

学 位 論 文 題 名

常染色体優性多発性嚢胞腎モデルマウスを用いた降圧薬
投与実験及び腎内RAS関与についての解析

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嚢胞腎（Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease : ADPKD）は遺伝性腎疾患の中で最も頻度が多く、加齢とともに嚢胞が増加し、70才までに約半数が腎不全に陥るとされる。原因遺伝子として *PKD1* と *PKD2* が同定され、各々の遺伝子産物であるポリシスチン 1, ポリシスチン 2 はともに腎の上皮細胞の繊毛に局在する。尿流を感知する受容体であるポリシスチン 1 からの刺激がカルシウムチャネルを有するポリシスチン 2 へ伝達され、尿細管および集合管細胞内にカルシウムイオンが流入することにより、尿細管径の調節が行われる。ADPKD では、ポリシスチン 1, 2 のどちらかの機能が喪失すると、径の調節ができず、嚢胞が形成される。また ADPKD 細胞では細胞内 Ca 濃度低下により細胞増殖カスケードが活性化され、嚢胞形成が促進されと考えられており、カルシウムチャネル拮抗薬（Calcium Channel Blocker : CCB）投与が嚢胞進行に悪影響を与える可能性が示唆されている。ADPKD における高血圧の合併は約 50～80%に見られ、高血圧は腎機能障害の要因となることが知られている。レニン・アンジオテンシン系（Renin-Angiotensin-system : RAS）の関与が示唆されているが、血圧と血漿レニン活性との相関は示されておらず、発症メカニズムは明らかではない。一方で、ADPKD に対する RAS の亢進は、腎嚢胞増殖の成因となる可能性や、腎間質の線維化をもたらす独立した因子である可能性が示唆されている。近年、RAS にかかわる関心は、全身 RAS から局所 RAS に向かっており、腎臓内における組織 RAS（腎内 RAS）の重要性が証明されている。最近の報告では、腎内 RAS 活性のバイオマーカーとして、アンジオテンシノーゲン（Angiotensinogen : AGT）の尿中排泄量が指標となることが示されている。本研究においては、降圧薬投与による嚢胞形成への影響を調べるとともに、新しい病態概念である腎内 RAS との関わりについて調べることを目的とし、*Pkd1* コンディショナルノックアウトマウスを用いて降圧薬の投与実験を行った。

【材料と方法】本研究では、IFN 誘導体である polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) によってノックアウトされる、薬剤誘導型 *Pkd1* コンディショナルノックアウトマウス (*Pkd1* *flax/flax*; *Mx1-Cre* mice) を作製し、使用した。生後 14 日目からの pI-pC 投与によって最も安定した表現型が得られており、治療薬投与と実験が可能なヒト ADPKD のモデル動物として適している。降圧薬投与としては、表現型が野生型である Control 群、溶媒のみの Vehicle 群、CCB 投与群（Amlodipine 群）、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬（ARB）投与群

(Olmesartan 群)、直接的レニン阻害薬 (DRI) 投与群 (Aliskiren 群)、の 5 群に分けて解析を行った。薬剤投与方法は、浸透圧ミニポンプを使用し、合計 12 週間の投与を行った。血圧は 2 週毎に tail-cuff 法を用いて測定した。22 週で屠殺し、腎 (肝) 重量・体重比、Cystic Index を測定した。また、BUN、尿中アルブミン排泄量、線維化についての病理組織学的検討、細胞増殖及びアポトーシスについて検討を行った。更に、尿中 AGT 排泄量の測定、免疫組織学的検査による AGT、アンジオテンシン II、レニンの発現など、腎内 RAS の関与について解析を行った。

【結果】血圧推移は、Amlodipine 群、Olmesartan 群、Aliskiren 群で、いずれも Vehicle 群と比較し、有意かつ同等な降圧効果を示した。腎重量・体重比、Cystic Index (腎) は、薬剤投与群において Aliskiren 群で最も小さく、BUN、尿中アルブミン排泄についても Aliskiren 群で有意差を持って低値を示していた。一方、肝臓については、肝重量・体重比、Cystic Index いずれも、薬剤投与群間で差は認めなかった。腎間質の線維化としては、 α SMA (smooth muscle actin) 染色、及び Elastica-Masson 染色にて、Olmesartan 群と Aliskiren 群で、有意な線維化抑制を認めた。PCNA (proliferative cell nuclear antigen) 染色による細胞増殖は、Olmesartan 群と Aliskiren 群で有意に抑制され、アポトーシスは、TUNEL

(terminal dUTP nick-end labeling) 染色にて、Olmesartan 群と Aliskiren 群で、有意に抑制されていた。ウェスタンブロッティングを用いた、細胞増殖因子の蛋白発現量についても、Olmesartan 群と Aliskiren 群で有意に減少していた。尿中 AGT 排泄量は、Aliskiren 群で有意差を持って低値を示しており、AGT、アンジオテンシン II、レニンの免疫組織学的検査においても、Aliskiren 群で最も染色が抑制されている傾向が示された。

