

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・イミダゾールポリアミドの開発

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系腎臓内科学専攻

馬場 晴志郎

修了年 2020 年

指導教員 阿部 雅紀

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・イミダゾールポリアミドの開発

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系腎臓内科学専攻

馬場 晴志郎

修了年 2020 年

指導教員 阿部 雅紀

目次

【概要】	1
【略語一覧】	2
【緒言】	4
1. 多発性嚢胞腎の特徴	4
2. ADPKD における嚢胞形成のメカニズム	5
3. GSK3 β の ADPKD への関与	6
4. ADPKD の治療	7
5. ピロール・イミダゾール (Pyrrole Imidazole: PI) ポリアミド	7
6. PI ポリアミドの創薬開発	8
【研究目的】	10
【研究方法】	11
1. 使用した細胞	11
2. 細胞の継代培養	11
3. マウスの GSK3 β の CREB 結合部位に対する PI ポリアミドの分子設計・合成	12
4. ゲルシフトアッセイ	12
5. M1 細胞に対するバソプレシン刺激での cAMP 産生	13
6. M1 細胞でのフォルスコリン刺激による GSK3 β mRNA 発現と GSK3 β PI ポリアミドの効果	14
7. M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する cAMP 産生と GSK3 β PI ポリアミドの効果	15
8. M1 細胞での濃度別によるフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能の検討	15
9. M1 細胞のフォルスコリン刺激による細胞増殖能と GSK3 β PI ポリアミドの効果	15
10. 嚢胞形成を誘導した M1 細胞の細胞形態の観察	16

11. M1 細胞でのバソプレシン及びフォルスコリン刺激による嚢胞形成能の評価	17
12. M1 細胞への <i>PKDI</i> shRNA 導入.....	17
13. <i>PKDI</i> ノックダウン M1 細胞および Control Vector 導入 M1 細胞での濃度別によるフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能の検討	18
14. <i>PKDI</i> ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能と GSK3 β PI ポリアミドの効果.....	18
15. <i>PKDI</i> ノックダウン M1 細胞でのバソプレシン及びフォルスコリン刺激による嚢胞形成能の評価	18
16. <i>PKDI</i> ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激による嚢胞形成能に対する GSK3 β PI ポリアミドの効果.....	19
17. 統計解析	19
【研究結果】	20
1. マウスの GSK3 β の CREB 結合部位に対する PI ポリアミドの分子設計・合成	20
2. GSK3 β PI ポリアミドのゲルシフトアッセイ	20
3. M1 細胞でのバソプレシン刺激に対する cAMP 産生	20
4. M1 細胞でのフォルスコリン刺激による GSK3 β mRNA 発現と GSK3 β PI ポリアミドの効果	20
5. M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する cAMP 産生と GSK3 β PI ポリアミドの効果	21
6. M1 細胞での濃度別によるフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能の検討	21
7. M1 細胞のフォルスコリン刺激による細胞増殖能と GSK3 β PI ポリアミドの効果	21
8. 嚢胞形成を誘導した M1 細胞の細胞形態の観察.....	22
9. M1 細胞でのバソプレシン及びフォルスコリン刺激による嚢胞形成能の評価	22
10. M1 細胞への <i>PKDI</i> shRNA 導入.....	22

11. Control Vector 導入 M1 細胞と <i>PKDI</i> ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能の検討	22
12. <i>PKDI</i> ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能と GSK3 β PI ポリアミドの効果	23
13. <i>PKDI</i> ノックダウン M1 細胞でのバソプレシン及びフォルスコリン刺激による嚢胞形成能の評価	23
14. <i>PKDI</i> ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激による嚢胞形成能に対する GSK3 β PI ポリアミドの効果	23
【考察】	25
【結論】	30
【謝辞】	31
【図・表】	32
【引用文献】	52
研究業績	58

【概要】

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になってきた。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、バソプレシン及びフォルスコリン刺激で 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で、GSK3 β mRNA 発現の増加を認め、合成した GSK3 β PI ポリアミドは、GSK3 β mRNA 発現増加を有意に抑制した。

ADPKD に近似した集合管細胞を得るため、M1 細胞に *PKDI* shRNA を導入し、*PKDI* ノックダウン M1 細胞を作製した。M1 細胞及び *PKDI* 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。*PKDI* 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。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。

【略語一覧】

AC	adenyl cyclase	アデニル酸シクラーゼ
ADPKD	autosomal dominant polycystic kidney disease	常染色体優性多発性嚢胞腎
AQP ₂	aquaporin 2	アクアポリン2
CCD	cortical collecting duct	皮質集合管
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンスレギュレーター
CREB	cAMP response element binding protein	
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride	死細胞染色色素
dDAVP	vasopressin	バソプレシン
DEX	dexamethasone	デキサメタゾン
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	ダルベッコ改変イーグル培地
DSMO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
eGFR	estimated glomerular filtration rate	推定糸球体濾過量
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
FBS	fatal bovine serum	ウシ胎児血清
FITC	fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
FSK	forskolin	フォルスコリン

GSK	glycogen synthase kinase	グリコーゲン合成酵素
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマト グラフィ
IBMX	3-isobutyl-1-methylxantine	PDE 阻害剤
MOI	multiplicity of infection	多重感染度
MW	molecular weight	分子量
PBS	phospholite-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PC	polycystin	ポリシスチン
PDE	phosphodiesterase	cAMP 分解酵素
PI	pyrrole imidazole	ピロール・イミダゾール
PIP	pyrrole imidazole polyamide	ピロール・イミダゾール ポリアミド
PKA	protein kinase A	プロテインキナーゼ A
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	逆転写ポリメラーゼ転写 反応
SE	standard error	標準誤差
TEMPO	Torvaptan Efficiency and Safety in Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and its Outcome	TEMPO 試験
TGF	transforming growth factor	トランスフォーミング増殖 因子
V ₂	vasopressin type 2	バソプレシン 2 型
V ₂ R	vasopressin type 2 receptor	バソプレシン 2 型受容体

【緒言】

1. 多発性嚢胞腎の特徴

多発性嚢胞腎は最も頻度の高い遺伝性嚢胞性疾患であり、両側腎臓に多数の嚢胞が進行性に発生、増大する⁽¹⁾。その原因遺伝子として常染色体優性の *PKD1* (16p13.3)⁽²⁾と *PKD2* (4q21-23)⁽³⁾、常染色体劣性の *PKHD1* (6p12)⁽⁴⁾が同定されている。

常染色体優性多発性嚢胞腎 (autosomal dominant polycystic kidney disease: ADPKD) は成人型多発性嚢胞腎とも呼ばれ、約 1,000~2,000 人に 1 人の割合で発症し、その遺伝子型によって重症度が異なる。ADPKD のうち、85%が *PKD1* 遺伝子、15%が *PKD2* 遺伝子、数%がどちらでもないと報告されており、*PKD1* 遺伝子異常による ADPKD がより重症傾向であるとされている⁽⁵⁾。胎生期の時点で顕微鏡的には嚢胞が存在しており、それが徐々に増大し、15 歳では約 86%に嚢胞の存在が画像上確認できると報告されている⁽⁶⁾。一般に 30~40 歳代頃までは無症状で経過するが、嚢胞が多数となり腎容積が大きくなると腹部膨満感、疼痛、肉眼的血尿といった自覚症状や、高血圧、嚢胞感染などの種々の合併症を生じる。最初に起きる腎臓の機能的異常は尿濃縮力の低下であるが、多数の嚢胞により腎臓が腫大するまではネフロンの代償のため糸球体濾過量は比較的保たれる⁽⁷⁾。40 歳ころから徐々に腎機能の低下を認め、60 歳代には約半数が末期腎不全に至る⁽⁵⁾。わが国では、約 31,000 例の ADPKD 患者がいると推定されている⁽⁸⁾。また、わが国では ADPKD が原疾患の慢性維持透析患者は 11,624 例であり、全慢性維持透析患者の 3.6%を占め、慢性透析患者の原疾患の 5 位となっている⁽⁹⁾。

2. ADPKD における嚢胞形成のメカニズム

ADPKD での嚢胞形成、拡大の進行のメカニズムとして、細胞異常増殖、細胞極性障害、嚢胞液分泌亢進があげられる。

Polycystin (PC) -1 (PC-1) と PC-2 はそれぞれ *PKD1*、*PKD2* 遺伝子の代謝産物である蛋白で、尿細管腔の繊毛に存在し⁽¹⁰⁾カルシウムイオンチャネルとしての機能を持つ。繊毛の動きなどの刺激でこれらのタンパクが活性化されると、細胞質内へカルシウム移動がおこり、細胞内カルシウム濃度が上昇する^(11,12)。

ADPKD では、PC の変異により細胞内へのカルシウム流入が阻害され、細胞内カルシウム濃度は低下する⁽¹³⁾。細胞内カルシウム濃度の低下は、cAMP 分解酵素 (phosphodiesterase: PDE) 活性を低下、adenyl cyclase (AC) 活性を上昇させ、細胞内 cAMP 上昇をきたす⁽¹⁾。また、生体内でバソプレシンは細胞内 cAMP の上昇を引き起こすことが知られている。バソプレシン 2 型 (V₂) 受容体は腎集合尿管に発現しており、バソプレシンによって V₂ 受容体が刺激されると AC を活性化させ、腎集合管細胞内の cAMP 濃度が上昇する⁽¹⁴⁾。通常細胞内 cAMP の上昇は細胞増殖活性を抑制させるが、多発性嚢胞腎の嚢胞由来細胞においては cAMP 濃度上昇が細胞増殖を促進させることが知られている⁽¹⁵⁾。ADPKD では、これらの cAMP 濃度上昇によって刺激された protein kinase A (PKA) が、MEK/ERK、mTOR、Wnt などの下流のシグナル経路を活性化し細胞増殖能が亢進し、嚢胞上皮細胞の異常増殖が起きると考えられている⁽¹⁵⁻¹⁹⁾。

繊毛は細胞極性維持に関与しており、尿細管構造形成に重要な役割を果たしている。PC-1 あるいは PC-2 の変異により、この細胞極性機能に障害をきたした細胞増殖が起こると嚢胞が形成される^(10,20)。

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) は、細胞膜上に存在する cAMP 依存性のクロライドチャネルで、CFTR を介したクロライドイオンの

移動には水輸送も伴う。ADPKDにおいてcAMP上昇で刺激されたPKAはCFTRを活性化させ、嚢胞腔内にクロライドイオンと共に水を分泌し嚢胞液貯留を促進する^(21,22)。また、バソプレシン刺激によるcAMP上昇がCFTR発現を増加させるとの報告もあり⁽²³⁾、cAMP依存性に嚢胞液貯留が進行し嚢胞が拡大していくと考えられている。

3. GSK3 β のADPKDへの関与

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) は、GSK3 α とGSK3 β の二つのアイソフォームを持ち、代謝、再生、分化、増殖などの細胞機能制御に関するシグナル伝達において重要な役割を担っている⁽²⁴⁾。GSK3はあらゆる臓器に存在しているが、腎臓においては、尿細管障害と再生、炎症、線維化、尿濃縮に関する制御を行っている⁽²⁵⁻²⁸⁾。

GSK3 β は、糖尿病⁽²⁹⁾、アルツハイマー型認知症⁽³⁰⁾、大腸癌⁽³¹⁾などの様々な疾患においてその発現が亢進していることが知られている。多発性嚢胞腎においてもGSK3 β の過剰発現がみられることが知られており、多発性嚢胞腎マウスにおいて、バソプレシンによる細胞内cAMPの増加は、転写因子cAMP response element binding protein (CREB)が下流シグナルのGSK3 β を介して嚢胞形成を起こすことが報告された⁽³²⁾。更に最近、Kakadeらは、*PKD1^{fl/fl}-PKHD1^{cre}*多発性嚢胞腎マウスにおいてcAMP依存性に嚢胞が拡大するメカニズムとして、CREB→GSK3 β →AC→cAMP→PKA→CREBという悪循環があることを報告し、cAMP-CREB依存性に多発性嚢胞ができることを示した⁽³³⁾(図1)。このように、ADPKDでの腎嚢胞形成にはV₂受容体の過剰なシグナルが主たる原因とされてきたが、最近GSK3 β の関与が明らかにされ、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。

4. ADPKD の治療

進行性嚢胞形成に対する治療法として、バソプレシン V₂ 受容体拮抗薬トルバプタン⁽³⁴⁾やチアゾリジン誘導体ピオグリタゾン⁽³⁵⁾の有効性が報告されている。トルバプタンはバソプレシンによる細胞内 cAMP 増加を抑制することにより腎集合管上皮細胞の増殖を低下させ嚢胞形成を抑制する⁽³⁴⁾。トルバプタンの臨床試験として、2007 年から 1,445 名の多発性嚢胞腎患者を対象に 3 年間の臨床評価 (Torvaptan Efficiency and Safety in Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and its Outcome; TEMPO 試験) が行われた。対象は、年齢が 18~50 歳で、両側腎容積が 750mL 以上、推定糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate: eGFR) が 60mL/min/1.73m² 以上という条件で行われ、結果は 2012 年に発表された⁽³⁶⁾。トルバプタンは腎容積の増大速度を約 50%抑制し、腎臓機能の指標となる血清クレアチニンの逆数の低下速度を約 30%緩和した。また、TEMPO 試験に参加した 1,445 名のうち、日本人は 177 名含まれており、この日本人参加者のサブ解析でも同様にトルバプタン投与により腎容積増大速度の抑制と腎機能低下速度の緩和を認めた⁽³⁷⁾。

しかし、これらの治療法においては、嚢胞形成を完全に抑制することはできず⁽³⁸⁾、したがって、より有効な治療法の開発が望まれている。

5. ピロール・イミダゾール (Pyrrole Imidazole: PI) ポリアミド

1996 年にカルフォルニア工科大学の Peter Dervan らはクロモマイシン、ディスタマイシン、アクチノマイシン D 等の構造的弓形の抗生物質が 2 本鎖 DNA と結合し作用する事を解析し、DNA 塩基特異的に結合する中分子ペプチド化合物である PI ポリアミドを発見した^(39,40)。

合成された DNA 結合 PI ポリアミドは、Py/Im ペアが CG、Py/Py ペアは AT ま

たは TA、Im/Py ペアは GC を認識し、これにより任意の DNA の minor groove に塩基特異的に蛋白質より強力に水素結合し、DNA 二重螺旋構造に入り込んで、転写因子の結合を阻害し遺伝子発現を抑制する事ができる (図 2)。PI ポリアミドの特徴として、組織障害に伴う疾病状態での遺伝子発現を正常化する遺伝子制御であり、siRNA の様に遺伝子をノックダウンしないため、副作用を軽減することができること、PI ポリアミドは有機化合物であるため、核酸医薬と違い核酸分解されず、細胞や生体内で安定であること、ベクターやデリバリー試薬なしに細胞の核に取り込まれ、遺伝子配列特異的に DNA に結合すること、また様々な遺伝子をターゲットとして自由に分子設計できるため、経口投与可能な新規遺伝子制御薬としての可能性を持つことが挙げられる。

この様に PI ポリアミドは低分子化合物と異なる、全く新しい中分子ペプチド化合物であり、次世代の遺伝子転写制御薬として期待される。

6. PI ポリアミドの創薬開発

福田らのグループは transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) に対する PI ポリアミドを分子設計し、遺伝子治療の目的で創薬開発を行ってきた。TGF- β 1 は細胞外基質の増生、線維芽細胞の遊走に関与し、腎炎、血管狭窄、肝硬変症、肺線維症などの線維性疾患の責任分子であり、TGF- β 1 に対する PI ポリアミドはこれらの線維性疾患の治療薬になりうると思われる。

