

腎臓を標的とした臓器選択的遺伝子治療 の基礎的研究

研究課題番号 07557363

平成9年度科学研究費

基盤研究A (2)

研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 東間 紘
(東京女子医科大学医学部教授)



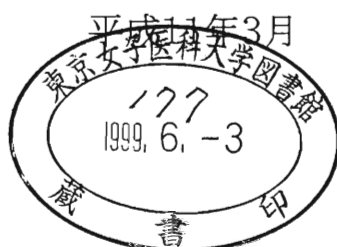
腎臓を標的とした臓器選択的遺伝子治療 の基礎的研究

研究課題番号 07557363

平成9年度科学研究費

基盤研究A (2)

研究成果報告書



研究代表者 東間 紘
(東京女子医科大学医学部教授)

研究組織

- 研究代表者：東間 紘 (東京女子医科大学医学部教授)
- 研究分担者：中澤 速和 (東京女子医科大学医学部助教授)
- 研究分担者：木原 健 (東京女子医科大学医学部講師)
- 研究分担者：田邊 一成 (東京女子医科大学医学部講師)
- 研究分担者：鬼塚 史朗 (東京女子医科大学医学部助手)
- 研究分担者：伊藤文夫 (東京女子医科大学医学部助手)
- 研究分担者：龍治 修 (東京女子医科大学医学部助手)
- 研究分担者：近藤 恒徳 (東京女子医科大学医学部助手)
- 研究分担者：橋本 恭伸 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費

平成7年度	3600	千円
平成8年度	4500	千円
平成9年度	1600	千円
<hr/>		
計	9700	千円

はしがき

近年の臓器移植技術は、免疫学の進歩とともに長足の発展を遂げ、これまで困難と思われてきた血液型不適合間の臓器移植を可能とさせたのみならず、異種間における臓器移植までも可能となる日は近い。

このような、臓器の代替を目的とした移植医療に対し、移植技術を臓器ターゲティングの手段としようとする新たな試みがある。骨髄移植を利用した遺伝子治療がその一例である。そこでは骨髄細胞の導入が目的ではなく、遺伝子の導入が目的であり、移植技術は遺伝子導入のための広義のドラッグデリバリーのひとつであると言えよう。

このような時代背景の下、これまでに1000例を超える腎移植を経験し、移植技術そのものはほぼ確立された我々の施設では、他領域への応用を模索していた。一つの応用が、*ex vivo*における腎手術である。これは、一旦、体外に摘出した患側腎に対し、体内では行いえない高度な治療を加えたのちに、再び体内に戻すとした方法であり、主に腎血管病変や腎腫瘍への治療手段に用いられた。

一方、ドラッグデリバリーの手段としては、腎に対する抗癌剤の動注療法などが実際に臨床で行われてきた。但し、動注療法は、標的臓器への高い選択性はないため、その改良が図られた。当施設では、標的以外の臓器への影響を最小限に抑えるため、大循環に還流した血液に対し、吸着を試みた。また、温度に対し感受性のあるリポゾームに抗癌剤を内包させ、特定の温度に維持し患部に高濃度の薬剤を送り込むことも試みた。

以上のような、当施設におけるこれまでの研究経緯を背景に、腎への選択的な遺伝子を含むドラッグデリバリーの手段として移植治療を応用しようとの発想が生まれ、今回の研究課題へと発展した。

腎への選択的なドラッグデリバリーが可能となった場合に、どのような疾患が実際に対象になりうるかとの検討も、同時に行った。本研究は、ドラッグデリバリーの対象を遺伝子に限れば、今後の発展の鍵は、種々の腎疾患が遺伝子の異常で語られていることが前提となる。現時点では、すでにその対象となる、あるいは、なりそうな腎疾患は極めて限られていると言わざるをえない。しかし腎疾患には、未だ発症機序の明らかでない疾患も数多い。今後のそれらの機序解明と相俟って、この新たな治療法の研究を進めていかなければならないが、科学研究費補助金交付の終了年にあたり、これまでに得られた成果をまとめ報告する次第である。

