

# 腎臓内科のための DDS 技術

長崎大学医学部第二内科

小畑陽子・西野友哉・河野 茂\*

## *Technologies of Drug Delivery System for Nephrology*

Chronic kidney disease (CKD) is known to be a risk factor for end stage renal disease (ESRD) and cardiovascular disease. Therefore, the development of new treatments for CKD is important and necessary. However, there is no established therapy for glomerulosclerosis and renal interstitial fibrosis, which are seen in the kidney of ESRD patients. Recent advances in basic research on the mechanism of fibrosis leads to discovery of fibrosis relating genes or factors. Some anti-fibrotic approaches for targeting these factors have been reported. In this review, we introduce several technologies and methodology using drug delivery system for fibrosis in nephrology.

近年、慢性腎臓病が末期腎不全ならびに心血管疾患の危険因子であることが明らかとなってきており、慢性腎臓病への対策を講じることは透析導入患者数の増加に歯止めをかけると共に心血管疾患の発症を防止することにも繋がり、大変重要と考えられる。しかしながら、末期腎不全でみられる糸球体硬化や腎間質線維化に対する根本的な治療方法はいまだ確立されていない。そこで、本稿では、臓器線維化に対する drug delivery system (DDS) を応用した再生誘導治療の試みを中心とした、腎臓内科分野における DDS 技術について概説する。

Yoko Obata, Tomoya Nishino, Shigeru Kohno\*

Keywords: fibrosis, cationized gelatin, small interfering RNA, gene-cell hybrid therapy

## はじめに

近年、慢性腎臓病は末期腎不全や心血管病の大きな危険因子であることが明らかとなり、世界規模でその病態解明と治療法の開発が進められている。一方、我が国における慢性透析患者数は2011年末の調査で30万人を超え、毎年1万人前後増加し続けている現状にある。末期腎不全にいたる原疾患はさまざまであるが、最終的に糸球体硬化や尿細管萎縮、間質の線維化を生じ、重篤な機能障害を来す。一般人口の高齢化に伴い、今後も慢性腎臓病患者数の増加が予測されており、発症機序の解明と、進展抑制のための治療法の開発が望まれている。近年、線維化の再生・修復に関する基礎研究により、さまざまな線維化関連因子が明らかとなり、それらをターゲットとした再生誘導治療が注目されている。そこ

で、本稿では、臓器線維化に対する drug delivery system (DDS) を応用した再生誘導治療の試みを中心とした、腎臓内科分野における DDS 技術について概説する。

## 腎臓内科分野における再生医療

難治性慢性疾患の1つである線維性疾患は、細胞外基質の過剰産生による臓器の線維化を特徴とし、腎臓だけでなく、心臓、肺、肝臓などの主要な臓器において重篤な機能障害をもたらす。しかしながら、現在までに、これらの慢性線維性疾患に対する根本的な治療方法は確立されていない。近年、臓器線維化の再生・修復に関する基礎研究の進歩により、その再生誘導治療が可能になりつつある。この再生誘導治療には、新しい治療法をつくり出すこと、治療適用の拡大、自然治癒力を高めることによって治療を可能にすることなどの目的があり、腎臓内科分野

\* Second Department of Internal Medicine,  
Nagasaki University School of Medicine

で問題となってくる線維化という現象に対する再生医療の基本戦略として、以下の3つの方法が考えられる。

- (1) 低分子薬剤、アンチセンスまたはsmall interfering RNA (siRNA) などにより、線維化を促進する分子の生理活性を抑制する。
- (2) マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) などにより線維化組織を分解し、前駆細胞や幹細胞などが増殖・分化することが可能な再生修復の場を確保する。
- (3) 細胞増殖因子、あるいはその遺伝子を導入することで、線維化を起こしている周囲の正常組織からの再生修復を促進する。

これらいずれの方法においても、線維化組織に対する低分子薬剤、蛋白質、遺伝子などを作用部位へ効率よく運び、その治療効果を最大限に高めるためのターゲティング、徐放化などの DDS 技術が不可欠となってくる。

#### 遺伝子・蛋白質・薬剤導入方法

抗線維化治療のターゲットとなる分子は、さまざまな線維化促進因子と抑制因子である。これまでに、線維化関連因子の発現を調節する遺伝子・蛋白質・薬剤などの細胞への導入方法は、ウイルス性のベクターを用いる方法と非ウイルス性のベクターを用いる方法の2種類に大きく分けられる。ウイルス性ベクターの場合、導入効率は高いという利点はあるが、実際、生体に応用する場合、安全性などの問題が残る。一方、非ウイルス性ベクターの場合、安全で操作が簡便であるという利点があるが、細胞へ導入される前に生体内の核酸分解酵素により分解される可能性があるため、導入効率に問題が残る。

ここでは、それぞれの導入法について簡単に紹介する。

#### 1. ウイルス性ベクター<sup>1)</sup>

##### (1) アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターは、細胞への遺伝子導入効率が極めて高く、培養細胞では静止期の細胞を含めほぼ100%の細胞に導入することができ

る。ただし、血球系細胞などの浮遊系細胞への導入効率は低いといわれている。動物個体へも局所投与することにより、遺伝子の高率な発現が期待できる。しかしながら、導入した遺伝子は染色体内に取り込まれず、体内で複製されないため、遺伝子の発現は一過性である。また、ウイルス遺伝子の大半が残るため、長期的に細胞毒性を示し、免疫が生じて反復投与ができなくなるなどの問題がある。

##### (2) レトロウイルスベクター

レトロウイルスベクターは細胞染色体上に遺伝子を高率に導入することができるため、遺伝子の安定した発現が継続する。現在行われているウイルスを用いた遺伝子導入法のなかで最も報告が多い。アデノウイルスと比べ組み換えウイルスの作成は容易であるが、静止期の細胞への導入が難しい。また、血清中の補体で不活化されるため、動物個体への投与は難しいことから、採取した細胞へ、レトロウイルスを用いて体外で遺伝子を導入する *ex vivo* 法が用いられることが多い。問題点としては、増殖能をもつウイルスが混入すると、染色体のあらゆる部分に遺伝子を挿入し、がん遺伝子を活性化させる危険性もある。

