

学 位 論 文 題 名

常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎における
Wnt/ β -catenin 経路に関する検討

学位論文内容の要旨

常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎 (Autosomal dominant polycystic kidney disease, 以下 ADPKD) は, 遺伝性腎疾患の中で最も頻度が高く, 腎臓, 肝臓を中心に多発性の嚢胞を形成し 70 才までにその半数が末期腎不全に至る予後不良な疾患である。

原因遺伝子として第 16 番染色体に座位する PKD1 遺伝子と, 第 4 番染色体に座位する PKD2 遺伝子が同定されている。その遺伝学的発症機序として, 癌抑制遺伝子と同様の体細胞変異によるツーヒット説が提唱されており, PKD 遺伝子の機能喪失により嚢胞が形成されてくると考えられている。ヒト PKD1 遺伝子の遺伝子産物であるポリシスチン 1 は, 分子量約 440 kd の巨大な膜蛋白で, 尿細管細胞の管腔側の線毛 cilia に存在し尿流を感知するセンサーとして働き, また PKD2 遺伝子の遺伝子産物であるポリシスチン 2 は, カルシウムイオンチャネルとして働くと考えられ, 両分子が共同して何らかの細胞内シグナル伝達経路に関わっていると考えられている。

ADPKD では, 嚢胞壁上皮で細胞増殖マーカー (PCNA) の発現が増加し, また全長ヒト PKD1 cDNA 強発現細胞では細胞増殖の遅延が報告されるなど, 嚢胞形成に尿細管上皮細胞の細胞増殖が関与していることが言われている。その詳細な機序については明らかでないが, 中でも Wnt/ β -catenin 経路が注目されており, これまでにもいくつかの報告がある。Wnt/ β -catenin 経路は, 発生過程での形態形成に関わるほか, 成体においても細胞の増殖, 分化の制御に重要な経路として知られ, 細胞内 β -catenin 量が同経路の活性化を制御している。通常の状態では, 細胞内 β -catenin は GSK-3 β , CKI α の二つのキナーゼによるリン酸化を受けたあと分解されるため, その量は低く保たれている。しかし細胞内のリン酸化を受けない安定型 β -catenin 量が増加すると, 核内に移行し, 転写因子 TCF (T cell factor) / LEF (lymphoid enhance protein) と結合し, 細胞増殖に関連する cyclin D1, c-myc などを含む Wnt 標的遺伝子の発現が亢進し, Wnt/ β -catenin 経路が活性化される。これまで, 胎児腎細胞に PKD1 cDNA C 末端を遺伝子導入すると同経路が活性化されたとの報告や c-myc ならびに β -catenin トランスジェニックマウスで腎嚢胞が形成されたとの報告がある。pkd1 遺伝子ノックアウトマウスの胎児腎臓では β -catenin の発現が低下していたが, cilia 形成に不可欠な分子である kif3A のコンディショナルノックアウトマウスでは ADPKD 類似の腎腫大と多発性嚢胞が形成され, 嚢胞上皮細胞では細胞質, 核内の両方での β -catenin の発現増強と c-Myc の発現増強が認められた。このように, 嚢胞形成への Wnt/ β -catenin 経路の関与は示唆されているが, 同経路の活性化に関しては相反する結果もあり, さらなる検討が必要であると考える。

そこで本研究では, pkd1 遺伝子の発現が確認されたイヌ正常尿細管上皮細胞を用いて

(1) pkd1 cDNA 強発現細胞 (2) siRNA library 導入による pkd1 遺伝子ノックダウン細胞, (3) pkd1 cDNA 欠失変異体導入細胞の3種類の細胞を作成し, これらの細胞における細胞増殖能, ならびにその機序として Wnt/ β -catenin 経路につき分子生物学的な解析を試みた.

pkd1 cDNA 強発現細胞は, 全長マウス pkd1 cDNA を導入したイヌ正常尿細管細胞安定株を用いた. 以前の報告と同様に, pkd1 cDNA 強発現細胞では細胞増殖が遅延していた. siRNA library 導入による pkd1 遺伝子ノックダウン細胞, pkd1 cDNA 欠失変異体導入細胞では, とともに細胞増殖が亢進しており, これより pkd1 遺伝子の細胞増殖に対する直接的な関与が明らかとなった.

次に, pkd1 遺伝子ノックダウン細胞, pkd1 cDNA 欠失変異体導入細胞で見られた細胞増殖の亢進について Wnt/ β -catenin 経路との関連を検討した. Wnt/ β -catenin 経路の活性化を制御している細胞内 β -catenin の発現量をコントロール細胞と比較したところ, 両細胞ともに細胞質, 核分画内の β -catenin の発現は増加していた. pkd1 遺伝子ノックダウン細胞, pkd1 cDNA 欠失変異体導入細胞における細胞増殖の亢進に Wnt/ β -catenin 経路の活性化が関与している可能性が示唆された.

細胞内 β -catenin の増加の機序を解明するため, β -catenin のリン酸化につき2種類の抗リン酸化 β -catenin 抗体を用いて検討した. 全 β -catenin の発現量に対するリン酸化 (T41/S45) β -catenin の発現はコントロールに比較し減少しており, 細胞内 β -catenin の増加の一因として, β -catenin のリン酸化減少による分解遅延が考えられた.

しかし, GSK-3 β によってのみリン酸化されるリン酸化 (T41/S37/S33) β -catenin の発現には差を認めず, また GSK-3 β の活性化を抗リン酸化 GSK-3 β 抗体により検討したが, コントロールとの間に差を認めなかった. 以上より細胞内 β -catenin の増加の一因として, β -catenin のリン酸化減少による分解遅延が考えられたが, そのリン酸化の減少は GSK-3 β の活性低下によるものでなく, CKI α の活性低下によるものと考えられた.

