



Title	核内受容体PPAR γ 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	https://hdl.handle.net/11094/44798
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

核内受容体 PPAR γ をターゲットとした
遺伝子治療に関する研究

2004年

形山 和史

核内受容体 PPAR γ をターゲットとした
遺伝子治療に関する研究

2004年

形山 和史

目次

略語一覧.....	1
緒論.....	2
本論.....	5
1. PPAR γ 発現アデノウイルスベクターによる炎症性腸疾患の遺伝子治療.....	5
1-1. PPAR γ 発現レベルと炎症性腸疾患.....	14
1-2. 炎症性腸疾患に対する PPAR γ 発現アデノウイルスベクターの治療効果.....	16
1-2-1. PPAR γ 発現アデノウイルスベクターの構築と特性.....	17
1-2-2. DSS 誘発腸炎モデルにおける PPAR γ 発現アデノウイルスベクターの治療効果.....	18
1-2-3. PPAR γ 発現アデノウイルスベクターによる炎症メディエーターの発現抑制.....	22
1-3. PPAR γ 活性化による遺伝子発現プロファイルの変化.....	24
1-4. 小括.....	27
2. PPAR γ の生理機能解析への新たなアプローチ: shRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた PPAR γ ノックダウン法の確立.....	29
2-1. shRNA 発現レンチウイルスベクターの構築.....	34
2-2. shRNA 発現レンチウイルスベクターの有用性評価: モデル遺伝子 Luciferase に対する RNAi 効果.....	35
2-3. PPAR γ に対する shRNA 発現レンチウイルスベクターの設計と RNAi 効果の検討.....	37
2-3-1. PPAR γ -mRNA に対する shRNA ターゲット配列の選択.....	37
2-3-2. PPAR γ -mRNA 量に与える影響.....	38
2-3-3. 前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化抑制効果.....	39
2-3-4. PPAR family タンパク量に与える影響.....	41
2-3-5. ベクター感染細胞における特異的な脂肪細胞分化抑制効果の確認....	42
2-4. 小括.....	43
総括.....	44
結論.....	46
謝辞.....	47
引用文献.....	48

略語一覧

Ad, adenoviral vector
Ad-Luc, adenoviral vector expressin firefy luciferase
Ad-LacZ, adenoviral vector expressing *Escherichia coli* β-galactosidase
Ad-PPAR γ , adenoviral vector expressing murine PPAR γ
BRL, BRL-49653 (rosiglitazone)
CMV, cytomegalovirus
COX-2, cyclooxygenase-2
DAI, disease activity index
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium
DSS, dextran sodium sulfate
EGFP, enhanced green fluorescent protein
FBS, fetal bovine serum
GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPDH, glycerol 3-phosphate dehydrogenase
H&E, hematoxylin and eosin
HRP, horseradish peroxidase
IBD, inflammatory bowel disease
ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1
IEC, intestinal epithelial cells
LPL, lamina propria lymphocytes
LV, lentiviral vector
LV-shRNA, lentiviral vector expressing short hairpin RNA
MOI, multiplicity of infection
PBS, phosphate buffered saline
PEC, peritoneal exudate cells
pfu, plaque-forming units
PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE, peroxisome proliferator response element
RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction
RNAi, RNA interference
RXR, retinoid X receptor
SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA, short hairpin RNA
SP, mononuclear cells from the spleen
TNF α , tumor necrosis factor α

緒論

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マウス肝臓の cDNA ライブラリーからクローニングされたリガンド未同定の核内受容体であった¹。その後の活発な cDNA クローニングによって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 α 、 δ (ヒトでは NUC1 とも呼ばれる)、および γ の 3 種類のサブタイプの存在が明らかとなっている。 α 型は主に肝臓や心筋、消化管に強い発現が認められ、 δ 型は組織特異性が見られず普遍的に発現している。一方、 γ 型にはさらに $\gamma 1$ 型と $\gamma 2$ 型の 2 種類のアイソフォームの存在が知られており²、 $\gamma 1$ 型は脂肪組織や免疫系臓器、副腎、小腸、大腸で強い発現が確認され、 $\gamma 2$ 型は脂肪細胞で特異的な発現が認められている^{3,4}。また、ヒト脂肪組織や大腸では第 3 番目のアイソフォーム、 $\gamma 3$ 型の mRNA が存在するが、その翻訳産物は $\gamma 1$ 型と同じであることが知られている(Fig.1)。これら PPAR は、レチノイン酸レセプター、甲状腺ホルモンレセプター、ビタミン D レセ

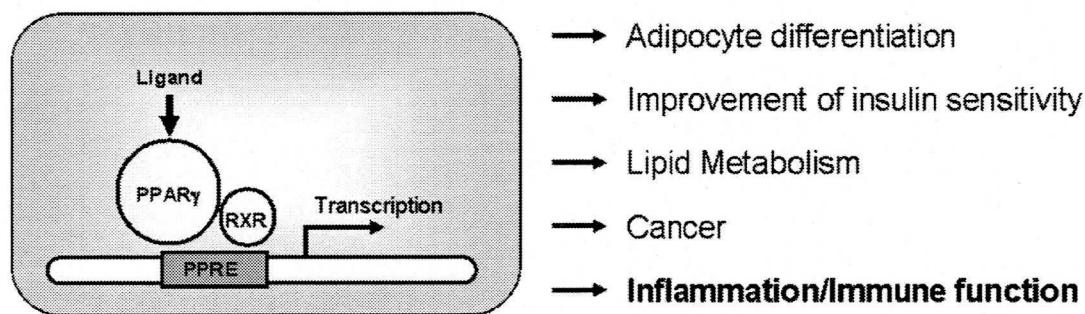
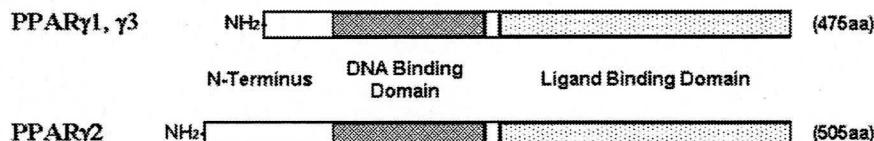


Fig. 1 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ).

プターなどの他の核内レセプターと同様に、9-シスレチノイン酸をリガンドとするレチノイドXレセプター(RXR)とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子の特異的なDNA認識配列(PPRE)に結合し転写を調節する(Fig.1)。PPREを有し、実際に転写が調節される遺伝子の多くが脂質代謝に関連する分子であったことからも、当初、PPARの主な生理的役割は脂肪細胞の分化や糖代謝調節であると考えられていた。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。実際、PPARの生体内における分布を見ても、発現の強さに差はあるものの、前述の組織以外に腎臓や生殖組織、中枢神経など広範な組織に存在していることが明らかとなっている⁵。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。

さて、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に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ジオン誘導体(TZD)のターゲット分子である PPAR γ 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、これらの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 γ との関わりが注目されている⁶⁻¹⁰。我々はこれまでに、マウス大腸炎モデルに対して PPAR γ 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 γ リガンドが予防効果を示すことを報告してきた^{7,10}。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 γ 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¹⁰。また、PPAR γ 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論議を呼んでいる¹¹。

そこで本研究の前半部では、PPAR γ の炎症性腸疾患に対する有効性を再度検証

すると共に、炎症惹起後の腸管組織における PPAR γ の変化を解析した。その結果、炎症の進行にともない腸管組織における PPAR γ の発現レベルが低下することを明らかにした。さらには、低下している PPAR γ レベルを PPAR γ 発現アデノウイルスベクターを用いて正常に戻すことにより、病態の回復を促進することに成功した。後半部では、PPAR γ 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 γ ノックダウン法を作成した。

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 γ 研究をはじめとする薬物ターゲットとして期待される生理活性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つながる有用な基礎的情報を提供し得るものと考え、ここに学位論文としてまとめた次第である。

本論

1. PPAR γ 発現アデノウイルスベクターによる炎症性腸疾患の遺伝子治療

潰瘍性大腸炎やクローン病は、再燃と緩解を繰り返す難治性炎症性腸疾患であり、厚生労働省により特定疾患に指定されている。両疾患の形成には、免疫学的生体防御機構の破綻、遺伝的素因、食生活の変化、あるいは腸内細菌の関与などが考えられているが、未だ病因は特定されていない。これまでに多くの薬物療法が提唱されており、厚生労働省難治性炎症性腸管障害調査研究班による治療指針案では、主にサラゾスルファピリジン、副腎皮質ステロイド剤による緩解導入法が示されている¹²。しかしながら、これらの薬物による治療はその効果に限界があり、未だ決定的な治療法がないのが現状である¹³。

近年、インスリン非依存性糖尿病治療薬であるトログリタゾン、ロジグリタゾン、ピオグリタゾンなどのチアゾリジンジオン誘導体が、PPAR γ を介して潰瘍性大腸炎やクローン病をはじめとする炎症性腸疾患に効果があるという報告が相次いだ⁶⁻¹⁰。1999年にペンシルベニア大学の Gary Wu らのグループが、PPAR γ のリガンド投与が腸管の炎症に対して有効であることをマウスモデルではじめて報告した⁶。この後、我々のグループが PPAR γ の抗炎症作用を PPAR γ ノックアウトマウスおよびマウス大腸炎モデルを用いて証明し^{7,10}、次いで Auwerx らのグループも別の腸炎モデルでリガンドの抗炎症作用を報告した⁹。その作用機序は、リガンドと結合した PPAR γ が主として NF- κ B 経路の活性化を抑制すると考えられている⁶⁻¹⁰。これにより TNF- α などの炎症性サイトカイン、ICAM-1 や COX-2 などの炎症メディエーターの発現が抑制され、結果として抗炎症作用を示すと説明されている。このように、PPAR γ のノックアウトマウスを用いた解析などから、腸管に存在する多量の PPAR γ は過剰な炎症反応を起こさないための内因

性の抗炎症系経路として働いている可能性が示唆された (Fig.2A)。しかしながら、我々と他のグループによる動物モデルを用いた解析によって、炎症惹起後のリガンド投与 (治療的投与) は効果が非常に弱いことが報告されている^{6,9,10}。これらが何に起因するかは明らかではないが、レセプターの量が約半分に減少していることが判っている PPAR γ ヘテロ欠損マウスでは炎症反応の促進が観察されたことから推測して^{7,10}、最も可能性が高い原因は内因性 PPAR γ レベルの減少ではないかと考えた (Fig. 2B)。そこで本章では、PPAR γ をターゲットとした炎症性腸疾患治療薬開発における問題点を明らかにすると共に、新しい治療戦略を提示すべく以下の検討を行った。

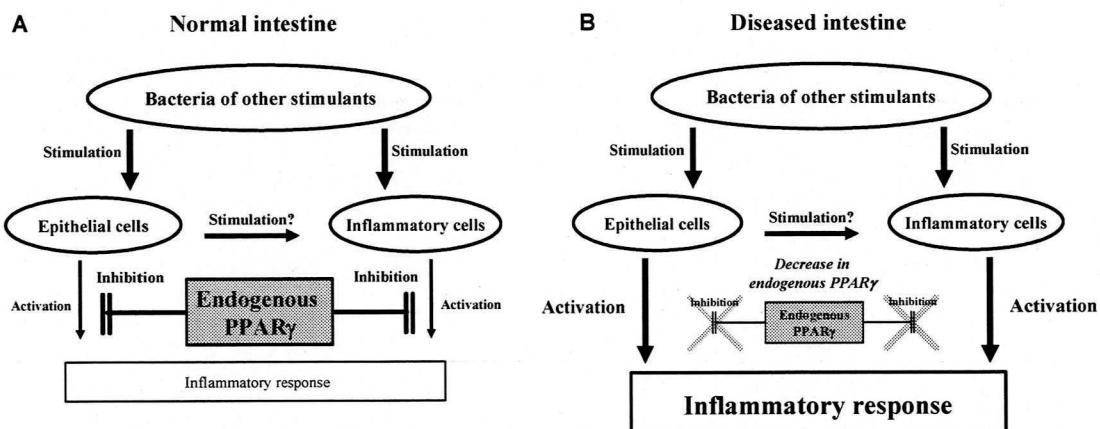


Fig. 2 Schematic illustrations of the role of PPAR γ in normal (A) and abnormal (B) intestines.

実験材料および実験方法

【試薬】

PPAR γ 特異的リガンド、ロジグリタゾン(BRL-49653)は SmithKline Glaxo Inc. より供与して頂いた。特に記載するもの以外は、分子生物学研究用グレード、研究用特級グレードまたはそれに準じる試薬を使用した。また、FBS は全て、56°C、30 分間の非

働化処理を行ったものを使用した

【アデノウイルスベクターの構築】

HEK293 細胞、シャトルプラスミド pHMCMV¹⁴ およびベクタープラスミド pAdHM15-RGD¹⁵ は水口裕之先生（国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部）より供与して頂いた。HEK293 細胞は、10% FBS および抗生物質を含む DMEM (Sigma) で培養した。

CMV promoter の制御下でマウス PPAR γ 1 を発現するアデノウイルスベクターの作製は、Mizuguchi らが報告した *in vitro* ライゲーション法に準じて行った¹⁴⁻¹⁶。XbaI と NotI site を含む Primer (sense: 5'-GCT CTA GAG CAA ATT ACC ATG GTT GAC ACA GAG ATG CC-3', antisense: 5'-TTT CCT TTT GCG GCC GCC TAA TAC AAG TCC TTG TAG ATC-3') を用い、腸管組織由来 cDNA ライブラリーをテンプレートに PCR を行うことで、マウス PPAR γ 1-cDNA を含む 1.4-kb のフラグメントを増幅した。増幅したフラグメントを XbaI/NotI で処理後、pHMCMV6¹⁴ の XbaI-NotI site に挿入し、pHMCMV6-PPAR γ 1 を作製した。Fiber の HI ループをコードする遺伝子配列部分に RGD モチーフに対応するオリゴスクレオチドを挿入した 5 型アデノウイルスゲノム (E1/E3 遺伝子を欠損) を含む pAdHM15-RGD¹⁵ と pHMCMV6-PPAR γ 1 を、それぞれ I-CeuI/PI-SceI で処理した後に *in vitro* ライゲーションを行い、pAdHM15-RGD-CMVPPAR γ 1 を作製した。作製した pAdHM15-RGD-CMVPPAR γ 1 を PacI で処理した後 HEK293 細胞にトランسفエクションすることで、PPAR γ 1 発現カセットを有する組換えアデノウイルスベクター (Ad-PPAR γ) を作製した。Ad-PPAR γ は、常法に従い塩化セシウムの密度勾配遠心後 Tris/HCl (pH 7.5) buffer で透析し精製・濃縮を行い、使用するまで -80°C で保存した。なお、透析に用いた Tris/HCl (pH 7.5) buffer には、RGD ファイバー型 Ad の凝集を抑える目的で、BSA (1%) を添加したものを使用した。組換え Ad の感染力価測定は、Kanegae らが報告した測定法に準拠して行った¹⁷。また、*Escherichia coli* β -galactosidase あるいは

firefly luciferase 発現カセットを有する同様の組換え Ad を作製し、コントロールとして使用した。なお、本検討で使用した組換え Ad (Ad)は、特に記載がない限り RGD ファイバー型 Ad を意味する。