現在、遺伝子治療の臨床試験が世界各国で行われているが、その半数以上がウイルスをキャリアとして用いている。しかしながら、キャリアとして用いたウイルスに起因すると思われるショックや白血病の発症事例が報告されており<sup>2)</sup>、より安全なキャリアの開発、治療遺伝子の導入部位をコントロールする技術の開発が望まれる。

#### 2. 非ウイルス性ベクター

##### (1) 物理刺激<sup>3~10)</sup>

物理刺激による遺伝子導入方法は、遺伝子とともに培養している細胞へ外部から物理的な刺激を与えることによってその細胞膜を一過性に不安定化し、遺伝子導入する方法である。電気、圧力、超音波、磁力などを利用した、これまでに多くの物理刺激による遺伝子導入方法が報告され、遺伝子導入効率を増強させることに成功している

物理刺激	原理	適用部位	文献
電気	電場の増加による小孔形成	筋肉、皮膚、肝臓、癌	4,10)
圧力	気圧、水圧による小孔形成	植物細胞、肝臓	3,9)
超音波	キャビテーションによる小孔形成	筋肉、腎臓、皮膚、神経	7)
磁力	磁力による磁性粒子-遺伝子複合体の細胞表面への集積	培養細胞	5)
レーザー光	集光ビームによる小孔形成	皮膚、脳	8)
温度	温度変化による複合体解離促進、転写効率上昇	培養細胞	6)

表1 物理刺激を利用した遺伝子導入法 (文献 39 より改変)

(表 1)。

## (2)カチオン化高分子<sup>11)</sup>

カチオン化高分子は、非ウイルスベクターとして用いられる代表的な材料の1つである。カチオン化高分子は負に帯電し、DNAと複合体を形成する。複合体を細胞内に取り込まれやすいサイズに、また細胞と相互作用しやすい表面性状にすることで遺伝子を効率的に細胞へ導入することが可能である。

代表的なカチオン化高分子としては、直鎖状ポリエチレンイミン、分岐状ポリエチレンイミン、ポリ-L-リジン、キトサンやデンドリマーなどの材料が用いられている。一般に、遺伝子とカチオン化高分子との複合体は、エンドサイトーシスによる細胞内への取り込み、エンドソームから細胞質へのエスケープ、核移行、転写の段階を経て遺伝子発現に至るとされている。

## (3)カチオン化脂質<sup>12,13)</sup>

カチオン化脂質は、水中でミセルを形成し、リポソーム(カチオン化リポソーム)となる。カチオン化リポソームは、カチオン化高分子と同様にDNAと複合体を形成し、遺伝子の発現効率を増強させる。この遺伝子導入法は、培養細胞系での実験において最も多く用いられている方法であり、リポフェクション法もこの一種である。脂質の種類やコレステロールなどの添加などによる遺伝子導入条件の最適化に関する研究が多く行われている。

## (4)その他の材料

ハイドロキシアパタイト、三リン酸カルシウムなどのリン酸カルシウムが遺伝子導入のための材料として用いられている。<sup>14)</sup>

## ベクターとしてのカチオン化ゼラチンの有用性

再生誘導治療で用いる薬物の多くは、細胞増殖因子及びその遺伝子である。すでに、生体組織の再生をめざした細胞増殖因子の利用が試みられ、その徐放化が必要不可欠であることが報告されている。しかしながら、タンパク質の徐放における最大の問題は、生物活性の低下であり、単に細胞増殖因子と徐放キャリア材料を混合するだけでは、実際の臨床応用は難しく、多くの場合、この過程において、タンパク質の変性による生物活性の低下をきたしてしまう。一般に、細胞増殖因子は塩基性タンパク質が多く、その分子表面に正電荷に富む領域が存在していることから、このタンパク質と徐放化キャリア高分子との間の静電的相互作用力を利用した徐放化システムが考案されている。このキャリア高分子としては、電荷をもち、生体吸収性で、かつ生体安全性のものであることが望ましい。そこで、より効率的にかつ安全に、線維化関連因子の発現を調節する遺伝子・蛋白質・薬剤などの細胞への導入、徐放化を行う担体として、カチオン化ゼラチンの有用性が数多く報告されている<sup>15)</sup>。

カチオン化ゼラチンの特徴として、①陽性荷電のため、陰性荷電している核酸やタンパク質とイオン結合し、その分解を防ぐ、②格子状の構造をとり、結合物質を内部に保護することで、分解酵素の影響を抑制する、③これまでに医学・薬学・食品分野で長く使用され、生体内での安全性が確立されている、④架橋度を変えることによりゼラチンの分解速度を自由に調節できる ⑤化学修飾が可能であり、形態も自由に変更できるなどが挙げられる。すでに、この徐放化技術によってさまざまな生体組織の再生誘導が実現されている<sup>16-18)</sup>。このゼラチンと遺伝子の

