

論文の内容の要旨

氏名：馬 場 晴志郎

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：多発性嚢胞腎への遺伝子転写制御薬としての GSK3 β に対するピロール・イミダゾールポリミアドの開発

多発性嚢胞腎は、最も多い遺伝性嚢胞性疾患であるが、嚢胞の形成および拡大を完全に停止させるような有効な治療法は確立されていない。最近、常染色体優性多発性嚢胞腎（Autosomal dominant polycystic kidney disease: ADPKD）における cAMP 依存性の嚢胞形成、拡大には glycogen synthase kinase 3 β （GSK3 β ）が関与しており、その過程において cAMP response element binding protein（CREB） \rightarrow GSK3 β \rightarrow Adenyl cyclase \rightarrow cAMP \rightarrow Protein Kinase A \rightarrow CREB という悪循環が存在していることが明らかとなり、GSK3 β が嚢胞形成に対する治療のターゲットとなり得ることが示唆された。

本研究では ADPKD に対する新規治療薬開発を目指し、マウス GSK3 β プロモーター配列の CREB 結合部位に結合し、GSK3 β の発現を阻害するピロール・イミダゾール（pyrrole imidazole: PI）ポリアミドを分子設計、合成し、マウスの集合管細胞株 M1 細胞を用いてその効果を検討した。

M1 細胞において、バソプレシン刺激で cAMP 産生が増加することを確認した。またフォルスコリン刺激も M1 細胞の cAMP 濃度を有意に上昇させ、さらに GSK3 β mRNA 発現を有意に増加させた。フォルスコリンの刺激は、M1 細胞の細胞増殖能を有意に増加させ、バソプレシンおよびフォルスコリンの刺激は嚢胞径を有意に拡大した。本研究においてフォルスコリン刺激によって cAMP 濃度の増加と共に GSK3 β mRNA 発現の増加を認めており、これらの結果から cAMP 依存性に引き起こされる嚢胞形成においては GSK3 β が関与することが示唆された。合成した GSK3 β PI ポリアミドは、フォルスコリン刺激での GSK3 β mRNA 発現増加を有意に抑制した。M1 細胞に対しフォルスコリンを異なる濃度で刺激した場合、細胞増殖能は濃度依存性に高まるのではなく、フォルスコリン 1 μ M で有意な細胞増殖能増大を認め、それ以上の濃度では増殖能増大を認めなかった。M1 細胞はマウス正常集合管細胞由来の細胞株であるため、GSK3 β を介した悪循環が起こりにくいと考えられた。

ADPKD に近似した集合管細胞を得るため、M1 細胞に PKD1 shRNA を導入し、PKD1 ノックダウン M1 細胞を作製した。PKD1 ノックダウン M1 細胞では濃度の異なるフォルスコリンで刺激すると、M1 細胞と比較しより高濃度のフォルスコリン刺激でも有意な細胞増殖能増大を認めた。PKD1 ノックダウン M1 細胞において、正常細胞である M1 細胞では起こらないと考えられた GSK3 β を介した悪循環が存在し、より高い濃度のフォルスコリン刺激においても細胞増殖の増加が誘導されているが示唆された。M1 細胞及び PKD1 ノックダウン M1 細胞はともに、バソプレシン及びフォルスコリン刺激で有意な嚢胞径拡大を認めた。PKD1 ノックダウン M1 細胞において、フォルスコリン刺激で細胞増殖能は有意に増加し、GSK3 β PI ポリアミドはそれを有意に抑制した。また、GSK3 β PI ポリアミドは、フォルスコリン刺激による嚢胞径拡大を有意に抑制した。

本研究において GSK3 β PI ポリアミドは、M1 細胞においてフォルスコリン刺激による GSK3 β mRNA 発現を有意に抑制し、PKD1 ノックダウン M1 細胞においてフォルスコリン刺激による細胞増殖能および嚢胞径拡大を有意に抑制した。以上より、マウス GSK3 β 遺伝子プロモーター-CREB 結合部位に特異的な PI ポリアミドは、ADPKD への新規遺伝子治療薬としての可能性を持つと考えられた。