

ポリシスチン 2 に対する抗体を用いた腎の組織学的検討

田中裕子* 土谷 健 望月俊雄 相川英三**
二瓶 宏*

Immunohistochemical analysis of the normal and cystic kidney using antibody against polycystin 2

Yuko TANAKA*, Ken TSUCHIYA, Toshio MOCHIZUKI, Eizou AIKAWA**, and Hiroshi NIHEI*

*Department of Medicine IV, **Department of Anatomy and Developmental Biology,
Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

A second gene responsible for polycystic kidney disease (*PKD*) has been identified recently, and an antisera (YCC2) against this gene's product, polycystin 2, has been generated. In the present study, we investigated the normal distribution of polycystin 2 in human adult kidneys and analyzed the expression of polycystin 2 in the cystic tubules of kidneys from patients with *PKD* and acquired cystic disease of the kidney (ACDK). The expression of polycystin 2 in normal regions of resected human kidneys, 4 cases of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) and 4 cases of ACDK was examined by immunohistochemically staining the specimens with a polyclonal antibody specific to the C-terminal region of polycystin 2. This region is specific to polycystin 2 and does not crossreact with polycystin 1. In normal kidneys, prominent expression of polycystin 2 was observed in the distal tubules. A faint level of expression was detected in the proximal tubules, and the glomerulus and vessels were almost negative for expression. In the cystic kidneys of ADPKD patients, 68.7 % of the cystic tubules stained positively for YCC2, although partial staining was seen in 41.2 % of the positive cystic tubules. Although the genetic background of the samples is unknown, the co-existence of positive and negative cysts suggest that a "two-hit" hypothesis is feasible and that the mutations are likely to be missense or in frame changes. In ACDK cysts, YCC2-positive staining was prominent in small cysts (less than 0.5 mm in diameter), which were also positive for DBA, a marker for distal tubules. In contrast, larger cysts of more than 0.5 mm in diameter which stained positive for a proximal tubule marker, Lotus T, tended to be less positively stained for YCC2. Overall, 94.5 % of the cysts stained positive for YCC2, which is a much higher rate than that of PKD cysts. These results suggest that ACDK cysts may be generated by a different mechanism from that of PKD cysts.

Jpn J Nephrol 2000 ; 42 : 583-590.

Key words : ADPKD, polycystin, ACDK, immunohistochemistry

はじめに

遺伝性腎疾患において、多発性嚢胞腎 (autosomal dominant polycystic kidney disease : ADPKD) は最も頻度の高い疾患であり、多くの症例で進行性に腎機能が低下し腎不全に至り、本邦透析患者における原因疾患の 3~4 % を占める。常染色体優性遺伝形式をとるが、遺伝的異質性があ

り、その約 85 % の家系は第 16 番染色体に、約 15 % の家系が第 4 番染色体に連鎖する。近年、前者の *PKD1* 遺伝子が責任遺伝子として同定され¹⁾、さらに後者の *PKD2* 遺伝子も続いて特定された²⁾。その蛋白ポリシスチンは基本的に膜蛋白であることが判明している。ポリシスチン 1 は 4,304 個のアミノ酸より成り、N 末端は細胞外に、C 末端は細胞内に存在し、7~11 回の膜貫通ドメインを持つ膜貫

* 東京女子医科大学第 4 内科, ** 同 解剖学・発生生物学

(平成 12 年 7 月 27 日受理)

通型の糖蛋白である。

一方、ポリシスチン2は968個のアミノ酸より成り、6個の膜貫通ドメインを持つ蛋白であり、この膜貫通領域にポリシスチン1との相同性が存在する。また、ポリシスチン1の細胞内C末端部のcoiled to coil領域で相互作用を示す可能性が指摘されている。このため、両者は発現様式、部位などにおける共通性が推測されている。しかしながら、抗体による組織学的検索においては、ポリシスチン1の場合、遺伝子構造上の重複領域の存在など、その蛋白に対する特異的抗体の作製が困難で、報告により差異が認められている。これに対して、ポリシスチン2で特異性の高い抗体が作製され、ノックアウトマウスでの組織発現の欠落が報告された^{3,4)}。正常腎および嚢胞腎などの病的な組織での組織学的検討により、蛋白本来の局在、細胞での機能解明にかかわる情報が得られるものと考えられる。今回、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(以下、GST)融合蛋白を抗原としたポリシスチン2に対するポリクローナル抗体を用いて、正常腎およびADPKD腎、後天性腎嚢胞(acquired cystic disease of the kidney: ACDK)について各々染色性を検討比較した。

