

表題：Nanoparticles を担体とした siRNAs デリバリーシステムによる  
腹膜線維症治療の開発

論文の区分：博士課程

著者名：吉澤寛道

担当指導教員氏名：長田太助 教授

所属：自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系専攻 腎尿路疾患学分野 腎臓内科学

2015 年 1 月 9 日申請の学位論文

## 目次

1. 緒言	2
2. 材料と方法	3
3. 結果	7
1) siRNAs-NPs の特性と生体内での分布	
2) TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による腹膜組織 TGF- $\beta_1$ の発現抑制効果	
3) TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による腹膜線維症抑制効果	
4) TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による筋線維芽細胞増殖抑制効果とその発生由来	
5) TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による腹膜透析機能の保護効果	
4. 考察	16
5. 結論	17
6. 謝辞	18
7. 引用文献	18

## 1. 緒言

腹膜透析患者において腹膜線維症は限外濾過不全を伴う腹膜透析機能の低下を高率に伴い、腹膜透析を離脱する要因となる<sup>1 2 3</sup>。腹膜線維症は組織学的に腹膜中皮層への筋線維芽細胞の増殖とコラーゲンなど細胞外基質の過剰蓄積で特徴付けられる<sup>4 5</sup>。腹膜線維症を抑制する治療法は未だ確立されておらず、治療法の確立は腹膜透析患者の予後改善のために重要である。

遺伝子治療は従来インヒビターなどの小分子や中和抗体などでは様々な理由（例：リガンド結合部位の欠損や、分子構造に関する問題）から標的化が困難であった分子を標的化することを可能にするため有望な治療手段である。RNA干渉は配列特異的な遺伝子抑制のメカニズムであり<sup>6 7</sup>、この遺伝子抑制メカニズムは様々な研究領域における実験手法から多くの疾患に対して応用され、潜在的に強力な治療アプローチとして発展してきた<sup>8 9 10</sup>。RNA干渉は small interfering RNAs (siRNAs)の前駆体である short hairpin RNAs (shRNAs)をウイルスベクター内に発現したものや、人工合成した siRNAs を直接細胞質内へ導入することによって効果を発揮する<sup>11</sup>。標的遺伝子の抑制に siRNAs を使用することはウイルス感染という治療法そのものに付随した安全性の問題がないために有望な治療オプションと考えられる。また siRNAs は内在性の RNA 干渉経路の後期に入ると、内在性の microRNAs 機構による遺伝子発現調節と比べて干渉の程度が弱いと考えられている<sup>11</sup>。

しかし、siRNAs はその薬剤としての有望性があるにもかかわらず、臨床応用への適応を阻む最大の障壁はそのデリバリーシステムにある。siRNAs は生体内へ投与されると腎臓から急速に排泄され、また血清中の RNAase によって分解されてしまうため、作用時間が短縮してしまう<sup>8 12</sup>。それに加えて、siRNAs は通常、トランスフェクション試薬のような適切な遺伝子キャリアーがなければ細胞膜を通過して細胞質内へ到達する効率が非常に低いと言われている<sup>13 14</sup>。そのため腹膜組織への siRNAs のデリバリーシステムを確立することが siRNAs を腹膜線維症治療へ応用するために必要で、また腹膜透析患者にとって有望な治療手段になると考えられる。本研究では非ウイルス性の生体脂質二重膜と同様な構成成分である liposome からなる nanoparticles (NPs)に siRNAs を内包化し、腹膜組織へ siRNAs を導入する遺伝子デリバリーシステムの開発を試みた。siRNAs で抑制する標的遺伝子として腹膜線維化で中心的な役割を担っている Transforming growth factor (TGF)- $\beta_1$  をターゲットとした。TGF- $\beta_1$ -siRNAs を NPs (liposome)に内包化し(TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs)<sup>15 16</sup>、腹膜線維症モデルにおける TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs の腹膜線維症抑制効果を検討した。

## 2. 材料と方法

本実験は自治医科大学実験医学センター運営委員会で承認され、自治医科大学動物実験指針に従った。

### 腹膜線維症マウス(peritoneal fibrosis mice ;PF)の作成

C57BL/6 マウス(10 週齢, 雄 ; 20-25g)を CLEA Japan, Inc (Tokyo, Japan)より購入し、温度と湿度の調節された室内で 12 時間の明暗周期で飼育を行った。腹膜線維症マウスは 40 mM に濃度調節した methylglyoxal (MGO)溶液(Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, MO, USA)を含んだ腹膜透析液(PDF ; 100 mL/kg)を連日 2 週間、腹腔内へ注射を行うことで作成した<sup>17</sup>。腹膜透析液の組成は 2.5% glucose, 100 mM NaCl, 35 mM sodium lactate, 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.7 mM MgCl<sub>2</sub> (Midperic®; Terumo, Tokyo, Japan)であった。

### siRNAs

TGF- $\beta_1$  を標的とした siRNAs (TGF- $\beta_1$ -siRNAs)及び標的分子を持たない(non-target) siRNAs (Control siRNAs)は Sigma-Aldrich Japan (Ishikari, Japan)より購入した。TGF- $\beta_1$ -siRNAs の塩基配列は 5'-GCAACAACGCCAUCUAUGATT-3' (sense strand) および 5'-UCAUAGAUGGCGUUGUUGCTT-3' (antisense strand)である。以下の siRNAs: Mission\_SIC\_001s (sense strand)および Mission\_SIC\_001as (antisense strand) (塩基配列は非公表)を Control siRNAs として使用した。

### Nanoparticles (NPs)内包化 siRNAs の作成

NPs (liposome) は phosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylethanolamine, cholesterol から構成され、凍結乾燥されたものを Hokkaido System Science Co., Ltd. (Sapporo, Japan)より購入した。siRNAs は DNase/RNase free 精製水(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)で希釈し、50  $\mu$ M に濃度調節した。次に 500 nmol の凍結乾燥 NPs を 100  $\mu$ L の siRNAs 水溶液で再水和を行った。Hokkaido System Science Co., Ltd. において測定した siRNAs-NPs のサイズは 100-200 nm であった。100  $\mu$ L の siRNAs-NPs は 100 mL/kgの腹膜透析液で希釈し、週 3 回 2 週間、腹膜線維症マウスへ腹腔内投与を行った。

### 腹膜線維症マウス腹膜への siRNAs-NPs 導入

腹膜組織における siRNAs の導入効率を調べるために 100  $\mu$ L の Cy3 標識 siRNAs (5 nmol) (Mirus Bio, Madison, WI, USA)に 500 nmol の NPs を加え、腹膜透析液(100 mL/kg)で希釈し Wild type マウスへ腹腔内注射を行った。注射 1 時間後

に腹膜および肝臓、腎臓を摘出し、4%paraformaldehyde (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, 25 mM CaCl<sub>2</sub>)で固定を行った。固定化した組織は Tissue-Tek<sup>®</sup> optimal cutting temperature (OCT) compound に包埋し、液体窒素で凍結保存した。次に Cryostat を用いて凍結ブロックを薄切し、作成した 7-8 μm の切片をシランコートガラススライド(Matsunami, Osaka, Japan)に貼付し、室温で乾燥を行った。切片はリン酸緩衝液(PBS)で2回洗浄後、核染色を行うために 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を含有した VECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)を滴下してカバーガラスで封入処理を行った。次に蛍光顕微鏡(BH2-RFL-T3 and BX50; Olympus, Tokyo, Japan)を用いて蛍光部位を観察撮影し Adobe Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA)を使用して画像処理を行った。