福田らは、これまでに TGF- β 1 の PI ポリアミドが、進行性腎障害のモデルラットにおいて、尿蛋白抑制や組織障害改善効果を示すことを報告している^(41,42)。TGF- β 1 に対する PI ポリアミドをラットに長期投与したところ、PI ポリアミドは体重や摂餌量には影響せず、血清でも通常の薬剤と同様な薬物動態を示した^(41,42)。また福田らは TGF- β 1 に対する PI ポリアミドが血管再狭窄⁽⁴³⁾、腹膜硬化

症⁽⁴⁴⁾、角膜損傷⁽⁴⁵⁾を抑制することも報告している。このほかにも、ヒト TGF- β 1 に対する PI ポリアミドは、前臨床として霊長類マーモセットでの皮膚瘢痕形成を完全に抑制した⁽⁴⁶⁾。さらに最近、大月らは前臨床試験としてマーモセットでのシクロスポリン A 腎症および一側尿管結紮水腎症モデルにおいても、ヒト TGF- β 1 に対する PI ポリアミドの有効性を確認した⁽⁴⁷⁾。

これらの成績から PI ポリアミドは遺伝子転写抑制中分子ペプチド薬として、難治性疾患の次世代の治療薬として期待されている。

【研究目的】

本研究は、多発性嚢胞腎に対する新規治療薬開発を目指し、マウスの GSK3 β の CREB 結合部位に PI ポリアミドを分子設計、合成し、マウス腎皮質集合管細胞株の M1 細胞でその効果を検討することを目的とする。

【研究方法】

1. 使用した細胞

マウス腎皮質集合管細胞株である M1 細胞 (ATCC CRL 2038: European Collection of Authenticated Cell Culture, Salisbury, England) を使用した。M1 細胞株は SV40 の初期領域 (Tg(SV40E)BRI/7) を遺伝子導入し形質転換したマウスの皮質集合管 (cortical collecting duct: CCD) に由来し、上皮の形態や CCD 固有の抗原など、CCD の持つ多くの特徴を表している。M1 細胞は確立された細胞株としての機能的な CCD 細胞の維持が可能であり、CCD の持つ多くの分化したイオン輸送機能、ホルモン反応性を保持しており⁽⁴⁸⁾、これまでも多くの ADPKD に関する研究に使用されている^(23,33,49)。本研究においても Gonzalez ら⁽⁴⁹⁾の方法を参考にし、実験を行った。

2. 細胞の継代培養

M1 細胞のバイアルを 37°C 温水中に浸し、1~2 分間揺らしながら融解した。あらかじめ 5% ウシ胎児血清 (Fatal bovine serum: FBS: JRH Bioscience, KS, USA) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12: DMEM/F-12) にペニシリン 100 単位/mL、ストレプトマイシン 100 µg/mL、Dexamethasone (DEX) 5 µM を添加した培地 10 mL を混入した遠心管に、バイアル中の細胞浮遊液 1 mL を入れ、軽くピペッティングした後、1,500 回転で 1 分間遠心した。細胞沈査を確認し、上清を捨て、25 cm² フラスコに 5 mL の増殖培地を用いて細胞沈査を全量播種し、37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養した。数日で細胞がフラスコ内でサブコンフルエントになっていることを確認し、細胞液を取り除きリン酸緩衝液 (Phospholite-buffered saline: PBS:

Sigma-Aldrich, MO, USA) で洗浄した後、細胞間接着が分離していることを確認し 0.25%トリプシン溶液 (Trypsin/ethylenediamineteraacetic acid (EDTA), Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて細胞を剥離・回収し、滅菌フラスコに split 比率 1:4 で播種し継代培養した。培地の交換は週 2 回の頻度で行い、コンフルエントになるごとに継代培養を繰り返した。第 5 継代時の細胞を実験に使用した。

3. マウスの GSK3 β の CREB 結合部位に対する PI ポリアミドの分子設計・合成

マウス GSK3 β プロモーター配列に存在する CREB 領域に対する PI ポリアミドを分子設計した。GSK3 β に特異性を持たせるため、CREB 結合部位と GSK3 β プロモーター配列にまたがるように、2 種類の PI ポリアミドを分子設計した。PI ポリアミドはペプチド合成機 PSSM-8 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて Fmoc 固相法にて合成し C18 カラムで High Performance Liquid Chromatography (HPLC) にて精製した。実験に用いた PI ポリアミドの濃度設定は、先行研究⁽⁴¹⁻⁴⁷⁾を参考に行った。

4. ゲルシフトアッセイ

GSK3 β sense oligo (fluorescein isothiocyanate (FITC) -AAGTCATGTCGTCAGGT TAGG) と GSK3 β antisense oligo (CCTAACCTGACGACATGACTT) を nuclease free water で 100 μ M にそれぞれ調節した。2 つの oligo を 10 μ L と annealing buffer (0.25M Tris-HCL(pH7.5)、87.5mM EDTA、0.2M NaCl) 50 μ L、nuclease free water 40 μ L を混合し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱変性後、徐々に温度を下げて 2 鎖 oligo を作製し、1 μ M になるよう希釈した。FITC-GSK3 β consensus oligo を Dimethyl Sulfoxide (DMSO: Sigma-Aldrich) で溶解した 10⁻⁶M の GSK3 β PI ポリアミドと 5 \times binding

buffer (20% glycerol、5mM MgCl₂、2.5mM EDTA、250mM NaCl、50nM Tris-HCL (pH7.5)) 中で 1 時間インキュベーションを行った。また competitor は蛍光ラベルしていない GSK3β consensus oligo を使用した。300V で 20 分泳動しておいた 20%ポリアクリルアミロイドゲルに作製したサンプルをアプライし、0.5×TBE バッファー300V で泳動した。LAS3000 (Fuji Film, Tokyo, Japan) を使用してゲルを撮影し、バンドを可視化した。

5. M1 細胞に対するバソプレシン刺激での cAMP 産生

cAMP の産生は、cyclic AMP enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (Cayman chemical company, MI, USA) を使用して測定した。6 well plate に M1 細胞を 1.0×10^5 cell/well になるように 5% FBS、5μM DEX 含有 DMEM/F-12 を用いて播種し、37°C、5%CO₂ の条件下でサブコンフルエントになるまで培養した。培地を除去し、PBS で well 内を洗浄した。PBS に最終濃度が 100μM になるように PDE 阻害剤 (3-isobutyl-1-methylxanthine: IBMX: Cayman chemical company) とバソプレシン ([diamino-Cys¹, D-Arg⁸]-Vasopressin acetate salt hydrate: dDAVP: Sigma-Aldrich) をそれぞれ 1μM、0.1μM、0.01μM になるように添加して誘導 buffer を作製し、細胞を 20 分間刺激した。刺激後、誘導 buffer を除去し、1well あたり 0.1%塩酸 1mL で細胞を 20 分間インキュベートした。スクレイパーで細胞を回収し、ピペッティングで細胞を十分に分離してエッペンチューブに移した後、10,000 回転で 10 分間、4°Cで遠心分離を行い、上清の Cell Lysate を回収した。Cell Lysate は ELISA Buffer で 3 倍に希釈した後、ELISA にて cAMP の測定を行った。

また Cell Lysate は Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) で蛋白量を測定し、得られた cAMP のデータは蛋白量で補正した。

6. M1 細胞でのフォルスコリン刺激による *GSK3β* mRNA 発現と *GSK3β* PI ポリアミドの効果

M1 細胞を 5% FBS、5 μ M DEX 含有 DMEM/F-12 を用いて 6 well plate に播種し、サブコンフルエント後、0.5% FBS、5 μ M DEX 含有 DMEM/F-12 にて低血清培養を行った。その間 PI ポリアミド-1 および PI ポリアミド-2 をそれぞれ最終濃度が 10⁻¹⁰M、10⁻⁹M、10⁻⁸M となるよう添加し、24 時間培養した。その後、フォルスコリンを最終濃度が 1 μ M となるよう添加し細胞の刺激を行った。6 時間後、培養液を除去し、TRIzol Reagent (Life Technologies, CA, USA) 1mL を加えピペッティング後エッペンチューブに移し 5 分間室温で置いた。クロロホルム 200 μ L を加え 15 秒間転倒混和し 2~3 分間室温で置いたのち、15,000 回転で 15 分間遠心分離し、上清を新しいエッペンチューブに移した。イソプロパノール 500 μ L を加え転倒混和し、室温で 10 分間置き 4 $^{\circ}$ C、15,000 回転で 10 分間遠心分離を行った。上清を除去し、沈殿物に 70%エタノール 1mL を加え混和し、4 $^{\circ}$ C、10,000 回転で 5 分間遠心分離し total RNA を抽出した。抽出した RNA 量を測定し、1 μ g 相当の total RNA を DNaseI (Thermo Fisher Scientific) で処理し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用し、cDNA を合成した。mRNA の発現は、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR) で確認した。

使用したプローブおよびプライマーセットを表 1 に示す。リアルタイム RT-PCR は Step One Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems, MA, USA) を使用した。PCR の条件は、熱変性 95 $^{\circ}$ C 20 秒、アニーリングおよび伸長反応を 95 $^{\circ}$ C 1 秒と 60 $^{\circ}$ C 20 秒とし、40 サイクル行った。PCR 産物は standard curve 法による相対定量で測定し、*GSK3β* mRNA の発現は *β-actin* を内部標準として補正して求めた。

7. M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する cAMP 産生と GSK3 β PI ポリアミドの効果

実験は、方法 5 と同様の手順で行った。

フォルスコリン刺激を開始する 3 時間前に GSK3 β に対する PI ポリアミド-1、PI ポリアミド-2 をそれぞれ終濃度が 10^{-10}M ~ 10^{-8}M になるよう培地に添加した。次に培地を除去し、PBS で well 内を洗浄した。PBS に最終濃度が $100\mu\text{M}$ になるように IBMX とフォルスコリン $1\mu\text{M}$ 、PI ポリアミド-1 及び PI ポリアミド-2 をそれぞれ 10^{-10}M ~ 10^{-8}M を添加して誘導 buffer を作製し、細胞を 20 分間刺激した。

8. M1 細胞での濃度別によるフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能の検討

96 well plate に M1 細胞を 5% FBS、 $5\mu\text{M}$ DEX 含有 DMEM/F-12 を用いて播種し、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 24 時間培養した。次に培地を 0.5%FBS、 $5\mu\text{M}$ DEX 含有 DMEM/F-12 に置き換え 24 時間低血清培養を行った。低血清培養後、フォルスコリンを終濃度が $1\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ となるよう添加し刺激を行った。 37°C 、5% CO_2 の条件下で 24 時間培養後、Premix WST-1 (Takara Bio, Shiga, Japan) を $10\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 90 分培養した。マイクロプレートリーダーを用いて、対照波形を 650nm として 450nm の波長を測定することで、細胞増殖能を測定した。

9. M1 細胞のフォルスコリン刺激による細胞増殖能と GSK3 β PI ポリアミドの効果

実験は、方法 8 と同様の手順で行った。

低血清培養が終了する 3 時間前に、GSK3 β に対する PI ポリアミド-1 及び PI

ポリアミド-2 をそれぞれ最終濃度が 10^{-10}M 、 10^{-9}M 、 10^{-8}M となるように培地に添加した。コントロールには等量になるように DMSO を添加した。低血清培養後、フォルスコリンを終濃度が $1\mu\text{M}$ になるよう添加した。またこの際、それぞれの濃度になるよう PI ポリアミド-1 及び PI ポリアミド-2 を再度添加した。

10. 嚢胞形成を誘導した M1 細胞の細胞形態の観察

M1 細胞を Matrigel matrix GFR (Corning, NY, USA) 上で 3 次元培養を行い、その形態について観察をした。24 well plate に $50\mu\text{L}$ のマトリゲルを置き、ブルーチップで素早く全体に広げ 15 分間 37°C に静置し、マトリゲルを重合させた。その間、M1 細胞は 3mM EDTA 含有 PBS にて処理し、細胞間接着が分離していることを顕微鏡で確認後、EDTA 含有 0.25% トリプシン溶液で細胞を剥離し、 5% FBS、 $5\mu\text{M}$ DEX 含有 DMEM/F-12 で細胞数が 5×10^4 cell/mL になるよう調整した。細胞懸濁液 1mL に $20\mu\text{L}$ のマトリゲルを添加し十分に攪拌後、全量を well 内に入れた。そのまま 3 日間培養し、嚢胞を形成していることを確認した。その後、終濃度がフォルスコリン $1\mu\text{M}$ になるよう培地に添加し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で毎日培地交換（フォルスコリンを含む）をして 5 日間刺激した。フォルスコリン刺激前と刺激後 5 日目において、嚢胞形成した M1 細胞の培地を廃棄し、PBS で洗浄した後に 4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定を行った。PBS で細胞を洗浄し、 0.5% Triton-X 含有 PBS で 20 分間、細胞膜の透過処理を行った。その後、細胞は Alexa Flour 488 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific) と 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI: Thermo Fisher Scientific) を用いて F-アクチンと核の染色を行い、蛍光顕微鏡 FLUOVIEW FV10i (OLYMPUS, Tokyo, Japan) にて撮影を行った。

11. M1 細胞でのバソプレシン及びフォルスコリン刺激による嚢胞形成能の評価

バソプレシン、フォルスコリン刺激による嚢胞形成能評価のため、既報の報告⁽³³⁾に基づき、方法 10 と同様の手順で実験を行った。嚢胞形成を確認後、それぞれの終濃度がバソプレシン 1 μ M、フォルスコリン 10 μ M になるよう培地に添加し、37°C、5%CO₂ 下で毎日培地交換（バソプレシン、フォルスコリンを含む）をして刺激した。刺激後 5 日目に IX73 倒立顕微鏡（OLYMPUS）で観察し、Q Capture Pro 7TM（Teledyne QImaging, BC, Canada）を用いて、一回の実験における、それぞれ異なる 2 視野での全嚢胞の長径を測定した。長径 10 μ m 以上の嚢胞について、Control、バソプレシン刺激、フォルスコリン刺激それぞれにおける嚢胞径の平均を比較、検討した。

12. M1 細胞への *PKDI* shRNA 導入

ADPKD に近似した集合管細胞を得るために、M1 細胞に *PKDI* をノックダウンする shRNA を導入した。M1 細胞に対する shRNA の導入は、日本大学遺伝子組み換え実験安全委員会の了承を得て、実験を施行した（整理番号 2018 医 28）。*PKDI* をターゲットとした shRNA をインサートしたレンチウイルスベクターをパッケージングしたレンチウイルス粒子（MISSION[®] Lentiviral Transduction Particles pLKO.1-puro-CMV-tGFP: SHCLNV, TRCN0000304612: Sigma-Aldrich）を用いて、ポリブレン法にて M1 細胞への遺伝子導入を行った。M-1 細胞が 1.6 \times 10⁴ cell/100 μ L になるよう希釈し、96 well plate に播種し 24 時間 37°C、5%CO₂ の条件下でインキュベーションした。レンチウイルス粒子多重感染度（multiplicity of infection: MOI）が 0.5~20 になるように段階希釈系列を調整し、ポリブレン濃度 4 μ g/mL となるよう添加した。翌日にウイルス粒子を含む培地を除去し、新しい培地に置換した。3 日目に蛍光顕微鏡で tGFP の蛍光を確認し、*PKDI* をノック