複合体(図1)により、核酸分解酵素による分解を防ぎ、安全かつ効率的に遺伝子導入することができる

と考えられる。

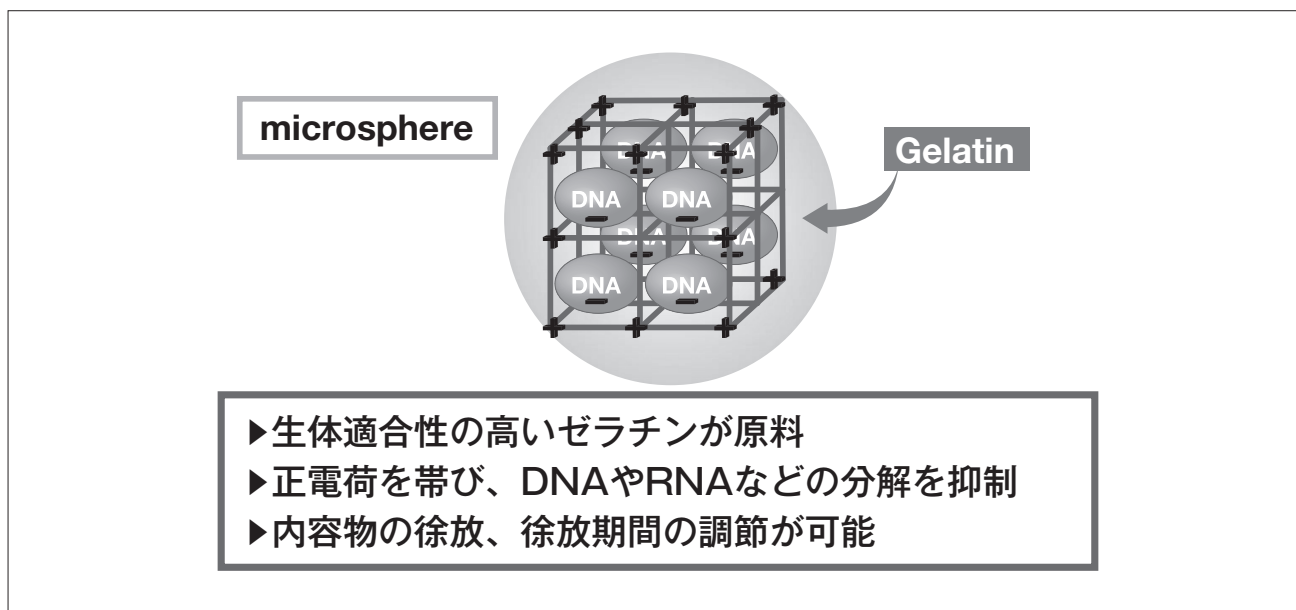


図1 カチオン化ゼラチン粒子(Cationized gelatin microspheres ; CGMs)

#### カチオン化ゼラチン粒子の 遺伝子—細胞ハイブリッド治療への応用

特定の細胞への遺伝子導入を行うことは、1991年に Plautz ら<sup>19)</sup>により初めて行われ、それ以降平滑筋や内皮細胞を用いた遺伝子導入が報告されてきた。細胞内では、核酸分解酵素による遺伝子分解は抑制されており、また、遺伝子の転写から蛋白発現が可能な状態にあるため、*Ex vivo* で特定の細胞に遺伝子を導入することにより、これらの細胞を生体内に投与するという cell-based gene therapy が行われるようになった。この治療法の利点としては、(1)選択的な遺伝子導入が行われるため、全身投与可能である、(2)遺伝学的に比較的均一な細胞集団として発育させることが可能である、(3)遺伝子の導入、発現が確実であるなどが挙げられる。逆に、欠点としては、(1)発現に時間が必要である、(2)細胞の採取、培養などの過程が必要である、(3)培養中に細胞の表現型が変化する可能性があるなどが挙げられる。利点を生かした治療として、内皮細胞へ遺伝子導入を行い、グラフト<sup>20)</sup>や t-PA を導入した細胞のステント<sup>21)</sup>へのコーティングなども行われている。しかし

ながら、これまでの治療では、遺伝子を導入された細胞の役割としては、遺伝子発現の場としての機能が重視されており、細胞自体の特性を生かした治療はほとんど行われていなかった。また、大部分の遺伝子導入細胞は、細胞塊が血管を閉塞する危険性があるため、血管内投与で使用することができないのが現状であり、主要臓器を標的とした治療には適用が難しいという点があった。そこで、失われた組織に対して必要な細胞を補充する細胞治療と欠損遺伝子や治療目的遺伝子を補充する遺伝子治療を組み合わせ、遺伝子—細胞ハイブリッド治療が開発されている。具体的には、目的の細胞を生体内より取り出し、この細胞へ遺伝子を導入後生体内に投与する。本治療法の優れた点は、①治療目的の細胞以外へ遺伝子が導入されることがなく、遺伝子発現レベルを制御しやすいため、副作用の危険性が軽減されること、②細胞自身が導入遺伝子をもとに合成されたタンパク質の供給源となることから、細胞の選択によっては、特異性の高い細胞の標的部位へのターゲティングが可能になること、③細胞の特定の機能を強化するような遺伝子を細胞内へ導入することにより、本来の細胞とは異なる性質を有する、機能を強



化された細胞を作成することができ、従来の細胞治療のみでは得られなかった治療効果を得ることができ、④細胞と遺伝子を組み合わせることにより、両者の特徴を生かした治療が可能になることなどである。この方法は、貪食能を持つ細胞であれば基本的に適用可能であり、細胞内へ遺伝子を導入するキャリアとして、カチオン化ゼラチン粒子は有用であることが報告されている。Nagaya らは、ゼラチン粒子を用いて貪食能を有する血管内皮前駆細胞へアドレノメデュリンを導入することにより、ラットの肺高血圧症モデルにおいて良好な治療効果を報告している<sup>22)</sup>。また、カチオン化スベルミン-デキストラン複合体を用いて、間葉系幹細胞にアドレノメデュリンを導入し、心筋梗塞巣へ投与することにより、心筋梗塞後の心機能改善効果を認めたとする報告もある<sup>23)</sup>。腎臓内科分野においても、われわれはこの遺伝子-細胞ハイブリッド治療の応用を試みており、後述する。