さらに, β -catenin は接着因子としてポリシスチン1と複合体を形成し細胞膜にも局在することから, pkd1 遺伝子ノックダウンによる細胞膜での β -catenin の発現の変化についても検討を加えた. 抗 β -catenin 抗体による細胞染色で, pkd1 遺伝子ノックダウンにより細胞形態の変化, β -catenin の細胞膜での発現の減弱, 細胞質内での発現の増強を認めたことから, pkd1 遺伝子ノックダウンによる, β -catenin の膜からの遊離も細胞内 β -catenin の増加の一因として考えられた.

本研究により, ADPKD における嚢胞上皮細胞の細胞増殖の亢進には pkd1 遺伝子の機能喪失が直接的に関連していることが明らかとなった. その機序として細胞内 β -catenin の発現が増加しており, Wnt/ β -catenin 経路の活性化が関与している可能性が示唆された. Wnt/ β -catenin 経路の活性化は, これまでの報告と異なり GSK-3 β の活性低下によるものではなく, CKI α による β -catenin のリン酸化減少による分解遅延と接着因子として細胞膜に存在する β -catenin の遊離によるものと考えられた.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 野々村 克也

学 位 論 文 題 名

常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎における Wnt/ β -catenin 経路に関する検討

常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎(Autosomal dominant polycystic kidney disease, 以下ADPKD)は遺伝性腎疾患の中で最も多く、両腎に多発性嚢胞を形成しほとんどが末期腎不全に至る予後不良な疾患である。

原因遺伝子としてPKD1 遺伝子, PKD2 遺伝子が同定され, PKD1 遺伝子産物のポリシスチン1は尿流を感知するセンサーとして, PKD2 遺伝子産物のポリシスチン2はカルシウムチャネルとして両分子は複合体を形成し何らかの細胞内シグナル伝達に関与しているとされる。中でもWnt/ β -catenin 経路はその主要分子 β -cateninが細胞膜でポリシスチンと結合していることから注目されているが, 活性化については一定の見解が得られていない。またADPKDでは嚢胞上皮細胞の増殖亢進が見られ, 病態形成に重要であるとされる。すなわちADPKDでは, pkd 遺伝子変異による何らかのシグナル伝達の異常を介した, 尿細管上皮細胞の増殖亢進から嚢胞が形成されると考えられているが詳細は不明である。

そこで本研究では, ADPKDの嚢胞上皮細胞の増殖亢進とWnt/ β -catenin 経路活性化について(1)マウスpkd1cDNA 強発現細胞(以下強発現細胞)(2)pkd1 遺伝子ノックダウン細胞(以下ノックダウン細胞)(3)pkd1cDNA 部分欠失変異体導入細胞(以下変異体導入細胞)を作成し解析を行った。

細胞増殖の検討では, 強発現細胞では増殖が遅延し, ノックダウン細胞, 変異体導入細胞ではともに増殖が亢進していた。

ノックダウン細胞, 変異体導入細胞において, Wnt/ β -catenin 経路の活性化をリン酸化を受けていない安定型 β -cateninの発現で検討したところ, 両細胞ともに細胞質, 核分画内で発現は増加し, 同経路は活性化していた。

安定型 β -catenin 増加について, その分解過程に見られるリン酸化 β -cateninの発現を検討したところ, 両細胞ともにリン酸化(T41/S45) β -catenin発現は減少しリン酸化減少による分解遅延が一因として考えられた。 β -cateninのリン酸化はGSK-3 β , CK1- α の二つのキナーゼに依存しているが, GSK-3 β によるリン酸化(T41/S37/S33) β -catenin, および活性型GSK-3 β の発現に差を認めず, そのリン酸化の減少はCK1 α の活性低下によると考えられた。

さらに, 接着因子として細胞膜に局在する β -cateninを細胞染色により検討したところ, pkd1 遺伝子ノックダウンにより, 細胞形態の変化とともに膜での β -cateninの発現減弱と細胞質内での発現増強を認めた。

以上、ノックダウン細胞と変異体導入細胞は同様の結果を示し、変異体導入細胞はドミナントネガティブ効果により pkd 遺伝子の機能を喪失した細胞と考えられた。よって両細胞で見られた病態は、ADPKD での pkd 遺伝子の機能を喪失した尿細管上皮細胞においても同様であると考えられた。

本研究では、ADPKD における嚢胞上皮細胞の増殖亢進には、Wnt/ β -catenin 経路の活性化が関与している可能性を示し、その活性化は CKI α による β -catenin のリン酸化減少による分解遅延と、細胞膜からの遊離による可能性を示した。

質疑応答においては、副査吉木教授から 1)イヌ尿細管上皮細胞を用いた理由 2)コラーゲンゲルを用いた三次元培養での検討の有無 3)siRNA の導入効率が低い理由 4)ADPKD 発症における体細胞変異の誘因 5)体細胞変異を回避し発症を抑制する研究について、の質問があった。次いで副査野々村教授から 1)本研究結果より治療への応用の可能性 2)マウスモデルでの検討について、の質問があった。次いで主査小池教授から 1) β -catenin 細胞膜接着の詳細 2) β -catenin 細胞膜接着の強固による治療の可能性 3) β -catenin のリン酸化促進薬の有無 4)今後の展望について、の質問があった。

いずれの質問に対しても概ね適切に回答し学位公開発表を終了した。

本論文による検討から、ADPKD における嚢胞形成機序の一部が解明され、治療への応用が期待される。審査委員一同は、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。