ダウンしたクローンのみを得るために、4 μ g/mL ピューロマイシンを添加した培地に交換し、セレクションを行い、安定発現株を得た。同様に non-target shRNA を導入したレンチウイルスベクターをパッケージングしたレンチウイルス粒子 (Custom MISSION[®] shRNA Transduction Particles: CSTVRS, Sigma-Aldrich) を用いてコントロール細胞を作製した。これらの遺伝子導入した M1 細胞の *PKDI* mRNA 発現を確認するために、shRNA の切断部位の sequence を含むプライマーを設計し (sense: 5'- GGAAC TTTGGGGATGGGGAG -3', antisense: 5'- CATGCCAA TAGCCACGTTGG -3'), リアルタイム RT-PCR を行った。PCR 産物は standard curve 法による相対定量で測定し、*PKDI* mRNA の発現は β -actin を内部標準として補正して求めた。

13. *PKDI* ノックダウン M1 細胞および Control Vector 導入 M1 細胞での濃度別によるフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能の検討

実験は、方法 8 と同様の手順で行った。フォルスコリンの濃度は 1 μ M、5 μ M、10 μ M、25 μ M、50 μ M となるよう添加し刺激を行った。

14. *PKDI* ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能と GSK3 β PI ポリアミドの効果

実験は、方法 8 と同様の手順で行った。フォルスコリンによる刺激は終濃度 10 μ M とした。GSK3 β PI ポリアミドは、PI ポリアミド-2 を終濃度 10⁻¹⁰M、10⁻⁹M、10⁻⁸M となるように添加した。

15. *PKDI* ノックダウン M1 細胞でのバソプレシン及びフォルスコリン刺激による嚢胞形成能の評価

PKDI ノックダウン M1 細胞は 5% FBS、5 μ M DEX 含有 DMEM/F-12 を用いて培養した。実験は、方法 10 の手順と同様に行い、刺激後 5 日目に IX73 倒立顕微鏡で観察し、それぞれ異なる 2 視野における嚢胞径を測定した。

16. *PKDI* ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激による嚢胞形成能に対する GSK3 β PI ポリアミドの効果

PKDI ノックダウン M1 細胞は方法 10 と同様の手順で、Matrigel matrix GFR 上で 3 日間培養し嚢胞を形成させた。次に培地に PI ポリアミド-2 を 10⁻¹⁰M、10⁻⁹M、10⁻⁸M 添加し 1 日培養後、フォルスコリン 10 μ M で 5 日間刺激を行った。IX73 倒立顕微鏡で観察し、それぞれ異なる 2 視野においての嚢胞径を測定した。

17. 統計解析

結果は平均値 \pm 標準誤差 (standard error: SE) として表記し、有意差検定は統計解析ソフトウェア SPSS version 26 (SPSS Inc, IL, USA) を用い統計学的解析を行った。2 群間での比較は Student's t-test を用い、多群間比較では Turkey 法を用いた。p<0.05 を統計学的有意差とした。

【研究結果】

1. マウスの GSK3 β の CREB 結合部位に対する PI ポリアミドの分子設計・合成

マウスの GSK3 β プロモーター領域を解析した結果、-2,949bp に CREBP-2 に対する結合配列を認めた (図 3)。GSK3 β に特異性を持たせるため、この部位と GSK3 β プロモーター配列にまたがるように PI ポリアミドを 2 種類分子設計、合成した。いずれもヘアピン型構造を呈し、分子量はそれぞれ 1,667Da、1,668Da の中分子化合物であった (図 4)。

2. GSK3 β PI ポリアミドのゲルシフトアッセイ

GSK3 β 2 本鎖 DNA に PI ポリアミド-1 および PI ポリアミド-2 を添加することで、バンドのシフトを認めた。非特異的 DNA コンペティターを添加したところバンドのシフト抑制を認めた。ミスマッチポリアミドではバンドの移動は認めなかった (図 5)。以上よりそれぞれの GSK3 β PI ポリアミドのターゲット配列への結合を確認した。

3. M1 細胞でのバソプレシン刺激に対する cAMP 産生

M1 細胞を 0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M の濃度でのバソプレシンで刺激し、cAMP 産生を検討した。M1 細胞をバソプレシンによって刺激すると、1 μ M バソプレシン刺激において cAMP 濃度は有意 ($p < 0.05$) に上昇した (図 6)。

4. M1 細胞でのフォルスコリン刺激による GSK3 β mRNA 発現と GSK3 β PI ポリアミドの効果

M1 細胞において、フォルスコリン刺激による *GSK3β* mRNA 発現に対する *GSK3β* PI ポリアミドの効果を検討した。フォルスコリン 1 μ M の刺激によって M1 細胞の *GSK3β* mRNA の発現は有意 ($p<0.05$, $p<0.01$) な上昇を認めた。*GSK3β* PI ポリアミド添加では、フォルスコリン刺激による *GSK3β* mRNA 発現の上昇が抑制された。特に PI ポリアミド-2 の 10⁻⁸M の濃度において、フォルスコリン刺激による *GSK3β* mRNA 発現の有意 ($p<0.01$) な抑制を認めた (図 7)。

5. M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する cAMP 産生と *GSK3β* PI ポリアミドの効果

フォルスコリン刺激による M1 細胞の cAMP 産生と、それに対する *GSK3β* PI ポリアミドの効果を検討した。フォルスコリン 1 μ M 刺激によって、M1 細胞での cAMP 濃度は有意 ($p<0.01$) な上昇を認めた。*GSK3β* PI ポリアミドは PI ポリアミド-1、PI ポリアミド-2 とともに、フォルスコリン刺激による cAMP 濃度上昇に対する抑制効果は認めなかった (図 8)。

6. M1 細胞での濃度別によるフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能の検討

Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System を用いて、M1 細胞を異なるフォルスコリン濃度で刺激し、M1 細胞の細胞増殖能を比較した。フォルスコリン 1 μ M の刺激で、M1 細胞の細胞増殖能は有意に増大した ($p<0.05$)。高濃度のフォルスコリン刺激では増殖能増大は認めなかった (図 9)。

7. M1 細胞のフォルスコリン刺激による細胞増殖能と *GSK3β* PI ポリアミドの効果

フォルスコリン刺激による M1 細胞の細胞増殖能と、それに対する *GSK3β* PI

ポリアミドの効果を検討した。フォルスコリン 1 μ M の刺激において、M1 細胞の細胞増殖能は有意 ($p<0.05$) に増加を認めた。GSK3 β PI ポリアミド添加において、フォルスコリン刺激による M1 細胞の細胞増殖能増大に対する抑制効果は認めなかった (図 10)。

8. 嚢胞形成を誘導した M1 細胞の細胞形態の観察

M1 細胞をマトリゲル上で 3 次元培養を行い、蛍光染色にて嚢胞の形態を観察した。フォルスコリン刺激にて、形成した嚢胞内で、核の増殖を伴いながら、嚢胞拡大を認めた (図 11)。

9. M1 細胞でのバソプレシン及びフォルスコリン刺激による嚢胞形成能の評価

M1 細胞をそれぞれフォルスコリン 10 μ M、バソプレシン 1 μ M で刺激し、5 日目の時点での嚢胞径を測定した。M1 細胞においてフォルスコリン刺激、バソプレシン刺激ともに、嚢胞径はコントロールと比較し有意 ($p<0.01$) な拡大を認めた。バソプレシン刺激に対し、フォルスコリン刺激では平均の嚢胞径は有意 ($p<0.01$) に拡大した (図 12)。

10. M1 細胞への *PKDI* shRNA 導入

PKDI ノックダウン M1 細胞を作製するため、M1 細胞に *PKDI* shRNA を導入した。*PKDI* shRNA 導入 M1 細胞において、*PKDI* mRNA の発現は Control vector 導入 M1 細胞に比べ有意 ($p<0.01$) に低下を認めた。これにより、*PKDI* 遺伝子がノックダウンされていることを確認した (図 13)。

11. Control Vector 導入 M1 細胞と *PKDI* ノックダウン M1 細胞でのフォルスコ

リン刺激に対する細胞増殖能の検討

PKDI ノックダウン M1 細胞ではフォルスコリン 10 μ M の刺激で細胞増殖能が有意 ($p<0.01$) に増大した。Control Vector 導入 M1 細胞ではフォルスコリン 10 μ M の刺激においても細胞増殖能増大は認めなかった (図 14)。

12. *PKDI* ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能と GSK3 β PI ポリアミドの効果

PKDI ノックダウン M1 細胞における、フォルスコリン刺激での細胞増殖能に対する GSK3 β PI ポリアミドの効果を検討した。細胞増殖能はフォルスコリン 10 μ M での刺激で有意 ($p<0.01$) に増加を認めた。GSK3 β PI ポリアミド添加では細胞増殖能の抑制を認めた。特に 10⁻⁸M の濃度でフォルスコリン刺激による細胞増殖能の有意な抑制 ($p<0.05$) を認めた (図 15)。

13. *PKDI* ノックダウン M1 細胞でのバソプレシン及びフォルスコリン刺激による囊胞形成能の評価

PKDI ノックダウン M1 細胞をそれぞれフォルスコリン 10 μ M、バソプレシン 1 μ M で刺激し、5 日目の時点で囊胞径を測定し比較、検討した。M1 細胞と同様、*PKDI* ノックダウン M1 細胞においてバソプレシン刺激、フォルスコリン刺激ともにコントロールと比較して、有意 ($p<0.01$) な囊胞径の拡大を認めた。また、*PKDI* ノックダウン細胞においても、フォルスコリン刺激ではバソプレシン刺激と比較し、囊胞径が有意 ($p<0.01$) に拡大した (図 16)。

14. *PKDI* ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激による囊胞形成能に対する GSK3 β PI ポリアミドの効果

PKDI ノックダウン M1 細胞をフォルスコリン 10 μ M で刺激し、刺激後 5 日目の囊胞径の大きさを測定し、コントロール、フォルスコリン刺激、GSK3 β PI ポリアミド添加での変化を比較、検討した。フォルスコリン刺激前における囊胞径の平均は 24.67 \pm 1.08 μ m で、囊胞径の大きさに有意差は認めなかった。フォルスコリン刺激 5 日目において、コントロールでは囊胞径の大きさに変化は認めなかった。フォルスコリン刺激では刺激後 5 日目では 0 日と比較し囊胞径は有意 ($p<0.01$) に拡大していた。GSK3 β PI ポリアミド添加では、10⁻¹⁰M 濃度では 0 日目と 5 日目では囊胞径に有意な変化は認めなかったが、10⁻⁹M および 10⁻⁸M 濃度ではフォルスコリン刺激によって囊胞径は有意 ($p<0.01$) に拡大した。GSK3 β PI ポリアミドはいずれの濃度においても、フォルスコリン刺激と比較し囊胞径の拡大を有意 ($p<0.01$) に抑制した (図 17、18)。

【考察】

本研究では、GSK3 β プロモーターの CREB 結合領域に特異的に結合し、その発現を抑制する PI ポリアミドを ADPKD の新規薬剤として創薬開発する事を最終目的として、バソプレシンおよびフォルスコリン刺激によるマウス集合管細胞での細胞増殖、嚢胞形成に対しての効果を検討した。

まず、マウスの GSK3 β に対する PI ポリアミドを 2 種類分子設計、合成した。これらの合成した PI ポリアミドがターゲット配列に結合することをゲルシフトアッセイで確認し、以降の実験で使用する事とした。

本研究で使用したマウスの腎皮質集合管細胞株 M1 細胞は、これまでの ADPKD に関する先行研究において広く使用されており、バソプレシンおよびフォルスコリンに対し感受性があることが示されている^(23,33,48,49)。本研究においても、1 μ M バソプレシン刺激によって M1 細胞の cAMP 濃度の有意な上昇を認め、使用した M1 細胞がバソプレシン刺激に対し感受性を持つことを確認した。

また 1 μ M 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。1 μ M 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、1 μ M バソプレシンおよび 10 μ M フォルスコリンの刺激は嚢胞径を有意に拡大した。これにより、バソプレシンおよびフォルスコリンが、細胞内 cAMP を増加させ、細胞増殖及び嚢胞拡大を引き起こす因子であることを確認した。興味あることに、ADPKD の腎嚢胞液中からフォルスコリンと同様の生物学的特性を持つ物質が同定されており、嚢胞形成、拡大への関与が指摘されている⁽⁵⁰⁾。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。

本研究において、合成した2種類のGSK3 β PIポリアミドのうち、PIポリアミド-2の10⁻⁸Mの濃度において、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。しかしながら、フォルスコリン刺激によるcAMP増加および細胞増殖能増大に対する抑制効果は証明できなかった。2種類のPIポリアミドは、湾曲度や柔軟性が異なること、異なる塩基配列をターゲットとしており、結合するDNAマイナーグループが異なることなど⁽⁴⁰⁾から、効果を示す濃度に違いがでた可能性が考えられる。PIポリアミドの効果には濃度依存性がないという報告⁽⁵¹⁾がある。福田らの検証では、高濃度PIポリアミドはそれ自体が転写因子として働いてしまう事が確認されている。今回は、PIポリアミド-2の方がより効果があると判断し、以降の実験においてはPIポリアミド-2をリード化合物として使用することとした。

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り、正常集合管細胞においては、前述のGSK3 β を介した悪循環が起こらず、cAMPの過剰状態をきたしにくく、持続的な嚢胞形成、拡大が起こりにくい可能性があると考えられた。また、GSK3 β を介した悪循環が起こりにくいため、今回合成したPIポリアミドがM1細胞でのフォルスコリン刺激に対するcAMP上昇や細胞増殖能増大に対し効果を認めなかった可能性が考えられた。ADPKDでは、このGSK3 β を介した悪循環によりcAMP過剰がおこり、それによってcAMP依存性の嚢胞形成、拡大が生じると考えられている。そのため、よりADPKDに近い状態にするため、PKDI遺伝子をshRNAにてノックダウンしたM1細胞を用いて実験を行うこととした。

まず、*PKDI* ノックダウン M1 細胞で、*PKDI* 遺伝子発現が有意に低下していることを確認した。*PKDI* 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、10 μ M の刺激で細胞増殖能増大のピークを認めた。このことは、*PKDI* 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。*PKDI* ノックダウン M1 細胞において、GSK3 β PI ポリアミド (10 $^{-8}$ M) はフォルスコリン刺激による細胞増殖能を有意に抑制した。さらに嚢胞拡大の評価においても、フォルスコリン刺激による嚢胞径の増大は、GSK3 β PI ポリアミド (10 $^{-8}$ M~10 $^{-10}$ M) 添加で有意に抑制された。このことから、GSK3 β PI ポリアミドは GSK3 β を介した悪循環存在下での ADPKD において、細胞増殖や嚢胞拡大に対し有効である可能性がある。

