

常染色体優性多発性嚢胞腎疾患モデルメダカの 表現型の解析

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性嚢胞腎 (ADPKD) の原因遺伝子として *PKD1* と *PKD2* が同定されており、その機序としてツーヒット説が提唱されている。近年ヒト *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もあることから、欠失変異体がドミナントネガティブとして働く可能性も示唆されている。そこで *Pkd1* および *Pkd2* の欠失変異体を遺伝子導入したモデルメダカが作成されたが、*Pkd1* の系統では嚢胞を認めず、*Pkd2* の系統では腎嚢胞を認めるものの少数であった。そこで今回導入した変異体遺伝子をホモ接合体とする、すなわち変異体遺伝子のコピー数を増やすことにより、嚢胞形成が促進するかを確認し、表現型を解析することを目的とした。

【材料と方法】*Pkd1* または *Pkd2* 変異体遺伝子が筋肉以外の全身で発現する EF-1 α -A プロモーターを使用した系 (*Pkd1* EF1 α 系、*Pkd2* EF1 α 系) とドキシサイクリン (DOX) によって発現が誘導される系 (*Pkd1* Tet-On 誘導系、*Pkd2* Tet-On 誘導系) の 4 種類の系統のメダカをホモ化に交配し、サザンブロッティングで導入遺伝子を確認した。導入遺伝子コピー数にはドットプロット法、発現量の確認には real time PCR で解析した。表現型の解析には、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色でそれぞれの系統の生後 1、2、3、4、5 ヶ月を各 5 匹ずつ腎、および肝の嚢胞の発現を観察し、1 切片における平均嚢胞数と断面の総面積における嚢胞面積の割合である cystic index を計測した。嚢胞を形成する要因の検討としては嚢胞構成細胞には LTL/DBA 免疫染色を、繊毛には acetylated-tubulin 免疫染色を、細胞増殖には PCNA 染色を、そしてアポトーシスには TUNEL 染色を施行した。また、DOX が嚢胞の成長を促進すると報告されているため、*Pkd1* および *Pkd2* の EF1 α 系も孵化後より DOX 暴露し、成魚での病理像、1 切片における平均嚢胞数、および cystic index を計測した。

【結果】サザンブロッティング法では全ての系統で予想される長さのバンドが確認され、遺伝子導入を確認できた。ドットプロット法、real time PCR による遺伝子コピー数、発現量の解析ではいずれの解析でも *Pkd2* EF1 α 系が最も多かった。HE 染色ではいずれの系統も孵化後 5 ヶ月では全ての個体において腎嚢胞を認め、*Pkd2* Tet-On 誘導系が最も嚢胞形成が著明であった。また、*Pkd2* Tet-On 誘導系のみで肝嚢胞を認めた。1 切片における平均嚢胞数、cystic index は各系統とも経時的に増加を認め、*Pkd2* Tet-On 誘導系が他の系統と比較して顕著に高値であった。LTL/DBA 免疫染色で嚢胞は LTL、DBA とともに陰性の遠位尿細管/集合管由来であり、*Pkd2* Tet-On 誘導系の一部で LTL 陽性の近位尿細管由来の嚢胞を認めていた。acetylated-tubulin 染色ではいずれの系統においても嚢胞構成細胞で繊毛が少なく、欠落しているものも認められた。PCNA 染色では野生型の尿細管と比較していずれの系統においても、嚢胞では PCNA 陽性細胞が有意に多く、また *Pkd2* Tet-On 誘導系では尿細管でも PCNA 陽性細胞が有意に多かった。TUNEL 染色ではいずれの系統においても嚢胞形成細胞で TUNEL 陽性細胞を認めなかった。DOX に暴露した *Pkd1* および *Pkd2* の EF1 α 系の腎病理を確認したところ *Pkd1* EF1 α 系では 1 切片における平均嚢胞数、cystic index は増加傾向を認め、*Pkd2* EF1 α 系では 1 切片における平均嚢胞数、cystic index はともに有意に増加を認めた。

