7. 腎疾患に対する遺伝子治療的アプローチ

—第43回日本透析医学会シンポジウムより—

榎野 博史 柏原 直樹 前島 洋平
岡山大学医学部第3内科

key words: 遺伝子治療, アンチセンス, decoy 核酸

慢性増殖性糸球体腎炎, 糖尿病性腎症等の多彩な疾患が進行し糸球体硬化をきたし最終的に末期腎不全に至る。現在, わが国において末期腎不全に至り維持透析を受けている患者は15万人以上存在し, 今後も増加すると予測される。慢性腎疾患の予後改善のためには糸球体硬化進展機構を解明し, 有効な治療法を開発することが必須である。近年, 分子生物学的手法の導入により糸球体硬化の進展機構に関して分子レベルでの知見が集積しつつある。遺伝子治療とは, 狭義には疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与することであるが, 広義には遺伝子工学的手法を用いた疾患の治療を含む。我々は難治性病態である糸球体硬化の進展阻止を目的とし, 分子レベルでの病態理解に立脚した腎疾患に対する広義の遺伝子治療的方法論の可能性を検討してきた。

慢性増殖性腎炎では, 糸球体内でのbFGF, PDGF等の増殖因子のautocrine/paracrine機構での過剰発

現や, chemokine, 接着因子の発現増加により誘導される炎症細胞浸潤により, メサンギウム細胞の増殖・形質変換が起こる。その後TGF- β の過剰発現により細胞外基質の質的量的異常をきたし, ひいてはアポトーシスが誘導され糸球体硬化に至る。近年, これらの各段階に対する遺伝子治療的アプローチの有用性が実験レベルで報告されている(図1)。

1. アンチセンス・オリゴヌクレオチド(AS-ODN)によるPDGF, TGF- β の発現抑制

AS-ODNは, 標的遺伝子のmRNAの一部と相補的な配列を有する核酸であり, mRNAにhybridizeし蛋白発現を特異的に阻害する。PDGF-B鎖, TGF- β_1 のmRNAの開始コドンを含む15merの配列に相補的なAS-ODNを作製した。ラット増殖性腎炎モデルであるThy1.1腎炎作製36時間後にAS-ODNを200 μ gずつcationic liposomeもしくはHVJ-liposomeとともに経腎動脈投与した。第7病日にて, AS-PDGF

図1 腎疾患に対する遺伝子治療的アプローチ。腎疾患進展の分子機序に立脚した遺伝子工学的手法を用いた治療法。

投与群で糸球体細胞数の増加が有意に抑制され、AS-TGF- β 投与群でメサンギウム基質の増加が有意に抑制された(図2)¹⁾。

2. decoy 核酸による転写因子 E2F の作用の抑制

ある遺伝子が発現されるには、その遺伝子上流の promoter/enhancer 領域 (cis-element) に転写因子という蛋白が結合する必要がある。この結合領域と同じ

図2 Thy1.1腎炎におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ODN) の糸球体内細胞外基質蓄積 (A) および糸球体内総細胞数 (B) に対する効果。細胞外基質蓄積は TGF- β_1 に対する AS-ODN あるいは sense-ODN を投与した腎炎ラット群で評価した。糸球体内総細胞数は PDGF-B 鎖に対する AS-ODN あるいは sense-ODN を投与した腎炎ラット群で評価した。

*: $p < 0.01$ ($n = 4$)

塩基配列を持つ二本鎖 ODN すなわち decoy を細胞内に導入すると、転写因子の cis-element への結合が競合阻害され遺伝子発現が阻害される。E2F は、細胞周期の進展および DNA 複製に関与する遺伝子群すなわち、thymidine kinase, DNA polymerase α 等の発現に必須の転写因子である。静止期では抑制性蛋白である Rb 蛋白と結合し不活化状態にあるが、増殖刺激が加わると Rb 蛋白がリン酸化され E2F が遊離し活性型となる。E2F に対する decoy を作製し、培養メサンギウム細胞に投与したところ血清刺激時の細胞増殖を濃度依存性に抑制した。また、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) にて decoy により E2F の cis-element への結合が競合的に阻害されていた。次に、Thy1.1 腎炎作製 36 時間後に E2F-decoy を 200 μ g ずつ multilamellar vesicle (MLV)-liposome をベクターに経腎動脈投与した。第7病日にて、E2F-decoy 投与群では糸球体総細胞数・PCNA 陽性細胞数の増加が有意に抑制された(図3)²⁾。

