

Cre/loxP システムを用いた *Pkd1* ノックアウトマウスの作製と解析

学位論文内容の要旨

緒言

常染色体優性遺伝型多発性嚢胞腎 (ADPKD) は最も頻度が高い遺伝性腎疾患である。加齢とともに嚢胞が両腎で増加し、進行性に腎機能が障害され、70 歳までに患者の約半数が腎不全に至る。ADPKD の原因遺伝子として、*PKD1* 遺伝子と *PKD2* 遺伝子が同定されている。*PKD1* の遺伝子産物であるポリシスチン 1 は、大きな細胞外ドメインをもつ膜貫通型蛋白で、機械的センサーの役割を果たす。一方 *PKD2* の遺伝子産物であるポリシスチン 2 は膜貫通型蛋白で、カルシウムイオンチャンネルとして作用する。

現在まで *Pkd1* ノックアウトマウスが数編報告されており、ホモ接合体では胎生 15.5 日から腎嚢胞を認め、胎生致死となる。胎生致死のためこれらのマウスは詳細な ADPKD の病態解析や薬剤投与実験には不十分なモデルであった。Cre/loxP システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスは、Cre トランスジェニックマウスの Cre 蛋白の発現部位、発現時期の違いによって、異なる表現型を得られる。現在まで *Pkd1*, *Pkd2* 遺伝子では、腎臓特異的なコンディショナルノックアウトマウスは作製されていない。

本研究においては、胎生致死でなく、緩徐に腎嚢胞が出現し、進行性に腎機能が低下するヒト ADPKD 類似の動物モデルを作製することを目的とする。私は腎臓特異的なカドヘリン遺伝子のプロモーターを使用した *ksp-Cre* マウスを用いて、腎臓特異的な *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスを作製したのでここに報告する。

方法と結果

1. ターゲティングベクターの作製

マウス BAC ライブラリーより *Pkd1* 遺伝子を含むクローンを得て、そこからエクソン 2-5 を含む断片を pBII KS(-)へのサブクローニングを行った。次に pBS246 の loxP 断片をイントロン 1 に、PK-11 の loxP-FRT-PGKNeo-FRT 断片をイントロン 4 に挿入した。

2. ES 細胞への遺伝子導入, *Pkd1* flox マウスの作製

ターゲティングベクターをマウスの ES 細胞に遺伝子導入した。セレクションはジフテリアトキシン、ネオマイシンを使用した。ES 細胞の DNA を用いて 3'側を PCR 法にて、5'側をサザンブロット法にてスクリーニングを行った。600 個中 5 個陽性であった ES 細胞のクローンを用いて *Pkd1* flox ヘテロマウス (*Pkd1*^{flox/+}) を作製した。flox ヘテロマウス同士を交配し、F2 マウスを得るも *Pkd1*^{flox/flox} マウスは得られなかった。次に flox ヘテロマウスと *FLP1* マウスを交配し、ネオマイシン耐性遺伝子を欠失した *Pkd1*^{deho/+} マウスを得た。*Pkd1*^{deho/+} 同士を交配し、*Pkd1*^{deho/deho} マウスを得た。

3. *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスの作製と発現解析

Pkd1 ヘテロマウス (*Pkd1*^{+/+}), *Pkd1*^{delno/delno} マウスと ksp Cre マウスを交配し, *Pkd1*^{+/+} Cre マウス, *Pkd1*^{delno/+} Cre マウスを作製した. *Pkd1*^{+/+} Cre マウス, *Pkd1*^{delno/+} Cre マウスを *Pkd1*^{delno/delno} マウスと交配し, *Pkd1*^{delno/+} Cre, *Pkd1*^{delno/delno} Cre マウスを作製した. *Pkd1*^{delno/delno} Cre マウスと *Pkd1*^{+/+} Cre マウスから腎臓, 肝臓, 心臓, 肺を摘出し, その DNA を用いてサザンプロット解析を行った. 各臓器で flox アレルを示すバンドを認めたが, エクソン 2~4 の欠失を示すバンドは腎臓のみ認められた. 腎臓におけるエクソン 2~4 の欠失を示すバンドの割合は, ImageJ による解析では約 30% であった.

4. *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスの表現型

ノックアウトマウスは生後 7 日ころから腹部の膨隆を認め, 生後 14 日-21 日に死亡する. 生後 4, 7, 14 日目の *Pkd1*^{delno/+} Cre, *Pkd1*^{delno/delno} Cre マウスとコントロール群を各々 10 匹ずつ採血し, 血液尿素窒素を測定した. 生後 7 日のノックアウトマウス群で有意な上昇を認め, 生後 14 日では腎機能はさらに悪化した. 体重, 腎重量も 10 匹ずつ測定し, 腎重量・体重比を用いて比較検討した. 生後 4 日でコントロール群とノックアウトマウス群において有意差を認めた. 日齢毎の腎重量・体重比では個体差がほとんどなく比較的均一であった.

