

腹膜硬化とその対策

カチオン化ゼラチン粒子を用いた腹膜線維症における
遺伝子治療の試み

—HSP 47 siRNA 投与による検討—*

小畑陽子*¹ 宮崎正信 阿部克成 山本一男*² 櫛引俊宏*⁶
 友重龍治 夏志銀*¹ 原田孝司*³ 大園恵幸*⁴ 松山俊文*²
 小路武彦*⁵ 田畑泰彦*⁶ 河野茂*¹

はじめに

透析医療において、持続携帯式腹膜透析(continuous ambulatory peritoneal dialysis: CAPD)療法は、患者のQOLを改善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を発症することがその普及の妨げとなっている¹⁾。その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腹膜の線維化が認められ^{2,3)}、一部の症例では被嚢性腹膜硬化症(encapsulating peritoneal sclerosis: EPS)と呼ばれる重篤な合併症へと発展する。しかしながら現在までのところ、このEPSに対するメカニズムの解明、および有効な予防・治療法の確立はなされていない。また、コラーゲン合成・分泌に必須の分子シャペロンであるheat shock protein 47(HSP 47)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知られており^{4,5)}、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。

そこで今回われわれは、その遺伝子発現を強力に抑制する方法およびその導入手段として、RNA干渉(RNA interference: RNAi)とカチオン化ゼラチン粒子(cationized gelatin microspheres: CGMs)を用いてHSP 47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。

I. 方法

1. カチオン化ゼラチン粒子の作製

エチレンジアミンを導入することによりカチオン化ゼラチンを作製し、グルタルアルデヒドを用いた後架橋法により、カチオン化ゼラチン粒子(直径32 μm)に架橋を行ったもの(分解期間:約2~3週間)を今回の実験に使用した。

2. Western blotting

デザインしたHSP siRNAの効果調べるために、マウス胎児線維芽細胞のNIH 3T3細胞にLipofectamine 2000を用いて、1) PBS, 2) HSP 47 siRNA, 3) GFP siRNAを導入し、導入24時間後の細胞を回収した。それを10% SDS-PAGE上で電気泳動を行って蛋白を分離し、HSP 47とactinの抗体を用いて両蛋白の検出を行った。

3. 動物実験

雄8週齢のICRマウスを用いて、0.1% chlorhexidine gluconate (CG) 200 μl を週3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製した。これらを3群に分け、CG投与3日前に各siRNA 50 $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}/\text{body}$ (PBS, HSP 47 siRNA, GFP siRNA)とCGMs 1 mg/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。

* Suppression of peritoneal fibrosis by HSP 47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres

key words: HSP 47, siRNA, CGMs

*¹ 長崎大学医学部第2内科 OBATA Yoko, et al [〒852-8501 長崎市坂本1-7-1]