本研究において、*in vitro* での実験で GSK3 β に対する PI ポリアミドが、*PKDI* ノックダウン M1 細胞のフォルスコリン刺激による細胞増殖能および、嚢胞の拡大を抑制することが示された。現在 ADPKD 治療薬として用いられるトルバプタンは、V₂受容体を介した cAMP 増加を阻害することで ADPKD 進展を抑制する⁽³⁴⁾が、嚢胞形成、拡大を完全には停止できないことが明らかになっている。また、糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体ピオグリタゾン⁽³⁵⁾やメトホルミン⁽⁵²⁾、ソマトスタチンアナログであるオクトオレチド⁽⁵³⁾、免疫抑制剤のラパマイシン⁽⁵⁴⁾の有効性も報告されているが、未だに確立された治療法は存在せず、有効な治療法の開発が望まれている。本研究で使用した GSK3 β PI ポリアミドは、cAMP 依存性に引き起こされる嚢胞形成、拡大の過程で鍵となる GSK3 β を直接阻害するため、より効果的な ADPKD 治療薬となる可能性を秘めている。しか

しながら、バソプレシンやフォルスコリン刺激での cAMP の増加には、GSK3 β を介さない経路が存在している可能性もあり、ADPKD の嚢胞形成、拡大のメカニズムのさらなる解明が望まれる。

GSK3 β はあらゆる組織に存在し、細胞機能制御に関わる酵素である。PI ポリアミドは疾患の状態では転写活性が亢進した遺伝子発現を正常レベルまで戻す遺伝子制御能を持ち、通常の転写活性にある場合には影響を及ぼさないため、副作用の発現率は低いと考えられる。一方で、トルバプタンは水利尿による高ナトリウム血症や肝障害が重篤な副作用として知られており、またピオグリタゾン、オクトオレチド、ラパマイシンといった薬剤は、低血糖、消化器症状、易感染性などの副作用をきたす可能性がある。PI ポリアミドは副作用の面でも既存の治療薬に対して優位性があると考えている。また GSK3 β は、糖尿病やアルツハイマー型認知症においてその発現が亢進していることが知られており^(29,30)、これらの疾患の発症、進展に関与していると考えられている。GSK3 β に対する PI ポリアミドはこれらの疾患に対しても有効性を示す可能性もあり、将来的には ADPKD 以外の分野での応用も期待できる。

アンチセンス DNA や siRNA などの核酸医薬は、現在 10 種類近くが筋ジストロフィー、アミロイドーシス、ウイルス感染症などに対し国内外で承認されている。PI ポリアミドは核酸医薬より遅れて発見されており、国内では日本大学、京都大学、千葉県がんセンター、米国ではカルフォルニア工科大学とスクリプス研究所で研究が行われ、創薬開発が盛んになってきた。米国には MGB Biopharma や Gene Sciences といったベンチャー企業が PI ポリアミドの創薬を行っているが、まだ臨床試験に至っていない。その理由として中分子ペプチド化合物であるための大量合成と精製の困難さからと考えられるが、既存の核酸医薬と比べ代謝が安定であり、次世代の医薬として期待される。

本研究の限界として、実験数が十分でなく、サンプル数の少ない実験もあり、今回開発した PI ポリアミドの有効性を確立するには十分とは言えない。PI ポリアミドの有効性を正確に評価するために、PI ポリアミドとミスマッチポリアミドとの比較や、control vector 導入 M1 細胞と *PKDI* ノックダウン M1 細胞に対する効果の比較について検討する必要がある。また、今回はバソプレシン刺激を行う際、先行研究を参考に 1 μ M バソプレシンで実験を行っているが、実際の生体内のバソプレシン濃度は 1nM 以下と低濃度であり、より低い濃度のバソプレシンでの検討も重ねていく必要がある。

今後の方針として、GSK3 β に対する PI ポリアミドの ADPKD への効果を *in vivo* で評価するため、多発性嚢胞腎マウスを用いた実験を実施する予定である。具体的には、多発性嚢胞腎モデルマウス B6(Cg)-*Cys 1^{cpk}/J* (Jackson Laboratory, ME, USA) を用いて、GSK3 β PI ポリアミドの薬物動態、腎容積や生存率に対する効果、他の治療薬との効果比較などについて検討していきたいと考えている。福田らは、これまで TGF- β に対する PI ポリアミドがラットの腎障害、血管再狭窄、腹膜硬化症、角膜損傷、皮膚癒痕を抑制することを報告⁽⁴¹⁻⁴⁷⁾しており、疾患モデルにおける PI ポリアミドの遺伝子治療としての有用性を示してきた。多発性嚢胞腎モデルマウスにおいても、同様に PI ポリアミドの有用性が示され、ADPKD に対する新規遺伝子治療薬の創薬開発につなげていくことが今後の検証課題である。

【結論】

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、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た。また、PKDI ノックダウン M1 細胞において、GSK3 β PI ポリアミドはフォルスコリン刺激による細胞増殖能および囊胞径拡大を有意に抑制した。このことより、マウス GSK3 β プロモーターCREB 結合領域に対する PI ポリアミドは、ADPKD に対する新規遺伝子治療薬としての可能性を持つと考えられる。

【謝辞】

本研究にあたり、日本大学総合研究科学研究所教授福田昇先生には、研究全般において終始熱心かつ丁寧にご指導いただいた。ここに拝謝の意を表す。また、このような機会を与えていただいた日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野教授阿部雅紀先生に心より深謝する。日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野研究協力員常見明子氏には、研究全般において惜しみない協力を賜った。本研究は常見氏の献身的な協力なしには遂行し得なかったことを記すとともに、深甚なる感謝を申し上げる。また多くの援助をいただいた日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野医局員の皆様に、感謝の意を表す。

【図・表】

表 1. 方法 9 で使用したプローブ及びプライマー

GSK3 β (Probe 法)

probe: 5'-FAM-TCCACGGTCTCCAGCATTAGTATCTGAGGC-TAMRA-3'

sense: 5'-CCACCATCCTTATCCCTCCAC-3'

antisense: 5'-GCAGAAGCGGCGTTATTGG-3'

β -actin (Sybr green 法)

sense: 5'-CCACCATGTACCCAGGCATT-3'

antisense: 5'-CGGACTCATCGTACTCCTTGC-3'

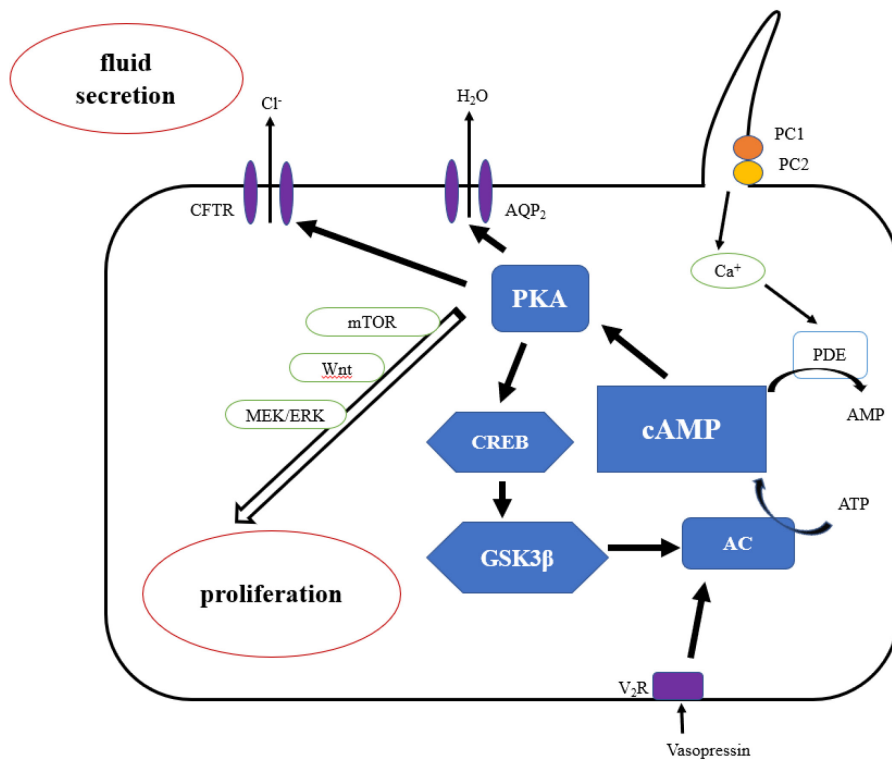


図 1. 嚢胞形成のメカニズム

ADPKD での嚢胞形成、拡大は、細胞の異常増殖、細胞極性障害、嚢胞液分泌貯留によって進行する。ADPKD において、PC-1、PC-2 変異による細胞内カルシウムイオン濃度の減少や V₂ 受容体を介したバソプレシンによる刺激で細胞内 cAMP 上昇がおき、それにより嚢胞形成が cAMP 依存性に引き起こされる。その過程において、CREB→GSK3β→adenyl cyclase→cAMP→protein kinase A→CREB の悪循環が存在する。(文献 18 より引用。一部改変。著作権に対する許諾を取得している。)

AC, adeny cyclase; PKA, protein kinase A; CREB, cAMP response element binding protein; GSK3β, glycogen synthase kinase 3β; PC, polycystin; AQP₂, aquaporin 2; V₂R, vasopressin type2 receptor; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

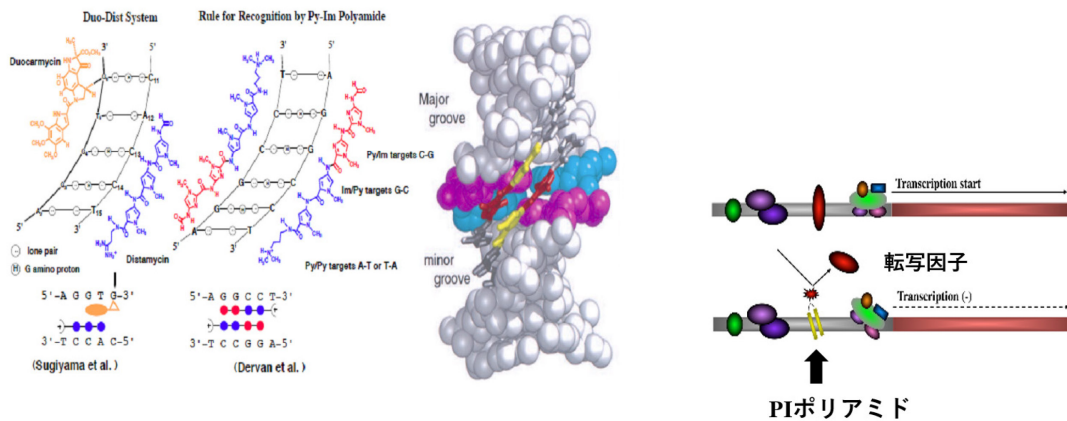


図 2. PI ポリアミドの遺伝子転写抑制原理

DNA 結合 PI ポリアミドは、Py/Im ペアが CG、Py/Py ペアは AT または TA、Im/Py ペアは GC を認識し、これにより任意の DNA の minor groove 塩基特異的に蛋白質より強力に結合し、DNA 二重螺旋構造に入り込んで、転写因子の結合を強力に阻害し転写を抑制する。(文献 43 より引用。著作権に対する許諾を取得している。)

PI, pyrrole imidazole.

CAGGTTTTAAAAATTACATTTACAATTGTTGCTGTGTGTGTGTGTGTCCACGTGTGGGC
 TTGTCTTGAACCTTGCATGGGCTGAGTCTGTCCCTTTTACCATGTGGTCTGAGCAITGCA
 AGTCA**TGTCGTCA**GGTTAGGCAGCAGGTACTTTTGCCCTGCACAGGCCACTCTGCCAGCTCT
 CAAACAGCCAAATTGTATATTCTCGGGCCTGGAGAGATAGCTCAGTGGTTAAGAACACTGG
 CTGTCTTTTATAGGATCCAGGTTCAATTCCAGCATCCCCATGACAGCTTACAACTGTCA
 GCAACTACAGTCCAGAGGATCTGATGCCCTCTGTAGGTACCAACATAGATATACATACA
 GAAGAAACACCCTATAGCCATTCAATTAARACAAATAAAATAAAAGTAGTATTCTAGGA
 TTGGGGATATGTCTCAGTGGTTAAAGTGTGAGGACCAGGGTCTAGATTTCTAGAACCCAC
 ATAAAAGCTGGGGTGCCTACCCTCCAAAATTGGGGACAGAGACAGGTAGATTCTTAGA
 GCTCACTGGCCAAATCAGTCTAGCCAAACGGGGAACTCTTGGGTGAGTAAGCTATCTGCC
 TTTTACTATTATTGTGTGACTGATGTGCCATGATGTACAGACCTGGAGGCCAGAAGAC
 AAGTTAATGGATTGGCCCTCTCCTTGGCCTTTAGGTGCATTCTGCAGACTGAATTTAGG
 TAGTCAGGCTTCTACAGCTAGCACTTTAGCAGAACTGGGGGATGTGGGACTGTACC
 GAGAGAAATGTGGAGTAGAGGCAAAGAACRAGGGATGTGAACCCCGGTTCTGTGCCCTTA
 ACTTTGTGGGTCTTGCAAAAATGAGTTAACTTTCAAGCGCACTAATACTTTTCCAGTA
 GTCCCTCACCATGTAGGAAGGCCAAAATGAGAGGTTTTCAAAGTCAGAAAACCGTACTGAC
 TGTTAAGTTTTCAGTATGTCTGTGGGTCCATATGGCCGACCCCCACTGAAACTCATGTA
 GATCAGGCTGGTCTTGAACCTCAGTGATTCATCTGCCCTCTGCAGTACTGGGATTAAGAG
 TGTTGCCCCACCACACTGGCTGGCTGTCTGTGTTTTTATAAATAAACTTTTCCCTCT
 CCAAGTCCATTTTGTGGACTGAAATATGATTTTTTCTATGAAAGATTTTTTTCRAAT
 TGAGTTAAAAATATCTGAAGGCCAACAAAAAGTTACTAATCAAAACCCCTAAGGTAGGCTA
 TTTTGAAGTAGTTTTATATACAAGAAATAGCCCGTTGCCAGTTTCTGCAACTAAACCC
 TTGTTATTACCTTCCCTGCTGTGATAAATTAGGTAGGGAGGATTTAAAGTTCTGCACCA
 GCAGTTTAGAACAGTGGCAAGGCTCTTTCATAATAGCATGGAGAGGCCACCATTCAAAATG
 ACAAAGTTGCCAAGCAAGGCCGCTGCTTTTAAAGATCTTTACCCCTCCCCCATGGCATCGG
 GCTACCTTATAGACGATTTTAAATGTGAAGAACRAGAGTCTCTTCTGCCTTGAGGCATA
 AAGTCTCCGATAAGGAAATGAGATTACAAAATGGCTGCCCTGTCCGGCACATTTTCCCTGG
 TTTTTTACTTTGTTGGTCTACGTGGTTTCGGCATAATCGGTTGCCAACACGTCAGATTTAG
 AGATCACACATAAAACTTCAACGTTATGGTTTTTGGTAATAAAAAAGGAGAGAGAG
 ATACGATTTTAAATGGTGGACCCCTTAAAGGCATGGATGGAAGTCCCGTTTCCACAT
 CATCTAACATTCCTATTGTCTTCCACCAGGCCGCTGTCATTGCTTTAATTGCCAGGCC
 CTACAGACATCTGAGTCTGCARACACTATCCAGACCTTTACTGGCTCCCTTCAAGCTTA
 CTTTGTCTGTCCCAAGTCCCTCATCAGATTTTAAAGCAATAGCTAAGCAATCTGATCAA
 GTACGTGTACTTTTACATGTCTTCTGGAGATAGCATCTCAACAGAAAGAGATGACTAT
 GCGGGTGGGTATTACAAGTATCACGGGATTACAGTCAGGATTGCCAGTGTCCACTCTAAC
 TTACTCTAGTCGTAGTACCCACGCCACACAGCTCTGGGATGGACCAGGCAATGGTCTCC
 TTTGTAGAACAATGGACGCTGGACTACATGTGAACCTACTTAGGCAGCAGTGTGCTGAT
 CATCCAATAACACTAAAAACTGCTGCGAGCAATCTGACTTGAAGTTCCTCCTAGGATTC
 GAGTACTGTCTGACCACATTTCCCTCACCTGTTTTCCGGGCTGCTTTTGGCTGGAC
 AGTCGCGCCCATGGACCGGCTCATCTAGCATGAGCTCATCTCTCGGGGGCGTTTCCAGA
 AGGCCCTGGTCTGGCCTTGTGGCCTGCTGCAAAGGGCTCCCCCCCCCCCCCAGGAT
 CAGCGGGCCCCCGCATGGGGGGGGCGGCTGCCAGAGGCTCTCCTTCTCTGGAAGCTT
 TGTCCCATTTAAGCGCTAGAGGTTTCGGCCCCGGCCACGGGCCCTACGCTCTTTCAGAG
 AATAGACGTTCTCATAGGCTCAGCACGGCGGTGGGGAGCCTCGGGCGCACTTGGTAAAGC
 CGCGCCCCCGGAGCTCCCGGAATGGGGACGGCTCACGCCCCACTAGAGCGCTCGGGG
 CCCGACCCCTCCGACCGCAGCATTGTGGACCGGCTGCACAGCCAGCACGAGCGTCCGCT
 CGGAAAGCAGATGCAGGCCAGCCACTCATCCCTTCGCCCCGCTTAGGGACCCACCCGAGGC
 CAATCCACTGCAGCTAGGTCTTGGGATTGCACAGCAGTGAGCGCTATTGGCCCGGCC
 ACGGGCTCCTGCACCCCTCTTCCCTTTTGGAGCTCCCTCCCGCGGCTCCAGCTCG
 ACGCTGCAGACCAATGAGATGGCACTTTATAGGTGCCCTCCCTCCGCTTTCTTCTTCC
 CCGCTCAAAGAGGGAGGGAGGCTCTGACTGGCCGATGTCTCGGAAGCCCTTCCC
 TTCACCAATCACCGAGAAAGGT**ACACGCCAGCGGAGTTGTCCAGCCAATGAGGAAACGG**

