

## pkd1 ノックアウトキメラマウスを用いた

### 嚢胞形成機序の検討

— pkd1 ノックアウトキメラマウスの解析 —

### 学位論文内容の要旨

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高く (約 1000 人に 1 人), 加齢とともに嚢胞が両腎に増加し, 進行性に腎機能が低下し, 70 才までに約半数が腎不全に陥る疾患であり, また高血圧, 脳動脈瘤などさまざまな腎外症状をきたす全身疾患である. 遺伝的多様性があり, 第 16 染色体短腕 (16p13.3) に存在する PKD1 遺伝子 (以下 PKD1) と第 4 染色体長腕 (4q13-23) に存在する PKD2 遺伝子が責任遺伝子として同定されている. ADPKD の発症機序として体細胞変異によるツーヒット説が提唱されている. すなわち, 常染色体優性遺伝性疾患のため生殖細胞から一対の PKD 遺伝子の異常が存在するが, さらに正常であるはずのもう一対の PKD 遺伝子に体細胞変異が起こり (ツーヒット), そのツーヒットを起こした尿細管上皮細胞が徐々にモノクローナルに増殖し, そのため尿細管が拡張し, それが最終的に嚢胞形成に至るといふ仮説である.

これまでいくつかの pkd1 ノックアウトマウスの報告があり, pkd1 ヘテロマウスでは異常所見がなく, pkd1 ノックアウトマウスで腎嚢胞ができることもツーヒット説を支持している. しかし, pkd1 ノックアウトマウスは心奇形のために胎生致死であり, 嚢胞形成機序の解明には至っていない.

本研究では, よりヒト ADPKD に近い動物モデルとして pkd1 ノックアウトの ES 細胞と正常マウス由来の 8 細胞期胚を用いた集合キメラ (pkd1 ノックアウトキメラ) マウスを作製し, 嚢胞形成機序の解析を行った.

初めに pkd1 遺伝子のエクソン 2 の Bgl II 制限酵素部位に GFP 遺伝子をノックインし, エクソン 6 までをネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを作製した. このターゲティングベクターを遺伝子導入した ES 細胞と C57BL/6J より得た 8 細胞期胚を用いてアグリゲーション法にてキメラマウスを獲た後, C57BL/6J と交配することで pkd1 ヘテロマウスを得た. この pkd1 ヘテロマウス同士を交配して pkd1 ノックアウトマウスを作製した.

pkd1 ヘテロマウスは特に異常を認めなかった. pkd1 ノックアウトマウスでは胎生期に著明な浮腫を認めて全て胎生致死であった. 胎生期 14.5 日 (以下 E14.5) までは腎嚢胞は認めず, E15.5 より腎嚢胞が観察された. ノックアウトマウスの腎臓は対照群 (以下 WT) に比較して大きく, 無数の嚢胞を認めた.

これまでの報告通り *pkd1* ノックアウトマウスは胎生致死であり、腎嚢胞形成における詳細な解析が困難であったため、よりヒト ADPKD に近い疾患モデルマウスを作る目的で *pkd1* ノックアウトキメラマウスを作製した。

*pkd1* ノックアウトマウス作製に使用したターゲティングベクターのネオマイシン耐性遺伝子の部分をハイグロマイシン耐性遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを作製した。*pkd1* ヘテロノックアウトの ES 細胞に、上記のごとく作製したターゲティングベクターを遺伝子導入し *pkd1* ノックアウトの ES 細胞を得た。この *pkd1* ノックアウトの ES 細胞を C57BL/6J より得た 8 細胞期胚を用いて集合キメラ (*pkd1* ノックアウトキメラ) マウスを作製した。

*pkd1* ノックアウトキメラマウスでは、*pkd1* ノックアウトマウスと同様に E15.5 より腎嚢胞を認めた。キメラ率の高いマウスは浮腫が著明であり胎生致死であったが、キメラ率の低いマウスは最長で 6 ヶ月以上生存することができた。62 匹のキメラマウスのうち 22 匹は胎生期に、40 匹は生後に解析した。

WT と比較すると、*pkd1* ノックアウトキメラマウスの腎臓は大きく多数の嚢胞を認めた。しかし、*pkd1* ノックアウトマウスの腎臓と違い多くの正常実質が残存していた。このことから *pkd1* ノックアウトキメラマウスは、*pkd1* ノックアウトマウスと比較してヒト ADPKD の腎臓により近いモデルマウスと考えられた。

病理組織像では、キメラ率が低いマウスの腎臓は嚢胞が少なく、正常実質が多く残っているが、キメラ率が高いマウスは大小多数の嚢胞を認め、正常実質はほとんど残っていない状態であった。嚢胞周囲ではほとんど線維化はなく、正常組織がそのまま残存していたが、一部の間質で線維化が著明であった。嚢胞壁は単層であるが、一部微小ポリープ様の過形成を起こしている嚢胞上皮細胞を認めた。

*pkd1* ノックアウトキメラマウスの腎臓の標本において GFP の発現を蛍光顕微鏡にて解析した。*pkd1* ノックアウトキメラマウスの腎臓の大部分の嚢胞では GFP 陽性であったが、GFP 陰性の細胞を含む嚢胞も認めた。さらに嚢胞の尿細管上皮細胞を詳細に観察すると、一つの尿細管においても GFP 陽性細胞と陰性細胞が混在していた。GFP に対する抗体を用いて免疫組織染色を施行した結果、緑色に光っている尿細管と抗 GFP 抗体で陽性となった尿細管は一致しており、GFP が特異的であることを確認した。

