

## 論文の内容の要旨

論文題目 *Pkd1* 遺伝子欠損マウスの解析

指導教官 北村唯一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程 外科学専攻

氏名 武藤 智

常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎 autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) は遺伝性腎疾患のなかで最も頻度が高く、腎臓に嚢胞が多発し半数の患者は終末期腎不全となる。腎臓以外では肝臓、膵臓、卵巣、甲状腺にも嚢胞を認め、心臓には僧帽弁逆流、大動脈弁逆流を認める。また、血管病変としては高血圧や動脈瘤を生じる。ADPKD の患者の 85% は 16p13.3 に位置する遺伝子 *PKD1* の異常により発症し、15% は 4q21-23 に位置する遺伝子 *PKD2* の異常により発症する。*PKD1* は cDNA サイズ 14.5kb の極めて巨大な遺伝子であ

り、遺伝子産物の polycystin-1 は 460 K Da の巨大な蛋白である。

ADPKD における症状は、腎嚢胞のみならず肝、膵嚢胞、大腸憩室、頭部および腹部大動脈瘤など、全て正常な管腔構造が何らかの原因により拡張しておこることから、細胞外器質と細胞、もしくは細胞間接着の異常が主体をなすと考えられる。そこで本論文においては、ヒト *PKD1* 遺伝子のマウスホモログである *Pkd1* 5'欠損マウス胎仔の表現型およびその発現機序について分子生物学的、組織化学的検討を行った。

マウス胎仔のホモ欠損マウスは胎生14.5日から著しい浮腫、全身出血、羊水過多、顎形成異常を生じ胎生致死であった。

ホモ欠損マウスの胎生致死の原因について検索するため、胎仔心臓を組織学的に検索した。ホモ欠損マウスには心臓神経堤細胞の移動の異常を示唆する心室中隔欠損ventricular septal defect (VSD) および大動脈騎乗Double Outlet of Right Ventricle (DORV) が認められた。これらの異常は野生型では認められず、ホモ欠損マウスの胎生致死との関与が示唆された。polycystin-1のc端には内因性の $\beta$ -catenin を安定化させる作用があり、また $\beta$ -cateninの心臓神経堤細胞の分化への関与も以前から指摘されている。したがって、ホモ欠損マウスではpolycystin-1の欠損のために $\beta$ -cateninが不安定となり、VSDやDORVといった表現型が引き起こされていると考えられる。そこで、胎仔心臓での $\beta$ -cateninの発現を、ホモ欠損マウスと野生型で比較したところ、ホモ欠損マウスが野生型と比べて57.8%に低下し、また $\beta$ -cateninの標的遺伝子であるc-MYC の発現も野生型と比べて25.2%に低下していた。

*Pkd1* ホモ欠損マウスにみられた総動脈管形成異常は心臓神経堤細胞の異常な遊走に起因し、endothelin-1 (ET-1) 欠損マウスにおいても認められる。polycystin-1 は神経堤細胞由来臓器においても発現が認められるため、

polycystin-1 が ET-1 の signaling pathway に関与している可能性があると考えられる。ET-1 は ERK を活性化することが知られている。そこで、ET-1 に誘発される ERK の活性化における polycystin-1 の関与を mouse embryonic fibroblast (MEF) を用いて検討した。endothelin receptor A、B の発現は野生型とホモ欠損 MEF の間で差を認めなかった。ERK gel shift assay では野生型が ET-1 刺激により急速な ERK2 のリン酸化を認めたのに対して、ホモ欠損 MEF では ERK2 のリン酸化が減弱しており、ET-1 を介する ERK の活性化に polycystin-1 が関与すると思われた。

ホモ欠損マウスにおいては、尿細管が成熟を始める胎生15.5日頃から腎嚢胞の形成が認められ、胎生16.5日以降ではホモ欠損マウス全例に嚢胞が観察された。野生型およびヘテロ欠損マウスには嚢胞は認められなかった。また、胎仔腎臓での  $\beta$ -catenin の発現は、心臓と同様にホモ欠損マウスが野生型と比べて 67% に低下していた。

尿細管上皮の成熟と機能分化には cadherin 依存性の細胞間接着が必要であるため、cadherin の発現低下が ADPKD における嚢胞発生の原因の一つとされている。そこで胎仔腎尿細管上皮における E-cadherin の発現を、免疫蛍光染色にて野生型と比較した。野生型では尿細管細胞の細胞-細胞間、基底側ともに E-cadherin の強い発現を認めたのに対して、ホモ欠損マウスでは細胞-細胞間における発現は比較的保たれていたものの、基底側における発現は著明に減少していた。また、ホモ欠損マウスの嚢胞でも細胞-細胞間、基底側ともに発現は減少していた。E-cadherin 以外の adherens junctions の構成成分の一つに PECAM-1 (CD31) がある。この PECAM-1 についても発現を比較したところ、E-cadherin と同様に野生型と比べてホモ欠損マウスでは基底側における発現が著明に減少していた。

嚢胞発生は、tyrosine kinaseの活性化による細胞増殖の亢進や脱分化に特徴づけられる。Epidermal growth factor receptor (EGFR)はADPKDにおいて過剰発現していることが知られている。また、hepatocyte growth factor (HGF)も嚢胞発生に関与し、HGF/c-METシグナルの過剰発現により嚢胞が発生することが遺伝子導入マウスにおいて示されている。Gab1はtyrosine kinase受容体であるc-Metの下流に位置し、ERK2を調節する重要なtyrosine-phosphorylated docking proteinであり、管腔形成に重要な役割を果たすことが知られている。そこで胎生16.5日マウス腎臓でのGab1リン酸化を野生型と比較したところホモ欠損マウスでは著明に亢進していた。また、MEFをHGFで刺激した場合、野生型ではGab1のリン酸化に変化を認めなかったが、ホモ欠損MEFでは著名なリン酸化の亢進を認めた。

以上の結果から、polycystin-1は $\beta$ -cateninやcadherin、MAPK、tyrosine kinaseといった分子を介して、心臓および腎発生において重要な役割を果たしていることが示唆された。