

Abstract

Inner Ear Disorders and NO

by

Masaya Takumida, Koji Yajin

from

Department of Otolaryngology, Hiroshima University School of Medicine

Involvement of nitric oxide (NO) and superoxide in the certain inner ear disorders was investigated in order to found a way to study the mechanisms and the treatment of Meniere's disease. The localizations of NO synthase (NOS) II, nitrotyrosine and xanthine oxidase (XO) were examined in the vestibular organ of the pigmented guinea pig after intratympanic injection of 1 mg LPS or 5 mf GM by immunohistochemical method. Caloric responses and ABR were recorded prior to each inoculation and then 48h afterwards. The effects of L-NAME, dexamethasone, SOD and ebselen were also investigated. Immunohistochemical study demonstrated the immunoreactivity for NOS II, XO and nitrotyrosine in the vestibular organs after inoculation with LPS or GM. The impaired caloric responses or ABR could be blocked with L-NAME, SOD, dexamethasone and ebselen. These observations indicate that enhanced production of both NO and superoxide with subsequent formation of peroxynitrite is likely to be an important factor responsible for pathological insult of vestibuli..

HLAに関連したびまん性汎細気管支炎感受性遺伝子の探索

慶長直人 徳永勝士* 江見 充**

はじめに

びまん性汎細気管支炎 (DPB) は日本でその疾患概念が初めて報告されて以来30年を経て, 近年では東アジアに集積する慢性炎症性肺疾患として国際的にも認識されるようになった¹⁻⁴⁾. このような地域集積性のメカニズムは, その地域特有の環境要因もしくはそこに居住する集団の遺伝背景の違いによるものと推測される.

DPB発症に関与する明確な外的要因は不明だが, 遺伝要因に関しては1990年, 杉山らによりHLA-B54抗原と疾患との強い関連性が報告された⁵⁾. 本研究ではそのことを足がかりにDPBの主要感受性遺伝子の探索を試みてきた⁶⁾. 昨年, ソウル大学臨床病理, 朴明姫教授より韓国DPB症例はHLA-A11と最も関連性が強く, HLA-BについてはB54ではなく, B55やB62と弱い関連性を持つとのデータが示された⁷⁾. このことは, 日韓の人類遺伝学上の近縁性を考慮すると, 未知のDPB感受性遺伝子がHLA-A座とB(C)座の間に位置し, その感受性対立遺伝子(d1)を含むB54-Cw1-d1-A11という共通の祖先染色体が存在したと考えると理解しやすい⁸⁾. すなわち, 日本ではB54-Cw1-d1-A24など, A座よりで主に組み換えが生じ, 固定し, 韓国では主にB座よりで組み換えが生じ, B55-Cw1-d1-A11やB62-Cw4-d1-A11などが主体となった可能性がある. 本年度は, この仮説をめくり, まずHLA-A, B座のほぼ中間に位置し, 非古典的HLAとして最近注目されるHLA-E遺伝子の多型性をPCR-SSCP法により検討した. さらに, HLA-A, B間のマイクロサテライトマーカを用いたハプロタイプの解析と, 疾患に対するマーカ-の関連性の強さの検討を行った.

対象および方法

1995年厚生省班診断基準に基づきDPBと確認された88症例を疾患群とした. 一方, HLAデータ及びゲノムDNAがともに利用可能な健常者93例を対照群とした.

HLA-Eのexon3は既知のプライマーセットを利用し⁹⁾, そのプロモーター領域に, 新たにプライマーを設定し, いずれもPCR-SSCP法により, 多型の検出を試みた.

HLA-A, B座間のマイクロサテライトマーカ-の蛍光プライマーセット (m1~m5)は東海大学猪子英俊教授の研究室より供与を受けた. またA座近傍のm6はD6S265として登録されているプライマーセットを使用した¹⁰⁾. 各マーカ-のalleleは, ABI PRISM 377 DNAシーケンサーとGeneScanプログラムにより解析した. いずれのマーカ-もリピート数の最大のalleleを#1として, リピート数の減少にしたがって#2, 3...と命名した.

ハプロタイプの推定は第11回国際組織適合性ワークショップで報告されたHLA用ハプロタイプ推定プログラムを用いた¹¹⁾. HLA-B54を保有するDPB患者を中心に9症例は, 家系情報より直接ハプロタイプを決定し得た.

韓国のHLA-A11陽性DPB患者8例のDNAサンプルはソウル大学朴明姫教授より供与を受け, 同様に解析を行った.

結 果

1. HLA-Eプロモーターおよびexon3の多型性

HLA-Eプロモーターの検索した領域からは塩基置換は見いだされなかった. exon3には2種類のalleleが認められたが, それらは世界に広く分布するGly/Arg-107多型であり, いずれもDPBとの関連性は見いだされなかった (データ省略).

2. HLA-B, C, m1...m5, HLA-Aのハプロタイプの推定 (表1)

コンピュータ解析により3%以上の頻度で存在す

東京大学呼吸器内科

* 東京大学医学系人類遺伝学

** 日本医科大学老人病研究所分子生物学

ると推定されるハプロタイプは健常群では4種類あり、その中にはDPBに抵抗性が予想されるHLA-B44, A33を含むハプロタイプが含まれていた。一方、DPB群で3%以上見られるハプロタイプは6種類が推定され、B54を含むハプロタイプが3種類含まれており、それらはいずれもHLA-B54-Cw1-m1#09-m2#15を共有していたが、m3以降、HLA-A側では異なるalleleに分かれ、最終的にA11

表1 対照及びDPB群で高頻度に見られるハプロタイプ (コンピューター推定3%以上)

Control (n=93)								
B	-C	-m1	-m2	-m3	-m4	-m5	-A	HF
B52	-Cb1	-#11	-#08	-#04	-#03	-#21	-A24	12%
B44	-Cb1	-#01	-#02	-#09	-#13	-#05	-A33	9%
B07	-Cw7	-#16	-#15	-#12	-#13	-#20	-A24	4%
B46	-Cw1	-#09	-#07	-#06	-#03	-#19	-A02	3%
DPB (n=88)								
B52	-Cb1	-#11	-#08	-#04	-#03	-#21	-A24	8%
B07	-Cw7	-#16	-#15	-#12	-#13	-#20	-A24	6%
B54	-Cw1	-#09	-#15	-#04	-#14	-#19	-A24	6%
B54	-Cw1	-#09	-#15	-#06	-#03	-#29	-A11	5%
B54	-Cw1	-#09	-#15	-#04	-#14	-#29	-A11	3%
B60	-Cw3	-#08	-#15	-#11	-#03	-#29	-A11	3%

とA24を有するハプロタイプが形成されているものと推測された。またDPB群で頻度の高い6つのハプロタイプのうち、3つがm1#09、さらに5つがm2#15というalleleを保有していた。ちなみに対照群ではB7を含むひとつのハプロタイプだけがこれらを保有していた。

3. 家系情報によるハプロタイプの直接決定 (表2)

HLA-B54陽性例を中心として家系情報により実際にハプロタイプを決定することのできた9名のDPB症例では、1.で推定されたように、m2を境としてHLA-A座側ではハプロタイプが分岐することが確認された。