GFP 遺伝子を *pkd1* 遺伝子のエクソン 2 にノックインさせているため、*pkd1* 遺伝子の発現する細胞で GFP 陽性となる。そのため、GFP の発現を解析することにより *pkd1* ノックアウトキメラマウスの尿細管細胞の由来を同定することが可能である。嚢胞を形成しているほとんどの尿細管上皮で GFP 陽性であったが、GFP 陰性細胞を含む嚢胞も認められ、正常尿細管上皮も嚢胞形成に関わっている可能性が示唆された。さらに GFP 陽性細胞でも嚢胞が形成されない尿細管を認めることから、嚢胞形成が開始されるためには、*pkd1* 遺伝子の欠損とともに何らかのトリガーが必要であると考えられた。

今後さらなる詳細な嚢胞形成機序の解明に向けて研究を進めていくうえで、ADPKD 患者の腎臓と非常に似た病理像ならびに経過をとる *pkd1* ノックアウトキメラマウスは非常に有用なモデルマウスとなりうると考えられた。

# 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

## pkd1 ノックアウトキメラマウスを用いた 嚢胞形成機序の検討

－ pkd1 ノックアウトキメラマウスの解析－

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高く、加齢とともに嚢胞が両腎に増加し、進行性に腎機能が低下し、70 才までに約半数が腎不全に陥る疾患であり、また高血圧、脳動脈瘤などさまざまな腎外症状をきたす全身疾患である。現在、嚢胞形成の機序としてツーヒット説が言われている。常染色体優性遺伝性疾患におけるツーヒットとは、まず生殖細胞に置いて一対の PKD 遺伝子の異常が存在し、次に体細胞 (嚢胞上皮となる尿細管上皮細胞) において、正常であるはずのもう一対の PKD 遺伝子に体細胞変異が起こるというものである。すなわち、ツーヒットを起こした尿細管上皮細胞が徐々にモノクローナルに増殖し、そのために嚢胞形成に至るといふ仮説が立てられている。これまでいくつかの pkd1 ノックアウトマウスの報告があり、pkd1 ヘテロマウスでは以上所見がなく、pkd1 ノックアウトマウスで腎嚢胞ができることからツーヒット説は有力とされている。しかし、pkd1 ノックアウトマウスは胎生致死のため嚢胞形成の機序の解明には至っていない。

本研究では、よりヒト ADPKD に近い動物モデルとして pkd1 ノックアウト ES 細胞と正常マウス由来の 8 細胞期胚を用いた集合キメラ (pkd1 ノックアウトキメラ) マウスを作製し、嚢胞形成の機序の解析を行った。

pkd1 ノックアウトキメラマウスは E15.5 より腎嚢胞を認めた。キメラ率の高いマウスは浮腫が著明で胎生致死であったが、キメラ率の低いマウスは最長で 6 ヶ月以上生存することができた。マウスの毛色からキメラ率を判断すると毛色が判断できるようになる生後 7 日以降まで生存したマウスは全例がキメラ率 30%以下と推定された。生後早期に死亡したマウスは腎臓が非常に大きくなり腸管を圧迫して腹部が膨満し、四肢がやせ細り、最終的には栄養障害で死亡するという経過をとった。

生後 8 日目の pkd1 ノックアウトキメラマウスにおいて、キメラ率が低いマウ

スの腎臓は嚢胞が少なく、正常実質が多く残っているが、キメラ率の高いマウスは大小多数の嚢胞を認め、正常実質はほとんど残っていない状態であった。病理組織像では嚢胞周囲ではほとんど線維化はなく、正常組織がそのまま残存していたが、一部の間質で線維化が著明であった。嚢胞壁は単層であるが、一部微小ポリープ様の過形成を起こしている嚢胞上皮細胞を認めた。

pkd1 ノックアウトキメラマウスにおける GFP の発現解析に置いては GFP 遺伝子を pkd1 遺伝子のエクソン 2 にノックインさせているため、pkd1 遺伝子の発現する細胞で GFP が陽性となる。そのため、GFP の発現を解析することにより pkd1 ノックアウトキメラマウスの尿細管細胞の由来を同定することが可能である。嚢胞を形成しているほとんどの尿細管上皮細胞で GFP 陽性であったが、GFP 陰性細胞を含む嚢胞も認められ、正常尿細管上皮も嚢胞形成に関わっている可能性が示唆された。また、一つの尿細管においても GFP 陽性細胞と陰性細胞が混在していることから、一つの尿細管は、少なくとも二つ以上の尿細管前駆細胞からなることも示唆された。さらに GFP 陽性細胞でも嚢胞が形成されない尿細管を認めることから、嚢胞形成が開始されるためには pkd1 遺伝子の欠損とともに何らかのトリガーが必要であると考えられた。

以上から本論文において、pkd1 ノックアウトキメラマウスの腎臓はヒト ADPKD 患者に非常に似た経過をとり ADPKD の動物モデルとして非常に有用であること、このマウスを解析することで新たな嚢胞形成の機序を解明したことを示した。

質疑応答においては、副査吉木教授から、1) 腎臓以外に嚢胞は形成されたか、2) なぜ正常細胞も嚢胞を形成しうるか、3) セカンドヒットの他のトリガーとは何が考えられるのか、についての質問があった。

次いで副査野々村教授から、1) 肝臓、膵臓での嚢胞を形成する細胞は何か、2) 今回できた肝臓、膵臓の嚢胞では GFP が陽性であったか、3) 脳動脈流の形成と嚢胞の形成は何か関係があるのか、についての質問があった。

次いで主査小池教授から、1) キメラマウスでは個々でキメラ率が違うがこれを克服する方法はあるか、2) 今後何を解析していくか、3) 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、申請者は概ね適切に回答した。

本論文における検討から、今後は嚢胞形成機序の更なる解明が期待される。今後 ADPKD の嚢胞形成機序、病態を解明する上で、本動物は有用なモデル動物であると考えられた。

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。