

氏 名	吉 澤 寛 道
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 483 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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 審 査 委 員	(委員長) 教 授 八木澤 隆 (委 員) 教 授 柳 澤 健 准教授 興 水 崇 鏡

論文内容の要旨

1 研究目的

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。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。治療薬の開発で人工合成した small interfering RNAs (siRNAs)を用いた RNA 干渉を介した遺伝子治療は従来、阻害薬や中和抗体が作成困難のため標的化不可能であった分子を標的にできるため難治性疾患の治療法として有望視されている。しかし標的指向性を持たない siRNAs は生体内に単独で投与した際、RNAase による急激な分解や、腎臓による急速排泄などから標的細胞内へは殆ど到達しない。このため siRNAs による遺伝子治療の臨床応用を考える上で超えるべき最大の障壁は siRNAs の標的組織へのデリバリーシステムの開発である。過去に腹膜線維症の治療用遺伝子のキャリアーとしてウイルスベクターが報告されているが、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り、早期の臨床応用は困難である。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、腹膜透析液に混注し腹腔投与するという簡便な方法により siRNAs を腹膜組織へ導入する遺伝子デリバリーシステムの開発を試みた。

2 研究方法

C57BL/6 マウスに腹膜線維症誘発物質である methylglyoxal(MGO)を 40mM に濃度調節した腹膜透析液(PDF;100mL/kg)を連日 12 日間腹腔内注射することで腹膜線維症マウス(peritoneal fibrosis mice ;PF)を作成した。治療の標的分子として腹膜線維化において中心的な役割を担う TGF- β 1 を選択し、治療用遺伝子として TGF- β 1-siRNA を使用した。NPs(liposome)は phosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylethanolamine, cholesterol から構成され、500nmol の凍結乾燥 NPs を 100 μ L の TGF- β 1-siRNAs 水溶液(50 μ M)で再水和処理を行った。

次に 100 μ L の TGF- β 1-siRNAs-NPs は 100mL/kg の腹膜透析液(PDF)で希釈し、1 日おきに計 6 回、腹膜線維症マウスへ腹腔内投与を行った(PF+TGF- β 1-siRNAs-NPs)。比較対照は無処置マ

ウス(Mock)、未治療の腹膜線維症マウス(PF)、non-target の Control-siRNAs を NPs に内包化し治療を行った腹膜線維症マウス(PF+Control-siRNAs-NPs)、TGF- β 1-siRNAs 単独投与で治療した腹膜線維症マウス(PF+TGF- β 1-siRNAs)とした。第 12 日目に腹膜透析機能を評価後に腹膜を摘出し、凍結保存した。腹膜の線維化と肥厚は Azan 染色で定量評価し、腹膜の線維化関連マーカー(α -SMA, Coll1A2, FN1, FSP1) とインターフェロン(IFN)応答(IFN- β , STAT1, OAS1)の遺伝子発現については qRT-PCR で定量評価を行った。また標的分子である TGF- β 1 の発現変化については蛍光免疫染色と腹膜透析液排液中の TGF- β 1 濃度(ELISA)を用いて定量評価し、筋線維芽細胞の増殖変化とその発生由来に関しては筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA と Cytokeratin(腹膜中皮細胞由来), CD45(骨髄細胞由来), CD31(血管内皮細胞由来)との間でそれぞれ蛍光二重免疫染色を行い、定量評価を行った。

3 研究成果

標的分子の TGF- β 1 の発現を蛍光免疫染色で定量評価すると、腹膜線維症マウスで認めた有意な TGF- β 1 の発現上昇(Mock に比べ)は TGF- β 1-siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、Control-siRNAs-NPs 投与や TGF- β 1-siRNAs 単独投与では抑制されなかった。また腹膜透析液排液中の TGF- β 1 濃度も腹膜線維症マウスにおいて有意な濃度上昇(Mock に比べ)を認め、その濃度上昇は TGF- β 1-siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、Control-siRNAs-NPs 投与や TGF- β 1-siRNAs 単独投与では抑制されなかった。

