

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

吸引圧法の腎臓疾患治療への応用に関する研究

研究分担者 川上 茂 長崎大学大学院医歯薬総合研究科 教授

本研究の目的は、吸引圧法を難治性腎疾患モデル動物の治療に応用することである。本年度は、まず腎疾患モデルラットへの吸引圧法の適用を検討した。次に、腎臓への吸引圧法による核酸医薬品であるオリゴ核酸の導入を行ったが、有効な結果を得られなかった。速やかに腎疾患治療へと研究を展開するため、遺伝子治療薬を用いる方針とし、hBMP7タンパク質を発現するプラスミドDNAの構築及び、吸引圧法による腎臓への導入を行った。

A. 研究目的

本年度（2年目）は、腎疾患モデルラット腎臓への吸引圧法の適用を試みた。また吸引圧法による健常マウス腎臓へのオリゴ核酸導入を検討した。さらに治療用タンパク質を発現するプラスミドDNAを構築し、それをを用いて健常マウス腎臓に対して、吸引圧法を適用した。

B. 研究方法

B-1. 腎疾患モデルラットの作製

ラット（Wister/ST、雌、7週齢）深麻酔下において正中線を切開、開腹し、左輸尿管を露出させた。縫合糸を用いて2か所結紮し、結紮した箇所を切断することで片側尿管結紮（UUO）モデルを作製した。

B-2. 腎臓への吸引圧法

マウス（ICR、雌、5週齢）、およびラット（Wister/ST、雌、7週齢）に麻酔を行い、開腹し、腎臓を必要最小限露出させた。尾静脈からCMVプロモーター制御下でルシフェラーゼを発現するプラスミドDNAを、マウスに対しては100 µg含む生理食塩水を200 µl、ラットに対しては1 mg含む生理食塩水を2 mL投与し（あるいはマウス、ラットに対して4

mg/kg投与し）、その直後に、腎臓の標的とする部位に軽くデバイスを接触させ、吸引圧制御システムを作動させた。ただちに閉腹し、6時間経過後、マウス及びラットを安楽死させて腎臓を取り出し、標的部位中のルシフェラーゼの発現量をルミノメーターで測定した。

B-3. 腎臓へのオリゴ核酸導入

マウス（ICR、雌、5週齢）に麻酔を行い、開腹し、腎臓を必要最小限露出させた。外因性遺伝子のノックダウンには、尾静脈からルシフェラーゼ遺伝子を発現するプラスミドDNAを100 µgと、ルシフェラーゼ遺伝子に対するsiRNAを50 µg含む生理食塩水200 µLを投与した。内因性遺伝子のノックダウンにはGAPDHに対するsiRNAを50 µg含む生理食塩水200 µLを投与した。投与後ただちに閉腹し、6時間後、および24時間後に遺伝子の発現量をルミノメーター及びリアルタイムRT-PCRにより測定した。ルシフェラーゼ遺伝子に対するsiRNA及びスクランブルsiRNAの配列は次の通りである。siRNA: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' (センス鎖) 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3' (アンチセンス鎖)、スクランブルsiRNA: 5'-CUUACGCUGUCAUGAUCGAdTdT-3' (センス鎖) and 5'-

UCGAUCAUGACAGCGUAAGdTdT-3' (アンチセンス鎖)。
 GAPDHに対するsiRNA及びスクランブルsiRNAの配列は次の通りである。
 siRNA: 5'-CAAGAGAGGCCCUAUCUCC AdTdT-3' (センス鎖)、
 5'-UGGGAUAGGGCCUCUCUUGdTdT-3' (アンチセンス鎖)、スクランブル
 siRNA:
 5'-CGCAACUACCGAUGCGAACdTdT-3' (センス鎖)、
 5'-GUUCGCAUCGGUAGUUGCGdTdT-3' (アンチセンス鎖)。
 GAPDHの発現量を定量したリアルタイムRT-PCRでは次の配列のプライマーを用いた。GAPDH 5'-TCTCTGCGACTTCAACA -3' (forward)、5'-GCTGTAGCCGTATTCATTGT -3' (reverse)、β-actin: 5'-GTTCTACAAATGTGGCTGAGGACTT-3' (forward)、5'-TTGGGAGGGTGAGGGACTT-3' (reverse)

