

学位論文題名

常染色体優性多発性嚢胞腎疾患モデルメダカ 作成と解析

学位論文内容の要旨

ヒト常染色体優性多発性嚢胞腎（以下、ADPKD と略す）は 1000 人に 1 人の発症頻度をもつ代表的な遺伝性腎疾患である。加齢とともに主に腎臓に多発性の嚢胞を形成し、進行性の腎機能障害をきたす。嚢胞の進行度に個人差があるが、多くは末期腎不全となり、透析療法が必要となる。その原因遺伝子として PKD1 と PKD2 がクローニングされている。どちらの遺伝子の変異によっても同じ臨床症状を引き起こす。

ヒト ADPKD は常染色体優性遺伝であり、その遺伝学的発症機序として、two-hit 説が提唱されている。父母より変異型と野生型の PKD 遺伝子を引き継いで出生後、成長の過程で何らかの原因により野生型 PKD 遺伝子に体細胞変異が生じるために、PKD 遺伝子の機能が喪失し嚢胞を形成すると考えられている。

Pkd1 ノックアウトマウスはホモ接合体で多発性嚢胞腎及び胎性致死をきたす。Pkd2 ノックアウトマウスもホモ接合体で多発性嚢胞腎を形成し、胎性致死となるが、Pkd1 ノックアウトマウスとの相違点として、内臓逆位が起こる。

現在、嚢胞腎モデル動物として複数のノックアウトマウスが作成されているが、遺伝子組換えマウスの維持・繁殖には多大な手間と費用が必要である。通常のノックアウトマウスでは胎性致死となるため薬剤投与研究には適さない。そこで、今回、私は薬剤投与研究がより簡便に低コストで実施可能な新たな動物モデルとしてメダカに着目した。小型魚類は脊椎動物として基本的な構造を全て備え、卵が透明であることから発生学の良好なモデルとして使われてきた。もう一つの小型魚類モデルとして知られているゼブラフィッシュは前腎の形成モデルとして研究されており、腎嚢胞形成突然変異体も多数発見されている。メダカにおいても、多発性嚢胞腎を発症する突然変異メダカが報告されており、ヒトの嚢胞腎形成の解析に寄与しうると考えられる。

また近年、小型魚類を用いて薬物スクリーニングを行う試みが成果をあげつつある。Pkd 遺伝子異常に基づいた嚢胞腎形成メダカを作成すれば、安価に多数の個体を維持し、大規模な薬剤スクリーニングシステムを構築することが可能となる。しかしメダカを用いる欠点として、現在の技術ではマウス以外ではノックアウト動物の作成が不可能である。小型魚類では Morpholino anti-sense oligonucleotide による遺伝子ノックダウン法が普及しているが、この方法では系統化することができない。腎嚢胞発生の主たる機序は前述の two-hit 説にあるように PKD 遺伝子の不活化と考えられるが、ヒト PKD2 の C 末端欠失変異体を遺伝子導入されたラットで腎嚢胞を認めたとの報告があり、欠失変異体がドミナントネガティブとして働く可能性が示唆されている。

本研究においては、Pkd 遺伝子操作により、腎嚢胞を有する系統化可能なメダカを作成することを目的とした。

既存の遺伝子データベースより、ヒト、フグ、マウスの Pkd1 及び Pkd2 を参考にメダカの Pkd1 及び Pkd2 の相同検索を行った。これをもとに cDNA ライブラリーより RT-PCR を行い、全長メダカ Pkd1 及び全長 Pkd2 の塩基配列を決定した。

メダカでは受精卵の 1~4 細胞期の細胞質にプラスミドコンストラクトを micro-injection することにより、*in vivo* で導入遺伝子を発現させることができる。遺伝子導入された卵はおよそ 7 日で孵化し、導入遺伝子の機能の簡便な評価が可能である。野生型メダカの受精卵に、メダカ Pkd1 遺伝子のシグナルペプチド以外の N 末端を欠失させ、タグとして EGFP を融合させたプラスミドコンストラクト EF-1 α -A-EGFP-Pkd1 Δ N を micro-injection 法により遺伝子導入した。屈曲を認め、組織切片による評価で前腎の嚢胞を認める個体があった。同様にメダカ Pkd2 の C 末端を欠失させ、タグとして EGFP を融合させたプラスミドコンストラクト EF-1 α -A-Pkd2 Δ C-EGFP を micro-injection 法により受精卵に遺伝子導入した。稚魚の段階で、心臓逆位、屈曲、前腎の嚢胞といった表現型を認めた。欠失変異体がドミナントネガティブとして働き、ロックアウト動物と同等の表現型を得たものと考えられた。

