

氏名	つちや しゅういち 土谷 修一
学位	博士(医学)
学位記番号	新大院博(医)第195号
学位授与の日付	平成19年 3月22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	Alport 症候群モデルマウスに対する Hepatocyte Growth Factor(HGF)遺伝子を用いた長期間の遺伝子治療検討 ーエレクトロポレーション法による反復 HGF 遺伝子導入の有効性についてー
論文審査委員	主査 教授 内山 聖 副査 教授 木南 凌 副査 教授 山本 格

## 博士論文の要旨

### 【緒言】

本研究では、Alport 症候群モデルマウスにマウス HGF をエレクトロポレーションすることで反復遺伝子導入を可能とし、その有効性をより臨床応用に近い形で検討した。また、HGF の効果と TGF- $\beta$ 1 との相互関係を明らかにするために、本モデルマウスの単離系球体、ラットメサンギウム細胞を用いて検討を行った。

### 【方法】

#### 1. 無治療 Alport モデルマウスの系球体での HGF 発現と受容体 c-Met の発現の検討

8週齢の野生型マウスと Alport モデルマウスの単離系球体 RNA を用い、HGF と c-Met の発現を判定量的 RT-PCR 法で検討した。また、さらに腎臓の凍結切片を用いて HGF と c-Met の蛍光抗体染色を行った。

#### 2. エレクトロポレーションによる Alport モデルマウスへのマウス HGF 遺伝子の反復遺伝子導入とその効果判定

HGF 遺伝子の導入は、発現ベクターにマウス HGF cDNA(mHGF)をつないだプラスミドを4週齢から3週毎にエレクトロポレーションにより筋肉に導入した。エレクトロポレーション前後の血中 HGF および TGF- $\beta$ 1 濃度を ELISA 法で測定した。また、効果判定のため、4週毎に尿蛋白、病理組織などの検討を

おこなった。8週齢マウスでは、上皮細胞数をWT1抗体による核染色により測定し、HGFの糸球体での抗アポトーシス作用を明らかにするため、TUNEL染色も行った。また、単離糸球体RNAを用いて、HGFの作用機序に関する詳細について検討を行った。

### 3. ラットメサンギウム細胞へのTGF- $\beta$ 1およびHGFの添加実験

初代培養ラットメサンギウム細胞にrhTGF- $\beta$ 1を添加、2ngと4ng/mlの2種類の濃度に分け培養した。また、TGF- $\beta$ 1に用いたものとは別に、メサンギウム細胞にCAGプロモーターにmHGFをつないだpCAG-mHGFを遺伝子導入し培養した。それぞれRNAを抽出し、HGFとTGF- $\beta$ 1相互の制御機構についてReal Time PCRを用いて検討した。

#### 【結果】

1)8週齢マウスにおけるHGFの発現は、C4a4 koマウスでは野生型マウスと比べ抑制されていた。逆にc-Metの発現は、野生型マウスよりもC4a4 koマウスの障害糸球体において亢進していることがわかった。2)血中HGF濃度は、尿蛋白が顕在化する以前から低下し始め、腎症の進行に伴って野生型マウスの半分以下まで低下した。また、エレクトロポレーションによるC4a4 koマウスのHGF血中濃度は高値に保たれていた。3)mHGF群では、無治療のC4a4 koマウスに比べ尿蛋白および、血中クレアチニン、BUNの抑制効果があり、生命予後も有意に改善した。4)対照群に比べ、mHGF群で8週齢の糸球体上皮細胞数は有意に保たれ、TUNEL陽性の上皮細胞は有意に減少していた。5)TGF- $\beta$ 1を添加したメサンギウム培養細胞ではHGFの発現は抑制され、4ng添加した細胞でより強く抑制された。また、mHGFを強制発現させた細胞では、TGF- $\beta$ 1の発現は抑制された。6)8週齢マウスの単離糸球体を用いたRT-PCRの結果では、対照群は、転写制御因子Smad2,3が増加していたが、mHGF群では、発現は抑制されていた。また、TGIFは、野生型マウスに比べ対照群で減少していたが、mHGF群では、有意に増加していた。

#### 【考察】

本研究では、メサンギウム細胞の培養実験においてHGFとTGF- $\beta$ 1が互いにその発現を抑制し、分子機能を調節していることを証明した。本マウスの血中HGF濃度の低下は、腎臓でのTGF- $\beta$ 1の発現増加と血中TGF- $\beta$ 1濃度増加に起因し、また、HGF遺伝子治療は、血中HGF濃度の増加させることで、血中TGF- $\beta$ 1濃度を低下させていることが推測された。

長期間のHGF遺伝子治療は、C4a4 koマウスの腎症に対して有効であった。本症でのHGFのTGF- $\beta$ 1に対するシグナル調節機構として、転写制御因子Smad2,3の発現を抑制することや、核内でSmad複合体と転写共役因子の結合を阻害するTGIFを増加させることで、TGF- $\beta$ 1シグナル標的遺伝子の発現を抑制することが示された。本研究においてHGFは、低HGF血症を改善することで、TGF- $\beta$ 1の発現お

よび生物活性を抑制させ、病初期には糸球体における基底膜の変性を軽減して、アポトーシスをはじめとする糸球体上皮細胞への細胞障害を抑制し、また病中期以降では同様の機序で尿細管間質の線維化抑制作用を発揮し、有効に作用すると考えられた。

HGF はヒトへの臨床応用に向けて検討されるべき薬剤であると考えられた。

### ( 論文審査の要旨 )

本研究は、Alport 症候群モデルマウス(C4a4ko マウス)において HGF 遺伝子導入の効果を明らかにすることを目的とした。未治療の C4a4ko マウスの 8 週齢における検討では、野生型マウスより HGF 発現は抑制され、血中 HGF 濃度も低下していたが、逆に c-Met 発現は亢進していた。C4a4ko マウスにエレクトロポレーション法でマウス HGF 遺伝子を反復導入したところ、血中 HGF 濃度は高値に保たれ、尿蛋白減少、血中クレアチニン・BUN の上昇抑制、および生命予後の改善がみられた。また、マウス HGF 遺伝子を反復導入した群では、8 週齢において糸球体上皮細胞数は有意に保たれ、TUNEL 陽性の上皮細胞は有意に減少していた。さらに、ラットメサンギウム培養細胞に TGF- $\beta$ 1 を添加すると HGF の発現は抑制され、mHGF を強制発現させた細胞では TGF- $\beta$ 1 発現は抑制された。8 週齢マウスの単離糸球体を用いた RT-PCR の結果では、転写制御因子 Smad2,3 発現は未治療群で増加していたが、mHGF 群では抑制されていた。

以上、本研究は、C4a4ko マウスで血中 HGF 濃度低下が腎症の進行と関係すること、メサンギウム細胞培養実験で HGF と TGF- $\beta$ 1 が互いに発現を抑制し、分子機能を調節していること、さらに、長期間の HGF 遺伝子治療が C4a4ko マウスの腎症に対して有効であ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。