B-4. hBMP7発現プラスミドDNAの構築

pF1KB6604ベクター (かずさDNA研究所) からhBMP7のcDNAフラグメントをpcDNA3ベクター (Invitrogen社) のマルチクローニングサイト (Hind III/Xba I サイト) に挿入することにより作製した。作製したpDNAは大腸菌DH5αへの形質転換後に増殖させ、pDNA精製キットJETSTAR2.0 Plasmid Giga Prep Kits 12 (GENOMED社) により抽出並びに精製を行った。

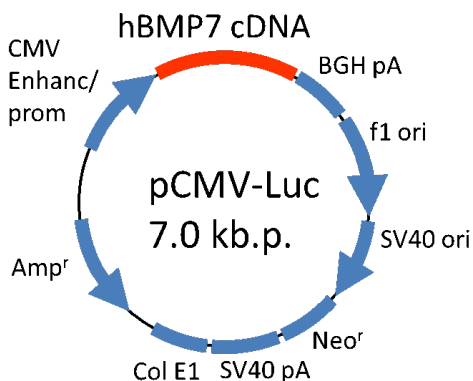


図1 構築したhBMP7発現プラスミドDNA

B-5. hBMP7タンパク質量測定 (in vitro, in vivo)

In vitroの実験においては、リポフェクタミンを遺伝子導入試薬として用いて、遺伝子導入24時間後の細胞中、および培養上清中のhBMP7濃度をELISAにより定量した。細胞は液体窒素並びに37の温浴に交互に4回侵漬し凍結、融解し、タンパクを抽出した。

In vivoの実験においてはまず吸引圧法および押圧法を右腎臓に適用し遺伝子を導入した。6時間経過後、組織ライセート中、および血清中のhBMP7濃度をELISAにより定量した。まず、臓器を脱血後に摘出し、コンプリート、ミニ、EASYPack (ロシュ社) を含むPBS中でホモジナイザーを用いて破碎し、4、13000 rpm、10分遠心後の上清を組織ライセートとして得た。また、深麻酔下で下大静脈より採取した血液を4で一晩静置し、室温で3000 rpm、15分間の遠心後の上清を血清として得た。

hBMP7濃度はQuantikine ELISA (R&D system社) により定量した。

B-6. リアルタイムRT-PCRによるhBMP7遺伝子の発現量測定

吸引圧法および押圧法を右腎臓に適用し遺伝子を導入し、6時間経過後、右腎臓の遺伝子発現量をリアルタイムRT-PCRにより定量した。具体的にはまず右腎臓を摘出し、全RNAをGen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma aldrich社) により抽出した。Primescript RT reagent Kit(タカラバイオ株式会社) を用いて逆転写反応を行い、各mRNA量はSYBR Premix Ex Taq(タカラバイオ株式会社) を利用してLight Cycler system (Roche Diagnostics社) によるリアルタイムRT-PCRにより、hBMP-7の発現量を定量した。用いたプライマーは次の通りである。
 hBMP7: 5'-CCGGGAACGCTTCGACAATG -3' (forward)、5'-CAGAGGGTACGGCTGTTCGAG -3' (reverse)

B-7. 腎臓への押圧法

マウス（ICR、雌、5週齢）に麻酔を行い、開腹し、腎臓を必要最小限露出させた。尾静脈からCMVプロモーター制御下でhBMP7を発現するプラスミドDNAを100 µg含む生理食塩水を200 µl投与し、その直後に、過去に研究室で報告している圧力制御デバイスを用いて腎臓にデバイスを接触させ、0.5 N/cm²の圧力で押圧した。ただちに閉腹し、6時間経過後、マウスを安楽死させて腎臓を摘出し、標的部位のhBMP7の発現量をELISA並びにリアルタイムRT-PCRにより定量した。

（倫理面への配慮）

動物実験を行うのにあたり、京都大学で策定された動物実験倫理規定に従ってプロトコルを作成し、倫理委員会の承認を受けるとともに、実験遂行時にはプロトコルを遵守した。DNAを取り扱う実験を行うにあたり、同様に承認を受け、環境問題および実験者の安全に十分に配慮して実験を行った。