対象と方法

1. 対象

腎癌にて摘出したヒト腎正常部、合併症などにより摘出したADPKD患者の嚢胞腎4例、ACDK患者の腎4例を対象とした。ADPKD患者は家族歴が不明で、遺伝子解析も行われていないため、*PKD1*家系もしくは*PKD2*家系のいずれかは判定不能であった。また、ACDK症例の原疾患はそれぞれ確定されていないが、透析患者で慢性糸球体腎炎由来と考えられる腎不全症例を抽出し、先天性奇形、感染症などの症例は除外した。症例よりの組織サンプリングに際しては、診断目的以外に組織学的な検討を行う可能性などにつき説明しインフォームド・コンセントを確立してある。

2. ポリシスチン2に対する抗体(以下、抗YCC2抗体)

ポリシスチン2に対する抗体は、Dr. S. Somlo(Yale大学, New Haven, USA)から供与されたものを用いた³⁾。抗体はアミノ酸配列687~962の部位のpolymerase chain reaction(PCR)産物をpGEX2T発現ベクターに挿入し、GST融合蛋白を作製して、家兎に免疫されたものである。作製されたポリクローナル抗体はenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法、ウエスタンブロット法な

どで特異性が確認されている³⁾。

3. 組織学的検討

腎組織はホルマリン液で固定し、脱水後、パラフィンに包埋、4 μ m厚の切片を作製し、免疫組織染色およびレクチン染色を行った。ポリシスチンに対する抗体を用いた免疫組織染色は、DAKO LSAB2キット/HRP(DAKO社)を使用し、labeled streptavidin biotin法(LSAB法)にて行った。切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するために、0.3%過酸化水素加メタノールに4 $^{\circ}$ C、30分間反応させた。組織抗原性の賦活化のため、マイクロウェーブを使用した。非特異的反応を阻止するために、二次抗体免疫動物である5%正常ヤギ血清に20分間室温下反応後、phosphate-buffer saline(PBS)で洗浄、一次抗体である抗YCC2抗体(1,000倍希釈)、コントロールとしてPBSを使用し、4 $^{\circ}$ C、24時間反応させた。その後PBSで洗浄し、ビオチン化二次抗体およびペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにて反応後、DAB液(3,3'-diaminobenzidine $\cdot$ 4HCl)で発色させた後水洗し、ヘマトキシリンにて核染色した。

近位尿細管と遠位尿細管の鑑別のため、レクチン染色を行い、近位尿細管のマーカーとしてLotus T(EY社)を、遠位尿細管のマーカーとしてDBA(EY社)を使用した。標本は同一のスライドグラスを2人の検者によって検鏡し、染色強度の判定と嚢胞の染色陽性率を算出した。尿細管内腔径が正常の尿細管の径の5倍となる1mm以上の拡大を示すものを嚢胞として判定した。染色性に関しては、嚢胞上皮の一部や非連続的に染色される嚢胞を部分的陽性(partially positive)とし、全体に染色される陽性群(positive)とされない陰性群(negative)とそれぞれ定義した。標本作製上の原因によると考えられる変化がみられる嚢胞は除外した。

結 果

1. 正常のヒト腎

ヒト腎における正常部位の抗YCC2抗体での染色をFig. 1に示す。弱拡大での観察で、髄質部を中心に染色性が認められた(Fig. 1a)。糸球体には、構成するメサンギウム細胞、係蹄壁、ボウマン嚢や細小血管にはほとんど染色性はみられず、糸球体周囲の尿細管では、近位尿細管は弱く染色された(Fig. 1b)。また、遠位尿細管は近位尿細管に比べて強く染色され、強拡大でも胞体全体が染色された(Fig. 1b, c)。髄質部から乳頭部を中心とする集合尿細管

では比較的強く染色が認められた (Fig. 1d)。腎実質での染色性のパターンを Table 1 にまとめた。また、個々の細胞での染色性の局在については、細胞全体が染まる傾向がみられ、管腔側、基底膜側などの特異的局在は顕著でなかった。

2. ADPKD 症例

Fig. 2 に ADPKD 症例の染色を示す。ADPKD 症例では、嚢胞を形成した大きな尿細管上皮に、染色性が認められる例と認められない例とが混在していた (Fig. 2a, b)。比較的小さな染色性が認められたものでは、正常腎での遠位尿細管とほぼ同等の強度であった (Fig. 2c)。嚢胞を形成していない残存する尿細管では、正常腎と同様の染色性が認められた。また、正常な尿細管のほぼ均一な染色性と異なり、嚢胞形成尿細管では部分的な染色が認められるものが観察された。間質面積の増加や線維化は顕著であったが、同部位や散在する小血管などはほとんど染色されなかった (Fig. 2d)。通常の尿細管腔径の 5 倍以上と考えられる径 1 mm 以上の嚢胞尿細管での染色が陽性の割合を各症例ごとに Table 2 に示す。症例の *PKD1*, *PKD2* の遺伝子学的背景が確定されていないため、各染色性の相違を比較した。各症例での平均は約 68.7% が陽性 (そのうち部分的陽性 41.2%), 31.3% が陰性で、抗 YCC2 抗体での嚢胞の染色率に著しい差異は観察されず、また、大きな嚢胞では部分的に染色されるものが観察された。

