

平成 17 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

ふりがな（ローマ字）		OKUYAMA AKIHIKO				
①研究代表者氏名		奥山 明彦		②所属研究機関・部局・職 大阪大学・大学院医学系研究科・教授		
③研究課題名	和文	移植腎への HGF 遺伝子導入の臨床研究				
	英文	Electroporation-mediated HGF gene transfer for preserving graft survival.				
④研究経費 金額単位：千円	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
	7,600	22,500	0	0	0	30,100
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
奥山 明彦	大阪大学・大学院医学系研究科・教授	泌尿器科学	研究の総括			
高原 史郎	大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座・教授	先端移植基盤学	移植腎生着および遺伝子治療の安全性・有効性に関する研究。遺伝子導入されたブタへの腎移植および移植後の管理。腎移植される患者へのHGF遺伝子導入、腎移植および移植後の管理。			
今井 圓裕	大阪大学・大学院医学系研究科・講師	腎臓内科	HGF遺伝子の作製、ブタ移植腎へのHGF遺伝子導入。 HGF遺伝子導入による腎保護作用の検討			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>Hepatocyte Growth Factor(以下 HGF)は短期間の使用では安全であることが証明されている。既に我々は腎移植での慢性拒絶反応において HGF の直接投与によって慢性拒絶反応が回避されることを証明した(J Am Soc Nephrol: 12:1280-1293,2001)。現在の腎移植における最大の問題は慢性拒絶反応による腎機能廃絶(腎死)である。この慢性拒絶反応は阻血など移植時のダメージによって引き起こされることが既に明らかになっている(Transplantation 64:190,1997)。また、生体腎移植においても、提供者の半数以上は 60 才以上であり、このような高齢の腎臓は当然予備力も少なく、やはり慢性拒絶反応に繋がっている。そこで本研究では、受者への HGF 遺伝子導入によって移植直後の腎機能の回復を促進することによって長期の移植腎生着を図ることを目的とする。</p> <p>(1)ブタ移植腎への HGF 遺伝子導入の安全性試験 申請者らは既に 1)ラット慢性拒絶反応・腎線維化モデルにおいて、移植後短期間の HGF 投与が移植腎の長期生着を可能にしたこと (J Am Soc Nephrol: 12:1280-1293,2001)、2)ラットの 5/6 腎摘・腎線維化モデルにおいて、electroporation 法による筋肉内への HGF 遺伝子導入によって腎の長期生着を可能にしたことを証明した (J Am Soc Transplant: in press)。また、ブタの片腎のみを自家腎移植し、同時に移植腎への electroporation 法による HGF 遺伝子導入によって移植腎内において HGF が過剰に発現していることを確認した(論文作成中)。さらに小動物における安全性試験については、申請者らは既にマウスとラットの実験から、electroporation 法によって導入され、産生された HGF の血中濃度は 2 週間以内に正常値まで下降することを確認している。また本実験の目的である早期の腎機能回復には移植後 2 週間以内の効果で十分であることも知られている。しかし臨床で同様の試みを行う前に、長期間にわたって HGF 血中濃度が高値を持続することがないこと、あるいは腎および他の臓器への影響がないことを確認する必要がある。そこで本実験では、HGF を導入したブタを 6 カ月間飼育し、経時的に屠殺し、血液検査によって異常検査値がないこと、および病理診断によって各臓器の異常がないことを確認する。</p> <p>(2)腎移植の臨床での HGF 遺伝子筋肉内導入試験 腎移植の手術時に同時に HGF 遺伝子の移植腎への導入を行い、有効性と安全性を検討する。</p>						

⑦ 研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)**1) シクロスポリン腎障害に対するHGF遺伝子治療の効果の検討**

シクロスポリン(CsA)などのカルシニューリン阻害薬の登場により、移植腎の短期生着率は飛躍的に向上したが、慢性移植腎症に起因する後期移植腎廃絶は、いまだ移植医療の問題点の1つである。HGFを用いたCsA腎症に対する遺伝子治療の可能性について検討した。