C. 研究結果

C-1. UUOモデルラットの作製と吸引圧法

我々は初年度にUUOモデルマウスを作製し、病態腎臓に対して、押圧法によりプラスミドDNAを導入できることを示した。本年度は、UUOモデルラットの作製を行い、病態腎臓に対して、吸引圧法でプラスミドDNAの導入を行った。

左腎の輸尿管を結紮して3週間後のUUOモデルラット腎臓に対して、吸引圧法を行った。核酸としてルシフェラーゼ発現プラスミドDNAを用いた。その結果、左右の腎臓に健常ラットの腎臓と同等のレベルのルシフェラーゼ発現量が認められた。このことから、ラット病態腎臓に対して、吸引圧法が有効であることが分かった。

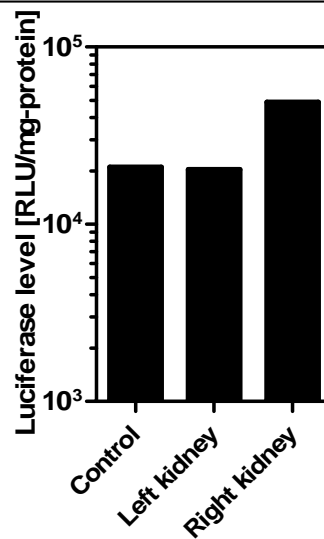


図2 UUOモデルラット腎臓に対する吸引圧法

C-2. マウス腎臓へのオリゴ核酸導入の検討

次に健常マウスを用いて、オリゴ核酸の導入を検討した。まず初めに、外因性遺伝子の発現抑制を行った。ルシフェラーゼを発現するプラスミドDNAとルシフェラーゼ遺伝子に対するsiRNAを共投与し、ルシフェラーゼ発現が抑制されるかどうか調べた。その結果、共投与群とプラスミドDNAのみ投与群で同等のルシフェラーゼ発現量が得られた。次に、内在性の遺伝子であるGAPDHに対するsiRNAを吸引圧法で健常マウスの腎臓に導入し、GAPDHの遺伝子の発現量を抑制できるかどうか調べた。コントロールとして、無処置群、スクランブルsiRNA群（GAPDHのsiRNAの配列をランダムに並べ替えたsiRNAを投与）を用いた。その結果、GAPDHの発現量に変化が見られなかった。

以上のように、腎臓に対するsiRNAを用いた吸引圧法によって、外因性、内因性の遺伝子の発現を抑制することができなかった。

C-3. hBMP7発現プラスミドDNAの構築

上述したように、腎臓への吸引圧法により核酸医薬品（siRNA）による遺伝子発現抑制効果を得られなかった。この

ことから、速やかに腎臓に対する疾患治療へと研究を展開するために、遺伝子治療薬であるプラスミドDNAを用いることを選択し、検討を進めた。まず、hBMP7を発現するプラスミドDNAを構築した（手順は研究方法に記載）。構築したプラスミドDNAがhBMP7を発現するかどうか、培養細胞（B16BL6）に導入し調べた。細胞、培養上清に含まれるhBMP7量を測定したところ、培養上清に多くのhBMP7が分泌されていることが分かった。これらの結果から、構築したプラスミドDNAはhBMP7を発現すること、さらにhBMP7は培養上清中に分泌されることが確認された。