【考察】本研究において導入した遺伝子変異体をホモ接合体とする、すなわち変異体遺伝子のコピー数を2倍に増やすことで全ての系統において嚢胞形成を認めることができ、ドミナントネガティブな機序でも嚢胞形成を考えると考えられた。本研究におけるトランスジェニックメダカで嚢胞形成がヒトADPKDと同じく緩徐であったのは変異体遺伝子の発現量が比較的少なく、正常遺伝子の不活化が少なかったことが要因として考えられた。嚢胞形成が最も顕著な*Pkd2*Tet-On誘導系は導入遺伝子数が少なく、導入遺伝子数のみが嚢胞形成に関与していないことが示唆されたため、嚢胞形成に差を認めた原因をさらに検証した結果、DOXの暴露による違いの可能性が考えられた。その確認のため、EF1 α 系のメダカをDOXに暴露したところ、*Pkd2*EF1 α では嚢胞形成が促進され、*Pkd1*EF1 α 系でも同様の傾向が認められ、DOXも一つの要因として考えられた。DOXはテトラサイクリン系の抗生剤であり、ADPKD患者の嚢胞の成長を促進する可能性があることから、使用には注意を要することが示唆された。LTL/DBA免疫染色では嚢胞は遠位尿細管/集合管由来であり、ヒトADPKDと同様の結果を示した。ただ*Pkd2*Tet-On誘導系のみで近位尿細管由来の嚢胞を少数ながら認め、これは*Pkd2*Tet-On誘導系は最も嚢胞形成が著明であったため、嚢胞形成が近位尿細管まで及んだものと考えられた。嚢胞構成細胞では繊毛の消失、欠落が認められていた。魚類では尿流が緩徐であるため、その尿細管細胞は運動性繊毛を有し、尿流を作り出す役割を果たしており、一方ヒト尿細管細胞は胎生期には運動性繊毛として機能しているが、出生後には運動性繊毛は認められるものの多くは一次繊毛として尿流を感知する機械的センサーの役割を果たしている。本研究のメダカで嚢胞形成が著明であった理由の一つには運動性繊毛の関与が考えられた。細胞増殖は全ての系統で認めてられており、特に嚢胞形成が最も著明であった*Pkd2*Tet-On誘導系では正常尿細管においても細胞増殖を認めており、これは嚢胞の前駆段階をみていたものと考えられた。細胞増殖が強い*Pkd2*Tet-On誘導系が最も嚢胞形成が著明で、肝嚢胞を認めた理由と考えられた。*Pkd2*Tet-On誘導系のトランスジェニックメダカは嚢胞形成が著明であり、薬剤曝露試験において有用な新たなモデル動物となる可能性が示唆された。

【結論】メダカ*Pkd1*および*Pkd2*の欠失変異体遺伝子導入メダカをホモ接合体にすることで腎嚢胞および肝嚢胞を発現させた。*Pkd2*Tet-On誘導系が最も嚢胞形成が著明であり、薬剤曝露試験の有用な新たなモデル動物となる可能性を示した。嚢胞形成の要因としてDOXによる暴露の可能性も示唆された。嚢胞構成細胞で繊毛の発現が低下していたことから、欠失変異体遺伝子が繊毛の形成に影響を及ぼしている可能性が示唆された。嚢胞形成には細胞増殖が関与しており、*Pkd2*Tet-On誘導系の正常尿細管における細胞増殖は嚢胞の前駆段階を見てい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 笠 原 正 則