【考察】ADPKD の高血圧では RAS 阻害薬が第一選択ではあるが、しばしば ADPKD 患者では十分な降圧が得られないため、CCB 等の多剤の併用療法が必要となる。本研究の結果、今回の観察期間においては、CCB は嚢胞形成や腎機能に悪影響を及ぼさない可能性が示されたため、ARB のみでは十分な降圧が得られない ADPKD 患者に対しては、選択肢として CCB も念頭に入れて治療を進めていく必要があるものと考えられた。また尿中 AGT 排泄量が増加しており、ADPKD の病態に腎内 RAS が関与している可能性が示唆された。更に DRI 投与によって尿中 AGT 排泄量が有意に減少し、AGT、アンジオテンシン II、レニンの発現も抑制されていたことから、DRI が腎内 RAS を抑制し得る可能性が示唆された。DRI 投与によって腎臓における嚢胞形成が抑制され、かつ腎機能及び尿中アルブミン排泄の悪化を抑制し得た背景には、腎内 RAS が関与している可能性が示唆された。

【結論】本研究では、腎内 RAS が ADPKD の病態に深く関わっている可能性が示唆された。また、ADPKD の最大の特徴である嚢胞形成にも腎内 RAS が関わっている可能性が示され、今後の更なる解明が必要であると考ええる。更に、直接的レニン阻害薬 (DRI) の ADPKD に対する嚢胞形成抑制という可能性についても見出すことができ、今後は、腎内 RAS の新しい知見を踏まえ、降圧薬の選択にもエビデンスレベルで言及し、確立していくことが重要であると考ええる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	野々村	克也
副査	教授	三輪	聡一
副査	教授	野口	昌幸
副査	教授	渥美	達也

学位論文題名

常染色体優性多発性嚢胞腎モデルマウスを用いた降圧薬 投与実験及び腎内RAS関与についての解析

高血圧は、常染色体優性遺伝性多発嚢胞腎（ADPKD）で高率に認められる合併症であり、レニン・アンジオテンシン系（RAS）の関与が示唆されているが、血圧と血漿レニン活性との相関は示されていない。本研究では、ADPKDの病態に腎内RASが深く関与している可能性が示され、RAS阻害薬である直接的レニン阻害薬（DRI）投与によって腎内RAS活性が抑制された結果、腎臓における嚢胞形成、腎機能、及び腎の線維化や尿中アルブミン排泄の悪化を抑制し得たことが示唆された。

審査ではまず、DRIのレニンに対する作用点や作用機序について質問がなされた。DRIとはレニンの活性部分に結合することにより、直接的にレニンの活性を抑える薬剤であると回答された。続いて、腎内RASの免疫染色においてDRI投与によってレニンの発現が抑えられていることの意義、そして全身のRASとしての傍糸球体細胞から発現するレニンとの違いについて質問がなされた。腎内RASでは遠位尿細管上皮細胞や集合管の上皮細胞である主細胞でレニンが発現し vicious cycle を形成することで更にレニンの発現が亢進するが、DRI投与によって腎内RASが抑制され遠位尿細管や集合管からのレニンの発現自体が抑えられている可能性が考えられ、傍糸球体細胞から分泌されるレニンとは、発現機序が異なる可能性について説明された。次に、腎内RAS抑制による腎の線維化抑制効果について、腎の嚢胞形成の程度による影響の有無について質問がされ、嚢胞形成の程度とは無関係に腎の線維化を抑制した可能性について回答された。続いて、同じRAS阻害薬であるARBとDRIについて、効果などの差異について質問がなされた。これに対し、大規模臨床試験のエビデンスが少なく、DRIとARBやACE阻害薬の使い方を明らかにした知見は報告されていないと回答された。続いて、降圧薬投与による降圧効果について、腎内RASと全身のRASのどちらを抑えていた可能性があるかにつき質問がなされた。これに対し、生後

14 週の時点で Control 群とノックアウトマウスである Vehicle 群を比較したところ、尿中アンジオテンシノーゼンの排泄量に差が無かったことから、少なくとも生後 14 週の時点までは、腎内 RAS ではなく、全身の RAS に対して効果があったものと考えられると回答された。次に、ADPKD における腎嚢胞の発生機序について質問がなされた。これに対し、ADPKD における嚢胞の形成機序について有力な仮説として、ツーヒット説があり、生下時の PKD 遺伝子のうち一方が障害された生殖細胞変異（ワンヒット）と生後の他方の遺伝子が障害された体細胞変異（ツーヒット）により発症し、体細胞変異が起きた尿細管上皮細胞がモノクローナルに増殖して嚢胞を形成する機序が考えられていると回答された。続いて、PKD2 の遺伝子産物であるポリシスチン 2 (PC2) の構造について質問がなされた。PC2 はアミノ酸配列が電位依存性カルシウムイオンチャネルに類似しており、Ca イオンなどを透過する transient receptor potential 蛋白に分類されており、イオン選択性が低く、チャネル活性の電位依存性が乏しいという特徴を持つと回答された。最後に、ADPKD での嚢胞の巨大化による合併症と予後規定因子につき質問がなされた。腎臓においては、嚢胞の巨大化による虚血性の病変や糸球体嚢胞の形成などによりネフロンが障害されて腎機能障害が出現すると回答された。また、予後規定因子については、血圧の管理が重要であるが、DRI や ARB の投与、更には CCB であるアムロジピンの併用投与が血圧管理において有用である可能性が示されたと回答された。

CCB であるアムロジピンの投与についての可否を調べ、嚢胞形成に悪影響は及ぼさない結果が示されたことは臨床的に意義があるものと評価された。また、ADPKD の病態に腎内 RAS が関わっていること、DRI 投与によって腎嚢胞形成が抑制される可能性が示されたことから、DRI は今後の ADPKD の治療として期待されるものであり、臨床的にも有意義な研究であると評価された。

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。