

薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナル

## ノックアウトマウスの解析と

## mTOR 阻害薬による嚢胞抑制効果についての研究

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 常染色体優性遺伝性多発嚢胞腎 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: ADPKD) は、遺伝性腎疾患の中で最も頻度が高く (約 1000 人に 1 人)、加齢とともに嚢胞が両腎に増加し、進行性に腎機能が障害され、70 才までに約半数が腎不全に陥る疾患である。また高血圧、多発肝嚢胞、脳動脈瘤などさまざまな腎外症状をきたす全身疾患である。原因遺伝子として、第 16 染色体短腕 (16p13.3) に存在する *PKD1* 遺伝子と第 4 染色体長腕 (4q13-23) に存在する *PKD2* 遺伝子が同定されている。

これまでにヒト ADPKD の病態解析ならびに薬物投与実験のために、動物モデルの作製が試みられてきた。*Pkd1* ノックアウトマウスにおいて、ホモ接合体では胎生致死となり、一方ヘテロ接合体では老齢となるまで腎嚢胞は認めず、いずれもヒト ADPKD の病態解析や薬物投与実験に適するモデルではなかった。そのため胎生致死を回避するモデルとして 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が作製されるようになった。Shibazaki らは腎臓特異的な *Ksp-Cre* マウスを用いて、*Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスを作製したが、生後 14 日-21 日で死亡するという非常に早い経過をたどり、やはり薬物投与実験には適していなかった。そこで本研究では、インターフェロンあるいはインターフェロン誘導体の polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) で誘導され全身に発現する *Mx1* 遺伝子のプロモーターをもつ *Mx1-Cre* マウスを用いて、薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスを作製することとした。このマウスは pI-pC 投与時期を調整することが出来るため、ヒト ADPKD に近いモデルが作成可能になることが予想される。

ADPKD の根治的治療薬の候補としてバゾプレシン V2 受容体阻害薬 (V2RA) があり、さまざまな PKD モデル動物に対してその有効性が示されており、ヒト ADPKD に対しての臨床治験も進行中である。また近年 V2RA に続く根治的治療薬の候補として mTOR (mammalian target of rapamycin) 阻害薬が注目されている。mTOR 阻害薬は細胞増殖抑制作用、血管新生抑制作用や抗癌作用をもつ薬剤であり、臓器移植の際の免疫抑制薬としても使用されている。実際 ADPKD モデルマウス、自然発症 PKD ラットに対する mTOR 阻害薬の腎嚢胞縮小効果が示されているが、ADPKD モデル動物に対する報告はない。

本研究においては、機能解析や薬物投与に適し、かつ表現型の安定した ADPKD モデルを確立し、mTOR 阻害薬の効果発現機序を明らかにすることを目的とした。すなわち薬剤誘導型の *Mx1-Cre* マウスを用いて *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスを作製し、さらに mTOR 阻害薬 rapamycin のアナログである everolimus の投与実験を行った。

【材料と方法】 Shibazaki らが作製した *Pkd1<sup>flox/flox</sup>* マウスと *Mx1-Cre* マウスを交配し、*Pkd1<sup>flox/+</sup> · Mx1-Cre<sup>+</sup>* マウスを作製した。さらに *Pkd1<sup>flox/+</sup> · Mx1-Cre<sup>+</sup>* マウスを *Pkd1<sup>flox/flox</sup>* マウスと交配し、*Pkd1<sup>flox/flox</sup> · Mx1-Cre<sup>+</sup>* マウスを作製した。*Pkd1<sup>flox/flox</sup> · Mx1-Cre<sup>+</sup>* マウスに対し、生後 7 日目および 14 日目より体重依存的に 10  $\mu$  g/g の pI-pC を 6 日間連続腹腔内投与し、

それぞれ生後 35 日目、生後 42 日目に屠殺し各種解析を行った。

次に生後 7 日目より pI-pC を投与した *Pkd1<sup>flox/flox</sup> · Mx1-Cre<sup>+</sup>* マウス (ノックアウト群) と *Pkd1<sup>flox/flox</sup> · Mx1-Cre<sup>-</sup>* マウス (コントロール群) に対し、everolimus を生後 14 日目から生後 34 日目までの連続 21 日間体重依存的に 3mg/kg あるいは 6mg/kg 経口投与し、生後 35 日目に屠殺し各種解析を行った。

