contributes to protein translation by preventing JNK-dependent inhibition of protein phosphatase 1. *J. Immunol.* 177, 1636-1645.

Nagao, S., Yamaguchi, T., Kusaka, M., Maser, R.L., Takahashi, H., Cowley, B.D., and Grantham, J.J. (2003). Renal activation of extracellular signal-regulated kinase in rats with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 63, 427-437.

Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., *et al.* (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* 33, 129-137.

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

Ramkumar, N., and Kohan, D.E. (2016). The nephron (pro)renin receptor: function and significance. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 311, F1145-f1148.

Rosilio, C., Nebout, M., Imbert, V., Griessinger, E., Neffati, Z., Benadiba, J., Hagenbeek, T., Spits, H., Reverso, J., Ambrosetti, D., *et al.* (2015). L-type amino-acid transporter 1 (LAT1): a therapeutic target supporting growth and survival of T-cell lymphoblastic lymphoma/T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 29, 1253-1266.

Saadi-Kheddouci, S., Berrebi, D., Romagnolo, B., Cluzeaud, F., Peuchmaur, M., Kahn, A., Vandewalle, A., and Perret, C. (2001). Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene. *Oncogene.* 20, 5972-5981.

Saigusa, T., Dang, Y., Bunni, M.A., Amria, M.Y., Steele, S.L., Fitzgibbon, W.R., and Bell, P.D. (2015). Activation of the intrarenal renin-angiotensin-system in murine polycystic kidney disease. *Physiol. Rep.* 3.

Scalise, M., Galluccio, M., Console, L., Pochini, L., and Indiveri, C. (2018). The Human SLC7A5 (LAT1): The Intriguing Histidine/Large Neutral Amino Acid Transporter and Its Relevance to Human Health. *Front. Chem.* 6, 243.

Sharp, J.W., Ross-Inta, C.M., Hao, S., Rudell, J.B., and Gietzen, D.W. (2006). Co-localization of phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2) and phosphorylated eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) in response to a threonine-devoid diet. *J. Comp. Neurol.* 494, 485-494.

Shibayama, Y., Fujimori, T., Nguyen, G., Hirose, T., Totsune, K., Ichihara, A., Kitada, K., Nakano, D., Kobori, H., Kohno, M., *et al.* (2015). (Pro)renin receptor is crucial for Wnt/beta-catenin-dependent genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci. Rep.* 5, 8854.

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

Song, R., Preston, G., Ichihara, A., and Yosypiv, I.V. (2013). Deletion of the prorenin receptor from the ureteric bud causes renal hypodysplasia. *PLoS One.* 8, e63835.

Stransky, L., Cotter, K., and Forgac, M. (2016). The Function of V-ATPases in Cancer. *Physiol. Rev.* 96, 1071-1091.

Tang, Y., Wang, Z., Yang, J., Zheng, W., Chen, D., Wu, G., Sandford, R., Tang, J., and Chen, X.Z. (2017). Polycystin-1 inhibits eIF2alpha phosphorylation and cell apoptosis through a PKR-eIF2alpha pathway. *Sci. Rep.* 7, 11493.

Thiaville, M.M., Pan, Y.X., Gjymishka, A., Zhong, C., Kaufman, R.J., and Kilberg, M.S. (2008). MEK signaling is required for phosphorylation of eIF2alpha following amino acid limitation of HepG2 human hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 283, 10848-10857.

Tomobe, K., Philbrick, D., Aukema, H.M., Clark, W.F., Ogborn, M.R., Parbtani, A., Takahashi, H., and Holub, B.J. (1994). Early dietary protein restriction slows disease progression and lengthens survival in mice with polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 1355-1360.

Torres, V.E., Chapman, A.B., Devuyst, O., Gansevoort, R.T., Grantham, J.J., Higashihara, E., Perrone, R.D., Krasa, H.B., Ouyang, J., Czerwiec, F.S., *et al.* (2012). Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 2407-2418.

Torres, V.E., and Harris, P.C. (2014). Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 18-32.

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

Ueno, S., Kimura, T., Yamaga, T., Kawada, A., Ochiai, T., Endou, H., and Sakurai, H. (2016). Metformin enhances anti-tumor effect of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) inhibitor. *J. Pharmacol. Sci.* 131, 110-117.

Wang, J., Shibayama, Y., Zhang, A., Ohsaki, H., Asano, E., Suzuki, Y., Kushida, Y., Kobara, H., Masaki, T., Wang, Z., *et al.* (2019). (Pro)renin receptor promotes colorectal cancer through the Wnt/beta-catenin signalling pathway despite constitutive pathway component mutations. *Br. J. Cancer.* *120*, 229-237.

Warner, G., Hein, K.Z., Nin, V., Edwards, M., Chini, C.C., Hopp, K., Harris, P.C., Torres, V.E., and Chini, E.N. (2016). Food Restriction Ameliorates the Development of Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* *27*, 1437-1447.

Wek, R.C., Jiang, H.Y., and Anthony, T.G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 7-11.

Wilson, P.D. (2004). Polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* *350*, 151-164.

Wuebben, A., and Schmidt-Ott, K.M. (2011). WNT/beta-catenin signaling in polycystic kidney disease. *Kidney Int.* *80*, 135-138.

Xu, Q., Jensen, D.D., Peng, H., and Feng, Y. (2016). The critical role of the central nervous system (pro)renin receptor in regulating systemic blood pressure. *Pharmacol. Ther.* *164*, 126-134.

Yamamoto, J., Nishio, S., Hattanda, F., Nakazawa, D., Kimura, T., Sata, M., Makita, M., Ishikawa, Y., and Atsumi, T. (2017). Branched-chain amino acids enhance cyst development in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* *92*, 377-387.

Yanagisawa, N., Ichinoe, M., Mikami, T., Nakada, N., Hana, K., Koizumi, W., Endou, H., and Okayasu, I. (2012). High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J. Clin. Pathol.* *65*, 1019-1023.

Yoder, B.K., Hou, X., and Guay-Woodford, L.M. (2002). 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.

Yun, D.-W., Lee, S.A., Park, M.-G., Kim, J.-S., Yu, S.-K., Park, M.-R., Kim, S.-G., Oh, J.-S., Kim, C.S., Kim, H.-J., *et al.* (2014). JPH203, an L-Type Amino Acid Transporter 1–Selective Compound, Induces Apoptosis of YD-38 Human Oral Cancer Cells. *J. Pharmacol. Sci.* *124*, 208-217.

Zhu, P., Sieben, C.J., Xu, X., Harris, P.C., and Lin, X. (2017). Autophagy activators suppress cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 158-172.