腹膜線維症マウスにおける TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs-NPs の治療効果を検討するために 100 μL の TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs (5 nmol)に 500 nmol の NPs を加えた TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs-NPs を腹膜透析液(100 mL/kg)で希釈し、MGO 投与の前日から 1 日置きに週 3 回 2 週間腹腔内投与を行った(PF+TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs-NPs)。次の各群を比較対照群とした。: 未処置のマウス(Mock)、NPs および siRNAs 投与をしない腹膜線維症マウス(PF)、NPs 内包化 Control-siRNAs を TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs-NPs と同じ方法で投与した腹膜線維症マウス(PF+Control-siRNAs-NPs)、100 μL の TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs (5 nmol)のみを腹膜透析液(100 mL/kg)で希釈し、腹腔内投与した腹膜線維症マウス(PF+TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs)。全ての群のマウスを 14 日後、腹膜平衡試験(PET;下記に詳細記載)を施行後に屠殺した。腹膜組織は摘出後、-80℃で凍結保存を行った。

#### 腹膜平衡試験 (Peritoneal Equilibration Test ;PET)

PET の詳細については過去に報告されている方法に従って実施した<sup>17</sup>。5 ml の 2.5 %ブドウ糖濃度の標準腹膜透析液(Midperic<sup>®</sup>; Terumo)を腹腔内へ投与し、1 時間後に腹腔内にある透析液を回収し、排液量と排液中クレアチニン濃度(D-Cr)を測定した。また同時に下大静脈より採血し、血清中クレアチニン濃度(P-Cr)を測定した。その後、血清中クレアチニン濃度に対する腹膜透析液排液中クレアチニン濃度の比(D/P-Cr)を計算し溶質透過性を評価した。

#### Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

siRNAs の NPs 内包化を検討するために 500 nmol の凍結乾燥 NPs に 100 μL の siRNAs (50 μM)を加えたもの 1 μL を 4 μL の DNase/RNase-free 精製水で希釈したもの(siRNAs-NPs)、500 nmol の凍結乾燥 NPs に 100 μL の siRNAs (50 μM)を加えたもの 1 μL を 4 μL の 5%deoxycholate (DOC) (Sigma-Aldrich)で処置したもの(siRNAs-NPs+5%DOC)、1 μL の siRNAs (50 μM)を 4 μL の DNase/RNase-free 精製

水で希釈したもの(siRNAs alone)をそれぞれポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。

#### Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR):

##### 定量的逆転写 PCR

腹膜組織の切片をガラスホモジナイザーとフィルターカラム破砕機(QIA Shredder; Qiagen, Valencia, CA, USA)を使用して粉碎した。次に腹膜組織中の total RNA を RNeasy Total RNA Isolation kit (Qiagen)を使用して抽出した。全量 100 ng の抽出 RNA を Superscript III First-strand Synthesis system (Life Technologies)を使用して逆転写反応を製造元の説明書に従って行い cDNA を合成した。Real-time PCR は SYBR Green ER qPCR Supermix (Life Technologies)を使用して行った。全ての PCR 反応は 20  $\mu$ L の反応容量で二重に重複させ行った。95°C で 10 秒間熱変性させた後、Real-time qRT-PCR は 熱サイクル(熱変性：95°C-15 秒間、アニーリングと伸長反応：60°C-60 秒間) を 40 サイクル繰り返すことで行った。プライマーはマウスの GAPDH,  $\alpha$ -SMA, collagen1A2, FN1, FSP1, IFN- $\beta$ , STAT1, OAS1 をタカラバイオ Inc.から購入した。標的遺伝子の発現量の定量化は Step One software (Life Technologies)を使用して行った。mRNA の発現量は GAPDH(内在性コントロール)を使用して補正を行った。

##### ELISA

マウス TGF- $\beta_1$  に特異的な ELISA キット(mouse TGF- $\beta_1$  ELISA; IBL, Hamburg, Germany)を使用し、製造元の説明書に従い行った。100  $\mu$ L の腹膜排液試料をマウス TGF- $\beta_1$  モノクローナル抗体がコートされたプレートへ滴下した。次にホースラディッシュ由来ペルオキシダーゼが標識された抗マウス TGF- $\beta_1$  抗体を加え 4 時間室温で静置した。洗浄後、発色は 100  $\mu$ L の基剤(テトラメチルベンジジン)を使用して行なった。反応は 1M のリン酸を加えることで中止し、吸光度は 450 nm で測定した。

##### 組織学的検査

マウス個体に PBS を灌流後、腹膜組織を摘出し 4%paraformaldehyde で一晚固定化した。組織はパラフィンへ包埋した後、切片を作成し、線維化の程度を評価するため Azan 染色を行った。コラーゲン線維は Azan 染色では青色に染色される。腹膜組織の肥厚度を評価するため Azan 染色サンプルの腹膜中皮下層肥厚度(中皮層の下縁から筋層の上縁まで)を画像分析ソフト(Image Pro 5.1, Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA)を使用して 400 倍視野下に無作為に 10 ヶ所測定し、その平均値を 1 サンプル分の腹膜中皮下層肥厚度とした。各群内のマ

ウス腹膜中皮下層肥厚度の平均値を計算し、その群における腹膜中皮下層肥厚度とした。

### 蛍光免疫染色

腹膜における TGF- $\beta_1$  の発現を評価するために腹膜組織のパラフィン包埋切片を脱パラフィン化と再加水を行い、抗原賦活化を行うため 10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)に浸け、121°Cで 15 分間オートクレーブ処理を行った。その後、非特異的抗原を抑制するためにサンプルを PBS で希釈した 10%ヤギ血清に浸けブロッキング処理を行った。次に前処理を受けた腹膜組織の切片をウサギ由来抗マウス TGF- $\beta_1$  ポリクローナル抗体(Abcam, Cambridge, UK)を PBS で 100 倍に希釈した溶液に浸し、4°Cで一晩静置した。切片は PBS で洗浄後、Alexa fluor 488 標識抗ウサギ IgG モノクローナル抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA)を PBS で 100 倍希釈した溶液に浸し、2 時間室温で静置した。また腹膜における  $\alpha$ -SMA, cytokeratin, CD45, CD31 の発現を評価するために前処理を行った切片をそれぞれ Cy3 標識抗マウス  $\alpha$ -SMA モノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) (×400 倍希釈), ウサギ由来抗マウス cytokeratin ポリクローナル抗体 (Acris Antibodies, San Diego, CA, USA)(×50 倍希釈), ウサギ由来抗マウス CD45 ポリクローナル抗体(Abcam) (×400 倍希釈), ウサギ由来抗マウス CD31 ポリクローナル抗体(Abcam) (×50 倍希釈)を使用して TGF- $\beta_1$  と同様に染色を行った。