3. decoy 核酸による転写因子 NF- κ B の作用の抑制

NF- κ B は、pro-inflammatory cytokine, ケモカイン、接着因子等の炎症性病変の原因遺伝子の発現に必須の転写因子である。NF- κ B は通常は抑制性蛋白である I κ B が結合し不活化状態にあるが、細胞に炎症性刺激が加わると I κ B がリン酸化され解離し NF- κ B

a|b

図3 Thy1.1腎炎における E2F-decoy の糸球体細胞増殖抑制効果。a) Mismatch control ODN を投与した腎炎ラット群 (A) に比し、decoy-ODN を投与した腎炎ラット群 (B) では糸球体細胞の増加が著明に抑制された (PAS 染色, 200 倍)。b) 各実験群にて 30 個の糸球体総細胞数を測定し平均値を算定した。NOR: 正常コントロール群, THY1: Thy1.1 腎炎群, THY1+MIS: Mismatch control ODN を投与した Thy1.1 腎炎群, THY1+decoy: E2F-decoy ODN を投与した Thy1.1 腎炎群 (各群とも $n = 4$)。

* $p < 0.01$ vs. THY1, THY1+MIS.

は活性型となり核内へ移行し炎症性病変に関与する遺伝子群の発現を亢進させる。NF- κ B に対する decoy を作製し、Thy1.1 腎炎の病初期に MLV-liposome とともに経腎動脈投与した。第7病日において糸球体内細胞数増加は NF- κ B-decoy 投与群で有意に抑制されていた。糸球体内単球・マクロファージ浸潤(ED-1 陽性細胞数)は decoy 投与群で著明に抑制された。次に、分離糸球体より核蛋白を抽出し EMSA を施行したところ、非治療群および mismatch 変異オリゴ投与群では第7病日において著明に NF- κ B 活性が亢進していたが、decoy 投与群では NF- κ B の結合が競合阻害されていた³⁾。

今後、これらの遺伝子治療法の臨床応用のためには、

1) 臓器・組織特異的な drug delivery system の開発、2) 組織特異的 promoter/enhancer の発見・利用、3) 導入遺伝子の発現制御機構 (on/off system) の開発、等の課題が克服される必要がある。しかし、遺伝子治療法は腎疾患進展の分子機序に立脚しており、治療対象を分子レベルにまで特定しており、従来の方法論とは一線を画している。また、従来の治療法では不可能であった遺伝子・分子レベルでの治療的介入が可能となると考えられる。現在、分子生物学は加

速度的に進歩しており、腎障害進展の分子機序のさらなる解明とともに、技術的困難は早晚解決するものと期待される。21 世紀においては、難治性病態である進行性腎障害に対する究極の治療法として有効で安全な遺伝子治療法が開発され、腎不全への進展阻止の強力な治療法となりうるものと期待される。

文献

- 1) Kashiwara N, Maeshima Y, Sugiyama Y, Sekikawa T, Okamoto K, Morita Y, Kanao K, Yamasaki Y, Makino H, Ota Z, Yasuda T, Nakanishi M : Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion by antisense oligonucleotides. In "Recent advances in molecular nephrology". ed Arakawa M and Nakagawa Y, 1-11, KOHKO-DO/Niigata, Japan, 1995
- 2) Maeshima Y, Kashiwara N, Yasuda T, Sugiyama H, Sekikawa T, Okamoto K, Kanao K, Watanabe Y, Kanwar Y, Makino H : Inhibition of mesangial cell proliferation by E2F decoy oligodeoxynucleotide in vitro and in vivo. J Clin Invest 101 : 2589-2597, 1998
- 3) Kashiwara N, Maeshima Y, Makino H : Therapeutic intervention in glomerulonephritis by oligonucleotides. Exp Nephrol 5 : 126-131, 1997