#### 腎線維化に対する DDS を利用した治療の試み

カチオン化ゼラチンをはじめとした非ウイルス性ベクターを用いた腎線維化に対する具体的な治療例として、これまでにいくつかの報告がある(表2)。Aoyama らは、MMP-1 をコードしたプラスミド DNA を含んだカチオン化ゼラチン粒子を腎被膜に直接注射することで、腎被膜直下の細胞にプラスミドを徐放化して、導入し、そこから産生された MMP-1 によって、ストレプトゾトシン誘発糖尿病性腎症モデルマウスの線維化を3週間にわたり抑制し、腎機能悪化を抑制できることを明らかにした<sup>16)</sup>。また、Kushibiki らは、一側尿管結紮による腎間質線維化モデルマウスに対して、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  タイプ II 受容体 (Transforming growth factor-beta receptor II; TGF- $\beta$ RII) の

siRNA をカチオン化ゼラチンと複合体を形成させて経尿管経路に投与することにより、10 日間にわたり腎線維化の進展を抑制できることを示した<sup>24)</sup>。Xia らは、同じく腎間質線維化モデルマウスに対して、heat shock protein47 (HSP47) siRNA を含有させたカチオン化ゼラチン粒子を経尿管的に投与することにより、2 週間にわたり腎間質線維化の抑制が可能であったと報告している<sup>25)</sup>(図2)。また、カチオン化ゼラチン以外のキャリアとして、DDS を利用した腎疾患に対する治療の試みとしては、ポリエチレングリコール鎖を有するカチオン性ブロック共重合体と mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1) siRNA との複合体を、ループス腎炎のモデルマウスに1週間に2回腹腔内投与することで、糸球体硬化や腎機能改善、蛋白尿減少効果を認めたとする報告もある<sup>26)</sup>。

これまでに、腎臓を標的とした投与経路としては、経被膜的、経尿管的、腹腔内投与など試みられているが、臨床応用を考えた上で、より簡便かつ効率的な投与方法の検討や標的分子の選定が望まれる。

#### 腹膜線維症に対する DDS を利用した治療の試み

腎臓内科分野での臓器線維化は、腎臓のみでなく、末期腎不全に対する治療として行われている腹膜透析に伴う腹膜線維症も問題となってくる。前述したように、わが国では、糖尿病などの生活習慣病の増加に伴い、透析患者数は年々増加の一途をたどっている。透析医療において、腹膜透析(peritoneal dialysis; PD) 療法は、患者の Quality of life (QOL) を維持する在宅医療として有用な治療法であるが、数年の経過後、組織学的に腹膜の線維化・硬化症を発症し、除水機能不全に陥るため、その長期継続が困難となることが多い。その腹膜における特徴的な病理所見として、著明なコラーゲンの増生を伴った

キャリア	投与内容	投与経路	疾患モデル	文献
カチオン化ゼラチン粒子	MMP-1	経被膜的	糖尿病性腎症	16)
カチオン化ゼラチン粒子	TGF- $\beta$ RII siRNA	経尿管的	一側尿管結紮による腎間質線維化	24)
カチオン化ゼラチン粒子	HSP47 siRNA	経尿管的	一側尿管結紮による腎間質線維化	25)
ポリエチレングリコール-ポリリジン重合体	MAPK1 siRNA	腹腔内投与	ループス腎炎	26)

