

博士論文

論文題目 多発性嚢胞腎の病態形成における
ミトコンドリア機能異常の関与

氏 名 石本 遊

目次

第1章 要旨

第2章 序文

2.1 多発性嚢胞腎に関して

2.2 ミトコンドリアに関して

2.3 悪性腫瘍におけるミトコンドリア異常の関与

2.4 ミトコンドリアと ADPKD

第3章 方法

3.1 ADPKD 動物モデル

3.2 細胞培養

3.3 DNA 抽出と RT-PCR による mtDNA コピー数の定量方法

3.4 RNA 定量化のための RNA 抽出と RT-PCR

3.5 ウェスタンブロッティング

3.6 免疫組織染色

3.7 MtROS とミトコンドリア形態の定量化

3.8 Muse セルアナライザー

3.9 化学試薬

3.10 統計解析

第4章 結果

4.1 ADPKD モデルラットの腎組織と正常腎組織での mtDNA コピー数の比較

4.2 ADPKD モデルラットの腎組織と正常腎組織での PGC-1 α の発現量の比較

4.3 Cy/+の腎組織における酸化ストレスマーカーの免疫組織染色

4.4 ヒト嚢胞壁上皮細胞とヒト正常尿細管細胞での mtDNA コピー数と PGC-1 α 発現量の比較

4.5 ヒト嚢胞壁上皮細胞とヒト正常尿細管細胞での ROS 産生の比較

4.6 ヒト嚢胞壁上皮細胞とヒト正常尿細管細胞でのミトコンドリア形態の比較

4.7 ヒト嚢胞壁上皮細胞とヒト正常尿細管細胞でのミトコンドリア膜電位の比較

4.8 ミトコンドリアを標的とした抗酸化薬 MitoQ 投与によるヒト嚢胞上皮

細胞の病態変化

第5章 考察

第6章 結語

第7章 引用文献

謝辞

第1章 要旨

常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal polycystic kidney disease : ADPKD)と癌における細胞増殖メカニズムとの類似性から、本研究では ADPKD におけるミトコンドリア異常について検討した。ADPKD モデル動物(Cy ラット)の腎臓では、正常腎と比較しミトコンドリア DNA コピー数やミトコンドリア生合成の主要制御因子 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha (PGC-1 α)発現量が低下しており、その局在が嚢胞上皮細胞であることが示唆された。ヒト ADPKD 嚢胞上皮細胞を用いて更なる検討を行ったところ、動物モデルで得られた結果と同様に、ミトコンドリア DNA コピー数の低下と PGC-1 α の発現量低下が認められた他、嚢胞上皮細胞のミトコンドリアでは正常尿管細胞のミトコンドリアと比較して、活性酸素種の産生が亢進していること、形態が断片化していること、膜電位が低下していることが確認された。In vitro において、ミトコンドリア特異的な抗酸化薬を用いたところ、活性酸素種の産生が低下し、細胞増殖が抑制されたことから、ミトコンドリア機能の異常が嚢胞上皮細胞の細胞増殖に寄与しているものと考えられた。

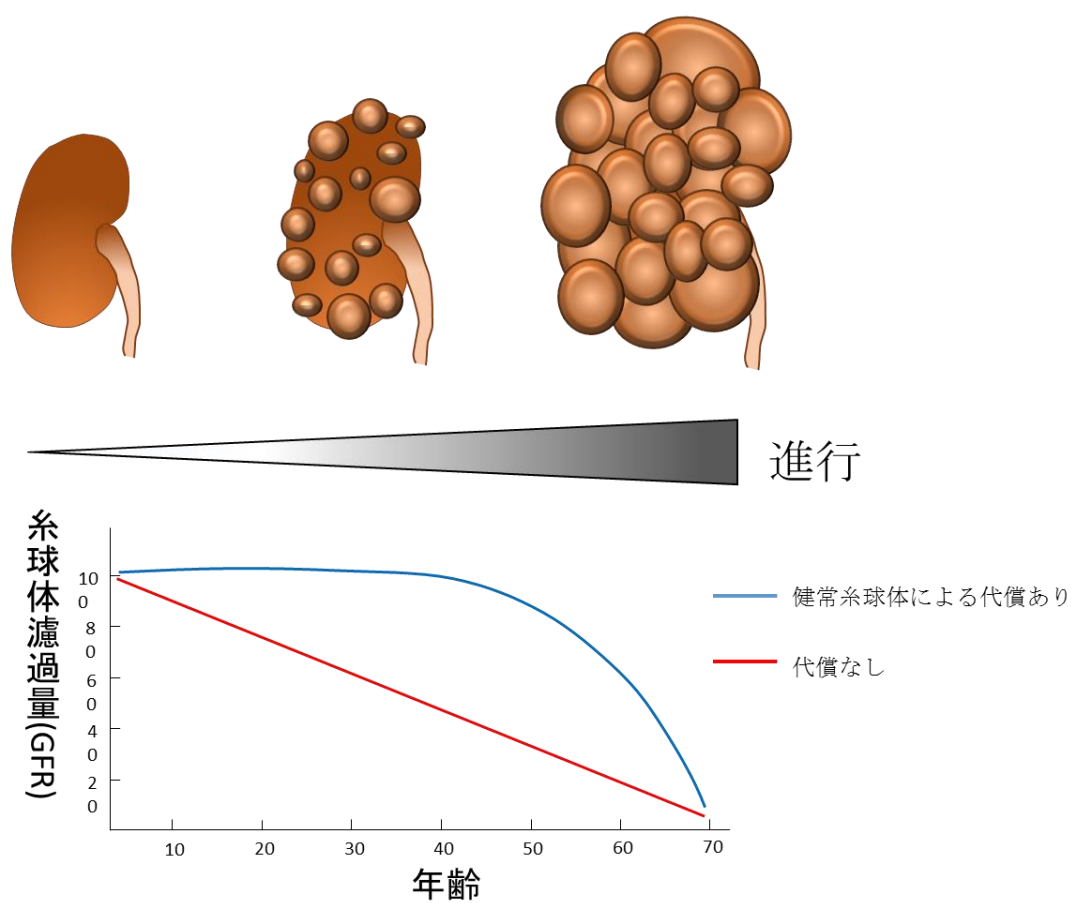
本研究は、ADPKD におけるミトコンドリア異常を示した初めての報告であり、ミトコンドリアが ADPKD の新たな治療標的となる可能性が示唆された。

第2章 序文

2.1 多発性嚢胞腎に関して

多発性嚢胞腎(Polycystic kidney disease : PKD)は遺伝性の腎疾患で、腎尿細管に嚢胞が多発し、巨大化することで腎機能障害をきたす疾患である。PKDには、常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal polycystic kidney disease : ADPKD)と常染色体劣性多発性嚢胞腎の主に2つのタイプが存在する。中でも、ADPKDは最も頻度の高い遺伝性腎疾患で、その頻度は500-1000人に1人とされ、polycystic kidney disease 1(PKD1)またはpolycystic kidney disease 2(PKD2)遺伝子の異常が原因となる(1)。主に成人で発症し、両側腎臓に多発性の嚢胞が進行性に発症・増大することで、徐々に腎機能が低下し、最終的には末期腎不全をきたすが(図1)、腎機能の低下が明らかとなるのは一般に中年期であり、70歳になると約50%が末期腎不全となり、腎代替療法が必要となるとされる(2)。

図 1. ADPKD の進行にともなう腎臓の模式図と腎機能の経過



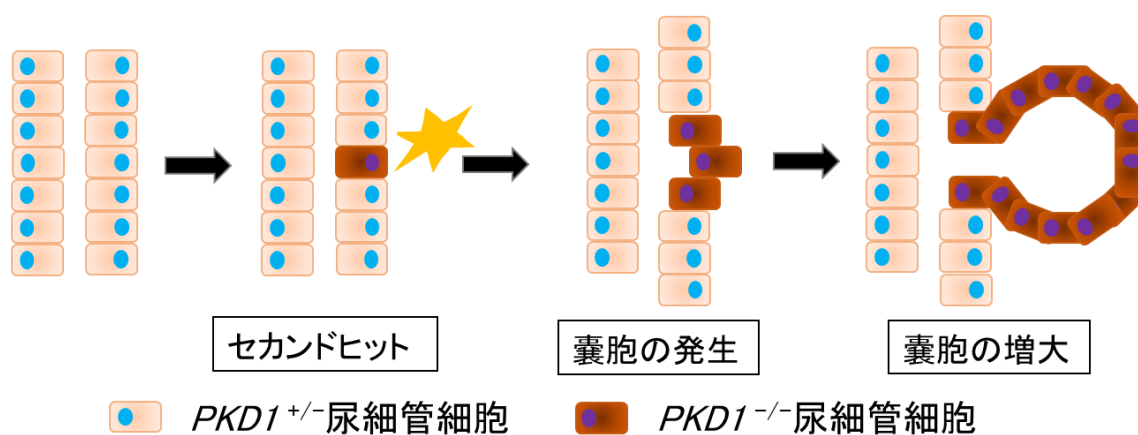
ADPKD の病態が進行するにつれ、腎臓に嚢胞が多発し、徐々に嚢胞が増大していく。腎容積の増大にともない、実際の腎機能は低下するが、健常糸球体の代償作用により、GFR は保たれるため、かなり病態が進行してから腎機能の低下が明らかとなる。

全世界的には 400-700 万人の患者がおり、腎代替療法を受ける患者のうち、7-15%は ADPKD が原疾患とされている(3, 4)。わが国では、全 End-Stage Renal Disease (ESRD)患者の約 3%が ADPKD 患者であり(5)、米国では血液透析患者の 2.4%、腹膜透析患者の 4.7%、腎移植を受けた患者の 9.9%が ADPKD 患者である(6)。

ADPKD 患者のうち、約 85%は polycystin-1 をコードする *PKD1* (ch16p13.3, 46 exons)の遺伝子変異で、残りの約 15%は polycystin-2 をコードする *PKD2* (ch4p21, 15 exons)の遺伝子変異である (7)。 polycystin-1 と polycystin-2 は膜貫通タンパクであり、両者は極性を持った上皮細胞の管腔側に存在する繊毛において二量体を形成することで協調して働き、非選択的 Ca^{2+} チャネルとして、細胞内への Ca^{2+} の流入を制御する役割を果たす(7) 。このことから、 polycystin-1 と polycystin-2 の異常にともなう、繊毛機能の異常が嚢胞腎の病態形成に関わっていると考えられるが、嚢胞の発生・増大には、尿細管細胞の異常な細胞増殖や、嚢胞内への分泌物の排泄、細胞外基質の変化、細胞極性など、いくつかの非常に複雑なメカニズムが関与していることが解明されてきている(8)。また、常染色体優性遺伝性の疾患であることから、ADPKD 患者の全ての細胞が生まれながらにして 2 対の *PKD* 遺伝子(*PKD1* または *PKD2*)のうち 1 対は正常な *PKD* 遺伝子であるにもかかわらず、実際に嚢胞が形成されて

いるのはネフロンのうち 1-5% だけであり(9, 10)、全ての細胞が一様にして嚢胞を形成しているわけではないことや、ADPKD 患者の 1 つの腎嚢胞から嚢胞上皮細胞を単離して調べた研究から、嚢胞を形成する細胞はモノクローナルで、この病気において本来は正常な対立遺伝子に *PKD1* または *PKD2* の変異が認められる(11) ことなどから、尿細管のある 1 つの細胞が異常をきたし、その細胞に端を発してクローナルな細胞増殖が起こるものと考えられている(12) (図 2)

図 2. ADPKD(*PKD1* 変異例)における腎嚢胞形成の模式図



PKD1^{+/-} の尿細管細胞に、何らかのセカンドヒットが起こることによって、*PKD1*^{-/-} となり、*PKD1*^{-/-} 尿細管細胞がモノクローナルに増殖することで嚢胞が発生・増大する。

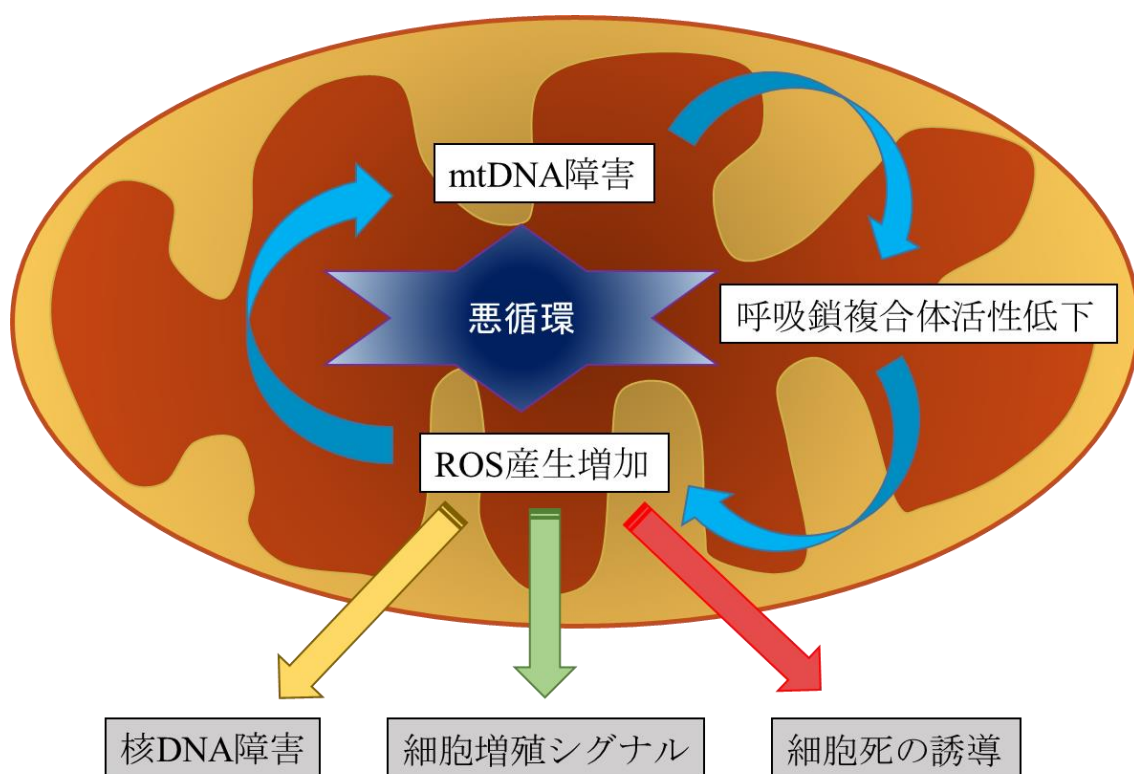
このことから、何らかの原因により正常な対立遺伝子の発現量低下や体細胞変異が嚢胞形成の開始点となるものと考えられ、生まれながらの遺伝子異常の他に、セカンドヒットが必要であるとする、ツーヒット仮説が ADPKD の病態形成において提唱されている(11, 13)。嚢胞壁を形成する嚢胞上皮細胞には、上述した様々な異常が存在するが、中でも一番の特徴は、分化が不完全で持続的に増殖し続けることであり、この異常な細胞増殖により尿細管に生じた嚢胞が拡大し、巨大化した嚢胞が正常尿細管を圧排することで、閉塞性の障害をきたし ADPKD 患者の腎機能が低下するとされている(14)。ADPKD 患者を対象とした臨床研究結果から、糸球体濾過量は正常ネフロンが減少しても過剰濾過により代償され、初期には病気の進行を反映しないため、総腎容量が腎機能障害の信頼できる指標として利用されている(15)。このように、細胞増殖を抑え嚢胞の増大を抑制することが ADPKD の最も効果的な治療であると考えられている。