*² 同 感染防御 *³ 同 腎疾患治療部 *⁴ 同 総合診療部 *⁵ 同 第3解剖 *⁶ 京都大学再生医科学研究所生体材料分野

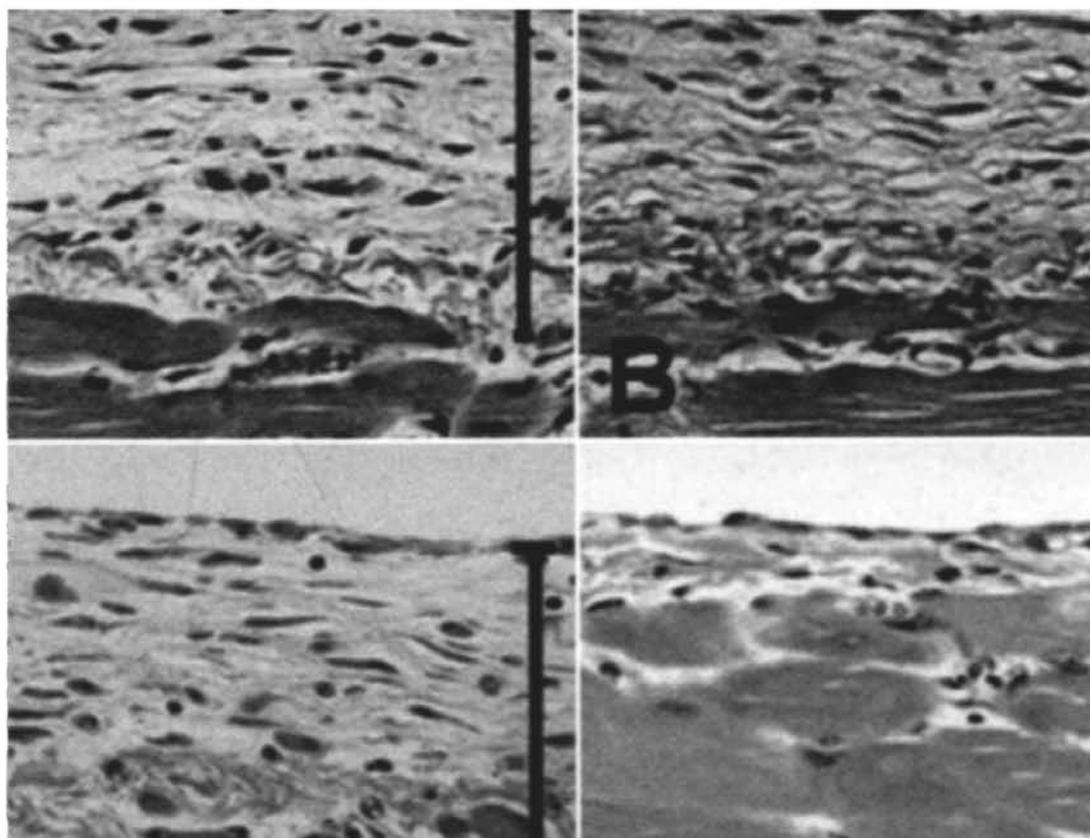


図 1 腹膜組織の HE 染色 (×200)

CG 投与開始後 21 日目の CG のみ投与した群 (A), PBS-CGMs 投与群 (B), GFP siRNA-CGMs 投与群 (C), HSP 47 siRNA-CGMs 投与群 (D)

4. 組織染色

腹膜組織の形態学的変化は HE 染色を用いて評価し, HSP 47, type III collagen, α -SMA, F 4/80, TGF- β の免疫組織染色を行った。

5. 統計

HE 染色と type III collagen の免疫組織染色の結果は, 中皮下腹膜肥厚組織および陽性領域の面積測定により評価した。HSP 47, α -SMA, F 4/80, TGF- β の免疫組織染色の結果は, 400 倍 1 視野中の陽性細胞数を計測し評価した。数値は平均値標準偏差で示し, 群間の比較は A-NOVA および Bonferroni/Dunn test で行い, $p < 0.05$ を有意とした。

II. 結果

1) *In vitro* における siRNA による HSP 47 発現抑制効果の検討

HSP 47 siRNA を導入した細胞では, HSP 47 蛋白の発現はコントロール群 (PBS, GFP siRNA) に比べて 50%程度減少していた。

2) 組織学的評価

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, HE 染色にて腹膜の肥厚・線維化を認めた。一方, HSP 47 siRNA-CGMs 投与群では腹膜の肥厚・線維化は著明に抑制されていた (図 1)。

3) 免疫組織学的検討

CG 投与開始後 21 日目の PBS-CGMs, GFP siRNA-CGMs 投与群では, HSP 47 陽性細胞数の増加を認め, それに伴う type III collagen の発現増強を認めた。また, α -SMA, F 4/80, TGF- β 陽性細胞数も増加していた。しかしながら, HSP 47 siRNA-CGMs を投与した群では, HSP 47 陽性細胞数, type III collagen の発現は有意に減少しており, α -SMA, F 4/80, TGF- β 陽性細胞数も減少していた (表)。

4) HSP 47 陽性細胞数の時間的变化

PBS-CGMs または HSP 47 siRNA のみを投与した群では, CG 投与に伴い HSP 47 の発現は, 14 日目以降, 時間経過とともに増加したが, HSP 47 siRNA と

表 HSP 47, α -SMA, F 4/80, TGF- β 陽性細胞数の検討 (CG 投与 21 日目)

	PBS-CGMs	HSP 47 siRNA-CGMs	GFP siRNA-CGMs
HSP 47	137.5 \pm 37.0	28.4 \pm 15.4 ^a	144.6 \pm 27.7
α -SMA	84.9 \pm 12.9	27.4 \pm 9.6 ^a	94.8 \pm 9.0
F 4/80	55.2 \pm 14.1	14.3 \pm 7.9 ^a	68.8 \pm 17.8
TGF- β	178.1 \pm 32.1	39.4 \pm 15.2 ^a	166.0 \pm 38.8