図 3. マウス GSK3β プロモーター領域の遺伝子配列

マウス GSK3β プロモーター領域の遺伝子配列を示す。青字で示した配列が EXON1 領域で、開始コドンは EXON4 に存在する。赤字で示した TGTCGTCA の配列が CREB 結合部位である。

Mouse GSK3 β Promoter CREB-2結合配列

-2969-AGCATGCAAGTGCATGTCGTCAGGTTAGGCAGCA- -2937

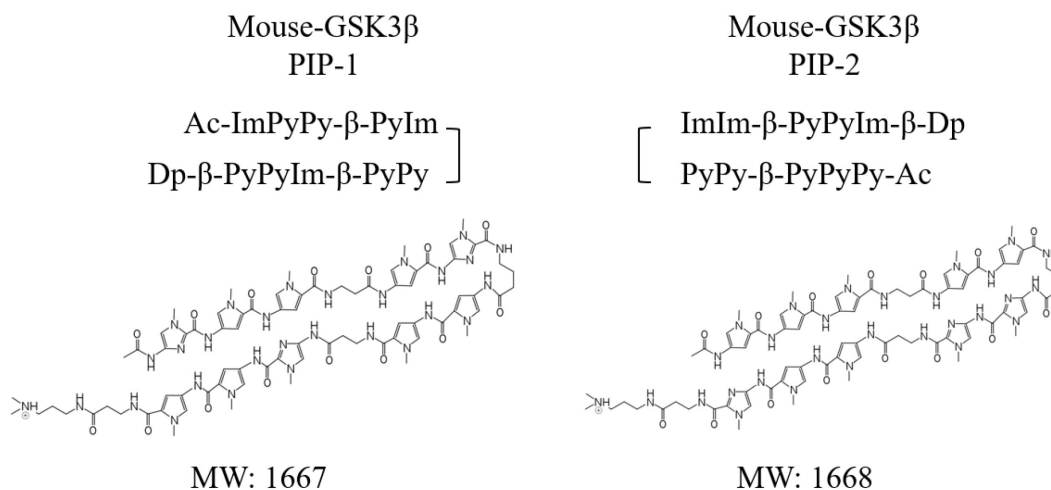


図 4. マウス GSK3 β の CREB 結合部位に対する PI ポリアミドの構造

マウス GSK3 β プロモーター領域に存在する CREB 結合部位 (赤字) に対して 2 種類の PI ポリアミド、PI ポリアミド-1 及び PI ポリアミド-2 を分子設計、合成した。GSK3 β プロモーター領域にまたがるよう青字の配列に対しそれぞれ PI ポリアミドを設計した。いずれもヘアピン型構造を呈する中分子化合物である。

PIP, pyrrole imidazole polyamide; MW, molecular weight.

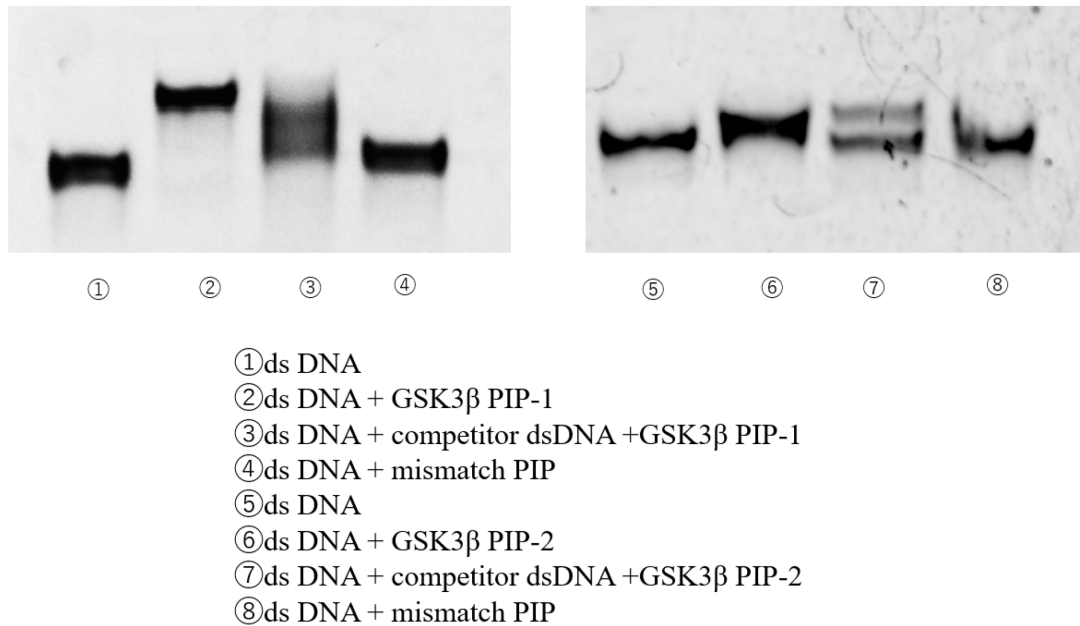


図 5. ゲルシフトアッセイによるターゲット配列へ結合

ゲルシフトアッセイでターゲットである GSK3β2 本鎖 DNA への結合を確認した。GSK3β 2 本鎖 DNA (①、⑤) に GSK3β PI ポリアミド-1 および PI ポリアミド-2 を添加するとバンドのシフトを認めた (②、⑥)。非特異的 DNA コンペティターを添加するとバンドのシフト減弱を認めた (③、⑦)。ミスマッチポリアミドではバンドのシフトは認めなかった。

PIP, pyrrole imidazole polyamide.

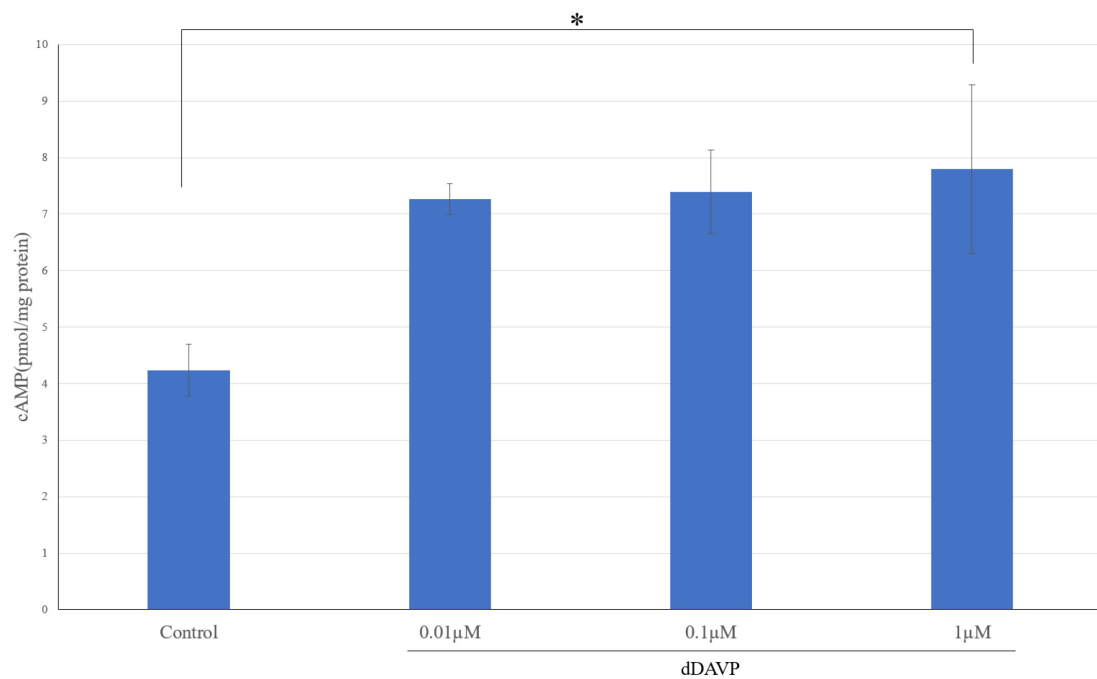


図 6. M1 細胞でのバソプレシン刺激に対する cAMP の産生

M1 細胞において、バソプレシン刺激での cAMP 産生を確認した。バソプレシン 1 μM の刺激において cAMP 濃度の有意な上昇を認めた。グラフは平均値±標準誤差 (n=3) で示している。(*p<0.05)

dDAVP, vasopressin.

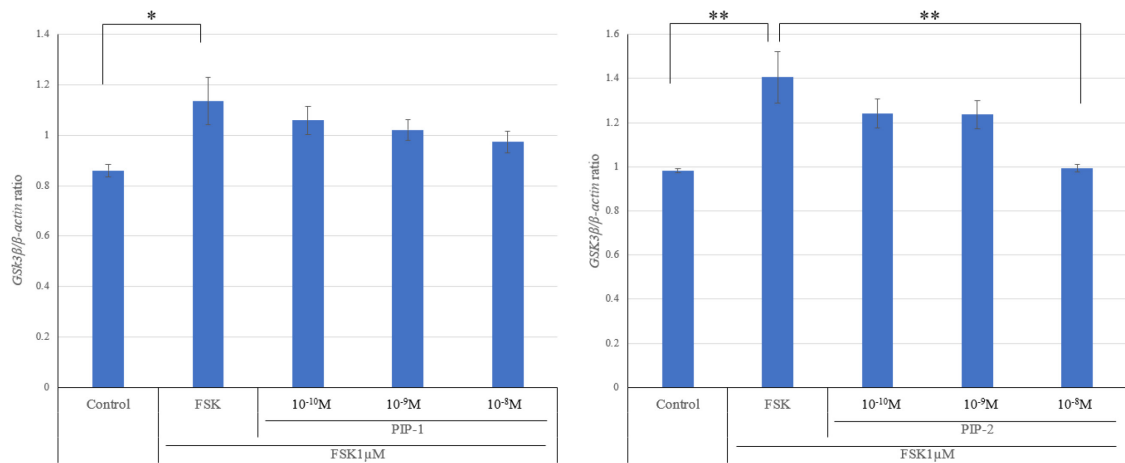


図7. M1細胞におけるフォルスコリン刺激による *GSK3β* mRNA 発現と *GSK3β* PI ポリアミドの効果

フォルスコリン刺激による *GSK3β* mRNA 発現と *GSK3β* PI ポリアミドの効果を検討した。フォルスコリン 1μM の刺激で、M1 細胞での *GSK3β* mRNA 発現は有意に増加した。 *GSK3β* PI ポリアミド-2 10⁻⁸M の濃度においてフォルスコリン刺激による *GSK3β* mRNA 発現を有意に抑制した。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。 (*p<0.05、**p<0.01)

PIP, pyrrole imidazole polyamide; FSK, forskolin.

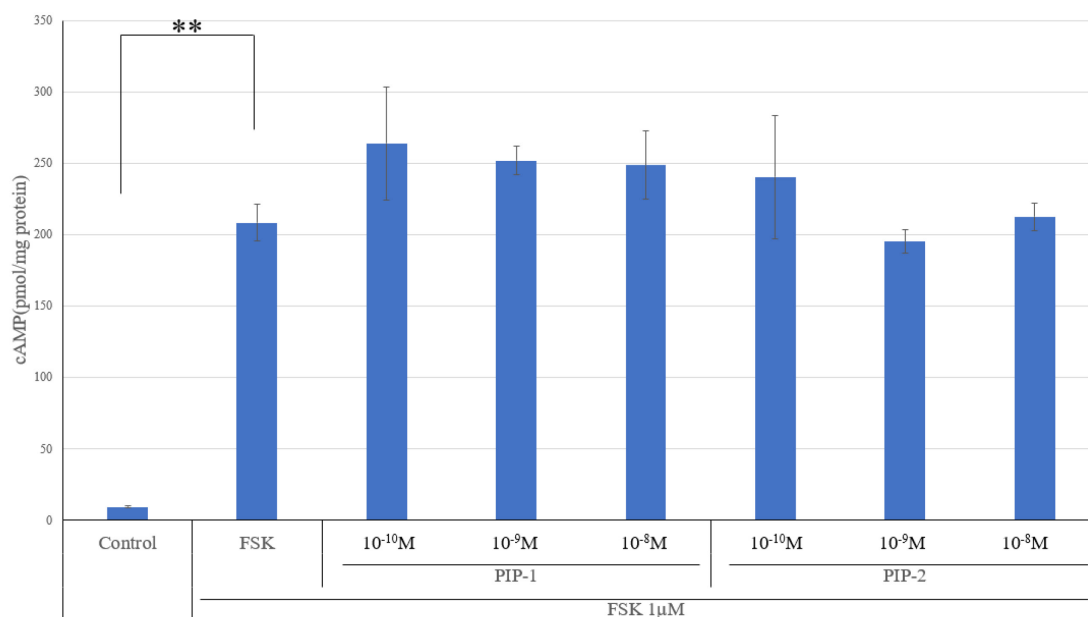


図 8. M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する cAMP の産生と GSK3β PI ポリアミドの効果

フォルスコリン刺激に対する M1 細胞の cAMP 産生とそれに対する GSK3β PI ポリアミドの効果を検討した。フォルスコリン刺激により、cAMP 産生は有意に増加した。グラフは平均値±標準誤差 (n=3) で示している。 (**p<0.01)

PIP, pyrrole imidazole polyamide; FSK, forskolin.

