

Alport 症候群の骨髄幹細胞による
細胞遺伝子治療法の検討

(課題番号 16390296)

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究補助金

(基盤研究 (B))

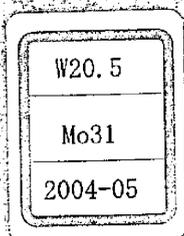
研究成果報告書



平成 18 年 4 月

研究代表者 内山 聖

(新潟大学・大学院医歯学系・教授)



W20.
No.31
2004-05

はしがき

アルポート症候群は、血尿で始まる進行性腎症と難聴を伴う遺伝性の疾患で、遺伝性腎症としては最も頻度の高い疾患である。

本症の病因は、腎糸球体基底膜の主要な構成成分である IV 型コラーゲン α 鎖の $\alpha 3$ (COL4A3)、 $\alpha 4$ (COL4A4) あるいは $\alpha 5$ 鎖遺伝子 (COL4A5) の突然変異によることが明らかにされ、これらの変異により、糸球体基底膜の基本骨格である IV 型コラーゲン α 鎖による高次の網目構造が形成されないため糸球体基底膜の菲薄化、層状化、断裂が生じ、糸球体基底膜が担っている濾過機能が次第に失われる結果、蛋白尿が増加し、最終的には糸球体硬化に至る。これまでに、それぞれの遺伝子変異を持つモデル動物が報告されているが、マウスでは、Col4a3 ノックアウトマウス、Col4a3 と Col4a4 の両方にまたがった挿入変異のある Col4 Δ 3-4 トランスジェニックマウスおよび Col4a5 ノックアウトマウスが現在までに報告され、私たちが作成した Col4a4 マウスノックアウトマウスもまた、COL4A4 変異による常染色体劣性遺伝型式のアルポート症候群のモデルマウスとしてその表現系を呈している。

これらのモデル動物を用いて、腎糸球体硬化への進行を阻止あるいは抑制できる治療法の開発目的に、これまでいくつかの本症の治療が試みられているが、未だに確立された治療法はないのが現状である。

本研究は Alport 症候群の治療にコラーゲン遺伝子を導入した骨髄幹細胞を用いるという新しい試みである。

研究組織

研究代表者：内山 聖（新潟大学・医歯学系・教授）

研究分担者：里方一郎（新潟大学・医歯学系・教授）

研究分担者：伊東達雄（新潟大学・医歯学系・助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	5,300	0	5,300
平成 17 年度	2,300	0	2,300
総計	7,600	0	7,600

研究発表

(1) 学会誌等

[総説] なし

[原著論文] なし

(2) 口頭発表

[国内学会発表]

- 1) 伊東達雄：Alport 症候群の治療法開発に向けた基礎的研究，第 39 回日本小児腎臓病学会学術集会，熊本，2004. 7. 2，プログラム抄録集：63-64，2004

(3) 出版物

なし

研究成果の概要

緒言

Alport 症候群は、1927 年に Alport により初めて報告された遺伝性糸球体腎症で、伴性劣性遺伝、常染色体劣性遺伝、および常染色体優性遺伝形式、さらに孤発例も存在する。本症の頻度は人口 5000 人に 1 人と決して稀な疾患ではなく、腎不全への進展阻止に有効な薬物療法がないため、10~30 歳の若年期に大部分の症例が腎不全に陥り、血液透析ないし腎移植により生命を維持せざるを得なくなる。そのため、腎不全の進行を阻止ないし抑制することのできる新しい治療法の開発が切望されている。本症の病因については、1990 年に伴性劣性遺伝型 Alport 症候群が腎糸球体基底膜(GBM)の主要な構成成分である IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖遺伝子(Col4A5)の突然変異により発症することが初めて報告され、その後、常染色体劣性ないし優性遺伝型は $\alpha 3$ 鎖あるいは $\alpha 4$ 鎖遺伝子(Col4A3 あるいは Col4A4)の突然変異が原因であることが明らかにされた。これらの変異により、GBM の基本骨格である IV 型コラーゲン $\alpha 3,4,5$ 鎖による高次の網目構造が形成されないために結果として GBM の菲薄化、断裂などが生じ、血尿、蛋白尿をきたして、最終的には腎不全に至る。