4. 韓国HLA-A11陽性DPB患者のマイクロサテライト解析

HLA-A11陽性で、なおかつHLA-B54陽性(4例)および陰性(4例)の症例はいずれもm2#15を保有していた。m1#9は特にB54陰性例では1例しか保有していなかった(データ省略)。

5. HLA-B54-Cw1-A11のハプロタイプに見られる各マーカー(m1...m6)と疾患との関連性の強さ

population attributable risk¹²⁾を表す統計量 δ を用いるとm2#15が最高値0.6を示した。(データ省略)。

表2 本邦DPB患者9名のハプロタイプ (直接決定)

	B	-C	-m1	-m2	-m3	-m4	-m5	-A
O.M.	B54	-Cw1	-#09	-#15	-#04	-#14	-#18	-***
S.K.	B54	-Cw1	-#09	-#15	-#04	-#14	-#02	-A24
Y.H.	B54	-Cw1	-#09	-#15	-#12	-#14	-#18	-***
I.S.	B54	-Cw1	-#09	-#15	-#04	-#14	-#29	-A11
F.T.	B54	-Cw1	-#09	-#15	-#06	-#03	-#29	-A11
M.M.	B54	-Cw1	-#08	-#15	-#06	-#03	-#01	-A31
K.T.	B54	-Cw1	-#09	-#15	-***	-#03	-#06	-A33
T.S.	B07	-Cw7	-#16	-#15	-***	-#13	-#20	-A24
K.E.	B07	-Cw7	-***	-#15	-#05	-#03	-#18	-A24

考 察

本年度は日韓両国のHLA解析の結果から得られた仮説であるDPB感受性遺伝子のひとつがHLA-A, B両遺伝子座の間に存在する可能性をめぐって、初めにA-Bの中間点に存在し、NK細胞の抑制系レセプターのリガンドであることが知られているHLA-Eの多型性を検討したが、検索した範囲ではDPBと有意な関連性は見いだされなかった。そこでDPB感受性遺伝子座の絞り込みが可能かを検討する目的で、HLA-A, B間の複数のマイクロサテライトマーカーを用いたハプロタイプ解析と疾患-マーカー間の関連性の強さを検討した。その結果、疾患感受性を有すると推定される複数のハプロタイプで共有され、統計量 δ のピークを示すマーカーm2が、HLA-EよりB座よりのHLA-A, B間に見いだされた。m2#15は本邦健常人でも69%が保有するalleleであるため、そのalleleを保有する染色体のうち、一部にのみDPB感受性を示す対立遺伝子が乗っているものと推測される。今後m2周辺の約400 kbを解析することにより、この仮説の妥当性をさらに検討すべきものと思われた。

謝 辞

採血および患者データの送付に当たり、虎の門病院、天理よろづ相談所病院、日本医科大学第四内科の諸先生方のご協力にあらためて感謝いたします。マイクロサテライトマーカーの具体的な取り扱い等に関しては、東海大学医学部分子生命科学2 田宮 元先生の御示唆に深謝いたします。

文 献

- 1) Corne J: Diffuse panbronchiolitis: a new Japanese export? *Lancet* 348: 1465-1466, 1996
- 2) Hoiby N: Diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis: East meets West. *Thorax* 49: 531-532, 1994
- 3) Kim YW, Han SK, Shim YS et al: The first report of diffuse panbronchiolitis in Korea: five case reports. *Intern. Med.* 31: 695-701, 1992
- 4) Tsang KWT, Ooi, CGC, Ip MSM et al: Clinical profiles of Chinese patients with diffuse panbronchiolitis. *Thorax* 53: 274-280, 1998
- 5) Sugiyama Y, Kudoh S, Maeda H et al: Analysis of HLA antigens in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 1459-62, 1990
- 6) Keicho N, Tokunaga K, Nakata K et al: Contribution of HLA genes to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158: 846-850, 1998
- 7) Park MH, Kim YW, Yoon HI et al: Association of HLA class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: 526-529, 1999
- 8) 徳永勝士: HLAからみる東アジア人類集団の特徴とDPB感受性遺伝子に関する遺伝学的考察. *Ther. Res.* 19: 199-201, 1998
- 9) Geraghty DE, Stockscheider M, Ishitani A et al: Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism. *Human Immunol.* 33: 174-184, 1992
- 10) Foissac A, Crouau-Roy B, Faure S et al: Microsatellites in the HLA region: an overview. *Tissue Antigens* 49: 197-214, 1997
- 11) Imanishi T, Akaza T, Kimura A et al: Estimation of allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci. Tsuji K, Aizawa M and Sasazuki T(eds) : *HLA Vol 1.* Oxford University Press, New York, pp1065-1220, 1991
- 12) Bengtsson BO, Thomson G: Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases. *Tissue Antigens* 18: 356-363, 1981

Abstract

HLA-linked candidate genes involved in a susceptibility to diffuse panbronchiolitis

by

Naoto Keicho, Mitsuru Emi*, Katsushi Tokunaga**

from

Department of Respiratory Medicine, University of Tokyo

*Department of Molecular Biology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School

**Department of Human Genetics, University of Tokyo

Considering HLA types associated with diffuse panbronchiolitis in the Japanese and Korean populations, we have postulated that one of the disease susceptibility genes is located between HLA-A and -B loci. In this study, polymorphisms in the HLA-E gene of which locus is in the middle of the two loci were first analyzed, but no obvious association with the disease was observed. In order to estimate the locus of the putative susceptibility gene more accurately on the physical map of the HLA region, we analyzed alleles of 6 microsatellite markers which were located between HLA-A and -B loci. Frequencies of the haplotypes were estimated in 88 patients and in 93 controls respectively. A specific allele of the marker designated m2 was shared among haplotypes frequently found in the patient group. This estimation was confirmed by analysis of haplotypes directly determined by pedigree data. Linkage disequilibrium mapping was also directed and the m2 was suggested as a marker close to the susceptibility gene. We should focus on a region of a few hundred kilo base pairs around the m2 as a locus of the HLA-linked susceptibility gene.

ウイルス性肺炎モデルにおけるパーオキシナイトライトによる急性肺傷害と遺伝子損傷メカニズム

赤池 孝章、宮本 洋一、澤 智裕、前田 浩

はじめに

我々はこれまでの研究により、マウスインフルエンザウイルス肺炎モデルにおいて宿主の炎症反応に伴って過剰に産生されるスーパーオキシド (O_2^-) と一酸化窒素 (NO) のカップリング産物であるパーオキシナイトライト (ONOO⁻) が肺組織損傷の主要なメディエーターとして機能していることを報告してきた¹⁾⁻⁸⁾。パーオキシナイトライトは、化学的反応性に富み、生体内において細胞障害、アポトーシスの誘導、変異原性の発現など多彩な病態生理活性を発現することが報告されている。

そこで今回は、インフルエンザウイルスによるマウスの劇症肺炎モデルにおけるパーオキシナイトライトによる生体内ニトロ化反応とアポトーシスの誘導を介した肺組織傷害メカニズムについて検討した。あわせて、センダイウイルスによる *in vivo* の感染系 (マウスのウイルス性肺炎モデル) におけるパーオキシナイトライトによるウイルスゲノムの変異促進作用について解析した。