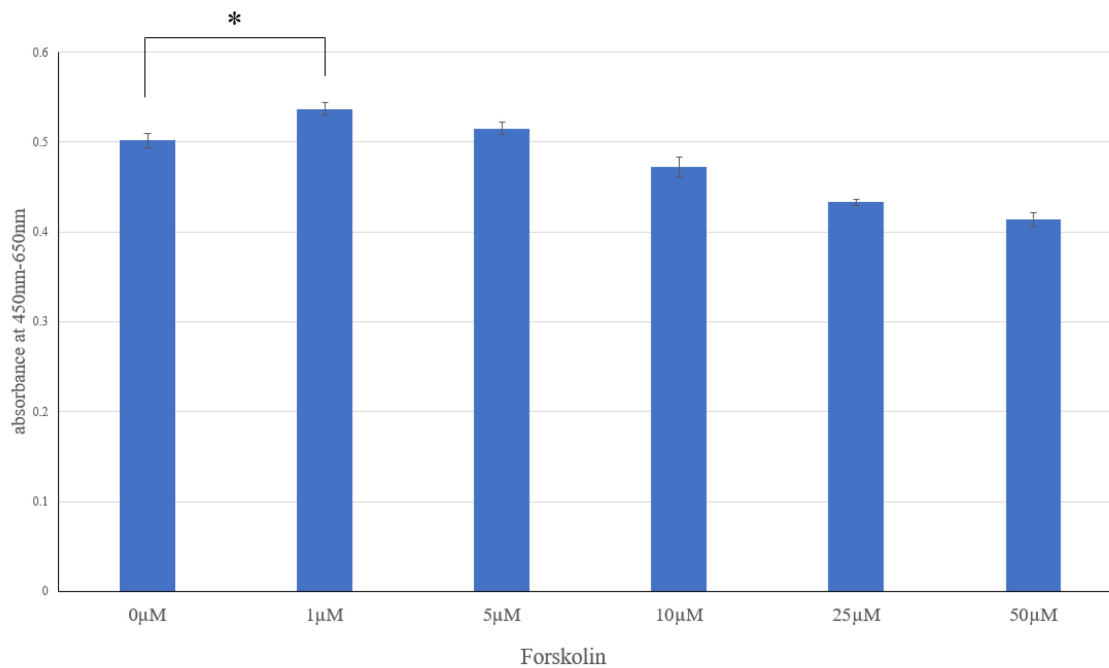


図 9. M1 細胞でのフォルスコリン濃度別刺激による細胞増殖能の検討

フォルスコリンを異なる濃度で刺激した際の、M1 細胞での細胞増殖能を検討した。フォルスコリン 1μM の刺激で細胞増殖能は有意に増大した。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。(*p<0.05)

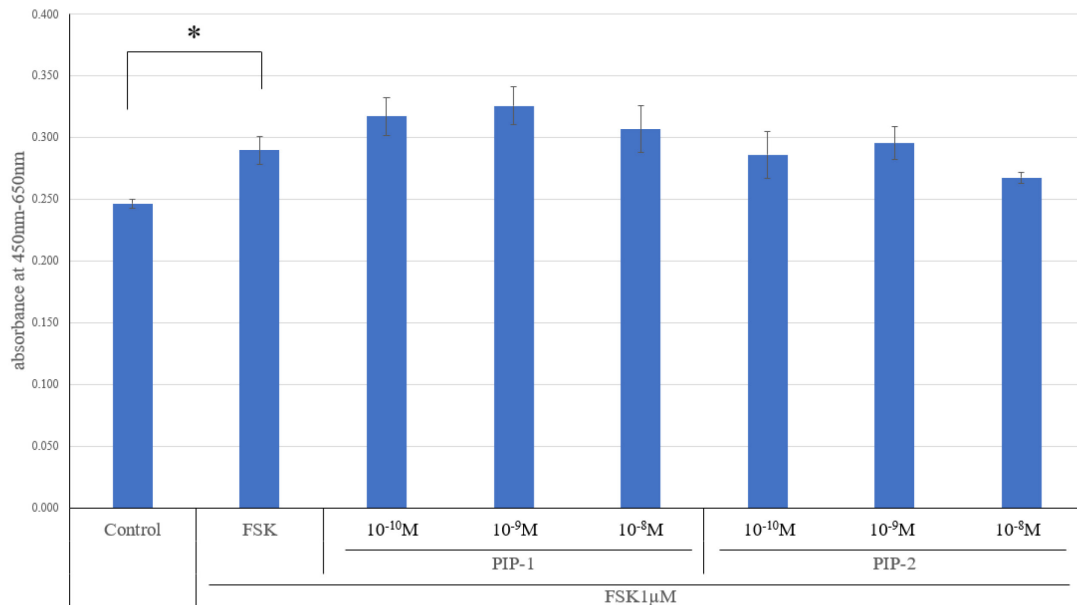


図 10. M1 細胞のフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能と GSK3β PI ポリアミドの効果

フォルスコリン刺激による M1 細胞の細胞増殖能とそれに対する GSK3β PI ポリアミドの効果を検討した。フォルスコリン刺激により、細胞増殖能は有意に増大した。GSK3β PI ポリアミドの細胞増殖能抑制は認めなかった。グラフは平均値±標準誤差 (n=8) で示している。(*p<0.05)

PIP, pyrrole imidazole polyamide; FSK, forskolin.

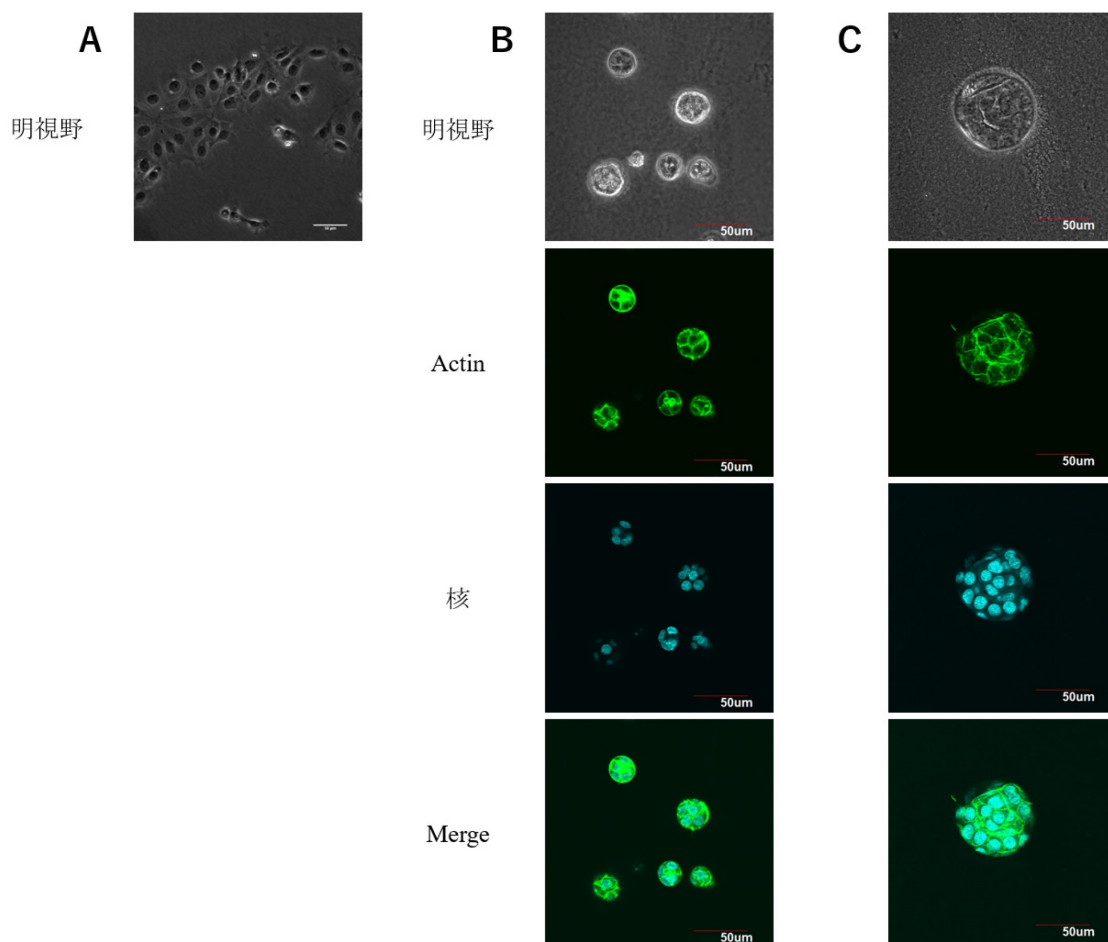


図 11. 嚢胞形成を誘導した M1 細胞の形態

M1 細胞をマトリゲル上で 3 次元培養し、嚢胞形成した形態を観察した。蛍光染色で F-アクチン（緑）と核（青）の染色を行った。明視野において方法 2 による培養の M1 細胞（A）と比較し、3 次元培養（B、C）では嚢胞の形成を認める。フォルスコリン刺激前（B）と比較し、フォルスコリン 1 μ M の刺激 5 日目（C）では、嚢胞の拡大と嚢胞内の細胞増殖に伴う核の増加を認める。

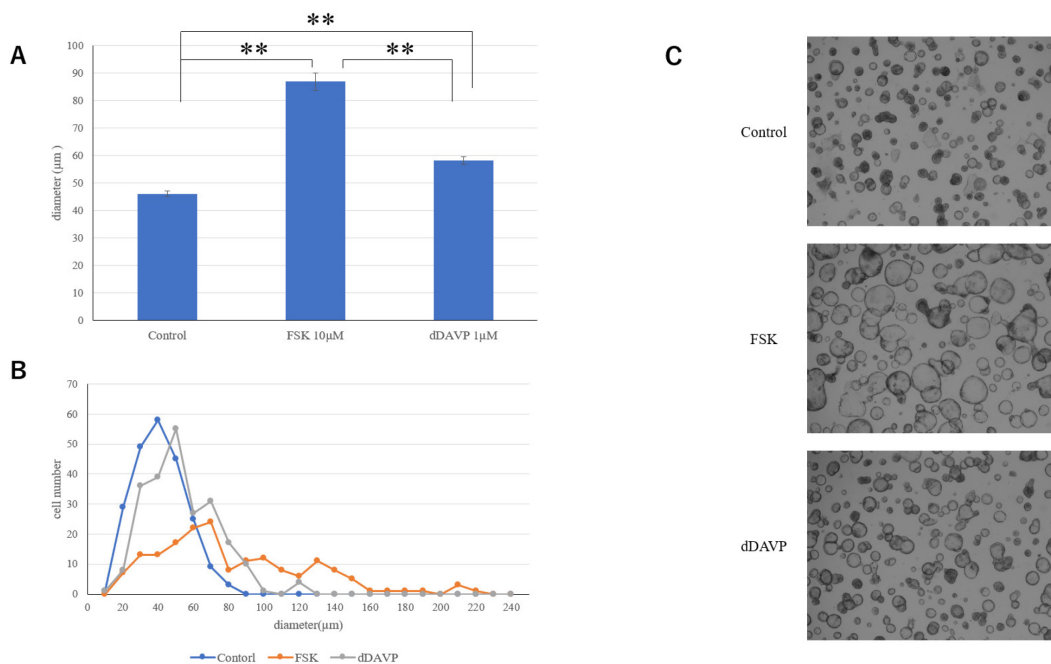


図 12. M1 細胞でのフォルスコリン刺激とバソプレシン刺激による囊胞形成能の比較

M1 細胞をマトリゲル上で 3 次元培養し、フォルスコリン、バソプレシン刺激に対する囊胞形成能を比較検討した。

A. フォルスコリン刺激 (n=172)、バソプレシン刺激 (n=228) とともに、刺激 5 日目で囊胞径はコントロール (n=218) と比較し有意に増大した。バソプレシン刺激に比較して、フォルスコリン刺激では有意に囊胞径増大を認めた。グラフは平均値±標準誤差で示している。 (**p<0.01)

B. 散布図を示す。フォルスコリン刺激、バソプレシン刺激で囊胞径の大きい細胞の数が増えている。

C. コントロール、フォルスコリン刺激、バソプレシン刺激の刺激後 5 日目の顕微鏡写真 (×40 倍) を示す。フォルスコリン刺激、バソプレシン刺激ともに囊胞の増大を認めている。

FSK, forskolin; dDAVP, vasopressin.

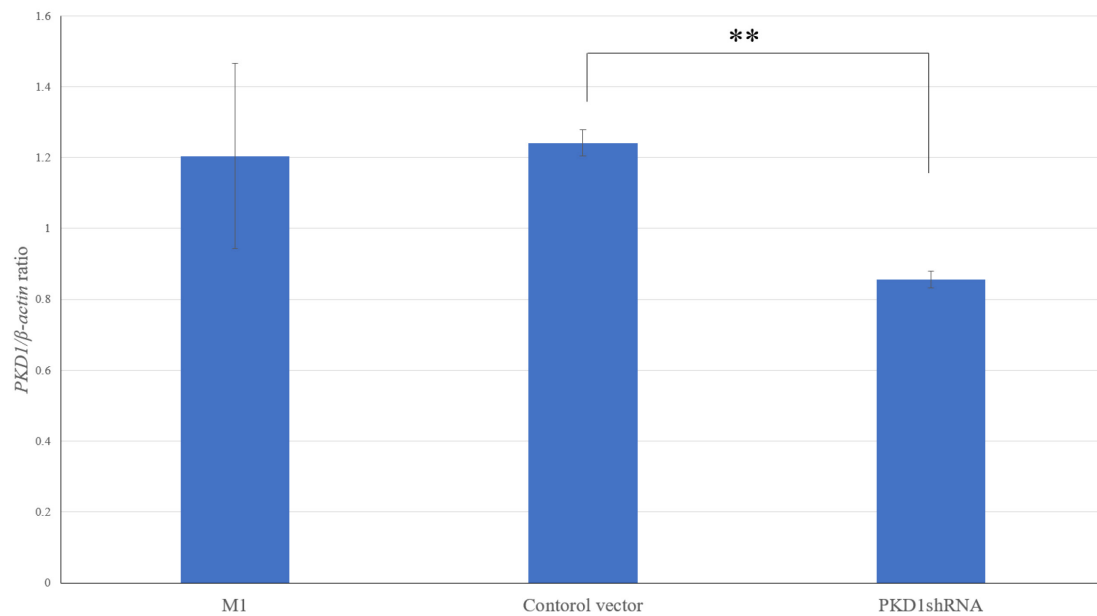


図 13. *PKD1* shRNA 導入 M1 細胞における *PKD1* mRNA の発現

PKD1 shRNA 導入 M1 細胞では、Control vector 導入 M1 細胞に比べ、*PKD1* mRNA 発現が有意に抑制された。グラフは平均値±標準誤差 (n=3) で示している。 (**p<0.01)

