

腹膜透析における腹膜劣化に対する遺伝子治療： 超音波造影剤によるアプローチ

森 泰 清*

Nonviral Transfer of the Gene with Microbubble Enhanced Ultrasound in Peritoneal Fibrosis

Yasukiyo MORI*

1. はじめに

近年、超音波を用いた治療が各分野で検討されており、中でも超音波造影剤（マイクロバブル）及び超音波照射による遺伝子導入、つまり遺伝子治療への応用が注目されている。現行の遺伝子治療の最大の問題点は、高効率ではあるが安全性に問題の残るウイルスベクターの使用を避けられない点と組織特異性発現の獲得の困難性である[1, 2]。最近、立花らが提唱するマイクロバブルを用いた遺伝子導入法により、血管内皮、心筋、骨格筋、胎児において超音波照射部位特異的に特定の分子を強制発現し得ることが動物実験で報告されている[3]。この場合の遺伝子はウイルスベクターを必要とせず、いわゆる“naked DNA”の状態を導入可能である。その機序には未だ不明の点も多いが、超音波エネルギーにより発生する気泡の複雑な運動（キャビテーション）が細胞膜の透過性を変化させ、これにマイクロバブルの崩壊が加わると一時的に細胞表面に多数の小孔が生じるとされている。この現象はソノポレーションと呼ばれ、この小孔を通じて、遺伝子や薬剤などの取り込みが可能になると考えられている。この際の超音波の強度は通常の診断に用いている超音波と同程度である[4]。このようにマイクロバブルを用いた遺伝子導入は安全かつ簡便に施行できるためヒトへの臨床応用の可能性が期待されている。

筆者らの研究グループでは、このマイクロバブルを用いた遺伝子導入法に着目し、腹膜線維症に対する遺伝子治療への基礎的検討を行っている。近年、糖尿病の増加や人口の高齢化に伴い、末期慢性腎不全患者の透析導入が年々増

加している。持続携行型腹膜透析療法（continuous ambulatory peritoneal dialysis; CAPD）は我が国においても、血液透析に次ぐ末期腎不全治療の他の選択肢として普及している。CAPDについて簡単に説明すると、腹腔内に留置したカテーテルより透析液を注入して一定時間貯留し、その間に腹膜を介して血中の不要な老廃物や水分を透析液に移行させ、その後透析液を体外に取り出して血液を浄化する治療法である。CAPDは毎日、寛徐に血液浄化・除水を施行するため、身体への負担、とりわけ急激な血行動態変化が通常の血液透析に比して少なく、また家庭や職場など社会生活の中で患者さん自身が行うことができるためQOL維持にも秀でている面が少なくない。しかしながらCAPDの長期継続には種々のハードルが存在する。最大の障害として、施行後数年してから生じる除水量減少に代表される腹膜機能低下、つまり腹膜劣化があげられる。これには腹膜線維症あるいは硬化症と呼ばれる腹膜の組織学的変化（線維化、中皮細胞の障害・喪失、新生血管増加など）が強く関連している。しかしながらこの組織変化を惹起するメカニズムは未だ解明されておらず、従って、腹膜機能の保全に対する画期的な手法もないのが現況である。そこで現在、筆者らは腹膜線維症モデルマウスを作成し、その腹膜へマイクロバブルを用いて種々の遺伝子導入を行い、その効果を検討している。本稿では、筆者らのこれまでの研究の概略について解説する。

2. マイクロバブルを用いたマウス腹膜への 遺伝子導入方法の検討

麻酔下でC57BL6Jマウス（6週齢雄）腹腔内に、pcaggs-LacZ（新潟大学 丸山弘樹博士より供与[5]）と超音波造影剤を懸濁混和した溶液を、23 G シリンジを用いて注入した。注入直後に経腹的に超音波を照射し（図1）、照射2日目に壁側腹膜の採取を行い、既報によるβ-galactosidase (X-gal) 染色を行って、導入を確認した[6]。予備実験にお

* 関西医科大学第2内科/2005年7月1日より京都府立医科大学腎臓・高血圧内科
Department of Medicine II, Kansai Medical University.
From July 1, 2005, Division of Hypertension and Nephrology, Kyoto Prefectural University of Medicine.