研究発表

(1) 学会誌など

- (1) 木原 健: 局所加温療法併用によるCisplatin含有熱感受性リポソームの抗腫瘍効果について. *東女医雑誌*. 1998; 68:852-860.
- (2) Kihara T, Nakazawa H, et al.: Superiority of selective bolus infusion and simultaneous rapid removal of anticancer agents by charcoal hemoperfusion in cancer treatment. *ASAIO Transactions* 1988; 34:581-584.
- (3) Kihara T, Nakazawa H, et al.: Clinical experience of radiofrequency regional hyperthermia combined with chemotherapy in 62 advanced liver cancer patients. *Hypertherm Oncol* 1988; 1: 457-459,
- (4) 木原 健、合谷信行、中澤速和、その他: CDDPの大量動注とDHP(direct hemoperfusion)併用療法に関する研究. *人工臓器*. 1986; 15:1275-1279.
- (5) Ito F, Toma H, Yamaguchi Y, et al.: A rat model of chemical-induced polycystic kidney disease with multistage tumors. *Nephron*. 1998; 79: 73-79.
- (6) Tanabe K, Takahashi K, Sonda K, et al.: Long-term results of ABO-incompatible living kidney transplantation. *Transplantation*.. 1998; 65: 224-228.
- (7) Tanabe K, Ishikawa N, Tokumoto T, et al.: Factors affecting long-term renal allograft survival in cyclosporine-treated kidney transplants. *Transplant Proc*. 1998; 30:1805-1809.
- (8) Huang XB, Ito F, Nakazawa H, and Toma H.: Enhanced expression of 8-

- hydroxy-deoxyguanosine in acquired cystic disease of the kidney. *Nephron* in press.
- (9) Huang XB, Ito F, Nakazawa H, Ryoji O, et al.: Localization of inducible nitric oxide synthase in acquired cystic disease of the kidney. *Nephron* in press.
- (10) Ito F, Nakazawa H and Toma H: Gene Expression Induced at an Early Stage of Diphenylthiazole Exposure. Submitted.
- (11) Ito F, Nakazawa H, Ryoji O, et al.: Cytokines Accumulated in Acquired Renal Cysts in Long-Term Hemodialysis Patients. Submitted.
- (12) Ito F, Nakazawa H, Hosokawa M, et al.: Accumulation of "Free" Iron and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Acquired Cystic Disease of the Kidney, Submitted.
- (13) Ito F, Nakazawa H, Kondo T, et al.: Suppressed Expression of Superoxide Dismutase in Dialyzed Kidneys, Submitted.
- (14) Ito F, Nakazawa H, Kondo T, et al.: Impaired Expression of hOGG1 Gene in Acquired Cystic Disease of the Kidney; Probable Cause of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Accumulation in Acquired Cystic Disease of the Kidney, Submitted.

研究成果要旨

(1) 培養細胞における遺伝子導入効率の検討

動物による実験を行う前に、遺伝子導入効率に対する温度、導入遺伝子濃度の影響を培養細胞を用いて検討した。遺伝子導入のターゲットとしては、ヒト子宮頸癌由来の上皮細胞HeLa、ブタ腎尿細管由来の上皮細胞LLC-PK1、ヒト正常メサンギウム細胞、ヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞の計4種の細胞株を用いた。導入遺伝子としてpGL3-Control Vector (Promega社、米国)を用いた。継代後、4%CO₂、37℃の条件下に8時間の培養を行った後、リン酸カルシウム法もしくはリポゾームによる遺伝子導入を行い、培養液温度を4℃、25℃、37℃、42℃とし2時間、2%CO₂、37℃で18時間、5%CO₂、37℃でさらに24時間培養し、発現ルシフェラーゼの活性測定により、導入効率を評価した。その結果、リン酸カルシウムによる遺伝子導入法では、いずれの細胞株も、25~37℃で最大の導入効率が認められるのに対し、リポゾームによる遺伝子導入法では、メサンギウム細胞で、比較的高温での導入効率が高く、血管内皮細胞、上皮細胞由来のHeLa、LLC-PK1では、温度による差異はあるものの、ほぼ一定の導入効率を示した。これらの結果から、リポゾームによる遺伝子導入法では、温度の影響を受けにくいことが示唆された。また、リポゾームによる遺伝子導入の場合に、導入効率に細胞種間での差があるかを検討した。いかなる温度においても、LLC-PK1の導入効率は、顕著に高い値を示した。しかし、低温では、培養細胞株間での導入効率の開きが大きいのに対し、温度を上げるに従い、小さくなる傾向を認め、温度条件を変えることで種々の細胞への導入を調節できる可能性が示唆される。さらに、リポゾーム懸濁液中の導入遺伝子濃度を0.004、0.04、0.4 μg/μlの3グループに分け検討したが、いずれの細胞株においても、0.04 μg/μlは0.004 μg/μlに比べ高い効率を示したが、後2者間に