腎糸球体硬化への進行を阻止あるいは抑制できる治療法の開発目的に、これまでいくつかのモデル動物を用いた本症の治療が試みられている。これらの治療成績には、samoyed dog にサイクロスポリン A(CyA)を投与して尿蛋白、糸球体ろ過率(GFR)の改善、病理組織学的変化が抑制されたとする報告や、samoyed dog にアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEi) を投与して尿蛋白抑制効果と、

生存期間の延長を認めたとする報告、Col4a3 ノックアウトマウスに ACEi を投与し、治療開始時期と治療期間で3グループに分け、治療開始時期が早いグループで尿蛋白抑制効果と生存期間の延長が認められ、長期間の治療の方がさらに効果があることを証明した報告などがあり、私達のモデルマウスでもこれらの薬剤に有効性を認めている。しかしながら、すでにヒトにも使用されているこれらの薬剤は、一部の患者で有効性を認める報告がなされているものの、症例によっては無効例も存在しており、未だに確立された薬物療法はないのが現状である。また、薬物療法以外に、遺伝子治療としてアデノウイルスベクターを用いた IV 型コラーゲン α 5 鎖遺伝子の豚腎臓への遺伝子導入の試みなどが報告されているが、導入効率、遺伝子発現の持続期間、侵襲の大きさ等に問題があり、現状では臨床応用は困難と考えられる。私たちは、本症の治療法の開発を目的に、本症のモデルマウス (Col4a4 ノックアウトマウス) を独自に作成して各種薬物療法および遺伝子治療法を検討している。本研究計画では、腎不全の阻止が可能で、かつ、効果が永続的な治療法をめざして、コラーゲン遺伝子を導入した骨髄幹細胞による細胞遺伝子治療法の検討をマウスを用いて行った。

材料と方法

正常コントロールマウスおよび Alport 症候群のモデルマウスである Col4a4 ノックアウトマウスに放射線照射後、緑色蛍光蛋白 GFP (Green Fluorescent Protein) マウスの骨髄を移植した。なお、本実験ではマウスのストレインは C57BL6 と 129SV のハイブリッドマウスを使用したが、GVHD の問題は生じな

った。骨髄移植を行う時期としては、GBM の不規則な肥厚と菲薄化、層状化および断裂、足細胞の足突起の融合・消失および GBM からの剥離、半月体形成など、本症の典型的な病理組織学的所見が明瞭になる生後 1 2 週より前として、生後 4 週、8 週について検討した。これまでの報告では、mesangium 細胞への分化は骨髄移植後 5 日目頃から観察されることより、本検討では、移植後 4 週後の生後 8 週、1 2 週に凍結切片を作成し、腎糸球体で蛍光を発する GFP 陽性細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察して数えた。

次に、最も効果的な時期に、GFP マウス、あるいは、IV 型コラーゲン $\alpha 4$ 鎖を産生する骨髄幹細胞を *Col4a4* ノックアウトマウスに移植し、腎構成細胞へ分化させることで糸球体基底膜領域 (GBM) に IV 型コラーゲン $\alpha 3,4,5$ 鎖による網目構造が形成されるのかを検討した。

結果

1) GFP マウスを用いた骨髄幹細胞移植の検討

Alport 症候群のモデルマウスである *Col4a4* ノックアウトマウスでは、正常コントロールマウスに比べて、骨髄幹細胞を骨髄移植すると、腎糸球体細胞に分化する頻度がどの程度高まるのかを検討した。*Col4a4* ノックアウトマウスでは、移植期間が 4 週齢から 1 2 週齢および、8 週齢から 12 週齢の群で、約 10%、野生型マウスに移植した場合と比べ、腎糸球体細胞に分化する頻度が高まることが明らかになった (図 1. c,d, 表 1)。移植期間が 4 週齢から 8 週齢の群が、野生型マウスに移植した場合と比べ頻度に変化がないことから、病理組織学的な所見が明らかになってくる時期 (8 週齢から 12 週齢) に一致して骨髄からの

遊走、分化が促進されると考えられた。また、発色細胞が糸球体構成細胞のどの細胞に分化したかを腎の凍結切片を用いて、二重染色法 (laminin, synaptopodin) で検討した。発現細胞は synaptopodin の内側に存在し、内皮あるいはメサンギウムに分化していると考えられた (図 2. a,b)。なお、この骨髄移植により、基底膜領域 (GBM) に IV 型コラーゲン $\alpha 3,4,5$ 鎖の発現は抗体染色で認められなかった。