腹膜の線維化と肥厚を Azan 染色で定量評価すると、腹膜線維症マウスで認めた有意な線維化と肥厚 (Mock に比べ)は TGF- β 1-siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、Control-siRNAs-NPs 投与や TGF- β 1-siRNAs 単独投与では抑制されなかった。線維化関連マーカー(α -SMA, collagen1A2, FN1,FSP1)の遺伝子発現変化(qRT-PCR)においても腹膜線維症マウスで認めた有意な α -SMA と collagen1A2 の発現上昇(Mock に比べ)は TGF- β 1-siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、Control-siRNAs-NPs 投与や TGF- β 1-siRNAs 単独投与では抑制されなかった。次に腹膜組織の siRNAs-NPs に対する IFN 応答(INF- β , STAT1, OAS1)を定量評価(qRT-PCR)すると腹膜線維症マウスにおいて siRNAs-NPs 投与による IFN 応答は認められなかった。

また筋線維芽細胞の増殖変化を蛍光免疫染色で定量評価すると腹膜線維症マウスで認めた有意な α -SMA 陽性筋線維芽細胞数の増加 (Mock に比べ)は TGF- β 1-siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、Control-siRNAs-NPs 投与や TGF- β 1-siRNAs 単独投与では抑制されなかった。

次に筋線維芽細胞の発生由来を調べるために α -SMA を腹膜中皮細胞マーカー(Cytokeratin)、骨髄細胞マーカー(CD45)、血管内皮細胞マーカー(CD31)との間でそれぞれ蛍光二重免疫染色を実施したが、Cytokeratin+ α -SMA 二重陽性細胞, CD45+ α -SMA 二重陽性細胞, α -SMA 単独陽性細胞の細胞数が全て腹膜線維症マウスで有意に増加(Mock に比べて)していた。Cytokeratin+ α -SMA 二重陽性細胞および CD45+ α -SMA 二重陽性細胞の細胞数増加は TGF- β 1-siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制されたが、 α -SMA 単独陽性細胞は TGF- β 1-siRNAs-NPs 投与では有意に抑制されなかった。Control-siRNAs-NPs 投与および TGF- β 1-siRNAs 単独投与ではこれらの二重陽性細胞や α -SMA 単独陽性細胞の増殖は全て抑制されなかった。CD31+ α -SMA 二重陽性細胞は全ての群で腹膜組織に同定されなかった。

腹膜平衡試験では腹膜線維症マウスにおいて有意な排液量減少と D/P-Cr の上昇(溶質透過性亢進)を認め、有意な腹膜透析機能の低下(Mock に比べて)が確認された。この腹膜透析機能の低下は TGF- β 1-siRNAs-NPs 投与によって有意に抑制された。Control-siRNAs-NPs 投与では D/P-Cr の上昇は有意に抑制されたが、排液量の減少は抑制されなかった。TGF- β 1-siRNAs 単独投与では排液量の減少も D/P-Cr の上昇も抑制されなかった。

4 考察

遺伝子治療は腹膜線維症に対して有望な治療手段になりうるが、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遺伝子改変による悪性腫瘍発症や強い免疫応答を惹起する可能性があるなど問題点もある。このため近年、腹膜線維症に対して非ウイルスベクターによる遺伝子治療の開発が進められてきた。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選択的に siRNAs を導入するシステムを開発した。このシステムを用いることで腹膜線維症マウスにおいて腹膜での標的遺伝子(TGF- β 1)発現を有意に抑制し、腹膜線維化の抑制が可能であった。これらの結果から siRNAs-NPs 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。

また、NPs は生体内へ投与されるとインターフェロン(IFN)応答を増悪させることが報告されているが、本研究では siRNAs-NPs は腹膜線維症マウスにおいて腹膜組織の IFN 応答を増悪させなかった。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おり、今後も siRNAs-NPs の投与方法・間隔が IFN 応答に与える長期的な影響を検証する必要がある。