3. ACDK 症例

萎縮腎にみられる ACDK についても染色性を検討した (Fig. 3)。嚢胞径 0.3 mm 以下の小さな嚢胞は、レクチン染色では遠位尿細管のマーカーである DBA で染色された。抗 YCC2 抗体での染色性もほぼ維持されていた。嚢胞径 0.3~0.5 mm の嚢胞になると、レクチン染色では DBA, Lotus T の両者の染色が混在し、抗 YCC2 抗体での染色性は比較的保たれ、DBA で染色がみられる遠位尿細管由来の嚢胞で、より多く染色される傾向が認められた。嚢胞径 0.5 mm 以上の大きな嚢胞では、レクチン染色では Lotus T で染色されるものが多くなり、DBA で染色されるものはみられなかった。抗 YCC2 抗体での染色性も様々であった。ADPKD の嚢胞と同様に 1 mm 径以上の尿細管の YCC2 陽性率を算出すると 94.8% (陰性 5.2%) であった。

以上より、遠位尿細管由来と考えられる小さな嚢胞では抗 YCC2 抗体による染色性がほぼ維持されていた。大きな嚢胞は近位尿細管由来が多いと推測され、抗 YCC2 抗体では染色性がみられるものとみられないものとが混在し

ていたが、ADPKD の嚢胞に比較して抗 YCC2 抗体の陽性率は ACDK 症例で高値であった。

考 察

ポリシスチン 2 は *PKD2* 由来の蛋白で、ポリシスチン 1 とアミノ酸レベルで高い相同性をもっている。*PKD2* 遺伝子の異常は ADPKD 患者群の約 15% を占めるとされているが、正常でも発現することが確認されており、今回、実際に正常および嚢胞腎、萎縮腎に合併する後天性の嚢胞での発現を免疫組織学的に検討した。

用いた抗 YCC2 抗体は、*PKD1* の C 末端と相同性のない部分のアミノ酸を基に融合蛋白を作製し抗原としたもので、ポリシスチン 2 に対する特異性が確認されている³⁾。ポリシスチン 2 の染色性についてはまだ報告は少ないが、正常のヒト腎での局在は、尿細管を中心とした上皮細胞での発現が報告されている。今回、ネフロンでの分布に関しては、遠位および集合尿細管での染色が近位尿細管より顕著であったが、Ong らの報告でも同様の指摘がなされている⁵⁾。糸球体や間質については、彼らと同様に陰性であった。

ポリシスチン 1 については、もう少し報告数も増えるが、染色性については報告により局在などが異なっている。これは先に述べたように、抗体自体の特異性にも問題があると考えられる。糸球体、間質は陰性とする報告もみられるが^{6,7)}、ボウマン嚢や糸球体上皮細胞については染色されるとする報告もある^{8~12)}。また血管の、主として内皮細胞での染色性を確認する指摘もある¹³⁾。

また、ポリシスチン 1 とポリシスチン 2 とが免疫組織学的に、1 つの細胞において共発現することが二重染色によって指摘されている⁵⁾。このことは、この両者が共同して“PKD pathway”を形成する可能性が推測されている。遺伝子レベルでは、ポリシスチン 1 とポリシスチン 2 の間に coiled to coil 領域を介して、相互作用を及ぼし binding partner として働く可能性が考えられ¹⁴⁾、さらに抗体による発現解析では共発現とともに、嚢胞を形成する尿細管で一方の染色体が認められない場合はもう一方の抗体の染色も欠落している指摘があり、両者がそれぞれの組み込みにかかわる可能性が推測されている^{5,15)}。また、臨床的には *PKD1* および *PKD2* 家系において経過、臨床像にさほどの差異がみられないことなどが、ポリシスチン 1 およびポリシスチン 2 の相互作用を推測させる理由である。