対象および方法

(1) インフルエンザウイルス肺炎モデルにおけるパーオキシナイトライトによる肺組織傷害メカニズムの解析

インフルエンザウイルス肺炎モデルにおける炎症局所のニトロ化反応を定量的に評価するため、HPLC-電気化学 (EC) 検出法を用いて、肺内のニトロチロシン生成量を測定した。あわせて、以前本モデルに治療効果を示した NOS 阻害剤やパーオキシ

ナイトライト消去剤のニトロチロシン生成、および、肺組織のアポトーシス誘導に与える効果についても検討した。

(2) パーオキシナイトライトによるウイルス遺伝子変異促進作用の解析

パーオキシナイトライトの *in vivo* におけるウイルス遺伝子変異を検証するため、iNOS ノックアウトマウス (C57BL/6-iNOS (-/-)) および C57BL/6-iNOS (+/+)マウスを用いて、green fluorescent protein (GFP) を組み込んだセンダイウイルス (GFP/SeV) 感染系を作製し、それぞれのマウス肺内で増殖したウイルスの GFP 遺伝子変異率を比較検討した。すなわち、ウイルス感染肺よりウイルスを CV-1 細胞を用いたプラーク形成法により分離し、ウイルスゲノム中の GFP 遺伝子の変異を GFP/SeV 感染細胞に発現される GFP の蛍光の消失により判定した。

結果および考察

(1) パーオキシナイトライトによる肺傷害メカニズム

肺組織内の蛋白を抽出し、酸加水分解後、HPLC-EC 検出法によりニトロチロシン生成を同定した。その結果、インフルエンザウイルス感染後、7日後の肺組織の蛋白中に、ニトロチロシンのピークが認められた (図 1)。さらにこれを、定量化して、ウイルス感染マウスの肺洗浄液および正常のサンプルと比較したところ、ウイルス感染のサンプル中にのみ有意なニトロチロシン生成が認められた (表 1)。さらに、このニトロチロシン生成は、パー

オキシナイトライトに対し強い消去活性をもって
いるエブセレンを投与することにより、強く抑制さ
れることがわかった。

またあわせて、ウイルス感染肺におけるアポトー
シスの誘導を tunnel 法により *in situ* で検出し、アポ
トーシスの発現に対するエブセレンの作用につい
て検討したところ、アポトーシスの誘導が、エブセ
レン投与により強く抑制されていた。同時に、炎症
細胞の浸潤に伴った既存肺胞構築の変化などの病
理組織学的変化は、エブセレン投与により著明に改
善しており、マウスの生存率も有意に改善していた。

以上の知見は、インフルエンザウイルスによる劇
症肺炎モデルの肺組織損傷に、パーオキシナイトラ
イトが深く関わっていること、さらに、組織中のニ
トロチロシンレベルが細胞・組織障害の良い指標と
なることを示唆している。

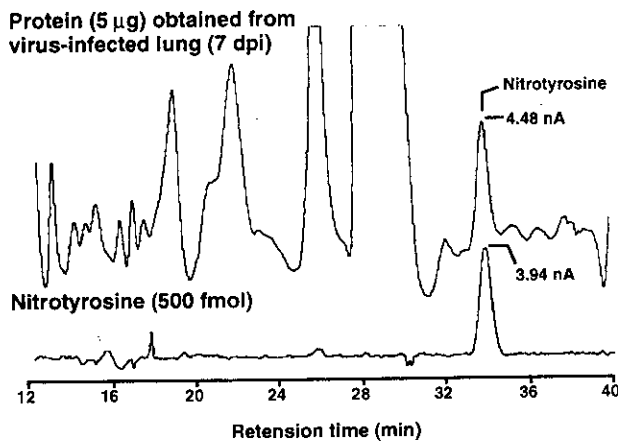


図1 インフルエンザウイルス肺炎モデ
ルにおけるニトロチロシン生成の HPLC-
EC 検出法による同定。

表1 ウイルス感染肺内のニトロチロシン生成量
(mol/100 mol tyrosine)

Virus infection (7 dpi)	
lung tissue	0.029
BALF	0.188
Normal lung tissue	<0.003

(2) ウイルス遺伝子変異

昨年までの研究成果として GFP/SeV をパーオキ
シナイトライトにより処理することにより、

GFP/SeV の遺伝子の変異率が経時的に上昇するこ
とがわかったが、今回さらに、この様なウイルス遺
伝子の変異が、*in vivo* の感染系で起こるかどうか検
討した。この為、GFP/SeV を C57BL/6 (B6) マウスお
よび B6 iNOS ノックアウトマウスに感染させ、感染
後 4, 6, 7 日目の肺組織中のウイルスを分離し、GFP
の変異率を測定した。その結果、ウイルスの肺内増
殖は両群で有意な差がなかったが、ウイルスの変異
率は、iNOS を発現する B6 wild マウスに有意に高
いことがわかった (図2)。また、電子スピン共鳴
法により、マウス肺内における NO 生成を直接解析
したところ、B6 wild マウスでは過剰な NO 生成が認
められたが、iNOS ノックアウトマウスでは NO の
生成はほとんど確認できなかった (図3)。

以上の結果より、ウイルス感染において NO や活
性酸素、さらにはパーオキシナイトライトの生成を
介し、宿主よりウイルスに加えられる酸化ストレス
が、ウイルスの遺伝子変異を促進させ、さらにはウ
イルスの分子進化をもたらすことが示唆された。こ
の様な変異は、酸化ストレスに対する病原体の生存
戦略であると解釈することも可能であり、一方で感
染・炎症における酸化ストレスは、生体の遺伝子に
対しても同様に変異原性を発揮することも予想さ
れる。今後さらに、宿主と病原体の両側面から酸化
ストレスによる遺伝子変異メカニズム解明が望ま
れる。