5. 病理組織学的解析

4%パラホルムアルデヒド(4%PFA)/PBS)にて還流固定を行い, 腎臓を摘出した. パラフィン包埋して切片を作製し, HE 染色および PAS 染色を行った. 生後 1 日で腎臓に嚢胞を認めた. 嚢胞は髄質に多く認められたが, 皮質にも散在していた. 近位尿細管では嚢胞形成を認めなかった. 生後 14 日目では腎臓全体が嚢胞で占められ, 間質はほとんど消失していた.

6. 免疫染色

4%PFA/PBS にて還流固定し, 腎臓を摘出した. パラフィン包埋して切片を作製し, 蛍光免疫染色を行った. 切片を一次抗体で 4℃にて一晚, 2 次抗体で室温にて 1 時間反応させた. 観察および撮影は共焦点レーザー顕微鏡にて行った. 近位尿細管マーカー (LTL), 集合管マーカー (DBA) を用いて染色した. LTL 陽性の嚢胞は認めず, 嚢胞のほとんどは DBA 陽性であった. LTL, DBA とともに陰性の嚢胞も認めた. 嚢胞はほとんどが集合管由来で, わずかにヘンレループ, 遠位尿細管由来の嚢胞を認めた. 集合管の主細胞と介在細胞を区別するために, DBA, H⁺-ATPase の二重染色を行った. 集合管由来の嚢胞において主細胞と介在細胞両方が認められた. 次に線毛を観察するために, acetyl-tubulin 染色を行った. コントロール群, ノックアウトマウス群では線毛の形態において差異は認めなかった. さらに acetyl-tubulin・H⁺-ATPase の二重染色では, 両群ともに, H⁺-ATPase 陰性細胞だけでなく, 陽性細胞にも線毛を認めた.

考察

本研究では腎臓特異的な *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスを作製し, その解析を行った. 表現型に影響を及ぼすネオマイシン耐性遺伝子の除去が必要と考え, FRT/FLP システムを導入した. *Pkd1*^{lox/+} 同士の交配では, *Pkd1*^{lox/lox} マウスは誕生せず, 胎生致死であった可能性が高い. そこで *Pkd1*^{delno/delno} マウスを作製したところ, 胎生致死とならずに表現型は野生型マウスと同様だった.

次に *Pkd1*^{delno/+} Cre マウス, *Pkd1*^{delno/delno} Cre マウスを作製した. サザンプロット解析により腎臓特異的にノックアウトされていることが確認されたが, ノックアウトされている *Pkd1* 遺伝子は約 30% であった. その理由は, 腎臓内の細胞において, Ksp プロモーターが働く細胞が, 全ての細胞ではなく一部の細胞 (ヘンレループ, 遠位尿細管, 集合管など) に働くためと考えられる.

今回の集合管由来の嚢胞に主細胞と介在細胞を認め, 集合管における嚢胞形成は, モノクローナルな細胞増殖によらないことが示唆された. 本研究のノックアウトマウスの嚢胞では, 線毛に形態異常を認めなかった. 従来, 線毛は集合管の介在細胞には認めないと報告されている. しかし本研究では

コントロール、ノックアウトマウス共に介在細胞に線毛を認めており、介在細胞も主細胞と同様に線毛による尿流感知システムが存在する可能性を示唆された。

Piontek らが作製した *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスは、生後 20 週で腎嚢胞、肝嚢胞を認めるが、嚢胞の数は少なく、腎不全に至らなかった。Leeuwen らの *pkd1^{fl/fl}* マウスは胎生致死ではなく腎嚢胞を形成するが、同週齢における表現型のばらつきが大きい。*pkd2* において、胎生致死を免れる遺伝子改変マウスが存在し、不安定なアレル (WS25 アレル) をもつノックアウトマウスが報告されている。表現型としては大小様々な嚢胞が出現し ADPKD に非常に類似していたが、個体毎に嚢胞形成の程度が異なり腎不全の程度も比較的不均一である。

本研究で作製したマウスは、同一日齢での腎臓腫大、腎不全の程度が比較的均一であり、さらに腎不全によって死亡する。そのため薬剤投与における評価が行いやすいモデルマウスと考えられた。*Pkd1^{chr20/chr20}* マウスは使用する Cre マウスを変更することで、ノックアウトする臓器、時期の変更が可能である。異なる Cre マウスとの交配により、ヒト ADPKD の病態に近い表現型をもつマウスが作製され、嚢胞形成機序の解明や薬剤投与実験に適用されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 野々村 克 也