2.2 ミトコンドリアに関して

ミトコンドリアは、20 億年前から細胞内で共生しているパートナーであり、真核生物の細胞質に存在している細胞内小器官である(16, 17)。ミトコンドリアは二重膜を持ち、内膜の内側のマトリックスに 2-10 コピーのミトコンドリア

DNA(mtDNA)を有している。ヒトにおいては、mtDNAは環状な16,569bpのDNAで、13のタンパク質とミトコンドリアの翻訳に必要な24のRNA(2つのrRNAと22のtRNA)の37の遺伝子をコードしている。ミトコンドリアDNAがコードする13のタンパク質は全て電子伝達系に関わるタンパク質であり、正常なミトコンドリア機能を維持するために必要不可欠なものである。ミトコンドリアの主な役割は、電子伝達系と酸化的リン化(oxidative phosphorylation : OXPHOS)、TCAサイクルとβ酸化を介してATPを産生することであるが、エネルギー産生をするだけでなく、細胞増殖など様々な細胞機能を制御していることが知られている。ミトコンドリアのホメオスタシスは、ミトコンドリアの生合成、mtDNAの複製、ミトコンドリアの形態変化(分裂や融合)により調整されている。これらのメカニズムが破綻すると、ミトコンドリア障害をきたし、活性酸素種(reactive oxygen species : ROS)の産生増加やアポトーシスが引き起こされる。ミトコンドリアが産生するROS(mtROS)が異常に高いと、その細胞毒性により細胞はアポトーシスまたはネクローシスをきたすが、mtROSはこれら細胞死を引き起こすだけでなく、同時にシグナリング分子や強力な有糸分裂促進因子としても作用する(18-21) (図 3)。

図 3. ミトコンドリア機能異常と細胞応答



mtDNA 障害が生じると、呼吸鎖複合体活性が低下し、ROS の産生が増加する。ROS は更なる mtDNA 障害を引き起こすため、このサイクルは悪循環となる。また、ROS の増加は、細胞死を誘導するだけでなく、細胞増殖にも寄与する。

そのため、細胞死が抑制されるような環境下では、増加した ROS 産生は腫瘍性形質変化に寄与することとなる。近年、ミトコンドリア障害に起因した病態生理学的役割に関する理解が進んだことで、ミトコンドリアを標的とした治療戦略が、ミトコンドリア病のみならず神経変性疾患や心疾患、悪性腫瘍など様々な疾患の治療に役立つ可能性が指摘されてきている。

2.3 悪性腫瘍におけるミトコンドリア異常の関与

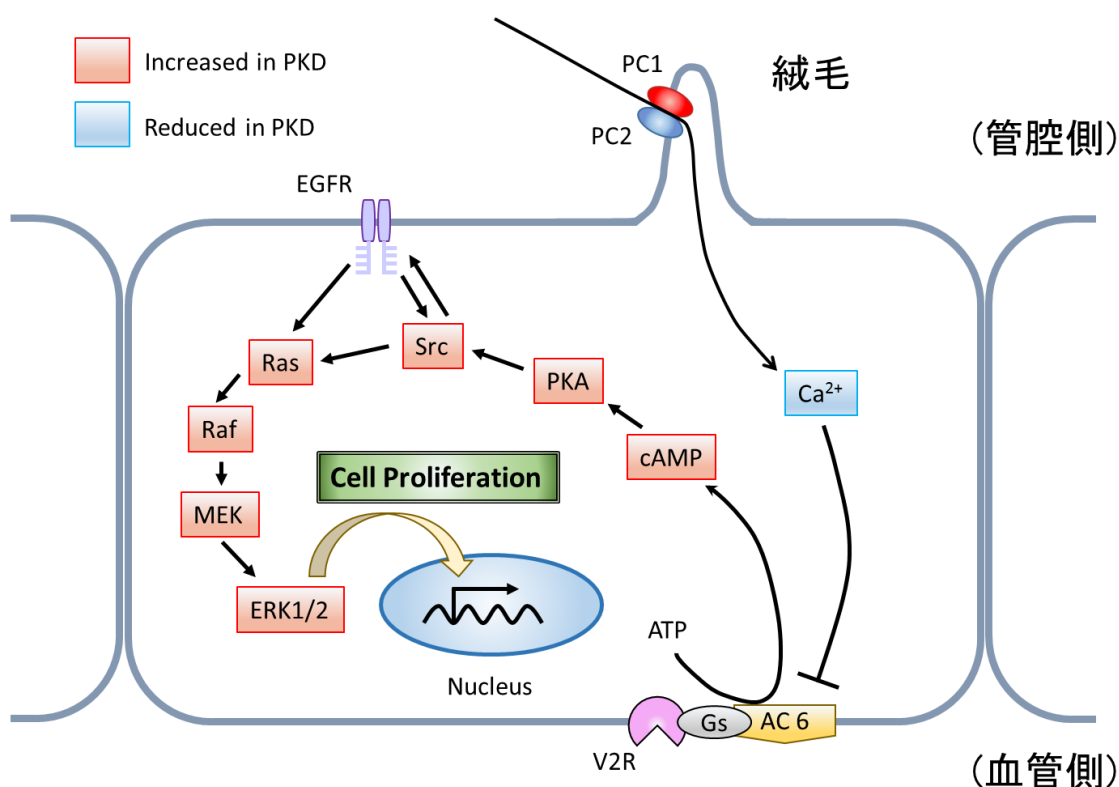
ミトコンドリア異常と悪性腫瘍に関して述べると、腫瘍細胞のミトコンドリアは、機能的・形態学的に正常細胞のミトコンドリアと異なることや(22)、mtDNA はイントロンやヒストンを持たないため、核DNA(nDNA)と比較して酸化障害の影響を受けやすく、一般に酸化障害に対してnDNAの10-20倍脆弱で変異をきたしやすいこと(23)、多くの発癌性物質がnDNAよりもmtDNAに結合しやすいことが知られている(24, 25)。実際に、mtDNAの体細胞性または生殖細胞性変異が、腎癌、大腸癌、頭頸部癌、甲状腺癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌や膀胱癌など様々な癌において確認されているほか(26-31)、白血病細胞においてはDNA配列異常が起こる以前からmtDNAの異常が起きていることも報告されている(32, 33)。更には、癌細胞由来の変異をきたしたmtDNAと正常細胞のmtDNAを置換すると、癌細胞由来のmtDNAに置換された細胞が癌細胞の表

現型を呈する(34)こと、mtDNAの変異だけではなく遺伝子多型も癌のリスクとなることが確認されていること(35-38)などからも、癌細胞におけるmtDNAの重要性が示されている。

2.4 ミトコンドリアと ADPKD

ADPKD患者の腎臓を正常腎とプロテオーム解析で比較した研究で、TCAサイクルや呼吸鎖複合体、エネルギー代謝やアミノ酸代謝にかかわる多数のミトコンドリア関連酵素がADPKD患者の腎組織では低下していること(39)が以前から報告されているが、それ以上ADPKDとミトコンドリアに関しての詳しい研究は行われていない。また、近年のADPKDや癌研究の進行により、癌細胞に認められる細胞増殖シグナルや、有酸素下でも解糖系でATPを産生する(Warburg効果)などの現象が、ADPKDにおいても共通して認められることが分かり、転移能などの違いはあるものの、両者が類縁疾患であることが示唆されている(40)。ADPKDの嚢胞上皮細胞増殖シグナルについては図4を参照。

図4. PKD嚢胞上皮細胞における細胞増殖シグナル



嚢胞上皮細胞では、ポリシスチン1または2(PC1、PC2)の発現量低下により、細胞内へのCa²⁺流入が減少し、細胞内Ca濃度が低下する。Ca²⁺はアデニル酸シクラーゼ6(AC6)の働きを抑制するが、この抑制が効かなくなることで、AC6が活性化し、サイクリックAMP(cAMP)が増加し、プロテインキナーゼA(PKA)、Src、Rasが活性化される。また、嚢胞上皮細胞では上皮成長因子受容体(EGFR)が過剰発現しており、これらのRas/Raf/MEKの活性化を介して、最終的に活性化されたERKが核へ移行し、転写因子が活性化され、細胞増殖をきたす。Gs : Gタンパク。V2R : バソプレッシンV2受容体。

これらのことを背景とし、今回我々は、ADPKDにおいてミトコンドリア機能異常が存在し、嚢胞形成・増大に寄与していることを疑い、ADPKDモデル動物を用いたin vivoの実験とヒトADPKD嚢胞上皮細胞を用いたin vitroの実験で、ADPKD病態形成に関するミトコンドリア機能異常の役割について研究した。

第3章 方法

3.1 ADPKD 動物モデル

ADPKD モデルである Han:SPRD-Cy (Cy ラット)の、野生型(+/+)とヘテロ接合体(Cy/+)の7週齢♂の腎組織と血清は、藤田保健衛生大学疾患モデル教育研究センターの長尾静子教授より供与された。

3.2 細胞培養

PKD1変異を持つADPKD患者の腎嚢胞から単離し不死化された、ヒト近位尿管由来の嚢胞上皮細胞 (WT 9-7)と、同様の方法で採取・不死化した正常なヒト近位尿管細胞(RCTEC-Lotus tetragonolobus agglutinin: RCTEC-LTA)を用いてin vitroの実験を行った(41)。どちらの細胞も、ハーバード大学のJing Zhou教授より供与された。細胞は、37°C、5%CO₂インキュベーター内で、10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma)を加えたDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)(Sigma-Aldrich)を用いて培養を行った。

3.3 DNA 抽出と RT-PCR による mtDNA コピー数の定量方法

In vivo、In vitroの実験において、DNA抽出はNucleoSpin Tissue(タカラバイオ)を用いて行った。mtDNAコピー数の定量化は、Millerらの報告(42)に基づき、抽出したDNAをリアルタイム定量PCR (RT-PCR)によって定量した。具体的には、mtDNAに特異的なDNA配列と、nDNAに特異的なDNA配列をPCRで増幅し、nDNAに対するmtDNAの割合(mtDNA/nDNA)から、1つの細胞あたりのmtDNAコピー数を計算するものである。PCRはCFX96 (Bio-rad)を使い、PCR試薬にはKAPA SYBR Fast Universal 2x qPCR master Mix (KAPA Biosystems)を用いて、10ngのDNAサンプルを95°C 30秒の後、95°C 5秒・60°Cでのアニーリング30秒・72°Cでの伸長反応10秒で40サイクル回し、リアルタイムPCRでデータを収集した。用いたプライマーについてはTable 1を参照。最終的な結果は、それぞれのコントロール(動物実験に関しては野生型、細胞実験に関しては正常近位尿細管)を基準に相対比で表した。

Table 1

Species	Genome	Target Gene	Forward Primer sequence 5'-3'	Reverse Primer sequence 5'-3'	reference
Rattus novegicus	mitochondria	cytochrome b	GCAGCTTAACATTCCGCCCAATC A	TACTGGTTGGCCTCCGATTCATG T	(43)
	nuclear	Actin	ATCATGTTTGAGACCTTCAACAC CC	CATCTCTTGCTCGAAGTCTAGG	(43)
Homo sapiens	mitochondria	tRNA-Leu	CACCCAAGAACAGGGTTTGT	TGGCCATGGGTATGTTGTTA	(44)
	nuclear	β 2- microglobulin	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTAT CT	TCTCTGCTCCCCACCTCCAAGT	(44)

3.4 PGC-1 α の RNA 定量化のための RNA 抽出と RT-PCR

RNA 抽出は miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて行い、RNA は miScript Reverse Transcription Kit (QIAGEN)を用いて相補的な DNA へ逆転写した。PCR は CFX96 (Bio-rad)を使い、PCR 試薬には KAPA SYBR Fast Universal 2x qPCR master Mix (KAPA Biosystems)を用いて、10ng の DNA サンプルを 95°C 30 秒の後、95°C 5 秒・60°Cでのアニーリング 30 秒・72°Cでの伸長反応 10 秒で 40 サイクル回し、リアルタイム PCR でデータを収集した。用いたプライマーについては Table 2 を参照。結果は、野生型を基準に相対比で表した。

