



Title	Inhibition of transforming growth factor- β 1 by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis
Author(s)	赤木, 良隆
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40717
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	赤木 良 隆
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 13695 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Inhibition of transforming growth factor- β_1 by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis (TGF- β アンチセンスオリゴヌクレオチドによる糸球体硬化進展の抑制効果)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 安東 明夫
	(副査) 教授 堀 正二 教授 萩原 俊男

論文内容の要旨

【目的】

細胞外基質蛋白(extracellular matrix: ECM)の糸球体内への蓄積により糸球体硬化が進展し、その結果、糸球体の有効濾過面積は減少し糸球体機能は廃絶する。ECMの蓄積には多くの増殖因子やサイトカインなど種々の因子が関与するが、transforming growth factor- β (TGF- β)はそれらの中で最も重要な役割を果たしており、主にメサンギウム細胞において産生され autocrine/paracrine的に作用していることが実験的モデルのみならずヒト腎炎においても明らかにされつつある。さらに、腎炎モデルラットにTGF- β 抗体を投与することにより ECM の蓄積が抑制されることや TGF- β 遺伝子導入により糸球体硬化病変が惹起されることが報告されている。これらの研究は、in vivoにおいて TGF- β の作用阻害が糸球体硬化病変の進展を抑制しうる可能性を示唆している。今回、HVJ-リポソーム法による遺伝子導入技術を利用して、糸球体硬化病変の進展に中心的な役割を果たしている TGF- β の腎での過剰発現をアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて抑制することにより、腎炎モデルの病変進展を抑制しうるか検討した。

【方法ならびに成績】

- 1) アンチセンスオリゴの設計 アンチセンスオリゴの塩基配列は TGF- β mRNA の翻訳開始点付近をターゲットにし、15mer の S-オリゴを作成した。また、コントロールとしてスクランブル/リバース/センスオリゴを用いて、アンチセンス効果がアンチセンスオリゴに特異的であるか検討した。
- 2) HVJ-リポソームの作製 遺伝子導入には金田らによって開発された HVJ ウィルスの細胞融合能を利用した HVJ-リポソーム法を用いた。10mgの混合脂質に20 μ gのオリゴを封入した脂質2重層のリポソームと不活化した HVJ ウィルスとの融合により HVJ-リポソームを作製した。
- 3) アンチセンスオリゴが導入された細胞の同定 基礎的な検討として、HVJ-リポソーム法により TGF- β アンチセンスオリゴを腎臓に導入した場合、どの細胞にオリゴが取り込まれるかを調べた。5'端を FITC 標識した TGF- β アンチセンスオリゴを HVJ-リポソーム法により経腎動脈的に正常ラットの腎臓に導入し、20分後に腎摘して腎切片上における FITC オリゴの局在を蛍光顕微鏡下に観察した。アンチセンスオリゴが導入されたことを示す腎組織の FITC の蛍光は導入側腎臓の全ての糸球体に認められたが、尿細管・間質にはほとんど認められなかった。また、糸

球体細胞に導入された FITC オリゴは、20分後すぐに核に移行・集積していることが確認された。さらにオリゴが導入された細胞を同定するために、OX-7（メサンギウム細胞の特異抗原である Thy-1 に対するモノクロナール抗体）を用いてメサンギウム細胞をローダミン染色した。その結果、TGF- β アンチセンスオリゴが導入された FITC 陽性の核は、主にローダミン陽性のメサンギウム領域中に存在し、メサンギウム細胞の核であることが推定された。

4) アンチセンスオリゴ導入による TGF- β mRNA レベルの検討 代表的なメサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルであるラット抗 Thy-1 腎炎を用いた。6 週令 SD ラットに OX-7 (1.0mg/KgBW) を静注することにより腎炎を惹起し、その 2 日後に TGF- β アンチセンスオリゴを導入した。また、TGF- β アンチセンスオリゴを導入したラットの左腎と対側の右腎を無治療群として実験に供した。抗 Thy-1 腎炎において TGF- β mRNA レベルがピークとなる腎炎惹起後 4 日目に糸球体をシービング法により単離し、糸球体の TGF- β mRNA レベルをノザンプロット法により比較検討した。その結果、TGF- β mRNA レベルは無治療群で著明に増加しており、スクランブル／リバース／センス導入群においては無治療群と比較して差は認められなかったが、アンチセンス導入群では、TGF- β mRNA レベルは約 70% 抑制されていた。

5) アンチセンスオリゴ導入による抗 Thy-1 腎炎の組織学的検討 抗 Thy-1 腎炎において組織学的变化がピークとなる腎炎惹起 9 日目に腎臓を灌流固定後、摘出した。そのパラフィン標本で PAS 染色によるメサンギウムの ECM 蓄積の程度 (ECM score) および糸球体細胞数の検討を行った。さらに、TGF- β 抗体を用いて免疫組織染色を行い、糸球体での TGF- β の発現抑制硬化を蛋白レベルにおいても検討した。スクランブル／リバース／センス導入群においては TGF- β の蛋白発現レベルは無治療群と比較してほとんど差は認められなかっただが、アンチセンス導入群では TGF- β の蛋白発現が抑制されていた。また、PAS 染色により組織変化を検討したところアンチセンス導入群では ECM の蓄積が著明に抑制されていた。そこで糸球体の ECM score および糸球体細胞数を評価した結果、同群では ECM score の有意な低下が認められた。一方、糸球体細胞数はオリゴを導入した各群間でほとんど変化が認められなかっただ。

【総括】

HVJ-リポソーム法によりアンチセンスオリゴをメサンギウム細胞の核に導入することが可能となり、TGF- β が autocrine/paracrine 的に作用すると考えられている糸球体のメサンギウム細胞において、効果的にアンチセンスオリゴを作用させることができたと考えられた。実験腎炎モデルラットにおいて過剰発現した TGF- β がアンチセンスオリゴにより発現が低下し、糸球体細胞外基質の蓄積が抑制された事から、TGF- β が糸球体硬化の進展に重要な役割を果たしていることが改めて示唆された。また、TGF- β の遺伝子発現を抑制することにより障害糸球体における ECM の蓄積を制御できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

慢性進行性糸球体疾患に共通する終末病理像である糸球体硬化病変は細胞外基質蛋白の蓄積に起因している。この細胞外基質の蓄積には多くの増殖因子やサイトカインなど種々の因子の関与が明らかにされつつあるが、それらの中で最も強力な細胞外基質産生作用を持つ transforming growth factor- β (TGF- β) は糸球体硬化病変の進展に関わる重要な因子として注目されており、主にメサンギウム細胞において産生され、オートクリン・パラクリン的に作用していることが実験的モデルのみならずヒト腎炎においても明らかにされつつある。

本研究では、糸球体硬化病変に対する遺伝子治療の可能性として、糸球体メサンギウム細胞で過剰発現している TGF- β をアンチセンスオリゴを腎臓に導入することにより是正することを試みた。

HVJ-liposome 法によりアンチセンスオリゴが高率に糸球メサンギウム細胞の核内に導入され、その結果、糸球体局所での TGF- β の遺伝子発現が効果的に阻害されることを明らかにした。また、遺伝子レベルでの TGF- β 発現を抑制することで、糸球体の細胞外基質の蓄積が抑制されることを初めて証明し、糸球体硬化病変進展に対する治療の可能性を示唆した。

この系の確立により、メサンギウム細胞に発現する特定の遺伝子の発現抑制を行うことが可能となり、進行性糸球体障害の病態解明にも資するところ大と期待され、学位に値するものと考える。