

いそ べ まさ つぐ

氏 名	磯 部 賢 諭
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第27号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	<i>In vivo</i> エレクトロポレーション 法を用いた Hepatocyte Growth Factor による Alport 症候群モデルマウスの遺伝子治療の検討:Hepatocyte Growth Factor は Alport 症候群モデルマウスの尿蛋白を抑制できる
論文審査委員	主査 教授 内 山 聖 副査 教授 山 本 格 副査 教授 下 條 文 武

博士論文の要旨

【目的】肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor : HGF)は、急性腎不全モデルマウスにおいては尿細管の再生を促進し、慢性腎炎モデルマウスでは尿細管の線維化を抑制する作用が報告され、現在、慢性腎疾患への適応が検討されている。今回、私は、有効な薬物療法がないとされる Alport 症候群の腎症に対して、エレクトロポレーション法を用いた HGF による遺伝子治療の有効性を Alport 症候群モデルマウスを用いて検討した。

【方法】Alport 症候群モデルマウスとして、IV型コラーゲン $\alpha 4$ 鎖遺伝子をノックアウトした *Col4a4*ノックアウトマウスを用いた。導入遺伝子として筋肉特異的に遺伝子発現を行う SR α プロモーターにヒトの HGF cDNA (hHGF)をつなぎ、さらに、遺伝子導入された細胞をマーキングするために LacZ 遺伝子を付けたプラスミド pHGF-LacZ を作成し、エレクトロポレーションにより 4 週齢の Alport 症候群モデルマウス腓腹筋に導入した。8 週齢より尿蛋白を測定し、8 週齢・12 週齢での腎組織所見及び生存期間について検討した。

【結果】hHGF 遺伝子の発現期間を検討したところ、hHGF 遺伝子の発現は、エレクトロポレーション法では約 3 週間持続すると考えられた。尿蛋白/クレアチニン比は、12 週齢で、対照群 (n=6) 53.8 ± 25.7 (平均値 \pm 標準偏差)、hHGF 遺伝子導入群 (n=4) 25.0 ± 10.6 であり、hHGF 遺伝子導入群で有意 (p=0.033) に蛋白尿は抑制された。電顕では、8 週齢の対照群で、糸球体基底膜の著明な肥厚および層状化、糸球体上皮細胞足突起の平坦化が多数の糸球体に認められたが、hHGF 遺伝子導入群では、糸球体基底膜は不整な箇所が認められるものの肥厚および層状化は明らかではなく、上皮細胞足突起も比較的保たれていた。光顕では、8 週齢の糸球体上皮細胞数は、対照群に比較して、hHGF 遺伝子導入群では有意に多く保たれていた。また hHGF 遺伝子導入群では、12 週齢の半月体形成は対照群に比較して有意に抑制され、線維性変化をきたした糸球体も少なかった。生存期間でも、hHGF 遺伝子導入群で有意に生命予後の改善が認められた。TGF- $\beta 1$ の発現は、対照群と比べ 6 週齢の hHGF 遺伝子導入群マウスの糸球体では抑制されていたが、8 週齢では、発現抑制は認められなかった。このことから TGF- $\beta 1$ の発現抑制は、hHGF 遺伝子の発現期間内に生じることが考えられた。また、8 週齢の腎間質の α -SMA の発現でみた筋線維芽細胞の蓄積は、対照群と比べ hHGF 遺伝子導入群で抑制され、間質の線維形成が抑制されて

いることが考えられた。

【考察】HGF は、Alport 症候群モデルマウスの蛋白尿を抑制し、病理組織所見の増悪を遅らせることが判明した。また、HGF は、本マウスの腎症の引き金と考えられる糸球体上皮細胞の変性および基底膜からの剥離・減少を抑制することが、今回の病理組織学的検討から明らかになった。この上皮細胞の障害性変化を HGF が抑制する機序には、hHGF 遺伝子導入群マウスで認められた糸球体での TGF- β 1 の発現抑制が関与していると考えられた。本研究結果より、HGF の Alport 症候群モデルマウスに対する重要な効果としては、糸球体の線維化がまだ始まっていない時期の糸球体上皮細胞への細胞障害を抑制することと初期の尿管間質障害の変化である myofibroblasts の増加の抑制にあると考えられた。今後、HGF はヒト Alport 症候群への臨床応用に向けて検討されるべき薬剤になると思われる。

審査結果の要旨

Alport 症候群モデルマウスで、エレクトロポレーション法を用いた肝細胞増殖因子 (hHGF) による遺伝子治療の有効性を検討した。12 週齢で、尿蛋白 / クレアチニン比は hHGF 遺伝子導入群で有意に抑制された。電顕では、8 週齢の対照群で糸球体基底膜の著明な肥厚と層状化、糸球体上皮細胞足突起の平坦化を多数の糸球体で認めたが、hHGF 遺伝子導入群では変化がわずかであった。光顕では、8 週齢の糸球体上皮細胞数は hHGF 遺伝子導入群で有意に多く保たれていた。また hHGF 遺伝子導入群では、12 週齢の半月体形成は有意に抑制され、線維性変化も少なく、生命予後は有意に改善した。TGF- β 1 の発現は、hHGF 遺伝子の発現期間 (3 週間) 内の 6 週齢の hHGF 遺伝子導入群マウス糸球体では抑制されていたが、8 週齢では発現抑制を認めなかった。また、8 週齢の腎間質 α -SMA の発現でみた筋線維芽細胞の蓄積は、hHGF 遺伝子導入群で抑制され、間質の線維形成が抑制されていると考えられた。

以上、HGF は Alport 症候群モデルマウスの蛋白尿を抑制し、病理組織所見の増悪を遅らせ、腎症の引き金と考えられる糸球体上皮細胞の変性および基底膜からの剥離・減少を抑制することを明らかにした点に、学位論文としての価値を認める。