Table 2

Species	Target Gene	Forward Primer sequence 5'-3'	Reverse Primer sequence 5'-3'
Rattus norvegicus	PGC-1 α	GAAAAAGCTTGACTGGCGTC	GCAGCACACTCTATGTCCTC
	B-Actin	TCTACAATGAGCTGCGTGTG	TCTTCATGAGGTAGTCTGTCAGG

3.5 ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティング用のタンパク抽出については、核タンパクはNE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて行い、それ以外のタンパク抽出はNuclear Extract Kit(Activ Motief)を用いて行った。タンパク濃度測定はDC protein kit (Bio-Rad Laboratories)を用いて行った。得られたサンプルにSDSサンプルバッファー(0.7 M Tris-HCl (pH 6.8)、20% SDS、72%グリセロール、10%メルカプトエタノール、0.024%ブROMフェノールブルー)を添加し、95°Cで5分間処理した後に、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後に、トリスグリシン転写バッファー(48 mM トリスバッファー、39 mM グリシン、0.05% SDS、10%メタノール)を用いて、タンパクをポアサイズ0.45 μ mのpolyvinylidene difluorideメンブレン(GE Healthcare)に転写した。メンブレンは、1次、2次抗体でインキュベートし、ECL Plus Western blotting system (GE Healthcare)で発色した。バンドのシグナルはNIH Image J software (National Institutes of Health)を用いて定量化した。一次抗体には、マウスモノクローナル抗Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)抗体(1:200; sc-32233)、ウサギポリクローナル抗Extracellular Signal-regulated Kinase(ERK)1抗体(1:200; sc-94)、マウスモノクローナル抗リン酸化ERK(pERK)抗体(1:200; sc-7383)、マウスモノクローナ

ル抗Histone H1抗体(1:50; sc-8030) はSanta Cruz Biotechnologyより購入し、ウサギポリクローナル抗PGC-1 α 抗体(1:1000; ab54481)はAbcamより購入した。二次抗体には、HRP付加されたヤギ抗マウスIgG (1:5000; 170-6516; Bio-Rad Laboratories)、HRP付加されたヤギ抗ウサギIgG (1:5000; 170-6515; Bio-Rad Laboratories) を用いた。

3.6 免疫組織染色

カルボニル化タンパクの免疫組織染色には、メチルカルノア(メタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1)固定した腎組織を、8-OHdGの免疫組織染色にはマイルドホルム(和光)で固定した腎組織を、それぞれパラフィン包埋して用いた。切片は3 μ m厚に薄切した。カルボニル化タンパクは、カルボニル化タンパク質免疫組織染色キット(シマ研究所)を、8-OHdGは抗8-OHdG抗体(日本老化制御研究所)を一次抗体に用いて、4 $^{\circ}$ C12時間インキュベートした。二次抗体には、カルボニル化タンパクはVECTSTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit(Vector)を、8-OHdGはVECTSTAIN Elite Mouse ABC IgG Kit(Vector)をそれぞれ用いた。画像解析にはImage Jを用い、カルボニル化タンパクは+/+の正常尿細管と Cy+/+ の嚢胞上皮部分の細胞全体の染色性の濃さを、8-OHdGは+/+の正常尿細管と

Cy3の囊胞上皮部分の核の染色性の濃さを、それぞれ面積と平均輝度の積から成る輝度の総和を定量化し、統計解析を行った。

3.7 MtROS とミトコンドリア形態の定量化

MtROSの評価は、MitoSox Red (M-36008, Molecular Probe) 50 nMで37°C15分インキュベートして細胞を染色し、BZ-9000 fluorescence microscope (Keyence)で観察し、Kudinらの報告(45)に基づき、その蛍光強度を評価することで行った。具体的には、2.5 μ M MitoSox Redで10分間、37°Cインキュベーター内でインキュベートした後に、PBSで洗浄してから観察し、Image Jで画像解析を行いmtROSの定量化を行った(46)。結果は、RCTEC-LTAを基準として表示した。

ミトコンドリアの形態評価については、細胞を50 nM MitoTracker Green FM (M-7514, Molecular Probe)で15分間染色し、BZ-9000 fluorescence microscopeで観察した。観察した画像からミトコンドリアの形態をImage Jを用いて、染色されたミトコンドリアの長径と短径の比からcircularityを計算し、その逆数によりミトコンドリアの伸長度を解析した(46)。

3.8 細胞内 ROS とミトコンドリア脱分極の測定

細胞内 ROS 測定、ミトコンドリア脱分極については、Muse Oxidative Stress Assay Kit (Merck Millipore)、Muse Mitopotential Kit (Merck Millipore)をそれぞれ用いて行い、Muse Cell Analyzer (Merck Millipore)で計測した。

3.9 化学試薬

MitoQuinone (Phosphonium [10-(4,5-dimethoxy-2-methyl-3,6-dioxo-1,4-cyclohexadien-1-yl)decyl] triphenyl-,mesylate; MitoQ)は、ミトコンドリアを標的とした抗酸化薬として初めて報告されたもので、脂質の過酸化を防ぐことでミトコンドリアを酸化障害から保護するものである(47)。このMitoQは、ケンブリッジ大学のM. Murphy先生より供与された。Mitoに対する偽薬としては、(1-Decyl) triphenylphosphonium bromide(SC-264801A, Santa Cruz)を用いた。

3.10 統計解析

実験結果は、JMP Pro11を用いて統計解析を行い、平均値±標準偏差で表記し、p値 < 0.05を統計学的な有意差と判定した。

第4章 結果

4.1 ADPKD モデルラットの腎組織と正常腎組織での mtDNA コピー数の比較

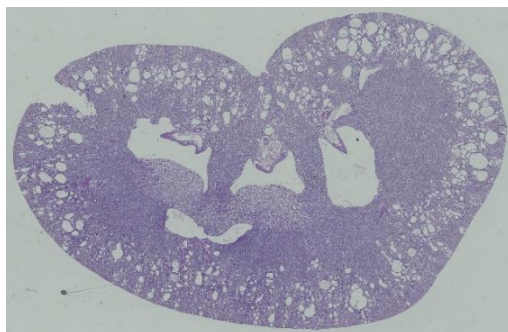
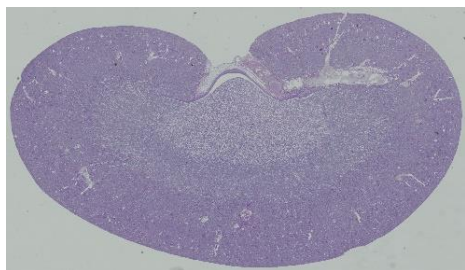
ミトコンドリア活性の低下は mtDNA 量の低下に影響を受け、mtDNA 量はミトコンドリア機能のマーカーとなることが知られている(48)ため、まず ADPKD モデルラットの腎組織における、mtDNA コピー数を正常腎と比較した。MtDNA コピー数の定量方法としては、リアルタイム PCR(RT-PCR)が最も広く使われている信頼できる方法である(49)ため、RT-PCR を用いて mtDNA コピー数を調べた。

用いた Han:SPRD-Cy (Cyラット)は、Kaspereit-Rittinghausenらが発見した、多発性嚢胞腎を自然発症する遺伝性モデルで、クロモソーム5の *Pkdr1* 遺伝子のエキソン13に存在するミスセンス変異が原因で、両側腎臓に近位尿細管由来の多数の嚢胞ができ、次第に増大して腎不全をきたす。野生型(+/+)、ヘテロ (*Cy*/+)、ホモ (*Cy*/*Cy*)の3つの遺伝子型が存在し(50)、*Cy*/*Cy*と *Cy*/+においては生まれながら腎嚢胞が存在するが、*Cy*/*Cy* は急激に病態が進行し、寿命は3週間と短命である一方、*Cy*/+は比較的ゆっくりと病態が進行し、ADPKD同様に進行に性差がある(オスと比較しメスでは進行が遅い)ことから、ADPKDモデル動物として確立されたラットである(51)。今回、7週齢の+/+と *Cy*/+オスの腎組

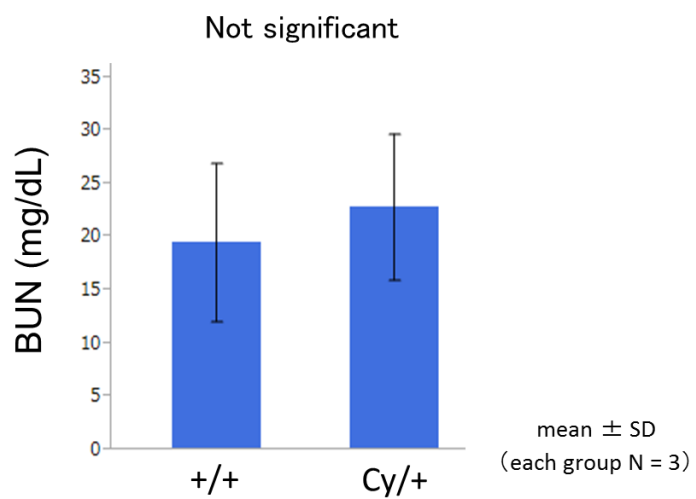
織をそれぞれ3つずつを用いて、腎組織からDNAを抽出し、RT-PCRを行った。このモデル動物において、経過とともに血液尿素窒素(Blood urea nitrogen : BUN)が上昇することが知られているため、腎機能障害の指標としてBUNも合わせて測定したところ、+/+ 群 19.4 ± 7.4 (mean \pm SD) mg/dl、Cy/+ 群 22.3 ± 6.9 mg/dl (p=0.70)と両者に有意差は認められなかったが(図5B)、+/+ 群のmtDNAコピー数(mtDNA/nDNA)を基準としてCy/+ 群のmtDNAコピー数と比較したところ、+/+ 群 1.0 ± 0.02 、Cy/+ 群 0.73 ± 0.14 (p<0.05)と有意な低下を認めた(図5C)。このことから、CyラットにおけるmtDNAコピー数の低下は、腎機能障害が明らかとなるよりも前に生じていることが確認された。

図 5. +/+と Cy/+との腎組織・BUN・mtDNA コピー数の比較

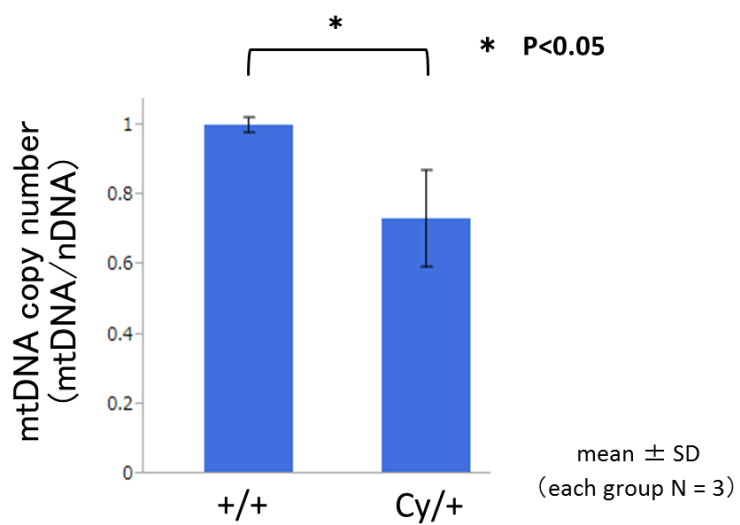
A :



B :



C :



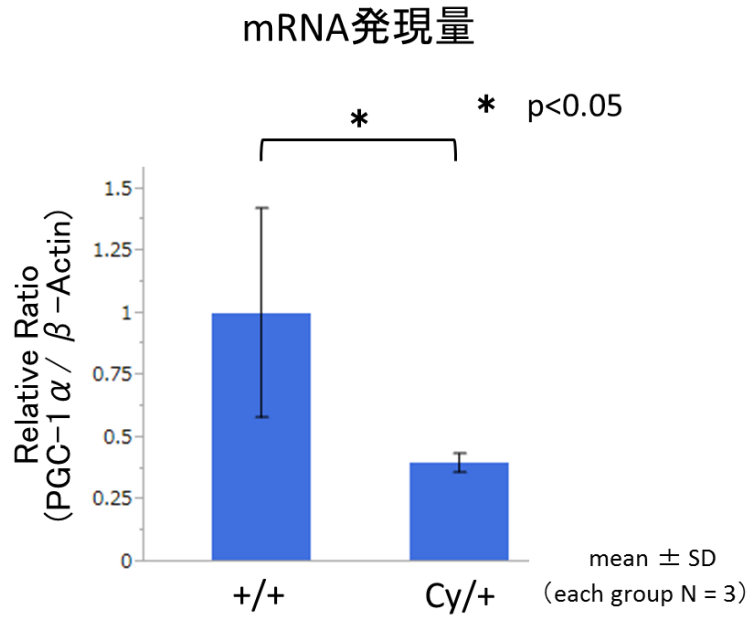
7週齢 Cy ラットの $+/+$ と $Cy/+$ の腎組織(PAS 染色)と BUN、腎組織における mtDNA コピー数の比較。A : (左) $+/+$ の腎組織、(右) $Cy/+$ の腎組織。週齢が若く囊胞のサイズは小さいが、 $+/+$ と比較して $Cy/+$ においては腎皮質を中心に腎囊胞の多発を認める。B : $+/+$ と $Cy/+$ の BUN。 $Cy/+$ において BUN はわずかに増加傾向を認めるが、両者に有意な差は認められない。C : $+/+$ と $Cy/+$ の mtDNA コピー数。 mtDNA コピー数は、 $+/+$ を基準としたものを示す。 $+/+$ と比較し $Cy/+$ において有意な減少を認める。