【結果】 生後 7 日目より pI-pC を投与したマウス (7 日群) と生後 14 日目より pI-pC を投与したマウス (14 日群) は、いずれも安定した表現型を示したが、7 日群が 14 日群に比べ腎臓・肝臓ともに嚢胞の発現が有意に強く、腎機能は低下していた。また細胞増殖の解析のため BrdU 染色を行ったが、腎臓・肝臓いずれも 7 日群で嚢胞上皮細胞増殖が有意に強かった。everolimus 投与実験では、6mg/kg 投与群において腎臓および肝臓の嚢胞が非投与群に比べ有意に抑制された。また、コントロール群では非投与群に比べ 6mg/kg 投与群で体重の減少が見られたが、ノックアウト群では有意差はなかった。BrdU 染色、TUNEL 染色を行ったが、腎臓・肝臓いずれも非投与群に比べ 6mg/kg 投与群で有意に嚢胞上皮細胞の増殖が抑制され、アポトーシスは増加していた。

【考察】 今回作製した薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスは、安定した表現型を示し、機能解析や薬物投与実験に適したマウスと考えられた。そして、生後 7 日目という早い時期にノックアウトすると、腎臓および肝臓の嚢胞上皮細胞の増殖が強くなり、嚢胞増大を促進していると考えられた。何故早い時期にノックアウトするとこの様な現象が起きるのかは不明であるが、この要因の解明が今後の重要な課題であると考えられた。さらに本研究は ADPKD モデル動物に対しての初めての everolimus 投与実験報告であり、腎嚢胞のみならず肝嚢胞の抑制効果を示した。細胞増殖の抑制とアポトーシスの増加が嚢胞形成抑制に寄与していると考えられ、今後はさらに everolimus 投与により誘導される細胞増殖抑制因子ならびにアポトーシス増加因子を同定することが ADPKD の病態解明ならびに治療薬開発につながるものと考えられた。

mTOR 阻害薬は抗がん剤としても使用され、副作用の少ない薬剤である。本研究でもコントロール群の everolimus 6mg 投与群においては everolimus による成長障害と思われる体重減少が認められたが、ノックアウト群では非投与群、投与群の体重に変化は認められなかった。ノックアウト群において everolimus 投与群では尿毒症の改善や嚢胞増大抑制による腹部圧迫症状の回避といった治療効果が現れ、非投与群と比べ栄養状態が良好であったためと考えられた。しかし実際に mTOR 阻害薬を臨床的に長期に用いるのは難しいと考えられ、嚢胞形成抑制効果の発現機序の解明により新たな候補薬剤を探ることがより重要であり、本研究の成果はこの点でも資するところが大きいと考える。

【結論】 ヒト ADPKD のモデルマウスとして、機能解析や薬物投与実験に適する薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスを作製した。生後 7 日目という早い時期に遺伝子欠失すると腎臓・肝臓いずれにおいても嚢胞形成が強くなり、その機序解明が今後の重要な課題である。さらに mTOR 阻害薬である everolimus の投与実験をおこなったが、腎嚢胞のみならず肝嚢胞の増大を抑制した。今後は、嚢胞形成抑制効果の発現機序の解明により新たな候補薬剤を探ることがより重要であると考えられる。

# 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

## 薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナル

### ノックアウトマウスの解析と

### mTOR 阻害薬による嚢胞抑制効果についての研究

常染色体優性遺伝性多発嚢胞腎 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: ADPKD) は、遺伝性腎疾患の中で最も頻度が高く、加齢とともに嚢胞が両腎に増加し、進行性に腎機能が障害され、70 才までに約半数が腎不全に陥る疾患である。原因遺伝子として、第 16 染色体短腕 (16p13.3) に存在する *PKD1* 遺伝子と第 4 染色体長腕 (4q13-23) に存在する *PKD2* 遺伝子が同定されている。ADPKD の嚢胞形成機序については徐々に解明されてきているが、まだなお不明な点が多い。