この結果を受け、トランスジェニックメダカ系統を確立した。欠失変異体の遺伝子導入では、屈曲及び致死の可能性があり、発現調節可能な系統を作るため Tet-On/Off 誘導系を用いた。Tet-On 誘導系はドキシサイクリン投与により導入遺伝子が発現し、Tet-Off 誘導系は逆にドキシサイクリンにより遺伝子の発現が抑制される系である。Tet-On/Off 系統については、転写因子を持つ系統と誘導される遺伝子を持つ系統をそれぞれ確立したのち、これらを交配させることにより得た。Pkd1 Δ N を持つ系統は Tet-Off EGFP-Pkd1 Δ N 系統を作成し、さらに誘導系を介さず、構成的に導入遺伝子を発現する系統として、EF-1 α -A-EGFP-Pkd1 Δ N 系統を作成した。Pkd2 Δ C を持つ系統については Tet-On Pkd2 Δ C-EGFP 系統及び EF-1 α -A-Pkd2 Δ C-EGFP 系統を作成した。

これらのトランスジェニックメダカを飼育し、組織切片を作成し、腎嚢胞を検索した。EF-1 α -A-EGFP-Pkd1 Δ N 系統のヘテロ接合体成魚の組織検索では 5 ヶ月の時点では、腎嚢胞を認めなかった。Tet-Off EGFP-Pkd1 Δ N 系統は、ドキシサイクリンがなければ最大活性で導入遺伝子が発現するはずだが、6 ヶ月後の成魚の組織切片では腎嚢胞は認めなかった。

Pkd2 Δ C を持つ系統については、EF-1 α -A-Pkd2 Δ C-EGFP 系統を 7 ヶ月飼育した後、ヘテロ接合体の組織切片を作成し検鏡した。両腎に数個の中等度の腎嚢胞を認めた。また、Tet-On Pkd2 Δ C-EGFP 系統をドキシサイクリン 10 μ g/ml に 4 ヶ月曝露した後、組織切片を検鏡したところ、片腎に数個の腎嚢胞を認めた。多量に変異体を発現させた一過性実験では稚魚の段階で腎嚢胞を認めているのに対して、系統化したメダカでは嚢胞形成に数ヶ月を要していることから、変異体の発現量が少ないほど、嚢胞形成に要する時間は長くなるものと推察された。

以上、Pkd1 N 末端欠失変異体導入トランスジェニックメダカでは表現型が得られなかったが、Pkd2 C 末端欠失変異体導入トランスジェニックメダカでは、十分な発現量があればドミナントネガティブ変異体として機能し腎嚢胞を形成すると考えられた。今後、ホモ接合体の作成や発現調節系のさらなる向上により、Pkd2 欠失変異体導入トランスジェニックメダカが、嚢胞形成における薬剤曝露試験において有効な新たなモデル動物となる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 野々村 克 也

学 位 論 文 題 名

常染色体優性多発性嚢胞腎疾患モデルメダカの 作成と解析

学位論文の内容は、ヒト疾患である常染色体優性多発性嚢胞腎の治療及び病態解明のため新たな疾患モデル動物としてメダカに着目したものである。

ヒト常染色体優性多発性嚢胞腎は 1000 人に 1 人の発症頻度をもつ代表的な遺伝性腎疾患である。加齢とともに主に腎臓に多発性の嚢胞を形成し、進行性の腎機能障害をきたす。その原因遺伝子として PKD1 と PKD2 がクローニングされている。どちらの遺伝子の変異によっても同じ臨床症状を引き起こす。通常のノックアウトマウスでは胎性致死となるため薬剤投与研究には適さない。本論文では薬剤投与研究がより簡便に低コストで実施可能な新たな動物モデルとしてメダカに着目した。多発性嚢胞腎を発症する突然変異メダカが報告されており、ヒトの嚢胞腎形成の解析に寄与しうると考えられる。しかし、現在の技術ではマウス以外ではノックアウト動物の作成が不可能である。腎嚢胞発生の主たる機序は PKD 遺伝子の不活化と考えられるが、欠失変異体がドミナントネガティブとして働く可能性が示唆されている。本論文においては、Pkd 欠失変異体により腎嚢胞を有するメダカを作成することを目的とした。