4.2 ADPKD モデルラットの腎組織と正常腎組織での PGC-1 α の発現量の比較

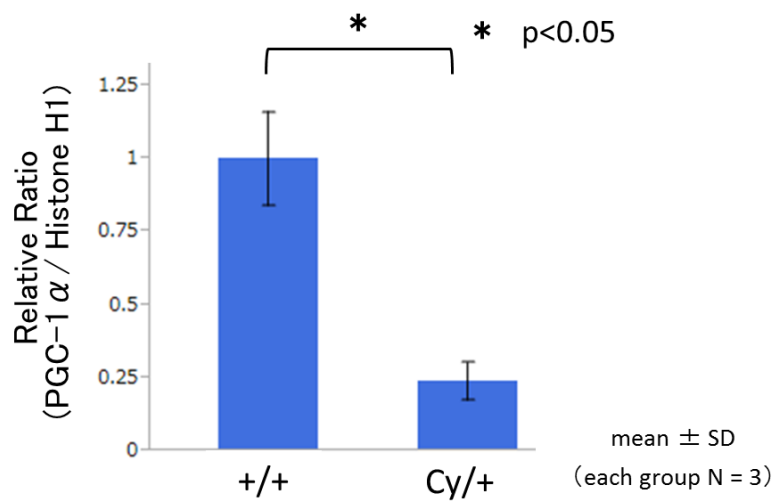
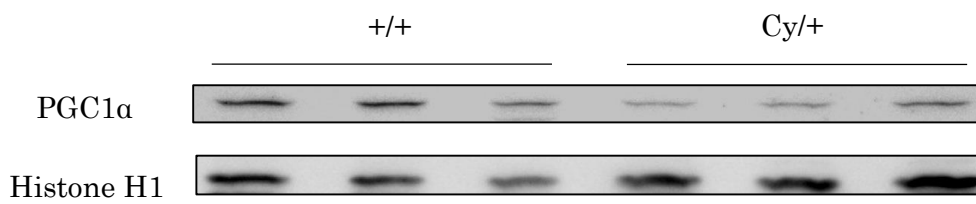
ミトコンドリア生合成の主要制御因子であるPGC-1 α は、腎臓においては近位尿細管に多く発現しており、そのホメオスターシスに寄与することが知られているため(52)、mtDNAコピー数の低下が確認されたADPKDモデル動物の腎組織において、PGC-1 α の発現量を測定した。RNA発現量はRT-PCRを、タンパク発現量はウエスタンブロッティング(WB)を用いて検証した。PGC-1 α は核タンパクであるため、WBについては腎組織から核分画のタンパクを抽出して行った。+/+群を基準としたRNA発現量は+/+ 群 1.0 ± 0.42 、Cy/+ 群 0.40 ± 0.04 ($p < 0.05$)と有意に低下し (Fig 6A)、+/+ 群を基準としたタンパク発現量も+/+ 群 1.0 ± 0.16 、Cy/+ 群 0.24 ± 0.06 ($p < 0.01$)と有意な低下を認めた(Fig 6B)。

図 6. *+/+* と *Cy/+* の腎組織における PGC-1 α の RNA とタンパク発現量の比較

A :



B :



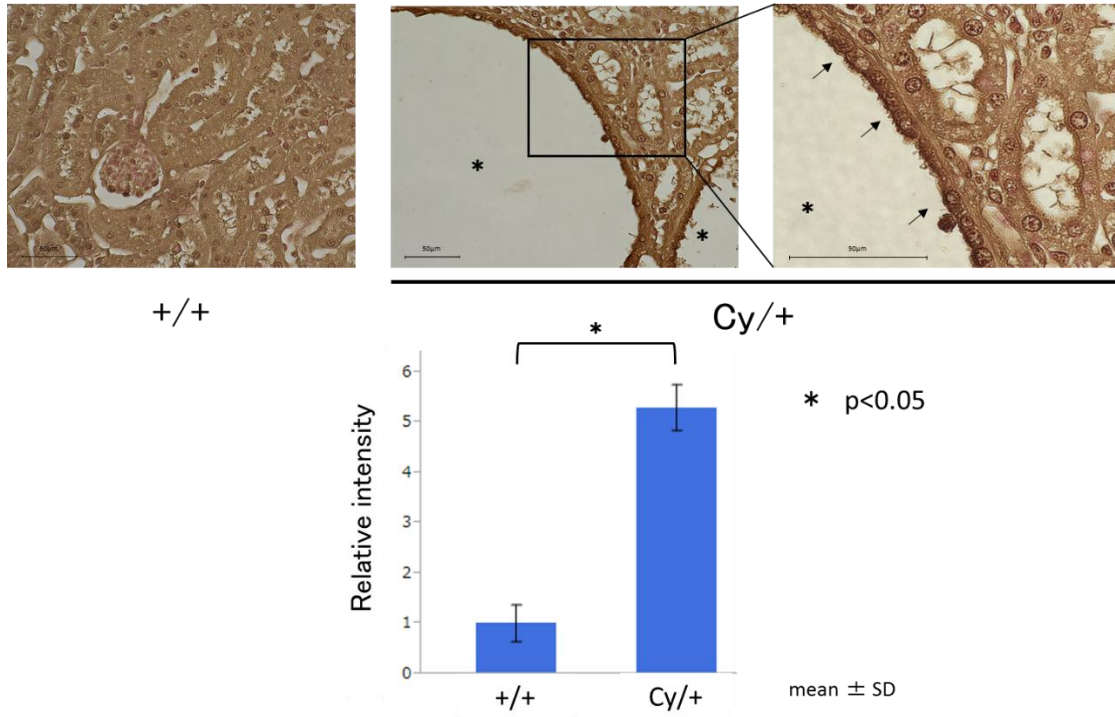
7週齢 Cy ラットの *+/+* と *Cy/+* の腎組織における PGC-1 α の RNA 量とタンパク発現量を比較。A : mRNA 発現量を RT-PCR で測定したもの。 *+/+* と比較して *Cy/+* において PGC-1 α の有意な減少を認める。 B ; (上)PGC-1 α と Histone H1 タンパク発現量の WB 結果、(下)PGC-1 α のバンドの濃さを Histone H1 の濃さで標準化した図。 *+/+* と比較して *Cy/+* において PGC-1 α の有意な減少を認める。

4.3 *Cy/+* の腎組織における酸化ストレスマーカーの免疫組織染色

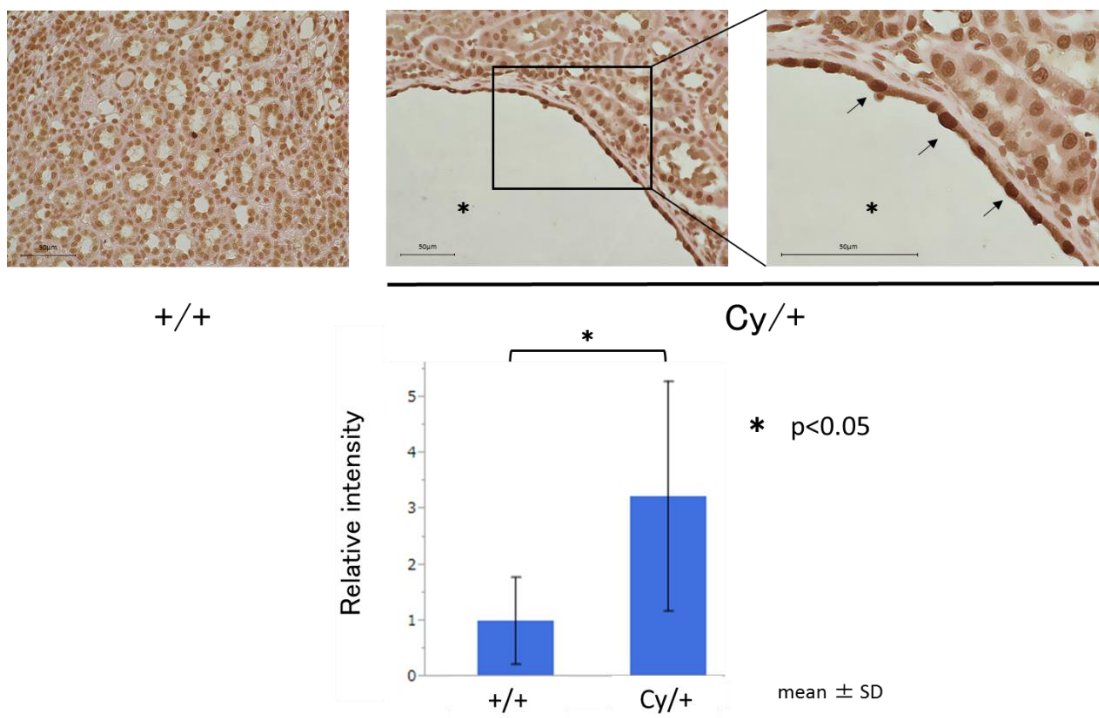
ADPKD モデル動物の腎組織において、mtDNA コピー数の低下と PGC-1 α が正常腎組織と比較して減少していることを確認し、何らかのミトコンドリア異常が嚢胞腎において存在するものと考えられたが、どの細胞にミトコンドリア異常が存在するのか、その局在については分かっていなかったため、免疫組織化学でその局在について検討した。ミトコンドリアの異常は、過剰な ROS 産生と関連していることが知られているため(53)、ここでは酸化ストレスマーカーであるカルボニル化タンパク質、8-OHdG を用いて *Cy/+* の腎組織を染色した。カルボニル化タンパク質は、酸化障害を受けたタンパク質の酸化修飾体として知られているもので、8-OHdG は DNA の酸化障害マーカーである。免疫組織化学の結果、カルボニル化タンパク質は、嚢胞壁上皮細胞の細胞質においてまだ異常をきたしていない尿細管細胞よりも強く染色されることが確認された(図 7A)。また、8-OHdG についても、嚢胞壁上皮細胞の核において異常をきたしていない尿細管細胞よりも強く染色されることが確認された(図 7B)。これらの結果は、嚢胞上皮細胞において ROS の産生亢進が起きていることを示しており、ROS とミトコンドリア異常との関連から、嚢胞上皮細胞においてミトコンドリア異常が存在していることを示唆するものであった。

図 7. $+/+$ と $Cy/+$ の腎組織における酸化ストレスマーカーの免疫染色

A :



B :



7週齢 Cy ラットの *+/+* と *Cy/+* の腎組織における、カルボニル化タンパクと 8-OHdG の免疫組織染色。 *+/+* の腎組織(左)と *Cy/+* の腎組織(中央)は x40 倍の弱拡大、(右)は中央の画像の囲み部分を拡大したもの(x100 倍)。*は嚢胞を示す。矢印は嚢胞上皮細胞において濃く染色されていることを示す。A : タンパクの酸化ストレスマーカーであるカルボニル化タンパクは、*Cy/+*の腎組織の嚢胞化をきたした尿細管嚢胞壁上皮細胞の細胞質を中心に、嚢胞化をきたしていない尿細管の細胞質よりも濃く染色される。下の棒グラフは、*+/+*の正常尿細管と *Cy/+*の嚢胞上皮部分の DAB 染色による細胞全体の染色性を Image J を用いて定量化して比較したもの。

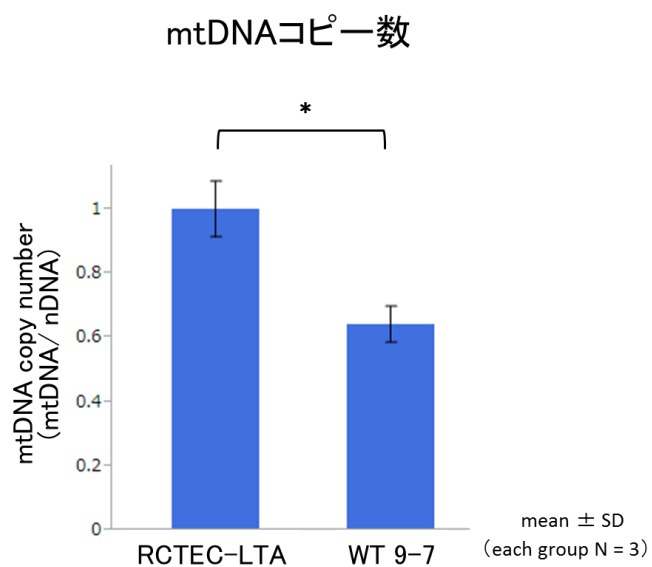
B : DNA の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG は、*Cy/+* の腎組織の嚢胞化をきたした尿細管嚢胞壁上皮細胞の核において、嚢胞化をきたしていない尿細管の核よりも濃く染色される。下の棒グラフは、*+/+*の正常尿細管と *Cy/+* の嚢胞上皮部分 DAB 染色による核の染色性を Image J を用いて定量化して比較したもの。

4.4 ヒト嚢胞壁上皮細胞とヒト正常尿細管細胞での mtDNA コピー数と PGC-1 α 発現量の比較

これまでの結果より、ミトコンドリア異常の局在が嚢胞壁上皮細胞であることが示唆されたため、次に我々は ADPKD の嚢胞壁上皮細胞において動物実験同様に mtDNA コピー数と PGC-1 α の発現量について検証した。ADPKD 嚢胞壁上皮細胞としては、Loghman-Adham らが確立した、*PKD1* 遺伝子異常のある ADPKD 患者の単一の嚢胞から嚢胞上皮細胞のみを採取し細胞株化した(41)、近位尿細管由来のヒト ADPKD 嚢胞壁上皮細胞(WT-9-7)を用いた。コントロールとしては、同様の方法で細胞株化された、正常近位尿細管細胞(renal cortical tubule epithelial cells derived from proximal tubules : RCTEC-LTA)を用いて両者を比較した。

RCTEC-LTA の mtDNA コピー数を基準として、WT 9-7 の mtDNA コピー数の比をとったところ、RCTEC-LTA 1.0 ± 0.12 、WT 9-7 0.67 ± 0.06 ($p < 0.01$)と、WT 9-7 の mtDNA コピー数は有意な低下が認められた(図 8)。

