



Title	A low affinity vasopressin V2-receptor gene in a kindred with X-linked nephrogenic diabetes insipidus
Author(s)	横山, 建二
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39496
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	横 山 建 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 2 5 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 2 月 2 2 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	A low affinity vasopressin V2 - receptor gene in a kindred with X - linked nephrogenic diabetes insipidus (伴性遺伝性腎性尿崩症家系におけるバゾプレッシン V2 受容体遺伝子異常の同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 鎌 田 武 信 (副査) 教 授 松 沢 佑 次 教 授 安 東 明 夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

腎集合管ではバゾプレッシン (AVP) 依存性に選択的な水の再吸収が行われている。遺伝性腎性尿崩症は集合管の AVP に対する反応性低下のための水再吸収低下をきたし、生下時より多飲多尿を呈する疾患である。本症の大多数が伴性劣性遺伝であることから、原因遺伝子は X 染色体上に存在すると考えられてきた。近年、腎集合管での水再吸収に重要な役割をしていると考えられる AVP 受容体 (V2 受容体) 遺伝子がクローニングされ、X 染色体短腕上に位置することが明らかにされた。そこで、腎性尿崩症と診断され、かつ家系内に多飲・多尿を呈する者が多くいる患者について、V2 受容体遺伝子解析および患者 V2 受容体の機能について検討した。

【方法ならびに成績】

[患者家系]

患者は 46 才の男性で、水制限試験, pitressin 負荷試験によって尿量低下をきたさないことから、腎性尿崩症と診断された。また、家系調査によって、多飲多尿を呈する者が患者の祖父、男の同胞、女の同胞の男児に認められた。このことから、伴性劣性遺伝形式をとる遺伝性腎性尿崩症が強く疑われた。

[患者 V2 受容体遺伝子の解析]

患者あるいは健常人末梢血より単核細胞を分離し、全 DNA を採取した。互いに overlap し、かつ V2 受容体遺伝子の全長をカバーするように作成した 3 種類のプライマーの組み合わせによって、それぞれの V2 受容体遺伝子を PCR 法によって増幅し、サブクローニングしたのち dideoxy 法あるいはオートシーケンサーにて塩基配列を同定した。シーケンスは、各々 3 つ以上のクローンで行い、いずれも同一の塩基配列であることを確認した。患者 V2 受容体遺伝子には、塩基の欠失や挿入は認められなかったが、641 位のアデニンがグアニンに置換していた。その結果、患者 V2 受容体では細胞外第 3 ドメインに存在する 205 位のチロシンがシステインに変化していた。なお、患者母親は、正常 V2 受容体遺伝子と上記の異常 V2 遺伝子をあわせもつヘテロ接合体であった。

[患者 V2 受容体の機能解析]

1. [患者 V2 受容体 cDNA の作成]

患者 V2 受容体遺伝子にみられた塩基置換が受容体機能異常をひきおこすかどうかを検討するため、正常および変異 V2 受容体の cDNA を調整した。正常 V2 受容体の cDNA は、腎癌患者の摘出腎から得た正常腎組織より全 RNA を抽出し、V2 受容体の 5' 側および 3' 側 non-coding 領域をプライマーとした RT-PCR 法によってクローニングした。患者 V2 受容体の cDNA は、site-directed mutagenesis 法により作成し、それぞれシーケンスにより正常および患者 V2 受容体 cDNA の塩基配列であることを確認した。

正常および患者 V2 受容体 cDNA を発現ベクターである pSVL に挿入し、COS 細胞へのトランスフェクションに用いた。

2. [正常および患者 V2 受容体蛋白の COS 細胞への発現]

COS 細胞は 10% FCS 添加 DMEM 培地で培養した。subconfluent 状態の COS 細胞に、リン酸カルシウム共沈澱法によって、それぞれの pSVL ベクターをトランスフェクションした。導入 24 時間後に 24 well plate に 1.0×10^6 cells / well の密度で継代した。継代 24 時間後に、以下の実験に供した。

3. [患者 V2 受容体の結合実験]

種々の濃度の [3 H] 標識 AVP を含む無血清培地を各 well に加え、4°C で 2 時間 incubate した後、NaOH で細胞を溶解した。HCl にて中和した後、細胞溶液の放射能を計測し、総 AVP 結合とした。また、同時に 1 μ M の未標識 AVP を加えた以外は同じ条件で実験を行い、この [3 H] 標識 AVP 結合を非特異的結合とした。総 AVP 結合と非特異的結合の差を特異的結合とし、Schatchard 解析を行った。

正常 V2 受容体の K_d が 1.8 nM であったのに対し、患者 V2 受容体の K_d は 19.8 nM と、患者 V2 受容体では AVP に対する親和性が約 1/10 に低下していた。しかし、COS 細胞膜上の受容体数は、正常 V2 受容体、患者 V2 受容体ともに約 8000 個/細胞で、差は認められなかった。

3. [患者 V2 受容体を発現した細胞での cAMP 産生能]

次に、V2 受容体の second messenger である cAMP 産生能が、患者 V2 受容体を発現している COS 細胞で保たれているかどうかを検討した。継代 24 時間後に種々の濃度の AVP を含む無血清培地を加え、37°C で 10 分間 incubate した。cAMP は ELISA 法によって測定した。

正常 V2 受容体を発現している細胞では、細胞内 cAMP は 0.1 nM の AVP から増加し始め、AVP の濃度依存性に増加し、1 nM でプラトーに達した。一方、患者 V2 受容体を発現している細胞では、10 nM 以上もの高濃度の AVP でのみ僅かに細胞内 cAMP が増加した。

【総括】

本研究では、臨床的に遺伝性腎性尿崩症と診断された患者において V2 受容体遺伝子上に点変異が存在することを見出した。この遺伝子異常のために患者 V2 受容体では AVP に対する親和性が低下しており、細胞内 cAMP 産生能も低下していることを明らかにした。本研究の結果から、遺伝性腎性尿崩症の発症メカニズムが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、伴性劣性遺伝性腎性尿崩症患者の遺伝子異常を同定し、また患者異常遺伝子を COS 細胞に導入、V2 受容体を発現させて、その機能異常をみたものである。患者 V2 受容体では、バゾプレッシンに対する親和性が低下しており、その結果、バゾプレッシンの second messenger である cAMP の産生も低下していることを明らかにした。現在までに、伴性劣性遺伝性腎性尿崩症の遺伝子異常はいくつか報告されてつつあるが、遺伝子異常の結果生じる受容体機能異常まで明らかにしたものはまだ少なく、本邦では初めてである。

以上のことから、本研究は学位に値するものと考えられる。