切片は PBS で 2 回洗浄後、核染色を行うために 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を含有した VECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)を滴下してカバーガラスで封入処理を行った。次に蛍光顕微鏡(BH2-RFL-T3 and BX50; Olympus, Tokyo, Japan)を用いて蛍光部位を観察撮影し Adobe Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA)を使用して画像処理を行った。陽性細胞数は画像分析ソフト(Image Pro 5.1, Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA)を使用して 400 倍視野下に無作為に 10 ヶ所をカウントし、その平均値を 1 サンプル分の陽性細胞数とした。各群内のマウスの陽性細胞数の平均値を計算し、その群における陽性細胞数とした。

### 生化学項目の測定

血清学的分析は臨床検査機関(SRL, Tokyo, Japan)で行った。

### 統計学的検査

データは mean  $\pm$  standard error (SE)で示した。グループ間の差を分析するために分散分析(ANOVA)を使用した。ANOVA で群間に統計学的な有意差が認められた場合、post hoc 分析として Tukey's test を行った。統計学的解析には SPSS v21

(IBM, Armonk, NY, USA) を使用した。P<0.05 を統計学的に有意なものとした。

### 3. 結果

#### 1) siRNAs-NPs の特性と生体内での分布

ポリアクリルアミドゲル電気泳導を用いて siRNAs の NPs への内包化の有無を検討すると siRNAs 単独(siRNAs alone)では 20 base pairs の位置にバンドが確認されたが、NPs を加えた siRNAs (siRNAs-NPs) は通常 siRNAs がバンドとして確認されるべき位置 (20 base pairs) に確認されなかった。それに対して siRNAs-NPs に界面活性剤である 5%deoxycholate (DOC)を加えて処置 (siRNAs-NPs-5%DOC) を行くと 20 base pairs の位置に再度バンドが確認された (図 1)。これらの結果から siRNAs の大部分が NPs に内包化されていることが示唆された。Cy3 標識 siRNAs で腹膜組織への siRNA 導入効率を検討した結果では NPs で内包化された Cy3 標識 siRNAs は腹膜組織中に強い蛍光発色を示した。しかし、NPs で内包化せず単独で投与された Cy3 標識 siRNAs は殆ど腹膜組織中に同定されなかった (図 2)。Cy3 標識 siRNAs の腹膜外臓器への移動を検討した結果では NPs で内包化された Cy3 標識 siRNAs を投与した例では肝臓や腎臓への Cy3 標識 siRNAs の移動は確認されなかった (図 3)。しかし、Cy3 標識 siRNAs を単独投与した場合には Cy3 標識 siRNAs の肝臓や腎臓への移動が確認された (図 3)。次に腹膜組織の siRNAs-NPs に対するインターフェロン (INF- $\beta$ , STAT1, OAS1) 応答を qRT-PCR で定量評価した。腹膜線維症マウス(PF)において siRNAs-NPs 投与によるインターフェロン応答は認められなかった(図 4)。

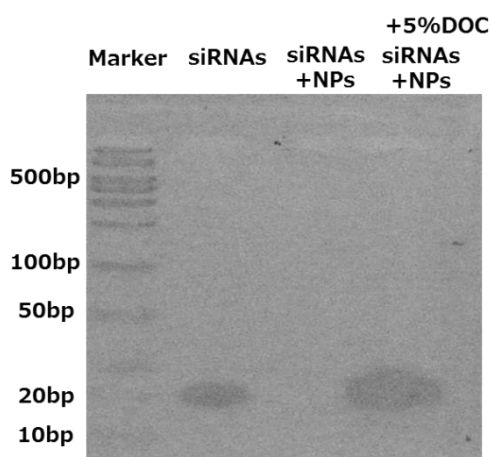
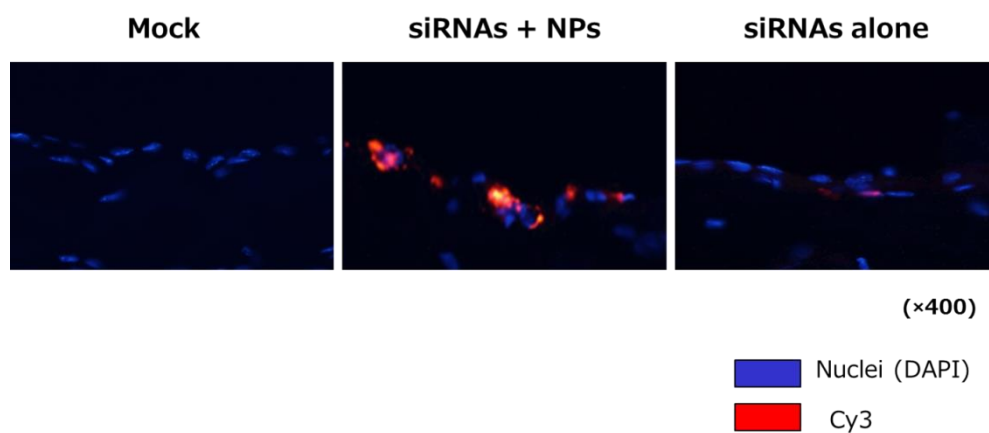


図 1 : NPs による siRNAs の内包効率

siRNAs 単独, siRNAs+NPs, siRNAs+NPs+ 5%DOC それぞれに対する

ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。5%DOC: 5%deoxycholate, bp: base pair