ヒト、フグ、マウスの Pkd1 及び Pkd2 を参考に既存の遺伝子データベースの相同検索により、メダカ Pkd1 及び Pkd2 をクローニングした。

野生型メダカの受精卵に、メダカ Pkd1 の N 末端を欠失させ、タグとして EGFP を融合させたコンストラクト EF-1 α -A-EGFP-Pkd1 Δ N を micro-injection 法により遺伝子導入した。屈曲を認め、前腎の嚢胞を認める個体があった。同様にメダカ Pkd2 の C 末端を欠失させ、タグとして EGFP を融合させたコンストラクト EF-1 α -A-Pkd2 Δ C-EGFP を micro-injection 法により受精卵に遺伝子導入した。稚魚の段階で、心臓逆位、屈曲、前腎の嚢胞といった表現型を認めた。

この結果を受け、トランスジェニックメダカを作成した。欠失変異体の遺伝子導入では、屈曲及び致死の可能性があり、発現調節可能なシステムを作るため Tet-On/Off 誘導系を用いたシステムも作成した。EF-1 α -A-EGFP-Pkd1 Δ N システムの成魚の組織検索では 5 ヶ月の時点では、腎嚢胞を認めなかった。Tet-Off EGFP-Pkd1 Δ N システムも、6 ヶ月後の成魚の組織切片では腎嚢胞は認めなかった。Pkd2 Δ C を持つシステムについては、EF-1 α -A-Pkd2 Δ C-EGFP システムを 7 ヶ月飼育した後、両腎に数個の中等度の腎嚢胞を認めた。また、Tet-On Pkd2 Δ C-EGFP システムをドキシサイクリン 10 μ g/ml に 4 ヶ月曝露した後、組織切片を検鏡したところ、片腎に数個の腎嚢胞を認めた。多量に変異体を発現させた一過性実験では稚魚の段階で腎嚢胞を

認めているのに対して、系統化したメダカでは嚢胞形成に数ヵ月を要していることから、変異体の発現量が少ないほど、嚢胞形成に要する時間は長くなるものと推察された。Pkd2 C 末端欠失変異体導入トランスジェニックメダカでは、十分な発現量があれば腎嚢胞を形成すると考えられた。

学位申請者宮本兼玄の学位論文公開發表は、平成 19 年 7 月 31 日に医学部臨床大講堂において行われた。申請者はスライドを用いながら約 15 分に渡って学位論文内容の発表を行った。その後、副査 畠山鎮次教授から、コンストラクトの N 末端の向きについて cell line に入れ FACS で調べたか、一過性発現で表現型が出たものは EGFP による蛍光が強かったか、系統化したメダカで腎嚢胞が少ないのは発現量が少なかったためか、細胞では Tet-On 誘導系ははわずかのドキシサイクリンでも反応してしまうが水槽中のメダカではどうなのかといった質問があった。

次いで副査 野々村克也教授から、実験は前腎の嚢胞をみているのか、小さな腎嚢胞もあるのか、メダカを用いたそもそもの理由は薬剤曝露試験に使うためだがどうしたらもっと安定して多数の腎嚢胞ができるのかといった質問があった。その後、主査 小池隆夫教授から、一過性発現実験では前腎に腎嚢胞ができているがヒトでは後腎に嚢胞ができる。これは同じことと考えていいのか、魚の Pkd1 の機能は何か、Pkd2 の C 末端欠失変異体では心臓逆位が起きたが生物学的意義は何か。ヒトで心臓逆位がおきるのか、ミュータジェネシスで突然変異体をつくれれば腎嚢胞はできるか、メダカの研究からヒト疾患である常染色体優性多発性嚢胞腎に対するアプローチや展望を何か得たかといった質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自験例や文献を引用し、適切に回答した。

この論文は常染色体優性多発性嚢胞腎の病態解明に寄与する点で高く評価され、今後、腎嚢胞の疾患モデル動物としてメダカが利用されることが期待される。

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。