今回は施行していないが、胎児の腎での発現は特徴的

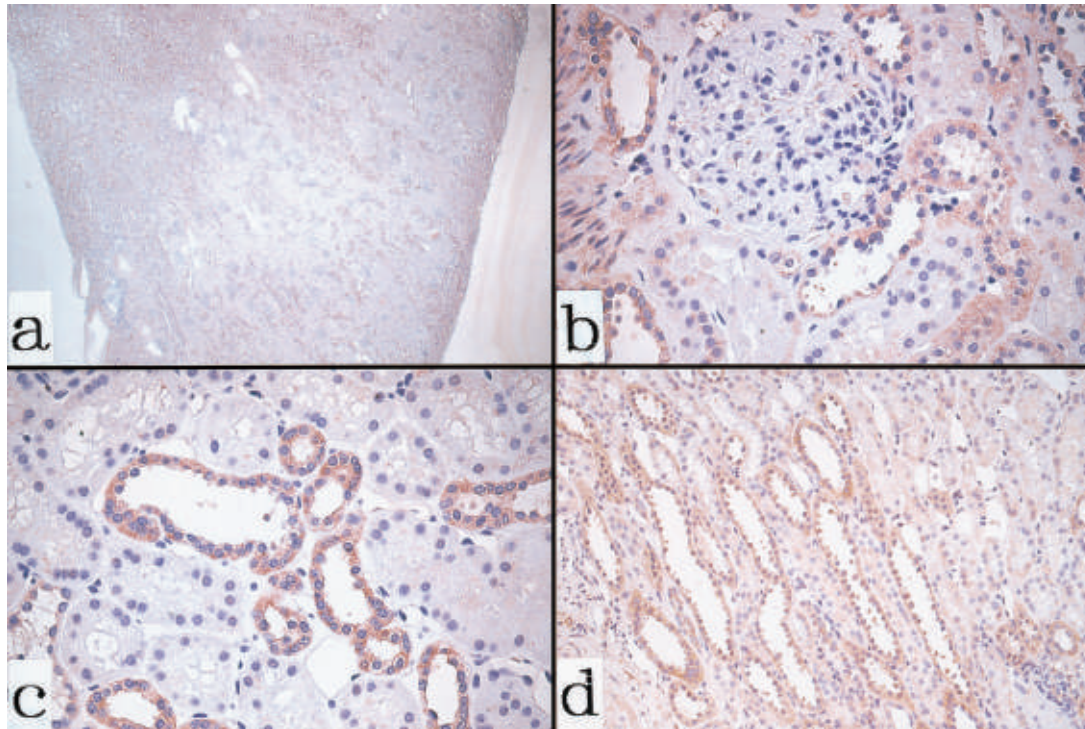


Fig. 1. Polycystin 2 expression in normal human kidney

- a : Low-power view showing prominent staining in medullary part of the kidney ($\times 20$)
- b : High-power view around the glomerular area ($\times 200$). Proximal tubules are stained weaker than distal tubules, in contrast, no staining is observed in glomerulus.
- c : Distal tubules showing strong staining
- d : Collecting tubules of papillary part showing strong expression of YCC 2.

Table 1. Immunoreactivity in the control kidney

	Glomeruli	Bowman's capsule	Proximal tubules	Distal tubules	Collecting tubules	Vessels
YCC 2	—	—	+	++	++	—

Scale of scoring : — if negatively stained, + if weakly stained above background, ++ if significantly different from background

で、総じて成人の腎より染色性が強く、特にネフロンを形成する中胚葉と尿管芽、S字体に染色されている。こうした指摘は、発達期、ネフロン形成期でのポリシスチンの関与を示唆するものである⁸⁻¹²。さらに Ibraghimov-Beskrovnya らの、虚血、再還流腎での急性尿細管壊死に陥った近位尿細管で染色性が亢進するという事実¹⁰からも、本蛋白の発生期もしくは細胞の再生、機能機転へのかかわりが推測される。他方、両遺伝子をノックアウトしたモデルマウスにおいてネフロン構造は形成されていることから、中胚葉から上皮細胞への形質転換などの作用にかかわるよりは、少なくとも構造の維持や正常の形態形成において何らかの役割を演じていると考えられる^{16,17}。

個々の細胞での局在については、報告により様々で、管腔側、基底膜側、胞体自体と確定していない。今回の観察では胞体に染色され膜への局在は顕著でなかった。胎生期では髄質集合尿細管での管腔側、基底膜側両側の染色性が観察されたと指摘されている¹⁸が、その生理学的意義については不明である。最近、培養細胞においてポリシスチン

2は細胞内の粗面小胞体に局在し、そのC末端のGlu787～Gly821(2つのリン酸化部位を含む)の34個のアミノ酸の存在がその局在に重要であると報告されている³。そして、粗面小胞体にあるポリシスチン2はゴルジ装置を経て細胞膜表面へ輸送され機能を発揮するものと考えられている。