表2 腎線維化に対する DDS を利用した治療

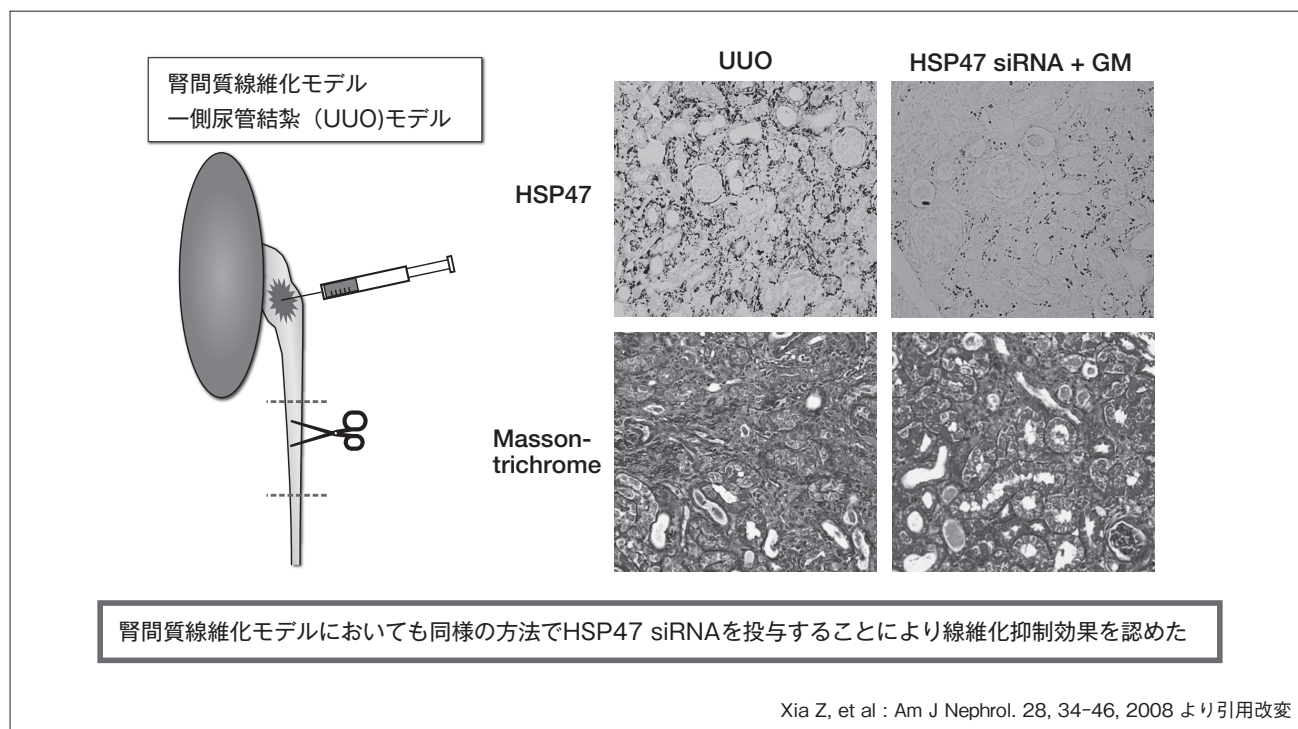


図2 カチオン化ゼラチン粒子を用いた HSP47 siRNA による腎間質線維化抑制効果の検討

線維化を認め<sup>27,28)</sup>、一部の症例では被嚢性腹膜硬化症 (Encapsulating peritoneal sclerosis;EPS) と呼ばれる生命を脅かす重篤な合併症へと発展する。PD における腹膜の形態的、機能的な変化の病因については、様々な研究が進められているが未だ不明で、その有効な予防・治療法も確立されていないのが現状である。我々のグループでは、腹膜線維化の機序を解明し、予防・治療につなげる研究を1つのテーマとして行っている。動物実験レベルでは、血管新生抑制剤<sup>29)</sup>、線維化促進因子のアンチセンス投与<sup>30)</sup>などを行い、ある程度の線維化抑制効果が得られてはいるが、臨床応用、実用化を考えるにあたって、アンチセンスより強力な遺伝子抑制作用を持つ siRNA の徐放や線維化に重要であるマクロファージに対するターゲティングといった DDS の考えを取り入れることを試みた。

#### (1)カチオン化ゼラチン粒子を用いた HSP47 siRNA による腹膜線維化抑制効果の検討

線維化組織を構成する主成分はコラーゲンであり、その合成・分泌に必須の分子シャペロンである HSP47 は、ヒトおよび実験モデルにおいて腹膜の

線維化とともにその発現が増強することが明らかとなっており<sup>31,32)</sup>、腹膜線維化の進展において重要な役割を果たしていることが推察される。

我々は、その遺伝子発現を強力に抑制する方法及びその導入手段として、RNA 干渉とカチオン化ゼラチン粒子 (cationized gelatin microspheres; CGMs) を用いて、HSP47 発現を抑制することにより、マウス腹膜線維症モデルにおける腹膜線維化の進展に対する効果の検討を行った<sup>33)</sup>。0.1% chlorhexidine gluconate (CG) 200 $\mu$ l を週三回腹腔内投与することによりマウス腹膜線維症モデルを作成した。これらを3群に分け、CG 投与3日前に各 siRNA 50mg/150 $\mu$ l/body (PBS、HSP47 siRNA、GFP siRNA) と CGMs 1mg/body を混合したものをマウスの片側の壁側腹膜内に直接注射を1回行った。CG 投与開始後、14, 21, 35 日目にマウスを屠殺し、腹膜組織の採取を行った。その結果、CG 投与開始後21日目の PBS-CGMs、GFP siRNA-CGMs 投与群では、CG のみ投与した群と同様に HSP47 陽性細胞数の増加と腹膜の肥厚・線維化を認めた。一方、HSP47 siRNA-CGMs 投与群では HSP47 陽性細胞数ならびに腹膜の肥厚・線維化は著明に抑制さ

れていた(図3)。

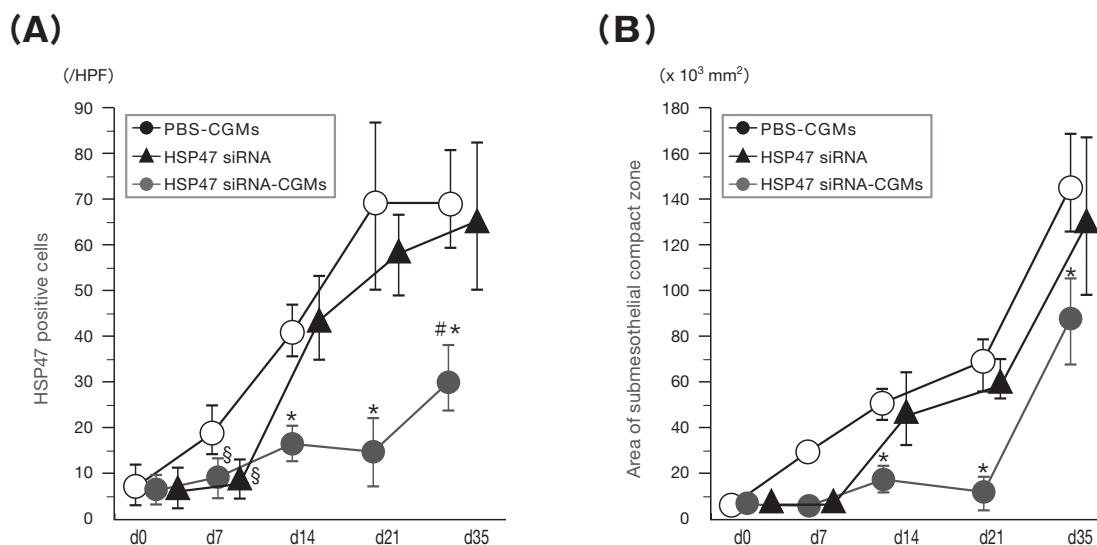
HSP47 陽性細胞数の時間的変化に関しては、PBS-CGMs または HSP47 siRNA のみを投与群では、CG 投与に伴い HSP47 の発現は、14 日目以降、時間経過とともに増加したが、HSP47 siRNA と CGMs を一緒に投与した群では 21 日目においても HSP47 の発現は有意に抑制されていた(図3)。

今回、線維化に重要な役割を果たしている HSP47 の発現を siRNA を用いて抑制することで、著明な腹膜肥厚の抑制を認めたことから、HSP47 siRNA は腹膜線維化予防の新しい方法として期待される。また、通常、単独投与では、7～10 日程度しか効果が持続しないといわれる siRNA を、CGMs を用いて徐放投与することで、その効果が 3 週間以上持続することが確認され、CGMs により、その内容物の徐放期間の調節が可能であることが *in vivo* でも証明された。以上より、HSP47 siRNA と CGMs を組み合わせた治療が腹膜線維症の治療方法の 1 つとして臨床応用につながる可能性が示唆された。このほかにも、最近、斎藤らは、CG によ