は有意な差違は認められなかった。

(2) ラットにおける遺伝子導入の検討

分裂細胞において、より高率な導入が認められるとの報告があることから、尿細管への導入を図る上で、急性尿細管壊死からの回復期の尿細管細胞をターゲットに置いた。当初、warm ischemiaによって、急性腎不全状態を惹起させようと試みたが、warm ischemic timeと腎障害との間、あるいは腎不全からの回復との間に安定した関係は得られなかった。そこで確実に急性尿細管壊死をもたらし、かつ、高率に回復しうる腎不全状態の導入手段として、HgCl₂ (4mg/kg)の投与を行うこととした。注入リポゾームは、八木らの報告に従いTMAG, DLPC, DOPEをモル比1 : 2 : 2で調製したMLVを用いた。一方、レポータ遺伝子にはルシフェラーゼ遺伝子を用い、HMG1との複合体を形成させて調製した。DNA : 総脂質比は1μg/50nmolとした。対象ラット16匹をHgCl₂(4mg/kg)の皮下注射群、非注射群（溶媒0.1%酢酸）とに分け、投与後腎機能の回復の基調にある4日目に腎を摘出し、氷中に浸し、十分に氷冷したColine's solutionで灌流した。直ちに、リポゾームを含むColine's solution 5ml (DNA10μg/ml) で灌流し血管をクランプ後、氷中に1時間静置した。腎移植法は、一般的な同所性移植を用いた。移植後、10日目に両側とも腎摘を行い、摘出標本に対しRT-PCR法、免疫組織化学法にて遺伝子の存在とその発現を検討した。各群8匹の内、腎が急性腎不全や移植術によって個体の死もしくは腎の壊死を示したと考えられるのは皮下注射群5例で、非注射群で2例であった。RT-PCRでは、皮下注射群3例中全例で、非注射群6例中5例で陽性となった。その局在については、主に糸球体、間質細胞であるが、強視野での平均陽性細胞数は、皮下注射群で2.9、非注射群で1.8であった。

現在、症例数を増やし、観察期間による群分けも増やし、さらに検討を続けている。その結果は、改めて紙上報告を行う予定である。

（3）対象疾患としての嚢胞性腎疾患

本治療の対象疾患としては、腎癌などの腫瘍性疾患や、常染色体優性多発性嚢胞腎などの遺伝性疾患があげられよう。我々は、後天性多嚢胞性腎疾患の発生機序について関心を抱いてきたが、それは、萎縮した透析腎に増殖性病変が発生することから、後天性多嚢胞性腎疾患の発生は再生、脱分化の過程に密接な関係があると考えられる。また、この疾患には高率に腎癌が合併することから、腎癌の発生を別な角度から検討できるという利点もある。遺伝子導入の対象として、腎変性疾患をターゲットに置き、その再生を最終的な目標とする上で、まず後天性多嚢胞性腎疾患の病態も、平行して検討した。その結果、本疾患では、DNA酸化障害の蓄積が認められること、その原因としてSOD発現の低下、glycosylaseであるhOGG1発現の低下が認められることが新たに明らかになった。今後、これらの検討をさらに進め、腎変性疾患の遺伝子治療の可能性についてさらに検討する予定である。