PKD1, *PKD2* の遺伝子学的診断が確定されていないため、ADPKD患者からの摘出腎での染色性の評価は難しい。約85%が*PKD1*症例であることを考えると今回の標本もその可能性が高いといえる。4症例の発現の検討では、約7割の嚢胞で染色され、他は染色性が欠落していた。今までの報告でも、*PKD1* および *PKD2* 症例でそれぞれのポリシスチン抗体の嚢胞の染色性は混在しているとされている^{5,7,9,19}。今回の症例が*PKD1*とすれば、抗YCC2抗体で陽性になるのは問題ないが、陰性になる嚢胞については、先に述べたようにポリシスチン1, 2それぞれの蛋白が相互の安定性にかかわり、ポリシスチン1の脱落からポリシスチン2の消失に至った可能性がある。

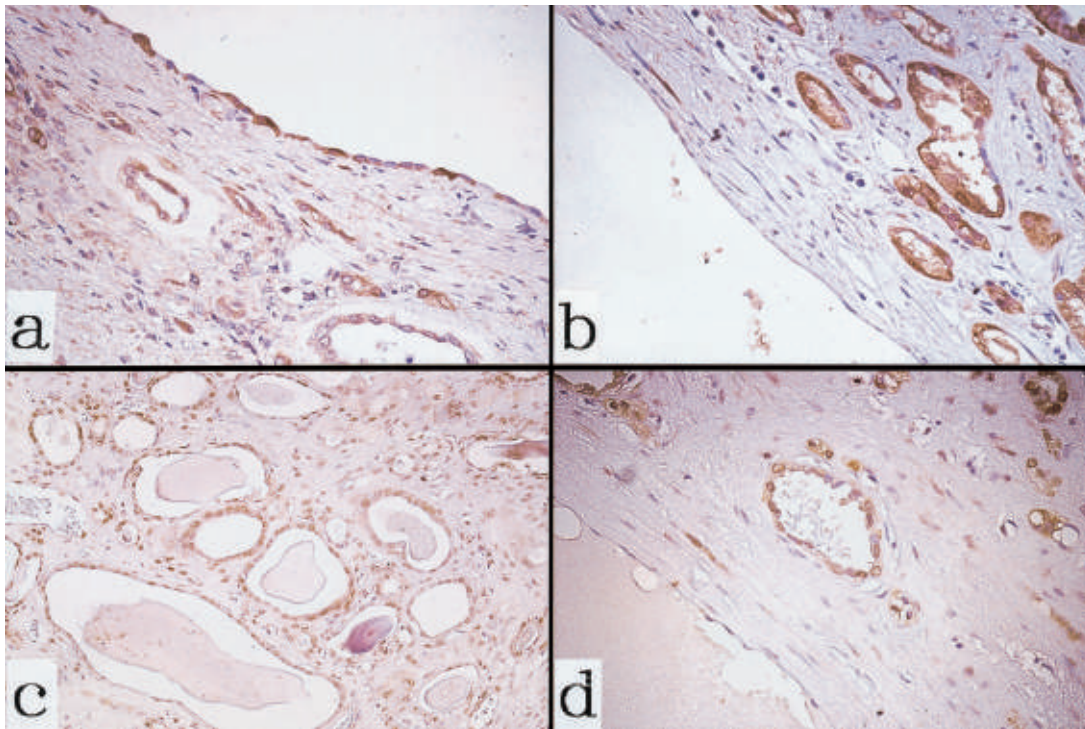


Fig. 2. Polycystin 2 expression in ADPKD kidney

- a : Residual tubules and small cyst showing positive staining for polycystin 2
- b : Interstitial area showing fibrotic changes is negative staining.
- c, d : Largely developed cysts are variously stained for YCC 2.

Table 2. Immunoreactivity of the kidney tissue in ADPKD patients

Patient (age and sex)	Positive	Partially positive	Negative
Case 1 (55, F)	21/28 (75.0 %)	8/21 (38.1 %)	7/28 (25.0 %)
Case 2 (54, M)	20/28 (71.4 %)	7/20 (35.0 %)	8/28 (28.6 %)
Case 3 (52, M)	12/18 (66.7 %)	5/12 (41.7 %)	6/18 (33.3 %)
Case 4 (60, M)	16/26 (61.5 %)	8/16 (50.0 %)	10/26 (38.5 %)