いて最も導入効率の優れていた条件は次の如くであり、その後の研究に使用した。すなわち、マイクロバブルには Optison® (Amersham 社, San Diego, USA) を用い、Optison® が最終濃度 30% となるように plasmid (pcaggs-LacZ) 溶液と鹼濁混和し、30 秒放置後、腹腔内に投与した。超音波照射は動物実験用超音波照射装置 (Sonitoron 2000; Rich Mar 社, USA) を用い、直径 6 cm のプローブで 1 MHz, 2 W/cm², 5 分の照射を行った。結果、腹膜中皮細胞層に相当する腹膜表層に X-gal 陽性細胞が検出され、マイクロ

バブルと経皮的超音波照射による腹膜への遺伝子導入が可能であることが明らかにされた (図 2, 3)。

3. 腹膜線維症モデルの作成

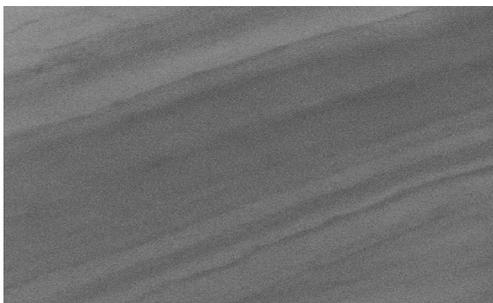
腹膜線維症の動物モデルとして、既報の如く、腹腔内に 0.1% chrolhexidine gluconate (CG) 溶液 0.3 mL を連日 3 週間注入する方法を用いた [7, 8]。本モデルでは、短期間で腹膜線維化を惹起することが可能である。1~3 週間まで投与群を作製し、1 週毎に壁側腹膜を採取した。採取した腹膜はホルマリン固定の後、パラフィン包埋し、組織性状や腹膜下組織の線維化を確認するために Masson-Trichrome 染色を行った。CG 投与 3 週間後、CG 投与群では腹膜中皮下層の肥厚を認め、多数の炎症細胞性浸潤と線維化を認めた (図 4(a))。定量的画像解析 (LuminaVision® software, Mitani Corp., Japan) を行ったところ、3 週間後の腹膜中皮下層厚はコントロール群 (生食のみ投与) に対して CG 投与群は有意に高値であった (図 4(b))。

4. Hepatocyte Growth Factor (HGF) 遺伝子導入とその効果

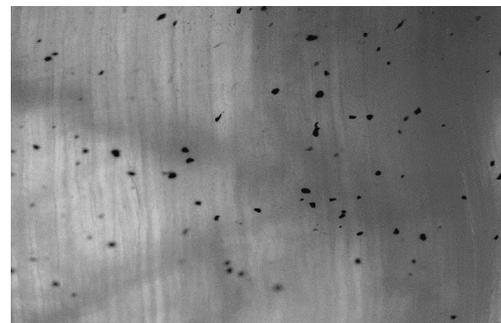
Hepatocyte growth factor (HGF) は当初、肝細胞の成長因子として同定されたが [9, 10]、その後の研究により多



図 1 マウスに対する経皮的超音照射の実際



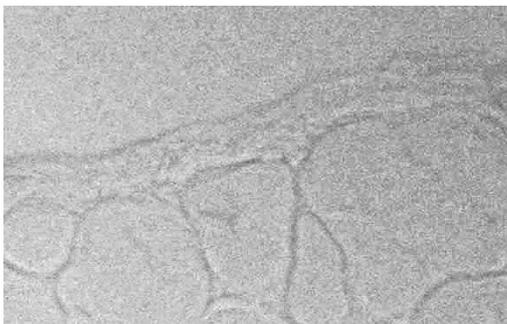
(a)



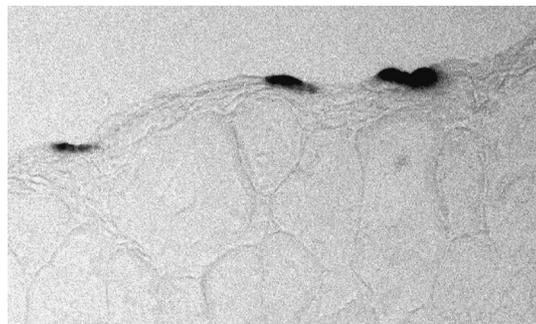
(b)

図 2 腹膜表面の X-gal 染色 (×40)

(a) コントロール群, (b) LacZ 導入群.