減塩下で連日シクロスポリンを皮下注射し、CsA腎症モデルを作成した。投与開始1週、2週後にエレクトロポレーション法にてCsA腎症モデルラットの筋肉にHGF遺伝子を導入し、HGF遺伝子導入の効果を検討した。組織学的検討により、vehicleを導入したCsA群では、2週後・3週後ともに細動脈硝子化や尿細管細胞障害、間質の線維化、間質の形質転換、マクロファージ浸潤を認めたが、HGF遺伝子導入群では、これらの病変はいずれも抑制されていた。また、腎皮質のTGFβ1発現を検討したところ、CsA群ではTGFβ1が上昇していたが、HGF群ではその発現が減少していることが確認された。CsA群で認められたTUNEL陽性の尿細管細胞のアポトーシスは、HGF群では軽減し、リン酸化Bad陽性細胞が増加していた。一方、細胞増殖のマーカーであるKi-67陽性尿細管細胞は、HGF群で増加しており、HGF遺伝子導入は、尿細管細胞を保生し、再生を促進していると考えられた。ヒト近位尿細管細胞株(HK-2)を用いてCsAに対するHGFの抗アポトーシス効果を検討した。CsAにより尿細管細胞にアポトーシスが誘導され、HGFがこれを抑制していることがカスパーゼ3活性測定により確認された。また、そのメカニズムとしてbcl-2、リン酸化Aktの上昇を介していることが確認された。

2) 虚血再灌流モデルを用いた移植腎に対するHGF遺伝子治療の効果の検討

HGFは移植後急性期の虚血再灌流傷害およびそれに起因する慢性移植腎症に対して有効である可能性がある。蛍光ラベルしたオリゴDNAをミニブタの腎動脈から注入し、エレクトロポレーション法により遺伝子導入を行うと、糸球体および間質細胞に遺伝子が導入されることが確認された。そこで我々はヒトへの臨床応用のために、ブタの腎臓にHGF遺伝子をエレクトロポレーションを用いて導入し、移植腎に対するHGF遺伝子治療の安全性と有効性に関する検討を行った。エレクトロポレーション法により、プラスミドベクターで導入したHGFが1週後に発現することを免疫組織化学およびELISAにより確認した。導入されたプラスミドベクターは遺伝子導入を行った腎臓にのみ存在し、他の臓器には導入されていなかった。移植腎に導入されたプラスミドベクターは遺伝子導入後6ヵ月後まで、存在していることが確認された。また、HGF遺伝子導入後1, 3, 6ヶ月目に腎臓を摘出し、組織への影響を検討したところ、コントロール群に比較して間質の線維化が抑制されていることが確認された。以上の検討から、ブタ移植腎へのHGF遺伝子導入は、安全かつ、腎保護作用を有することが確認された。

3) ヒト移植腎に対するHGF遺伝子治療の臨床研究

前述したシクロスポリン腎障害に対するHGF遺伝子導入による薬剤性障害の軽減およびブタ移植腎モデルに対するHGF遺伝子導入の安全性および移植腎保護作用の検討結果を併せて、HGF遺伝子治療は、腎移植に対して有効な治療戦略となる可能性がある。現在、ヒト移植腎への臨床応用に向け、倫理委員会に申請中であり、倫理委員会にて、承認されれば、HGF遺伝子治療の臨床試験を施行する予定である。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

日本においても、1995年から本格的な遺伝子治療臨床研究が開始され、現在ではその対象疾患も広がっており、最近では癌やエイズなど後天性疾患に対する遺伝子治療が主流となり、循環器疾患においても、閉塞性動脈硬化症などに臨床応用されるようになってきている。残念ながら、移植腎に対する遺伝子治療はいまだ行われていないが、このような最先端の研究の臨床応用が期待される場所である。