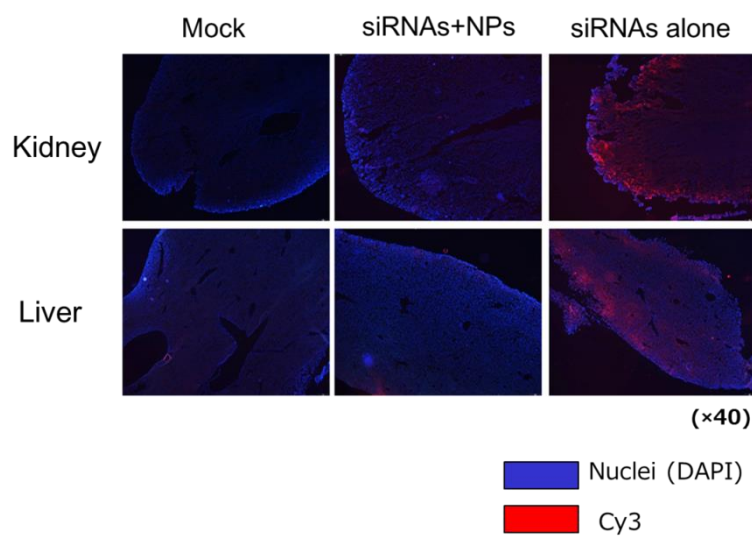




**図 2 : Cy3 標識 siRNA の腹膜組織への分布**

Cy3 標識 siRNAs を野生マウスに腹腔内投与し、siRNAs の腹膜組織への導入効率を評価した。

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole



**図 3 : Cy3 標識 siRNA の腎臓・肝臓への分布**

Cy3 標識 siRNAs を野生マウスに腹腔内投与し、siRNAs の腎臓と肝臓への移動を評価した。

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

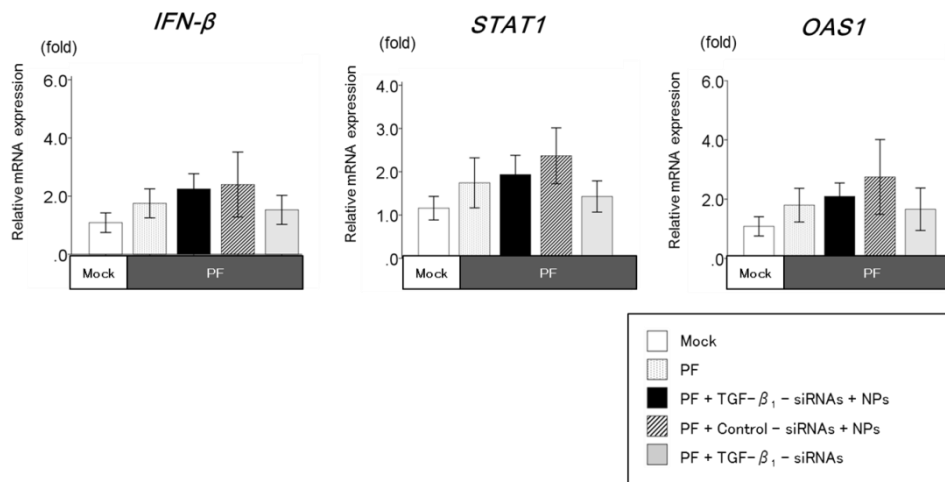


図4：腹膜組織における siRNAs-NPs に対するインターフェロン応答

各群の腹膜組織における IFN-β, STAT1, OAS1 の mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて評価した。

各群 N=6, 値は平均値±標準誤差(誤差範囲)

PF: peritoneal fibrosis, IFN-β: interferon-β, OAS1: 5' -oligoadenylate synthase

## 2) TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs-NPs による腹膜組織 TGF-β<sub>1</sub> の発現抑制効果

蛍光免疫染色による腹膜の TGF-β<sub>1</sub> の発現評価で、腹膜線維症マウスで Mock マウスに比べて腹膜で有意な TGF-β<sub>1</sub> の発現上昇が認められた(図 5)。この発現上昇は TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、Control-siRNAs-NPs 投与および TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs 単独投与では抑制されなかった(図 5)。また ELISA 法による腹膜排液中の TGF-β<sub>1</sub> 濃度の評価では腹膜線維症マウスにおいて Mock マウスに比べて有意な TGF-β<sub>1</sub> 濃度上昇を認めた(図 6)。この腹膜排液中 TGF-β<sub>1</sub> 濃度上昇は TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、Control-siRNAs-NPs 投与および TGF-β<sub>1</sub>-siRNAs 単独投与では抑制されなかった(図 6)。



### 3) TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による腹膜線維症抑制効果

腹膜組織線維化と肥厚の Azan 染色による定量評価では、腹膜線維症マウスで Mock マウスに比べて有意な腹膜線維化と腹膜中皮下層の肥厚が認められた(図 7)。この腹膜線維化は TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、Control-siRNAs-NPs 投与および TGF- $\beta_1$ -siRNAs 単独投与では抑制されなかった(図 7)。また腹膜組織における線維化関連マーカー( $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), collagen1A, fibronectin1 (FN1), fibroblast-specific protein (FSP1)) の発現量の qRT-PCR による検討では腹膜線維症マウスにおいて Mock マウスに比べて有意に  $\alpha$ -SMA と collagen1A2 の発現上昇が認められた(図 8)。これらの発現上昇は TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、Control-siRNAs-NPs 投与および TGF- $\beta_1$ -siRNAs 単独投与では抑制されなかった(図 8)。FN1 と FSP1 も  $\alpha$ -SMA や collagen1A2 と同様な傾向を認めたが統計学的に有意差は得られなかった。上皮系マーカー(E-cadherin と occludin)の各群での発現変化については、同じグループ内の個体間でも発現量の誤差が大きかったため有意な結果が得られなかった(データ省略)。

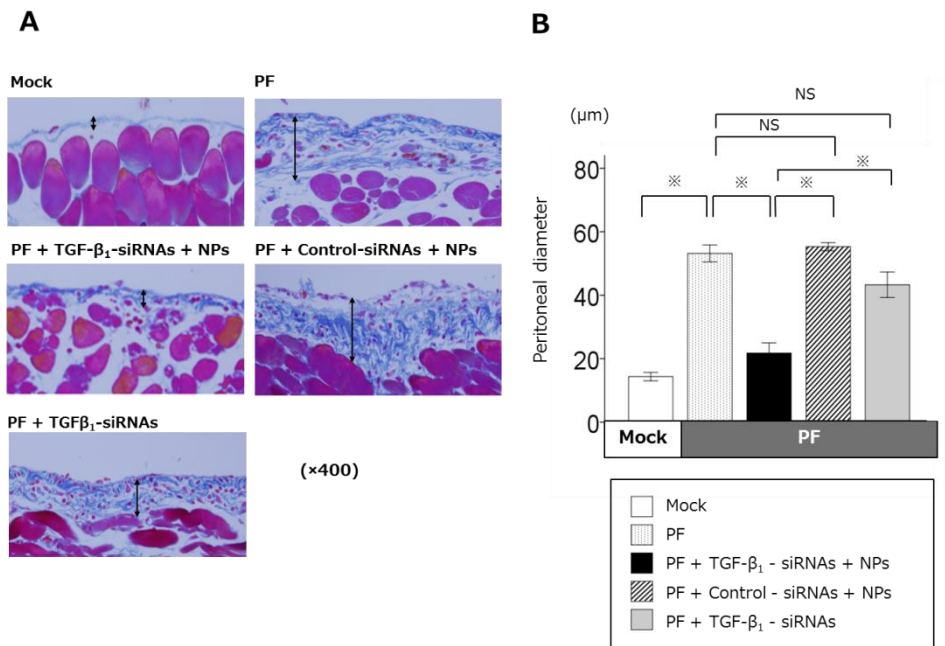


図 7 : TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による腹膜線維症抑制効果

A ; 各群における Azan 染色の典型的な腹膜組織像( $\times 400$  倍) B ; 腹膜中皮下層肥厚度( $\mu\text{m}$ )

各群 N=6, 値は平均値 $\pm$ 標準誤差(誤差範囲), \*:  $P < 0.05$ , NS: not significant, PF: peritoneal fibrosis