【TNF- α および LPS で刺激した細胞におけるアデノウイルスベクターの感染効率】

EL4 ならびに RAW264 細胞はそれぞれ理研ジーンバンクと東大加齢医学研究所より供与して頂いた。EL4 細胞は 10% FBS および抗生物質を加えた RPMI1640 培地にて、RAW264 細胞は 10% FBS および抗生物質を加えた DMEM (Sigma)で培養した。それぞれの細胞を 2 ng/ml の TNF α (Gibco)、1 μ g/ml の LPS (Sigma) あるいはそれらの組み合わせにより 24 時間刺激した後、RGD ファイバーミュータント型アデノウイルスベクターあるいは従来型アデノウイルスベクターを感染させた(40 MOI)。その 24 時間後に細胞を回収し、luciferase assay (Promega)を行った。

【DSS 誘導腸炎モデルマウスの作製と治療効果の検討】

日本クレアあるいは日本 SLC より購入した specific pathogen-free (SPF) グレードの C57BL/6J 雄マウスを使用し、8 週齢 (体重 : 20-25 g)の時点で、2.5 % (wt/vol)の DSS (MW≈40,000、ICN Biomedicals)を含む飲料水を自由摂取させることにより腸炎を誘発した。この腸炎モデルマウスは、DSS 投与開始後 4 日以内に IBD 様症状を示し、およそ 7 日後に多くの個体が死亡する^{10, 18}。治療実験 *Protocol 1* では、DSS の投与を開始した日を Day 0 とし、Day 8 まで DSS を与え続けた。

この腸炎モデルマウスを使用して PPAR γ 遺伝子導入の治療効果を検討するために、以下のような 4 つの実験群を設定し評価を行った。

- 1) DSS-control : DSS により腸炎を誘発し、治療を行わない群
- 2) Ad-LacZ + vehicle : コントロールの Ad として Ad-LacZ を投与し、PPAR γ 特異的リガンドを投与する群

3) Ad- PPAR γ + vehicle : Ad- PPAR γ のみを投与する群

4) Ad- PPAR γ + ligand : Ad- PPAR γ を投与し、PPAR γ 特異的リガンドを投与する群。

Ad- PPAR γ と Ad-LacZ は、それぞれのウイルスベクターを PBS に懸濁し、Day 4 と Day 6 に一回当たり 2.5×10^8 pfu のベクター(2.5×10^8 pfu in 300 μ l of PBS)を腹腔内に投与した。PPAR γ 特異的リガンド、ロジグリタゾンは蒸留水に溶解し(3 mg/ml)、Day 4 から Day 7 まで、ディスピーザブル・フィーディングニードル(FUCHIGAMI)を用い経口投与(3 or 30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)した。治療実験 *Protocol 2*では、8 日間 DSS 投与した後に、通常の飼育に使用する飲料水に変更し、Day 14 まで経過を観察した。

【細胞の回収】

マウス腹腔を 4 ml の PBS で 2 回洗浄し、洗浄液中に存在する細胞を回収し PEC として使用した。LPL および IEC は、腸管組織の酵素分散とパーコール処理により回収した^{19, 20}。パイエル板を除去した小腸を切り開き、0.5 mM EDTA/2% FBS 含有 RPMI1640 培地で 37°C、15 分間穩やかに攪拌した後、RPMI1640 培地中で激しく攪拌し、培地中の細胞を回収した。その後、2% FBS 含有 RPMI1640 培地中で 37°C、15 分間、1mM EDTA 入り PBS 中で室温、20 分間、順次上清中の細胞を回収しながら残渣を穩やかに攪拌した。得られた残渣を 37°C、攪拌条件下でコラゲナーゼ Type IV (Sigma)処理することで細胞を分散させた。これらの細胞を Percoll (Amersham Pharmacia Biotech)の不連続密度勾配 (25 %、40 %、75 %) に重層し、遠心操作(2000 rpm、20°C、20 分間)を行い、40 % と 75 % の間に存在する細胞を LPL、25 % と 40 % の間に存在する細胞を IEC として使用した。また、脾臓を取り出した後にナイロンメッシュを用いて細胞を分散させ、ACK Buffer (0.15 M NH₄Cl, 0.01 M KHCO₃, 0.01 mM Na₂EDTA, pH 7.2-7.4; For 1L: 8.29 g NH₄Cl, 1.0 g KHCO₃, 37.2 mg Na₂EDTA, adjust pH to 7.2-7.4 with NaOH or HCl, to a volume of 1L of H₂O)を脾臓 1 個当たり 0.8 ml 加え氷上で 2 分インキュベートし、赤血球を除去した細胞群を SP として使用した。

【導入遺伝子の分布特性評価】

Ad を腸炎モデルマウスに腹腔投与した場合の各組織における導入遺伝子量は、Ad-Luc を用いて評価した。DSS 投与後 4 日目に Ad-Luc を 2.5×10^8 pfu (2.5×10^8 pfu in 300 μl of PBS) 腹腔投与し、その 48 時間後に腸管組織ならびに脾臓から細胞を単離し、luciferase assay (Promega)を行った。なお、腸炎モデルマウスでの Ad の投与経路に関する予備検討の結果、Ad を用いた腸管組織への遺伝子導入は、腹腔投与が最も効率よく、再現性のある結果が得られた。経直腸投与は、絶食条件下においても個体によって糞便の残存量が大きく異なるため、個体ごとの遺伝子導入量のばらつきが大きく本検討に不適当であった。また、開腹した後に腸管に直接 Ad を注入する方法も考えられたが、実際に検討した結果、激しい炎症ならびに体重減少を伴う著しい衰弱が認められる DSS 誘発腸炎モデルマウスに適用することは不可能であった。

【Western Blot Analysis】

液体窒素中で冷却したクールミル(Tokken)を用いて破碎した組織サンプルは、protease inhibitors を添加した lysis buffer (400 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 10 % Triton, 100 mM Na₂EDTA, adjust pH to 7.4) 中で可溶化し、遠心操作により不溶成分を除去した。4-40 μg のタンパク質を含む可溶化サンプルを SDS-PAGE にて分離後、polyvinylidene Fluoride (PVDF)メンブレン(MILLIPORE)に転写した。PPAR γ 、GAPDH の検出には、それぞれ anti-PPAR γ mouse monoclonal antibody (sc-7273; Santa Cruz Biotechnology, a dilution factor of 1:200)、anti-GAPDH rabbit polyclonal antibody (2275-PC-1; Trevigen, a dilution factor of 1:3000)および HRP-linked horse anti-mouse IgG (#7076; Cell Signaling, a dilution factor of 1:16000)、HRP-linked goat anti-rabbit IgG (#7074; Cell Signaling, a dilution factor of 1:16000) を用いた。HRP の検出には ECL-plus kit (Amersham)および Hyperfilm ECL (Amersham)を用いた。なお、PPAR γ を検出する際に使用した抗体は $\gamma 1$ 型および $\gamma 2$ 型の両アイソフォームを認識する。多くの場合 2 本のバンドが観察されているが、上方のバンドは $\gamma 2$ 型、

下方のバンドが γ 1型アイソフォームであると考えられる²¹。

【腸炎の評価】

DSS を投与後、体重減少、肉眼的所見、腸管からの出血に基づいて腸炎の評価を行った。DAI は、下記の項目について二重盲検的に数値化し、各群での平均値を算出した。便潜血は、糞便懸濁液(1mg/ml in H₂O)を遠心後、上清を回収し、Hemoccult SENS[®] (Beckman Coulter)にて評価した^{22,23}。

Table. 1 Scoring of disease activity index.

Score	Weight Loss	Stool Consistency	Occult/Gross Rectal Bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1-5%		
2	5-10%	Loose stools	Hemoccult+
3	10-20%		
4	>20%	Diarrhea	Gross bleeding

【Histologic Analysis and Immunohistochemical Staining】

取りだした腸管組織を常法に基づきパラフィン包埋後、組織切片(3 μ m)を作製し、H&E 染色を行った。また、anti-ICAM-1、anti-COX-2 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology)を用いて免疫染色を行い、腸管組織における ICAM-1 と COX-2 の発現量を評価した⁷。抗体の検出は、vectastain ABC kit (Vector Laboratories)、3, 3'-diaminobenzidine substrate kit (Vector Laboratories)を使用した。

【半定量的 RT-PCR (for PPAR γ -mRNA)】

組織より回収した細胞から Tri-Reagent (Sigma)を用いて total RNA を回収した。First-strand cDNA は、1 μ g の total RNA、random hexamers (Invitrogen)、および SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen)を使用し、添付のプロトコルに従い生成した。

その反応液を、マウス PPAR γ 1 と γ 2 に共通な primer pair (5'-AGT CTG TGG GGA TAA AGC AT-3' and 5'-GTG ATT TGT CCG TTG TCT TT-3')と共に 18S rRNA を内部標準として使用可能な Classic 18S primer set (Ambion)を使用し、Taq DNA polymerase (Sigma)にて増幅した²⁴。なお本検討で解析を行ったサンプルの場合、18S primer : Competimer 比は 2 : 8 が最適であった。増幅後のサンプルは、2% agarose gel (0.5 × Tris-borate-EDTA buffer) 中で電気泳動を行った後に ethidium bromide 染色により可視化し、digital camera で画像を取得した。

【定量的 RT-PCR (for cytokine-mRNA)】

TNF- α および IL-10 発現量の定量は、TaqMan RT-PCR system を用いて行った。それぞれ TaqMan Universal PCR Mastermix、primer/probe for quantitation of murine GAPDH、TNF- α 、IL10 (Applied Biosystems)を使用してサンプルを調製した後、ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いて増幅、検出を行った。各サンプル間の RNA 抽出効率ならびに cDNA 増幅効率の補正には、GAPDH mRNA の値を用いた。

【High-density oligonucleotide array 解析】

正常マウスおよびDSS誘発腸炎モデルマウス(Day 1あるいはDay 4)の大腸から、Total RNA を回収した。1 μ g の polyadenylated RNA から T7-based amplification method を用いておよそ 100 μ g の cDNA を生成し、High-density oligonucleotide array(GeneChip; U74, Affymetrix)にハイブリダイズした²⁵。なお、各群から 3 サンプル作製し、解析を行った。それぞれの array のから得られた値を、Affymetrix GeneChip version 3.3 software、intron や reverse sequences にハイブリダイズしてしまう適当でない probe pairs と probe sets を除外するための class ABC mask file を用いて解析を行った。

Array 解析結果を検証するために、過去に報告された方法に基づいて、real-time

quantitative RT-PCR を行った²⁶。RNAeasy kit (Qiagen)を用いて mRNA を調製し、MMLV reverse transcriptase を使用して cDNA を生成した。spectrophotometer DU640 (BECKMAN COULTER)を使用して 260 nm および 280 nm の吸光度を測定し、生成した cDNA の収量と純度を確認した。これらの cDNA サンプルをテンプレートに、Primer Express software (Applied Biosystems)を使用して設計した特異的 primer sets (Table. 2)、SYBR Green PCR kit (Applied Biosystems)を用いて PCR を行った。なお、quantitative PCR 解析には ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いた。

Table 2. Primer sets for quantitative PCR.

Gene	5'-Forward	3'-Reverse
Mouse DNA for regIII gamma protein	AATCACTGATATAAATATTA	AAAATATTGCAACCTTGAGT
Haptoglobin	GGACTCACCACGGGGCCAC	AGCTGGTTTTCCCCACGTA
Major urinary protein 5	CCTGGCCITCGACAAAAGAG	CCAAATATATTCAGTCAC
Matrix metalloproteinase 3	GGAGATGCTCACITTGACGA	ACTGGGTACATCAGAGCTTC
Pancreatic-associated protein	CATGGTGAAGAGAACAGGAA	ACGGTCTAAGGCAGTAGATG
Lipopolysaccharide-binding protein	CCTGAACTTTCCATCACAG	AGACCACTGTTCTAAGGAGC
Matrix metalloproteinase 13	TGCATATGAACATCCATCCC	ACACGTGGTCTCAGAGAAAG
Ly-6 alloantigen	CAATCTTGCTTACCCATCT	CCATGGTCCAGGTGCTGCCT
Interferon-inducible GTPase	TGGAGACTCTGAAGAAAAGC	CAAACAACCTCTGAATAT
GRO1 oncogene	GAAGACAGACTGCTCTGATG	TTAAATATTAATGTAAGATA
RAB5C, member RAS oncogene family	CGATCGGCTGACTATATTGAC	TGACTCCAGCTGGGAGAGA
Calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1	TGAGCGGATTGACTCTGAA	GATCCCCTTGCTGTAATGT
V-maf	CTGCTTGTCAAGCACCGTGG	GCCTGTGTACACACAGGAAC
Jun-B oncogene	AACAGGCAAACAGAAGGCCA	AGATATAAGTAAAACAACTG
Interferon-induced protein with tetratricopeptide	GAAATCAAGGAGATGCTTGA	TGGTAGATAGCCTTGTCTTG
Major histocompatibility complex III	AGGAGAAAAGGAGGGGCC	CCCAGCCGTGTCTTCCCACT
Histocompatibility class II antigen A	GACTCAAATTCAACCCAGC	TGACTGACTTGTCTATTCTG
Interferon-inducible protein	GGTCCCAGCAGCACAGTGAT	CTTCGTGACTTGTCCGCTG
Aquaporin 4	GTATGACTAGAGGACAGCAC	TATATCCATTATAGGCTTT
Chemokine (C-C) receptor 1	AGCCAACAGGTGGACCTGTC	TTTCCACTGTGGATGGGAGG
Matrix metalloproteinase	TGATATCAGCATTGGCCC	TACGTTTCTCTCTCTCTT
Interferon-gamma	CAGACAGCACTCGAATGTGT	AGGTATACTTATTCATATG

【統計学的解析】

全ての結果は、mean ± standard error of the mean として表記した。統計学的なサンプル間の比較は、Student *t*-test、あるいは一元配置分散分析を行った後に Scheffe's method により評価した。

結果と考察

1-1. PPAR γ 発現レベルと炎症性腸疾患

炎症を伴う腸管組織における内因性 PPAR γ レベルを検討するために、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 γ 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内因性 PPAR γ の発現レベルが低下していることを確認しました(Fig. 3A)。

さらには、腸管組織から回収した粘膜固有層リンパ球(LPL)、腸管上皮細胞(IEC)および腸管の周囲に存在している腹腔細胞(PEC)での PPAR γ 発現レベルを解析した結果、LPL と PEC において炎症反応の進行に伴う著しい PPAR γ 発現レベルの減少が認められた(Fig.3B, LPL and PEC)。一方、IEC ならびに遠隔の免疫臓器である脾臓から回収したリンパ球(SP)では、PPAR γ 発現レベルに顕著な変化は認められなかった(Fig.3B, IEC and SP)。LPL および PEC において特異的に PPAR γ レベルの減少が認められたが、これらは共に、T 細胞、B 細胞、マクロファージを多く含む細胞分画であるため、炎症反応と PPAR γ の関わりを考察する上で興味深い結果である。そこで、さらに詳細に

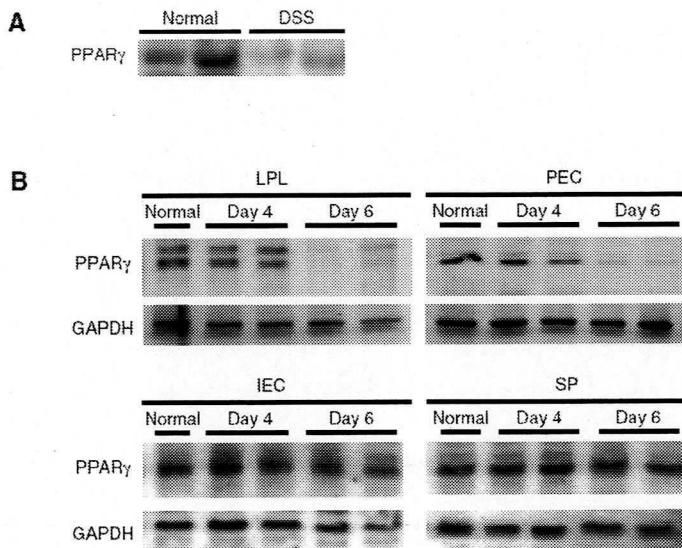


Fig. 3 Determination of PPAR γ levels by western blot analysis. (A) A decrease of endogenous PPAR γ expression in the colon 8 days after receiving DSS. (B) The time-course of changes in endogenous PPAR γ levels in LPL, PEC, IEC and SP during DSS-induced colitis. Isolated cells from three mice per group in duplicate were pooled and the samples prepared as described in Methods. LPL, intestinal lamina propria lymphocytes; PEC, peritoneal exudate cells; IEC, intestinal epithelial cells; SP, splenic mononuclear cells.