本研究では、機能解析や薬物投与実験の可能なヒト ADPKD のモデルマウスとして、薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスである *Pkd1<sup>flox/flox</sup> · Mx1-Cre<sup>+</sup>*マウスを複製し解析した。このマウスは polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) の投与により *Mx1-Cre* が誘導され *Pkd1* 遺伝子が欠失されるため、ノックアウト時期を任意に調節できる。

生後 7 日目より pI-pC を投与したマウス (7 日群) と生後 14 日目より pI-pC を投与したマウス (14 日群) を比較したところ、7 日群が 14 日群に比べ腎臓・肝臓ともに嚢胞の発現が有意に強く、腎機能は低下していた。また細胞増殖の解析のため BrdU 染色を行ったが、腎臓・肝臓いずれも 7 日群で嚢胞上皮細胞増殖が有意に強かった。生後 7 日目という早い時期にノックアウトすると、腎臓および肝臓の嚢胞上皮細胞の増殖が強くなり、嚢胞増大を促進していると考えられたが、何故早い時期にノックアウトするとこの様な現象が起きるのかは不明であり、この要因の解明が今後の重要な課題であると考えられた。

ADPKD の根治的治療薬の候補としてバゾプレシン V2 受容体阻害薬 (V2RA) があるが、近年 V2RA に続く根治的治療薬の候補として mTOR (mammalian target of rapamycin) 阻害薬が注目されている。mTOR 阻害薬は細胞増殖抑制作用、血管新生抑制作用や抗癌作用をもつ薬剤であり、臓器移植の際の免疫抑制薬としても使用されている。実際 ADPKD モデルマウス、自然発症 PKD ラットに対する mTOR 阻害薬の腎嚢胞縮小効果が示されているが、ADPKD モデル動物に対する報告はない。本研究においては、さらに *Pkd1<sup>flox/flox</sup> · Mx1-Cre<sup>+</sup>*マウスに対し、mTOR 阻害薬である everolimus の投与実験を行った。

everolimus 6mg/kg 投与において腎臓および肝臓の嚢胞が非投与群に比べ有意に抑制され、また腎臓・肝臓いずれも非投与群に比べ 6mg/kg 投与で有意に嚢胞上皮細胞の増殖が抑制され、アポトーシスは増加していた。本研究は ADPKD モデル動物に対しての初めての everolimus 投与実験報告であり、腎嚢胞のみならず肝嚢胞の抑制効果を示した。細胞増殖の抑制とアポトーシスの増加が嚢胞形成抑制に寄与していると考えられ、今後はさらに

everolimus 投与により誘導される細胞増殖抑制因子ならびにアポトーシス増加因子を同定することがADPKDの病態解明ならびに治療薬開発につながるものと考えられた。

審査員からは、主にロックアウト時期による嚢胞形成の差異についてと、mTOR 阻害薬が実際にヒト ADPKD に使用する場合どの様な投与デザインが考えられるか、につき質問があった。

前者に対しては、生後7日目と14日目の間に嚢胞形成における臨界点があることが予想されるが、その臨界点においてどのような因子が関与しているかは不明であり、今後その究明がすなわち嚢胞形成機序の解明につながることを期待され、さらに研究を進めていきたい、と回答した。

後者に対しては、mTOR 阻害薬は免疫抑制剤や抗がん剤として使用されている薬剤であり、副作用の点から考慮しても長期投与は困難と考えられるため、例えば巨大嚢胞をかかえそのことによりADLの低下が著しい患者などに限定して使用する可能性や、或いはmTOR 阻害薬が奏効することが事前に予測できるマーカーが開発されると、適応患者を限定できるかもしれない、と回答した。

この論文は、ADPKD モデルマウスの確立と mTOR 阻害薬の嚢胞抑制を示したことで高く評価され、今後の嚢胞形成機序の解明や、mTOR 阻害薬のADPKD に対する実用化が期待される。

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。