(a)



(b)

図 3 薄切切片での腹膜 X-gal 染色 (×400)

(a) コントロール群, (b) LacZ 導入群.

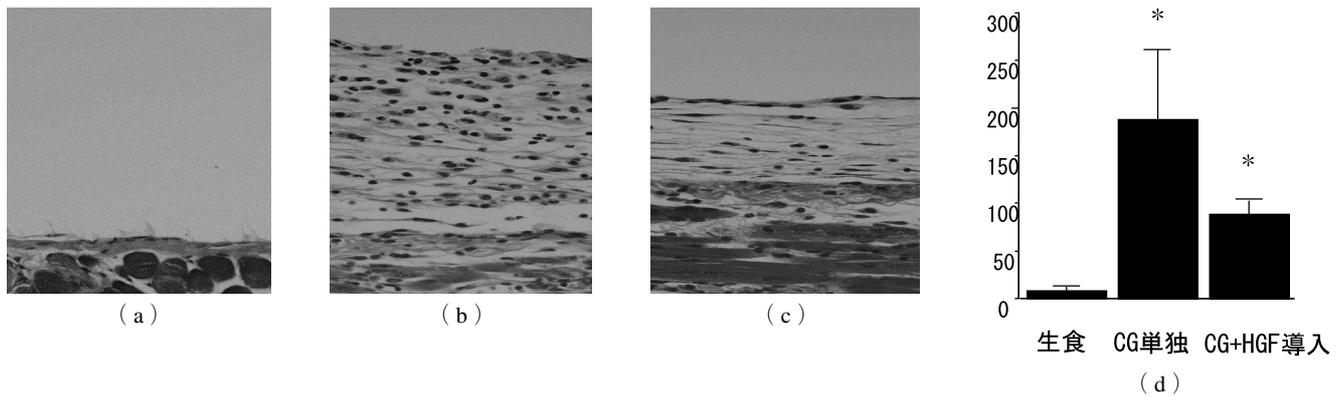


図4 Chrolhexidine gluconate (CG) 投与腹膜線維症モデルマウスの腹膜 (Masson-Trichrome 染色: $\times 200$) (a) 生食群, (b) CG 単独群, (c) CG+HGF 導入群, (d) 腹膜, 中皮下層の肥厚度, 生食群: $7.80 \pm 3.8 \mu\text{m}$, CG 単独群: $205.0 \pm 65.5 \mu\text{m}$, CG+HGF 導入群: $88.0 \pm 14.7 \mu\text{m}$. 生食群 VS CG 単独群: $*p < 0.001$, CG 単独群 VS CG+HGF 導入群: $*p < 0.001$.

様な生理作用があり, なかでも肝, 腎, 肺, 皮膚等種々の臓器で抗線維化作用を有することが報告されている[11]. この HGF の抗線維化作用の機序は未だ明確になされていないが, 多数の機序が関与していると考えられている. なかでも中心的役割を有するのは, 線維化因子である TGF- β との拮抗作用であると想定されている[11]. 腹膜においても, 培養腹膜中皮細胞を用いた実験系で, 糖負荷により刺激された TGF- β の産生が HGF の添加によって抑制されることが最近報告された[12]. そこで, 著者らは前述の方法で腹膜線維症モデルに HGFcDNA (pcaggs-HGF: 新潟大学 丸山弘樹博士より供与) を導入した. 今回の検討では, 腹膜線維化の抑制効果を観察するために実験初日の CG 投与前に HGF 遺伝子導入を行った. 3 週間の CG 連日投与の後, 壁側腹膜を採取し, HGF 遺伝子導入群と非導入群での組織性状を比較, 観察した. また, 腹膜採取時に採血を行い, HGF 遺伝子導入の全身に及ぼす影響を検討する目的で HGF の血漿中濃度を測定した (ELISA 法, R & D 社, USA). Masson-Trichrome 染色において, HGF 遺伝子導入 CG 投与群では非導入 CG 投与群に比し, 有意に腹膜中皮下層厚が抑制されており, 同部位に存在する線維組織や炎症性細胞も減少していた (図 4(b), (c)). 次に免疫染色において, 導入された HGF 遺伝子の発現を確認したところ, HGF 遺伝子投与群では腹膜表層の細胞に HGF 蛋白発現を観察し得た (図 5, 矢印). さらに, TGF- β 陽性細胞数も HGF 遺伝子投与群で有意に減少していた (図 6). なお, 血漿中 HGF 濃度は, 遺伝子導入群, 非導入群のいずれにおいても感度以下であり, 両群間での差を検出し得なかった. 今回の効果発現の機序として, 腹膜表層の細胞に強発現した HGF が腹膜組織内でパラクラインに作用し, 周辺細胞での TGF- β の発現を抑制したことが考えられる. また, HGF の作用は直接に TGF- β 発現に作用するのみならず, MCP-1 及びその下流シグナルである NF- κ B の抑制を介して, 腎間質局所における炎症時のマクロファージ遊

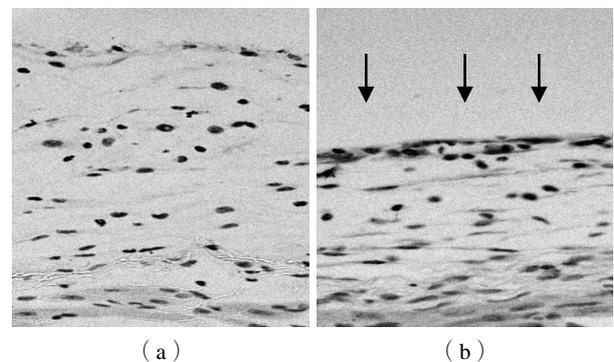


図5 HGF 免疫染色 ($\times 200$) (a) CG 単独群, (b) CG+HGF 導入群.

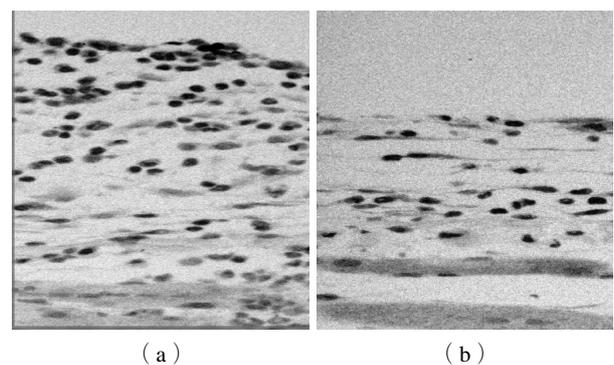


図6 TGF- β 免疫染色 ($\times 200$) (a) CG 単独群, (b) CG+HGF 導入群.

走能の低下を来すことも報告されており[13], 今回の炎症性細胞数の減少効果との関連が考えられる. さらに, これら炎症性細胞や筋線維芽細胞が TGF- β 産生細胞でもあることから, これらの細胞の減少も間接的に腹膜組織全体としての TGF- β 産生低下を惹起した可能性がある. この腹膜における HGF の線維化抑制の詳細な機序については, 現在も研究を進めているところである.

5. おわりに

現在までの諸家による研究では、肥厚・線維化には TGF- β が主要な因子として関与しているとされている [14]。Margetts ら [15] は、アデノウイルスをベクターとして用いた TGF- β 遺伝子をラット腹膜に強制発現させることにより、線維化の惹起を証明している。従って、この分子の過剰効果を抑制することは、線維化軽減をもたらすものと考えられる。しかしながら、現時点で臨床応用可能な TGF- β 拮抗薬は開発されていない。また、将来的に使用可能となっても全身投与の際には、他の臓器作用も勘案されねばならない。その点において、本法を用いた遺伝子治療は、目的とした組織に高濃度に特定の蛋白を発現させることが可能であり、より特異的な治療法の一つと成り得る。著者らの研究の結果、マイクロバブルと遺伝子を経皮的に腹腔内に注入し、超音波照射することにより、少なくとも腹膜表層への遺伝子導入は可能であり、低侵襲かつ簡便で反復投与も可能な腹膜への遺伝子導入法であることが初めて明らかとなった。また、この方法による HGF 遺伝子発現により腹膜線維化抑制作用が証明し得た。今回の研究をさらに発展させることによって、著者らは臨床における CAPD においても腹膜カテーテルを介した簡便な遺伝子導入が理論的には可能であると考えている。今後、本法の効率向上や治療を視野に入れた HGF 以外の候補遺伝子の検討も行っていきたい。