PPAR γ の減少が認められる細胞種および部位を同定するために、Magnetic cell separation system を用いた各種細胞の単離、腸管組織切片上での PPAR γ に対する免疫染色を試みたが、考察に値する結果は得られなかつた(data not shown)。前者の場合は、抗体の組み合わせ、精製方法などいくつかの手法を試みたが、残念ながら十分な純度の細胞を単離する事ができず検討することができなかつた。後者に関しては、腸管組織上での免疫染色結果には顕著な差が認められなかつたが、この結果は他のグループの過去の報告と一致している^{6,9}。この一見矛盾した結果は、おそらく *in situ* での免疫染色結果と、アクリルアミドゲル中で分子量の異なるタンパク質を分離濃縮・検出することが可能な Western blot 法の検出感度の差であると考えるが詳細は不明である。

次に、炎症反応の進行に伴う PPAR γ タンパクの著しい減少が認められた LPL および PEC での、PPAR γ -mRNA レベルを評価した。興味深いことに、タンパクレベルの減少とは異なり、PPAR γ -mRNA レベルに変化は認められなかつた(Fig.4)。この結果は、炎症組織に存在する細胞では正常組織と同様に PPAR γ -mRNA の転写は活性化されているにもかかわらず、タンパク質への翻訳の段階あるいは PPAR γ タンパク質の分解過程においてが何らかの調節を受けていることを示している。最近、interferon- γ が脂肪細胞において ubiquitin-proteasome system を活性化し、PPAR γ タンパクの分解を促進するという報告がなされた²¹。Interferon- γ をはじめとする様々なサイトカインが炎症反応と密接な関係があることは明らかであり、炎症性腸疾患においても interferon- γ が重要な役割を示すことが数多く報告されている²⁷⁻²⁹。後述するように、本研究の中で行った Gene chip 解析においても DSS 腸炎モデルマウスの

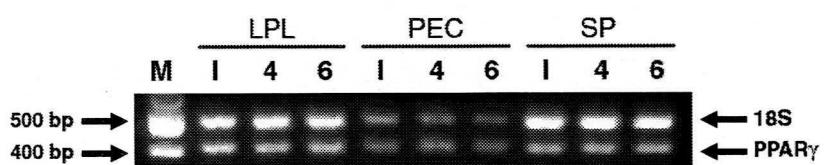


Fig. 4 Determination of PPAR γ -mRNA levels by semiquantitative RT-PCR analysis. Isolated cells from three mice per group in duplicate were pooled and the samples prepared as described in Methods. N, Normal; 4, 4 days after DSS administration; 6, 6 days after DSS administration; LPL, intestinal lamina propria lymphocytes; PEC, peritoneal exudate cells; SP, splenic mononuclear cells.

腸管組織では interferon- γ によって誘導される多くの遺伝子群の発現増強が認められた。したがって、脂肪細胞で観察された PPAR γ タンパクの分解促進が、炎症組織に存在する細胞群で同様に引き起こされている可能性は高い。

以上のように、これらの腸炎モデルマウス解析の結果は、炎症惹起後の PPAR γ レベルの減少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 γ 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も、内因性の PPAR γ 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³⁰。

1-2. 炎症性腸疾患に対する PPAR γ 発現アデノウイルスベクターの治療効果

2001 年に Gary Wu らのグループは、PPAR γ のリガンドであるロジグリタゾン投与が潰瘍性大腸炎に有効であるというヒトでのオープントライアル試験結果を報告している³¹。しかしながら、この報告では約半数(54%)の症例で有効性が認められたとされているが、他の薬剤と併用された結果であるためリガンド単独の効果を判定することは困難である。また、前述のように動物モデルを用いた解析結果ならびにヒトの炎症腸管の解析結果は、炎症が起こってからの PPAR γ リガンド単独投与にはその効果に限界がある可能性を示している。さらには、PPAR γ 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、PPAR γ を炎症性腸疾患治療薬のターゲットとすることに否定的な考えもあった¹¹。そこで、減少した PPAR γ を正常レベルに回復させること、ならびにその治療効果を検討すること目的とし、腸管への PPAR γ 遺伝子デリバリーを試みた。

1-2-1. PPAR γ 発現アデノウイルスベクターの構築とその特性

炎症腸管組織への遺伝子導入には、現存の遺伝子導入用ベクターの中で生体に適用した場合に最も効率よく遺伝子導入可能なベクターのひとつであるア

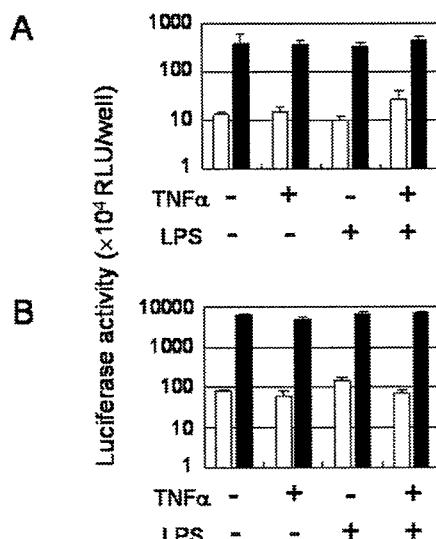


Fig. 5 The transduction efficacy of luciferase gene in RAW264 cells (A) or EL4 cells (B) by RGD fiber-mutant adenovirus vector (closed column) or conventional adenovirus vector (open column). Macrophage-like RAW 264 cells or EL4 T lymphoma cells were stimulated with the indicated stimulant for 24 hours, and the cells were infected with adenovirus vectors at a multiplicity of infection of 40. 24 hours later, cells were harvested and performed luciferase reporter assay.

一を使用した。アデノウイルスベクターは分裂期・静止期の両細胞に対して効率よく遺伝子導入することが可能であり、さらには導入された外来遺伝子がゲノム DNA に組み込まれないため安全性も高い³²。はじめに、炎症に伴う内因性 PPAR γ の著しい減少が認められた細胞群がリンパ球集団であったことから、TNF α あるいは LPS で刺激した RAW264 細胞(マウス腹腔マクロファージ様細胞株)と EL4 細胞(マウス胸腺腫細胞株)に対するアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率を確認した。なお、現在広く使用されている従来型の E1/E3 欠損 5 型アデノウイルスベクターに加え、より広範囲の細胞群に遺伝子を導入できるようにアデノウイルスベクターのファイバー部分に RGD モチーフを導入した、ファイバーミュータント型 RGD アデノウイルスベクターについて検討を行った¹⁴⁻¹⁶。その結果、RGD アデノウイルスベクターは、いずれの細胞においても従来型に比べて優れた遺伝子導入効率を示した(Fig.5)。そこで、ファイバーミュータント型 RGD アデノウイルスベクター(以下、Ad と略す)の E1 欠損領域に PPAR γ 発現カセットをインビトロライゲーション法にて挿入し、PPAR γ 発現アデノウイルスベクター(Ad-PPAR γ)を作製した(Fig.6A)。作製した Ad-PPAR γ は感染細胞内で効率よく PPAR γ を

発現可能であることを Western blot 法にて確認した(Fig.6B)。

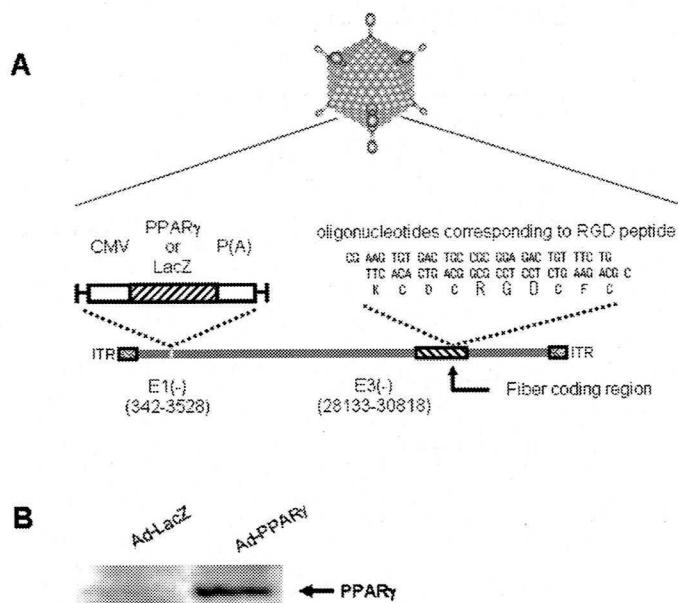


Fig. 6 Recombinant adenovirus vectors. (A) Diagram of construction of E1/E3-deleted Ad vector expressing PPAR γ . ITR, inverted terminal repeat; CMV, cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer; P(A), bovine growth hormone polyadenylation signal. (B) Demonstration of murine PPAR γ synthesis from Ad-PPAR γ vector using western blot analysis of the COS-7 cell line transfected with Ad-PPAR γ .

1-2-2. DSS 誘発腸炎モデルにおける PPAR γ 発現アデノウイルスベクターの治療効果

DSS 誘発腸炎モデルマウスは、ヒトの潰瘍性大腸炎やクロhn病と比較的類似した炎症性腸疾患モデル動物であり再現性の良い結果が得られることから、炎症性腸疾患の研究に広く用いられている。DSS 誘発腸炎モデルは、これまで我々や他のグループが報告しているとおり、DSS を含む(2.5%)飲料水をマウスに自由摂取させることにより作製した。このモデルでは DSS 投与 4 日後に炎症がピークに達し、血便・下痢を伴う激しい衰弱により 8 日後までに 80%近くのマウスが死亡する^{10, 33}。Ad-PPAR γ は、腸管に著しい炎症が認められる時期、すなわち DSS 投与開始後 4 日目と 6 日目に投与した

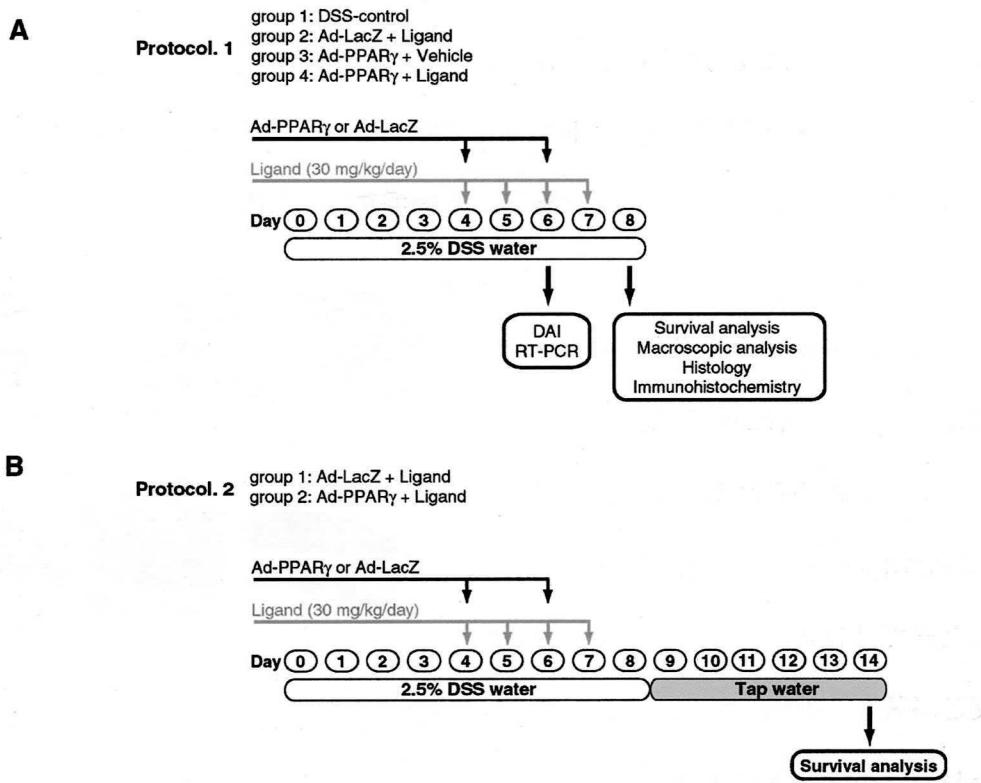


Fig. 7 Design for the intervention studies. In the first protocol (A), drinking water containing DSS was administered from day 0 to 8 and mice were sacrificed at day 8. In the second protocol (B), DSS water was changed to usual tap water at day 8. Ad-PPAR γ or Ad-LacZ was administered by intraperitoneal injection on day 4 and on day 6 (black arrows). PPAR γ -specific ligand, BRL-49653, was suspended in distilled water and administered orally from day 4 to day 7 (gray arrows).

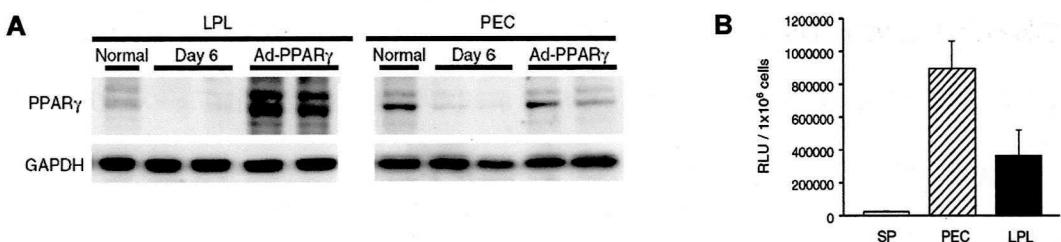


Fig. 8 Administration of Ad during DSS-induced colitis. (A) The restoration of PPAR γ following administration of Ad-PPAR γ during DSS-induced colitis. (B) Luciferase activity following intraperitoneal administration of Ad-Luc. SP, splenic mononuclear cells; PEC, peritoneal exudate cells; LPL, intestinal lamina propria lymphocytes. Results are expressed as mean (SEM) from each group ($n=4-7$) and represent an increase in enzyme activity (relative light units (RLU) / 1×10^6 cells) compared to the same cellular populations from untreated control mice.