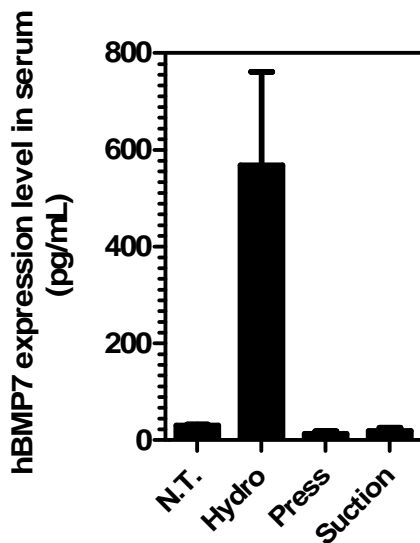


図3 腎臓への吸引圧法を行ったマウス血清中のhBMP7量測定

C-4. hBMP7発現プラスミドDNAを用いた腎臓への吸引圧法

次に、構築したプラスミドDNAを吸引圧法で健常マウス腎臓に導入し、腎組織中、血清中のhBMP7のタンパク質量を調べた。ポジティブコントロールとして、ハイドロダイナミクス法により、肝臓にhBMP7発現プラスミドDNAを導入したマウスを用いた。その結果、ポジティブコントロール群では、血清中に高い濃度でhBMP7が存在していることが確認されたが、腎臓への押圧法や吸引圧法で核酸導入した群では、血清中にhBMP7が検出されなかった。このことから、押圧法や吸引圧法では、

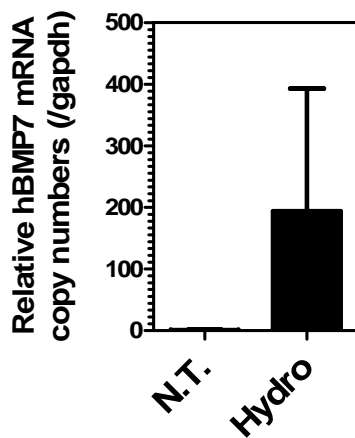
hBMP7発現プラスミドDNAが腎臓細胞に導入されない、あるいは導入されても発現しない可能性があると考え、押圧、吸引圧法を行った腎臓あたりのhBMP7遺伝子発現量を調べる実験を行った。その結果、ポジティブコントロールとして用いたハイドロダイナミクス法でプラスミドDNAを導入した肝臓では、無処置マウスの肝臓に比べて、194倍のhBMP7が発現していることが分かった。また腎臓への押圧法、吸引圧法を行った群では、それぞれ69倍、26倍のhBMP7遺伝子の発現が観察された。これらの結果から、hBMP7発現プラスミドDNAは、押圧法、吸引圧法を用いて健常マウスの腎臓に導入することが可能であることがわかった。

D. 考察

初年度に、UUOモデルマウスを作製し、UUOモデルマウスの腎臓に対して吸引圧法を適用出来る可能性を示した。そこで本研究では、UUOモデルラットを作製し、病態腎臓に対して、吸引圧法が適用可能であることを示した。これにより、吸引圧法による難治性腎疾患治療実現の可能性が示唆された。本研究では、核酸医薬品であるsiRNAを用いて、腎臓において、外因性、内因性の遺伝子発現を抑制しようと試みたが、有効な結果が得られなかった。その理由は不明であり、今後の検討課題である。このため核酸医薬品による腎疾患治療は困難であると思われた。そこで、遺伝子治療薬を用いた腎疾患治療を行うという研究方針に切り替え、研究を進めた。腎疾患の治療用タンパク質として、骨形成因子であるBMP7を選択した。BMP7は線維化の進行の主要な因子であるTGF- β を抑制し、線維化の抑制だけでなく障害された腎組織の修復が報告されているタンパク質であり、慢性腎臓病に対する新規治療薬となり得る。しかし、その広範な副作用が問題となり実用化には至っていない。本研究により、吸引圧法を用いて腎臓特異的にBMP7を作用させることができれば、BMP7を用いた腎疾患治療が可能になると期待される。本研究では、実際にhBMP7発現プラスミドDNAを構築し、健常マウスの腎臓に

において、hBMP7の遺伝子発現が増大していることを明らかにした。一方、ELISA法を用いたタンパク質量測定では、発現の向上は検出されなかったが、これは、発現したhBMP7タンパク質の絶対量が少ないため、血清中に分泌されてしまうと濃度が薄まり、ELISAの検出感度を下回ったと考えられる。今後は、吸引箇所を増やし、腎臓あたりの発現量を向上させることで、タンパク質レベルでの発現向上が確認できると思われる。今後、腎疾患モデルマウスの腎臓に対して、構築したhBMP7発現プラスミドDNAを導入することで、難治性腎疾患モデルの治療の実現が期待される。

a)



b)