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 表現型の解析

常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎の発症機序としてツーヒット説が提唱されているが、欠失変異体が野生型の機能を阻害するドミナントネガティブ説の可能性も示唆されている。そこでヘテロ接合体では少数の嚢胞形成しか認めなかった欠失変異体を遺伝子導入したモデルメダカをホモ接合体とすることにより、嚢胞形成が促進するかを確認し、表現型を解析した。EF-1 α -A プロモーターで *Pkd1* または *Pkd2* 変異体遺伝子が発現する系 (*Pkd1* EF1 α 系、*Pkd2* EF1 α 系) とドキシサイクリン (DOX) によって発現誘導される系 (*Pkd1* Tet-On 誘導系、*Pkd2* Tet-On 誘導系) の 4 種類の系統のメダカをホモ化に交配した。遺伝子発現量は *Pkd2* EF1 α 系が最も多かった。病理では各系統とも孵化後 5 ヶ月では全ての個体に腎嚢胞を認め、嚢胞の数と面積は経時的に増加を認めた。*Pkd2* Tet-On 誘導系が最も嚢胞形成が著明であり、肝嚢胞も認めた。嚢胞はほとんどが遠位尿細管/集合管由来であり、*Pkd2* Tet-On 誘導系の一部で近位尿細管由来の嚢胞を認めていた。嚢胞構成細胞では繊毛が少なく、欠落しているものも認められた。野生型の尿細管と比較して各系統とも、嚢胞では細胞増殖が有意に多く、*Pkd2* Tet-On 誘導系では尿細管でも有意に多かった。DOX が嚢胞の成長を促進すると報告されているため、EF1 α 系も孵化後より DOX 暴露して腎病理を確認したところ *Pkd1* EF1 α 系では嚢胞数、面積は増加傾向を認め、*Pkd2* EF1 α 系ではともに有意に増加を認めた。メダカ *Pkd1* および *Pkd2* の欠失変異体遺伝子導入メダカをホモ接合体にすることで腎嚢胞および肝嚢胞を発現させ、ドミナントネガティブな機序でも嚢胞形成を考えると考えられた。*Pkd2* Tet-On 誘導系が最も嚢胞形成が著明であり、薬剤曝露試験の有用な新たなモデル動物となる可能性を示した。嚢胞形成の要因として DOX による暴露の可能性も示唆された。嚢胞構成細胞で繊毛の発現が低下していたことから、欠失変異体遺伝子が繊毛の形成に影響を及ぼしている可能性が示唆された。嚢胞形成には細胞増殖が関与しており、*Pkd2* Tet-On 誘導系の正常尿細管における細胞増殖は嚢胞の前駆段階を見ている可能性が示唆された。

質疑応答では副査の笠原正則教授から、本実験におけるドミナントネガティブの証明、今回できたメダカで胎生致死とならなかった理由、*Pkd2* の系統の方で嚢胞ができた機序、嚢胞形成を進める DOX を利用した Tet system を用いた理由、ADPKD の発症機序についての質問があり、それぞれ、マウスの抗体と交差性がなく証明できなかったこと、遺伝子発現量が少なく胎生致死にならなかったこと、Ca チャネルである *Pkd2* と DOX の Ca 濃度低下の

作用が相乗効果となった可能性があること、2009年の報告なので作成時には予想していなかったこと、ツーヒット説とドミナントネガティブ説が混在している可能性を回答した。次いで副査の野々村克也教授から、魚類を哺乳類と同じモデルとしての是非、DOXを投与するタイミングの検討、このモデルを使用した今後の展望についての質問があり、それぞれ、ネフロンが保たれ遺伝子と表現型がともに相同性のある疾患も報告されているため可であること、DOX投与を遅らせる検討はないが途中中止でも嚢胞形成はかわらないこと、大量薬剤スクリーニングと嚢胞形成を認める機序の解明を検討していることを回答した。さらに主査の小池隆夫教授より、ドミナントネガティブの証明についての展望、他のCaチャネルに関する薬剤は検討、このモデルにおける肝嚢胞の検討についての質問があり、細胞での検討、Ca拮抗薬投与の検討、細胞増殖や繊毛の検討の予定を回答した。

いずれの質問に対しても、申請者は過去の文献報告や未発表であった実験結果などを引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、腎嚢胞形成メカニズムを解析するためのモデル動物という点で高く評価され、今後の薬剤曝露試験の有用な新たなモデル動物として期待される。

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。