(Fig. 7A)。PPAR γ 特異的リガンドであるロジグリタゾンは、4日目以降7日目まで1日1回経口投与した。Ad-PPAR γ をDSS誘発腸炎マウスに投与した結果、炎症反応の進行に

ともない著しいPPAR γ 発現レベルの減少が認められたLPLおよびPECでのPPAR γ レベルを高めることに成功した(Fig. 8A)。また、モデル遺伝子ルシフェラーゼ発現カセットを有するベクターを同様のプロトコルにて投与することにより、LPLならびにPECへ効率よく目的遺伝子を送達可能であることを再確認した(Fig. 8B)。

治療を行わなかったコントロール群(DSS-control群)では、これまでの報告どおり腸管からの出血を伴う激しい炎症が認められるのに対し、Ad-PPAR γ 投与とリガンド投与を併用した群ではDSS投与に伴う腸管の炎症反応が著しく抑制されていた(Fig. 9A and 9B)。また、Ad-LacZあるいはAd-Lucのみの投与は、DSS誘発腸炎の発症・進行に影響を与えないことを確認している(data not shown)。大腸組織の顕微鏡的所見においても、このAd-PPAR γ とリガンド併用群の腸炎治療効果は明らかであった(Fig. 9C)。DSS-control群では、粘膜固有層および筋層への著しい炎症細胞の浸潤と腸管陰窓の消失を伴う明らかな炎症像が観察されるのに対し(Fig. 9C, DSS-control)、Ad-PPAR γ とリガンドの併用治療を行った群では、わずかながら炎症細胞の浸潤・粘膜の肥厚が確認される程度であった(Fig. 9C, Ad-PPAR γ +Ligand)。

マウスの生存率は、DSS-control群の23%(Fig. 10A, DSS-control)に対し、Ad-PPAR γ のみの投与群では54%と有意に増加した(Fig. 10A, Ad-PPAR γ +vehicle)。これは内因性PPAR γ 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る。また、リガンドのみの投与群でも58%の生存率を認めたが(Fig. 10A, Ad-LacZ+Ligand)、Ad-PPAR γ 投与とリガンド投与を併用した群

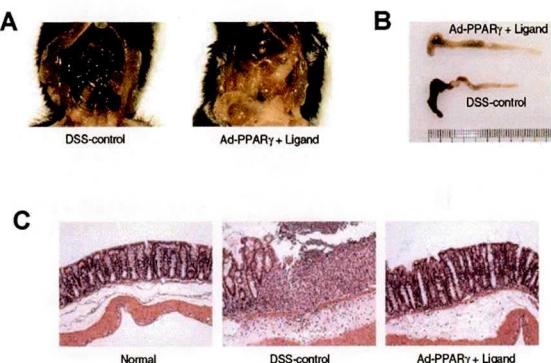


Fig. 9 Protection from colitis by PPAR γ -gene transfer. (A and B) Macroscopic observations of the abdominal cavity and the colon, respectively, from DSS-control or Ad-PPAR γ plus ligand treated mice at day 8 after DSS-induced colitis. (C) Representative photomicrographs of mouse colon sections prepared from paraffin-embedded samples were stained with hematoxylin and eosin from a normal (left), a DSS-control (middle), or Ad-PPAR γ plus ligand treated mouse (right), respectively. Magnification: $\times 100$ for photomicrographs.

では 87% の生存率を示し相乗効果が認められた(Fig. 10A, *Ad-PPAR γ + Ligand*)。これらの結果は炎症の程度を数値化した disease activity index (DAI) の結果と相関しており、DSS-control 群およびリガンドのみの投与群と比較して、*Ad-PPAR γ* とリガンド併用群では顕著な治療効果が認められた($P < 0.05$, respectively; Fig. 10B)。さらには、*Ad-PPAR γ* を投与した場合には、低用量のリガンドを投与した場合にも顕著な治療効果が認められた (Fig. 10C)。これらの結果は、炎症が既に引き起こされている腸管組織への PPAR γ 遺伝子導入が、DSS 誘発腸炎治療において有用であることを強く示唆している。

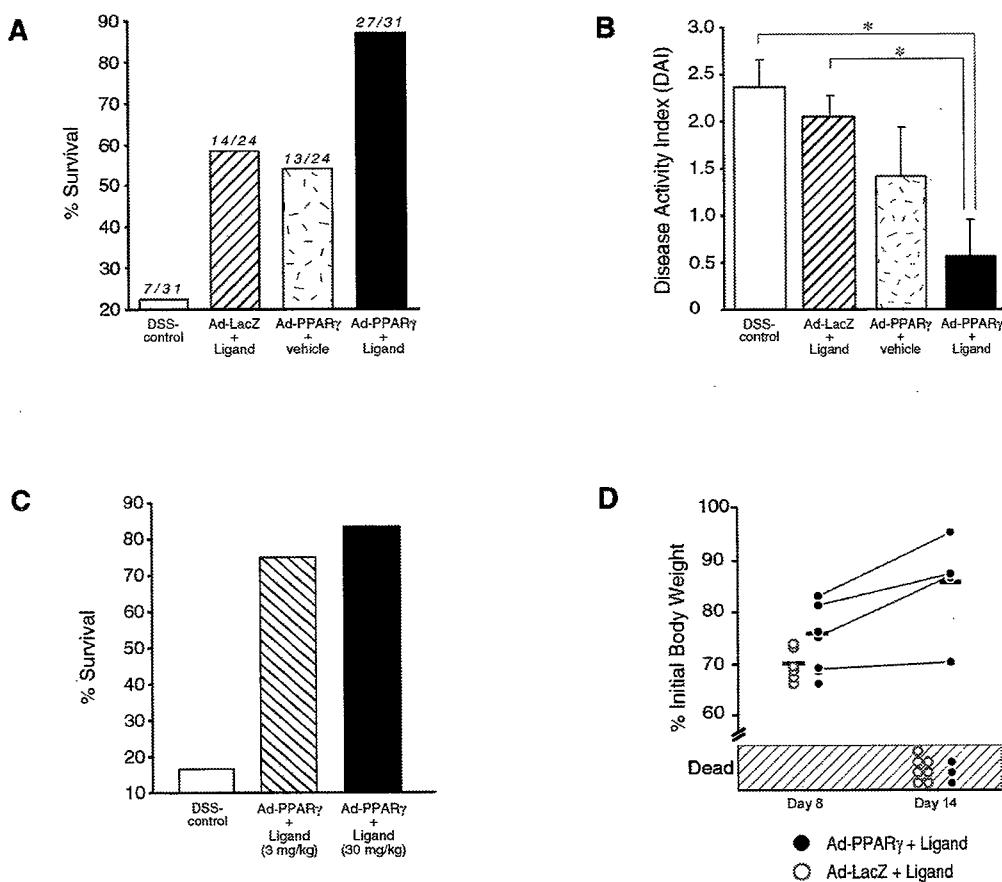


Fig. 10 Therapeutic efficacy of *Ad-PPAR γ* and ligand on DSS-induced colitis. (A) Survival at day 8. The number on each bar represents the number of survival/total number of animals in experimental groups. (B) Disease activity index (DAI) was calculated at day 6 based upon data collected by double-blinded observers (bars, SEM). *, $P < 0.05$ for *Ad-PPAR γ* plus ligand compared to DSS-control or *Ad-LacZ* plus ligand (ANOVA). (C) Survival comparison between low- and high-dose administration of PPAR γ -specific ligand in the mice treated with *Ad-PPAR γ* . (D) Recovery of body weight from day 7 to day 14.

さらに Ad-PPAR γ 投与によって DSS 誘発腸炎からの回復が促進されていることを証明するために、リガンドのみの投与群、Ad-PPAR γ 投与とリガンド投与を併用した群について、それぞれ 8 日目に生存していたマウスの DSS 投与中止後の経過を観察した(Fig. 7B)。その結果、Ad-PPAR γ とリガンドの併用投与によって治療を行った群では 7 例中 4 例が体重増加を伴う明らかな回復傾向を示したが、リガンドのみの投与群(7 例)では全ての個体が死亡した(Fig. 10D)。これらの結果は、炎症腸管組織に Ad-PPAR γ 等を用いて PPAR γ 遺伝子導入を行わない場合には、リガンドのみの治療効果は限界があることを示している。さらには、リガンドにより活性化された PPAR γ が、炎症状態からの回復を担う生理機能に深く関わっていることを強く示唆している。

1-2-3. PPAR γ 発現アデノウイルスベクターによる炎症メディエーターの発現抑制

腸管における炎症の進行過程は、その腸管組織での ICAM-1 の発現量と強い相関性を示すことが知られている^{34, 35}。ICAM-1 は炎症反応の過程で炎症細胞の浸潤を担う重要な分子であり、結果としてその発現量を低下させることが腸炎治療につながると考えられている。本検討においても、DSS-control 群では正常な個体と比較して著しい ICAM-1 の発現増強が認められた。一方、Ad-PPAR γ とリガンドの併用治療を行った個体の腸管組織では、その発現が有意に抑制されていた(Fig. 11A, *upper panels*)。また、炎症腸管組織において発現増強が認められることが広く知られている COX-2 に関しても^{36, 37}、Ad-PPAR γ とリガンドによる治療群では正常腸管組織と同程度の発現レベルであった(Fig. 11A, *lower panels*)。特に、DSS-control 群では粘膜固有層リンパ球(LPL)において COX-2 の強い発現が認められたが、治療群ではその発現が有意に抑制されていた。

次に、PPAR γ 遺伝子導入による腸炎治療効果を、腸管組織におけるサイトカイン発現量を解析することで評価した。その結果、Ad-PPAR γ とリガンドにより治療を行

った群では、炎症性サイトカイン TNF α の発現が有意に抑制されていた(Fig. 11B)。一方、興味深いことに治療群の腸管組織では、抗炎症作用を示す IL-10 の発現が上昇傾向を示していた($P = 0.088$; Fig. 11C)。これらの結果から、PPAR γ 遺伝子導入による治療は、腸炎症状を引き起こす炎症メディエーターの発現を抑制することが明らかとなった。

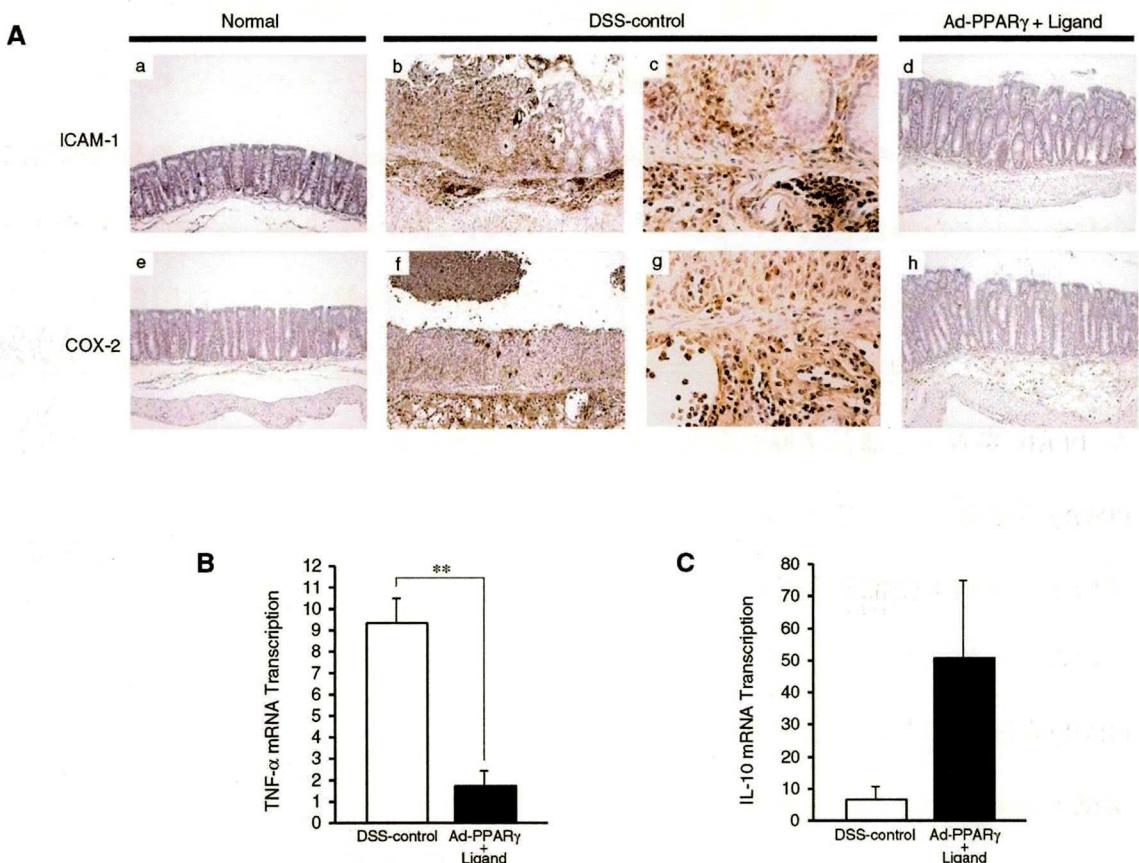


Fig. 11 Inhibition of inflammatory mediators by Ad-PPAR γ -gene therapy. (A) Immunohistochemical analysis of ICAM-1 (panel a, b, c and d) and COX-2 (panel e, f, g and h) expression in colon sections. Colon sections from a normal mouse (a, e), from a DSS-control mouse (b, c, f, g) and from a DSS exposed mouse treated with Ad-PPAR γ plus ligand (d, h). Panel a, b, d, e, f and h are 100 \times magnification, and panel c and g are 400 \times magnification. (B) Quantitation of mRNA encoding for TNF- α (B) and IL-10 (C) normalized to mRNA encoding for GAPDH in colons after treatment with Ad-PPAR γ plus ligand. Results are shown as fold increases compared to those of healthy, normal mice. **, $P < 0.01$ for Ad-PPAR γ plus ligand compared to DSS-control (t -test). Data represent \pm SEM from 3-4 different animals.