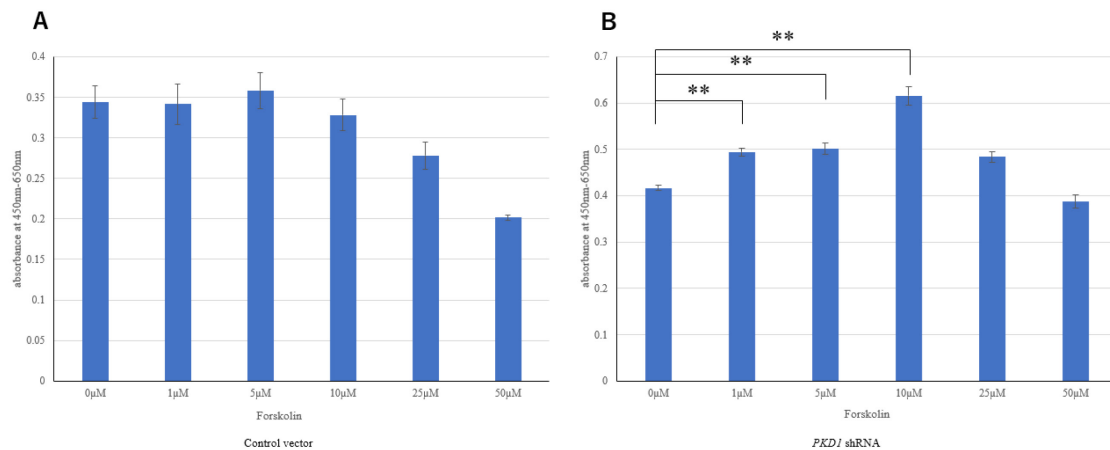


図 14. Control vector 導入 M1 細胞と *PKD1* ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン濃度別刺激による細胞増殖能の検討

Control vector 導入 M1 細胞と *PKD1* ノックダウン M1 細胞において、フォルスコリン濃度別の細胞増殖能を比較検討した。

A. Control vector 導入 M1 細胞においては、フォルスコリン刺激による有意な細胞増殖能増大は認めなかった。

B. *PKD1* ノックダウン M1 細胞では、フォルスコリン 10μM の刺激で細胞増殖能増大のピークを認めた。

グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。(**p<0.01)

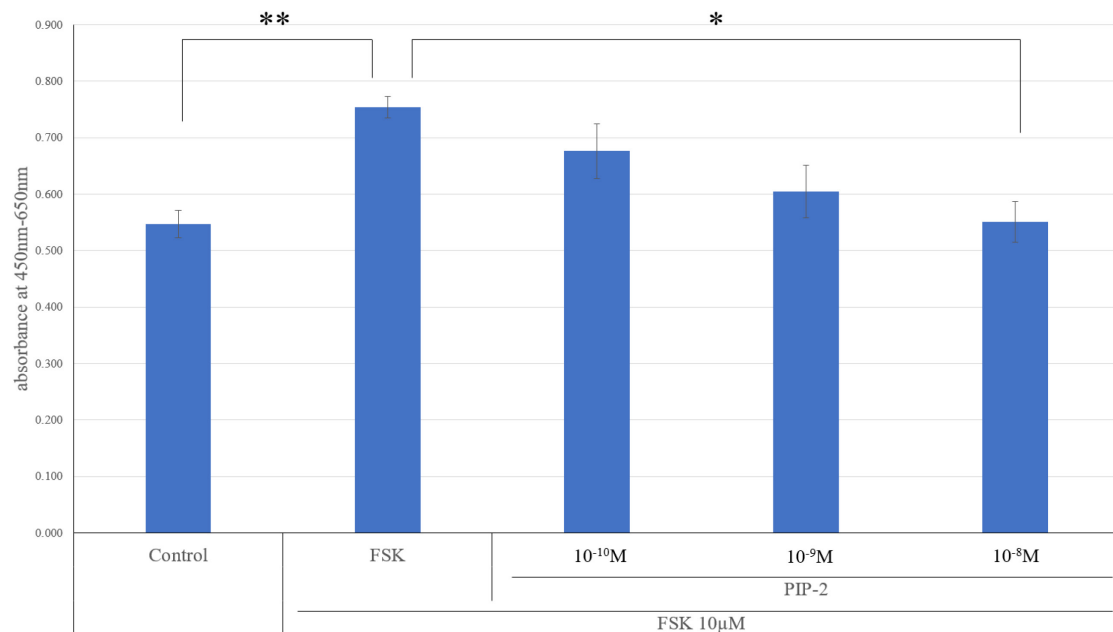


図 15. *PKD1* ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激に対する細胞増殖能と GSK3 β PI ポリアミドの効果

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に対する PI ポリアミドの効果を検討した。GSK3 β PI ポリアミド-2 10⁻⁸M の濃度において、フォルスコリン刺激による細胞増殖能増大を有意に抑制した。グラフは平均値 \pm 標準誤差 (n=8) で示している。(*p<0.05、**p<0.01)

PIP, pyrrole imidazole polyamide; FSK, forskolin.

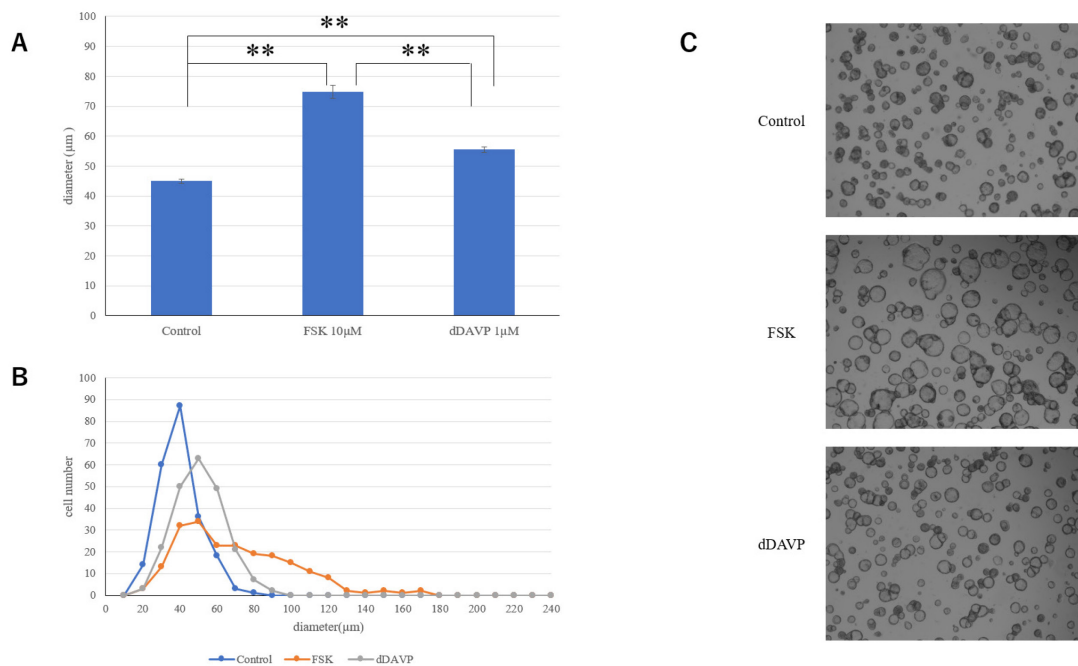


図 16. *PKD1* ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激とバソプレシン刺激による嚢胞形成能の比較

PKD1 ノックダウン M1 細胞をマトリゲル上で 3 次元培養し、フォルスコリン、バソプレシン刺激に対する嚢胞拡大を比較検討した。

A. フォルスコリン刺激 (n=216)、バソプレシン刺激 (n=206) とともにコントロール(n=218)と比較し有意に嚢胞径の拡大を認めた。フォルスコリン刺激は、バソプレシン刺激と比較し有意に嚢胞径は拡大した。グラフは平均値±標準誤差で示している。 (**p<0.01)

B. 散布図を示す。フォルスコリン刺激、バソプレシン刺激で嚢胞径の大きい細胞の数が増えている。

C. コントロール、フォルスコリン刺激、バソプレシン刺激それぞれの刺激後 5 日目の顕微鏡写真 (×40 倍) を示す。フォルスコリン刺激、バソプレシン刺激ともに嚢胞の拡大を認めている。

FSK, forskolin; dDAVP, vasopressin.

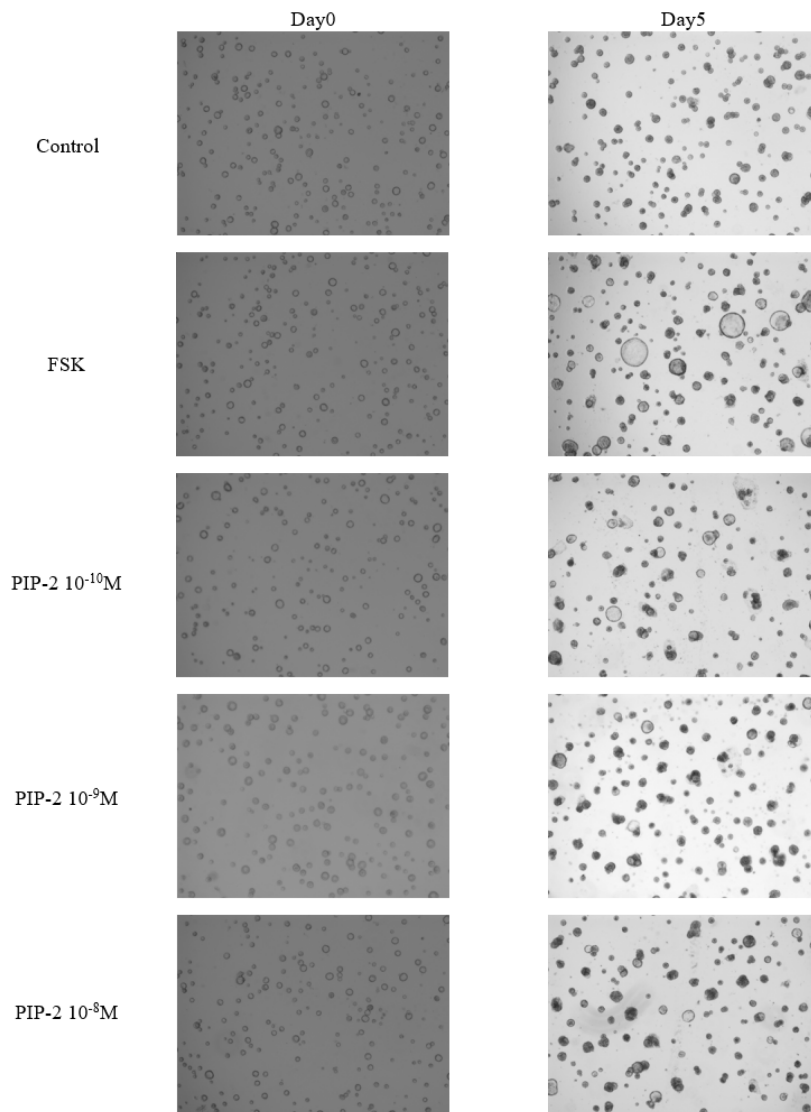


図 17. *PKD1* ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激による囊胞径拡大と GSK3 β PI ポリアミドの効果

コントロール、フォルスコリン刺激、10⁻¹⁰M、10⁻⁹M、10⁻⁸M の PI ポリアミド-2 添加における、それぞれのフォルスコリン刺激 0 日と 5 日目の顕微鏡画像 ($\times 40$ 倍) を示す。フォルスコリン刺激にて囊胞の拡大を認め、GSK3 β PI ポリアミド添加で囊胞拡大の抑制を認める。

FSK, forskolin; PIP, pyrrole imidazole polyamide.

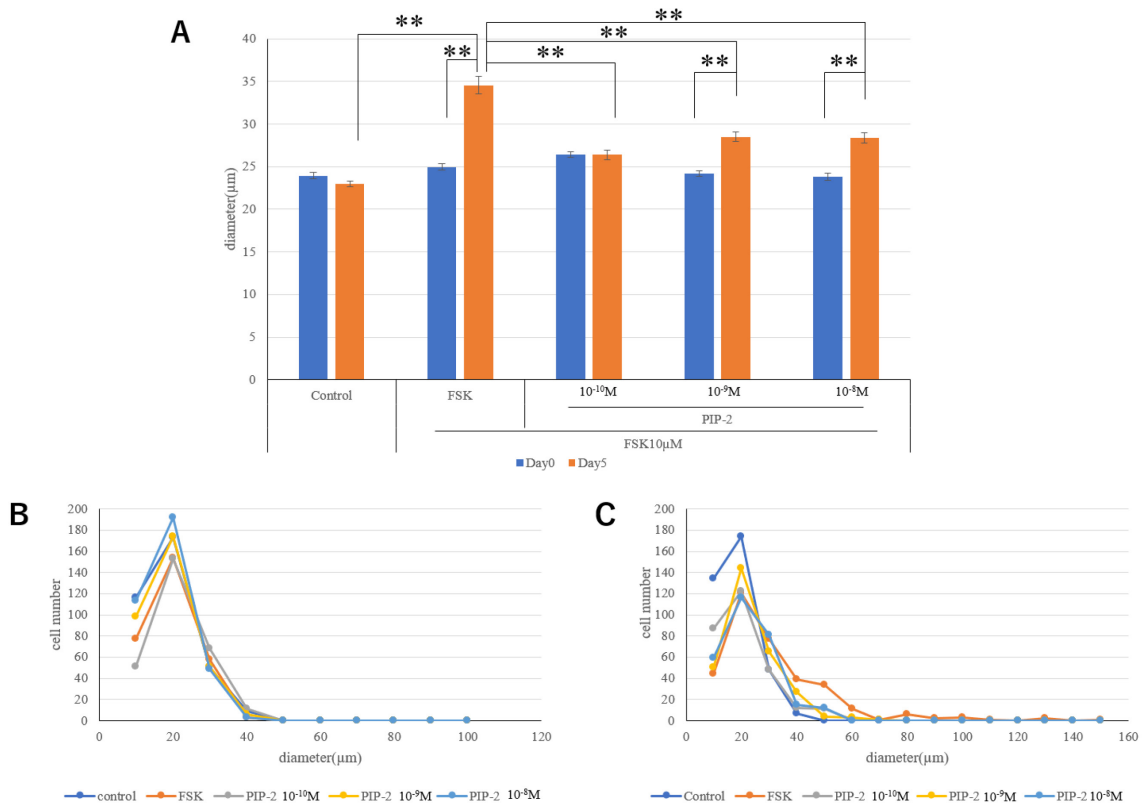


図 18. *PKD1* ノックダウン M1 細胞でのフォルスコリン刺激による囊胞径増大と GSK3β PI ポリアミドの効果

- A. 刺激 5 日目では、フォルスコリン刺激はコントロールと比較し、有意な囊胞径増大を認めた。GSK3β PI ポリアミド添加はいずれの濃度においてもフォルスコリン刺激による囊胞径増大を有意に抑制した。グラフは平均値±標準誤差 (Day0: Control n=348、FSK n=292、PIP-2 10⁻¹⁰M n=283、PIP-2 10⁻⁹M n=329、PIP-2 10⁻⁸M n=359、Day5: Control n=364、FSK n=341、PIP-2 10⁻¹⁰M n=281、PIP-2 10⁻⁹M n=294、PIP-2 10⁻⁸M n=284) で示している。 (**p<0.01)
- B. 刺激 0 日の散布図を示す。囊胞径による分布に差は認めない。
- C. 刺激 5 日目の散布図を示す。フォルスコリン刺激で、囊胞径の大きい細胞の数が増加し、GSK3β PI ポリアミド添加で囊胞径が大きい細胞の数は減少している。

FSK, forskolin; PIP, pyrrole imidazole polyamide.