Data are mean \pm SD. ^ap < 0.001 versus CGMs with PBS and CGMs with GFP siRNA

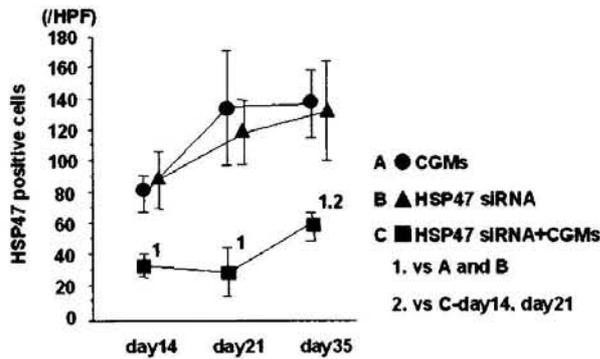


図 2 CGMs による siRNA 徐放効果の検討

CGMs を一緒に投与した群では 21 日目までは HSP 47 の発現は有意に抑制されていた (図 2)。

III. 考察

今回、線維化において重要な役割を果たしている HSP 47 を、siRNA を用いてその発現を抑制することで、著明な腹膜肥厚の抑制がみられたことは、HSP 47 siRNA は腹膜線維化を予防する新しい方法として期待される。また、HSP 47 の発現を抑制することにより、腹膜肥厚およびコラーゲン蓄積を抑制するだけでなく、 α -SMA, F 4/80, TGF- β 陽性細胞数の減少も認められた。これは、コラーゲンを主とした細胞外基質の増生自体が、MCP-1 や TGF- β などのいろいろなサイトカインや成長因子の発現を増加させることが報告されており^{6,7)}、これらを介した機序によるものと考えられた。

さらに、siRNA と組み合わせて使用した CGMs は、生体適合性の高いゼラチンから成るため、その安全性はすでに確立されている。また、ゼラチン分子間の架橋度を変えることにより、その内容物の徐放期間の調節が可能であることなどが利点としてあげられる⁸⁾。今回の検討においても、通常は 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

徐放投与することにより、その効果が 3 週間以上持続した。

今回、治療標的とした HSP 47 は、腹膜線維症だけでなくさまざまな線維化疾患との関連が示唆されており^{9,10)}、HSP 47 siRNA と CGMs を組み合わせた新しい遺伝子抑制方法は、“線維化”という臓器障害を起こす現象に対する治療的アプローチにも応用可能であると考えられるため、今後の更なる検討が望まれる。

文 献

- 1) Afthentopouls IE, Passadakis P, Oreopoulos DG: Sclerosing peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients: one center's experience and review of the literature. *Adv Ren Replace Ther* 5: 157-167, 1998
- 2) Gandhi VC, Humayun HM, Ing YS, et al: Sclerotic thickening of the peritoneal membrane in maintenance peritoneal dialysis patients. *Arch Intern Med* 140: 1201-1203, 1980
- 3) 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
- 4) 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
- 5) Mishima Y, Miyazaki M, Abe K, et al: Enhanced expression of heat shock protein 47 (HSP 47) in rat model of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* 23: 14-22, 2003
- 6) Marra F, Pastacaldi S, Romanelli RG, et al: Integrin-mediated stimulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression. *FEBS Lett* 414: 221-225, 1997
- 7) Garcia-Velasco JA, Seli E, Arici A: Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in human endometrial stromal cells by integrin-dependent cell adhesion. *Biol Reprod* 61: 548-552, 1999

- 8) Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, et al : Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. J Control Release 80 : 333-343, 2002
- 9) Masuda H, Fukumoto M, Hirayoshi K, et al : Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP 47 gene and the $\alpha 1$ (I) and $\alpha 1$ (III) collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. J Clin Invest 94 : 2481-2488, 1994
- 10) Iwashita T, Kadota J, Naito S, et al : Involvement of collagen-binding heat shock protein 47 and procollagen type I synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis : contribution of type II pneumocytes to fibrosis. Hum Pathol 31 : 1498-1505, 2000