1-3. PPAR γ 活性化による遺伝子発現プロファイルの変化

本研究におけるこれまでの検討結果、および過去の報告から、PPAR γ 経路の活性化を制御することが炎症性腸疾患の治療および予防に有効性を示すことが明らかとなった。PPAR γ の活性化による抗炎症作用メカニズムは、主に NF- κ B の活性化抑制であると考えられている^{35, 37}。事実、本検討においても NF- κ B 抑制の結果であることが示唆される ICAM-1、COX-2、TNF- α の発現抑制が認められた。その他、これらの分子以外にも PPAR γ 経路の活性化が、inducible nitric oxide synthase (iNOS) や IL-8 の発現抑制につながることが報告されている^{6, 7, 9, 38}。一方で、PPAR γ は RXR とヘテロダイマー (PPAR γ /RXR) を形成することで転写因子としての活性を発揮することは明らかであるが、ヒトゲノム解析が終了した現在でも PPAR γ が NF- κ B の活性化経路を抑制する現象を PPRE を有する遺伝子群の発現調節によって完全に説明することは不可能であり、PPAR γ が制御しているターゲット

遺伝子と疾病との関わりはほとんど明らかとなっていない。そこで、PPAR γ 遺伝子導入による炎症性腸疾患の治療メカニズムを解明すること、ならびに炎症性腸疾患治療に有効な新しい薬物ターゲット分子の探索を目指し、腸管において PPAR γ が制御している遺伝子群を網羅的に解析した。

DSS 腸炎モデルマウスにおいて、炎症反応の進行に伴い腸管

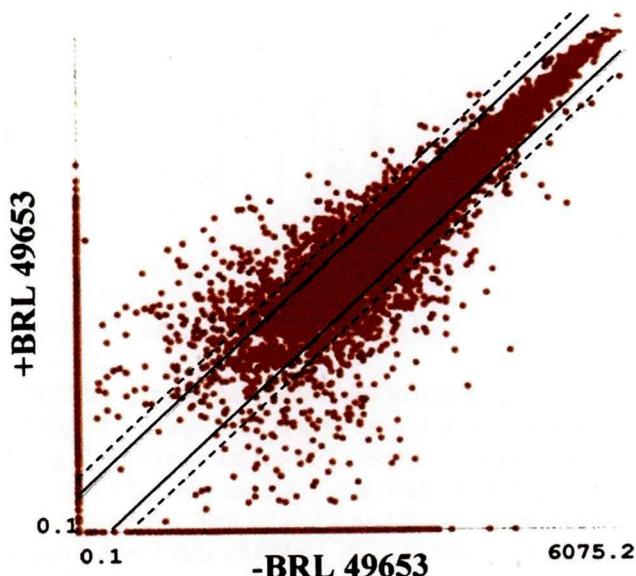


Fig. 12 Plot comparing hybridization intensities for individual genes from the intestinal specimen of the DSS colitis mouse and the specimen of DSS colitis mouse treated with PPAR γ ligand on day 4. Inner solid and outer dashed lines indicate expression difference of threefold and tenfold, respectively.

で発現が亢進する遺伝子、減少する遺伝子、および PPAR γ リガンドを投与することで炎症の進行を抑制した腸管の遺伝子発現を Gene Chip を用いて包括的に解析した。その結果、発現が大きく変化する多くの遺伝子を同定することに成功した (Fig. 12)。また、得られた結果の信頼性を検証するために、合計 50 の遺伝子発現変化について real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR)を行った(Fig. 13)。その結果、Gene Chip と qRT-PCR の両者で得られた結果が一致した確率は 60% であった。

この結果は、過去に報告されている値と一致する結果であり、本検討における Gene Chip 解析が信頼に値することが示された²⁶。Gene Chip の解析結果とその他の解析結果が矛盾する可能性があることは否定することはできないが、炎症性腸疾患に対する薬物治療ターゲット分子のスクリーニングに使用する際の初期の解析方法としては非常に優れた方法であると考える。

炎症状態で発現が亢進し、かつ、その亢進が PPAR γ リガンド投与により著しく抑制されていた遺伝子を Table. 3 に示す。つまり、これらは炎症性腸疾患の惹起あるいは増悪化に関与していることが示唆される遺伝子群である。解析の結果、これらの遺伝子はいくつかのクラスターに分類することができた。

- 1) oncogene families such as GRO1
- 2) inflammatory or immunomediator-related genes such as interferon γ

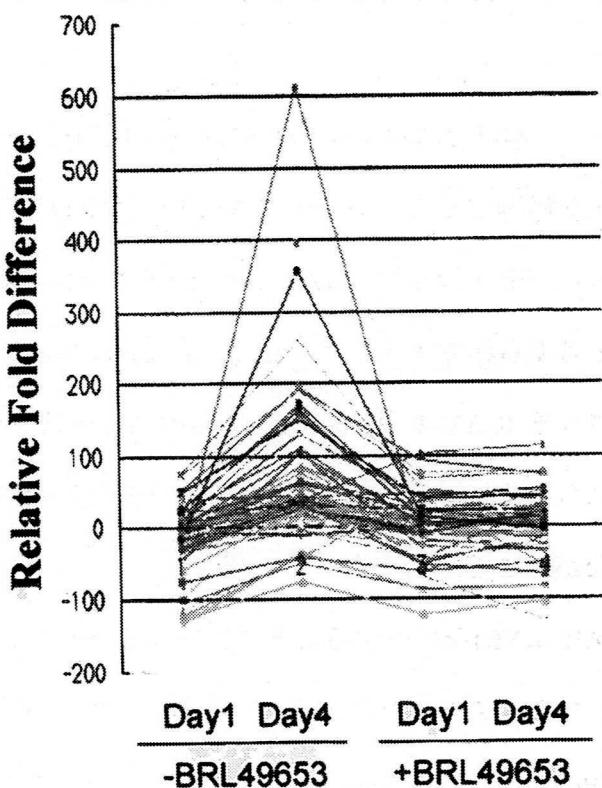


Fig. 13 Gene clustering sorted according to condition, in which genes increased in DSS colitis and decreased in DSS colitis treated with PPAR γ on day 4. Individual genes are listed Table 1.

3) water electrolyte-associated genes

4) others

GRO1、V-maf、Jun-B 等のような oncogene family genes が PPAR γ 経路の活性化により有意に抑制されていた。これらは炎症性腸疾患との関わりが深いと考えられている分子である^{39, 40}。interferon- γ -related genes や MHC class II genes に関しても実際に炎症性腸疾患患者において発現の上昇が観察されており、病態の発症および進行過程で重要な役割を担っていることが示唆されている^{41, 42}。過去の報告と一致するこれらの遺伝子群は本検討のポジティブコントロールと理解することが可能であり、得られた結果を詳細に解析することで炎症性腸疾患における新たな治療ターゲットと成り得る候補分子の発見につながることが期待された。また、water electrolyte-associated genes と DSS 腸炎モデルとの関係はこれまでに報告されていないため、さらに検討を重ねる必要がある。しかしながら、炎症性腸疾患の代表的症状である下痢を考慮すると、この遺伝子の発現変化は理にかなった結果であると考えられた。RegIII gene は腸管上皮細胞で高い発現が認められ、近年、腸管上皮細胞の再生過程における役割が注目されており、これまで解析が終了している遺伝子の中でも PPAR γ 経路の活性化による炎症性腸疾患治療メカニズムを考察する上で大変興味深い結果である⁴³⁻⁴⁶。残念ながら Gene Chip 解析は得られた結果の解析が煩雑であり、多くの遺伝子に関しては現在解析を進行中であるが、少なくとも PPAR γ 経路の活性化が炎症性腸疾患治療に有用であることが本検討結果からも証明された。Gene Chip 解析はその技術の発展にのみ注目が寄せられ、得られた結果をいかに利用していくかという点に関しては確固たる方法論が確立されているとは言い難い。既にいくつかの研究機関において得られた結果をデータベース化し、多くの研究者が利用できるように整備が進められつつあり、その発展が期待される。

Table. 3 Gene upregulated in DSS colitis and downregulated in DSS colitis associated to PPAR γ .

GenBank	Sort score	qRT-PCR	Gene
D63362	-45.39	-70	Mouse DNA for regIII gamma protein
M96827	-41.3	-72	Haptoglobin
M16360	-40.94	-80	Major urinary protein 5
X66402	-40.42	-56	Matrix metalloproteinase 3
D63359	-40.37	-50	Pancreatic-associated protein
X99347	-33.67	-52	Lipopolysaccharide-binding protein
X66473	-33.48	-48	Matrix metalloproteinase 13
X04653	-32.68	-40	Ly-6 alloantigen
AJ007971	-32.38	-44	Interferon-inducible GTPase
J04596	-12.27	-46	GRO1 oncogene
AI836812	-12.11	-30	RAB5C, member RAS oncogene family
U73487	-11.89	-30	Calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta
D42124	-11.75	-22	V-maf
U20735	-11.71	-26	<i>Jun-B</i> oncogene
U43085	-11.69	-30	Interferon-induced protein with tetratricopeptide
AFO49850	-11.59	-30	Major histocompatibility complex (MHC) III
X52643	-11.45	-26	Histocompatibility class II antigen A
X56602	-11.42	-25	Interferon-inducible protein
U88623	-11.42	-32	Aquaporin 4
U28405	-11.40	-35	Chemokine (C-C) receptor 1
Y13185	-11.39	-24	Matrix metalloproteinase 10
XM125899	-11.0	-23	Interferon gamma

Sort score, difference in gene expression change; qRT-PCR, quantitative RT-PCR

1-4. 小括

これまでの検討結果から、炎症惹起後のリガンド単独投与の治療効果には限界があり、一定以上のPPAR γ 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。また、PPAR γ 遺伝子デリバリーは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。この他にも、関節炎モデルや腸管の虚血再灌流傷害に対してPPAR γ のリガンド投与が有効性を示すことを既に我々のグループで明らかとしている^{7,38}。また、炎症とnitric oxide (NO)産生の指標としてニトロチロシンの生成が知られているが、興味深いことに、活性化されたマクロファージ中ではPPAR γ のチロシン残基がより選択的にニトロ化を受け、リガンド結合後のPPAR γ の挙動に影響を与えることを明らかとしている⁴⁷。このようにPPAR γ リガンドが有効性を示す例、PPAR γ タンパクの減少が認められる例、あるいはPPAR γ タンパクが修飾を受けるこ

とで PPAR γ 本来の機能が抑制されていることが予想される疾患においても、PPAR γ の遺伝子デリバリーが新しい治療法となり得る可能性がある。PPAR γ 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 γ が支配しており、PPAR γ 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。現在我々の研究グループでは、目的とする組織や細胞に特異的に遺伝子導入するためのターゲティング能を有するベクター開発を進めており、本研究成果と融合することにより安全かつ効果的な遺伝子治療法が確立することを期待する。

2. PPAR γ の生理機能解析への新たなアプローチ：shRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた PPAR γ ノックダウン法の確立

遺伝子産物の機能解析において、目的遺伝子の機能が個体レベルで解析できるトランスジェニックあるいはノックアウト動物は非常に有用である。その他、抗体投与によって特定の蛋白質や細胞を欠失させる方法等が考えられるが、完全に欠失させることは困難であり、かつ、核内受容体である PPAR γ には適用することができないため PPAR γ ノックアウト動物の作製価値は大きい。残念ながら、PPAR γ ホモノックアウトマウス (PPAR γ -/-) は胎生致死であり、成体の解析を行うことは不可能である。これまで、2型糖尿病・肥満・インスリン抵抗性を媒介する分子としての PPAR γ の機能は、その多くの部分が PPAR γ ヘテロノックアウトマウスの解析により明らかとなってきた⁴⁸。さらには、抗炎症作用についても PPAR γ ヘテロノックアウトマウスから得られた情報は非常に有用であった^{7, 10}。しかしながら、ヘテロノックアウトマウスを用いた解析には限界があることも事実である。

さて、RNA interference (RNAi)は 21 塩基程度の二本鎖 RNA (double strand RNA, dsRNA) を細胞内に導入し標的遺伝子の mRNA を塩基配列特異的に破壊する手法であり、ショウジョウバエ、線虫、植物のみならず哺乳類においても有用な遺伝子機能破壊法であることが近年判明してきた⁴⁹⁻⁵¹。さらには、short hairpin RNA (shRNA)として short interfering RNA (siRNA)前駆体を細胞内で発現させることにより RNAi を誘導する技術も開発され、その応用範囲は急速に拡がりつつある⁵²⁻⁵⁴。本章では、未だ不明な部分が多く残されている PPAR γ の生理的役割を解明すること、ならびに前章でその有効性を明らかとした PPAR γ 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を目的とし、RNAi 技術を応用した PPAR γ ノックダウン法の作成を試みた。

実験材料および実験方法

【LV-shRNA の構築】

human genomic DNA (Clontech)から EcoRI site と BglII site を含む primer pairs (5'-CCA TGG AAT TCG AAC GCT GAC GTC-3' and 5'-GCA AGC TTA GAT CTG TGG TCT CAT ACA GAA CTT ATA AGA TTC CC-3')を用いてヒト H1-RNA promoter を増幅し、pHM5⁵⁵ の EcoRI-BglII site にクローニングしたプラスミド(pHM5-H1)は、水口裕之先生(国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部)より供与して頂いた。ウイルスベクターの產生に使用する 293T 細胞、pMDLg/pRRE、pMD.G、pRSV-Rev、および基本となる SIN ベクタープラスミドは、三好浩之先生(理研バイオリソースセンター)より供与して頂いた。

pHM5-H1 は、その BglII/XbaI site に適切な配列を挿入することで shRNA を発現するように設計されている(Fig. 14A)。pHM5-H1 の BglII/XbaI site に選択したターゲット配列を含む oligonucleotides を挿入した(Fig. 14A and Table. 5)。挿入した配列を DNA シークエンサー(ABI PRISM 310; Applied Biosystems)により確認した後に、shRNA 発現カセットを SIN (self-inactivating)ベクタープラスミド(CS-CDF-EG-PRE-K1f)に挿入することで、shRNA 発現カセットを有する SIN ベクタープラスミド(CS-H1-shRNA-EG)を構築した(Fig. 14B)。

vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)をエンベロープ蛋白とするレンチウイルスベクターは、過去の報告に基づいて作製した⁵⁶⁻⁵⁸。10% FBS および抗生物質を含む DMEM 中で培養した 293T 細胞に、パッケージングプラスミド(pMDLg/pRRE)、エンベローププラスミド(pMD.G)、Rev プラスミド(pRSV-Rev)および SIN ベクタープラスミド(CS-H1-shRNA-EG)をトランスフェクションした。產生されたベクターは超遠心により濃縮し、Hanks' balanced salt solution に再懸濁し、使用するまでの期間-80°C に保存した。本検討で使用した全てのレンチウイルスベクターは enhanced green fluorescent

protein (EGFP) 発現カセットを有しているため、段階希釈したベクターストックを HeLaP4 に感染させた後に fluorescence-activated cell sorter (FACS) 解析することでベクターの力価を求めた。

【LV-shRNA-Lu 感染 HeLaP4 細胞の作製】

HeLaP4 細胞は 10 % FBS と抗生物質を含む DMEM 中で培養した。この細胞に LV-shRNA-Lu を 10 MOI になるように添加した。24 時間後に培地を交換し、さらに 48 時間培養を行ったのちに FACS 解析により感染効率を確認した。HeLaP4 細胞に 10 MOI で感染させた場合の感染効率は 98 % 以上であった。この細胞をさらに培養し、以降の検討に使用した。

【LV-shRNA-Lu の Firefly luciferase に対する RNAi 効果】

Firefly luciferase に対する RNAi 効果は SV40 promoter の制御下に Firefly luciferase を発現するプラスミド (pGL3-Control; Promega) と、内因性コントロールとして使用する HSV-TK promoter の制御下に Renilla luciferase を発現するプラスミド (pRL-TK; Promega) を co-transfection することで評価した。なお、pGL3-Control と pRL-TK の混合比率は 10 : 1 (重量比) で行った。プラスミドの transfection には Effectene (QIAGEN) を使用し、定法に従い行った。それぞれの luciferase 活性は、Dual-luciferase assay system (Promega) を使用し、添付のプロトコルにしたがって測定した。

【LV-shRNA 感染 3T3-L1 細胞の作製】

3T3-L1 preadipocytes は 10% FBS および抗生物質を添加した DMEM 中で培養した。作製した LV-shRNAs を 50 MOI あるいは 200 MOI で感染させ、EGFP の発現を FACS を用いて解析することで感染効率を求めた。感染効率は 50 MOI の場合 $66.57\% \pm 1.44$ 、200 MOI の場合は $91.64\% \pm 1.07$ (SEM) であった。各 LV-shRNA で形質導入した細胞は