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

Cre/loxP システムを用いた

Pkd1 ノックアウトマウスの作製と解析

常染色体優性遺伝型多発性嚢胞腎(ADPKD)は最も頻度が高い遺伝性腎疾患である。加齢とともに嚢胞が両腎で増加し、70歳までに患者の約半数が腎不全に至る。ADPKDの原因遺伝子のひとつに *PKD1* 遺伝子が同定されている。*Pkd1* ノックアウトマウスは、ホモ接合体では胎生15.5日から腎嚢胞を認め、胎生致死となる。胎生致死のためこれらのマウスは詳細な病態解析や薬剤投与実験には不十分なモデルであった。今回腎臓特異的カドヘリン遺伝子のプロモーターを使用した *ksp-Cre* マウスを用いて、胎生致死とはならない腎臓特異的な *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスを作製した。

ターゲティングベクターとして、マウス *pkd1* 遺伝子のイントロン1に loxP 断片を、イントロン4に loxP-FRT-PGKNeo-FRT 断片を挿入した。ターゲティングベクターをマウスのES細胞に遺伝子導入し、陽性クローンを用いて *Pkd1* flox ヘテロマウス(*Pkd1*^{+/loxP})を作製した。*FLP1* マウス、*ksp Cre* マウスを交配し、*Pkd1*^{+/loxP} *Cre* マウスを作製した。

Pkd1^{+/loxP} *Cre* マウスと *Pkd1*^{+/+} *Cre* マウスから腎臓、肝臓、心臓、肺を摘出し、そのDNAを用いてサザンブロット解析を行った。エクソン2~4の欠失を示すバンドは腎臓のみ認められた。生後4日のノックアウトマウスで腎臓の腫大し、生後7日のノックアウトマウス群で腎不全を呈し、生後14日-21日に死亡する。病理組織では、生後1日で腎臓において嚢胞を認め、生後14日目では腎臓全体が嚢胞で占められた。近位尿細管では嚢胞形成を認めなかった。近位尿細管マーカー(LTL)、集合管マーカー(DBA)を用いた蛍光免疫染色では、LTL陽性の嚢胞は認めず、嚢胞のほとんどはDBA陽性であった。LTL、DBAともに陰性の嚢胞も認めた。嚢胞はほとんどが集合管由来で、ヘンループ、遠位尿細管由来の嚢胞も認めた。DBA、H⁺-ATPase の二重染色では、集合管由来の嚢胞において主細胞と介在細胞両方が認められた。さらに acetyl-tubulin・H⁺-ATPase の二重染色では、両群ともにH⁺-ATPase 陰性細胞だけでなく、陽性細胞にも線毛を認めた。

今回の集合管由来の嚢胞に主細胞と介在細胞を認め、集合管における嚢胞形成は、モノクローナルな細胞増殖によらないことが示唆された。本研究のノックアウトマウスの嚢胞では、線毛に形態異常を認めず、コントロール、ノックアウトマウス共に介在細胞に線毛を認めており、介在細胞も主細胞と同様に線毛による尿流感知

システムが存在する可能性が示唆された。本研究で作製したマウスは、同一日齢での腎臓腫大、腎不全の程度が比較的均一であり、腎不全によって死亡する。そのため薬剤投与における評価が行いやすいモデルマウスと考えられた。*Pkd1*^{flx/flx}マウスは使用するCreマウスを変更することで、ノックアウトする臓器、時期の変更が可能である。異なるCreマウスとの交配により、ヒトADPKDの病態に近い表現型をもつマウスが作製され、嚢胞形成機序の解明や薬剤投与実験に適用されることが期待される。

質疑応答は、副査の畠山鎮次教授より開始コドンの位置、エクソン2-4を削除することでドミナントネガティブにならないか、嚢胞では細胞が増殖しているのかどうかについての質問があった。

次いで副査の野々村克也教授よりヒトでは集合管に限局するような病態はあるのか、ラパマイシン、ソマトスタチンなどがこのモデルに投与することで、効果は期待できるのかについての質問があった。

更に主査の小池隆夫教授より今回のマウスの集合管由来の嚢胞では2種類の細胞が存在するが、人との違いはどうか、ツーヒットが起こる場合になぜ片側の腎臓のみに嚢胞がたつたよらないのか、今後の臨床的アプローチについての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去の論文や自験例を引用し畠山教授の質問に対しては、開始コドンはエクソン1にあり、3n+αでエクソンを削除していることからドミナントネガティブにならない、ノックアウト細胞は増殖していると解答した。野々村教授の質問に対しては、ヒトで限局された病態は起きない、ラパマイシン、ソマトスタチンの作用機序から考えて、このモデルでも効果が期待できると解答した。小池教授の質問に対しては、2種類の細胞が存在しているが、多数の細胞がノックアウトされる点が異なっている、確率から考えて左右均等になっていく、異なるCreマウスを交配して新しいノックアウトマウスを作製し、ラパマイシンやバソプレッシン2受容体拮抗薬などの薬剤を投与し、効果の評価をすると解答した。

この論文は、*pkd1* 遺伝子を腎臓特異的にノックアウトした初めてのモデルマウスであり、表現型の評価も十分に行われている点で高く評価され、今後薬剤投与における嚢胞形成抑制の評価が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。