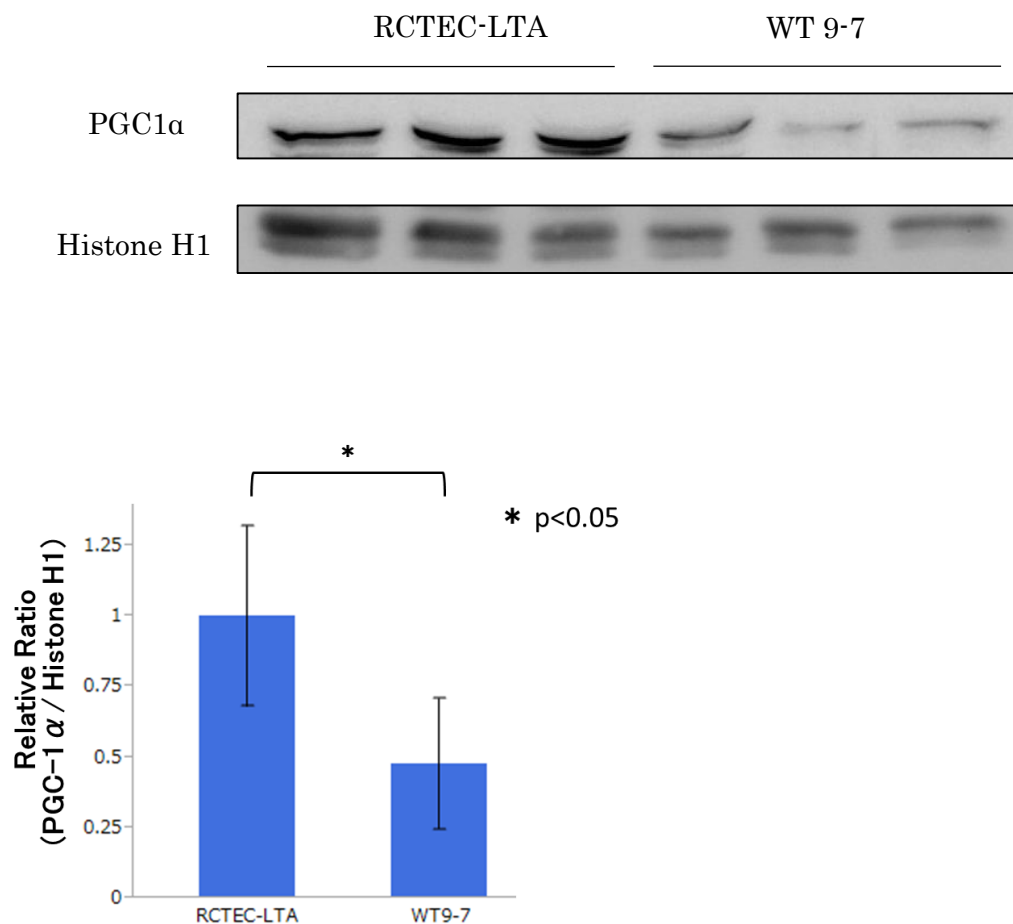
図 8. In vitro における mtDNA コピー数の比較



RCTEC-LTA と WT 9-7 における、mtDNA コピー数を RCTEC-LTA を基準として比較表した。RCTEC-LTA と比較して、WT 9-7 では有意に mtDNA コピー数の低下を認める。

また、RCTEC-LTA と WT 9-7 の核タンパクを抽出して行った WB において、バンドの濃さを Histone H1 との比で定量化したところ、RCTEC-LTA を基準と、RCTEC-LTA 1.00 ± 0.2 、WT 9-7 0.48 ± 0.23 ($p < 0.05$)と PGC-1 α の有意な低下が認められ(図 9)、in vitro においても ADPKD モデル動物を用いた実験と同様の結果が得られた。

図 9. PGC1 α タンパク発現量の比較



RC2EC-LTA と WT 9-7 における、PGC-1 α のタンパク発現量の比較。

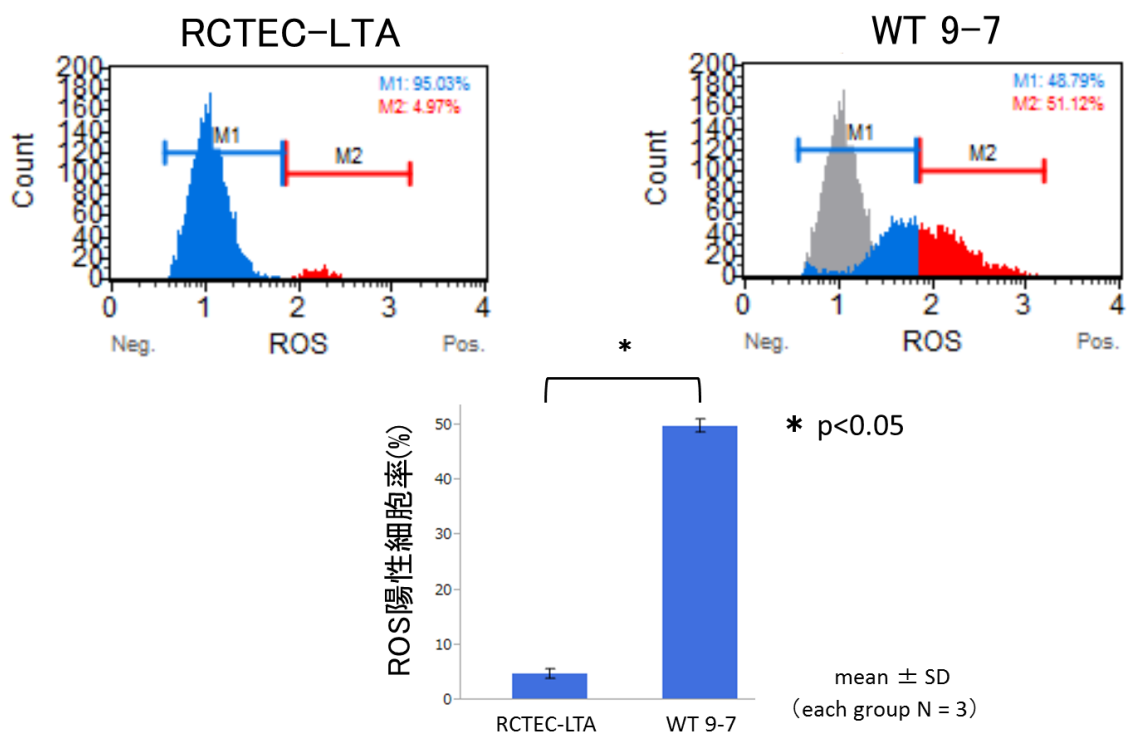
(上)PGC-1 α と Histone H1 の WB、(下)PGC-1 α のバンドの濃さを Histone H1 の濃さで標準化し、RC2EC-LTA を基準として示した図。RC2EC-LTA と比較して WT 9-7 では PGC-1 α の有意な減少を認めた。

4.5 ヒト嚢胞壁上皮細胞とヒト正常尿細管細胞での ROS 産生の比較

細胞内でのROSは主にミトコンドリアで産生されており、ミトコンドリア由来のROS(mitochondrial ROS : mtROS)は、細胞内シグナル伝達や細胞のホメオスタシス維持に重要な役割を担っているが(54-56)、過剰なROSは細胞の酸化ストレス障害を引き起こすとともに、ミトコンドリア機能不全の特徴にもなることが知られている(57, 58)。このことから、更なるミトコンドリア異常を調べる目的で、ヒトADPKD嚢胞上皮細胞と正常尿細管細胞を用いて、細胞内ROSの測定を行った。方法としては、まず、総ROS量を比較する目的で、細胞内ROSの検出によく用いられる、ジヒドロエチジウムに基づいた試薬を使ったMuse Oxidative Stress Kitを用いた細胞内スーパーオキシドの検出系を利用して、ROS陽性細胞と陰性細胞をMuse Cell Analyzerで検出した。

その結果、ROS陽性細胞はRCTEC-LTAでは $4.8 \pm 0.9\%$ 、WT 9-7では $49.9 \pm 1.2\%$ とWT 9-7においては有意にROS陽性細胞が増加していることが確認された(図10)。また、両者のグラフを比較すると、WT 9-7において全体の山のピークがRCTE-LTAと比較してROS陽性側に移動していることから、嚢胞上皮細胞においてはROS産生が亢進していることが示された。

図 10. RCTEC-LTA と WT 9-7 における ROS 陽性細胞の割合



Muse Oxidative Stress Assay Kit による RCTEC-LTA(左)と WT 9-7(右)での ROS 陽性細胞の比較。右図における灰色の山は、左図の RCTEC-LTA における結果を表したものである。WT 9-7 では RCTEC-LTA と比較し全体に右ヘシフトしており、ROS 陽性細胞数の増加が確認される。

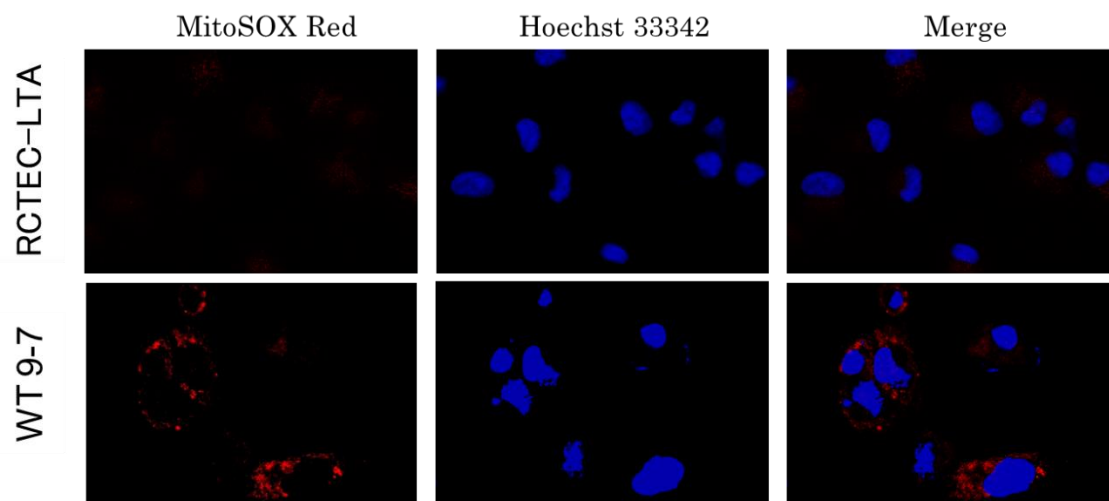
次に、このROSが本当にミトコンドリア由来であることを確認する目的で、MitoSOX Redを用いた免疫細胞染色を行った。MitoSOX Redは、生細胞のミトコンドリアに選択的に取り込まれて、そこでスーパーオキシドに酸化されることで赤色の蛍光を発色するが、他の細胞内ROSでは発色しないため、mtROSの検出に用いられるものである。

結果は、RCTEC-LTAと比較し、WT 9-7では明らかにMitoSOX Redの蛍光強度が高く検出され(図11A)、RCTEC-LTAの蛍光強度を基準として画像解析をしたところ、WT 9-7においてはMitoSOX Redの蛍光強度が 2.9 ± 1.9 倍を示し、 $p < 0.01$ と有意な増強が認められた(図11B)。

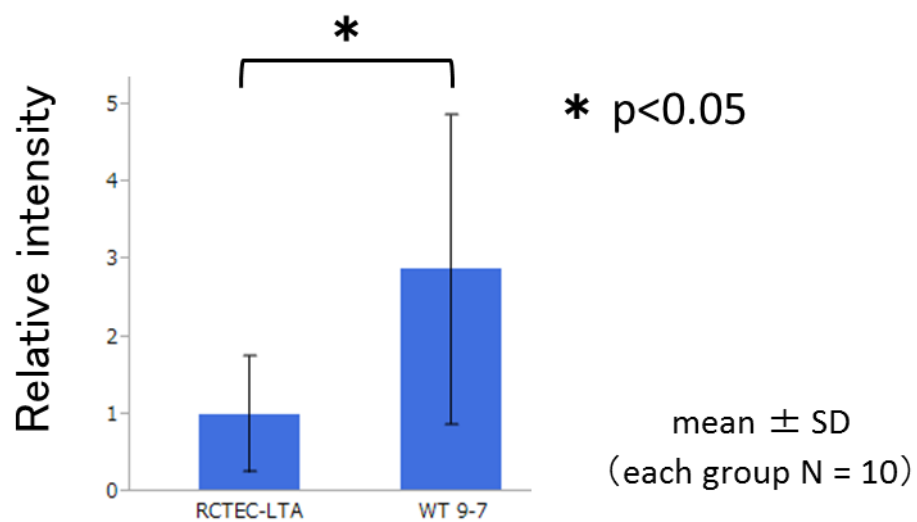
これらの結果から、嚢胞壁上皮細胞ではミトコンドリア由来のROSが有意に増強していることが示され、やはり嚢胞壁上皮細胞ではミトコンドリア機能異常が起きているものと推測された。

図 11. MitoSOX Red による mtROS の評価

A :



B :



A : MitoSOX による RC1EC-LTA(上)と WT 9-7(下)の細胞染色。(左)