引き続き培養し、種々の検討に使用した。

【成熟脂肪細胞への分化誘導条件】

脂肪細胞の分化誘導は、過去の報告に基づいて予備検討を行い、本検討に最適な分科誘導条件を設定した³。細胞がコンフルエントに達した2日後(day 0)に、培養メディウムを rosiglitazone (1 μM), insulin (150 nM), dexamethasone (1 μM) and 3-isobutyl-1-methylxanthine (100 μM)を含む differentiation medium (DM)に変更し、3日ごとに新しいDMに交換した。

【前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化に関する解析】

3T3-L1 細胞の分化は、Oil red O 染色と glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性を測定することで評価した⁵⁹⁻⁶¹。Oil Red O 染色は、DM 中で分化を誘導した day 9 の細胞を 10 % formalin で 2 時間固定し、蒸留水で洗浄した後に、Oil red O 溶液 (0.3 %) で 4 時間染色した。その後、十分に水洗することで、過剰な色素を除去した。なお、染色に用いた Oil red O 溶液は、2-propanol に溶解した Oil red O (0.5%; Aldrich) と蒸留水を 3 : 2 の割合で混合し、室温で 10 分間放置した後フィルターでろ過した。GPDH 活性は GPDH assay kit (Hokudo)を用い、添付のマニュアルに従い測定した。day 9 の細胞を PBS で 2 回洗浄した後、酵素抽出溶液を加え、氷上にて超音波破碎機を用いて細胞を破碎した。15000rpm 4°C 5 分間遠心した後、上清 20μL に対して反応基質溶液 40μL を混合し 340 nm での吸光度を spectrophotometer DU640 (BECKMAN COULTER)を用いて継時的に測定した。

【RT-PCR (for PPARα, PPARδ and PPARγ2-mRNA)】

LV を感染させた 3T3-L1 細胞から、Tri-Reagent (Sigma)を用いて total RNA を回収した。First-strand cDNA は、1 μg の total RNA、oligo(dT12-18) primer (Invitrogen)、お

より SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen)を使用し、添付のプロトコルに従い生成した。その反応液を、下記の primer pair を使用して Taq DNA polymerase (Sigma)にて増幅した⁶²。なお、同様の処理をした LV 未感染 3T3-L1 細胞のサンプルを用いて直線性を示す至適増幅サイクル数を決定した後に、各サンプルの増幅を行った。増幅後のサンプルは、2% agarose gel (0.5 × Tris-borate-EDTA buffer)中で電気泳動を行った後に ethidium bromide 染色により可視化し、digital camera で画像化した。また、NIH Image software を用いた画像解析を行い、ターゲットのバンド強度を数値化した。

Table. 4 The primer sequences and cycle numbers used in this study for detection of PPAR α , PPAR δ and PPAR γ 2.

Target mRNA	Primers	Cycles
murine PPAR α	5'-CGACAAGTGTGATCGGAGCTGCAAG-3'	35 or 38
	5'-GTTGAAGTTCTTCAGGTAGGCTTC-3'	
murine PPAR δ	5'-GGCCAACGGCAGTGGCTTCGTC-3'	27 or 30
	5'-GGCTGCAGGCCTTAGTACATGTCCT-3'	
murine PPAR γ 2	5'-GCTGTTATGGGTGAAACTCTG-3'	33 or 36
	5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGTT-3'	
GAPDH	5'-GCTCACTGGCATGGCCTTC-3'	20 or 23
	5'-ACCACCCCTGTTGCTGTAGC-3'	

【Western Blot Analysis】

先の方法に準じ、培養細胞から可溶化サンプルを作製して解析した。PPAR α 、PPAR δ の検出には、それぞれ anti-PPAR α rabbit polyclonal antibody (sc-9000; Santa Cruz Biotechnology, a dilution factor of 1:200)、anti-PPAR β/δ rabbit polyclonal antibody (sc-7197; Santa Cruz Biotechnology, a dilution factor of 1:1000)を使用した。また、NIH Image software を用いた画像解析を行い、各バンドの強度を数値化した。

結果と考察

2-1. shRNA 発現レンチウイルスベクターの構築

合成 dsRNA を用いて RNAi を誘導する場合、生体内における安定性およびその効果の持続期間等が問題とされていた。前述の shRNA 発現システム用いて RNAi を誘導する手法はこれらの問題点を解決し、遺伝子機能を解析するための遺伝子ノックダウンモデルの作製手法として注目されている⁵²⁻⁵⁴。本検討では、持続的な遺伝子発現を目的とする場合に広く用いられているレトロウイルスベクターの中でも、休止期の細胞にも効率よく遺伝子を導入し、安定な遺伝子発現が達成できるレンチウイルスベクター(LV)に shRNA 発現カセットを搭載し、その機能特性・有用性を評価した。用いた LV は vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) 蛋白をエンベロープとしているため、基本的に動物種・細胞種を問わず効率よく目的遺伝子を送達可能であり、適用範囲が広いことが利点である^{57, 63-66}。なお、ウイルス作製時に使用するパッケージングプラスマミドからは HIV の修飾遺伝子(*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*)および制御遺伝子(*tat*, *rev*)を削除し、3'LTR の U3 にあるエンハンサー/プロモーター領域を削除しているため、その安全性は極めて高く、P2 レベルで取り扱うことが可能なベクターである(Fig. 14B)。

shRNA の発現にはヒト H1 プロモーターを用い、shRNA のループ構造を形成する配列

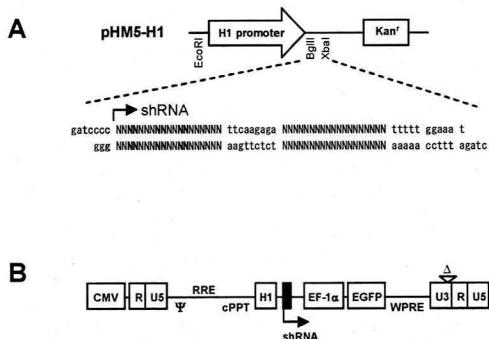


Fig. 14 Vector construction. (A) Oligonucleotides encoding both strands of the targeting sequence, a spacer sequence which provided a loop structure and a transcriptional termination signal T5 were annealed and inserted into BglII/XbaI sites in pHM5-H1. (B) Schematic representation of self-inactivating (SIN) lentiviral vector plasmid (CS-H1-shRNA-EG). CMV: cytomegalovirus promoter, Ψ: packaging signal, RRE: rev responsive element, cPPT: central polypurine tract, H1: human H1 promoter, EF-1 α : human elongation factor 1-alpha subunit gene promoter, EGFP: enhanced green fluorescent protein, WPRE: woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element. Δ: deleting 133 bp in the U3 region of the 3'LTR

は TTCAAGAGA 配列を選択した(Fig. 14A)⁵²。

2-2. shRNA 発現レンチウイルスベクターの有用性評価：モデル遺伝子 Luciferase に対する RNAi 効果

shRNA 発現プラスミドベクターを用いた検討において firefly luciferase に対して既に効果が確認されている shRNA 発現カセットを搭載した shRNA 発現レンチウイルスベクター(LV-shRNA-Lu)を作製し、感染細胞内での RNAi 効果を検討した。この firefly luciferase に対する shRNA 発現プラスミドベクターは、firefly luciferase 発現カセットを有するプラスミドベクターとおよそ 10:1 の比率で混合して細胞に co-transfection した場合、firefly luciferase の発現をコントロールの約 10 %程度まで抑制することが確認されている(Mizuguchi *et al.*, unpublished data)。作製した LV-shRNA-Lu を感染させた細胞では、shRNA 発現カセットを持たないコントロールのベクター(LV-EG)感染細胞に比べて、およそ 30 %程度まで firefly luciferase の発現を抑制することができた(Fig. 15A and 15C)。さらにこれらの細胞を 3 ヶ月間継代を繰り返した後に同様の検討を行った結果、感染 1 週間後に得られた結果と同等の RNAi 効果が認められた(Fig. 15B and 15D)。また、先の検討でも使用した Ad-Luc (firefly luciferase 発現カセットを有するファイバーミュータント型 RGD アデノウイルスベクター)をこれらの細胞に感染させた場合にも、プラスミドベクターにより firefly luciferase 発現カセットを導入した場合と同様に firefly luciferase の発現抑制効果が認められた(Fig. 16)。このように、作製した LV-shRNA は効果的かつ持続的な RNAi 効果を誘導可能であり、shRNA 導入用ベクターとしての有用性が明らかとなった。

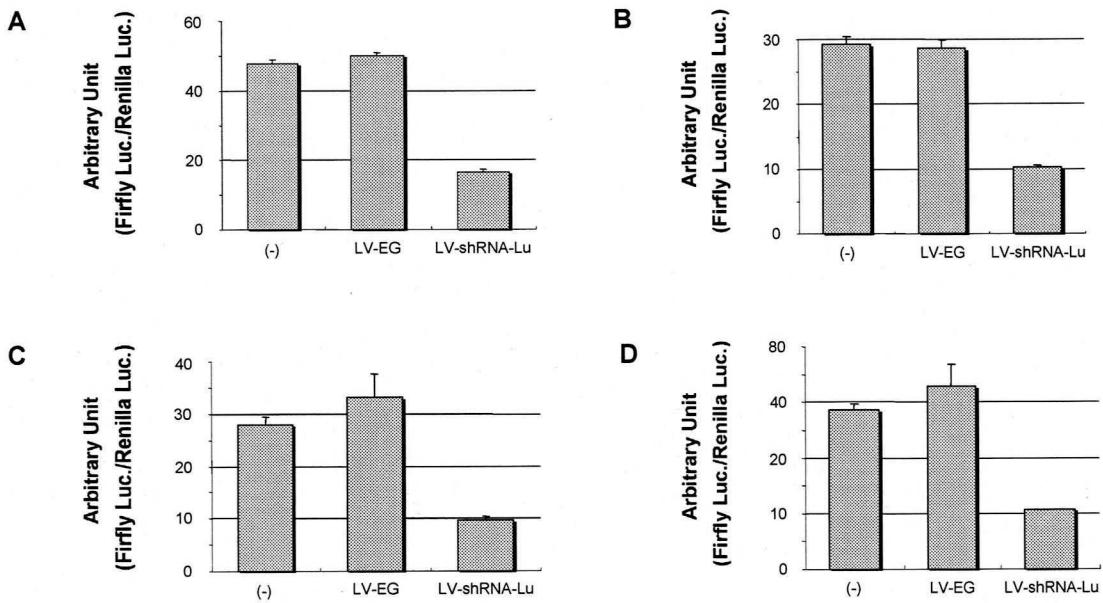


Fig. 15 Effect of lentiviral vector mediated RNA interference against Firefly luciferase. (A and C) HeLaP4 cells were infected with LV-EG or LV-shRNA-Lu at a multiplicity of infection (MOI) of 10. The infected HeLaP4 cells were grown and transfected with a plasmid expressing Firefly luciferase (pGL3-control) and an internal control plasmid expressing Renilla luciferase (pRL-TK) by using Effectene reagent. (B and D) The transduced HeLaP4 cells which had been continuously passaged for 3 months were transfected with pGL3-control and pRL-TK. Dual-luciferase assay were carried out 24 h (A and B) or 48 h (C and D) after the transfection. The results are presented as luciferase activity (arbitrary unit), which is the ratio of Firefly luciferase/Renilla luciferase. Results are expressed as mean \pm standard deviation.

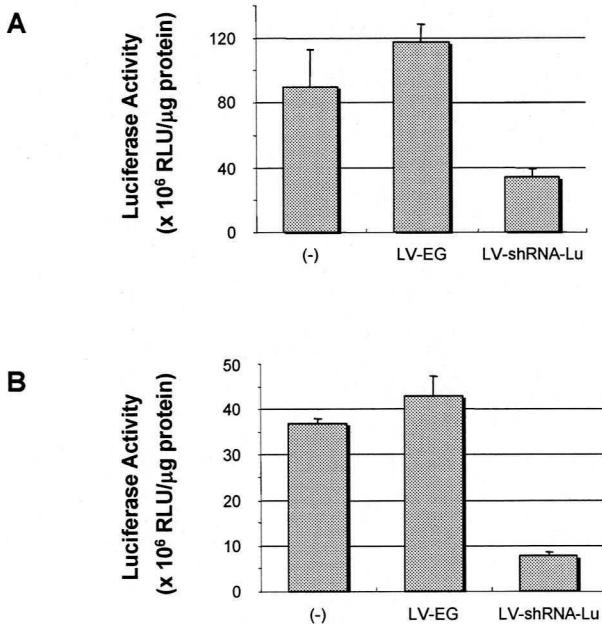


Fig. 16 Effect of lentiviral vector mediated RNA interference against Firefly luciferase. HeLaP4 cells were infected with LV-EG or LV-shRNA-Lu at a multiplicity of infection (MOI) of 10. The transduced HeLaP4 cells which had been continuously passaged for 3 months were infected with adenovirus vectors expressing Firefly luciferase at MOI of 40 (A) or 8 (B) for 48 h and then assayed for luciferase activity. Results are expressed as mean \pm standard deviation.

2-3. PPAR γ に対する shRNA 発現レンチウイルスベクターの設計と RNAi効果の検討

PPAR γ は脂肪細胞の分化過程においてマスター・レギュレーターとして働くことが既に知られている^{48, 67, 68}。そこで、PPAR γ を効果的にノックダウンすることが可能なターゲット配列の選択は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化抑制効果ならびに PPAR γ -mRNA 量、PPAR γ タンパク量の変化を指標に評価を行った。

2-3-1. PPAR γ -mRNA に対する shRNA ターゲット配列の選択

PPAR γ に対する shRNA のターゲット配列は、GC 含量、PPAR γ -mRNA の二次構造、他の遺伝子との相同意を考慮に入れながら、PPAR γ -mRNA の翻訳領域を広くカバー

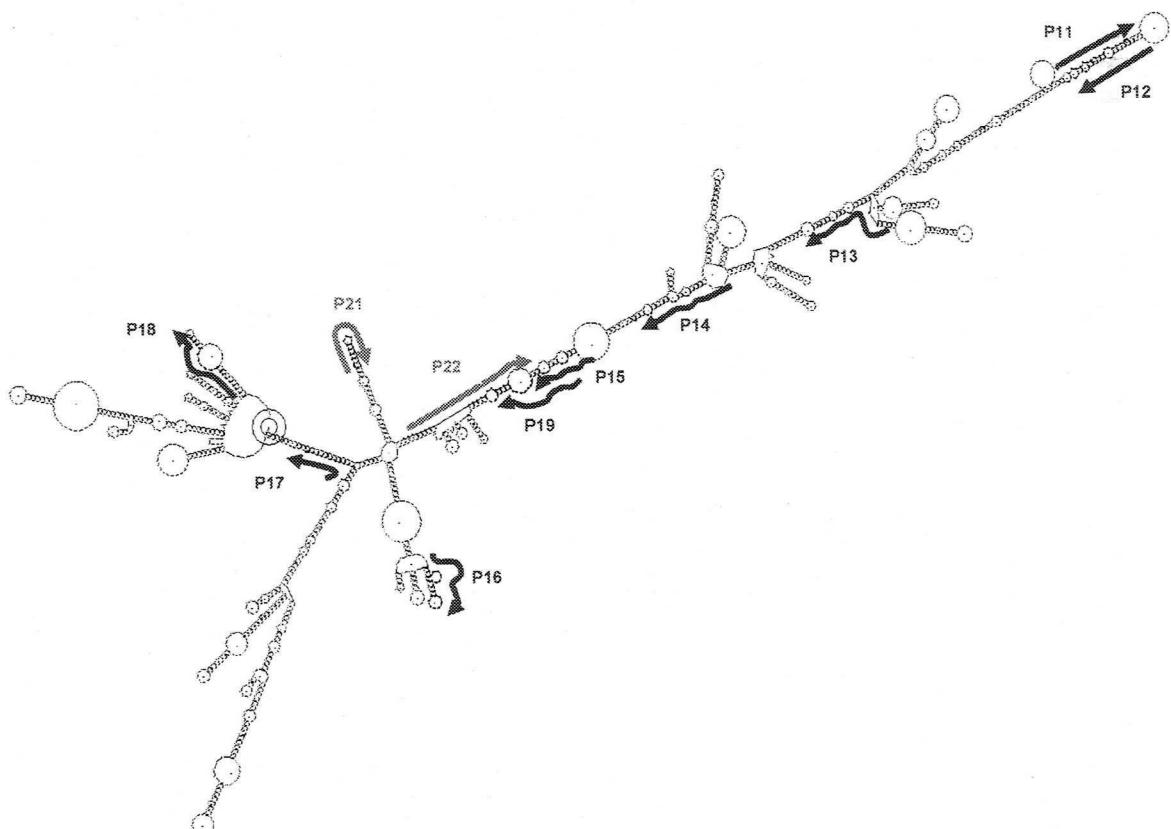


Fig. 17 The secondary structure of the murine PPAR γ mRNA and target sites of shRNA selected in this study.