2) IV 型コラーゲン $\alpha 4$ 鎖を産生する骨髄幹細胞移植の検討

4週齢の *Col4a4* ノックアウトマウスに、本症に対する遺伝子治療の有効性を検証する目的で作成した IV 型コラーゲン $\alpha 4$ 鎖遺伝子を強制発現するトランスジェニックマウスの骨髄を移植した。本トランスジェニックマウスは、表現形に明らかな異常を認めず、また、このマウスから得られた骨髄幹細胞は、恒久的な発現が期待でき、細胞に遺伝子導入をする場合と比べ、培養期間も短期間になり分化する危険性も少ないことから、*Col4a4* ノックアウトマウスに対する幹細胞移植の効果判定に用いた。野生型マウスの骨髄移植と同様、基底膜領域 (GBM) に IV 型コラーゲン $\alpha 3,4,5$ 鎖の発現は抗体染色で認められなかった (図 2. c,d)。

このことから、IV 型コラーゲン $\alpha 4$ 鎖のみを強制発現させても、通常に発現している IV 型コラーゲン $\alpha 3,5$ 鎖が微量であるために細胞内で有効に利用されず、ヘテロ三量体を形成していない、あるいは、検出できないほど微量であることが考えられた。IV 型コラーゲン $\alpha 3,4,5$ 鎖ともに強制発現させた場合、ヘテロ三量体は、安定であることから、上皮細胞に分化しなくとも内皮あるいは

メサンギウムから基底膜領域 (GBM) に三量体が移行し、網目構造を構成することも考え、以下のトランスジェニックマウスを作成を考えた。

3) IV 型コラーゲン $\alpha 3,4,5$ 鎖のヘテロ三量体を産生する IV 型コラーゲン鎖を産生・分泌できる骨髄幹細胞を得るために、CAG-*Col4a3, Col4a4, Col4a5, LacZ* Tg マウスを作成する。

活性の強い CAG プロモーターに *Col4a3, Col4a5* cDNA をつないだ人工遺伝子と、CAG プロモーターに *Col4a4* cDNA と発現部位が明らかになるように LacZ をつないだ人工遺伝子を等モル数になるように調整し、マイクロインジェクションにより CAG-*Col4a3/a4/a5/LacZ* Tg マウスを作成した (図 3)。生まれてきたマウスから骨髄を採取し、IV 型コラーゲン $\alpha 3, 4, 5$ 鎖が骨髄細胞で産生されることを、RNA および蛋白レベルで確認した (図 4. a, b, c, d)。

4) IV 型コラーゲン鎖を産生・分泌する骨髄細胞の *Col4a4* ノックアウトマウスへの骨髄移植

この IV 型コラーゲン鎖を産生・分泌する骨髄細胞を 4 週齢 *Col4a4* ノックアウトマウスに放射線照射後に移植した。移植された骨髄幹細胞が、腎糸球体に運ばれて mesangium 細胞あるいは内皮細胞に分化した際、IV 型コラーゲン鎖が産生・分泌されるかを検討した。

12 週齢で解剖し、腎臓の切片を用いて、IV 型コラーゲン $\alpha 3,4,5$ 鎖それぞれについて抗体染色を行ったが、腎糸球体基底膜 (GBM) 領域には、明らかな $\alpha 3,4,5$ 鎖の局在を認めなかった。

考察

骨髄幹細胞は多分化能を有し、置かれた場により、神経細胞、心筋細胞、肝細胞などに分化しうる。腎糸球体では、骨髄幹細胞を移植した場合、内皮あるいは mesangium 細胞に分化し、他の実験腎炎モデルの傷害糸球体で寄与率が高まることは、すでに報告されており、今回、Alport 症候群の傷害糸球体でも骨髄幹細胞が、内皮あるいは mesangium 細胞に分化する頻度が高まることが明らかになった。しかし、1つの糸球体に数個の IV 型コラーゲン産生骨髄幹細胞が定着・分化すれば、GBM の変性は抑制できるのではないかと予測していたが、実際には GBM には IV 型コラーゲン $\alpha 3,4,5$ の 3 量体は認められなかった。この理由として、骨髄幹細胞が糸球体上皮細胞に分化できなかったことから考えると、糸球体構成細胞では上皮細胞が GBM での IV 型コラーゲンのネットワーク形成になんらかの役割を持っており、上皮細胞以外の細胞で産生された IV 型コラーゲンの 3 量体はネットワークを形成できず、排出されてしまう可能性が考えられる。また、Alport 症候群の傷害糸球体においても糸球体構成細胞に分化した細胞の寄与率は依然として低いことも否定できない。今後の課題として、寄与率を高めるために、主として、糸球体構成細胞への分化に関与している間葉系幹細胞の割合を増やして移植することなども検討する必要がある。

