The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Exploring RNA Interference as a Therapeutic Strategy for Renal Disease
Author(s)	高畠, 義嗣
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45500
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【15】

氏　　名	高畠義嗣（たかばたけ よしつぐ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　19248　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	Exploring RNA Interference as a Therapeutic Strategy for Renal Disease （RNA interference を用いた腎疾患治療の試み）
論文審査委員	（主査） 教授 堀　正二 （副査） 教授 金田 安史　教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

【目的】

RNA interference（RNAi）は２本鎖 RNA により、相補的な mRNA が分解され、その発現が特異的に抑制される現象である。最初植物や線虫で報告されたこの現象は、哺乳動物細胞では、interferon 応答と呼ばれる一種の抗ウイルス反応により非特異的な apoptosis や翻訳抑制が生じるため観察されなかった。しかし 2001 年 Tuschl らは約 21 塩基の short interfering RNA（siRNA）を発見し、これを導入することにより哺乳動物細胞においても RNAi が観察されることを報告した。RNAi は、発現抑制の手段として急速に普及しているものの、腎疾患に対する応用例の報告はまだない。本研究では腎疾患治療における RNAi の有効性について検討した。

【方法ならびに成頼】

(1) 培養メサンギウム細胞（腎糸球体構成細胞の一つ）を用いて、luciferase 発現 vector とその発現を抑制する siRNA あるいは antisense oligo DNA（ASODN）を co-transfection し、24 時間後に dual luciferase assay をおこなったところ、siRNA は ASODN の 1000 分の１以下の濃度で標的遺伝子の発現を抑制した。またこの siRNA の配列を１塩基置換すると抑制効果が消失した。

(2) ラットの腎臓に経腎動脈的に electroporation を用いて luciferase 発現 vector およびその発現を抑制する siRNA を導入、４日後に糸球体を単離し、dual luciferase assay を行ったところ、5μg という低用量で特異的な発現抑制が認められた。

(3) 内因性遺伝子に対する siRNA の効果を検証するため、GFP transgenic rat の腎動脈から GFP に対する siRNA を導入し、７日後に腎組織を蛍光顕微鏡にて観察したところ、ほとんどの腎糸球体において GFP の発現抑制が認められた。またメサンギウム細胞のマーカーである OX-7 にて染色した結果、siRNA は同細胞に導入されていることが確認された。

(4) siRNA の治療効果を検証するモデルとして Thy-1 腎炎を採用した。同モデルでは糸球体における TGF-β1 の発現が病態形成に関与することが実証されている。そこでまず TGF-β1 に対する siRNA を３種類作成し、培養メサン

ギウム細胞を用いた in vitro の実験で最適な siRNA を選択した。次に Thy-1 腎炎惹起 24 時間後、in vitro で効果を確認した siRNA を遺伝子導入した。4 日後に治療効果を検討したところ、糸球体における TGF-β1 の発現は抑制され、細胞外基質沈着の軽減などの組織学的改善が得られた。

(5) 効果持続期間が短いなどの siRNA の欠点を補うべく、種々の siRNA 発現 DNA vector が開発されている。そのうち最も繁用されている U6 promoter を用いた siRNA 発現 vector を採用して上記と同じ配列の siRNA を発現する vector を設計した。(4)と同様の実験をおこなったところ、合成 siRNA と同等の効果を確認した。

以上より siRNA は腎疾患における遺伝子制御の手段として有効であると考えられたが、実際に臨床応用するにあたっては特に siRNA の効果持続時間が重要な問題であり、さらに検討を加えた。

(6) GFP transgenic rat の筋肉(直接注射)および腎臓(経腎動脈)に electroporation を用いて GFP に対する siRNA を導入したところ、その効果持続時間は前者の 3 ケ月以上に対して、後者では 14 日程度であり、臓器により異なることが確認された。

(7) 最近 siRNase の可能性があるとして報告された exonuclease のひとつ *eri-1* の臓器発現を検討したところ、骨格筋に比して糸球体や脳での発現が高く、これが糸球体での siRNA の効果持続時間を規定している可能性が示唆された。

【総括】

(1) siRNA は従来用いられてきた核酸医薬に比較して、きわめて低濃度で特異的に標的遺伝子の発現を抑制した。

(2) electroporation を用いた経腎動脈的アプローチにより siRNA はメサンギウム細胞に特異的に導入された。

(3) Thy-1 腎炎モデルにおいて TGF-β1 に対する siRNA は糸球体における標的遺伝子の発現を抑制し、組織学的改善をもたらした。

以上より siRNA は腎疾患における遺伝子発現制御において有用なツールになると考えられた。

論文審査の結果の要旨

RNA interference (RNAi) は 2 本鎖 RNA により相補的な mRNA の発現が特異的に抑制される現象で、約 21 塩基の short interfering RNA (siRNA) が重要な役割を果たす。申請者は本研究において腎疾患の治療における siRNA の有効性について検討した。

申請者は、培養メサンジウム細胞を用いて、ルシフェラーゼ発現ベクターと co-transfection することにより、アンチセンス DNA と siRNA の遺伝子発現抑制効果を比較したが、siRNA の効果はアンチセンス DNA の 1000 倍以上高いことを確認した。また、エレクトロポレーション法を用いて腎糸球体にルシフェラーゼ発現ベクターおよび siRNA を co-transfection し、*in vitro* での siRNA の効果を検討し、siRNA は低用量で、糸球体でのルシフェラーゼ活性を特異的に抑制すること、さらに、EGFP トランスジェニックラットに EGFP に対する siRNA を導入することにより、siRNA が導入された細胞は、糸球体メサンギウム細胞であることを確認した。

メサンギウム増殖性腎炎に類似した Thy-1 腎炎モデルラットに TGF-β1 をターゲットとした siRNA を導入し、腎炎に対する治療効果があるかを検討したところ、siRNA を導入した腎炎糸球体では、Northern blot、Western blot、免疫組織化学により、対側腎に比べて、有意に TGF-β1 発現が抑制されていることが確認され、この TGF-β1 発現抑制に伴い、糸球体での smooth muscle α actin や細胞外基質産生が抑制されることも確認した。

糸球体腎炎を対象疾患として臨床応用するためには、siRNA を長期間作用させることが必要となる。siRNA の効果持続期間に関する検討では、糸球体に導入された siRNA の効果は 2 週間しか持続しなかったが、筋肉では 90 日以上効果が持続し、その持続期間に *eri-1* という RNA 分解酵素が関与している可能性を示唆し、siRNA を長期間作用させるための糸口を見出した。

本研究は、siRNA による遺伝子治療が糸球体腎炎に有用な手段であることを示した。さらに慢性進行性腎障害に対する siRNA の応用に向けた重要な知見を示した。以上より、本論文は学位に値するものと認める。