一するように設計した(Table 5 and Fig. 17)。

Table 5. LV vectors used in this study

<i>LV vector</i>	<i>shRNA-target gene</i>	<i>shRNA-target sequence</i>
LV-shRNA-P11	PPAR γ 1 & 2	CAGCTCTACAAACAGGCCCTC
LV-shRNA-P12	PPAR γ 1 & 2	ATGGCCATTGAGTGCCGAG
LV-shRNA-P13	PPAR γ 1 & 2	TAAATGTCAGTACTGTCGG
LV-shRNA-P14	PPAR γ 1 & 2	TTGGCGGAGATCTCCAGTG
LV-shRNA-P15	PPAR γ 1 & 2	GTCTGCTGATCTGCGAGCC
LV-shRNA-P16	PPAR γ 1 & 2	TCACCATTGTCATCTACG
LV-shRNA-P17	PPAR γ 1 & 2	GTTTGAGTTGCTGTGAAG
LV-shRNA-P18	PPAR γ 1 & 2	ATGAGCCTTCACCCCTGC
LV-shRNA-P19	PPAR γ 1 & 2	GATCTGCGAGCCCTGGCAA
LV-shRNA-P21	PPAR γ 2	ACTCTGGGAGATTCTCCTG
LV-shRNA-P22	PPAR γ 2	CCTTCGCTGATGCACTGCC
LV-shRNA-Lu	Luciferase	ACGCTGAGTACTTCGAAAT
LV-shRNA-Scramble	No target gene	GCGCGCTTGAGGATTCTG
LV-EG	(-)	(-)

LV-EG has no shRNA-expressing cassette. All vectors carry an EGFP-expressing cassette as a marker gene so that the cells transduced with LV-shRNAs can be identified by green fluorescence.

2-3-2. PPAR γ -mRNA 量に与える影響

各 LV-shRNA を感染させた前駆脂肪細胞 (3T3-L1 preadipocytes)を用い、分化条件下での PPAR γ -mRNA 発現レベルを RT-PCR にて評価した。なお、LV-shRNA-Lu、LV-shRNA-Scramble ならびに shRNA 発現カセットを持たないベクター (LV-EG)を感染させた細胞をコントロールとした。その結果、LV-shRNA-P15 および LV-shRNA-P17 感染細胞で顕著な PPAR γ -mRNA レベルの低下が確認された(Fig. 18)。一方、LV-shRNA-P15、-P17 は PPAR α と PPAR δ の発現にほとんど影響を及ぼさなかった。また、PPAR γ に対する他の LV-shRNAs についても中程度の抑制効果が確認された。

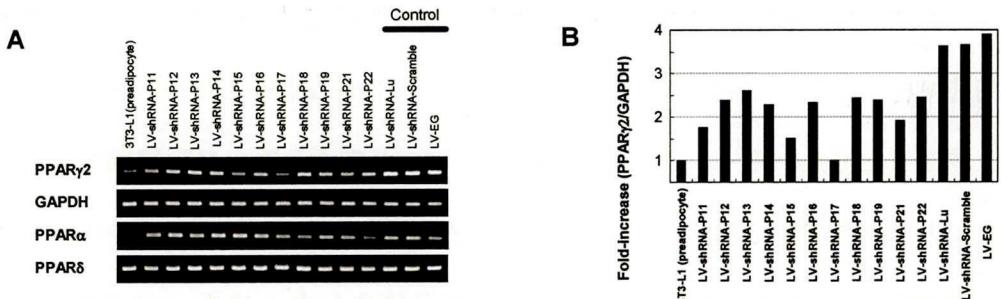


Fig. 18 Alteration of PPAR family mRNA levels in 3T3-L1 cells transduced with LV-shRNAs (A) 3T3-L1 preadipocytes were infected with each LV-shRNA (200 MOI) and then subjected to the differentiation protocol. Two days after the induction of adipocyte differentiation, mRNA levels of PPAR γ 2, PPAR α , PPAR δ , and GAPDH were determined by RT-PCR analysis. Results are representative of two individual experiments. (B) Densitometric quantitation of the gel image shown in (A, PPAR γ and GAPDH). Each PPAR γ value was normalized to the values for GAPDH and expressed as a fold-increase over the basal level detected in 3T3-L1 preadipocytes.

2-3-3. 前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化抑制効果

次に、脂肪細胞への分化抑制効果を評価した。前駆脂肪細胞は、ロジグリタゾン (BRL-49653) をはじめとする PPAR γ 特異的リガンドによって成熟脂肪細胞への分化が著しく促進される。本検討で用いた 3T3-L1 細胞においても、ロジグリタゾンの分化促進効果が顕著

に観察された(Fig.19)。コントロールである LV-shRNA-Lu、-Scramble、LV-EG 感染細胞は、細胞内の中性脂質に高い親和性を持つ Oil Red O によって強く染色され、典型的な成熟脂肪細胞の様相を示すのに対して、LV-shRNA-P15 ならびに-P17 感染細胞はほとん



Fig. 19 Effect of PPAR γ -specific ligand, rosiglitazone (BRL-49653), on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were exposed to differentiation medium containing different concentration of rosiglitazone for 9 days and stained with Oil Red O. BRL, BRL-49653; INS, insulin; DEX, dexamethasone; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine

ど染色されず、脂肪細胞への分化が強く抑制されていることが判明した(Fig. 20A)。また、脂肪細胞の脂肪合成活性の指標として glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性を測定した結果からも、LV-shRNA-P15 と-P17 が有する強力な脂肪細胞分化抑制能が明らかとなった(Fig. 20B)。これらは、RT-PCR の結果とほぼ相関しており、PPAR γ の発現が特異的に抑制された結果であることが示唆された。また、本検討で 3T3-L1 preadipocytes の分化誘導に使用した培地中には比較的高濃度(1 μ M)の PPAR γ 特異的リガンドを添加しており、発現した PPAR γ タンパクの活性化が十分に引き起こされる条件であると考えられる。そのような条件下においても LV-shRNA-P15 ならびに-P17 によって誘導される RNAi 効果が非常に強力なものであることが予想された。

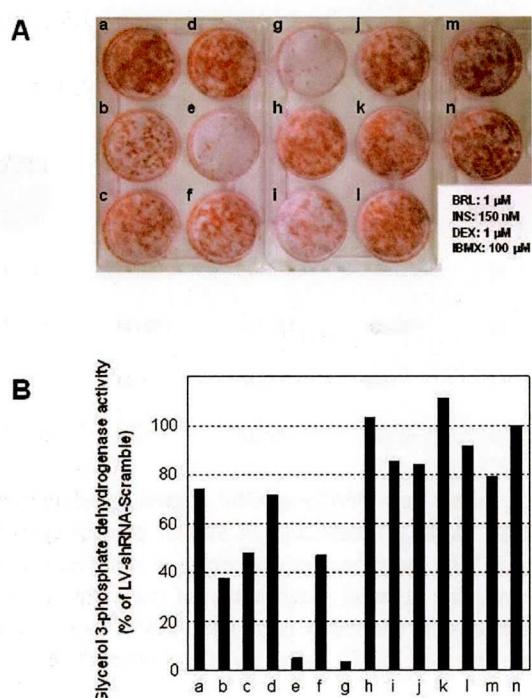


Fig. 20 Effect of LV-shRNAs on adipocyte differentiation. (A) Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes (infected with LV-shRNA; 200 MOI) to adipocytes was monitored by measurement of intracellular lipid accumulation using Oil red O staining on day 9. (B) Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity was measured on day 9. Data were expressed as percentage of the GPDH activity of 3T3-L1 cells which were infected with LV-shRNA-Scramble (200 MOI).
a: LV-shRNA-P11; b: LV-shRNA-P12;
c: LV-shRNA-P13; d: LV-shRNA-P14;
e: LV-shRNA-P15; f: LV-shRNA-P16;
g: LV-shRNA-P17; h: LV-shRNA-P18;
i: LV-shRNA-P19; j: LV-shRNA-P21;
k: LV-shRNA-P22; l: LV-EG; m: LV-shRNA-Lu;
n: LV-shRNA-Scramble. BRL, BRL-49653; INS, insulin; DEX, dexamethasone; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine. Similar results were obtained in two independent experiments.

2-3-4. PPAR family タンパク量に与える影響

特定遺伝子を強力に抑制する技術として注目されている RNAi であるが、最近、一部の siRNA が完全に相補的でない mRNA に対して翻訳阻害活性を示し、mRNA の切断を介すことなく遺伝子発現を抑制するという事例が報告された⁶⁹。長鎖 dsRNA は、哺乳動物の細胞に対して細胞が有する抗ウイルス活性 (Interferon system) を誘導してしまうことから、RNAi の誘導には 21 塩基程度の短鎖 RNA あるいはその前駆体である shRNA を利用するのが一般的である⁷⁰。しかしながら、短い RNA であるが故にその特異性は低くなり、期待しない効果を引き起こしてしまう可能性は否定することができない。事実、本検討で PPAR γ -mRNA に対して設計したいくつかの shRNA ターゲット配列は、PPAR α と PPAR δ に対して一部相補的である。そこで、作製した LV-shRNA の PPAR γ に対する特異性を検証するために PPAR γ 、PPAR α 、PPAR δ に対する Western blotting を行いそれぞれのタンパクレベルを確認した。その結果、LV-shRNA-P15 および-P17 感染細胞における PPAR γ の著しい発現抑制効果と共に、コントロール群と同程度の PPAR α および PPAR δ 発現を確認することができた(Fig. 21)。

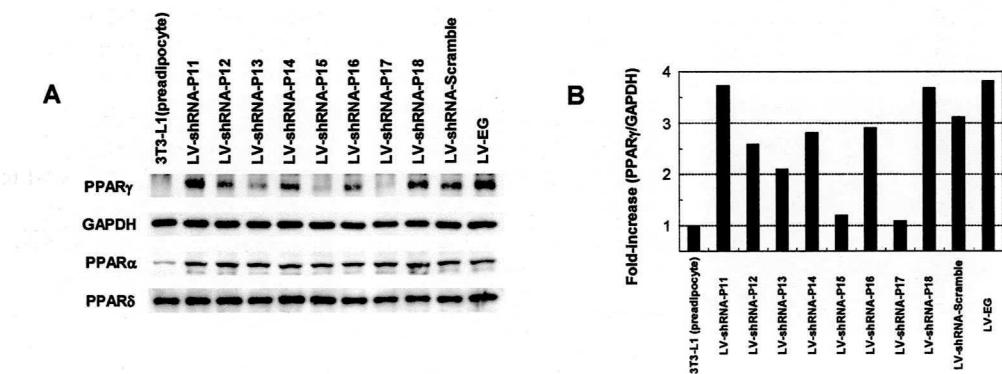


Fig. 21 Alteration of PPAR family protein levels in 3T3-L1 cells transduced with LV-shRNAs (200 MOI). (A) Four days after the induction of adipocyte differentiation, the whole cell extract was analyzed by western blotting with antibodies against PPAR γ , PPAR α , PPAR δ and GAPDH. Results are representative of two individual experiments. (B) Densitometric quantitation of the image shown in (A, PPAR γ and GAPDH). Each PPAR γ value was normalized to the values for GAPDH and expressed as a fold-increase over the basal level detected in 3T3-L1 preadipocytes.

2-3-5. ベクター感染細胞における特異的な脂肪細胞分化抑制効果の確認

最後に、これまでの検討で良好な結果が得られた LV-shRNA-P15 と LV-shRNA-P17 による脂肪細胞の分化抑制効果を、個々の細胞レベルで評価を行った。作製した全てのベクターは、ベクター感染細胞の同定に使用可能な enhanced green fluorescent protein (EGFP) 発現カセットを有している (Fig. 14B)。コントロールとして使用した LV-shRNA-Scramble 感染 3T3-L1 細胞では、緑の蛍光像として観察されるベクター感染細胞において細胞の肥大化および細胞内への脂肪的蓄積が観察され、成熟脂肪細胞への分化を確認することができた (Fig. 22, *LV-shRNA- Scramble*)。一方、LV-shRNA-P15 ならびに LV-shRNA-P17 感染細胞は線維芽細胞様の形態を維持しており、分化が抑制されている様子が明らかであった (Fig. 22, *LV-shRNA-P15* and *LV-shRNA-P17*)。また、LV-shRNA-P15、LV-shRNA-P17 が感染していない (EGFP の発現が認められない) 細胞でのみ、脂肪細胞への分化が観察された。

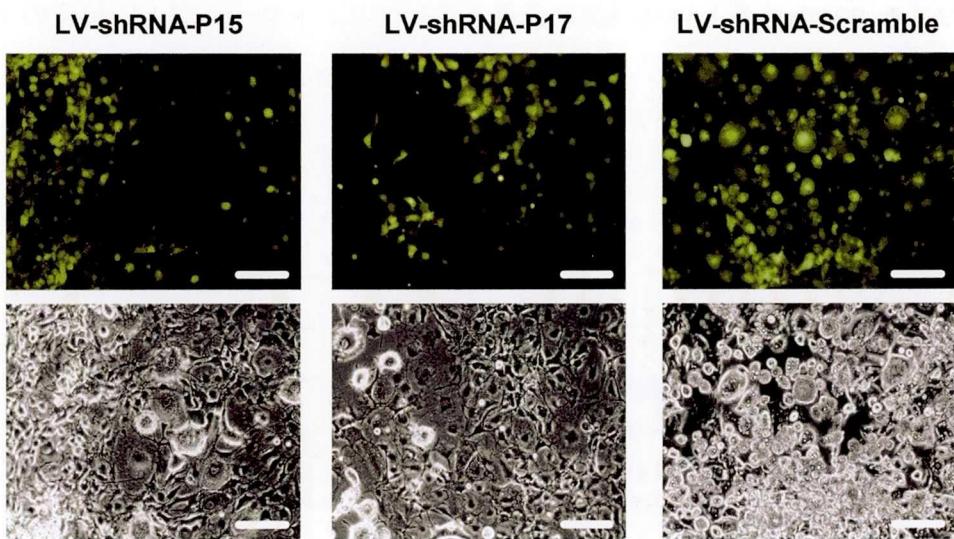


Fig. 22 Identification of the 3T3-L1 cells transduced with LV-shRNA. Brightfield and fluorescent microscopy images collected from the same field. The LV-shRNA infected cells, which expressed EGFP, were detected as green fluorescence (upper panels) and morphologically identified mature adipocyte with a voluminous spherical shape and a large accumulation of intracytoplasmic lipid vesicles (lower panels). Bars represent 100 μm .