骨髄幹細胞を用いる方法は、本研究での GBM の構造を直接的に修復させる治療には有効性を得られなかったが、病勢の抑制を目的として液性因子などを産生させる遺伝子デリバリー法としては、腎疾患でも有効と考えられる。患者本人の骨髄幹細胞を用いるのでドナーの確保や拒絶反応の問題が解消される、などの利点もあり、今後臨床応用への可能性がある方法と考える。

図説

表1. 移植期間による腎糸球体構成細胞に分化する骨髄幹細胞の寄与率の変化。

Col4a4^{-/-}: アルポートモデルマウス Col4a4^{+/+}: 野生型マウス **: 野生型

マウス比べた場合の有意差 $p < 0.05$

移植期間が4週齢から12週齢および、8週齢から12週齢の群で、野生型マウスに移植した場合と比べ、寄与率が有意に高かった。

図1. a, b. 移植期間が4週齢から12週齢のアルポートモデルの骨髄細胞（12週齢） a: スメアの光顕像 b: 同じ検体のEGFPの蛍光発色像

c, d. 移植期間が4週齢から12週齢のマウスの腎糸球体でのEGFPの蛍光発色像（12週齢） アルポートモデルマウスの糸球体の方が、野生型マウスに比べより多くの発色細胞を認めた。

図2. a, b. EGFP発現細胞の局在、synaptopodinによる二重免疫組織化学

図1で使用した12週齢の腎切片（a）を上皮細胞のスリット膜を構成する蛋白synaptopodinの抗体染色した（b）。赤く発色する（矢印）膜状の部分がsynaptopodinの存在する領域であり、EGFP発現細胞はその内側に認められることから内皮あるいはメサンギウムに分化していると考えられた。

図3. CAG-Col4a3, Col4a4, Col4a5, LacZ Tgマウスの作成

活性の強いCAGプロモーターにCol4a3, Col4a5 cDNAをつないだ人工遺伝子と、CAGプロモーターにCol4a4 cDNAと発現部位が明らかになるようにLacZをつな

いだ人工遺伝子を等モル数になるように調整し、マイクロインジェクションによりCAG-*Col4a3/a4/a5*/LacZ Tgマウスを作成した。

図 4. CAG-*Col4a3, Col4a4, Col4a5, LacZ* Tg マウスの骨髄細胞での *Col4a3, Col4a4, Col4a5* の発現

a. 8週齢のTgマウスと野生型マウスの骨髄間葉系細胞を培養し、この細胞での*Col4a3, Col4a4, Col4a5*のメッセージレベルの発現をReal time PCRにより検討した。いずれの α 鎖ともに強い発現を認めた。

Tg: CAG-*Col4a3, Col4a4, Col4a5, LacZ* Tg WT: 野生型マウス

b. 8週齢のTgマウスの培養細胞の*Col4a4*抗体染色像 蛍光抗体法による検討でも3系統の α 鎖ともに蛋白レベルでの発現を認めた (図は、*Col4a4*のみ)。

EGFP陽性細胞/ 糸球体 週齡	Col4a4-/-	Col4a4+/+
4週齡BMT~8週齡 (n=4)	26.7±5.6	25.6±4.2
4週齡BMT~12週齡 (n=4)	28.7±5.3 **	25.4±5.0
8週齡BMT~12週齡 (n=5)	28.2±6.0 **	25.7±5.2

