



Title	Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity
Author(s)	水井, 理之
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45405
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	みずいまさゆき 水 井 理 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 19252 号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity (シクロスポリン誘発性腎傷害に対する HGF 遺伝子治療効果)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 荻原 俊男 教授 奥山 明彦

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

シクロスポリン (CsA) の登場によって、急性拒絶反応は激減し腎移植後1年以内の移植腎生着率は飛躍的に改善したが、慢性期生着率は未だ改善されていない。このような慢性移植腎症 (Chronic allograft nephropathy ; CAN) の中には、移植腎生検にて明らかな免疫学的拒絶反応を示していないにもかかわらず尿細管萎縮や間質線維化などの腎障害が認められる例が多く見られ、その原因の一つとして CsA をはじめとするカルシニューリン阻害剤による腎毒性の影響が重要視されており、移植腎機能を維持するためにはこの腎毒性を軽減することが急務となっている。今回我々は、肝細胞増殖因子 (HGF) に着目した。HGF は強力な肝細胞増殖作用をもつサイトカインであるが、血管形成・形態形成・細胞分裂・細胞遊走、アポトーシス抑制作用等を有し、腎においては、急性腎不全や線維化において有効であることが実験レベルで報告されている。我々はこれまでに、エレクトロポレーションを用いて筋肉へ plasmid DNA を導入し、筋肉で発現した蛋白を血流を介して腎臓に作用させることにより、糸球体病変を改善させることが可能であることを報告しており、この方法を用いて HGF 発現ベクターによるラットシクロスポリン腎傷害モデルに対する HGF 遺伝子治療を行い、その効果とメカニズムについて検討した。

〔 方法ならびに成績 〕

1) エレクトロポレーション法を用いて、HGF 発現 plasmid DNA をラット筋肉に遺伝子導入することにより、腎に作用させることが可能か検討した。bupivacaine 筋注3日後に、エレクトロポレーション法により HGF 遺伝子を導入することにより血漿 HGF 濃度の上昇を認め、腎尿細管細胞の増殖効果を認めた。2) 雄 SD ラットに低塩食下で CsA を連日皮下注することにより腎傷害を誘発した。7日後、14日後に前脛骨筋にエレクトロポレーション法により HGF 遺伝子を導入し、14日後および21日後に検体採取を行った。組織学的検討により、PBSを導入した CsA 群では、2週後・3週後ともに細動脈硝子化や尿細管細胞障害、間質の線維化を認めたが、HGF 遺伝子導入群では、これらの病変はいずれも抑制されていた。また、間質の形質転換のマーカーである smooth muscle α actin (SM α A) の発現や、マクロファージのマーカーである ED1 も CsA 群では増加していたが、HGF 群では改善が認められた。

CsA 群で認められた TUNEL 陽性の尿細管細胞のアポトーシスは、HGF 群では軽減し、リン酸化 Bad 陽性細胞が増加していた。一方、細胞増殖のマーカーである Ki-67 陽性尿細管細胞は、HGF 群で増加しており、HGF 遺伝子導入は、尿細管細胞を保護し再生を促進していると考えられた。強い線維化因子である TGF β 1 に対する影響を検討するために、腎皮質の TGF β 1 発現を検討したところ、CsA 群では TGF β 1 が上昇していたが、HGF 群ではその発現が減少していることが確認された。3) ヒト近位尿細管細胞株 (HK-2) を用いて CsA に対する HGF の抗アポトーシス効果を検討した。CsA により尿細管細胞にアポトーシスが誘導され、HGF がこれを抑制していることがカスパーゼ3 活性測定により確認された。また、そのメカニズムとして bcl-2、リン酸化 Akt の上昇を介していることが確認された。

[総 括]

エレクトロポレーション法を用いた筋肉への HGF 遺伝子導入により、HGF を腎臓に作用させることが可能であった。HGF 遺伝子導入により、CsA による尿細管間質障害は軽減された。HGF は尿細管細胞に対して、抗アポトーシス作用を有するとともに、細胞増殖を促し、CsA 誘発性腎傷害に対する治療として有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

シクロスポリン (CsA) などのカルシニューリン阻害薬の登場により、移植腎の短期生着率は飛躍的に向上したが、慢性移植腎症に起因する後期移植腎廃絶は未だ移植医療の問題点であり、その一つに CsA 誘発性腎傷害が挙げられる。申請者は、HGF を用いた CsA 誘発性腎傷害に対する遺伝子治療の可能性について検討した。

減塩食下で連日シクロスポリンを皮下注射し、CsA 誘発性腎傷害モデルを作成した。投与開始1週、2週後にエレクトロポレーション法にて腎傷害モデルラットの膀胱筋に HGF 遺伝子を導入し、その効果を検討した。組織学的検討により、vehicle を導入した CsA 群では、2週後・3週後ともに細動脈硝子化や尿細管細胞障害、間質の線維化、間質の形質転換、マクロファージ浸潤を認めたが、HGF 遺伝子導入群では、これらの病変はいずれも抑制されていた。また、腎皮質の TGF β 1 発現については、CsA 群では TGF β 1 が上昇していたが、HGF 群ではその発現が減少していることを確認した。CsA 群で認められた TUNEL 陽性の尿細管細胞のアポトーシスは、HGF 群では軽減し、リン酸化 Bad 陽性細胞が増加していた。一方、細胞増殖のマーカーである Ki-67 陽性尿細管細胞は、HGF 群で増加しており、HGF 遺伝子導入は、尿細管細胞を保護し再生を促進していると考えられた。さらに *in vitro* の系でヒト近位尿細管細胞株 (HK-2) を用いて CsA に対する HGF の抗アポトーシス効果を検討し、CsA により尿細管細胞にアポトーシスが誘導され、HGF がこれを抑制していることをカスパーゼ3 活性測定により確認した。また、そのメカニズムとして bcl-2、リン酸化 Akt の上昇を介していることを確認した。

本研究は、HGF による遺伝子治療がシクロスポリン誘発性腎傷害に有用な手段であることを示した。筋肉への遺伝子導入は、簡便かつ効果的な治療法であり、今後の移植医療に役立つ重要な知見である。以上より、本論文は学位に値するものと認める。