る腹膜線維症モデルに対して、シート状に加工したカチオン化ゼラチンに低分子ヘパリンを含有させ、壁側腹膜に貼付することによって、薬剤の徐放化が可能となり、抗線維化効果を認めたと報告しており<sup>34)</sup>、カチオン化ゼラチンは用途や投与方法に応じて、さまざまな形態に加工が可能なことも利点と思われる。

## (2) Hepatocyte Growth Factor (HGF) 遺伝子導入マクロファージを用いた腹膜線維化抑制効果の検討

PD 患者やマウス腹膜線維症モデルの腹膜組織において、腹膜線維化の進展とともにマクロファージの浸潤を認める<sup>31,32)</sup>。このマクロファージの貪食能に我々は着目し、遺伝子導入治療を試みた。Tabata らの研究によりマクロファージによる異物粒子の貪食には、マクロファージが好んで取り込む粒子サイズが存在し、血清存在下では、ゼラチンが強力な貪食促進作用を示すことが報告されている<sup>35)</sup>。さらに、マクロファージがその走化性によって障害部位に特異的に集まるという性質を利用する



HSP47 陽性細胞数 (A) ならびに中皮下腹膜肥厚面積 (B) は HSP47 siRNA-CGMs 投与群ではコントロール群よりも抑制されており、その効果は 21 日目まで持続していた。

§ : vs PBS-CGMs group at day 7 at  $P < 0.01$ . \* : vs PBS-CGMs group at days 14, 21, and 35 at  $P < 0.01$ .

Obata Y, Nishino T, et al : Acta Biomater 8, 2688-2696, 2012 より引用

図3 カチオン化ゼラチン粒子を用いた HSP47 siRNA による腹膜線維化抑制効果の検討



ことで、標的組織へのターゲティングが可能になると思われる。今回、遺伝子-細胞ハイブリッド治療を実現させるために、前述の CGMs を細胞内に遺伝子を導入する材料として用いた。そこで、本研究では、マクロファージが貪食能を持つこと、線維化腹膜組織にマクロファージが浸潤していることを利用して、マクロファージに抗線維化作用を有する HGF 発現プラスミド含有カチオン化ゼラチン粒子を貪食させることにより、腹膜特異的に HGF を発現させ、腹膜の線維化抑制効果を検討した (図 4)。まず、*in vitro* で CGMs を用いてマクロファージに HGF 遺伝子発現プラスミドを貪食させることでその遺伝子を導入し、HGF 蛋白の発現を確認した。さらに、マウス腹膜線維症モデルにおける検討においても、HGF 遺伝子発現プラスミド導入マクロファージを経静脈的に投与することで、肥厚した腹膜組織に遺伝子導入マクロファージの浸潤を認め、同部位において有意に腹膜肥厚の抑制を認めた。この結果から、マクロファージの遊走能を利用して、腹膜特異的に HGF 遺伝子を導入することで組織特異的な遺伝子治療が可能になり、今後の遺伝子治療戦略を検討する上で重要なことと考えられた。今後の課題としては、全身への影響や、カチオン化ゼラチン粒子によるマクロファージへの遺伝子導入率向上、HGF をマクロファージに強制発現させること

でマクロファージの phenotype へ与える影響を検討することなどが挙げられた。

#### 腎臓内科分野で実際に使われている DDS 技術

これまでは、腎臓、腹膜などの臓器線維化に対する DDS 技術を用いた再生誘導治療に焦点を当て、解説してきたが、臨床応用にはまだ至っていないのが現状である。実際に、現在の腎臓内科分野で使われている DDS 技術としては、腎性貧血治療に広く使用されている赤血球造血刺激因子製剤 (erythropoiesis stimulating agent; ESA) に関するものが多い。エリスロポエチンは腎臓で産生され、低酸素状態に反応して血中に放出され、赤血球前駆細胞を刺激することで赤血球産生を促進する。腎性貧血は、腎臓から産生されているエリスロポエチン産生低下に起因し、慢性腎臓病に高頻度に認められ、それ自体が腎機能の悪化や運動機能の低下をもたらし、患者の quality of life (QOL) を低下させるばかりでなく、心血管系イベントの発症リスクを上昇させる原因となっている。ESA は、腎性貧血に対する標準的治療薬である。現在、臨床で利用可能な ESA には、①体内で産生されるエリスロポエチンと同じ塩基配列を有する遺伝子組み換えヒトエリスロポエチン (rHuEPO) 製剤のエポエチンアル