** : p<0.05

表 1

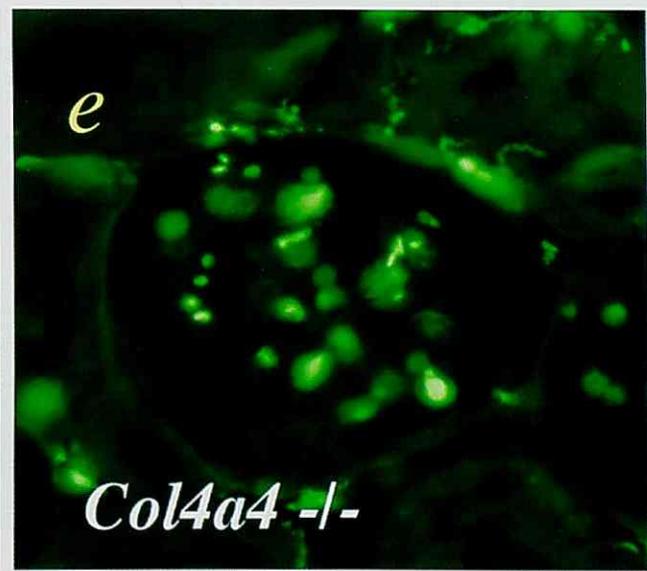
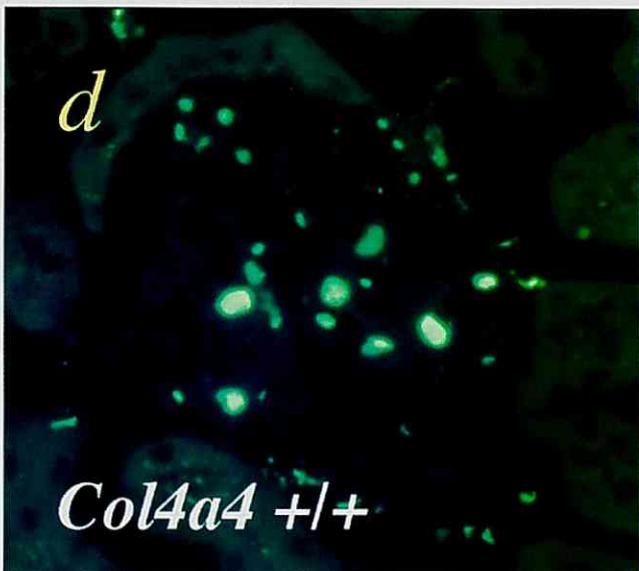
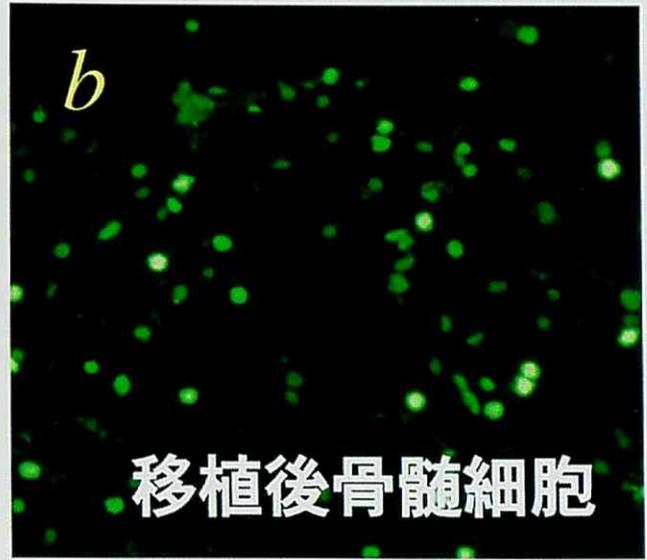
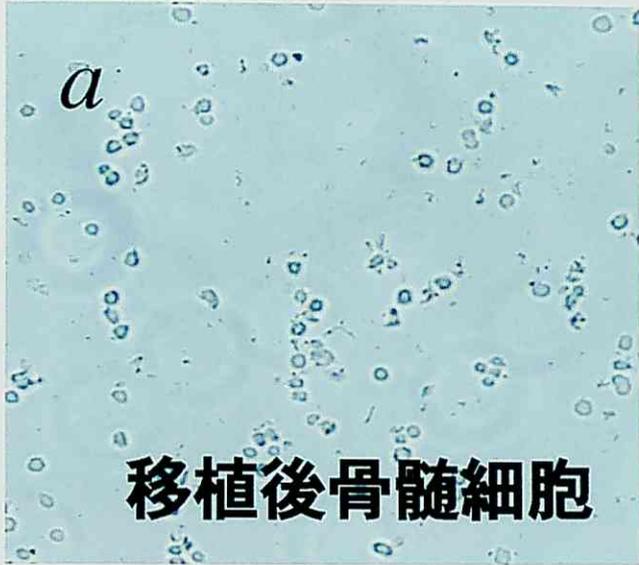