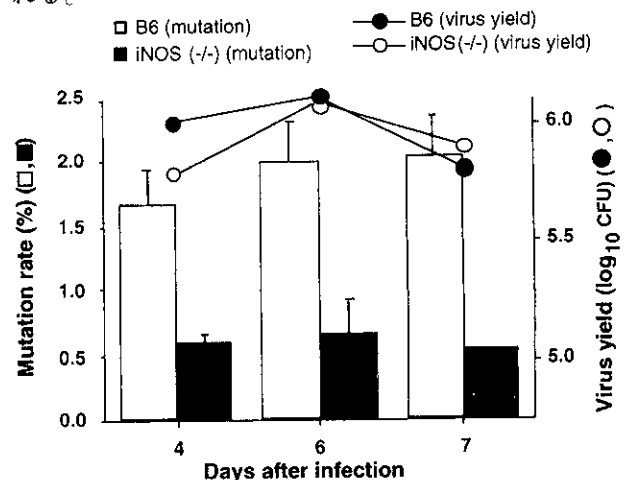


図2 GFP/SeV 肺炎モデル (B6 および iNOS ノック
アウトマウス) における GFP/SeV の肺内増殖と GFP
遺伝子変異率。

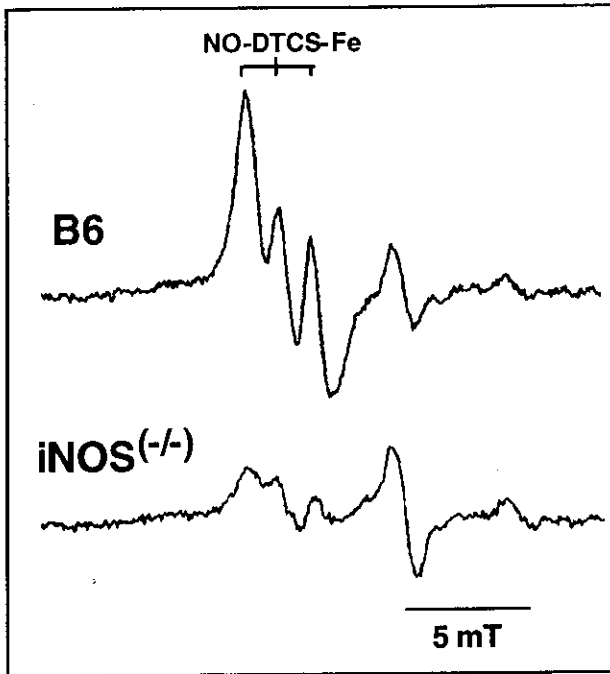


図3 GFP/SeV感染B6マウスおよびB6*iNOS*ノックアウトの肺内(感染後7日目)におけるNO生成の電子スピン共鳴法による同定。DTCS-FeをNO捕捉剤として用いた。

謝辞

本研究の一部は、熊本大学医学部・第一内科学、岡本竜哉博士、菅守隆助教授、安藤正幸教授、および東京大学医科学研究所、ウイルス感染研究部、加藤篤博士、永井美之教授との共同研究により行った。

文献

- 1) Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S et al.: Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: Involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 2448-2453, 1996
- 2) Akaike T, Suga M, Maeda H: Free radicals in viral pathogenesis: Molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217: 64-73, 1998

- 3) 赤池孝章: ウイルス感染病態とNO. *ウイルス* 47, 165-176, 1997
- 4) Maeda H, Akaike T, Wu J et al.: Bradykinin and nitric oxide in infectious disease and cancer. *Immunopharmacology* 33: 222-230, 1996
- 5) Sato K, Suga M, Akaike T et al.: Therapeutic effect of erythromycin on influenza virus-induced lung injury in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 853-857, 1998
- 6) Maeda H, Akaike T: Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Moscow)* 63: 854-865, 1998
- 7) Akaike T, Maeda H: Nitric oxide in influenza pathogenesis. Fang, FC (ed): *Nitric Oxide and Infection*. Plenum Publishing Co., New York, in press, 1999
- 8) 赤池孝章: 肺における活性酸素とスカベンジャー. 工藤翔二、土屋了介、金沢実、大田健(編): *Annual Review 呼吸器* 1998. 中外医学社, 東京, pp 34-46, 1998

Abstract

Pathogenesis of Virus-induced Pneumonia Mediated through Peroxynitrite Formation: Lung Injury via Extensive Tissue Nitration and Acceleration of Viral Mutation

by

Takaaki Akaike, Yoichi Miyamoto, Tomihiro Sawa and Hiroshi Maeda

from

Department of Microbiology, Kumamoto University School of Medicine

Our previous study indicates that peroxynitrite (ONOO^-) a coupling product of nitric oxide (NO) and superoxide is a major pathogenic principle in influenza virus-induced pneumonia in mice. Based on the potent chemical reactivity and diverse biological actions of ONOO^- , involvement of ONOO^- in various disease pathogenesis has been also suggested recently. Here we found that ONOO^- is involved in the lung injury possibly through extensive tissue nitration, particularly nitration of tyrosine residues of various proteins. It is of most interest that treatment of influenza virus-infected animals with ebselen, which shows a potent ONOO^- scavenging action, led to significant amelioration of the lethality of the infection as well as improvement of pathological change of the lung. More important, tyrosine nitration in the lung was greatly attenuated by the ebselen treatment; the reduced level of nitrotyrosine in the lung was verified by an immunohistochemical analysis with use of anti-nitrotyrosine antibody, and by quantitative measurement of nitrotyrosine by using HPLC coupled with electrochemical analysis as well. Therefore, quantification of the nitrotyrosine in the tissues may be useful for estimation of the lung tissue damage induced by oxidative stress. Meanwhile, another important aspect of ONOO^- is its potent mutagenic activity. In this context, the effect of ONOO^- on the viral RNA genome was further investigated. Specifically, the rate of mutation of the green fluorescence protein-constructed Sendai virus (GFP/SeV) with or without peroxynitrite treatment was examined as quantifying the incidence of loss of fluorescence by GFP expressed in the virus-infected cell *in vitro*. Moreover, the mutation of GFP/SeV was also tested *in vivo* in *iNOS*^{-/-} mice infected with GFP/SeV. The results obtained *in vitro* and *in vivo* studies showed that the mutation rate of GFP genome in GFP/SeV was apparently accelerated by NO or its reactive oxidized derivative ONOO^- . It is thus suggested that oxidative stress mediated by ONOO^- may cause enhanced mutation frequency of the virus, which will confer the virus genetic diversity and molecular evolution.

一酸化炭素を介した臓器機能制御機構：

ヘムオキシゲナーゼの臓器内分布と門脈血行異常症

末松 誠, 牧野 伸也, 石村 巽

はじめに

我々は最近肝臓で内因性に生成される一酸化炭素 (CO) が類洞血管抵抗を生理的レベルに低く保つために必要不可欠であることを報告した^(1,2)。しかしながら肝臓、脾臓を含む門脈循環は言うに及ばず、他臓器における CO の生成系であるヘムオキシゲナーゼ (HO) の分布検索は未知のままであった。我々はラットの HO isozyme である HO-1, HO-2 を特異的に認識する単クローン抗体を作成し肝臓での CO 生成の責任部位を明らかにしたが、これらの抗体のうちヒト抗原に交叉する抗 HO-1 抗体 GTS-1 を見出しヒトにおける発現と門脈血行異常症での発現異常を検討したので報告する。

対象および方法

ラット肝細胞から RT-PCR 法により HO-1, HO-2 の cDNA を作成し, plasmid vector pEFneo にこれを導入しマウス由来 T 細胞株 WR19L を用いた stable transformant を樹立した。このマイクロソーム分画をマウスに免疫, ラット HO-1 に対する抗体 GTS-1, HO-2 に対する抗体, GTS-2 を精製した。GTS-1 抗体はヒト HO-1 に特異的に結合し HO-2 とは交叉反応を示さなかった。大腸癌肝転移症例の健常部 wedge biopsy をコントロールとして、idiopathic portal hypertension (IPH) と診断され pancytopenia のために手術適応となった症例、および肝硬変症例の wedge biopsy から得られた肝組織の HO-1 発現を解析した。また各群において HO-1 の主要な発現部位である Kupffer cell の population を検討するため KP-1 抗体によるマクロファージ染色を併せ施行した。