MitoSOX Red の染色、(中央)Hoechst 33342 による核染色、(右)両者の

Merge。WT 9-7 では RC1EC-LTA と比較し、MitoSOX Red が強く染色され

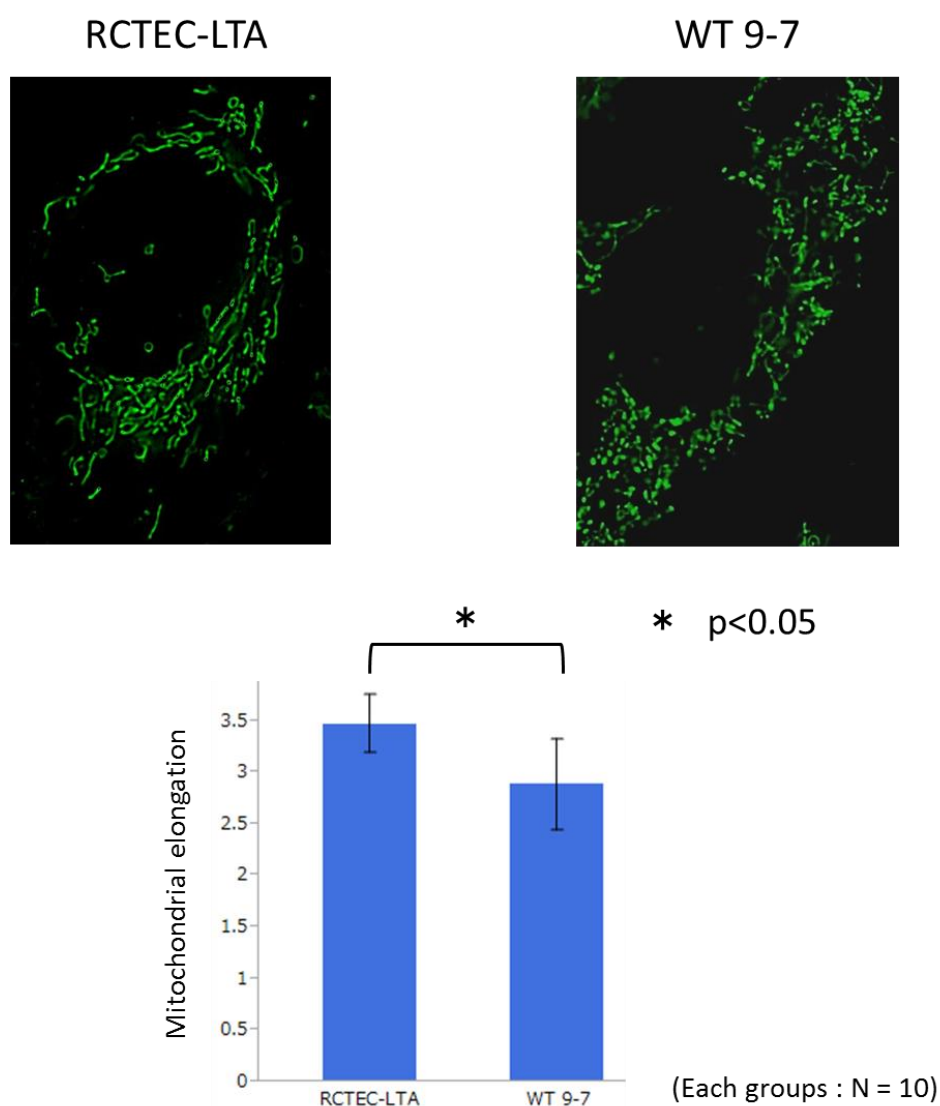
ており、mtROSが増加していることが示している。B：上記 MitoSOX Red の蛍光シグナルを Image J を用いて定量化し、RCTEC-LTA を基準として比較をしたもの。WT 9-7 では RCTEC-LTA と比較し、有意にシグナルの増強を認める。

4.6 ヒト嚢胞壁上皮細胞とヒト正常尿細管細胞でのミトコンドリア形態の比較

上述した通り、ミトコンドリアはダイナミックなオルガネラであり、環境に応じて分裂と融合による形態制御を繰り返すことでホメオスターシスを維持している。このダイナミクスが適切に行われることは、mtDNA変異を持ったミトコンドリア病患者において保護的に働くが(59, 60)、このダイナミクスに破綻をきたし、融合し伸長したミトコンドリアから、分裂して断片化した形態に変化する時には、呼吸鎖複合体活性の低下やmtROSの産生増加を伴うことが報告されている(61)。このことから、嚢胞壁上皮細胞におけるミトコンドリアの形態変化についても検討した。ミトコンドリアの形態は、ミトコンドリアを特異的に染色するMitotracker Green FMを用いて免疫細胞染色を行うことで評価した。

染色結果から、その形態を画像解析したところ、融合に伴う伸長の程度はRCTEC-LTA 3.5 ± 0.3 、WT 9-7 2.9 ± 0.4 と有意に低下($p < 0.01$) (図12)しており、WT 9-7のミトコンドリアはRCTEC-LTAのミトコンドリアと比較し断片化が確認された。これにより形態異常も、嚢胞壁上皮細胞におけるミトコンドリア機能異常を示唆する結果を得た。

図 12. MitoTracker Green FM によるミトコンドリアの形態評価



RC TEC-LTA(上左)と WT 9-7(上右)における、Mitotracker Green FM を用いたミトコンドリアの免疫染色。RC TEC-LTA ではミトコンドリアが線状だが、WT 9-7 ではミトコンドリアが点状の形態を示す。(下) Image J を用いて、ミトコンドリアの伸長度合いを解析した図。RC TEC-LTA と比較して WT 9-7 ではミトコンドリアの断片化が有意に認められた。

4.7 ヒト嚢胞壁上皮細胞とヒト正常尿細管細胞でのミトコンドリア膜電位の比較

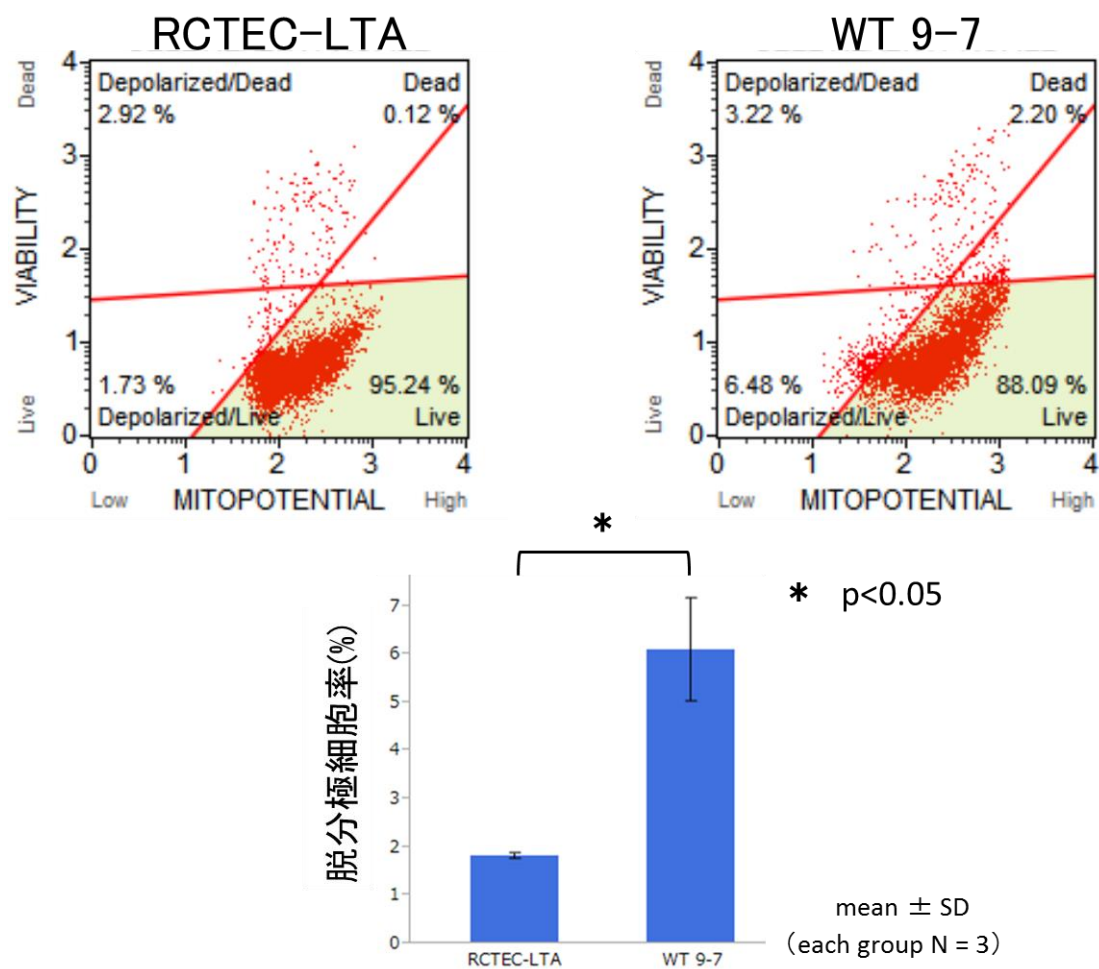
ミトコンドリア呼吸鎖による細胞のエネルギーは、ミトコンドリア膜における電気化学的勾配として蓄えられ、健全な細胞では、このエネルギーの蓄積によりミトコンドリア膜電位が生じ、ATP産生が可能となる。ミトコンドリア内膜の膜電位消失は、アポトーシスの初期に認められ、ミトコンドリア内膜の脱分極はミトコンドリア機能異常を示す所見となる(62)。そのため、嚢胞上皮細胞におけるミトコンドリア膜電位についても検討した。

この膜電位の変化をみるために、MitoPotential Kitを用いた。このKitは、ミトコンドリア膜電位依存性に染色される、陽イオン性の親油性染色物質を利用して、ミトコンドリア膜電位の変化を検出するとともに、細胞死に関しても7-ADDを用いて染色し、2色の染色物質で細胞を染め分けるものであり、ミトコンドリア膜電位が高いと、MitoPotential染色はミトコンドリア内膜に蓄積して強い蛍光を示し、脱分極しているミトコンドリアでは蛍光は弱まる。

これにより、染色したミトコンドリアを、Muse Cell Analyzerで検出したところ、脱分極した細胞の割合はRCTEC-LTAでは $1.8 \pm 0.05\%$ であったが、WT 9-7では $6.1\% \pm 1.06\%$ と、嚢胞上皮細胞では正常尿細管細胞と比較してミトコンドリア膜電位が有意に低下($p < 0.05$)していることが確認された(Fig 13)。脱分極

をきたしているミトコンドリアの割合が多いことは、ミトコンドリア機能異常を示すことから、これまでの結果同様、嚢胞上皮細胞においてミトコンドリア機能異常が存在することが示唆された。

図 13. ミトコンドリア膜電位の比較

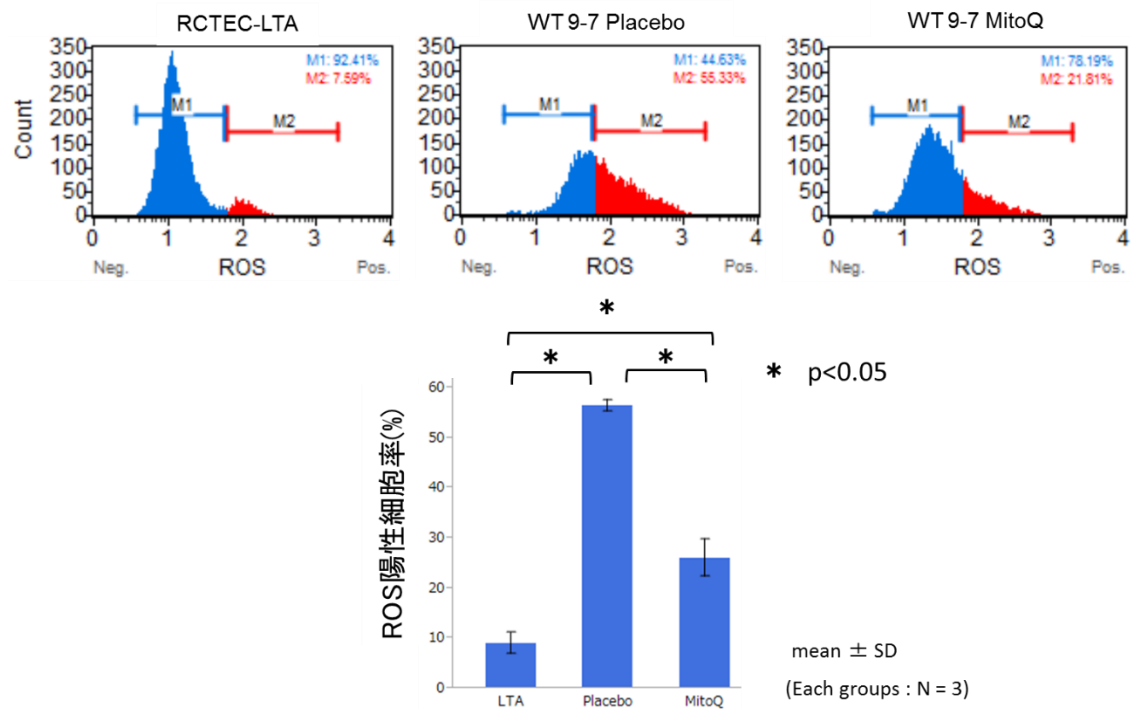


MitoPotential Kit を用いたミトコンドリア膜電位の比較。RC TEC-LTA 比較して WT 9-7 では、脱分極をきたしたミトコンドリアの割合が有意に増加していることを示す。

4.8 ミトコンドリアを標的とした抗酸化薬 MitoQ 投与によるヒト嚢胞上皮細胞の病態変化

ミトコンドリアは、主要な ROS 産生源であるだけでなく、ROS の主な標的ともなり、上述したように nDNA よりも酸化ストレスの障害を受けやすい。これまで、嚢胞上皮細胞において ROS 産生が亢進していることを示しており、過剰に産生された ROS によりミトコンドリアが障害を受け、更に ROS を産生する悪循環に入っている可能性が考えられたため、ミトコンドリアを標的とした抗酸化薬を用いて ROS 産生の変化を確認した。用いたミトコンドリアを標的とした抗酸化薬 MitoQ は、ミトコンドリアに特異的に作用し、ミトコンドリア膜の脂質過酸化を防ぐことで、ミトコンドリアを酸化ストレスから守る働きを持つ。ROS の検出については、Muse Oxidative Stress Kit を用いた細胞内スーパーオキシダの検出系を利用して行った。Placebo・MitoQ とも 100nM で投与し、ROS を検出した結果、ROS 陽性細胞はプラセボ群では $56.5 \pm 1.2\%$ 、MitoQ 投与群では $26.1 \pm 3.7\%$ と、MitoQ 投与により ROS 陽性細胞が有意に減少した。両者のグラフを比較すると、MitoQ 投与群では全体の山のピークがプラセボ群と比較して ROS 陰性側に移動していることが確認され(図 14)、MitoQ 投与により、各細胞における ROS 産生が低下していることが示された。

