



Title	Gene transfer targeting interstitial fibroblasts by the artificial viral envelope-type hemagglutinating virus of Japan liposome method
Author(s)	辻江, 道子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42684">https://hdl.handle.net/11094/42684</a>
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、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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	辻 江道子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16063 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Gene transfer targeting interstitial fibroblasts by the artificial viral envelope-type hemagglutinating virus of Japan liposome method (AVE型HVJリポソーム法を用いた腎間質細胞への遺伝子導入)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二
	(副査) 教授 金田 安史 教授 萩原 俊男

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

尿細管間質障害は進行性腎障害においてその原疾患に関わらず共通にみられる病理変化であり、腎間質障害の程度が糸球体の障害よりも腎機能低下や腎の長期予後と相関するとされている。間質障害進行のメカニズムは十分に解明されていないが、間質の線維芽細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。

この点から、間質線維芽細胞への遺伝子導入は、尿細管間質障害の病態メカニズムの解明、ひいては遺伝子治療に応用可能と考えられるが、腎間質を標的とした遺伝子導入はこれまで2つ報告が認められるのみである。アデノウイルスを用いた *in vivo* 遺伝子導入では、糸球体及び尿細管の周囲血管と主に大血管に遺伝子が導入されており、培養尿細管細胞を用いた腎皮膜下への *ex vivo* 遺伝子導入では、導入細胞は腎皮膜下にとどまり、いずれも間質線維芽細胞をターゲットとした遺伝子導入には成功していない。

本研究では AVE型HVJリポソーム法を用い、腎間質細胞への新しい遺伝子導入法を開発することを目的とした。間質線維芽細胞への特異的遺伝子導入が可能となれば、特定のサイトカインなどの機能解析を *in vivo* で行うことができ、病態解明につながるばかりでなく、将来的には遺伝子治療の可能性も広がると考えられる。

#### 【方法と成績】

##### 腎間質細胞への遺伝子導入及び導入細胞の同定

従来の HVJ リポソームに比べて、artificial viral envelope (AVE) を用いた改良型 HVJ リポソーム法は *in vivo* においてより高い遺伝子導入効率を有することが報告されている。そこで、この AVE型HVJリポソーム法を用いて腎間質細胞への遺伝子導入を試みた。

6 週齢の雄性 SD ラットの尿管に30G針を穿刺し、腎静脈をクランプした後 FITC ラベルしたオリゴ DNA (50 μg) を含んだ AVE型HVJリポソーム溶液 (300 μL) を逆行性に注入した。10分後に腎臓を単離し、FITC 蛍光を観察した。FITC ラベルされたオリゴ DNA は10分後既に腎組織の核に集積していることが確認された。導入細胞を同定するために、ロダミンラベルしたIV型コラーゲン（尿細管基底膜のマーカー）に対する抗体を用いて、蛍光抗体法により染色したところ、導入細胞は尿細管基底膜の外側に位置し、腎間質細胞であることが確認されたが、糸球体および尿細管細胞には全く導入されなかった。また、導入された細胞は ER-TR 7 (線維芽細胞のマーカー) 陽性、ED 1 (マクロファージのマーカー) 陰性の細胞であることから、導入細胞はマクロファージではなく間質線維芽細胞で

あることが確認された。

#### 間質への導入経路

遺伝子が間質領域に導入される経路を確認するために、墨汁を尿管から注入し、組織学的な検討を行った。300 μLの墨汁を腎静脈をクランプした後、尿管から逆行的に注入すると、墨汁は皮質領域にびまん性に広がり、組織学的には、墨汁は尿細管腔には認められず間質内にのみ分布していた。このことから、逆行性に注入された遺伝子は腎孟上皮細胞の間隙を通って直接間質内に到達することが示された。

#### 導入された遺伝子の発現効率の検討

腎においては内因性のβガラクトシダーゼ活性が認められるため、上流に核移行装置を組み込んだ LacZ 遺伝子 (pActLacZ-NLS) を用いて X-gal 染色により腎間質細胞に導入された遺伝子の発現を検討した。外因性の LacZ-NLS 遺伝子が発現した場合は X-gal 染色により核のみが青染するため、細胞質が青染する内因性の βガラクトシダーゼ活性と区別が可能である。6 週齢の雄性 SD ラットの尿管に30G針を穿刺し、腎静脈をクランプしたのち、pActLacZ-NLS (200 μg) を含んだ AVE 型 HVJ リポソーム溶液 (300 μL) を逆行性に注入し、10分後腎静脈のクランプを解放し、尿管を結紮した。1、2 週間後に腎臓を単離し、組織の X-gal 染色を行った。腎間質細胞の核のみが青染し、糸球体細胞や尿細管細胞は染色されず導入遺伝子の間質細胞での発現が確認された。また導入遺伝子は少なくとも 2 週間は発現することが確認された。

以上の結果より AVE 型 HVJ リポソームを用いた逆行性遺伝子導入により、遺伝子は間質線維芽細胞の核に導入され、レポーター遺伝子の発現は導入後少なくとも 2 週間は持続することが確認された。

#### **【総括】**

我々は AVE 型 HVJ リポソーム法を用いた逆行性遺伝子導入法により *in vivo* において初めて腎間質線維芽細胞に特異的に遺伝子導入する方法を開発した。この方法は、今後進行性腎障害における腎間質線維芽細胞の関与を *in vivo* での分子生物学的検討を可能とし、さらには、進行性腎障害に対する遺伝子治療の実現の可能性を示唆するものである。

### **論文審査の結果の要旨**

尿細管間質障害は、進行性腎障害において共通にみられる病理変化であり、腎間質障害の程度が腎機能低下や腎の長期予後と相關するとされている。間質障害進展に間質の線維芽細胞が重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細は明らかではない。

この点から、間質線維芽細胞への遺伝子を導入することは、特定の分子の機能解析を *in vivo* で行うことができ病態進展のメカニズムの解明につながるばかりでなく、遺伝子治療にも応用可能と考えられ、腎間質線維芽細胞への特異的遺伝子導入法の開発は、腎臓病学における長年の課題であった。

本研究では AVE 型 HVJ リポソーム法を用い、腎間質細胞への新しい遺伝子導入法を開発した。AVE 型 HVJ リポソームを尿管より逆行性に導入することにより、遺伝子は間質細胞の核に導入され、免疫染色により導入された細胞は線維芽細胞であることが確認された。また、墨汁を用いた実験では、遺伝子を含む HVJ リポソーム溶液は腎孟から直接間質に達することも解明している。レポーター遺伝子を用いた検討では間質における外来の遺伝子発現は導入後 2 週間持続することを確認している。

AVE 型 HVJ リポソーム法を用いた逆行性遺伝子導入法により、*in vivo* において世界で初めて腎間質線維芽細胞に特異的に遺伝子導入する方法を開発したことは、今後進行性腎障害における腎間質線維芽細胞の役割の解明を *in vivo* での分子生物学的アプローチで可能とし、さらには、進行性腎障害に対する遺伝子治療の実現にも寄与することが期待され、その意義は大きく、学位に値するものと考える。