図1

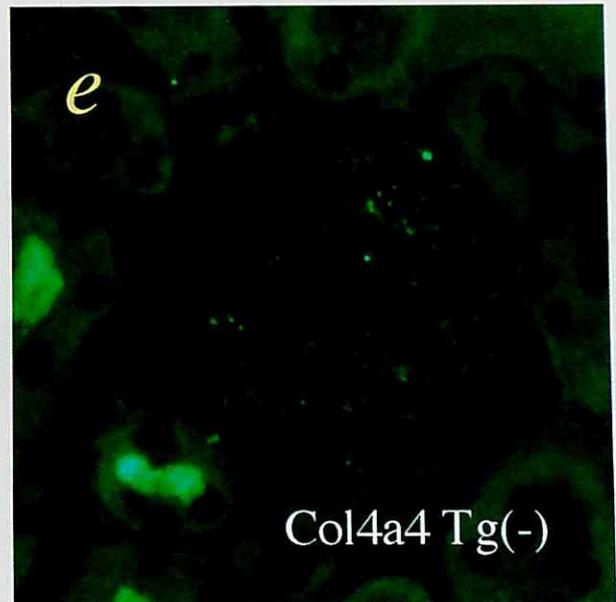
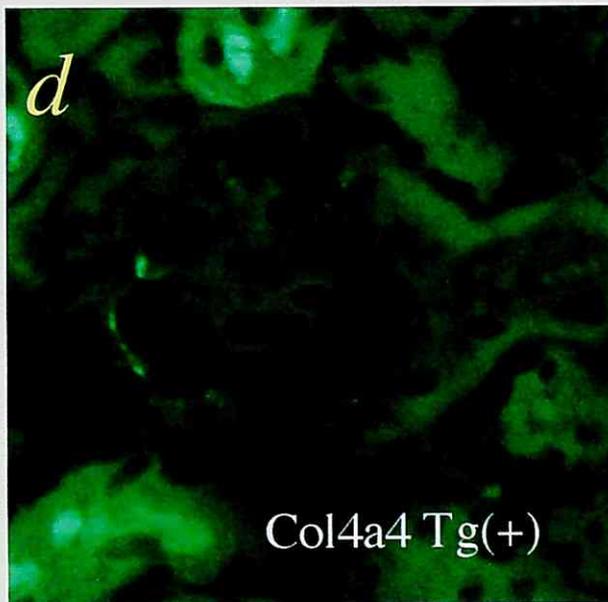
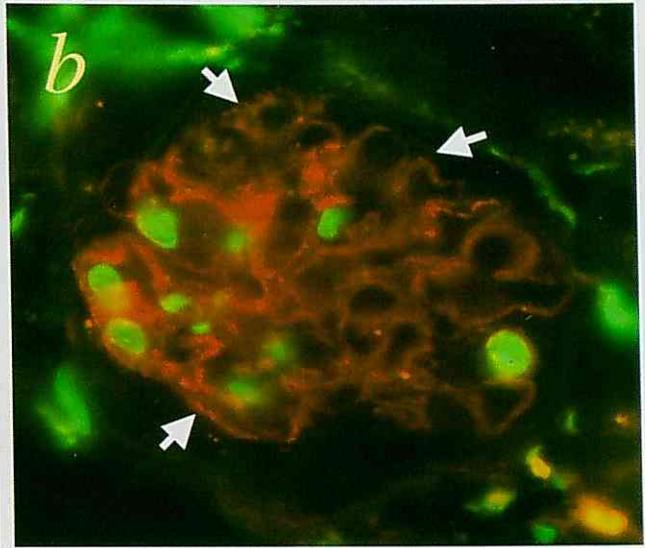