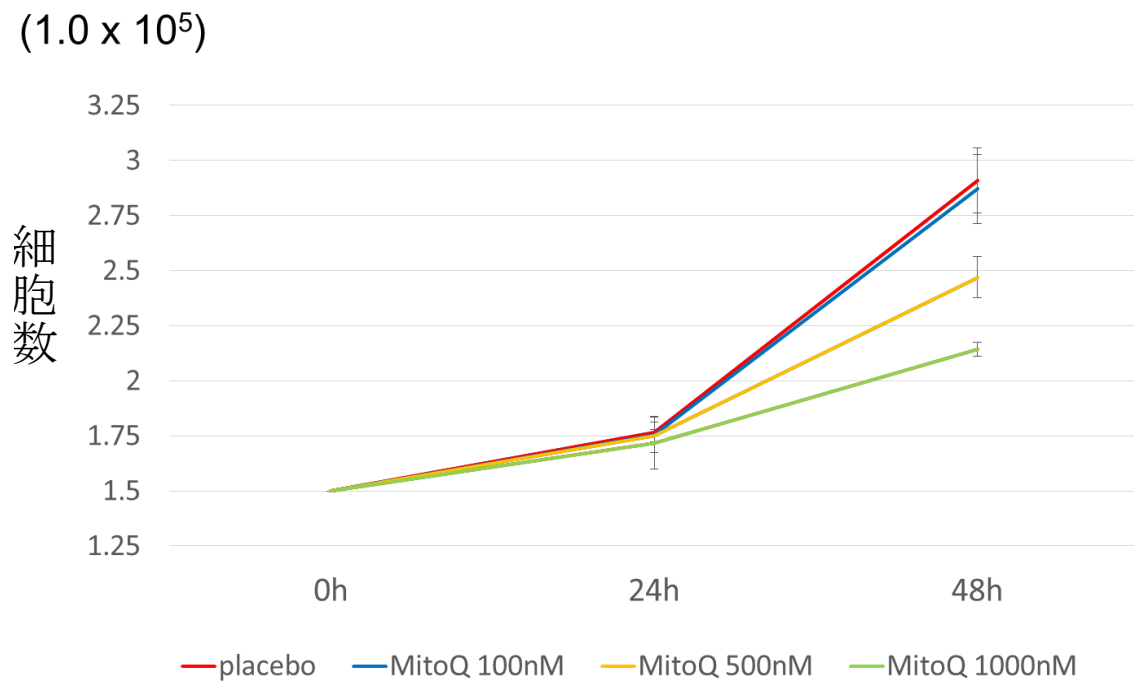
図 14. MitoQ 投与による ROS 産生への影響



WT 9-7 を Placebo 投与群（左）と MitoQ 投与群（右）における ROS 陽性細胞の割合。Placebo 投与群の図における灰色で示されている山は、MitoQ 投与群での結果であり、MitoQ 投与により全体に左へシフトし ROS 陽性細胞が減少していることを示している。

障害されたミトコンドリアは ROS 産生を増加させ、ROS は更なるミトコンドリア障害を引き起こすという悪循環が知られており、MitoQ によりこの悪循環を断つことで ROS 産生が抑制されることが、ROS 産生を低下させた機序として考えられた。次に、この ROS 産生抑制が細胞増殖に関与するかを調べる目的で、Placebo 群と MitoQ 群(100nM、200nM、500nM、1000nM)における薬剤投与後 24h と 48h で細胞数をカウントしたところ、投与後 24h の時点では有意差を認めないものの、48h 後には MitoQ の用量依存性に細胞増殖が抑制された(Fig 15)。なお、MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole) や類似の色素をホルマザン色素へ還元する酵素活性を利用した系による細胞数の評価は、ミトコンドリア内酵素であるコハク酸デヒドロゲナーゼの作用をみており、ミトコンドリアに影響を与える MitoQ の投与実験においては不適切であるため、細胞数のカウントにより細胞増殖を評価した。

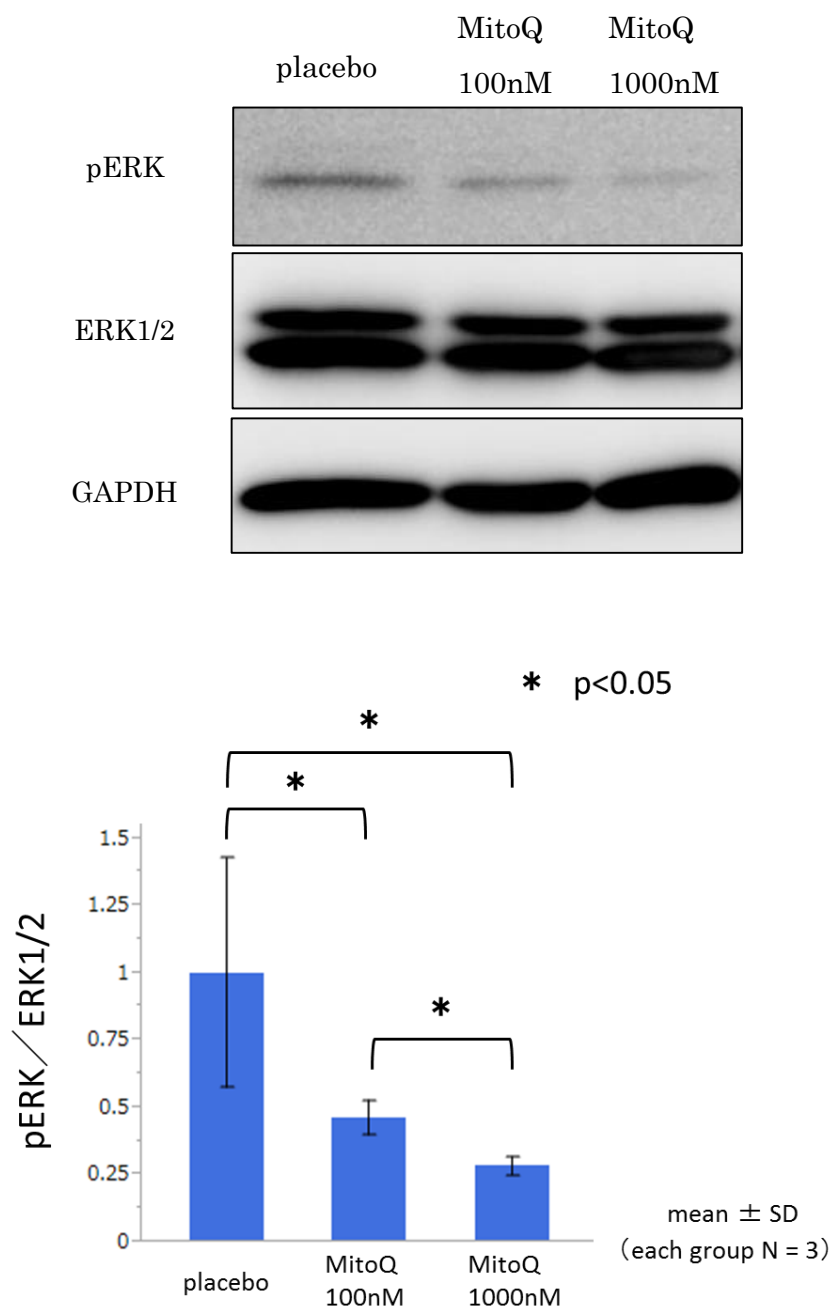
図 15. MitoQ の細胞増殖への影響



WT 9-7 を Placebo 投与群と MitoQ 投与群(濃度は 100nM、500nM、1000nM)における、薬剤投与後 24h、48h での細胞数。MitoQ 投与群では、濃度依存性に細胞増殖抑制が認められる。

癌細胞においては、ROS自体が直接的にRasを活性化し(63)、その下流のERKシグナルを増強させることが知られている(64)、mtROSの増加が細胞増殖に寄与することが報告されている(65)ため、この細胞増殖抑制が、APDKDで確認されている異常な細胞増殖シグナルを抑制したことによるものかどうかを確認する目的で、薬剤投与48h後の細胞からタンパクを抽出し、pERK発現量をWBで確認したところ、MitoQの濃度依存性にpERKの減少が認められた(図16)。

図 16. MitoQ 投与による pERK タンパク発現量の比較



WT 9-7 を Placebo 投与群と MitoQ 投与群(濃度は 100nM、1000nM)に分けて、ERK のリン酸化を WB で確認した図。MitoQ の濃度依存性に ERK のリン酸化が抑制されていることが確認される。

これらの結果は、ミトコンドリアを標的とした抗酸化薬により、ミトコンドリアの酸化障害が軽減されてmtROSの産生が低下し、ROSに伴う細胞増殖シグナルが抑制されることで細胞増殖が抑えられることを示している。

第5章 考察

ADPKDに対する新規薬剤であるバソプレッシンV₂受容体拮抗薬のトルバプタンが、ADPKD患者の総腎容積やestimated glomerular filtration rate (eGFR)の低下を抑制することが最近のTEMPO 3:4 trialで報告されたが、1年あたり1 ml/min/1.73m²の腎機能低下抑制と効果は軽度であり、また、薬剤内服に伴う水利尿や肝障害などによる副作用で23%の患者が内服継続不可能となる(66)など、ADPKDの進行抑制に効果的な治療法の開発が現在も望まれている。

今回、我々はADPKDにおけるミトコンドリア機能異常に着目して研究を行い、ADPKDモデル動物におけるmtDNAコピー数の低下・PGC-1 α の発現量低下を手掛かりに、免疫染色でミトコンドリア異常の局在が嚢胞壁上皮細胞であることを確認し、嚢胞壁上皮細胞を用いたin vitroの実験で、嚢胞上皮細胞では正常尿細管細胞と比較しミトコンドリア機能異常があることを証明した。ミトコンドリア機能障害と癌との関係は徐々に解明されてきているが、癌と類似す

る部分の多いADPKDにおけるミトコンドリア機能については、ミトコンドリア異常の存在が知られていなかったため、これは新たな知見である。

ADPKDの病態で最も重要とされるのは、嚢胞上皮細胞の異常な細胞増殖であり、細胞増殖シグナルにおいては、細胞増殖に必要な様々な過程を制御する mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK経路が知られているが(67)、この経路の最初のステップはGTPaseタンパクであるRasの活性化であり、Rasの活性化はADPKDの腎臓において確認されている。最近の癌細胞の研究で、Rasが活性化した細胞にミトコンドリアが加わると、Rasと協調して周辺の正常細胞の異常増殖を引き起こすことが報告されているが(68)、我々が今回示した結果は、ADPKDにおいても同様の病態が起きていることを示唆するものと考えられる。

今回の研究においては、*PKD1^{+/+}* となった細胞が*PKD1^{-/-}* となる前にミトコンドリア機能異常が起きているのか、*PKD1^{-/-}* 後に結果としてミトコンドリア機能異常を生じているのか、そのタイミングについては示すことができていないが、ROSはDNA障害を引き起こす主要因子であり(69)、DNAの酸化ストレス障害マーカーである8-OHdGの免疫組織染色も嚢胞壁上皮細胞において増強していることから、ミトコンドリア機能異常によるROS産生増加がDNA障害をきたし、*PKD1^{+/+}* 細胞を*PKD1^{-/-}* 細胞へ変化させている可能性も考えられる。

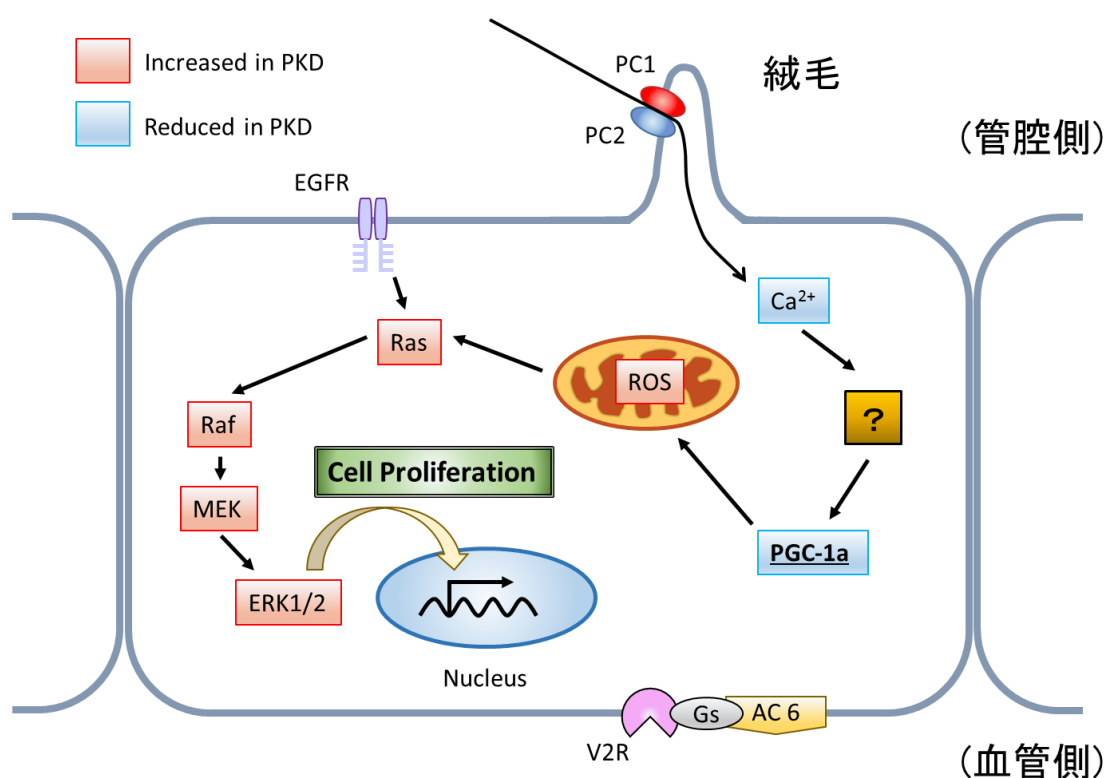
今後この時系列を証明することができれば、ADPKDの発症における2ヒット仮説の2ヒット目がミトコンドリア機能異常で説明できる可能性があり、その場合、ミトコンドリアを標的とした治療により嚢胞の発生自体を抑制することができるようになるかもしれない。