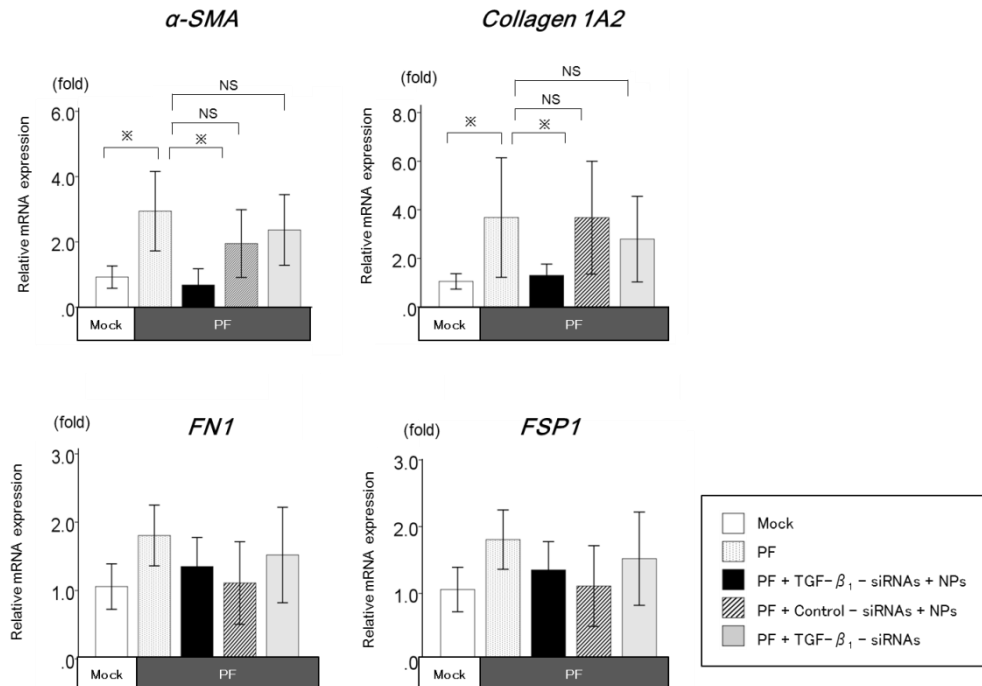


図 8 : TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による線維化関連マーカーの発現抑制効果

各群の腹膜組織における  $\alpha$ -SMA, collagen1A2, FN1, FSP1 の mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて評価した。

各群 N=6, 値は平均値±標準誤差(誤差範囲), \*:  $P < 0.05$ , NS: not significant

PF: peritoneal fibrosis,  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -smooth muscle actin, FN1: fibronectin 1, FSP-1: fibroblast specific protein-1

#### 4) TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による筋線維芽細胞増殖抑制効果とその発生源由来

腹膜組織における筋線維芽細胞の増殖を筋線維芽細胞の表面マーカーである  $\alpha$ -SMA の蛍光免疫染色で定量評価したところ腹膜線維症マウスで Mock マウスに比べて有意に  $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞数が増加していた。この  $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞数は TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs の投与によって有意に抑制されたが、Control-siRNAs-NPs 投与および TGF- $\beta_1$ -siRNAs 単独投与では抑制されなかった(図 9)。次に  $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞の由来と特性を調べるために  $\alpha$ -SMA と腹膜中皮細胞マーカー(cytokeratin), 骨髄由来細胞マーカー(CD45), 血管内皮細胞マーカー(CD31)の蛍光二重免疫染色を実施した。cytokeratin と  $\alpha$ -SMA の二重陽性細胞(図 10A, 10C), CD45 と  $\alpha$ -SMA の二重陽性細胞(図 10B, 10D),  $\alpha$ -SMA 単独陽性細胞(図 10E)が腹膜線維症マウスで Mock マウスに比べて有意に増加していた。cytokeratin と  $\alpha$ -SMA の二重陽性細胞および CD45 と  $\alpha$ -SMA の二重陽性細胞の細胞数増加は TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、 $\alpha$ -SMA 単独陽性細胞は TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs 投与では有意に抑制されなかった(図 10A-E)。Control-siRNAs-NPs 投与および TGF- $\beta_1$ -siRNAs 単独投与ではこれら全ての二重

陽性細胞や  $\alpha$ -SMA 単独陽性細胞の増殖は抑制されなかった (図 10A-E)。CD31 と  $\alpha$ -SMA の二重陽性細胞は全ての群で腹膜組織中に同定されなかった(データ省略)。

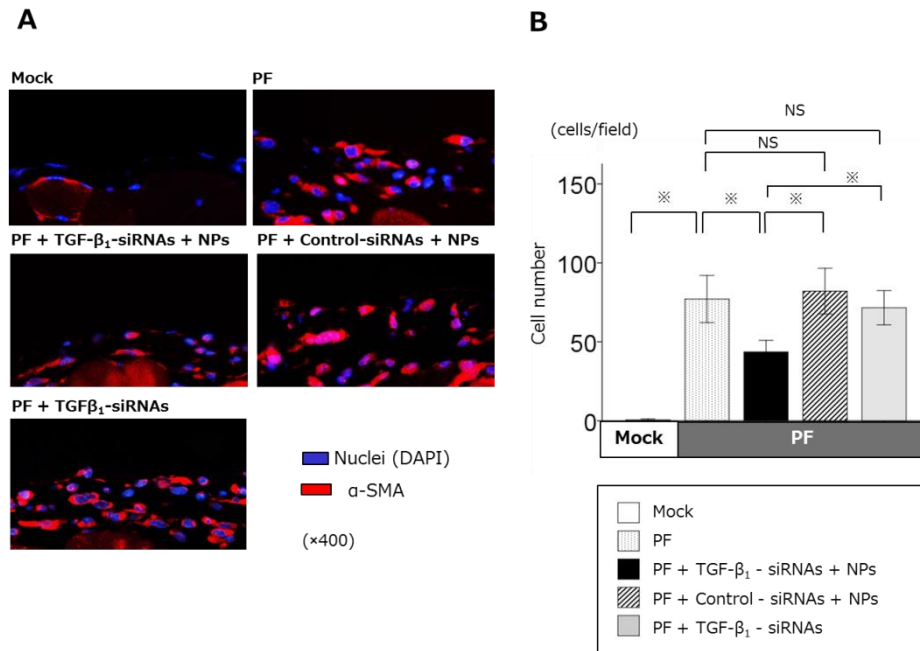


図 9 : TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による腹膜組織中  $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞の増殖抑制効果

A; 各群における  $\alpha$ -SMA 蛍光免疫染色の典型的な腹膜組織像( $\times 400$  倍)

B; 一視野当りの腹膜組織中  $\alpha$ -SMA 陽性細胞数(cells/field)

各群 N=6, 値は平均値 $\pm$ 標準誤差(誤差範囲), \*: P<0.05, NS: not significant

PF: peritoneal fibrosis, DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole, TGF- $\beta_1$ :Transforming growth factor- $\beta_1$