結果

ヒト正常肝組織では、HO-1 はラット同様 Kupffer cell に強く発現しており伊東細胞や肝実質細胞での発現はわずかであった。IPH 症例では Kupffer cell の密度には変化がないにもかかわらず HO-1 の発現が著明に低下していた。また同一症例の spleen では red pulp の拡大と HO-1 発現の上昇が認められた。一方肝硬変症例では HO-1 発現は Kupffer cell では保たれており、肝実質細胞での発現も認められた。

考案

肝臓は他の臓器と異なりわずか数 cmH₂O の低い圧勾配で血流が維持されており、低い血管抵抗が維持されることが血行の恒常性を維持するために不可欠であると考えられるが、そのメカニズムは不明であった。門脈圧上昇の病的反応の分子メカニズムは不明であるがラット肝におけるこれまでの検討では生理的レベルの CO が持続的に生成されることが肝臓の低い血管抵抗を維持するために必要であることが示されている^(1,2)。誘導型酵素である HO-1 の転写調節にはサイトカインや低酸素の他に wall shear stress が関与することが知られている。一方 IPH における肝 HO-1 発現の低下は、同一症例の spleen での発現が上昇していることから本症の原因とは考えられない。しかしながら前類洞性収縮が本態とされる IPH で発現が低下し、肝硬変での発現が低下しないことを考慮すると、Kupffer cell が hemodynamic force の変動をセンシングして HO-1 発現を調節している可能性がある。今後マクロファージが肝のような低圧灌流系において hemodynamic sensor として作動する可能性について in vitro で検討を進める予定である。

文献

- 1) Suematsu M, Goda N, Sano T, et al.: Carbon monoxide : An endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 96: 2431-2437, 1995
- 2) Suematsu M, Wakabayashi Y, Ishimura Y: Gaseous monoxides: A novel regulator of microvascular function in the liver. *Cardiovasc Res* 32: 679-686, 1996
- 3) Sano T, Shiomi M, Wakabayashi Y, et al.: Endogenous carbon monoxide suppression stimulates bile acid-dependent biliary transport in perfused rat liver. *Am J Physiol (Gastrointest. & Liver Physiol.)* 272: G1268-G1275, 1997
- 4) Goda N, Suzuki K, Naito M, et al.: Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver: Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 101(3): 604-612, 1998
- 5) Shinoda, Y., Suematsu, M., Wakabayashi, Y., et al.: Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 28: 286-295, 1998

Abstract

Carbon monoxide-mediated regulation of organ function: Role in idiopathic portal hypertension

by

Makoto Suematsu, Nobuya Makino, Yuzuru Ishimura

from

Department of Biochemistry, School of Medicine Keio University

This study aimed to examine distribution of the heme oxygenase (HO) isoforms in human liver immunohistochemically using newly raised monoclonal antibodies. [Method] Anti-rat HO-1 MoAb GTS-1 exhibited a cross-reactivity against human HO-1. Using the MoAb, liver specimens collected by wedge biopsy in patients with idiopathic portal hypertension and liver cirrhosis were examined immunohistochemically. [Results] In the control liver, HO-1 was expressed predominantly in Kupffer cells but not in other non-parenchymal cells nor in hepatocytes. On the other hand, livers of idiopathic portal hypertension displayed a marked paucity of the HO-1 expression, while the population of Kupffer cells remained normal. It should be noted that livers of cirrhotic patients exhibited a marked induction of HO-1 not only in Kupffer cells but also in hepatocytes. [Conclusion] The results suggest a role of HO-1 expressed in Kupffer cells as a sensing apparatus for sinusoidal hemodynamics and that its down regulation could aggravate sinusoidal patency through CO-mediated mechanism in patients with idiopathic portal hypertension.

細胞内超微活性酸素代謝特性と FALS 病態の解析

井上正康、佐藤英介、吉良幸美

はじめに

酸素の確保と血管の機能維持は個体のエネルギー代謝を支える基盤であり、ヒトの生存を保証する根幹である。この酸素の一部は常に活性酸素に変換され、多彩な生理機能のみならず、各種の病理機能を発揮している。加齢性脳血管障害をはじめ、老化関連疾患にもスーパーオキシドや NO などの活性酸素種が関与する可能性が示唆されているが、その実態は不明である。本研究は、活性酸素を血管や組織で部位特異的に代謝制御する SOD 誘導体を開発し、血管源性の加齢関連疾患における活性酸素の意義を明らかにするとともに、血管組織の活性酸素病態を阻止軽減することにより、病的老化の予防治療と健康な加齢変化を可能とする方法論開発の理論基盤を確立することを目的とする。さらに、抗酸化防御系の細胞内超微局在性を解明し、特に Cu/Zn-SOD の分子変異が関係する家族性側索硬化症(FALS)の分子機構を解明することも本研究の目的である。

これまでの解析により、極めて短寿命と信じられてきた多機能分子の一酸化窒素(NO)が生理的低酸素環境下では極めて安定に長時間作用しうること、およびその生理的あるいは病理的作用が低酸素環境下で増強することが判明した¹⁻⁹⁾。

したがって、血管源性疾患における NO の意義を知るには体内局所の酸素環境下で動態を解析

することが重要である。さらに、これまでは主に細胞質に分布すると考えられていた Cu/Zn-SOD が細胞内顆粒画分にも高濃度に分布し、そこでスーパーオキシドを有効に不均化していることが判明した。本研究は、脳血管病態、癌病態、感染病態における NO の代謝制御機能と Cu/Zn-SOD の超微細分布動態を解析し、各種疾患や FALS 病における役割を明らかにすることを目的として行われた。

対象および方法

病巣指向性 SOD や血管内皮指向性 SOD などを開発し、個体レベルで活性酸素病態を解析する系を確立してきた¹⁰⁻¹³⁾。これらの部位指向性 SOD が障害血管をはじめとする病巣局所でスーパーオキシドを選択的に消去することにより、活性酸素ストレスや本ラジカルと反応する一酸化窒素(NO)の機能がどの様に影響されるかを解析した。

本年度は、血管源性病態モデルとして高血圧ラット(SHR)および Watanabe 動脈硬化兔を用いて解析すると同時に、ヒトの加齢に伴い増加する癌病態における活性酸素代謝特性を解析した。さらに、肝および脳の細胞分画を行い、細胞質、核、ミトコンドリアおよびパーオキシゾーム画分における Cu/Zn-SOD の分布動態を解析すると同時に、正常および変異 SOD の結合性を解析した。各画分における Cu/Zn-SOD の局在は Western blotting 法により解析した。顆粒画分と SOD との相互作用の様相を Triton X-100 や CHAPS などの界面活性剤存在下に検討した。ヒト型 SOD としては、wild type

Cu/Zn-SOD 及び本教室で見出した FALS 患者の Asn86Ser (N86S)変異 SOD を遺伝子工学的手法により酵母で発現させ、各顆粒画分との反応を解析した。本顆粒画分を percoll density gradient により細分画し、各オルガネラのマーカー酵素と SOD の局在性について解析した。

