



Title	核内受容体PPAR $\gamma$ をターゲットとした遺伝子治療に関する研究
Author(s)	形山, 和史
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44798">https://hdl.handle.net/11094/44798</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	かた 形 やま かず ふみ 山 和 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 18633 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	核内受容体 PPAR $\gamma$ をターゲットとした遺伝子治療に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 真弓 忠範 (副査) 教 授 小林 祐次 教 授 前田 正知 教 授 山元 弘

### 論 文 内 容 の 要 旨

現在の日本では食事の欧米化や運動不足などの生活環境に起因した糖尿病患者が増加の一途をたどっている。興味深いことに、その増加と相関するかのよう炎症性腸疾患患者数も増加しつつあり、これらの間になんらかの因果関係があるのではないかと予想されていたものの詳細は不明であった。近年我々の研究グループをはじめいくつかの研究グループが、2 型糖尿病治療薬チアゾリジン誘導体のターゲット分子である Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) が炎症を伴う疾患における治療ターゲットになる可能性を示して以来、これら疾患の共通の原因遺伝子としてのみならず、さまざまな疾患と PPAR $\gamma$  との関わりが注目されている。我々はこれまでに、マウス大腸炎モデルに対して PPAR $\gamma$  リガンドを予防的に投与することで腸管の炎症を抑制可能であること、腸管の虚血再灌流障害に対して PPAR $\gamma$  リガンドが予防効果を示すことを報告してきた。一方、同じ動物モデルを用いた検討において、炎症反応が起こった後の投与（治療的投与）では PPAR $\gamma$  リガンドの有効性は著しく減弱しているか、あるいはその効果がほとんど確認できなかった。また、PPAR $\gamma$  リガンドの抗炎症作用はレセプターを介さないリガンド直接の作用であるという報告も存在し議論を呼んでいた。そこで申請者は、本研究において PPAR $\gamma$  の炎症性腸疾患に対する有効性を再度検討すると共に、炎症性腸疾患に対して有効な PPAR $\gamma$  をターゲットとした遺伝子治療の可能性を示した。さらには、未だ不明な部分が多く残されている PPAR $\gamma$  の生理的役割を解明する為に有用な PPAR $\gamma$  ノックダウン法の確立を目指した。

はじめに、炎症性腸疾患のモデルとして汎用されているデキストラン (DSS) 誘発腸炎マウスを用い、正常マウスと、DSS により腸炎を誘発したマウスの大腸における PPAR $\gamma$  発現レベルを Western blot 法で比較した。その結果、DSS 誘発腸炎マウスの腸管組織で PPAR $\gamma$  の発現レベルが低下していることを確認した。さらには、炎症の進行に伴い、腸管に存在するリンパ球集団において PPAR $\gamma$  発現レベルが著しく低下することを明らかとした。また、興味深いことに腸管周辺の腹腔細胞においても同様に PPAR $\gamma$  発現レベルの低下が認められた。一方、腸管上皮細胞および遠隔の免疫臓器である脾臓のリンパ球集団では、PPAR $\gamma$  の発現レベルに顕著な変化は認められなかった。これらの結果は、腸管あるいは腸管周囲に存在するリンパ球において炎症惹起後に PPAR $\gamma$  レベルが減少することが、リガンド投与効果の減弱につながる可能性を示している。実際に、内因性 PPAR $\gamma$  レベルの減少がヒトの腸炎患者で認められたという事例が報告されたことから、内因性 PPAR $\gamma$  の量的変化が炎症反応の惹起、ならびに悪化に関与している可能性が示唆された。

そこで次に、PPAR $\gamma$ 発現アデノウイルスベクター (Ad-PPAR $\gamma$ ) を用いて腸管で減少した PPAR $\gamma$  レベルを回復させ、その治療効果を検討した。その結果、治療を行わなかったコントロール群では DSS 投与開始後 8 日目の生存率が 23% であるのに対し、Ad-PPAR $\gamma$  のみの投与群で 54% と有意に増加した。これは内因性 PPAR $\gamma$  レベルが回復しただけでもある程度の炎症反応の抑制が起こることを示しており、非常に興味深い知見であった。また、PPAR $\gamma$  リガンドのみの投与群でも 58% の生存率を認めたが、Ad-PPAR $\gamma$  投与とリガンド投与を併用した群では 87% の生存率を示し相乗効果が認められた。さらには、肉眼的所見、顕微鏡的所見、体重減少の抑制、ICAM-1 や COX-2 といった炎症メディエーターの発現抑制、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の発現抑制など、いずれの評価法においても Ad-PPAR $\gamma$  投与とリガンド投与を併用した群で顕著な治療効果が認められた。以上の結果から、炎症惹起感のリガンド単独投与の治療効果には限界があり、一定レベル以上の PPAR $\gamma$  タンパクが標的部位に存在していることが必須であることが証明された。さらには、PPAR $\gamma$  遺伝子デリバリーがリガンド投与の効果を最大限に引き出すために有効な方法であることを明らかとした。PPAR $\gamma$  を介した炎症抑制メカニズムの詳細は未だ十分には理解されていないが、本知見は、生体が本来有している抗炎症機能を PPAR $\gamma$  が支配しており、PPAR $\gamma$  経路の活性化を調節することが炎症を伴う疾患治療に有用であることを強く示唆している。