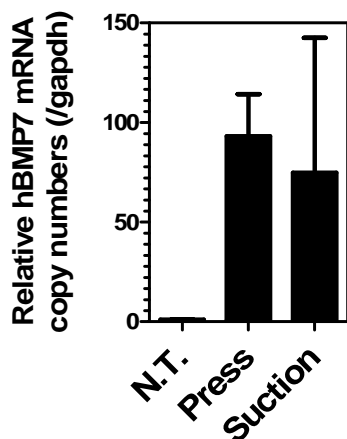


図 4 腎臓への吸引圧法を行ったマウス腎臓における hBMP7 遺伝子発現量の変化

ハイドロダイナミクス法 (a)、押圧法と吸引圧法 (b)

E. 結論

本年度は、腎疾患モデル動物の病態腎臓に対して吸引圧法が適用可能であることを示した。また治療用タンパク質遺伝子をマウス腎臓で高発現させることに成功した。このことから吸引圧法による腎疾患モデル動物の治療応用の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Shimizu, K., Zhang, G., Kawakami, S., Taniguchi, Y., Hayashi, K., Hashida, M., Konishi, S. *Liver suction-mediated transfection in mice using a pressure-controlled computer system.* Biological Pharmaceutical Bulletin, 37(4): 569-575 (2014)
Highlighted paper selected by Editor-in-Chief

学会発表

谷口陽太、川上茂、林昂司、清水一憲、小西聡、山下富義、橋田充：腎臓への吸引圧核酸導入法における吸引圧条件の最適化、遺伝子/デリバリー研究会 第13回シンポジウム、帝京大学、日本、2013年5月11日 (土)

張光元、清水一憲、川上茂、小西聡、橋田充：Hepatic suction-based site-specific transfection in mice : improving naked plasmid DNA transfer to the liver by optimization of suction conditions and device softness、日本薬剤学会 第28年会、愛知県産業労働センター、日本、2013年5月25日 (土)

清水一憲、川上茂、張光元、谷口陽太、林昂司、木下秀之、桑原宏一郎、中尾一和、橋田充、小西聡：吸引圧を利用したin vivo核酸導入法における吸引圧波形の検討、第65回日本生物工学会大会、広島国際会議場、日本、2013年9月20日 (金)

清水一憲、張光元、谷口陽太、小西聡、

川上茂、橋田充：吸引圧を利用したin vivo核酸導入法による疾患治療、化学工学会第79回年会、岐阜大学、日本、2014年3月18日（火）

依頼講演など
なし

著書
なし

A. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

特許取得
METHOD FOR OPERATING A DEVICE

FOR DELIVERING A SUBSTANCE TO BE INTRODUCED, AND METHOD FOR DELIVERING A SUBSTANCE TO BE INTRODUCED

Inventor : Kazunori Shimizu, Satoshi Konishi, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida

欧州出願：11835898.5
（出願日2013年5月21日）

実用新案登録
なし

その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

吸引圧法の心臓疾患治療への応用に関する研究

研究分担者 木下 秀之 京都大学医学部附属病院 医員

本研究では、吸引圧法を難治性心疾患の治療に応用することを目指している。本年度（最終年度）は心疾患治療のため、心筋梗塞モデルマウスへの吸引圧法を行った。また吸引圧法が健常マウスの心機能に与える影響を長期的な観点で調べた。その結果、心筋梗塞モデルマウスの心臓に吸引圧法が適用可能であった。また吸引圧法はマウス心機能に明らかな障害を与えないことが明らかとなった。

A. 研究目的

本年度は、吸引圧法による心疾患治療の実現に向けて、次の2点を実施することを目的とした。一つ目は、心筋梗塞モデルマウスの心臓に対して、吸引圧法が適用可能であるかどうかを明らかにすることである。二つ目は、心臓への吸引圧法が長期的な観点で心機能に与える影響の有無を健常マウスを用いて明らかにすることである。

B. 研究方法

B-1. 心臓への吸引圧法

麻酔下のマウスの呼吸を人工呼吸器で管理し、開胸した。マウス尾静脈からルシフェラーゼ発現プラスミドDNAを100 µg含む生理食塩水200 µlを投与した。直後に、吸引デバイスを目的部位に軽く接触させ、吸引圧制御システムを作動させた。