結果

上記の部位指向性 SOD を用いて解析した結果、虚血性脳死病態や脳浮腫には病巣局所において過剰産生されたスーパーオキシドが NO を消去して局所微小循環病態が誘起されること、本 SOD が低酸素下で NO 依存性の cGMP 産生を増加させて病態を抑制することが判明した¹⁰⁾。高血圧病態でも血管局所のスーパーオキシド過形成により NO 機能が低下して持続性血管収縮が誘起されていること¹¹⁾、および NO の血管弛緩作用が酸素濃度低下により著明に増強することが判明した。一方、組織ミトコンドリアの電子伝達系と ATP 産生は NO により可逆的に阻害されること、その阻害度が低酸素下で増強されることが判明した^{14,5)}。したがって、酸素分子、NO、およびスーパーオキシドの局所バランスがエネルギー代謝を精密に制御していることが判明した。

この原理により、低酸素下ではマクロファージに由来する NO が癌細胞のエネルギー代謝を強く抑制し、癌細胞をアポトーシスに陥らせることが、癌組織周辺の血管新生により酸素が動員されて赤血球が癌細胞近辺に循環し出すと、本阻害作用が消失し、癌細胞が急激に増殖することが判明した²³⁾。

主要な抗酸化防御因子グルタチオン(GSH)は NO とニトロソチオールを形成する。GSH 代謝回転動態を正常ラットと SHR で比較した所、高血圧病態では GSH 代謝回転速度が約 50%に低下していた。Watanabe 動脈硬化兔を用いて同様に解析した結果、動脈硬化病態でも GSH 代謝回転速度が著しく低下(正常群の約 50%)していることが判明した。これらの所見は、二種類の血管源性病態において、主要抗酸化分子群の代謝輸送動態が抑制されてい

ることを意味する。

細胞分画法を用いて解析した結果、これまではすべて細胞質に局在すると考えられていた Cu/Zn-SOD が、細胞質のみならず、パーオキシゾームを主体とする顆粒画分にも結合することが判明した。この結合は非共有結合性の可逆的なものであるが、FALS 患者の変異 Cu/Zn-SOD ではその膜結合能力が低下していることが明らかになった。

考察

各種活性酸素が極めて不安定で短寿命でありながら、SOD 等の特異的酵素や抗酸化分子群により効率よく代謝制御されていることを考えると、消去酵素や抗酸化分子群が活性酸素の産生部位に限りなく近接していることが不可欠の要因となる。例えば、細胞内におけるスーパーオキシドの消去反応を考えるならば、短寿命のスーパーオキシドを瞬時に不均化する Cu/Zn-SOD は、従来から考えられていた細胞質のみでは不十分であり、その発現局所に局在化していることが必要である。

本研究でも、部位指向性 SOD が各種の血管病態や脳病態を著明に改善することが明らかとなった¹²⁾。また、局所の酸素分圧も NO の作用を制御する重要な因子であることも判明し、これらがエネルギー代謝を高次に制御するスーパーシステムを形成していることが示唆された。

細胞生物学的解析の結果、Cu/Zn-SOD も細胞内において、細胞質のみならず、パーオキシゾームをはじめとする様々なオルガネラ膜表面にも結合して存在することが判明し、これにより化学反応論的な問題が解決されていることが明らかになった。同時に、FALS 患者の変異 Cu/Zn-SOD のオルガネラ膜への結合能が低下していることより、変異 Cu/Zn-SOD の局在性変化が細胞内消去部位変化を誘起し、これが活性酸素傷害の原因となりうる可能性が考えられる。Cu/Zn-SOD に変異を有する FALS の発症メカニズムを解明する目的で、他の部位に変異を有する SOD を用いて同様の解析を行

う必要がある。

もっとも、Cu/Zn-SOD の変異を伴う FALS は全 ALS 中の約 2% 足らずであり、この可能性のみが本疾患発症原因であるとは考えにくい。本病態では病変が運動神経細胞特異的であり、かつ遅発発症であることも重要なメッセージである。両病理特性に対応する分子要因の同定と解析が不可欠であり、この面からも検討していく必要がある。

文献

- 1) Y. Takehara, T. Kanno, T. Yoshioka, M. Inoue and K. Utsumi. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial energy metabolism by nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 323(1): 27-32, 1995
- 2) Y. Inai, Y. Takehara, M. Yabuki, E. F. Sato, J. Akiyama, T. Yasuda, M. Inoue, A. A. Horton and K. Utsumi. Oxygen-dependent-regulation of Ehrlich ascites tumor cell respiration by nitric oxide. *Cell Struct. Func.*, 21(2): 151-7, 1996
- 3) M. Nishikawa, E. F. Sato, K. Utsumi and M. Inoue. Oxygen-dependent regulation of energy metabolism in ascites tumor cells by nitric oxide. *Cancer Res.*, 56(19): 4535-40, 1996
- 4) S. Okada, Y. Takehara, M. Yabuki, T. Yoshioka, T. Yasuda, M. Inoue and K. Utsumi. Nitric oxide, a physiological modulator of mitochondrial function. *Physiol. Chem. Physics.*, 28(2): 69-82, 1996
- 5) Y. Takehara, H. Nakahara, Y. Inai, M. Yabuki, K. Hamazaki, T. Yoshioka, M. Inoue, A. A. Horton and K. Utsumi. Oxygen-dependent reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Cell Struct. Func.* 21(4): 251-8, 1996
- 6) M. Yabuki, Y. Inai, T. Yoshioka, K. Hamazaki, T. Yasuda, M. Inoue and K. Utsumi. Oxygen-dependent fragmentation of cellular DNA by nitric oxide. *Free Rad. Res.*, 26(3): 245-55, 1997
- 7) H. Yu, E. F. Sato, K. Nagata, M. Nishikawa, M. Kashiba, T. Arakawa, K. Kobayashi, T. Tamura and M. Inoue. Oxygen-dependent regulation of the respiration and growth of *Escherichia coli* by nitric oxide. *FEBS Lett.* 409(2): 161-5, 1997
- 8) K. Nagata, H. Yu, M. Nishikawa, M. Kashiba, A. Nakamura, E. F. Sato, T. Tamura and M. Inoue. *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J. Biol. Chem.* 273(23): 14071-3, 1998
- 9) M. Nishikawa, E.F. Sato, T. Kuroki, K. Utsumi, M. Inoue. Macrophage-derived nitric oxide induces apoptosis of rat hepatoma cells in vivo. *Hepatology*, 28(6): 1474-1480, 1998
- 10) M. Inoue, N. Watanabe, K. Matsuno, J. Sasaki, Y. Tanaka, H. Hatanaka and T. Amachi. Expression of a hybrid Cu/Zn-type superoxide dismutase which has high affinity for heparin-like proteoglycans on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 266(25): 16409-14, 1991
- 11) K. Nakazono, N. Watanabe, K. Matsuno, J. Sasaki, T. Sato and M. Inoue Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(22): 10045-8, 1991
- 12) Y. Takeda, H. Hashimoto, F. Kosaka, M. Hirakawa and M. Inoue. Albumin-binding superoxide dismutase with a prolonged half-life reduces reperfusion brain injury. *Am. J. Physiol.*, 264(5 Pt 2): H1708-15, 1993
- 13) M. Inoue. Targeting superoxide dismutase by gene and protein engineering. *Meth. Enzymol.* 233: 212-21, 1994