2-4. 小括

以上の検討から、PPAR γ の発現を強力に抑制する shRNA のターゲット配列を同定することに成功した。また、レンチウイルスベクターを shRNA 導入用ベクターとして利用することで、長期にわたり安定な RNAi 効果を誘導することを確認し、ノックダウンモデル作製用ベクターとしての有用性を明らかとした。RNAi を用いた遺伝子ノックダウン法には、相同組換え法などによって作製された標的遺伝子破壊法とは異なり、ターゲット配列の選択によって様々な強度のノックダウンを達成可能であるという利点がある。つまり、LV-shRNA-P15、-P17 のように強力な抑制効果を示すターゲット配列はもちろんのこと、中程度の抑制効果を示す配列と組み合わせた解析を行うことで、解析結果の信頼性を向上させることが可能である。この PPAR γ ノックダウン法を駆使することで、PPAR γ ヘテロノックアウトマウスで得られた解析結果を別の角度から検証するとともに、これまで明らかにされていない PPAR γ の生理機能解析が大きく進展するものと期待される。

総括

潰瘍性大腸炎やクローン病といった難治性炎症性腸疾患の患者数は、アメリカでは数百万人にのぼると見られている^{13, 71}。それに対して日本での患者数はまだ少数であるが、近年、潰瘍性大腸炎の患者数は急激に上昇している¹²。本研究は、炎症性腸疾患に対して PPAR γ 発現ベクターによる遺伝子治療法が有用であることを動物実験を用いて初めて示したものである。まだ動物実験の段階であるが、将来的にはステロイド抵抗性の症例や、劇症の症例、あるいはバイオプシーで PPAR γ レベルの減少が認められる症例等に応用することは意義のあることだと考える。

本研究では主に炎症性腸疾患について検討を重ねたが、他の疾患に対して、特に炎症を伴う疾患に対して PPAR γ 遺伝子デリバリーが有効性を示すかどうかという点に関しても非常に興味深い。我々の研究グループでは既に、潰瘍性大腸炎やクローン病の場合と同様に NF- κ B の活性化や炎症性サイトカインの発現増強が認められる腸管虚血再灌流傷害に対して、PPAR γ 経路の活性化が防御的に働くことを報告している⁷。さらには、心臓の虚血再灌流傷害に対しても、PPAR γ 経路が防御的に働くという報告があることからも⁷²⁻⁷⁴、PPAR γ 経路の活性化が虚血再灌流傷害の抑制に有効である可能性を示している。しかしながらその一方で、心臓の PPAR γ レベルは、脂肪組織や腸管に比べて著しく低いのも事実である^{5, 75, 76}。また、心臓や腸管と同様に、虚血に弱い臓器である脳に対しても PPAR γ 経路がその傷害を抑制することが期待されたが、我々が脳梗塞モデルで検討したところ PPAR γ 活性化による防御効果は確認できなかった(unpublished data)。これは脳に存在する PPAR γ レベルは心臓に比べても著しく少ないので効果が認められなかつたのではないかと考えられる。今後、PPAR γ の発現レベルとその活性化が各組織・各細胞に及ぼす影響をさらに詳細に検討する必要がある。このような観点からも、本研究で作製した PPAR γ の発現を特異的かつ強力に抑制可能な shRNA 発現レンチ

ウイルスベクター、およびPPAR γ 発現ファイバーミュータント型RGDアデノウイルスベクターの利用価値は大きい。これらPPAR γ の発現を自由にコントロールすることが可能なベクターシステムを応用することで、これまで明らかとされていなかったPPAR γ の生理機能が解明されることが期待される。さらには、ヒトゲノム解読完了後のプロト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。

結論

核内受容体 PPAR γ をターゲットとした炎症性腸疾患に対する新規遺伝子治療法の開発ならびに PPAR γ の生理機能解析に有用な遺伝子ノックダウン法の確立を試み、以下に示す結論を得た。

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 γ の減少が炎症反応の悪化につながることを示した。
2. PPAR γ の減少が、PPAR γ 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とした。
3. 炎症腸管へ PPAR γ 遺伝子を送達し PPAR γ 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 γ -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 γ の関わりを明らかとし、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 γ 研究の進展に貢献するであろう PPAR γ ノックダウン法を確立した。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜るとともに、研究に対する姿勢、情熱をご教授くださいました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授 真弓忠範先生に衷心より謝意を表します。また、本研究にあたり、種々ご指導を頂きました大阪大学大学院薬学研究科助教授 中川晋作先生、ならびに大阪大学大学院薬学研究科助手 堤康央先生に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始あたたかいご指導、ご鞭撻を賜りました、大阪大学大学院歯学研究科講師 和田孝一郎先生、横浜市立大学医学部助教授 中島淳先生ならびに多大なるご支援を賜りました大阪大学大学院歯学研究科教授 上崎善規先生に心より御礼申し上げます。

本研究に関して、貴重なるご指導、ご助言を賜るとともに、アデノウイルスベクター等の作製に必要な実験材料を快くご供与くださいました、国立医薬品食品衛生研究所主任研究官 水口裕之先生に深謝致します。

また、レンチウイルスベクターの使用をご快諾くださるとともに、有益なご助言、ご指導を賜りました、理化学研究所バイオリソースセンター サブチームリーダー 三好浩之先生に心より感謝致します。

Gene Chip 解析を行うにあたり、種々ご指導、ご協力を賜りました東京大学先端科学技術研究センター 油谷浩幸先生に厚く御礼申し上げます。

そして本研究を行うにあたり多大なご協力を頂きました、有山輝子修士、立花雅史修士、大橋興三修士、古木理恵学士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野の諸氏ならびに本研究を通じて知り合えた友人に感謝致します。また、在学中の経済的援助を賜りました日本育英会に感謝いたします。

最後に、常にあたたかく見守ってくれた家族に感謝いたします。

引用文献

1. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-50.
2. Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7921-5.
3. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994;8:1224-34.
4. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 1997;272:18779-89.
5. Braissant O, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor- alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* 1998;139:2748-54.
6. Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:383-9.
7. Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, Ohnishi S, Saubermann LJ, Kadokawa T, Blumberg RS, Nagai R, Matsuhashi N. Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 2001;120:460-9.
8. Wada K, Nakajima A, Blumberg RS. PPARgamma and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Trends Mol Med* 2001;7:329-31.
9. Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englano W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of Colon Inflammation through Activators of the Retinoid X Receptor (RXR)/Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPARgamma) Heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001;193:827-38.
10. Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadokawa T, Aburatani H, Matsuhashi N, Nagai R, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis.

- Inflamm Bowel Dis 2002;8:330-9.
11. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001;7:48-52.
 12. 八尾恒良, クローン病診断基準, 難治性炎症性腸管障害調査研究班 平成6年度研究報告書,63-66 (1995).
 13. Blumberg RS, Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *Jama* 2001;285:643-7.
 14. Mizuguchi H, Kay MA. A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 1999;10:2013-7.
 15. Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y, Kay MA, Hayakawa T. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther* 2001;8:730-5.
 16. Mizuguchi H, Kay MA. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum Gene Ther* 1998;9:2577-83.
 17. Kanegae Y, Makimura M, Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol* 1994;47:157-66.
 18. Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, Exley M, Snapper S, Balk SP, Hagen SJ, Kanauchi O, Motoki K, Sakai T, Terhorst C, Koezuka Y, Podolsky DK, Blumberg RS. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology* 2000;119:119-28.
 19. Ohta N, Hiroi T, Kweon MN, Kinoshita N, Jang MH, Mashimo T, Miyazaki J, Kiyono H. IL-15-dependent activation-induced cell death-resistant Th1 type CD8 alpha beta+NK1.1+ T cells for the development of small intestinal inflammation. *J Immunol* 2002;169:460-8.
 20. Yamamoto M, Fujihashi K, Kawabata K, McGhee JR, Kiyono H. A mucosal intranet: intestinal epithelial cells down-regulate intraepithelial, but not peripheral, T lymphocytes. *J Immunol* 1998;160:2188-96.
 21. Floyd ZE, Stephens JM. Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J Biol Chem* 2002;277:4062-8.
 22. Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClung J, Shebani K, Moore F, O'Brien M, Becker JM. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G1298-306.
 23. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran

- sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993;69:238-49.
24. Farazmand A, Koykul W, Peippo J, Baguma-Nibasheka M, King WA, Basrur PK. Sex-linked genes are not silenced in fetal bovine testes expressing X-inactive specific transcript (XIST). *J Exp Zool* 2001;290:327-40.
25. Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, Kodama T, Aburatani H. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res* 2001;61:889-95.
26. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* 2001;25:443-51.
27. Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997;18:61-4.
28. Rustvold J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997;112:1493-505.
29. Sandborn WJ, Targan SR. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:1592-608.
30. Hafraoui S, Lefebvre AM, Geboes K, Cortot A, Auwerx J, Colombel JF, Desreumaux P. Ulcerative colitis is associated with a mucosal deficit in PPARgamma. *Gastroenterology* 2001;116:A689. (Suppl.).
31. Lewis JD, Lichtenstein GR, Stein RB, Deren JJ, Judge TA, Fogt F, Furth EE, Demissie EJ, Hurd LB, Su CG, Keilbaugh SA, Lazar MA, Wu GD. An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3323-8.
32. Bramson JL, Graham FL, Gauldie J. The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo. *Curr Opin Biotechnol* 1995;6:590-5.
33. Nakajima A, Wada K, Katayama K, Saubermann L, Osawa E, Nagase H, Ueno N, Matsuhashi N, Aburatani H. Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligand administration in dextran sodium sulfate mice. *J Gastroenterol* 2002;37 Suppl 14:62-6.
34. Bennett CF, Kornbrust D, Henry S, Stecker K, Howard R, Cooper S, Dutson S, Hall W, Jacoby HI. An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:988-1000.
35. Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH, West AB, Ron D. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta- deficient mice. *J Clin Invest* 2001;107:585-93.

36. Hendel J, Nielsen OH. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1170-3.
37. Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115:297-306.
38. Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, Kadokawa T, Mayumi T, Yura Y, Kamisaki Y. PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur J Pharmacol* 2002;448:231-8.
39. Lang SM, Heinzelmann M, Stratakis DF, Teschauer W, Loeschke K. Detection of Ki-ras mutations by PCR and differential hybridization and of p53 mutations by SSCP analysis in endoscopically obtained lavage solution from patients with long-standing ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:2166-70.
40. Ierardi E, Principi M, Francavilla R, Passaro S, Noviello F, Burattini O, Francavilla A. Epithelial proliferation and ras p21 oncogene expression in rectal mucosa of patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2001;46:1083-7.
41. Salomon P, Pizzimenti A, Panja A, Reisman A, Mayer L. The expression and regulation of class II antigens in normal and inflammatory bowel disease peripheral blood monocytes and intestinal epithelium. *Autoimmunity* 1991;9:141-9.
42. Bisping G, Lugering N, Lutke-Brinrup S, Pauels HG, Schurmann G, Domschke W, Kucharzik T. Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2001;123:15-22.
43. Narushima Y, Unno M, Nakagawara K, Mori M, Miyashita H, Suzuki Y, Noguchi N, Takasawa S, Kumagai T, Yonekura H, Okamoto H. Structure, chromosomal localization and expression of mouse genes encoding type III Reg, RegIII alpha, RegIII beta, RegIII gamma. *Gene* 1997;185:159-68.
44. Abe M, Nata K, Akiyama T, Shervani NJ, Kobayashi S, Tomioka-Kumagai T, Ito S, Takasawa S, Okamoto H. Identification of a novel Reg family gene, Reg IIIdelta, and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region. *Gene* 2000;246:111-22.
45. Dieckgraefe BK, Crimmins DL, Landt V, Houchen C, Anant S, Porche-Sorbet R, Ladenson JH. Expression of the regenerating gene family in inflammatory bowel disease mucosa: Reg Ialpha upregulation, processing, and antiapoptotic activity. *J Investig Med* 2002;50:421-34.
46. Ogawa H, Fukushima K, Naito H, Funayama Y, Unno M, Takahashi K, Kitayama T,

- Matsuno S, Ohtani H, Takasawa S, Okamoto H, Sasaki I. Increased expression of HIP/PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:162-70.
47. Shibuya A, Wada K, Nakajima A, Saeki M, Katayama K, Mayumi T, Kadokawa T, Niwa H, Kamisaki Y. Nitration of PPARgamma inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line, RAW 264. *FEBS Lett* 2002;525:43-7.
48. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadokawa T, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999;4:597-609.
49. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.
50. Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 2002;32:107-8.
51. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-9.
52. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-3.
53. Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, Okabe M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 2002;532:227-30.
54. Kunath T, Gish G, Lickert H, Jones N, Pawson T, Rossant J. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol* 2003;21:559-61.
55. Mizuguchi H, Kay MA. A simple method for constructing E1- and E1/E4-deleted recombinant adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 1999;10:2013-7.
56. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 1998;72:8150-7.
57. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 1999;283:682-6.
58. Tahara-Hanaoka S, Sudo K, Ema H, Miyoshi H, Nakauchi H. Lentiviral vector-mediated transduction of murine CD34(-) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2002;30:11-7.
59. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975;5:19-27.

60. Wise LS, Green H. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem* 1979;254:273-5.
61. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 1992;97:493-7.
62. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA, Rodriguez BR, Kliewer SA, Lehmann JM, Morris DC. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol* 1996;50:1087-94.
63. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996;272:263-7.
64. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 1997;17:314-7.
65. Takahashi M, Miyoshi H, Verma IM, Gage FH. Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J Virol* 1999;73:7812-6.
66. Pfeifer A, Kessler T, Yang M, Baranov E, Kootstra N, Cheresh DA, Hoffman RM, Verma IM. Transduction of liver cells by lentiviral vectors: analysis in living animals by fluorescence imaging. *Mol Ther* 2001;3:319-22.
67. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994;79:1147-56.
68. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7355-9.
69. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 2003;17:438-42.
70. Moss EG, Taylor JM. Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system. *Nat Cell Biol* 2003;5:771-2.
71. Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnosis, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001;120:622-35.
72. Khandoudi N, Delerive P, Berrebi-Bertrand I, Buckingham RE, Staels B, Bril A. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* 2002;51:1507-14.
73. Shiomi T, Tsutsui H, Hayashidani S, Suematsu N, Ikeuchi M, Wen J, Ishibashi M, Kubota T, Egashira K, Takeshita A. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated

- receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2002;106:3126-32.
74. Wayman NS, Hattori Y, McDonald MC, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S, Pisano B, Chatterjee PK, Thiemermann C. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size. *Faseb J* 2002;16:1027-40.
75. Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM. Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med* 1998;4:1058-61.
76. Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isoforms for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:564-70.