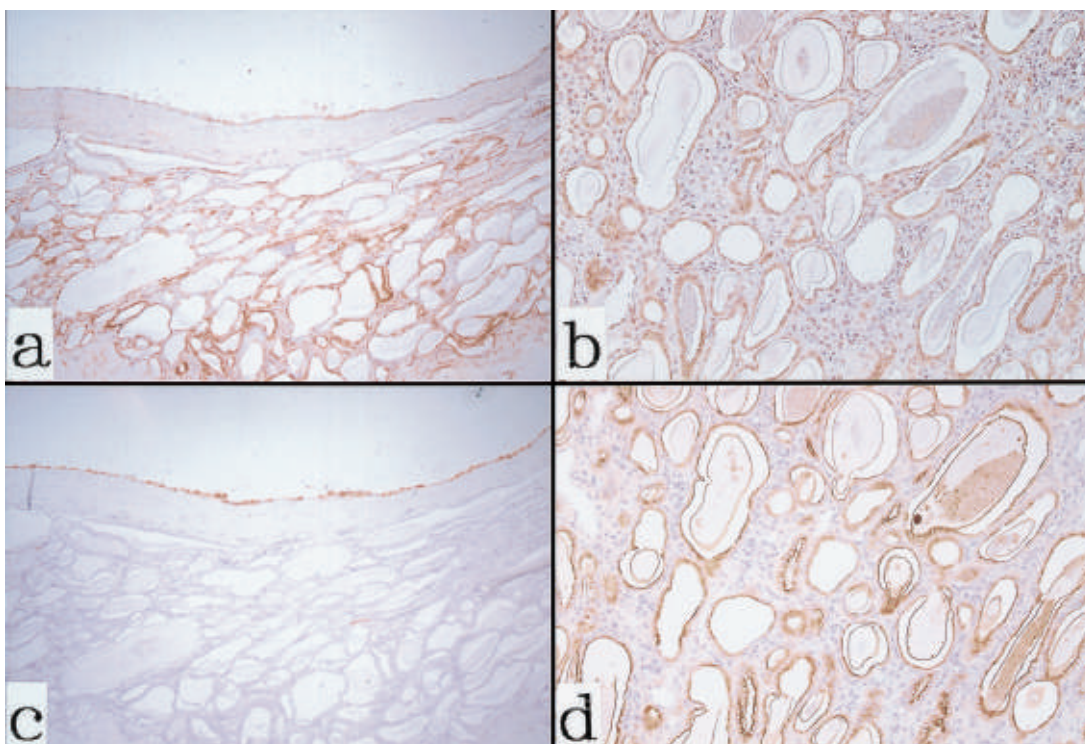


Fig. 3. Polycystin 2 expression comparing with lectin staining in ACDK kidney

- a, b : Several cysts are positive for YCC 2 staining.
- c : Acquired cyst in large size showing positive staining for Lotus T
- d : Smaller size cysts tend to be positive for DBA.

ヒト嚢胞での各蛋白の染色体が混在している点は *PKD1* 症例の報告でもみられることで^{6-9,19)}、実験的な動物モデルでの結果と必ずしも一致しない。*PKD2* のノックアウトマウス (*pkd2*^{-/-}) が作製されているが、ヘテロ接合体 (*pkd2*^{+/-}) では嚢胞が数個認められ、さらに、遺伝子組み換えの際に正常とターゲティングされたエクソン 1 が並列に存在する縦列挿入を生じた不安定な対立遺伝子が偶然作製される。この場合には正常なエクソン 1 をもつ対立遺伝子が存在するため、*pkd2*^{-/-} のように致死ではなく、ヒトの ADPKD でみられるような大小さまざまな嚢胞が形成されたが、この場合にもポリシスチン 2 の染色性は欠落しており、ヒトの症例での染色性とは異なっていた。ヒトでの染色性の結果についての説明は、単純には嚢胞形成の発端にポリシスチンが決定的な意義を持たず、進展の速度や嚢胞の性質などに関与している可能性である。もう一つは *PKD* 遺伝子がミスセンス変異やインフレームの変異により不活性化、もしくは短縮を生じた蛋白を産生することで抗原性を保持し染色性が維持される可能性である。いわゆるツーヒット説では、一つの嚢胞上皮細胞で、生殖細胞において正常であった対立遺伝子が体細胞で欠失 (loss of heterozygosity : LOH) したり、変異が起こることが報告された^{20,21)}。これは体細胞変異 (somatic mutation) により 2 つ目の遺伝子の不活性化が起こり、嚢胞が形成されることを示している^{22,23)}。生殖細胞ならびに体細胞での変異がミスセンスを中心としたものなら、蛋白自体は存在するが機能的異常を持つことになる。今まで報告のある嚢胞内の尿細管上皮でのポリシスチンの発現の亢進に関しては、遺伝子異常に基づく蛋白により、正常な蛋白の機能抑制が発生する、いわゆるドミナントネガティブ効果が生じている可能性があり、染色性の異質性が原因とも考えられる。

今回の検討でも、一つの嚢胞で部分的な陽性の染色性が認められたことの原因は明らかではない。他の報告でも指摘があり¹⁹⁾、性質の違う嚢胞が癒合している可能性、嚢胞上皮の一部にヘテロ接合性の消失 (LOH) や体細胞変異が生じている可能性、もしくは嚢胞上皮の部分的な細胞周期の相違などに起因するものと推測される。

一方、ACDK では小さな嚢胞は遠位尿細管のマーカーである DBA で染色され、抗 YCC2 抗体でも染色がみられた。大きな嚢胞は主として Lotus T で染色され、近位尿細管に由来するものが多数と考えられたが、抗 YCC2 抗体の染色性は様々である。これらは遠位側優位な染色性において正常腎での染色の分布とよく似ていると考えられ、

総じて嚢胞の陽性率は ADPKD に比べて高率であった。後天性の嚢胞については、その性質、発生機序に関して報告がある²⁴⁾。ACDK の嚢胞は主として近位尿細管に由来するとされており²⁵⁾、その発症機序については閉塞や線維化による連続性の中断に続発する変性的尿細管の拡張によるよりも、近位尿細管部の過形成、残存ネフロンに拡張に基づく変化と推測されている²⁶⁾。嚢胞自体の増殖性の亢進、発癌率が高率であることなどが特徴である²⁷⁾。さらに、堀口らは萎縮腎における嚢胞の増殖能の亢進とともに、上皮増殖因子 (epidermal growth factor : EGF) やその受容体の発現が亢進しているとしている²⁸⁾。最近、ADPKD の嚢胞においても EGF 受容体の局在異常や活性の亢進が指摘されており、進展機序にかかわりを持つ可能性がある²⁹⁾。さらに、Avner らはその阻害により嚢胞進展に抑制がかけられると報告し³⁰⁾注目されており、今後の解明が期待されている。

結 論

ポリシスチン 2 に対する抗体、抗 YCC2 抗体は、正常ヒト腎で遠位尿細管を中心に染色された。ADPKD 腎においては、嚢胞形成尿細管での染色性は約 68 % で陽性であったが、染色を認めない嚢胞も観察され、いわゆるツーヒット説を支持する所見と考えられた。ACDK の嚢胞では、サイズの小さいものは遠位尿細管由来で、大きい嚢胞は主として近位尿細管のマーカーが陽性であったが、小さい嚢胞で抗 YCC2 抗体の染色性が高度であった。ADPKD と比較すると嚢胞の抗 YCC2 抗体の陽性率は ACKD 症例で高率であった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、YCC2 抗体の供与を賜りました、Yale 大学 Dr. Steve Somlo および Dr. Yiqiang Cai に深謝致します。また、技術のご助言をいただいた東京女子医科大学解剖・発生学教室の諸先生、久保田康子検査技師および腎臓病総合医療センター病理堀田茂、中山英喜検査技師に感謝致します。

