Osaka University Knowledge Archive

Title	Glomerulosclerosis Induced by in vivo Transfection of transforming Growth Factor-β or Platelet-derived Growth Factor Gene into the Rat Kidney
Author(s)	猪阪, 善隆
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3075052
rights	© 1993 Journal of Clinical Investigation
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏　　名	猪阪善隆（いさかよしたか）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11283　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	**Glomerulosclerosis Induced by in vivo Transfection of Transforming Growth Factor-β or Platelet-derived Growth Factor Gene into the Rat Kidney（TGF-β，PDGF遺伝子のラット腎へのin vivo遺伝子導入による糸球体硬化病変の発現）**
論文審査委員	（主査） 教　授　鎌田　武信 （副査） 教　授　松沢　佑次　　教　授　田中　亀代次

論文内容の要旨

【目的】

現在腎臓病学において，慢性腎不全に至る最大の原因疾患である糸球体腎炎の発症，進展を解明し，治療対策を講じることが，究極の課題であるといえる。これまでに，主に培養細胞や実験腎炎を用いた多くの研究結果からplatelet-derived growth factor（PDGF），transfoming growth factor β（TGF-β）などの増殖因子をはじめとする各種生理活性物質が注目され，最近，それらの腎局所における過剰発現が糸球体硬化病変進展において重要と考えられているが，このことをin vivoで検定しうるモデル系はこれまで確立されていない。糸球体硬化病変進展に関与しうる諸因子のcDNAを，HVJ-リポソーム法によりラット腎動脈よりin vivo遺伝子導入を行い，それらを腎局所でのみ過剰発現させ，特定因子の腎病変成立への関与をin vivoで直接検討することを目的とする。

【方法】

導入する遺伝子としては，PDGF，TGF-βのcDNAを取りあげた。

(1) in vivo遺伝子導入：アクチンプロモーター下にPDGF，TGF-βおよびコントロールとしてchloramphenicol acetyl transferase（CAT）のcDNAを含んだ発現ベクター（pAct-PDGF，pAct-TGFβ，pAct-CAT）を作製する。この発現ベクター（pAct-PDGF，pAct-TGFβ，pAct-CAT）を核の非ヒストン蛋白であるhigh mobility group-1（HMG-1）とともリポソームに封入し，さらにその表面にHVJ（センダイウイルス）を配したHVJ-リポソームを作成し，このHVJ-リポソーム懸濁液0.5ml（lipids 2mg，plasmid DNA 50μg）をラット腎動脈より注入し，in vivo遺伝子導入を行った。

(2)糸球体病変の検討

(a)遺伝子導入の確認;in vivo遺伝子導入後，3，5，7日目に灌流固定を行い，蛍光抗体法によりPDGF，TGF-β蛋白の発現を確認した。

(b)光顕による病理学的変化の検討;メサンギウム細胞の増殖や細胞外基質の増加などの糸球体腎炎様の変化について検討を加えた。細胞増殖，細胞外基質産生の程度を定量するために，各切片につき糸球体直径が80-100μmに相当する糸球体をランダムに30個選び，糸球体内の細胞数をカウントするとともに，Rajiら（Kidney Int. 26. 137，1984）が報告した方法に従ってメサンギウム基質の増生の程度を求め，各2-3匹のラットについて検討を行った。

(c)蛍光抗体法による検討;抗ラットⅠ，Ⅲ，Ⅳ型コラーゲン抗体を用い，細胞外基質成分について検討した。

【成績】

(1)HVJ-リポソーム法によりPDGF，TGF-β遺伝子の腎臓へのin vivo遺伝子導入を行い，蛍光抗体法により，その蛋白発現を確認した。腎臓の糸球体内細胞および皮質内の動脈に蛋白発現が認められたが，尿細管には発現は認められなかった。

(2)TGF-β遺伝子の導入により，3日目より細胞外基質増加がみられ，5，7日目にはさらにその変化が強くみられた。また細胞増殖も軽度認められた。

(3)PDGF遺伝子の導入により，3日目より細胞増殖がみられ，5，7日目にはさらにその変化が強くみられ，糸球体の分葉化も認められた。また，細胞外基質の産生増加も認められた。

(4)コントロールとしてのCAT遺伝子導入後には細胞増殖及び細胞外基質増生は，認められず，また蛋白尿も認めなかった。

(5)正常糸球体では基底膜成分であるⅣ型コラーゲンが認められるだけであるが，TGF-β遺伝子の導入により，Ⅳ型コラーゲンの増加が認められるだけでなく，糸球体硬化症に特徴的とされる間質コラーゲンであるⅠ型，Ⅲ型が認められた。

【総括】

HVJ-リポソーム法により，PDGF，TGF-βが糸球体腎炎においてそれぞれ細胞外基質産生，細胞増殖を主体とした作用をもっていることをin vivoにおいて初めて証明した。このモデルにより，細胞障害性を有することなく，腎臓局所に遺伝子を導入することが可能となり，諸因子を腎臓局所においてオートクラインあるいはパラクラインな因子として作用させ，糸球体腎炎発症におけるある単一因子の影響を直接的に検討することが可能となった。本法がtransgenic mouseと最も異なる点は，transgenic mouseではある因子が全身的に過剰発現しており，ある臓器に生じた病変にこれら全身性の過剰発現が少なからず影響を与えるのに対し，本法ではある標的臓器でのみ過剰発現させ得るため，それら全身的影響を除外し得ることである。in vivo遺伝子導入による腎障害モデルの作製は，糸球体硬化病変発症進展の病態解明，治療効果の検定系として役立つことが期待される。

論文審査の結果の要旨

糸球体病変の硬化に至る進展制御因子として，platele-derived growth factor（PDGF），transfoming growth factot β（TGF-β）が，注目されている。この2つの増殖因子の標的細胞であり，かつ産生細胞であるメサンギウム細胞の培養細胞を用いたin vitroの実験において，TGF-βは細胞外基質産生を亢進し，細胞増殖を抑制するとされ，PDGFは細胞増殖を促進するとされている。

本研究はこれらの増殖因子のin vivoでの効果を検討するために，in vivo遺伝子導入法を用い，これらの増殖因子を腎臓局所において過剰発現させ，TGF-β，PDGF遺伝子の導入によりそれぞれ細胞外基質増加，細胞増殖を主体とする糸球体病変が認められることを明らかにした。

この系の確立により，糸球体硬化病変進展に関与しうる他の因子の直接的関与もin vivoで検討することが可能となり，各種サイトカインの複雑なネットワーク解明にも資するところ大と期待され，学位に値すると考える。