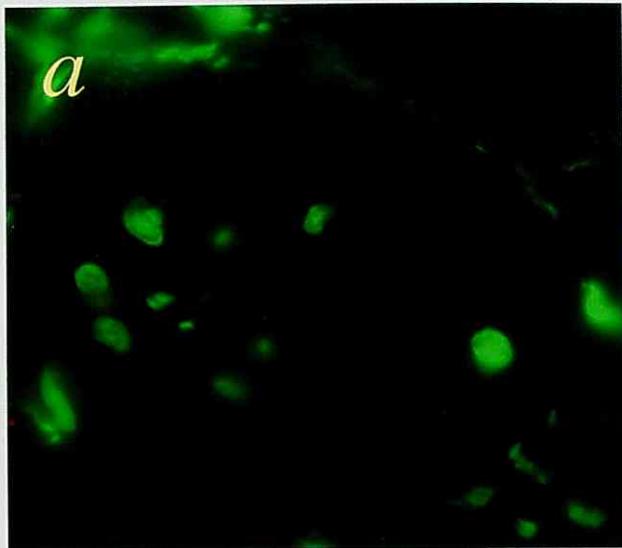
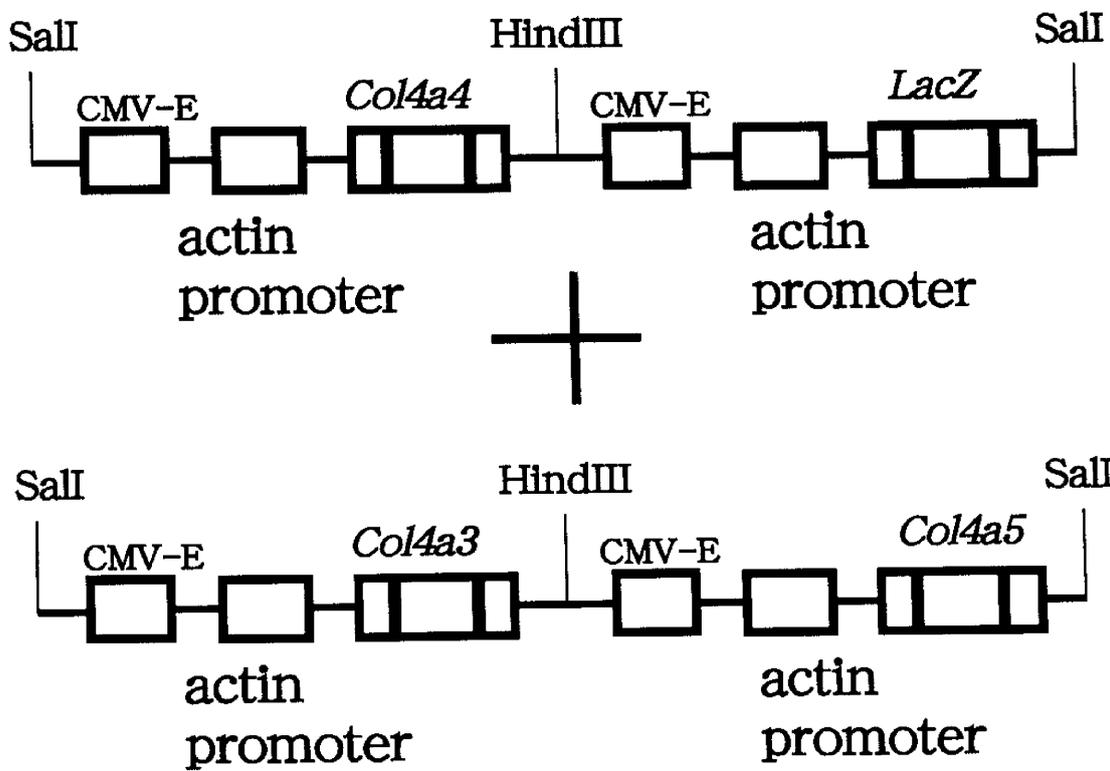
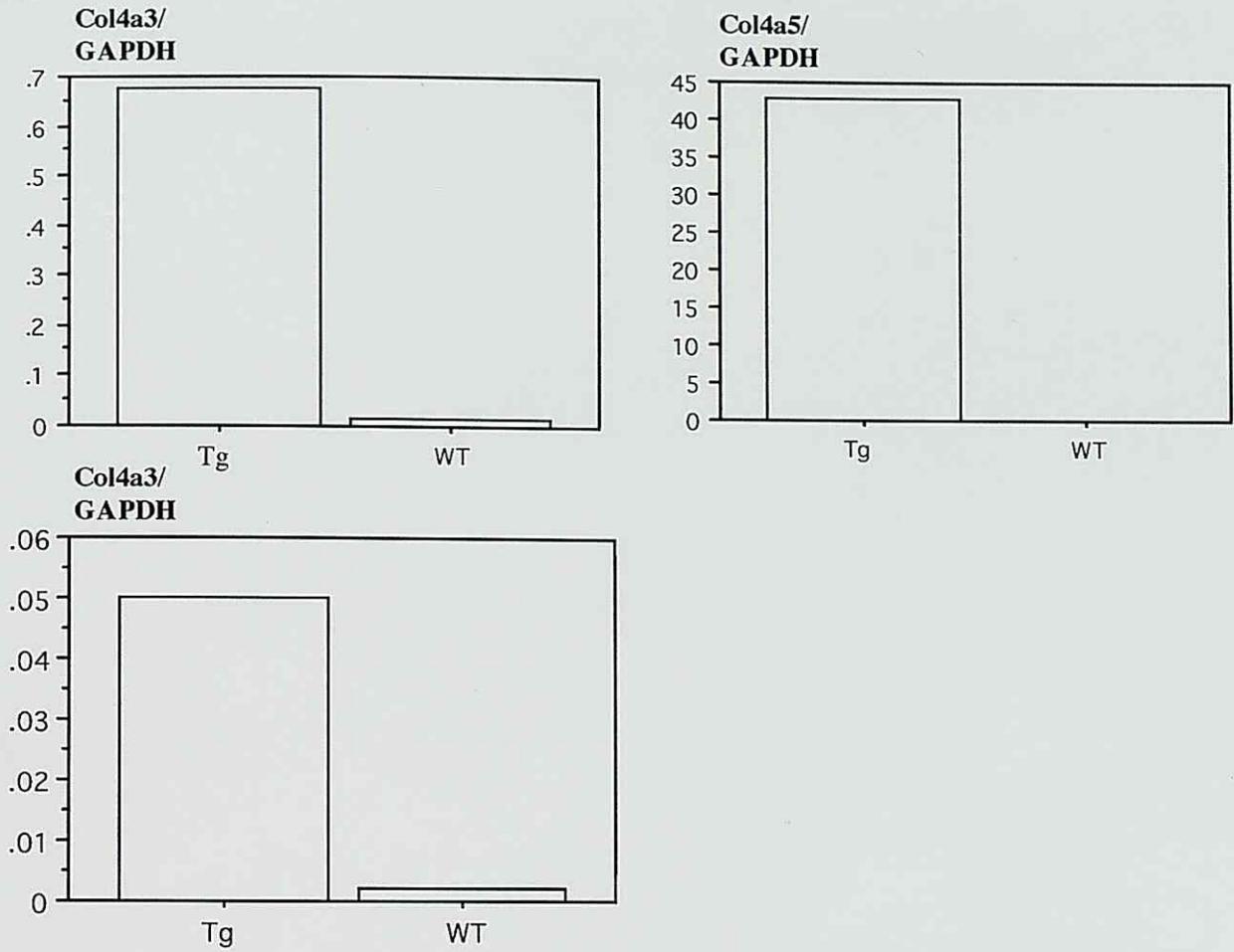