Abstract

Role of molecular oxygen, nitric oxide and superoxide in the regulation of energy metabolism and in the pathogenesis of neuronal diseases

by

Masayasu Inoue, Eisuke F. Sato, Yukimi Kira

from

Osaka City University Medical School

Because nitric oxide (NO) reacts with heme proteins, oxygen and superoxide radical, biological and pathological effects of reactive oxygen species might be affected by the cross-talk between these compounds. We found that NO is fairly stable under physiologically low oxygen tension and, hence, it exhibits potent activity for a fairly long time *in vivo*. Therefore, biological action of NO is significantly enhanced by hypoxia thereby compensating the decreased energy metabolism in the brain and other tissues. To elucidate the role of NO in the pathogenesis of oxygen toxicity in the brain, effects of NO on the respiration of mitochondria, tumor cells and bacteria were studied at different oxygen tensions. NO reversibly inhibited the electron transport of mitochondria, cancer cells and bacteria; the inhibitory effect was stronger at high oxygen tension than at low tensions. Kinetic analysis using site-directed SOD revealed that *in vivo* function of NO is markedly enhanced either by hypoxia or by dismutating superoxide radicals *in situ*. Function of NO as vasodilator also increased in ischemic brain and other hypoxic tissues. The long acting SOD inhibited the increase in vascular permeability of the reperfused brain and other tissues and minimized their injury by modulating the NO-dependent metabolisms. Thus, the cross-talk of oxygen and reactive oxygen species plays critical roles in the regulation of energy metabolism and in the pathogenesis of ischemic injury of the brain and other tissues. We also found that normal but not mutant Cu/Zn-SOD binds to membrane surface of organelles, such as peroxisomes, thereby effectively dismutating superoxide radicals in and around these organelles. possible mechanism for neuronal injury in FALS patients is proposed.

生体組織への遺伝子導入効率の増強と長期遺伝子発現ベクターの開発

金田安史 佐伯良修

はじめに

私達は蛋白修飾リボソームの開発を行い、その一つがHVJ-liposomeとして現在生体組織への遺伝子導入に用いられている¹⁾。しかし現行のHVJ-liposomeは短所も多く、将来の遺伝子治療を実現させるためにより強力なデリバリーシステムとして確立することが望まれている。そこでHVJ-liposomeを導入効率の増強と長期遺伝子発現の観点から改良しそれを用いて遺伝子治療の可能なアプローチを提唱することを目標として研究を行った。

対象および方法

Luciferase geneの発現ベクターとしてpGL2-Promotor-Vector (Promega) より HindIII、BamHIで切り出したluciferase geneをpcDNA3 (In Vitrogen) のHindIII、BamHIサイトにクローニングしたプラスミド(pcluc)を作製した。遺伝子長期発現のためにchick-beta actin promoterの下流にluciferase geneを持つプラスミドにP205のEBNA-1とoriPの配列をクローニングしたpEBActlucを用いた。

ethanolamine(DOPE), shingomyelin(SM), 負電荷脂質として phosphatidyl serine(PS)を用いた。従来のHVJ-liposomeはPS、PC、Cholを重量比で1:4.8:2で混合したlipid mixtureよりなるliposomeを用いていた。リボソーム脂質の検討をリン脂質の種類と比率、リン脂質とコレステロールの比、正電荷脂質の有無を基にして行った。脂質を混合しクロロフォルムに溶解後エバポレーターを用いて脂質混合物を作製した。この脂質混合物9.75mgに200ugのDNAを加えvortex法によりliposomeを作製し、これに紫外線で不活化したHVJ(30000HAU)を加えて融合させ蔗糖密度勾配を用いた超遠心によりHVJ-liposomeを精製した。

遺伝子導入用のHEK293(Human embryonal kidney)、BHK(Baby hamster kidney)、FS3(Normal human diploid fibroblast)細胞3-5x100000個に対して様々な量のHVJ-liposomeを加えた。生体組織への導入については8週令のICRマウスの肝臓被膜下と大腿四頭筋にそれぞれ0.2、0.1mlのHVJ-liposome液を注射した。ルシフェラーゼ活性の測定は、ルミノメーター(Lumat LB9501)により測定した。

結果

1. 遺伝子導入効率の増強

正電荷脂質のDC-Cholを加えたHVJ-cationic liposomeが培養細胞での遺伝子発現を現行HVJ-liposomeより数十倍以上増強できた。し

大阪大学医学部遺伝子治療学

正電荷脂質としてDC-Cholesterol(DC-Chol)、中性脂質としてcholesterol(Chol), phosphatidyl choline(PC), dioleoylphosphatidyl

かしさらに検討を重ねると正電荷脂質の含量が増すと培養細胞への遺伝子導入は増強するが生体の実質臓器への遺伝子導入効率は逆相関して減少することがわかった。そこでルシフェラーゼ遺伝子発現をもとに至適リボソームの脂質構成成分を検討したところ、SM, PC, DOPE を 1:1:1 で含み、リン脂質とコレステロール比が 1:1, DC-Chol と Chol 比が 1:4 である時に最大の遺伝子発現が培養細胞において得られたが、マウス肝臓や骨格筋での遺伝子発現は DC-Cholesterol の入った正電荷リボソームでは殆ど認められなかった。しかし DC-Chol の代わりに PS を加え負電荷になった HVJ-liposome は培養細胞での遺伝子発現は正電荷リボソームより低い、肝臓、骨格筋での遺伝子発現は現行の HVJ-liposome による遺伝子発現の 5-10 倍であった²⁾。組織での最大の遺伝子発現が得られるリボソームの構成成分は HIV のエンヴェロープや赤血球膜の脂質に酷似しており私達はこのリボソームを AVE(Artificial Viral Envelope)-liposome と称している。

2. 遺伝子発現の長期化

HEK293 と BHK 細胞において EB の配列を持つ pEBActluc の導入群では 2 日後からルシフェラーゼ遺伝子発現が上昇し低下は見られなかったのに対して、EB の配列を持たない pActluc の導入群では 1 日目をピークに低下し pEBActluc 導入群の 1/4 以下となった。さらに長期に培養した時にプラスミド DNA が保たれ自律増殖していることをサザンブロットにより調べた。その結果 2 週間後の段階では pEBActluc 導入群では DNA は MboI で切断され HEK293 細胞中で複製されていることが示唆されたが、pActluc 導入群では DNA は MboI に抵抗性で培養細胞中で複製されていないこと

がわかった。4 週間後では pEBActluc 導入群の DNA は依然として保たれ MboI 感受性であったのに対し pActluc 導入群では染色体外にはプラスミド DNA は存在しなかった。一方 BHK 細胞ではどちらのプラスミドを導入しても 4 日後において酵素活性は低下していたが、pEBActluc のほうがやや活性の保持は良いようであった。これは EBvirus の複製が齧歯類の細胞中でははたらかないと言われていることを反映していると考えられる。次に神経に分化させ非分裂のラット PC12 細胞における導入遺伝子発現の変化を調べた。pActluc 導入群ではルシフェラーゼ活性が徐々に低下したのに対して pEBActluc 導入群では酵素活性は全く変化せず維持された。なおこの細胞が分裂していないことは細胞数の経日変化が見られないことから判断された。マウスの肝臓に HVJ-liposome で導入すると約一ヶ月の遺伝子発現を認めた(図 1)。潜伏感染装置を持たないと一週間で発現がなくなった³⁾。