また、*PKD*⁺となった細胞が結果としてミトコンドリア機能異常を生じているのだとしても、細胞や組織におけるミトコンドリアROSの増加は細胞増殖シグナルの活性化、生理的な細胞死経路の断絶（細胞の不老化）、血管新生の亢進といった、癌の典型的な現象につながることも明らかにされており(70)、MitoQはROS産生を低下させ、ERKのリン酸化抑制を介して嚢胞上皮細胞の細胞増殖を抑えることができる可能性がある。ミトコンドリア障害によるROSの増加が嚢胞増大に寄与している可能性を示したこの結果は、*PKD1* ノックアウトマウスの腎臓に酸化ストレス障害モデルとして知られる虚血再灌流をかけることで、嚢胞増大が促進されるとした過去の報告(71)とも合致するものであり、ミトコンドリアを標的とした抗酸化薬がADPKDに有効である可能性が高いと考えられる。

本研究で用いたヒトADPKD嚢胞上皮細胞は、*PKD1* に変異がある嚢胞化をきたしている腎嚢胞から得られたものであり、2ヒット仮説に基づくと既に*PKD1*⁺となった細胞である。そのため、本研究においてヒトADPKD嚢胞上

皮細胞を用いたin vitroの実験で示した結果をまとめると、以下の図17のようになる。

図17. PKD嚢胞上皮細胞におけるミトコンドリア機能異常を介した細胞増殖シグナル経路の模式図



上記のように、PC1が機能不全により、絨毛を介したCa²⁺の流入が低下し、細胞内Ca²⁺低下がPGC-1α発現量減少に寄与し、その下流のミトコンドリア生合成が低下することで、ミトコンドリア機能異常を生じやすくなり、それに伴うROS産生増加が細胞増殖に寄与するというものである。Ca²⁺が直接的にPGC-1αをup-regulateするとした過去の報告はなく、何らかを介してPGC-1α発現量

減少させていることが予想される。PGC-1 α をup-regulateする分子として、一酸化窒素合成酵素、グアニル酸シクラーゼ、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ、カルシニューリン、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、環状クアノシンーリン酸が知られており(72)、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼとカルシニューリンに関しては、細胞内Ca²⁺濃度により活性化されることから、これらの分子の活性低下によりPGC-1 α 発現量が減少していることが予想される。今後、この経路についても追加で検証をしていく予定である。

今回の研究の限界としては、薬剤投与実験がin vitroのみであることが挙げられる。こちらについても、現在ADPKDモデル動物に対するMitoQ投与実験を行っているところであり、in vivoにおいて同様の効果が得られるかどうか今後検討していく予定である。また、ADPKDモデル動物の正常尿細管と嚢胞上皮細胞のミトコンドリアの形態比較についても、電子顕微鏡による評価を追加していく予定である。

第6章 結語

本研究において、ADPKDの嚢胞上皮細胞においてミトコンドリア機能低下が起きていることを示し、ADPKDの病態形成におけるミトコンドリア異常の関与を初めて証明した。更には、ミトコンドリアを標的とした治療により、嚢胞発生・増大を抑制することができる可能性も示唆された。ミトコンドリアを標的とした治療薬は、急性腎障害の領域において治験が行われるなど、腎疾患の新たな治療戦略として今後期待されており、今回使用したミトコンドリア標的薬のMitoQは、抗加齢効果を期待したサプリメントとして海外では市販され、既にヒトにおいて安全性が確立されていることから、動物実験で嚢胞の発生・増大抑制効果を示すことができれば、すぐに臨床試験を行うことが可能であるものと思われる。

第 7 章 引用文献

1. Harris PC. Molecular basis of polycystic kidney disease: PKD1, PKD2 and PKHD1. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11(3):309-14.
2. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int*. 2009;76(2):149-68.
3. Badani KK, Hemal AK, Menon M. Autosomal dominant polycystic kidney disease and pain - a review of the disease from aetiology, evaluation, past surgical treatment options to current practice. *J Postgrad Med*. 2004;50(3):222-6.
4. Torra R. Autosomal dominant polycystic kidney disease, more than a renal disease. *Minerva Endocrinol*. 2014;39(2):79-87.
5. Nakai S, Hanafusa N, Masakane I, Taniguchi M, Hamano T, Shoji T, et al. An overview of regular dialysis treatment in Japan (as of 31 December 2012). *Ther Apher Dial*. 2014;18(6):535-602.
6. Saran R, Li Y, Robinson B, Ayanian J, Balkrishnan R, Bragg-Gresham J, et al. US Renal Data System 2014 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2015;66(1 Suppl 1):Svii, S1-305.
7. Hateboer N, v Dijk MA, Bogdanova N, Coto E, Saggart-Malik AK, San Millan JL, et al. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet*. 1999;353(9147):103-7.
8. Chang MY, Ong AC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: recent advances in pathogenesis and treatment. *Nephron Physiol*. 2008;108(1):p1-7.
9. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*. 2007;369(9569):1287-301.
10. Baert L. Hereditary polycystic kidney disease (adult form): a microdissection study of two cases at an early stage of the disease. *Kidney Int*. 1978;13(6):519-25.
11. Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell*. 1996;87(6):979-87.
12. Grantham JJ, Cook LT, Torres VE, Bost JE, Chapman AB, Harris PC, et al. Determinants of renal volume in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2008;73(1):108-16.
13. Brasier JL, Henske EP. Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J Clin Invest*. 1997;99(2):194-9.

14. Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(10):556-66.
15. Grantham JJ, Torres VE, Chapman AB, Guay-Woodford LM, Bae KT, King BF, et al. Volume progression in polycystic kidney disease. *N Engl J Med.* 2006;354(20):2122-30.
16. Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature.* 2010;467(7318):929-34.
17. Wallace DC. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:781-821.
18. Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:297-348.
19. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(11):1295-322.
20. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 1997;11(2):118-24.
21. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(4):775-94.
22. Pedersen PL. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res.* 1978;22:190-274.
23. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(17):6465-7.
24. Allen JA, Coombs MM. Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. *Nature.* 1980;287(5779):244-5.
25. Backer JM, Weinstein IB. Mitochondrial DNA is a major cellular target for a dihydrodiol-epoxide derivative of benzo[a]pyrene. *Science.* 1980;209(4453):297-9.
26. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene.* 2006;25(34):4647-62.
27. Chinnery PF, Samuels DC, Elson J, Turnbull DM. Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? *Lancet.* 2002;360(9342):1323-5.
28. Copeland WC, Wachsman JT, Johnson FM, Penta JS. Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest.* 2002;20(4):557-69.
29. Gasparre G, Hervouet E, de Laplanche E, Demont J, Pennisi LF, Colombel M, et al. Clonal expansion of mutated mitochondrial DNA is associated with tumor

formation and complex I deficiency in the benign renal oncocytoma. *Hum Mol Genet.* 2008;17(7):986-95.

30. Bartoletti-Stella A, Salfi NC, Ceccarelli C, Attimonelli M, Romeo G, Gasparre G. Mitochondrial DNA mutations in oncocyctic adnexal lacrimal glands of the conjunctiva. *Arch Ophthalmol.* 2011;129(5):664-6.

31. Pereira L, Soares P, Máximo V, Samuels DC. Somatic mitochondrial DNA mutations in cancer escape purifying selection and high pathogenicity mutations lead to the oncocyctic phenotype: pathogenicity analysis of reported somatic mtDNA mutations in tumors. *BMC Cancer.* 2012;12:53.

32. Clayton DA, Vinograd J. Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes. *Nature.* 1967;216(5116):652-7.

33. Clayton DA, Vinograd J. Complex mitochondrial DNA in leukemic and normal human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969;62(4):1077-84.

34. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science.* 2008;320(5876):661-4.

35. Canter JA, Kallianpur AR, Parl FF, Millikan RC. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. *Cancer Res.* 2005;65(17):8028-33.

36. Liu VW, Wang Y, Yang HJ, Tsang PC, Ng TY, Wong LC, et al. Mitochondrial DNA variant 16189T>C is associated with susceptibility to endometrial cancer. *Hum Mutat.* 2003;22(2):173-4.

37. Permuth-Wey J, Chen YA, Tsai YY, Chen Z, Qu X, Lancaster JM, et al. Inherited variants in mitochondrial biogenesis genes may influence epithelial ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(6):1131-45.

38. Zhai K, Chang L, Zhang Q, Liu B, Wu Y. Mitochondrial C150T polymorphism increases the risk of cervical cancer and HPV infection. *Mitochondrion.* 2011;11(4):559-63.

39. Liu Y, Dai B, Mei C, Zhang Y, Xiong X, Sandford R. Identification of phosphoproteins in kidney tissues from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Proteomics Clin Appl.* 2008;2(7-8):1153-66.

40. Seeger-Nukpezah T, Geynisman DM, Nikonova AS, Benzing T, Golemis EA. The hallmarks of cancer: relevance to the pathogenesis of polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(9):515-34.

41. Loghman-Adham M, Nauli SM, Soto CE, Kariuki B, Zhou J. Immortalized epithelial cells from human autosomal dominant polycystic kidney cysts. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(3):F397-412.
42. Miller FJ, Rosenfeldt FL, Zhang C, Linnane AW, Nagley P. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(11):e61.
43. Edwards JL, Quattrini A, Lentz SI, Figueroa-Romero C, Cerri F, Backus C, et al. Diabetes regulates mitochondrial biogenesis and fission in mouse neurons. *Diabetologia*. 2010;53(1):160-9.
44. Rooney JP, Ryde IT, Sanders LH, Howlett EH, Colton MD, Germ KE, et al. PCR based determination of mitochondrial DNA copy number in multiple species. *Methods Mol Biol*. 2015;1241:23-38.
45. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4127-35.
46. Burbulla LF, Krüger R. The use of primary human fibroblasts for monitoring mitochondrial phenotypes in the field of Parkinson's disease. *J Vis Exp*. 2012(68).
47. Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem*. 2001;276(7):4588-96.
48. Cho YM, Park KS, Lee HK. Genetic factors related to mitochondrial function and risk of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77 Suppl 1:S172-7.
49. Venegas V, Halberg MC. Measurement of mitochondrial DNA copy number. *Methods Mol Biol*. 2012;837:327-35.
50. Brown JH, Bihoreau MT, Hoffmann S, Kränzlin B, Tychinskaya I, Obermüller N, et al. Missense mutation in sterile alpha motif of novel protein SamCystin is associated with polycystic kidney disease in (cy/+) rat. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(12):3517-26.
51. Gretz N, Kränzlin B, Pey R, Schieren G, Bach J, Obermüller N, et al. Rat models of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11 Suppl 6:46-51.
52. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*. 2006;30(4):145-51.

53. Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med* (Maywood). 2013;238(5):450-60.
54. Dai DF, Rabinovitch PS, Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ Res*. 2012;110(8):1109-24.
55. Quintero M, Colombo SL, Godfrey A, Moncada S. Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(14):5379-84.
56. Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA. Mitochondria and endothelial function. *Circ Res*. 2013;112(8):1171-88.
57. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
58. Dromparis P, Michelakis ED. Mitochondria in vascular health and disease. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:95-126.
59. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell*. 2010;141(2):280-9.
60. Baumann K. Organelle dynamics: Fusing for stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(6):391.
61. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):870-9.
62. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(1):67-71.
63. Abe J, Okuda M, Huang Q, Yoshizumi M, Berk BC. Reactive oxygen species activate p90 ribosomal S6 kinase via Fyn and Ras. *J Biol Chem*. 2000;275(3):1739-48.
64. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, et al. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest*. 1997;100(7):1813-21.
65. Hu Y, Lu W, Chen G, Wang P, Chen Z, Zhou Y, et al. K-ras(G12V) transformation leads to mitochondrial dysfunction and a metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Cell Res*. 2012;22(2):399-412.
66. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, et al. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 2012;367(25):2407-18.

67. Nagao S, Yamaguchi T, Kusaka M, Maser RL, Takahashi H, Cowley BD, et al. Renal activation of extracellular signal-regulated kinase in rats with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2003;63(2):427-37.
68. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T. Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila*. *Nature.* 2012;490(7421):547-51.
69. Rossman TG, Goncharova EI. Spontaneous mutagenesis in mammalian cells is caused mainly by oxidative events and can be blocked by antioxidants and metallothionein. *Mutat Res.* 1998;402(1-2):103-10.
70. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer.* 2014;14(11):709-21.
71. Takakura A, Contrino L, Zhou X, Bonventre JV, Sun Y, Humphreys BD, et al. Renal injury is a third hit promoting rapid development of adult polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet.* 2009;18(14):2523-31.
72. Rasbach KA, Schnellmann RG. Signaling of mitochondrial biogenesis following oxidant injury. *J Biol Chem.* 2007;282(4):2355-62.

謝辞

本研究を実施するにあたり、その機会と多大なご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科腎臓内科学内分泌病態学の南学正臣教授に深く感謝致します。本研究の立案、遂行にあたり、実験指導および実験方針に対する助言をいただきました東京大学大学院医学系研究科慢性腎臓病病態生理学の稲城玲子特任准教授に心よりお礼を申し上げます。また、ADPKD モデル動物のサンプルを提供していただくと共に、貴重なご意見を賜りました藤田保健衛生大学疾患モデル教育研究センター長尾静子教授に深く感謝いたします。ヒト ADPKD 嚢胞上皮細胞と正常尿細管細胞を提供していただいたハーバード大学の Jing Zhou 教授、ならびに MitoQ を提供していただいたケンブリッジ大学 MRC Mitochondrial Biology Unit の Mike Murphy プログラムリーダーにも感謝申し上げます。