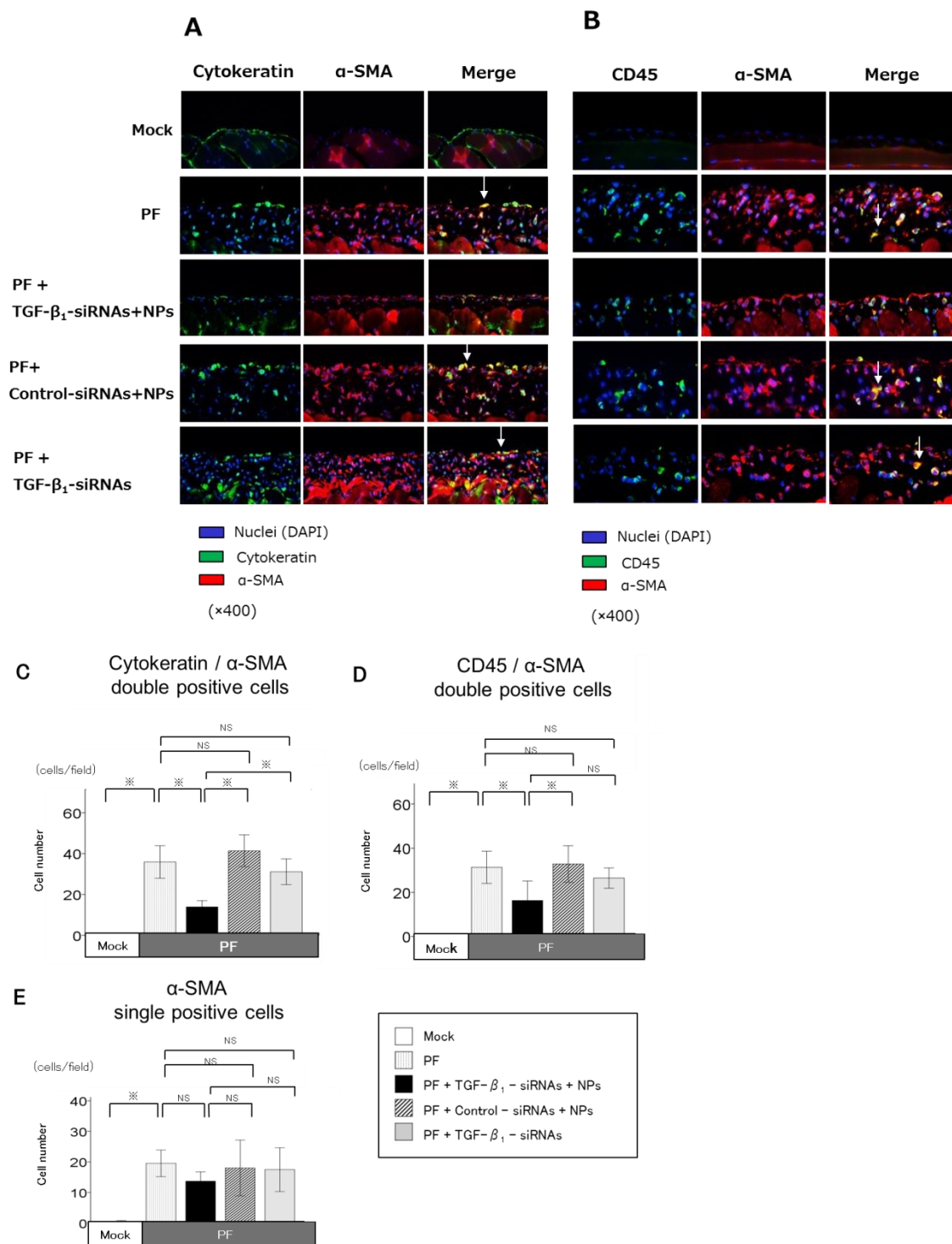


図 10 : TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による腹膜中皮細胞由来と骨髓細胞由来の筋線維芽細胞の増殖抑制効果

A; 各群における  $\alpha$ -SMA/cytokeratin 蛍光二重免疫染色の典型的な腹膜組織像(×400 倍) (二重陽性細胞；黄色)

B; 各群における  $\alpha$ -SMA/CD45 蛍光二重免疫染色の典型的な腹膜組織像(×400 倍) (二重陽性細胞；黄色)

C; 一視野当りの  $\alpha$ -SMA/cytokeratin 二重陽性細胞数(cells/field)

D; 一視野当りの  $\alpha$ -SMA/CD45 二重陽性細胞数(cells/field)

E; 一視野当りの  $\alpha$ -SMA 単独陽性細胞数(cells/field)

各群 N=4, 値は平均値 $\pm$ 標準誤差(誤差範囲), \*: P<0.05, NS: not significant

PF: peritoneal fibrosis, DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole,  $\alpha$ -SMA: $\alpha$ -smooth muscle actin

## 5) TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による腹膜透析機能の保護効果

腹膜平衡試験(PET)の結果では腹膜線維症マウスにおいて Mock マウスに比べて有意な腹膜透析液排水量の減少と D/P-Cr の上昇(溶質透過性亢進)を認め、腹膜透析機能の低下が確認された(図 11)。これらの腹膜透析機能の低下は TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制された(図 11)。Control-siRNAs-NPs 投与では D/P-Cr の上昇は抑制されたが、腹膜透析液排水量の減少は抑制されなかった。TGF- $\beta_1$ -siRNAs 単独投与では腹膜透析液排水量の減少も D/P-Cr 上昇も抑制されなかった。

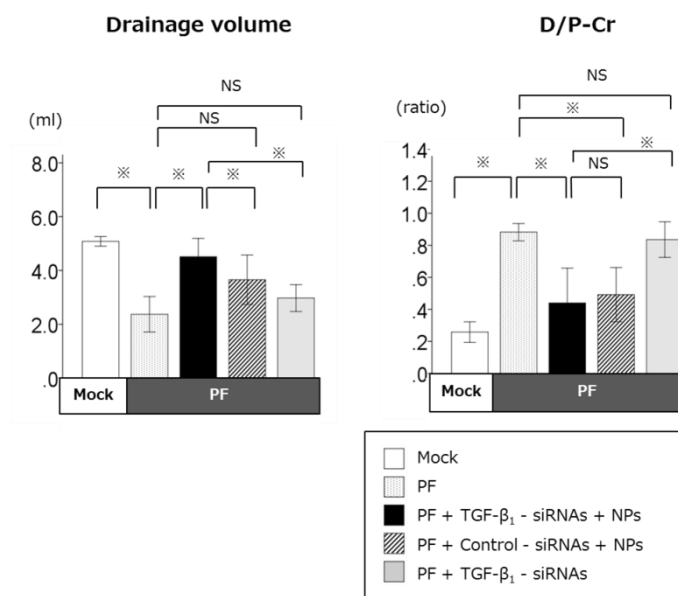


図 11 : TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs による腹膜透析機能保護効果

各群における腹膜透析機能を腹膜平衡試験(PET ; peritoneal equilibrium test)で評価した。

評価項目 ; 腹膜透析液排水量 : 初期の腹膜透析液注入量(5ml)+除水量

D/P-Cr : 血清中(P)のクレアチニン濃度に対する腹膜透析液排水中(D)のクレアチニン濃度(Cr)の比で溶質透過性の指標。

各群 N=6, 値は平均値 $\pm$ 標準誤差(誤差範囲), \*: P<0.05, NS: not significant

PF : peritoneal fibrosis, Drainage volume : 腹膜透析液排水量



#### 4. 考察

実験結果から siRNAs は NPs に内包化することにより腹膜組織へ選択的に導入され、また TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs によって腹膜線維化が抑制されることが示された。これらの結果、NPs による siRNAs デリバリーシステムは腹膜線維症に対して有望な治療手段になりうることが示唆された。