腹膜線維化で重要な筋線維芽細胞は腹膜中皮細胞、骨髄由来細胞、血管内皮細胞、腹膜在来の線維芽細胞など複数の発生由来があると報告され、TGF- β 1 はそれらの細胞が筋線維芽細胞へ形質転換を果たす場面において重要な役割を持つ。本研究でも TGF- β 1-siRNAs-NPs は Cytokeratin(腹膜中皮細胞マーカー)や CD45(骨髄由来細胞マーカー)との二重陽性の筋線維芽細胞の増殖を有意に抑制したが、 α -SMA 単独陽性の筋線維芽細胞の増殖は抑制しなかった。この結果は過去の報告と合致しており、TGF- β 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- β 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。 α -SMA 単独陽性の筋線維芽細胞の増殖が TGF- β 1-siRNAs-NPs によって抑制されなかったことに関しては今後も更なる検討が必要である。

5 結論

TGF- β 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である TGF- β 1 の発現を抑制し、腹膜線維化を抑制した。この遺伝子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。

論文審査の結果の要旨

腹膜透析療法を継続する上での最大の障壁は腹膜線維症の合併による腹膜機能の低下である。本研究は small interfering RNAs (siRNAs)を用いた治療用遺伝子 (TGF- β 1-siRNAs) を腹膜組織へ導入する方法として liposome からなる nanoparticles(NPs)で siRNAs を内包化する遺伝子

デリバリーシステムを開発、検討し、同時に線維症の発現にかかわる TGF- β 1 遺伝子発現の抑制が線維症を予防できるか否かを検討したものである。

研究は C57BL/6 マウスを用いてなされている。はじめに NPs に内包化された siRNAs が腹膜透析液中から高率に腹膜組織中に移動することを確認し、このデリバリーシステムが遺伝子治療の有用な手段となりうることを立証している。

続いて、C57BL/6 無処置マウス(Mock)、methylglyoxal 腹腔内注射(12 日間)による腹膜線維症モデル(PF)、これに TGF- β 1-siRNAs-NPs、Control-siRNAs-NPs、TGF- β 1-siRNAs を腹腔内追加投与(1 日おきに計 6 回)するモデル群を作成し、腹膜組織内の TGF- β 1、その他の線維化関連マーカーの発現、腹膜の組織学的変化、筋線維芽細胞の動態、腹膜機能の変化を各群間で比較検討している。そして、TGF- β 1-siRNAs-NPs 群においては PF 群に認められた TGF- β 1、 α -SMA、collagen1A2 の発現上昇が抑制され、組織学的な定量評価でも線維化が抑制されていることを確認している。また α -SMA 陽性筋線維芽細胞数、Cytokeratin+ α -SMA 二重陽性細胞および CD45+ α -SMA 二重陽性細胞の細胞数増加の抑制も認めている。腹膜平衡試験においても PF 群にみられた排液量減少、D/P-Cr の上昇(溶質透過性亢進)が TGF- β 1-siRNAs-NPs 群で改善していることを確認している。一方、siRNAs-NPs 投与による腹膜組織の IFN 応答の増悪はみられていない。

これらの結果は TGF- β 1-siRNAs-NPs デリバリーシステムによって標的遺伝子(TGF- β 1)の発現が抑制され、腹膜線維化の抑制が可能であることを示したものであり、本方法が腹膜線維症抑制の有望な治療手段となる可能性を示唆するものと考えられる。今後、このデリバリーシステムをどのように発展、応用させてゆくかについてはさらなる検討を要するものの、研究内容は学位授与に相応しいものと審査委員は一致して判断した。

学位論文には一部の修正を要したが適確な修正がなされた。なお、研究結果は Gene Therapy 誌にも受理されている。

最終試験の結果の要旨

申請者は腹膜透析療法の現況や課題、とくに長期継続の支障となる腹膜線維症の病態と開発が期待されている治療を総説した後、本研究の意義について述べた。続いて siRNAs による遺伝子治療と siRNAs を内包化するデリバリーシステム開発の意義についても言及し、マウスを用いた本実験の方法、結果を簡潔にまとめた。デリバリーシステムの手法や内包化の TGF- β 1-siRNAs-NPs 群で確認された線維化抑制の成績を中心に質疑応答がなされたが返答は適切であり、また今後の研究の発展や課題についても十分に理解できていた。博士論文最終試験(試問)においても審査委員は一致して合格と判定した。