【引用文献】

1. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*. 2007; 369: 1287–1301.
2. Hughes J, Ward CJ, Peral B, et al. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet*. 1995; 10: 151-160.
3. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*. 1996; 272: 1339-1342.
4. Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, et al. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet*. 2002; 30: 259-269.
5. Mizoguchi M, Tamura T, Yamaki A, et al. Genotypes of autosomal dominant polycystic kidney disease in Japanese. *J Hum Genet*. 2002; 47: 52-54.
6. Reed B, Nobakht E, Dadgar S, et al. Renal ultrasonographic evaluation in children at risk of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2010; 56: 50-56.
7. Grantham JJ, Chapman AB, Torres VE. Volume progression in autosomal dominant polycystic kidney disease: the major factor determining clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006; 1: 148-157.
8. Higashihara E, Nutahara K, Kojima M, et al. Prevalence and renal prognosis of diagnosed autosomal dominant polycystic kidney disease in Japan. *Nephron*. 1998; 80: 421-427.
9. 日本透析医学会. わが国の慢性維持透析療法の現況(2017年12月31日現在).

透析会誌. 2018; 51: 699-766.

10. Yodar BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 2508-2516.
11. Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK cell primary cilium increase intracellular calcium. *J Membr Biol.* 2001; 184: 71-79.
12. Praetorius HA, Spring KR. The renal cell primary cilium function as a flow sensor. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003; 12: 517-520.
13. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 2003; 33: 129-137.
14. Noda Y, Sasaki S. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel disease: molecular mechanism of water channel aquaporin-2 trafficking. *J Pharmacol Sci.* 2004; 96: 249-254.
15. Yamaguchi T, Pelling JC, Ramaswamy NT, et al. cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney Int.* 2000; 57: 1460-1471.
16. Hanaoka K, Guggino WB. cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 1179-1187.
17. Reif GA, Yamaguchi T, Nivens E, et al. Tolvaptan inhibits ERK-dependent cell proliferation, Cl⁻ secretion, and in vitro cyst growth of human ADPKD cells stimulated by vasopressin. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 301: F1005-1013
18. Devuyst O, Torres VE. Osmoregulation, vasopressin and cAMP signaling in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013; 22: 459-470.

19. Torres VE, Harris PC. Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25: 13-32.
20. Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, et al. Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol.* 2002; 12: R378-380.
21. Hanaoka K, Devuyst O, Schwiebert EM, et al. A role for CFTR in human autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol.* 1996; 270: C389-399.
22. Fuller CM, Benos DJ. CFTR! *Am J Physiol Cell Physiol.* 1992; 263: C267-286.
23. De Lemos Barbosa CM, Souza-Menezes J, Amaral AG, et al. Regulation of CFTR expression and arginine vasopressin activity are dependent on polycystin-1 in kidney derived cells. *Cell physiol Biochem.* 2016; 38: 28-39.
24. Woodgett JR, Force T. Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development. *J Biol Chem.* 2009; 284: 9643-9647.
25. Howard C, Tao S, Yang HC, et al. Specific deletion of glycogen synthase kinase-3 β in the renal proximal tubule protects against acute nephrotoxic injury in mice. *Kidney Int.* 2012; 82; 1000-1009.
26. Singh SP, Tao S, Fields TA, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition attenuates fibroblast activation and development of fibrosis following renal ischemia-reperfusion in mice. *Dis Model Mech.* 2015; 8: 931-940.
27. Norregaard R, Tao S, Nilsson L, et al. Glycogen synthase kinase 3 α regulates urine concentrating mechanism in mice. *Am J Physiol renal Physiol.* 2015; 208: F650-660.
28. Wang Z, Havasi A, Gall J, et al. GSK3 β promotes apoptosis after renal ischemic

- injury. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 284-294.
29. Lau KF, Miller CG, Anderton BH, et al. Molecular cloning and characterization of the human glycogen synthase kinase-3 β promoter. *Genomics*. 1999; 60: 121-128
 30. Hanger DP, Hugh K, Woodgett JR, et al. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localization of the kinase. *Neurosci Lett*. 1992; 147: 58-62.
 31. Walz A, Ugolkov A, Chandra S, et al. Molecular pathways: Revisiting glycogen synthase kinase-3 β as a target for the treatment of cancer. *Clin Cancer Res*. 2017; 23: 1891-1897.
 32. Tao S, Kakade VR, Woodgett JR, et al. Glycogen synthase kinase-3 β promotes cyst expansion in polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2015; 87: 1165-1175.
 33. Kakade VR, Tao S, Rajagopal M, et al. A cAMP and CREB-mediated feed-forward mechanism regulates GSK3 β in polycystic kidney disease. *J Mol Cell Biol*. 2016; 8: 464-476.
 34. Gattone VH, Wang X, Harris PC, et al. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med*. 2003; 9: 1323-1326.
 35. Muto S, Aiba A, Saito Y, et al. Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet*. 2002; 15: 1731-1742.
 36. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, et al. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 2012; 367: 2407-2418.
 37. Muto S, Kawano H, Higashihara E, et al. The effect of tolvaptan on autosomal dominant polycystic kidney disease patients: a subgroup analysis of the Japanese

- patient subset from TEMPO 3:4 trial. *Clin Exp Nephrol*. 2015; 10: 866-877.
38. Hetal I. Polycystic kidney disease. Brisbane. Codon Publications. 2015. Chapter 3.
 39. Trauger JW, Baird EE, Dervan PB. Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations. *Nature*. 1996; 382: 559-561.
 40. Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem*. 2001; 9: 2215-2235.
 41. Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting the TGF-beta1 promoter for treatment of progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 422-432.
 42. Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole-imidazole targeting of the transforming growth factor-beta1 promoter. *Kidney Int*. 2011; 79: 46-56.
 43. Yao EH, Fukuda N, Ueno T, et al. A pyrrole-imidazole targeting transforming growth factor-beta1 inhibits restenosis and preserves endothelialization in the injured artery. *Cardiovasc. Res*. 2009; 81: 797-804.
 44. Serie K, Fukuda N, Nakai S, et al. Pyrrole-imidazole polyamide targeting transforming growth factor-beta1 ameliorates encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Intl*. 2012; 32: 462-472
 45. Chen M, Matsuda H, Wang L, et al. Pretranscriptional regulation of Tgf-beta1 by PI polyamide prevents scarring and accelerates wound healing of the cornea after exposure to alkali. *Mol Her*. 2010; 18: 519-527.
 46. Washio H, Fukuda N, Matsuda H, et al. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole-imidazole, targeting the TGF-beta1 promoter. *J Invest Dermatol*. 2011; 131: 1987-1995.

47. Otsuki M, Fukuda N, Inoue T, et al. Preclinical study of DNA-recognized peptide compound pyrrole-imidazole polyamide targeting human TGF- β 1 promoter for progressive renal diseases in the common marmoset. *Molecule*. 2019; 24: E3178.
48. Soos BA, Naray-Fejes-Toth A, Carretero OA, et al. Characterization of a mouse cortical collecting duct cell line. *Kidney Int*. 1991; 39: 1168-1175.
49. Gonzalez AA, Cifuentes-Araneda F, Ibaceta-Gonzalez C, et al. Vasopressin/V2 receptor stimulates renin synthesis in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016; 310: F284-293.
50. Putnam WC, Swenson SM, Reif GA, et al. Identification of a forskolin-like molecule in human renal cysts. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 934-943
51. Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, et al. Preclinical study of novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting human TGF- β 1 Promoter for hypertrophic scars in a common marmoset primate model. *PLoS One*. 2015; 10: e0125295.
52. Takiar V, Nishio S, Seo-Mayer P, et al. Activating AMP-activated protein kinase (AMPK) slows renal cystogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2011; 108: 2462-2467.
53. Caroli A, Perico N, Perna A, et al. Effect of longacting somatostatin analogue on kidney and cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease (ALADIN): a randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2013; 382: 1485-1495.
54. Shillingford JM, Piontek KB, Germino GG, et al. Rapamycin ameliorates PKD resulting from conditional inactivation of Pkd1. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 489-497.

研究業績

馬場 晴志郎

I 発表	①一般発表	17 (共 9)
	②特別発表	なし
II 論文	①原著論文	1 (共 1)
	②症例報告	なし
	③総説	1
III 著書		2

以上

I 発表

① 一般発表

1. 及川治、馬場晴志郎、岡村雅広、古川哲也、堀越周、阿部雅紀、岡田一義、相馬正義: 血液透析患者におけるクエン酸第二鉄水和物のシナジー効果: 第 58 回日本腎臓学会学術集会総会、横浜、2016 年 6 月
2. 大野迪子、及川治、堀越周、鈴木紘子、馬場晴志郎、小熊秀隆、中村吉宏、阿部雅紀、岡田一義、相馬正義、樋口輝美: HD 導入期アナフィラキシーショック後に心停止を来たし、蘇生に成功した一例: 第 58 回日本腎臓学会学術集会総会、横浜、2016 年 6 月
3. 宇都宮慧、及川治、堀越周、馬場晴志郎、鈴木紘子、小林洋輝、大月伯恭、林田迪子、小熊秀隆、中村吉宏、鈴木敏子、岡村真喜誉、阿部雅紀、岡田一義、相馬正義: 両腎摘出後に内シャント感染から感染性心内膜炎を併発した HD 患者の 1 剖検例: 第 61 回日本透析医学会学術集会総会、大阪、2016 年 6 月
4. 及川治、馬場晴志郎、岡村雅広、古川哲也、堀越周、森内正理、東龍英、鄭立晃、大月伯恭、根岸英理子、高島弘至、丸山高史、丸山範晃、井下篤司、阿部雅紀、岡田一義、相馬正義: 血液透析患者におけるクエン酸第二鉄水和物の臨床効果: 第 61 回日本透析医学会学術集会総会、大阪、2016 年 6 月
5. 大野迪子、及川治、堀越周、鈴木紘子、馬場晴志郎、小熊秀隆、中村吉宏、岡田一義、阿部雅紀、樋口輝美: HD 導入期アナフィラキシーショック後に心

停止を来たし、蘇生に成功した一例: 第 46 回日本腎臓学会東部学術大会、東京、2016 年 10 月

6. Seishiro Baba, Tomoyasu Otsuki, Kazuyoshi Okada, Masanori Abe. Levocarnitine Injections Decrease the Need for Erythropoiesis Stimulating Agents in Hemodialysis Patients with Renal Anemia. American Society of Nephrology Kidney Week, Chicago, 2016.11.
7. Tomoyasu Otsuki, Masanori Abe, Seishiro Baba, Noriaki Maruyama, Kazuyoshi Okada. Efficacy and Safety of Pregabalin for the treatment of Neuropathic Pain in Patients Undergoing Hemodialysis. American Society of Nephrology Kidney Week, Chicago, 2016.11.
8. Seishiro Baba, Michiko Ohno, Makiyo Okamura, Toshiko Suzuki, Kei Utsunomiya, Hiroyuki Takashima, Kazuyoshi Okada, Masanori Abe. Levocarnitine Decreases the Need for Erythropoiesis Stimulating Agents and Erythropoiesis Resistance Index in Patients Undergoing Hemodialysis. 24th World Congress of Nephrology, Mexico City, 2017.4.
9. 岡村真喜誉、馬場晴志郎、丸山高史、及川治、樋口輝美、岡田一義、阿部雅紀: 維持透析患者の腎性貧血に対するレボカルニチン注射の有用性の検討: 第 62 回日本透析医学会学術集会総会、横浜、2017 年 6 月
10. 馬場晴志郎、福田昇、常見明子、岡村真喜誉、大野迪子、阿部雅紀: 多発性嚢胞腎への新規バイオ医薬としての GSK3 β に対する PI ポリアミドの開発: 第 60 回日本腎臓学会学術集会総会、新潟、2018 年 6 月

11. 馬場晴志郎、福田昇、常見明子、大野迪子、阿部雅紀: 多発性嚢胞腎への新規バイオ医薬としての GSK3 β に対する PI ポリアミドの開発: 第 41 回日本高血圧学会総会、旭川、2018 年 9 月
12. 馬場晴志郎、福田昇、常見明子、大野迪子、阿部雅紀: 多発性嚢胞腎への新規バイオ医薬としての GSK3 β に対する PI ポリアミドの開発: 第 61 回日本腎臓学会学術集会総会、名古屋、2019 年 6 月
13. 川本俊輔、北井真貴、秋谷友里恵、古川哲也、堀越周、馬場晴志郎、奈倉千苗美、吉田好徳、阿部雅紀: 重症血小板減少症の末期腎不全患者に対し腹膜透析を導入し得た 1 例: 第 64 回日本透析医学会学術集会総会、横浜、2019 年 6 月
14. 馬場晴志郎、福田昇、常見明子、大野迪子、阿部雅紀: GSK3 β に対する転写抑制 PI ポリアミドの多発性嚢胞腎への効果の検討: 第 27 回嚢胞性腎疾患研究会、東京、2019 年 10 月
15. 大野迪子、福田昇、常見明子、深澤みゆき、馬場晴志郎、阿部雅紀: 多発性嚢胞腎疾患特異的 iPS 細胞からの腎臓オルガノイドを用いた多発性嚢胞腎への個別医療: 第 27 回嚢胞性腎疾患研究会、東京、2019 年 10 月
16. 馬場晴志郎、福田昇、常見明子、大野迪子、阿部雅紀: GSK3 β に対する遺伝子制御薬 PI ポリアミドの多発性嚢胞腎への効果の検討: 第 42 回日本高血圧学会総会、東京、2019 年 10 月
17. 馬場晴志郎、福田昇、常見明子、大野迪子、及川治、阿部雅紀: 多発性嚢胞

腎に対するGSK3β転写抑制PIポリアミドの創薬開発: 第10回腎不全研究会、
東京、2019年12月

② 特別発表

なし

II 論文

① 原著論文

1. Masanori Abe, Takashi Maruyama, Noriaki Maruyama, Seishiro Baba, Hiroyuki Takashima Tomoyasu Otsuki, Terumi Higuchi. Efficacy of levocarnitine supplementation in improving lean body mass and physical function in patients on hemodialysis: A randomized controlled trial. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 34(1): i292-i304, 2019.

② 症例報告

なし

③ 総説

1. 馬場晴志郎、阿部雅紀: 8. 急性血液浄化 Slow low-efficiency daily dialysis(SLEDD): 腎と透析, 83(3): 395-400, 2017.

III 著書

1. 馬場晴志郎、阿部雅紀: V糖尿病・代謝・栄養 Q2. 透析患者ではインスリン

製剤の適応はどうなっていますか？また、どのように使えばよいですか？：
いまさら訊けない！透析患者薬剤の考えかた、使いかた Q&A Ver.2.（加藤
明彦 編著）Page 224-230、中外医学社、東京、2017年12月

2. 馬場晴志郎、阿部雅紀: IV. 合併症に対する薬物治療 1. なかなか高血糖が改
善しない。次の糖尿病治療薬はどうする?: CKD 患者の薬物治療 最初の一手
と次の一手（加藤明彦 編集）Page191-198、文光堂、東京、2018年3月

馬場晴志郎、阿部雅紀: IV. 合併症に対する薬物治療 2. 最近低血糖症状が増
えてきた。対策はどうする?: CKD 患者の薬物治療 最初の一手と次の一手
（加藤明彦 編集）Page199-204、文光堂、東京、2018年3月