腹膜透析患者にとって腹膜線維症は確立された治療法のない難治性の合併症である<sup>1 2 3</sup>。遺伝子治療は腹膜線維症に対して有望な治療手段になると考えられている<sup>18</sup>。実際、過去の動物モデルを用いた研究では腹膜線維症に対して遺伝子治療が有効であったという報告がなされている。例えばウイルスベクター(例：アデノウイルス、レンチウイルス)で治療用遺伝子を腹膜組織へ導入し腹膜線維化抑制に効果的であったという研究がこれまで報告されている<sup>19 20</sup>。しかし、臨床応用を考えるとウイルスベクターを用いた遺伝子治療では治療用遺伝子が患者遺伝子に組み込まれ、遺伝子改変を引き起こすことによる悪性腫瘍発病や、患者に強い免疫応答を引き起こす可能性があるなどの問題点もある<sup>18</sup>。このため非ウイルスベクターによる腹膜線維化治療も近年開発が進められている<sup>21 22</sup>。ラット腹膜線維症モデルにおいて Heat shock protein (HSP)47 に対する antisenseoligo の腹腔内投与による腹膜線維化抑制<sup>21</sup>や超音波マイクロバブルシステムを用いたプラスミド DNA の腹膜組織内導入による腹膜線維化抑制などが報告されている<sup>22</sup>。生体脂質二重膜と同様の構成成分である liposome からなる NPs は治療遺伝子を内包することで生体内における高い生体適合性、化学的安定性、遺伝子導入効率を持つと報告されているが<sup>23 24</sup>、腹膜線維症においてはこれまで報告されていなかった。本研究では liposome (NPs)に siRNAs を内包化し、腹膜透析液に混注する簡便な方法により腹膜組織へ siRNAs を導入する遺伝子デリバリーシステムを開発した。またこのシステムを用いて腹膜線維症モデルで腹膜での標的遺伝子(TGF- $\beta_1$ )発現を有意に抑制し、腹膜線維化抑制が可能であった。これらの結果から TGF- $\beta_1$ -siRNAs 遺伝子デリバリーシステムは腹膜線維症抑制に有望な治療手段となることが示唆された。

腹腔内投与された siRNAs の腹膜組織以外の臓器への分布の検討では siRNAs 単独投与では肝臓、腎臓に siRNAs が分布するのに対して、siRNAs-NPs では肝臓、腎臓に siRNAs 分布が認められなかった。この結果から、siRNAs を NPs に内包化し腹腔内投与するデリバリーシステムは腹膜組織特異的に siRNAs 導入が可能になると考えられた。また、siRNAs-NPs は腹膜線維症マウスにおいて腹膜組織のインターフェロン(IFN)応答を増悪させなかった。これまでの研究では NPs は生体内へ投与されると IFN 応答を増悪させることが報告されている<sup>25 26 27</sup>。この NPs による IFN 応答には NPs の投与経路、方法、投与量が大きく関与して

いると報告されている<sup>25 26 27</sup>。本研究で開発したデリバリーシステム(腹膜透析液に希釈した siRNAs-NPs の腹腔内投与)が腹膜に対する NPs の IFN 応答軽減に影響している可能性が示唆された。今後、siRNAs-NPs の投与方法・間隔と IFN 応答に与える長期的な影響を解明するため更なる検証が必要であると考えられた。

腹膜線維症は組織学的に腹膜中皮下層における筋線維芽細胞の増殖とコラーゲン型細胞外基質の過剰蓄積で特徴付けられる。近年、Lourerio らは腹膜組織中の筋線維芽細胞は腹膜中皮細胞(中皮間葉転換)、骨髄由来細胞、血管内皮細胞(血管内皮間葉転換)、腹膜在来の線維芽細胞など複数の発生源があることを報告した<sup>16</sup>。TGF- $\beta_1$  は中皮間葉転換や血管内皮間葉転換、骨髄由来線維芽細胞の分化において中心的な役割を担っている<sup>28 29 30</sup>。また Lourerio らは TGF- $\beta_1$  阻害蛋白を用いて TGF- $\beta_1$  シグナルを阻害することで腹膜中皮細胞、骨髄由来細胞、血管内皮細胞の由来と考えられる筋線維芽細胞の増殖が抑制され、腹膜線維化が抑制されたが、腹膜在来の線維芽細胞の増殖は抑制されなかったと報告した<sup>16</sup>。本研究においても TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs は cytokeratin や CD45 と  $\alpha$ -SMA の二重陽性の筋線維芽細胞の増殖を抑制したが、 $\alpha$ -SMA 単独陽性の筋線維芽細胞の増殖は抑制しなかった。この結果は Lourerio らの報告と合致しており、TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs は腹膜中皮細胞や骨髄由来線維芽細胞など種々の細胞における TGF- $\beta_1$  の発現上昇を抑制し、筋線維芽細胞への形質転換を抑制している可能性が示唆された。また  $\alpha$ -SMA 単独陽性の筋線維芽細胞の増殖が TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs によって抑制されなかったが、その理由について、TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs ではこれらの細胞群に TGF- $\beta_1$ -siRNAs が導入されなかった可能性、 $\alpha$ -SMA 単独陽性筋線維芽細胞が元来 TGF- $\beta_1$  発現抑制による細胞増殖抑制に抵抗性であった可能性など、様々な可能性に関して今後更なる検討が必要であると考えられた。

また、本研究の標的遺伝子である TGF- $\beta_1$  は線維化促進因子である以外に炎症性サイトカインとしての役割もあり、ラットを用いた動物実験では TGF- $\beta_1$  シグナル伝達系を抑制することで細菌性腹膜炎が増悪したという報告もされている<sup>31</sup>。そのため、TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs システムが腹膜炎などの副作用を引き起こす可能性があり、このシステムによる TGF- $\beta_1$  発現抑制が腹膜炎に及ぼす影響についても今後更に検討していかなければならないと考えられた。

## 5. 結論

TGF- $\beta_1$ -siRNAs-NPs デリバリーシステムは腹膜線維症マウスにおいて標的遺伝子(TGF- $\beta_1$ )の発現を抑制し、腹膜線維化を抑制した。このデリバリーシステムは腹膜透析患者における腹膜線維症の有望な治療手段となる可能性がある。

## 6. 謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、御指導を賜りました内科学講座腎臓内科学部門主任教授長田太助先生、前主任教授(現 JCHO うつのみや病院院長)草野英二先生には深く感謝致します。また、研究全般にわたり、終始丁寧に御指導を頂きました同教室講師森下義幸先生には深く感謝致します。また研究の推進に幾度となく有意義なアドバイスを頂きました同教室教授武藤重明先生、明治薬科大学病態生理学教室教授石橋賢一先生、三重大学大学院医学系研究科分子病態学教授島岡要先生に深く感謝致します。最後に終始支えて頂きました腎臓内科学教室の皆様のお蔭で無事本論文を書き終えることが出来ました。この場をお借りして深く感謝致します。

## (確認事項)

本研究の内容は主論文として 2014 年 4 月 30 日に **Gene therapy** 誌に投稿し、同年 11 月 11 日に同誌に受理された。本論文中使用した図は掲載雑誌(**Gene therapy**)の著作権元である **Nature Publishing Group** の許可を得た上で使用している。

## 7. 引用文献

1. Krediet, R. T.; Lindholm, B.; Rippe, B., Pathophysiology of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int* **2000**, *20 Suppl 4*, S22-42.
2. Gandhi, V. C.; Humayun, H. M.; Ing, T. S.; Daugirdas, J. T.; Jablokow, V. R.; Iwatsuki, S.; Geis, W. P.; Hano, J. E., Sclerotic thickening of the peritoneal membrane in maintenance peritoneal dialysis patients. *Arch Intern Med* **1980**, *140* (9), 1201-3.
3. Ronco, C.; Feriani, M.; Chiaramonte, S.; Brendolan, A.; Bragantini, L.; Conz, P.; Dell'Aquila, R.; Milan, M.; La Greca, G., Pathophysiology of ultrafiltration in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* **1990**, *10* (2), 119-26.
4. Devuyst, O.; Margetts, P. J.; Topley, N., The pathophysiology of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol* **2010**, *21* (7), 1077-85.
5. Margetts, P. J.; Bonniaud, P., Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* **2003**, *23* (6), 530-41.
6. Hannon, G. J., RNA interference. *Nature* **2002**, *418* (6894), 244-51.