文 献

- Beck C, Uramoto H, Boren J, Akyurek LM: Tissue-specific targeting for cardiovascular gene transfer. Potential vectors and future challenges. *Curr Gene Ther.* **4**(4): 457-467, 2004.
- Tomanin R, Scarpa M: Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. *Curr Gene Ther.* **4**(4): 357-372, 2004.
- Tachibana, K: Emerging technologies in therapeutic ultrasound: thermal ablation to gene delivery. *Hum Cell.* **17**(1): 7-15, 2004.
- Blomley MJ, Cooke JC, Unger EC, Monaghan MJ, Cosgrove DO: Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound. *BMJ.* **322**(7296): 1222-1225, 2001.
- Maruyama H, Sugawa M, Moriguchi Y, Imazeki I, Ishikawa Y, Ataka K, Hasegawa S, Ito Y, Higuchi N, Kazama JJ, Gejyo F, Miyazaki JI: Continuous erythropoietin delivery by muscle-targeted gene transfer using in vivo electroporation. *Hum Gene Ther.* **11**(3): 429-437, 2000.
- Takase O, Hirahashi J, Takayanagi A, Chikaraishi A, Marumo T, Ozawa Y, Hayashi M, Shimizu N, Saruta T: Gene transfer of truncated IkappaBalpha prevents tubulointerstitial injury. *Kidney Int.* **63**(2): 501-513, 2003.
- Ishii Y, Sawada T, Shimizu A, Tojimbara T, Nakajima I, Fuchinoue S, Teraoka S: An experimental sclerosing encapsulating peritonitis model in mice. *Nephrol Dial Transplant.* **16**(6): 1262-1266, 2001.
- Yoshio Y, Miyazaki M, Abe K, Nishino T, Furusu A, Mizuta Y, Harada T, Ozono Y, Koji T, Kohno S: TNP-470, an angiogenesis inhibitor, suppresses the progression of peritoneal fibrosis in mouse experimental model. *Kidney Int.* **66**(4): 1677-1685, 2004.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature.* **342**(6248): 440-443, 1989.
- Gao X, Mae H, Ayabe N, Takai T, Oshima K, Hattori M, Ueki T, Fujimoto J, Tanizawa T: Hepatocyte growth factor gene therapy retards the progression of chronic obstructive nephropathy. *Kidney Int.* **62**(4): 1238-1248, 2002.
- Liu, Y: Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol.* **287**(1): F7-F16, 2004.
- Matsuo K, Maeda Y, Naiki Y, Matsuoka T, Tamai Y, Yonekawa S, Sakaguchi M, Iwamoto I, Hasegawa H, Matsuoto K, Nakamura T, Kanamaru A: Possible effects of hepatocyte growth factor for the prevention of peritoneal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol.* **99**(3): e87-e94, 2005.
- Gong R, Rifai A, Tolbert EM, Biswas P, Centracchio JN, Dworkin LD: Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES. *J Am Soc Nephrol.* **15**(11): 2868 - 2881, 2004.
- Devuyst O: New insights in the molecular mechanisms regulating peritoneal permeability. *Nephrol Dial Transplant.* **17**(4): 548-551, 2002.
- Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gaudie J: Gene transfer of transforming growth factor-beta to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol.* **12**(10): 2029-2039, 2001.

森 泰清 (もり やすきよ)

平成3年関西医科大学大学院医学研究科卒業。平成12年より関西医科大学第二内科講師，平成17年7月より京都府立医科大学腎臓・高血圧内科講師。専門分野：腎高血圧。
所属学会：日本内科学会，日本透析医学会，日本腎臓学会，日本高血圧学会など。