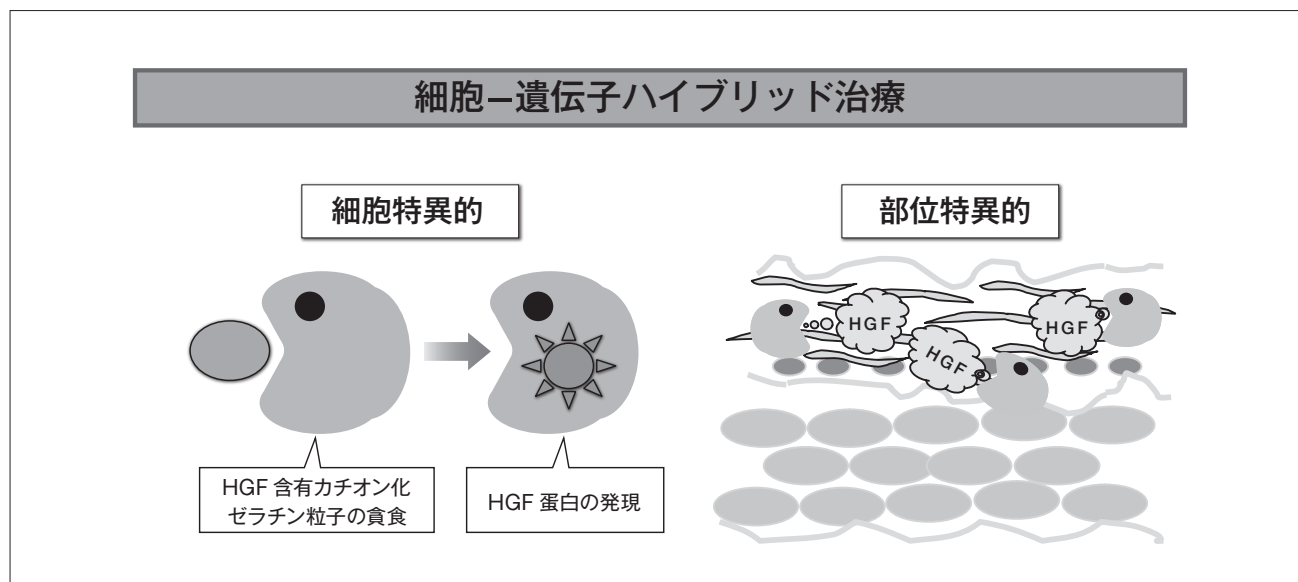


図 4 マクロファージを利用した腹膜線維症への細胞-遺伝子ハイブリッド治療



ESA	対象	平均半減期 (時間)	
		静脈内投与	皮下投与
エポエチンアルファ	健康ボランティア	6.8	19.4
エポエチンベータ	健康ボランティア	8.8	24.2
ダルベポエチンアルファ	慢性腎臓病患者 (非透析) 透析患者	25.3	69.6 48.8
メトキシポリエチレングリコール - エポエチンベータ	慢性腎臓病患者 (非透析)	77	142
	透析患者	134	139
	健康ボランティア	133	137

表 3 ESA の半減期<sup>36)</sup>

ファ / ベータ製剤、②エリスロポエチンのアミノ酸配列の 5 カ所を改変して糖鎖結合部位を増やしたダルベポエチンアルファ製剤 (DA)、2011 年 7 月より新たに導入された③エポエチンベータペゴル製剤 (continuous erythropoietin receptor activator; CERA) がある (表 3)。従来の rHuEPO 製剤は、半減期が短く、ヘモグロビン濃度を目標範囲内に維持するためには頻回の投与が必要であり、腎性貧血の効果的な治療 / 管理には多大な労力や時間を要することが多く、患者は最大週 3 回の ESA 投与を受けることになる。rHuEPO の活性は、その糖鎖に含まれるシアル酸の量に関連しており、シアル酸含有量が多いほど、EPO 受容体との結合能は若干低下するものの血中半減期が長くなることが基礎実験で明らかにされていたことを応用し、DA は、rHuEPO 分子へ新たに 2 か所の N 型糖鎖を導入したことで、血中からの消失半減期が 3 倍以上延長し、高い血中濃度を長時間維持することが可能となった<sup>36)</sup>。このような糖鎖工学を応用したタンパク医薬も DDS の一種であるといえよう。一方、CERA は、エポエチンベータ 1 分子に、分子量約 30000 の直鎖メトキシポリエチレングリコール (PEG) 1 分子を化学的に結合させた分子量約 60000 の新規 ESA であり、既存の ESA に比較して血中からの消失半減期が 100 時間以上と極めて長いのが特徴である<sup>37)</sup>。慢性腎臓病患者を対象とした第 II 相及び第 III 相臨

床試験の結果、CERA は 2 週に 1 階の投与で腎性貧血を改善し、また 4 週に 1 回の投与で 1 年間にわたり良好にヘモグロビン濃度を維持できることが報告されている<sup>38,39)</sup>。この CERA に使用されている PEG 化は、薬剤の体内動態を変化させる DDS の手法の 1 つとして、慢性肝炎治療におけるインターフェロン製剤などにも使用されている。合成高分子ポリエチレングリコールは、不揮発性、無臭で、免疫原性、毒性に悪影響を及ぼさないという特性を持つ。薬剤に PEG を負荷することで、抗原性の低下、体内停滞時間の延長などによる薬効増強効果が期待される。

## おわりに

腎臓内科分野においては、疾患発症進展メカニズムの解明とともに、“線維化”という重篤な臓器障害をもたらす現象に対する、DDS 技術を応用した内科的再生誘導治療の開発、臨床応用は、慢性腎臓病の根本的な治療へつながることが期待される。この治療法を成功させるためには、タンパク質及び遺伝子などの液性因子による線維化に関連した分子の発現抑制、細胞外基質の分解促進、組織再生の促進は不可欠であり、そのためにも DDS 技術のさらなる発展が望まれる。

## 文献

- 1) Stone D, David A, Bolognani F, Lowenstein PR, Castro MG. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J Endocrinol*.164:103-118, 2000.
- 2) Wu C, Dunbar CE. Stem cell gene therapy: the risks of insertional mutagenesis and approaches to minimize

genotoxicity. *Front Med*.5:356-371, 2011.