考察

1. 正電荷脂質含有リボソームは培養細胞系では遺伝子導入効率が負電荷リボソームに比較して高いが、生体組織では逆転する。組織内への遺伝子導入のためには組織内透過性が重要で正電荷リボソームは表面でトラップされるが負電荷リボソームは拡散が可能であるために効率がよいのであろう。
2. AVE-liposome が高い遺伝子導入効率を有するのは、この組成のリボソームがサイズが最小(約 380nm)であること、細胞膜に結合後、融合し膜成分の再配分がおこるがこれがスムーズにおこるのではないかと推察される。
3. EB virus の EBNA-1 と Ori-P 配列を有するプラスミドはヒト細胞中で自律増殖が可

能であり長期遺伝子発現が得られた。齧歯類の細胞では自律増殖が不可能と推定されたが、核内によく保持されていると考えられる。この結果は生体臓器での長期遺伝子発現がかなり期待できることを示しておりより大型動物での検証が必要である。

文献

1. Dzau, V J, Mann, M, Morishita, R et al. Kaneda, Y. Fusigenic viral liposome for gene therapy in cardiovascular diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 93, 11421-11425, 1996

2. . Saeki, Y, Matsumoto, N, Nakano, Y et al. Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus); Reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. Human Gene Therapy 8, 1965-1972, 1997

3. Saeki, Y, Wataya-Kaneda, M, Kaneda, Y Sustained transgene expression in vitro and in vivo using an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ-liposomes. Gene Therapy 5, 1031-1037, 1998

Abstract

Development of more efficient gene delivery system for human gene therapy

by

Yasufumi Kaneda, Yoshinaga Saeki

from

Division of Gene Therapy Science, Osaka University School of Medicine, Suita, Osaka
565-0871, Japan

Toward human gene therapy, we have developed highly efficient liposomes coated with HVJ (Sendai virus) fusion proteins. These HVJ-liposomes introduced DNA, RNA, antisense-oligonucleotides (AS-ODN), ribozymes and proteins directly into the cytoplasm. To enhance gene expression, nuclear proteins, such as HMG-1, were co-introduced with plasmid DNA. Gene transfer in vivo by this delivery system is repeatable since it is much less immunogenic and cytotoxic compared with other vector systems. [Method] We have improved HVJ-liposomes for more efficient delivery and long-term gene expression. To increase gene delivery efficiency, we developed a novel anionic HVJ-AVE (artificial viral envelope) liposome and cationic HVJ-DC liposome by changing lipid components of liposomes. For long-term gene expression, we employed Epstein-Barr virus (EBV) replicon vectors using oriP sequence and EBNA-1. [Results] HVJ-AVE liposome was 10 times efficient in in vivo gene expression than conventional HVJ-liposome, and HVJ-DC liposome was 100 times more efficient in in vitro gene expression than conventional HVJ-liposome. We also concluded that AVE- and DC-liposome had different characters in gene delivery and that proper liposome should be chosen dependent upon the target organ and target disease. When Epstein-Barr virus (EBV) replicon vector was coupled with HVJ-liposomes, the gene expression in mouse liver lasted more than 1 month while it was not detected in 1-2 weeks by the plasmid without EBV sequences. [Conclusion] HVJ-liposome system has been improved for more efficient gene delivery and long-term gene expression. Actually, this system has been useful for gene therapy of cancers and common diseases.

腎間質線維化に対する遺伝子治療の可能性の検討

今井圓裕、猪阪善隆、堀 正二、金田安史*

はじめに

腎間質の線維化とは、腎間質に細胞外基質蛋白が蓄積した状態であるが、多くの尿細管細胞は萎縮あるいは消失し、間質には単核球の浸潤と線維芽細胞の増殖を伴っている。このような間質の線維化は尿細管間質性腎炎などによって糸球体病変を伴うことなく形成される場合と、糸球体障害に続発して起こってくる場合があるが、腎疾患の原因に関わらず終末像に至る過程で共通してみられる病理変化である。間質線維化の程度は残存腎機能に相関し、腎疾患の予後を反映する指標としては糸球体病変の程度よりもむしろ良い指標となる。このような間質線維化の分子機序が明らかとなり、腎障害の慢性進行過程が解明されれば、腎障害の進展を抑制しうる可能性があるが、現在までのところでは糸球体硬化の機序に比べて解明が進行していないのが現状であり、今後の研究により明確にされる必要がある。

TGF- β (transforming growth factor- β)は細胞外基質代謝に対して非常に強力な作用を有するサイトカインである。TGF- β と腎の関わりについては、これまで多くの研究が糸球体をターゲットとして行われてきた。多くの実験腎炎で糸球体でのTGF- β 増加が証明され、ヒトの腎病変においても慢性腎炎、糖尿病性腎症ほか多くの疾患で糸球体硬化病変において発現が増強していることが報告されている。また、TGF- β に対する抗体¹⁾やアンチセンスオリゴヌクレオチド導入²⁾、TGF- β の生理的中和物質であるデコリンの骨格筋への発現³⁾によりThy-1腎炎の糸球体細胞外基質沈着が抑制されることから、糸球体細胞外基質増加と、TGF- β は強く関係しているものと考えられる。

大阪大学病態情報内科学

*大阪大学遺伝子治療学

一方、間質線維化においても、いくつかの実験モデルで間質線維化に伴ってTGF- β が多く発現しており、また、TGF- β を肝臓で高発現するトランスジェニックマウス⁴⁾では糸球体硬化とともに間質の線維化が認められることなどは間質線維化へのTGF- β の関与を示唆している。進行性腎間質線維化モデルである一側尿管結紮ラット腎においては、TGF- β が発現し間質細胞の形質転換、線維化に関与していることが報告されている。今回は、この一側尿管結紮(unilateral ureteral obstruction: UUO)モデルを用いて、腎間質線維化に対してTGF- β アンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ODN) による遺伝子治療法の有効性について検討した。

対象および方法

我々は増殖因子であるTGF- β の糸球体での過剰発現が糸球体硬化病変の直接の因子であることを示し⁵⁾、さらにアンチセンスDNAを利用して腎でのTGF- β の遺伝子発現を抑制することによる遺伝子治療²⁾を報告してきたが、今回は間質細胞をターゲットとした遺伝子治療の可能性について検討した。

従来のHVJ-リポソーム法では腎間質へは高率に遺伝子を導入することができないため、artificial viral envelope (AVE)を用いた改良型HVJ-liposome法⁶⁾を用いた逆行性遺伝子導入法を試みた。6週齢の雄性SDラットの尿管にカテーテルを留置し、artificial viral envelopeを用いた改良型HVJ-liposome法により逆行性にFITCラベルしたオリゴDNAを腎臓に導入した。導入後20,40,60分間の尿流遮断群および10分間の尿流・腎静脈血流同時遮断群について遺伝子導入効率を検討した。また、導入された細胞の同定のために、type IV collagenでcounter stainingを行った。