なお本研究の一部は厚生省特定疾患「進行性腎障害」調査研究班、多発性嚢胞腎および武田科学振興財団研究助成金によって行われた。

本論文の要旨は、第 42 回日本腎臓学会総会 (1999 年、横浜) において発表した。

文 献

1. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. The

- polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 1994 ; 77 : 881-94.
2. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJM, Somlo S. *PKD2*, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996 ; 272 : 1339-42.
 3. Cai Y, Maeda Y, Cedzich A, Torres VE, Wu G, Hayashi T, Mochizuki T, Park JH, Witzgall R, Somlo S. Identification and characterization of polycystin-2, the *PKD2* gene product. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 28557-65.
 4. Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Ho H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S. Somatic inactivation of *pkd 2* results in polycystic kidney disease. *Cell* 1998 ; 93 : 177-88.
 5. Ong ACM, Ward CJ, Butler RJ, Biddolph S, Bowker C, Torra R, Pei Y, Harris PC. Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease protein, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *Am J Pathol* 1999 ; 154 : 1721-9.
 6. Geng L, Segal Y, Peissel B, Deng N, Pei Y, Carone F, Rennke HG, Glucksmann-Kuis AM, Schneider MC, Ericsson M, Reeders ST, Zhou J. Identification and localization of polycystin, the *PKD1* gene product. *J Clin Invest* 1996 ; 98 : 2674-82.
 7. Ward CJ, Turley H, Ong ACM, Comley M, Biddolph S, Chetty R, Ratcliffe PJ, Gatter K, Harris PC. Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 1524-8.
 8. Palsson R, Sharma CP, Kim K, McLaughlin M, Brown D, Arnaout A. Characterization and cell distribution of polycystin, the product of autosomal dominant polycystic kidney disease gene 1. *Mol Med* 1996 ; 2 : 702-11.
 9. Peters DJM, Spruit L, Klingel R, Prins F, Baelde HJJ, Giordano PC, Bernini LF, de Heer E, Breuning MH, Bruijn JA. Adult, fetal, and polycystic kidney expression of polycystin, the polycystic kidney disease-1 gene product. *Lab Invest* 1996 ; 75 : 221-30.
 10. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Dackowski WR, Foggensteiner L, Coleman N, Thiru S, Petry LR, Burn TC, Connors TD, Raay TV, Bradley J, Qian F, Onuchic LF, Watnick TJ, Piontek K, Hakim RM, Landes GM, Germino GG, Sandford R, Klinger KW. Polycystin : *In vitro* synthesis, *in vivo* tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 6397-402.
 11. Weston BS, Jeffery S, Jeffery I, Sharaf SFA, Carter N, Sagggar-Malik A, Piice RG. Polycystin expression during embryonic development of human kidney in adult tissues and ADPKD tissue. *Histochemical J* 1997 ; 29 : 847-56.
 12. Adersberg JV, Chamberlain S, D'Agati V. Polycystin expression is temporally and spatially regulated during renal development. *Am J Physiol* 1997 ; 272 : F602-9.
 13. Griffin MD, Torres VE, Grande JP, Kumar R. Vascular expression of polycystin. *J Am Soc Nephrol* 1997 ; 8 : 616-26.
 14. Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 1997 ; 16 : 179-83.
 15. Tsiokas L, Kim E, Arnould T, Sukhatme VP, Walz G, Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of *PKD1* and *PKD2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 6965-70.
 16. Lu W, Peissel B, Babakhanlou H, Pavlova A, Geng L, Fan X, Larson C, Brent G, Zhou J. Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted *Pkd1* mutation. *Nat Genet* 1997 ; 17 : 179-81.
 17. Wu G, Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, Tibara S, Tuchman J, Cai Y, Park JH, Adelsberg JV, Ho H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S. Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in *Pkd2*. *Nat Genet* 2000 ; 24 : 75-8.
 18. Markowitz GS, Cai Y, Li L, Wu G, Ward LC, Somlo S, D'Agati VD. Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am J Physiol* 1999 ; 277 : F17-25.
 19. Ong ACM, Harris PC, Davies D, Pritchard R, Rossetti S, Biddolph S, Vaux DJT, Migone N, Ward CJ. Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue. *Kidney Int* 1999 ; 56 : 1324-33.
 20. Torra R, Badenas C, Millan JLS, Perez-Oller L, Estill X, Darnell A. A loss-of-function model for cystogenesis in human autosomal dominant polycystic kidney disease type 2. *Am J Hum Genet* 1999 ; 65 : 345-52.
 21. Pei Y, Watnick T, He N, Wang K, Liang Y, Parfrey P, Germino G, George-Hyslop PST. Somatic *PKD2* mutations in individual kidney and liver cysts support a "two-hit" model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1999 ; 10 : 1524-9.
 22. Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Qian F, Onuchic LF, Klinger KW, Landes G, Germino GG. Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell* 1998 ; 2 : 247-51.
 23. Koptides M, Hadjimichael C, Koupeptidou P, Pierides A, Deltas CC. Germinal and somatic mutations in the *PKD2* gene of renal cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 1999 ; 8 : 509-13.
 24. Ishikawa I. Acquired cystic disease : mechanisms and manifestations. *Semin Nephrol* 1991 ; 11 : 671-84.
 25. Ishikawa I, Takayasu H, Shikura N. Lectin peroxidase

- conjugate reactivity in acquired cystic disease of the kidney. *Nephron* 1989 ; 51 : 211-4.
26. Vandeursen H, Damme BV, Baert B, Baert L. Acquired cystic disease of the kidney analyzed by microdissection. *J Urol* 1991 ; 146 : 1168-72.
27. Nadasdy T, Laszik Z, Lajoie G, Blick KE, Wheeler DE, Silva FG. Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases. *J Am Soc Nephrol* 1995 ; 5 : 1462-8.
28. 堀口孝泰, 石川 勲. 多嚢胞化萎縮腎における vimentin ならびに細胞増殖因子の発現についての免疫組織学的検討. *日腎会誌* 1993 ; 35 : 797-807.
29. Du J, Wilson PD. Abnormal polarization of EGF receptors and autocrine stimulation of cyst epithelial growth in human ADPKD. *Am J Physiol* 1995 ; 269 : C487-95.
30. Richards WG, Sweeney WE, Yoder BK, Wilkinson JE, Woychik RP, Avner ED. Epidermal growth factor receptor activity mediates renal cyst formation in polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 1998 ; 101 : 935-9.