- 3) Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. The hydrodynamics-based procedure for controlling the pharmacokinetics of gene medicines at whole body, organ and cellular levels. *Adv Drug Deliv Rev*.57:713-731, 2005.
- 4) Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in

- high electric fields. *EMBO J*.1:841-845, 1982.
- 5) Scherer F, Anton M, Schillinger U, et al. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther*.9:102-109, 2002.
- 6) Takeda N, Nakamura E, Yokoyama M, Okano T. Temperature-responsive polymeric carriers incorporating hydrophobic monomers for effective transfection in small doses. *J Control Release*.95:343-355, 2004.
- 7) Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther*.9:372-380, 2002.
- 8) Terakawa M, Ogura M, Sato S, et al. Gene transfer into mammalian cells by use of a nanosecond pulsed laser-induced stress wave. *Opt Lett*.29:1227-1229, 2004.
- 9) Yang N, Horn R. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*.15:213-218, 1995.
- 10) Zimmermann U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim Biophys Acta*.694:227-277, 1982.
- 11) Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther*.9:1647-1652, 2002.
- 12) Pedroso de Lima MC, Neves S, Filipe A, Duzgunes N, Simoes S. Cationic liposomes for gene delivery: from biophysics to biological applications. *Curr Med Chem*.10:1221-1231, 2003.
- 13) Simoes S, Filipe A, Faneca H, et al. Cationic liposomes for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv*.2:237-254, 2005.
- 14) Rauschmann MA, Wichelhaus TA, Stirnal V, et al. Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials*.26:2677-2684, 2005.
- 15) Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Control Release*.109:256-274, 2005.
- 16) Aoyama T, Yamamoto S, Kanematsu A, Ogawa O, Tabata Y. Local delivery of matrix metalloproteinase gene prevents the onset of renal sclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Tissue Eng*.9:1289-1299, 2003.
- 17) Kushibiki T, Nagata-Nakajima N, Sugai M, Shimizu A, Tabata Y. Delivery of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II receptor by cationized gelatin to prevent interstitial renal fibrosis. *J Control Release*.105:318-331, 2005.
- 18) Nakamura M, Jo J, Tabata Y, Ishikawa O. Controlled delivery of T-box21 small interfering RNA ameliorates autoimmune alopecia (Alopecia Areata) in a C3H/HeJ mouse model. *Am J Pathol*.172:650-658, 2008.
- 19) Plautz G, Nabel EG, Nabel GJ. Introduction of vascular smooth muscle cells expressing recombinant genes *in vivo*. *Circulation*.83:578-583, 1991.
- 20) Dichek DA, Anderson J, Kelly AB, Hanson SR, Harker LA. Enhanced *in vivo* antithrombotic effects of endothelial cells expressing recombinant plasminogen activators transduced with retroviral vectors. *Circulation*.93:301-309, 1996.
- 21) Flugelman MY, Virmani R, Leon MB, Bowman RL, Dichek DA. Genetically engineered endothelial cells remain adherent and viable after stent deployment and exposure to flow *in vitro*. *Circ Res*.70:348-354, 1992.
- 22) Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, et al. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*.108:889-895, 2003.
- 23) Jo J, Nagaya N, Miyahara Y, et al. Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran. *Tissue Eng*.13:313-322, 2007.
- 24) Kushibiki T, Nagata-Nakajima N, Sugai M, Shimizu A, Tabata Y. Enhanced anti-fibrotic activity of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II receptor for a mouse model of obstructive nephropathy by cationized gelatin prepared from different amine compounds. *J Control Release*.110:610-617, 2006.
- 25) Xia Z, Abe K, Furusu A, et al. Suppression of renal tubulointerstitial fibrosis by small interfering RNA targeting heat shock protein 47. *Am J Nephrol*.28:34-46, 2008.
- 26) Shimizu H, Hori Y, Kaname S, et al. siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*.21:622-633, 2010.
- 27) Honda K, Hamada C, Nakayama M, et al. Impact of uremia, diabetes, and peritoneal dialysis itself on the pathogenesis of peritoneal sclerosis: a quantitative study of peritoneal membrane morphology. *Clin J Am Soc Nephrol*.3:720-728, 2008.
- 28) Williams JD, Craig KJ, Topley N, et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol*.13:470-479, 2002.
- 29) Yoshio Y, Miyazaki M, Abe K, et al. TNP-470, an angiogenesis inhibitor, suppresses the progression of peritoneal fibrosis in mouse experimental model. *Kidney Int*.66:1677-1685, 2004.
- 30) Nishino T, Miyazaki M, Abe K, et al. Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 suppress peritoneal fibrosis in rats. *Kidney Int*.64:887-896, 2003.
- 31) Mishima Y, Miyazaki M, Abe K, et al. Enhanced expression of heat shock protein 47 in rat model of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int*.23:14-22, 2003.
- 32) Shiohita K, Miyazaki M, Ozono Y, et al. Expression of heat shock proteins 47 and 70 in the peritoneum of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int*.57:619-631, 2000.
- 33) Obata Y, Nishino T, Kushibiki T, et al. HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres suppresses peritoneal fibrosis in mice. *Acta Biomater*.8:2688-2696, 2012.
- 34) Saito T, Tabata Y. Preparation of gelatin hydrogels incorporating low-molecular-weight heparin for anti-fibrotic therapy. *Acta Biomater*.8:646-652, 2012.
- 35) Tabata Y, Ikada Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials*.9:356-362, 1988.
- 36) Kiss Z, Elliott S, Jedynasty K, Tesar V, Szegedi J. Discovery and basic pharmacology of erythropoiesis-stimulating agents (ESAs), including the hyperglycosylated ESA, darbepoetin alfa: an update of the rationale and clinical impact. *Eur J Clin Pharmacol*.66:331-340, 2010.
- 37) Curran MP, McCormack PL. Methoxy polyethylene glycol-epoetin beta: a review of its use in the management of anaemia associated with chronic kidney disease. *Drugs*.68:1139-1156, 2008.
- 38) Kessler M, Martinez-Castelao A, Siamopoulos KC, et al. C.E.R.A. once every 4 weeks in patients with chronic kidney disease not on dialysis: The ARCTOS extension study. *Hemodial Int*.14:233-239, 2010.
- 39) Macdougall IC, Walker R, Provenzano R, et al. C.E.R.A. corrects anemia in patients with chronic kidney disease not on dialysis: results of a randomized clinical trial. *Clin J Am Soc Nephrol*.3:337-347, 2008.
- 40) 城潤一郎・田畑泰彦 10. 遺伝子導入法 進みにつける細胞移植治療の実際上巻 218-225, メディカルドゥ, 2008