7. Tijsterman, M.; Ketting, R. F.; Plasterk, R. H., The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* **2002**, *36*, 489-519.
8. Dykxhoorn, D. M.; Lieberman, J., The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med* **2005**, *56*, 401-23.
9. Sledz, C. A.; Williams, B. R., RNA interference in biology and disease. *Blood* **2005**, *106*(3), 787-94.
10. Leung, R. K.; Whittaker, P. A., RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* **2005**, *107*(2), 222-39.
11. de Fougères, A.; Vornlocher, H. P.; Maraganore, J.; Lieberman, J., Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6*(6), 443-53.
12. Soutschek, J.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Charisse, K.; Constien, R.; Donoghue, M.; Elbashir, S.; Geick, A.; Hadwiger, P.; Harborth, J.; John, M.; Kesavan, V.; Lavine, G.; Pandey, R. K.; Racie, T.; Rajeev, K. G.; Rohl, I.; Toudjarska, I.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Koteliansky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M.; Vornlocher, H. P., Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **2004**, *432*(7014), 173-8.
13. Palliser, D.; Chowdhury, D.; Wang, Q. Y.; Lee, S. J.; Bronson, R. T.; Knipe, D. M.; Lieberman, J., An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* **2006**, *439*(7072), 89-94.
14. Stewart, S. A.; Dykxhoorn, D. M.; Palliser, D.; Mizuno, H.; Yu, E. Y.; An, D. S.; Sabatini, D. M.; Chen, I. S.; Hahn, W. C.; Sharp, P. A.; Weinberg, R. A.; Novina, C. D., Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* **2003**, *9*(4), 493-501.
15. Yao, Q.; Pawlaczyk, K.; Ayala, E. R.; Styszynski, A.; Breborowicz, A.; Heimbürger, O.; Qian, J. Q.; Stenvinkel, P.; Lindholm, B.; Axelsson, J., The role of the TGF/Smad signaling pathway in peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis solutions.

*Nephron Exp Nephrol* **2008**, *109*(2), e71-8.

16. Loureiro, J.; Aguilera, A.; Selgas, R.; Sandoval, P.; Albar-Vizcaino, P.; Perez-Lozano, M. L.; Ruiz-Carpio, V.; Majano, P. L.; Lamas, S.; Rodriguez-Pascual, F.; Borrás-Cuesta, F.; Dotor, J.; Lopez-Cabrera, M., Blocking TGF-beta1 protects the peritoneal membrane from dialysate-induced damage. *J Am Soc Nephrol* **2011**, *22* (9), 1682-95.
17. Hirahara, I.; Kusano, E.; Yanagiba, S.; Miyata, Y.; Ando, Y.; Muto, S.; Asano, Y., Peritoneal injury by methylglyoxal in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* **2006**, *26* (3), 380-92.
18. Li, X. J.; Sun, L.; Xiao, L.; Liu, F. Y., Gene delivery in peritoneal dialysis related peritoneal fibrosis research. *Chin Med J (Engl)* **2012**, *125* (12), 2219-24.
19. Motomura, Y.; Kanbayashi, H.; Khan, W. I.; Deng, Y.; Blennerhassett, P. A.; Margetts, P. J.; Gauldie, J.; Egashira, K.; Collins, S. M., The gene transfer of soluble VEGF type I receptor (Flt-1) attenuates peritoneal fibrosis formation in mice but not soluble TGF-beta type II receptor gene transfer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2005**, *288* (1), G143-50.
20. Margetts, P. J.; Gyorffy, S.; Kolb, M.; Yu, L.; Hoff, C. M.; Holmes, C. J.; Gauldie, J., Antiangiogenic and antifibrotic gene therapy in a chronic infusion model of peritoneal dialysis in rats. *J Am Soc Nephrol* **2002**, *13* (3), 721-8.
21. Nishino, T.; Miyazaki, M.; Abe, K.; Furusu, A.; Mishima, Y.; Harada, T.; Ozono, Y.; Koji, T.; Kohno, S., Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 suppress peritoneal fibrosis in rats. *Kidney Int* **2003**, *64* (3), 887-96.
22. Guo, H.; Leung, J. C.; Chan, L. Y.; Tsang, A. W.; Lam, M. F.; Lan, H. Y.; Lai, K. N., Ultrasound-contrast agent mediated naked gene delivery in the peritoneal cavity of adult rat. *Gene Ther* **2007**, *14* (24), 1712-20.
23. Kikuchi, A.; Aoki, Y.; Sugaya, S.; Serikawa, T.; Takakuwa, K.; Tanaka, K.; Suzuki, N.; Kikuchi, H., Development of novel cationic liposomes for efficient gene transfer into peritoneal disseminated tumor. *Hum Gene Ther* **1999**, *10* (6), 947-55.

24. Sato, Y.; Murase, K.; Kato, J.; Kobune, M.; Sato, T.; Kawano, Y.; Takimoto, R.; Takada, K.; Miyanishi, K.; Matsunaga, T.; Takayama, T.; Niitsu, Y., Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat Biotechnol* **2008**, *26* (4), 431-42.
25. Wang, X.; Podila, R.; Shannahan, J. H.; Rao, A. M.; Brown, J. M., Intravenously delivered graphene nanosheets and multiwalled carbon nanotubes induce site-specific Th2 inflammatory responses via the IL-33/ST2 axis. *Int J Nanomedicine* **2013**, *8*, 1733-48.
26. Ban, M.; Langonne, I.; Huguet, N.; Guichard, Y.; Goutet, M., Iron oxide particles modulate the ovalbumin-induced Th2 immune response in mice. *Toxicol Lett* **2013**, *216* (1), 31-9.
27. Morishige, T.; Yoshioka, Y.; Inakura, H.; Tanabe, A.; Narimatsu, S.; Yao, X.; Monobe, Y.; Imazawa, T.; Tsunoda, S.; Tsutsumi, Y.; Mukai, Y.; Okada, N.; Nakagawa, S., Suppression of nanosilica particle-induced inflammation by surface modification of the particles. *Arch Toxicol* **2012**, *86* (8), 1297-307.
28. Li, J.; Qu, X.; Bertram, J. F., Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol* **2009**, *175* (4), 1380-8.
29. Bellini, A.; Mattoli, S., The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest* **2007**, *87* (9), 858-70.
30. Desmouliere, A.; Geinoz, A.; Gabbiani, F.; Gabbiani, G., Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* **1993**, *122* (1), 103-11.
31. Wang, X.; Nie, J.; Jia, Z.; Feng, M.; Zheng, Z.; Chen, W.; Li, X.; Peng, W.; Zhang, S.; Sun, L.; Mao, H.; Lan, H. Y.; Yu, X., Impaired TGF-beta signalling enhances peritoneal inflammation induced by E. coli in rats. *Nephrol Dial Transplant* **2010**, *25* (2), 399-412.