続いて、PPAR $\gamma$  をターゲットとする炎症性腸疾患の遺伝子治療を様々な角度から検証すること、ならびに PPAR $\gamma$  の生理的役割を簡便かつ効率よく解析することを目的に、新たな遺伝子機能解析法として注目されている RNA interference (RNAi) を利用することで、汎用性の高い遺伝子ノックダウンシステムの作製を試みた。はじめに、RNAi を誘導することが可能な short hairpin RNA (shRNA) 発現カセットを、増殖している細胞のみならず休止期の細胞にも効率よく安定に遺伝子を導入することが可能なレンチウイルスベクターに搭載し、RNAi 誘導用ベクターとしての機能特性・有用性を評価した。既にルシフェラーゼ遺伝子に対する発現抑制効果が確認されている shRNA 配列を用いて shRNA 発現レンチウイルスベクター (LV-shRNA) を作製した結果、感染細胞内で強力かつ長期にわたり安定な RNAi 効果が確認され、ノックダウンモデル作製用ベクターとしての LV-shRNA の有用性を明らかとした。さらには、PPAR $\gamma$  の発現を強力に抑制する shRNA のターゲット配列を数種類同定し、LV-shRNA を用いた新規 PPAR $\gamma$  ノックダウン法を確立することに成功した。

これらの研究成果は、未だ決定的な治療法が存在しない炎症性腸疾患に対する新たな治療戦略を提示すると共に、今後の PPAR $\gamma$  研究に対して有益な情報を提供し得るものと考えられる。さらには、ヒトゲノム解読完了後のプロテオーム創薬研究において、ここで示した研究戦略ならびに解析技術が薬物ターゲットとして期待されているタンパク質の機能解析に応用され、新規薬物治療法の開発に貢献することを期待する。

## 論文審査の結果の要旨

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) は、ペルオキシソーム誘導作用を持つ化合物によって活性化されるタンパクとしてクローニングされたリガンド未同定の核内受容体である。現在、種々の動物種および臓器から複数の PPAR サブタイプが同定され、哺乳動物においては  $\alpha$ 、 $\delta$  および  $\gamma$  の 3 種類のサブタイプの存在が明らかとなっている。当初、PPAR は脂肪細胞の分化や糖代謝調節において重要な役割を果たしている分子として知られていた。しかし、解析が進むにつれ PPAR のリガンド、標的遺伝子はそれぞれ多様であり、生理的・病理的機能も極めて多様なものであることが分かってきた。したがって、PPAR が担う生理機能のうち、これまでに解明された部分はごく一部であるに過ぎないと考えられる。近年我々の研究グループをはじめいくつかの研究グループが、2 型糖尿病治療薬チアゾリジンジオン誘導体のターゲット分子である PPAR $\gamma$  が炎症を伴う疾患における治療ターゲットになる可能性を示して以来、さまざまな疾患と PPAR $\gamma$  との関わりが注目されている。著者は、PPAR $\gamma$  の炎症性腸疾患に対する有効性を再度検討すると共に、炎症惹起後の腸管組織における PPAR $\gamma$  の変化を解析した。さらに、PPAR $\gamma$  の生理的役割をより詳細に効率よく解析するための技術を確立することを目的とし、新たな遺伝子機能解析法として注目されている RNA interference (RNAi) を用いた PPAR $\gamma$  ノックダウン法の作成を試みた。その結果、以下の成果が得られた。

- 1) 炎症を伴う腸管組織のリンパ球および腹腔リンパ球における PPAR $\gamma$  の減少が炎症反応の悪化につながることを示した。
- 2) PPAR $\gamma$  の減少が、PPAR $\gamma$  特異的リガンドによる腸炎治療効果を減弱させる主な原因であることを明らかにした。
- 3) 炎症腸管へ PPAR $\gamma$  遺伝子を送達し PPAR $\gamma$  経路を活性化することが、炎症性腸疾患治療に有効であることを動物モデルで初めて明らかにした。
- 4) shRNA 発現レンチウイルスベクターを作製し、強力かつ持続的な RNAi 効果を誘導することに成功した。
- 5) PPAR $\gamma$  mRNA に対する効果的な shRNA ターゲット配列を同定することに成功した。

以上、腸管の炎症反応と PPAR $\gamma$  の関わりを明らかにし、炎症性腸疾患に対して有効な遺伝子治療の可能性を示した。さらには、今後の PPAR $\gamma$  研究の進展に貢献するであろう PPAR $\gamma$  ノックダウン法を確立している点、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものとする。