

平成10年度厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）総括研究報告書

慢性糸球体腎炎の遺伝子治療に関する研究

課題番号（H10-特別-016）

平成11年3月

主任研究者 横尾 隆
（東京慈恵会医科大学医学部内科学講座第2）

研究要旨

これまでの多くの研究により特定の遺伝子を糸球体に導入することによる糸球体腎炎治療の可能性は示唆され、糸球体に特異的かつ効果的に遺伝子を導入する方法の開発が進んでいるものの未だに多くの問題点を抱えている。そのひとつは糸球体腎炎の特徴としてその病期がそれぞれの糸球体でまちまちであることであり、炎症が進行した部位とほとんど正常に近い部位とが混在することが多く見られる。そこで炎症の部位及び時期に特異的に遺伝子を導入することが必要となる。今回我々は骨髓細胞をCSF-1等の単核球系に分化誘導しやすい環境下で培養することにより、炎症部位に発現する接着分子ICAM-1のリガンドを持った細胞をつくり、この細胞を担体とし炎症部位に特異的に遺伝子を導入する方法を開発した。マウス (DBA/2) の骨髓細胞を大腿骨、脛骨より採取し、I-929細胞上清含有培地にて7日間培養する。この培養の間に骨髓細胞は炎症部位に誘導される接着分子ICAM-1のリガンドであるCD11b及びCD18陽性率が $12.7 \pm 3.4\%$ から $99.1 \pm 0.9\%$ になることをflow cytometerにて確認した。subclone化したこれらの細胞(担体細胞)をfluorescent lipophilic probeにてラベルし、DBA/2マウスに尾静脈を介して戻した。そのうえで糸球体でのICAM-1の発現を高めるためlipopolysaccharide (LPS)の腹腔内投与をくりかえしたところ、投与開始後24時間で担体細胞が糸球体に集積しはじめ($0.73 \pm 0.10/\text{gcs}$)、投与終了した一週間後まで徐々に増え($1.47 \pm 0.19/\text{gcs}$)、その後消失した。一方生食を腹腔内投与されたコントロールマウスでは、担体細胞の集積はほとんどみられなかった($0.05 \pm 0.03/\text{gcs}$)。このLPSで制御される担体細胞の糸球体への集積は、4週、8週後にもみられた。更に免疫組織科学的解析によりこの担体細胞の糸球体への集積はICAM-1の発現レベルと相関していることが確認された。これらの事象を基にこの担体細胞にレポーター遺伝子を導入し、実際に遺伝子の運び屋として機能するか確認した。担体細胞にadeno virus vectorを用いhuman glucocerebrosidase (GC)遺伝子導入した後マウスに戻し、LPSまたは生食の腹腔内投与をくり返したところ、LPS投与群の単離糸球体の培養上清のGC活性は生食投与群の3.2倍であった。また担体細胞を導入したマウスの糸球体のみヒト特異的GC DNAがPCR法にて検出された。更にこのシステムの腎毒性についても検討したところ担体細胞の再注入はLPSの一週間投与を併用しても明らかな蛋白尿増加効果や血清中クレアチニン増加効果を認めなかった。以上より腎毒性の少ない炎症部位特異的な糸球体への遺伝子導入法が確立されたことが示された。

続いてこのシステムの今回糸球体腎炎に対する有用性について検討した。DBA/2Jマウスの骨髓から得た担体細胞にアデノウイルスを用いて抗炎症性サイトカインであるマウスInterleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra)遺伝子を導入した。ウエスタンブロット法を用いこれらのIL-1ra遺伝子導入担体細胞が効率良くIL-1raを発現していることを確認後、ラビットIgG及びcomplete Freund's adjuvantにて前感作したDBA/2Jマウスに尾静脈を介し戻した。コントロールとしてGC遺伝子を導入したmock transfectantを使用した。24時間後これらのマウスに抗基底膜抗体を投与し糸球体腎炎を励起させたところ、mock細胞を投与した群においては多量のアルブミン尿を認めたが、IL-1ra産生担体細胞を投与した群ではこれらのアルブミン尿は優位に抑制された。 $(220.8 \pm 76.8 \text{ mg/day in IL-1ra treated mice vs. } 1.34 \pm 0.10 \text{ mg/dl in mock treated mice at day 14})$ 。また血中クレアチニンレベルもIL-1ra遺伝子導入群ではコントロールと比較し有意に低値であった $(0.62 \pm 0.08 \text{ mg/dl in IL-1ra treated mice vs. } 1.34 \pm 0.10 \text{ mg/dl in mock treated mice})$ 。組織学検討でも抗GBM抗体投与14日目に半月体形成率がIL-1ra投与群に優位に低下していた。

蛍光色素にてラベルした担体細胞を用いた実験により、抗基底膜抗体投与3日目には担体細胞が有意に糸球体に集積していることが確認され、またこれらの糸球体を単離し培養したところIL-1ra産生担体細胞を投与した群の糸球体では培養上清中に多量のIL-1raが分泌されていることが確認された。一方両群の血清中にはIL-1raはウエスタンブロット法で検出できる範囲の誘導は見られなかった。これらの結果は、IL-1ra産生担体細胞の投与による抗GBM抗体誘導腎炎の抑制は担体細胞の糸球体局所でのIL-1ra産生に寄与していることを示唆するものと思われる。

以上より、我々の開発したex vivo遺伝子導入法は一部の糸球体腎炎進行を一定期間抑止することが可能であることが示唆された。

A. 研究目的

これまで慢性糸球体腎炎の治療法としてステロイド剤や免疫抑制剤、抗血小板療法等が古くから用いられているがその治療効果は必ずしも有効とは言えず、年間約1万人が透析導入となっている。現在本邦における末期腎不全患者数は約17万人に至り国庫負担も1兆円を越え負担も大きく、革新的な治療法の開発が期待されている。これまでの多くの研究により特定の遺伝子を糸球体に導入することによる糸球体腎炎治療の可能性は示唆され、糸球体に特異的かつ効果的に遺伝子を導入する方法の開発が進んでいるものの未だに多くの問題を抱えている。例えば腎糸球体は他の臓器で一般に遺伝子導入に使われているアデノウイルスやレトロウイルスに感受性が乏しい事が知られ (Wagner et al., *Nephrol. Dial. Transplant.* 10:1801-1807, 1995)、これまで腎糸球体を標的とした遺伝子導入システムとしてHVJ-liposome法(Tomita et al., *Biochem. Biophys. Res. Communi.* 186:129-134, 1992)やメサンギウムベクター法(kitamura et al., *J. Clin. Invest.* 94:497-505, 1994)等報告は限られている。更に、その制御期間が非常に短いことやシステムの煩雑さ等のため、慢性に進行する糸球体腎炎の治療に成果が見られたという報告は未だ無い。特に糸球体腎炎の特徴の一つとしてその進行度がそれぞれの糸球体でまちまちであることがあり、炎症が進行した部位とほとんど正常に近い部位とが混在することが多く見られる。そこで炎症の部位及び時期に特異的に遺伝子を導入することが必要となる。そこで今回我々は炎症部位に発現する接着分子ICAM-1に注目し、このリガンドを持った細胞を担体とし炎症部位に特異的に遺伝子を導入する方法の開発を試みた。さらにこのシステムを用い、炎症糸球体に抗炎症性サイトカインを導入し糸球体腎炎進行を抑制させ得るか検討した。

B. 研究方法

マウス (DBA/2) の骨髄細胞を大腿骨、脛骨より採取し、CSF-1等の単核球系に分化誘導しやすい因子を多く含むL-929細胞上清含有培地にて7日間培養する。この培養の間に骨髄細胞は炎症部位に誘導される接着分子ICAM-1のリガンドであるCD11b及びCD18陽性になることをflow cytometerにて確認した後、subclone化したこれらの細胞群 (担体細胞) をfluorescent lipophilic probeにてラベルし、DBA/2Jマウスに尾静脈を介して戻す。その上で糸球体でのICAM-1の発現を高めるためにlipopolysaccharide(LPS)の腹腔内投与を7日間にわたりくり返す。Day 0, 1, 2, 4, 7, 9, 11, 28, 34, 56, 63日目にマウスより腎臓を摘出し、糸球体への担体細胞の集積を蛍光顕微鏡を用い検索する。さらに免疫組織科学的手法を用い、ICAM-1の発現レベルとの相関性について検討する。次にこのICAM-1による制御がどれくらいの期間持続するか確認するために7日間のLPSの投与を担体細胞導入後4週、8週後にも同様に行い、糸球体に集積するか検討した。これらの結果を基にこの担体細胞にレポーター遺伝子を導入し、実際に遺伝子の運び屋として機能するか確認した。骨髄細胞を採取、36時間pre-incubationした後、human β -galactosidase(GC)を発現する組換えレトロウイルスベクターMFGのproducer細胞株の培養上清を加え感染させた。このレポーター遺

伝子を持った担体細胞をマウスに戻し、LPSまたは生理食塩水の腹腔内投与をくり返し糸球体でのICAM-1の発現を誘導した。human specific GC sequenceを検出するpolymerase chain reaction(PCR)及び単離糸球体のGC bioassay を施行し、実際に炎症糸球体にGC 遺伝子が導入されているか確認した。

続いて次にこのシステムを用いた治療への適応性について検討した。DBA/2Jマウスの骨髄から得た担体細胞にアデノウイルスを用いて抗炎症性サイトカインであるマウス Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra)遺伝子を導入した。ウエスタンブロット法を用いこれらのIL-1ra遺伝子導入担体細胞が効率良くIL-1raを発現していることを確認後、ラビット IgG及びcomplete Freund's adjuvant にて前感作したDBA/2Jマウスに尾静脈を介し戻した。コントロールとしてGC遺伝子を導入したmock transfectantを使用した。24時間後これらのマウスに抗基底膜抗体を投与し糸球体腎炎を励起させ、尿蛋白排泄量、血清クレアチニン値、及び腎組織学的所見の差について経時的に検討する。さらにこの治療効果が糸球体局所でのIL-1作用抑制に因るものか確認するために、これらのマウスから糸球体を単離しその培養上清中のIL-1raをウエスタンブロット法によって半定量した。

C. 研究結果

骨髄細胞をL929細胞上清にて7日間培養することによってICAM-1のリガンドのCD11b, CD18 の陽性率が $12.7 \pm 3.4\%$ から $99.1 \pm 0.9\%$ になることがflow cytometerにて確認された。

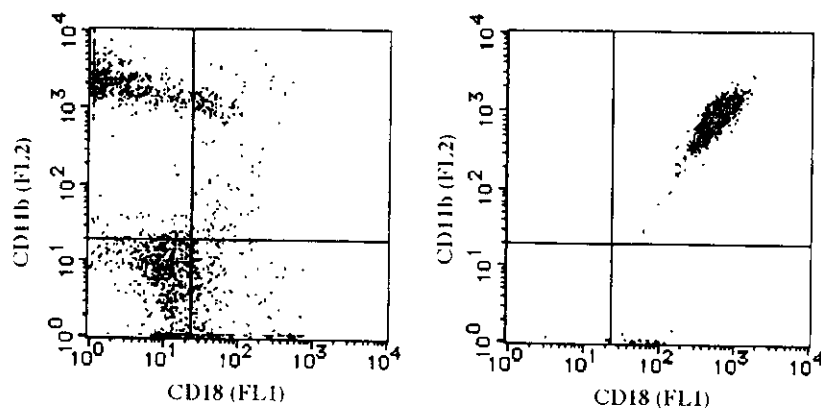


図1：L-929細胞上清含有培地にて培養前（左）後（右）のマウス骨髄細胞の
Two-color flow cytometric analysis。

この特殊培養により、骨髄細胞はsub-clone化し、ほとんどの細胞がCD11b, CD18 を発現していることが分かる。

これらを蛍光色素にてラベルし、マウスに尾静脈を介して戻したうえで糸球体でのICAM-1の発現を高めるためlipopolysaccharide (LPS)の腹腔内投与をくりかえしたところ、投与開始後24時間で担体細胞が糸球体に集積しはじめ ($0.73 \pm 0.10/\text{gcs}$)、投与終了した一週間後まで徐々に増え ($1.47 \pm 0.19/\text{gcs}$)、その後消失した。一方同量の生理食塩水を腹腔内投

与されたコントロールマウスでは、担体細胞の集積はほとんどみられなかった ($0.05 \pm 0.03/\text{gcs}$)。また糸球体内の担体細胞の数は糸球体のICAM-1の発現強度と一致していた。

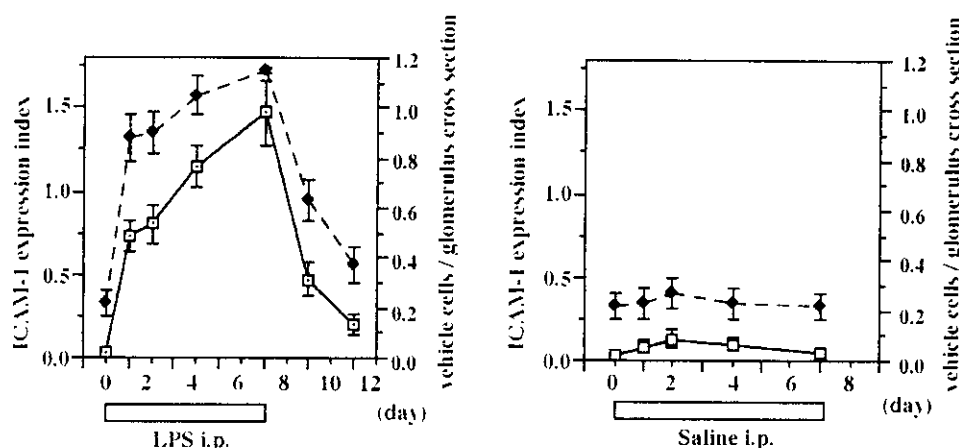


図2：Kinetics of ICAM-1 expression and number of recruited vehicle cells in the glomerulus.

このLPSで制御される担体細胞の糸球体への集積は、4週にもみられた。更に免疫組織科学的解析によりこの担体細胞の糸球体への集積はICAM-1の発現部位及び発現レベルと相関していることが確認された。

このICAM-1の発現で制御される担体細胞が実際に遺伝子を運ぶことができるか調べた実験では、LPS投与によってICAM-1の糸球体での発現を高めた群の単離糸球体は有意に強いGC活性がみられ、さらにpolymerase chain reaction(PCR)を用いた実験では、遺伝子導入した担体細胞を静脈注射したマウスにのみhuman specific GC sequenceが存在していることが確認された。

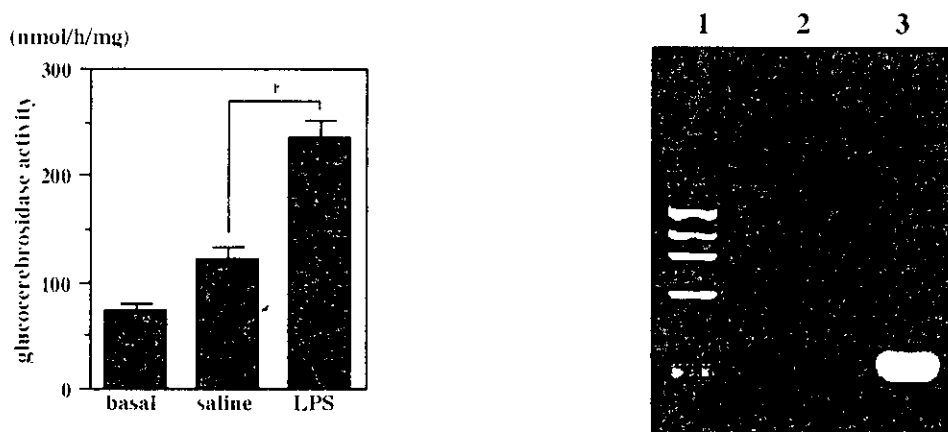


図3：担体細胞を用いた糸球体への遺伝子導入

GC遺伝子を導入しICAM-1の発現を誘導した糸球体に有意に高いGC活性を認め(左)、またこの糸球体はhuman specific GC sequenceを含んでいることが分かる(右)。

更にこのシステムの腎毒性についても検討したところ担体細胞の再注入はLPSの一週間投与を併用しても明らかな蛋白尿増加効果や血清中クレアチニン増加効果を認めなかった。

Number of infused cell	0	1 x 10 ⁵	5 x 10 ⁶	3 x 10 ⁷
urine albumin (µg/ml)	< 20	< 20	< 20	65.3 ± 2.2
serum creatinine (mg/dl)	< 0.3	< 0.5	< 0.4	< 0.4

表1：担体細胞導入の腎機能に与える影響

今回用いた5x10⁶個の担体細胞の導入に因っても尿中アルブミン排泄量、血中クレアチニン値に影響を与えないことが分かる。

以上より腎毒性のない炎症部位特異的な糸球体への遺伝子導入法が確立されたことが示された。

このシステムを用い抗炎症性サイトカインのIL-1raをマウスに導入し、抗基底膜抗体を投与することによって糸球体に炎症を惹起させたところ、mock細胞を投与した群においては多量のアルブミン尿を認めたが、IL-1ra産生vehicle cellを投与した群ではこれらのアルブミン尿は優位に抑制された。(220.8±76.8 mg/day in IL-1ra treated mice vs. 1.34±0.10 mg/dl in mock treated mice at day 14)。また血中クレアチニンレベルもIL-1ra遺伝子導入群ではコントロールと比較し有意に低値であった(0.62±0.08 mg/dl in IL-1ra treated mice vs. 1.34±0.10 mg/dl in mock treated mice)。

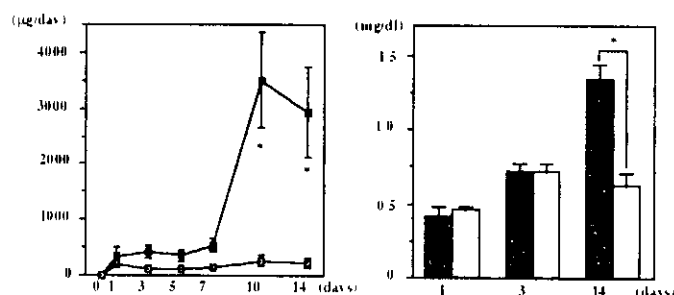


図4：Effect of IL-1ra gene delivery on the renal function after anti-GBMGN induction

IL-1ra遺伝子導入により、尿中アルブミン排泄量（左）、及び血中クレアチニン濃度は有意に抑制されていることが分かる。(Open squares and columns, IL-1ra treated mice; closed squares and columns, mock treated mice)

組織学検討でも抗GBM抗体投与14日目に半月体形成率がIL-1ra投与群に有意に低下していた。

蛍光色素にてラベルした担体細胞を用いた実験により、抗基底膜抗体投与3日目には担体細胞が有意に糸球体に集積していることが確認され、またこれらの糸球体を単離し培養したところIL-1ra産生vehicle cellを投与した群の糸球体では培養上清中に多量のIL-1raが分泌されていることが確認された。一方両群の血清中にはIL-1raはウエスタンブロット法で検出できる範囲の誘導は見られなかった。

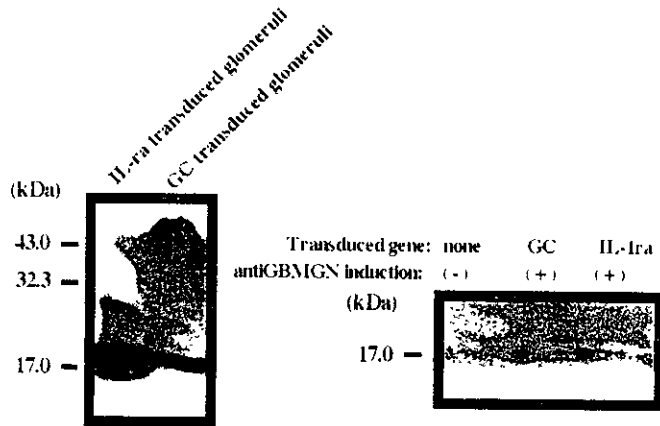


図5：Local production of IL-1ra at the vehicle cell recruited glomeruli (left) and serum IL-1ra label. IL-1ra遺伝子を導入した糸球体の培養上清は、コントロールに比し有意に多くのIL-1ra蛋白を分泌しているが、IL-1raの血清濃度は両者で差がないことが分かる。

これらの結果は、IL-1ra産生担体細胞の投与による抗GBM抗体誘導腎炎の抑制はvehicle cellの糸球体局所でのIL-1ra産生に寄与していることを示唆するものと思われる。

D. 考察

今回の研究により、我々は炎症糸球体特異的遺伝子導入法を開発し、さらにこのシステムを用い、抗炎症性サイトカインを糸球体に導入することによってある種の糸球体腎炎の治療が可能となることを示唆する所見を得た。制御期間が従来の糸球体をターゲットとした遺伝子導入法と比較してこのシステムの優れた点はいかに挙げられると思う。

- 1) 炎症糸球体に特異的に遺伝子を導入することが可能となった。
- 2) 末梢血管から投与できるので繰り返し投与が可能となり、また侵襲が少ない。
- 3) 遺伝子導入に伴って腎機能低下を生じることがほとんどない。
- 4) 1回投与で比較的長期に制御が可能となる。
- 5) 自家骨髄を使用することが可能なため、免疫反応を惹起させずに繰り返し導入が可能。

これらの利点は糸球体腎炎に対する治療の臨床応用に必須の項目であり、糸球体腎炎の遺伝子治療を現実化させる為の新たな一步を踏み出させるものと期待される。しかし実際の臨床応用まではまだまだ超えなければならない壁がいくつも立ち並んでいる。その一つは遺伝子導入の期間である。このシステムは従来のものより、飛躍的に長期間遺伝子導入可能となったが、それでも年余に渡って進行する慢性腎炎の治療には不十分であり、さらに長期間導入が可能となるようシステムが必要となる。これに対し次に我々は骨髓幹細胞自体にレトロウイルスを用いて遺伝子導入し生着させ、担体細胞を体内で産生させるシステムの開発に取り組んでいる。この方法は以前マウスにおいて7ヶ月間外来遺伝子の安定供給が可能になることが確認されている(T. Ohashi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:11332-11336, 1992) ため、抗炎症効果の延長が図れるものと期待している。もう一つ改善すべき点は炎症特異性の向上である。今回の実験の結果では導入したIL-1raは血清中にほとんど検出されなかったが、ICAM-1の発現部位に存在しない流血中の担体細胞から分泌される蛋白が、予期せぬ作用を及ぼす可能性がある。このためICAM-1に接着した後にスイッチがonになるon/off switching systemを組み合わせる必要がある。これに対し我々はCre/loxP system (Kanegae et al., *Nucleic Acids Res.* 23:3816-3812, 1995)の導入を検討し、研究を開始した。つまり、担体細胞にIL-1のプロモーターで発現するIL-1raを導入することによりIL-1が発現するような状況下 (ICAM-1と接着した時等)、IL-1の発現量に応じてIL-1raが分泌され、IL-1の活性を抑制することが可能となる。しかし今回使用したCAGプロモーターに比較し、IL-1プロモーターは非常に弱いため、十分量のIL-1raが得られない。そこでIL-1プロモーターで制御され、CAGプロモーターでドライブされるシステムを確立するため、Cre/loxP system を導入した。現在IL-1プロモーターでCreを発現するアデノウイルスの作成に成功しLacZ遺伝子をマーカーにregulationが可能か検討中である。

上記の2点以外にもまだまだ解決しなければならない問題点が多くあるがそれらをひとつひとつ解決することにより、遺伝子治療が糸球体腎炎の新しい治療戦略となり得ることを期待し、今後も研究を続ける予定である。

E. 結論

これまでの慢性糸球体腎炎の治療法としてステロイド剤や、免疫抑制剤、抗血小板療法等が古くから用いられているがその治療効果が必ずしも有効とはいえず、革新的な治療法の開発が期待されている。我々の開発した接着分子をマーカーにした炎症部位特異的 ex vivo 遺伝子導入法により一部の糸球体腎炎進行を一定期間抑止することが可能であることが示めされた。このシステムは糸球体腎炎のみならず接着分子が炎症細胞集簇に係わる他の炎症性疾患 (例えば慢性関節リウマチ) にも応用可能であり、広くステロイドやNSAIDを連用し続けないとコントロール出来ない慢性進行性炎症の新たな治療戦略として今後の研究発展が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Yokoo, Y. Utsunomiya, T. Ohashi, T. Imasawa, T. Kogure, Y. Futagawa, T. Kawamura, Y. Eto, and T. Hosoya: Inflamed site-specific gene delivery using bone marrow-derived CD11b⁺CD18⁺ vehicle cells in mice. *Hum. Gene Ther.* 9:1731-1738, 1998
- 2) T. Yokoo, Y. Utsunomiya, T. Imasawa, K. Hirano, T. Kawamura, T. Hosoya, and O. Sakai: Treatment of IgA nephropathy using novel therapeutic strategy. -inflamed site specific gene delivery-. *Nephrology* (in press), 1999
- 3) T. Yokoo, T. Ohashi, Y. Utsunomiya, H. Kojima, K. Hirano, T. Kogure, Y. Hisada, Y. Eto, T. Kawamura, and T. Hosoya: Correction of antibody-induced acute glomerulonephritis using genetically modified bone marrow derived "vehicle cells". (Submitted for publication)

2. 学会発表

- 1) T. Yokoo, T. Ohashi, Y. Utsunomiya, T. Kawamura, T. Hosoya, Y. Eto: Novel gene delivery system to inflamed site using bone marrow derived CD11b⁺CD18⁺ vehicle cell. Annual Meeting of American Society of Gene Therapy. Seattle, May 1998
- 2) T. Yokoo, T. Ohashi, Y. Utsunomiya, K. Hirano, T. Kawamura, T. Hosoya: Application of gene therapy for antibody-induced glomerulonephritis using bone marrow derived vehicle cells. Annual meeting of American Society of Nephrology. Philadelphia, October 1998
- 3) 横尾 隆、宇都宮保典、大橋十也、今澤俊之、川村哲也、衛藤義勝、細谷龍男：CD11b⁺ CD18⁺骨髄由来細胞を担体とした炎症部位特異的遺伝子導入法の開発。第41回日本腎臓学会総会。6月。東京。1998
- 4) 横尾 隆：糸球体腎炎に対する遺伝子治療。第四回DNA医学研究所夏期公開セミナー。7月東京。1998
- 5) 横尾 隆、大橋十也、宇都宮保典、平野景太、川村哲也、衛藤義勝、細谷龍男：CD11b⁺CD18⁺ 骨髄由来細胞を用いた糸球体腎炎の病態解析及び遺伝子治療の試み。第4回分子腎臓研究会。9月。大阪。1998
- 6) 横尾 隆、宇都宮保典、今澤俊之、平野景太、川村哲也、細谷龍男、酒井 紀：抗炎症性遺伝子導入によるIgA腎症の病態解明と遺伝子治療の可能性の追求。第22回IgA腎症研究会。1月。東京。1999