

Title	Electroporation-mediated PDGF receptor-IgG chimera gene transfer ameliorates experimental glomerulonephritis
Author(s)	中村, 弘之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/43219
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	中村 弘之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16513 号
学位授与年月日	平成13年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Electroporation-mediated PDGF receptor-IgG chimera gene transfer ameliorates experimental glomerulonephritis (エレクトロポレーション法を用いた PDGF 受容体 IgG キメラ遺伝子導入による糸球体腎炎治療の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 安東 明夫 教授 金田 安史

論文内容の要旨

【目的】

糸球体腎炎の病変進展の過程、すなわち、メサンギウム細胞の増殖および基質の増加には、多くのサイトカインや成長因子が関与している。なかでも Platelet-derived growth factor (以下 PDGF) は重要な役割を持つと考えられており、PDGF の作用発現を制御することにより、腎炎における糸球体障害の進展を抑制しうる可能性が期待される。

近年、electroporation 法が *in vivo* 遺伝子導入法に応用され、動物実験レベルにおいて、皮膚、筋肉などへの遺伝子導入が試みられている。electroporation 法はウイルスベクターを用いた遺伝子導入法に比して安全であり、安価で手法も簡易であるといった利点があり、遺伝子導入法として有用と考えられる。

本論文では、ラット糸球体腎炎モデルを用いて、electroporation 法を用いた筋肉への PDGF 受容体-IgG キメラ (PDGFR/Fc) 遺伝子導入により、腎炎の進展を抑制し得るかを検討した。

【方法】

1. PDGFR/Fcキメラ分子による PDGF 作用阻害の検討 (*in vitro*)

PDGF β レセプターの細胞外ドメインの cDNA を、ヒト IgG の Fc 部分の cDNA に融合したキメラ発現ベクターを作製し、COS 細胞に導入し、培養上清からキメラ分子を精製した。

① ヒトメサンギウム細胞をキメラ分子の存在下あるいは非存在下で PDGF により刺激した後、PDGF レセプターを免疫沈降法により単離し、リン酸化チロシンに対する抗体を用いて Western blot 法によりリン酸化を受けた PDGF レセプター量を評価した。

② PDGF による細胞増殖作用に対するキメラ分子の抑制効果を、培養 NIH3T3 細胞を用いた colony forming assay および、培養メサンギウム細胞を用いた ^3H -thymidine uptake にて評価した。

2. PDGFR/Fc遺伝子導入による糸球体腎炎進展抑制効果の検討 (*in vivo*)

① electroporation 法による骨格筋への遺伝子導入

ラット前頸骨筋に DNA200 μg を筋注し、同部をピンセット型電極で挟み、100V、6 回の電気パルスをかけ導入を行った。bupivacaine 前処置効果の検討のため、luciferase 発現ベクター導入 4 日後の筋肉での luciferase 活性を測定した。また、PDGFR/Fc発現ベクターを筋肉に導入し、4 日後の血中 PDGFR/Fc濃度を

ELISA 法にて測定した。

② Thy-1 腎炎モデルにおける PDGFR/Fc 発現ベクター導入による治療効果

ラット前脛骨筋に PDGFR/Fc 発現ベクターを導入し、翌日に OX-7 静注にて糸球体腎炎モデルである Thy1 腎炎を惹起させた。第 5、7 日後に腎臓を摘出し、PAS 染色による糸球体細胞数、細胞外基質産生の程度を、また、免疫染色にて細胞増殖のマーカーである PCNA、形質転換の指標となる α SMA を評価した。さらに、糸球体を sieving 法により単離し、Northern blot 法にて α SMA、TGF β 、I 型コラーゲンの糸球体における mRNA 発現を評価した。

【成績】

1. PDGF の刺激により、ヒトメサンギウム細胞の PDGF レセプターのチロシン残基が強くリン酸化を受けたが、キメラ分子同時添加によりレセプターのリン酸化は抑制された。

PDGF 刺激により、コロニー数および ^3H -thymidine uptake の増加が認められたが、キメラ分子の同時添加によりこれらは有意に抑制され、キメラ分子による細胞増殖抑制効果が確認された。

2. 遺伝子導入効率の検討では、bupivacaine 前処置により無処置群に比し有意に遺伝子発現増強が認められた。また、この方法を用いた PDGFR/Fc 発現ベクター導入 4 日後の血中 PDGFR/Fc 濃度は $244.4 \pm 89.8 \text{ ng/ml}$ であった。

Thy1 腎炎惹起 5 日目には、disease control 群 (DC 群) では PCNA 陽性細胞数の増加が認められたが、PDGFR/Fc 発現ベクター導入群 (PDGFR/Fc 群) では有意な減少を認めた。また、PDGFR/Fc 群では DC 群と比し α SMA 発現が有意に抑制された。

Northern blot 法にて糸球体での α SMA、TGF- β 、I 型コラーゲン mRNA 発現を検討したところ、DC 群では発現の亢進が認められたが、PDGFR/Fc 群ではこの発現が抑制された。

PAS 染色にて、DC 群では著明な細胞増殖及び基質の増生を認めたが、PDGFR/Fc 群では両者ともに有意な抑制が認められた。

【総括】

electroporation 法を用いた骨格筋への PDGFR/Fc 発現ベクター導入により、PDGFR/Fc 蛋白が血中に有効濃度分泌され、Thy-1 腎炎モデルラットにおいて、糸球体の細胞増殖及び細胞外基質増生の抑制、 α SMA、TGF- β 、I 型コラーゲンの発現低下が認められ、PDGF の作用発現を抑制することにより糸球体障害の進展を抑制しうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

我が国において慢性腎不全による透析患者は年々増加しており、IgA 腎症をはじめとする糸球体腎炎の進展を阻止する新たな治療法の開発が望まれている。中村弘之君は、腎炎の病変進展において重要な役割もつと考えられている血小板由来増殖因子 (PDGF) の作用を制御することにより、腎炎を治療しうる可能性が考えられることに着目し、PDGF β 受容体 IgG キメラ発現ベクターを骨格筋にエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入することにより、腎炎の進展を抑制しうるかどうかを検討した。

まず、PDGF β 受容体 IgG キメラ発現ベクターを作成し、COS 細胞に導入して得られたキメラ分子が PDGF-BB の作用を抑制するかを検討した。培養細胞を用いた実験により、キメラ分子は PDGF-BB による PDGF β レセプターのチロシンリン酸化を抑制し、PDGF によるコロニー形成および、 ^3H -thymidine incorporation を有意に抑制し、キメラ分子が PDGF の作用を抑制することを示した。

次に、ラット骨格筋へのエレクトロポレーション法を用いた PDGF β 受容体 IgG キメラ発現ベクターの遺伝子導入を行い、キメラ分子の血中濃度を測定することにより、キメラ分子が発現、分泌されることを確認した。さらに、ラット糸球体腎炎モデルにおいて、PDGF 受容体 IgG キメラ遺伝子導入による治療効果を検討し、糸球体における細胞増殖および細胞外基質の増生を抑制することを示し、治療に直結する可能性を示し得た。

以上、糸球体腎炎に対する治療として、PDGFの作用抑制を目的としたエレクトロポレーション法を用いた遺伝子治療という、臨床応用の可能性のある新たな治療法を開発した点で、中村君の研究は非常に意義深いものであり、学位に値するものと考えられる。