图2



☒3

a



b

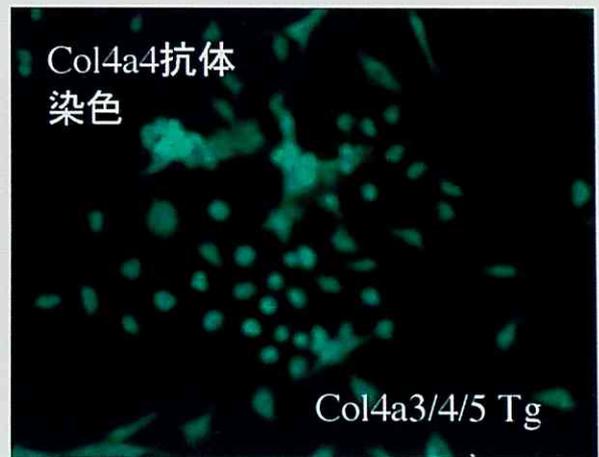
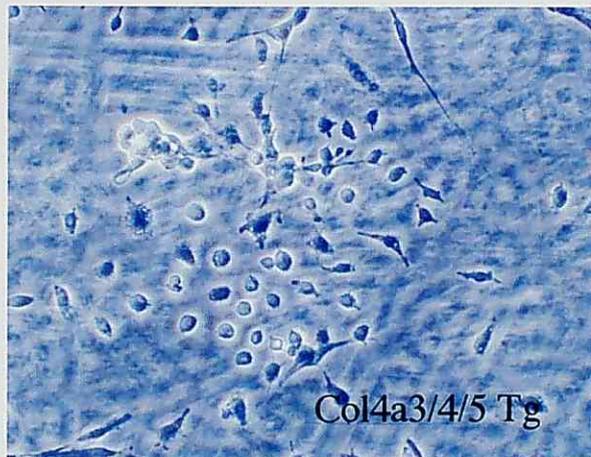


图4