B-2. Tail-cuff法

Tail-cuff法を用いて、マウスの収縮期血圧を測定した。用いた装置は、無加温型非観血式血圧計（室町機械株式会社）である。

B-3. 心臓超音波法

マウス左室機能評価を心臓超音波検査

により行った。測定した項目は、左室拡張末期径、左室収縮末期径、内径短縮率、壁厚、心拍数である。

B-4. 心筋梗塞モデルマウスの作製

まず挿管し、人工呼吸器を装着した。左第4番肋骨と第5番肋骨の間から開胸し、前下行枝を結紮した。結紮には7-0縫合糸を用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験を行うのにあたり、京都大学で策定された動物実験倫理規定に従ってプロトコルを作成し、倫理委員会の承認を受けるとともに、実験遂行時にはプロトコルを遵守した。DNAを取り扱う実験を行うにあたり、同様に承認を受け、環境問題および実験者の安全に十分に配慮して実験を行った。

C. 研究結果

C-1. 心筋梗塞モデルマウスへの吸引圧法

心筋梗塞モデルマウスを作製し、研究代表者らとともに、心臓に対して吸引圧法を行った（結果は総括研究報告書に記した）。

C-2. 吸引による心機能への影響

初年度に、心臓を吸引して約10日前後での心機能への影響を調べた。Tail cuff法、超音波検査法を行ったが、無処置群、シャムオペ群、吸引群のいずれの群間でも有意差は見られなかった。そこで、本年度は、長期的な心機能への影響を調べた。吸引圧法を行い、3か月後での心機能を、Tail cuff法により、収縮期血圧、心拍数を測定した。また超音波法を用いて、左室拡張末期径、左室収縮末期径、内径短縮率、壁厚、心拍数を測定した。その結果、いずれの測定項目においても、いずれの群間に有意な差は観察されなかった。このことより、心臓の吸引圧法は心機能に影響を与えないことが分かった。

表1 心機能への影響（3か月後）

		コントロール群	sham手術群	吸引群
tail-cuff法	収縮期血圧 (mmHg)	99.7 ± 3.1	101.5 ± 2.9	101.5 ± 2.0
	心拍数 (/min)	623.7 ± 24.1	600.5 ± 24.1	627.0 ± 20.8
心臓超音波検査	左室拡張末期径 (mm)	2.98 ± 0.14	3.06 ± 0.13	2.95 ± 0.11
	左室収縮末期径 (mm)	1.54 ± 0.14	1.49 ± 0.17	1.37 ± 0.11
	内径短縮率 (%)	48.5 ± 2.2	51.9 ± 3.9	53.9 ± 2.3
	壁厚 (mm)	0.90 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.89 ± 0.02
	心拍数 (/min)	744.4 ± 10.1	711.3 ± 23.0	707.2 ± 32.5

D. 考察

本研究では、心筋梗塞モデルマウスを作製し、その心臓に対して吸引圧法を行い、ルシフェラーゼ発現プラスミドDNAを、梗塞部位あるいはその周辺に導入することに成功した。心筋梗塞モデルマウスに対して、吸引圧法を適用したのは初めてであり、本手法による心筋梗塞モデル治療の可能性を示すことができた。

また本研究では、マウス心臓への吸引圧法が心機能に与える影響を、心臓を吸引してから3か月後のマウスを用い

て調べた。初年度に、心臓を吸引してから約10日後の健常マウスの心機能を調べ、吸引が心機能に影響を与えないことを明らかにしていた。本年度の結果から、3か月後のマウスにおいても心機能に影響がみられなかったことから、マウス心臓を吸引することは、心機能に大きな影響を与えないということが示唆された。

E. 結論

本研究により、心筋梗塞モデルマウスの治療に吸引圧法が有効である可能性が示された。また、心臓への吸引圧法は安全な手法であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

清水一憲、川上茂、張光元、谷口陽太、林昂司、木下秀之、桑原宏一郎、中尾一和、橋田充、小西聡：吸引圧を利用したin vivo核酸導入法における吸引圧波形の検討、第65回日本生物工学会大会、広島国際会議場、日本、2013年9月20日（金）

依頼講演など

なし

著書

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