本研究は、シクロスポリン腎障害に対するHGF遺伝子導入による薬剤性障害の軽減およびブタ移植腎モデルに対するHGF遺伝子導入の安全性および移植腎保護作用の検討結果を併せて、HGF遺伝子治療は、腎移植に対して有効な治療戦略となる可能性を示唆しており、シクロスポリン腎障害や慢性移植腎症により、移植腎廃絶をきたし、維持透析療法に戻らざるを得ない患者にとって、福音となる可能性がある。現在、ヒト移植腎への臨床応用に向け、倫理委員会に申請中であり、倫理委員会にて、承認されれば、HGF遺伝子治療の臨床試験を施行する予定であり、本研究の成果が、移植患者に還元される可能性大である。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

1. H. Zhang, H. Lu, S. Enosawa, S. Suzuki, S. Takahara, T. Nakajima, H. Saito and K. Sakamoto
Comprehensive examination of gene expression associated with long-term stable graft acceptance by renal transplant recipients.
Clin Transplant 18: 70-78, 2004
- ②. K. Yazawa, Y. Isaka, S. Takahara, E. Imai, N. Ichimaru, Y. Shi, Y. Namba and A. Okuyama
Direct HGF gene transfer into kidney suppressed cyclosporine A nephropathy.
Nephrol Dial Transplant 19: 1-5, 2004
3. Nakajima H, Takenaka M, Kaimori JY, Hamano T, Iwatani H, Sugaya T, Ito T, Hori M, Imai E
Activation of the signal transducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin.
J Am Soc Nephrol, 15:276-85, 2004.
- ④. Mizui M, Isaka Y, Takabatake Y, Mizuno S, Nakamura T, Ito T, Imai E, Hori M
Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity.
Kidney Int 65:2041-2053, 2004
5. Imai E, Takabatake Y, Mizui M, Isaka Y
Gene therapy in renal diseases.
Kidney Int 65:1551-1555, 2004
6. Isaka Y, Nakamura H, Mizui M, Takabatake Y, Horio M, Kawachi H, Shimizu F, Imai E, Hori M
DNAzyme for TGF-beta suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis.
Kidney Int 66:586-590, 2004
7. Ma J, Matsusaka T, Yang H, Kawachi H, Shimizu F, Isaka Y, Imai E, Kon V, Ichikawa I
Local actions of endogenous angiotensin II in injured glomeruli.
J Am Soc Nephrol 15:1268-1276, 2004
8. Suzuki A, Iwatani H, Ito T, Imai E, Okabe M, Nakamura H, Isaka Y, Yamato M, Hori M
Platelet-derived growth factor plays a critical role to convert bone marrow cells into glomerular mesangial-like cells.
Kidney Int 65:15-24, 2004
9. Xin J, Homma T, Matsusaka T, Ma J, Isaka Y, Imai E, Ichikawa I
Suppression of cyclosporine A nephrotoxicity in vivo by transforming growth factor beta receptor-immunoglobulin G chimeric protein.
Transplantation 77:1433-1442, 2004
10. S.Kobayashi, K.Dono, T.Tanaka, M.Sakon, S.Takahara, Y.Isaka, E.Imai and M.Monden
Rapid recovery from liver injury in hepatectomized rat by naked HGF gene transfer with in vivo electroporation.
Hepatology (in press)

- ⑪. Y. Isaka, K. Yamada, Y. Takabatake, M. Mizui, M. Miura-Tsujie, N. Ichimaru, K. Yamawa, R. Utsugi, A. Okuyama, M. Hori, E. Imai and S. Takahara
Electroporation-mediated HGF gene transfection protected the kidney against graft injury.
Gene Therapy (in press)
12. Takabatake Y, Isaka Y, Mizui M, Kawachi H, Shimizu F, Ito T, Hori M, Imai E:
Exploring RNA Interference as a Therapeutic Strategy for Renal Disease.
Gene Therapy (in press)
13. Feng Xue, Terumi Takahara, Yutaka Yata, Kazunobu Nonome, Eiji Shinno, Masami Kanayama, Shiro Takahara, Akiharu Watanabe, and Toshiro Sugiyama
Actions of a Rho Signaling Inhibitor, Y-27632, Against Progression in a Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma
Gastroenterology(in press)

学会発表

1. 第92回 日本泌尿器科学会総会 平成16年 4月12日
特別講演 「腎臓移植の新たな展開—遺伝子治療、免疫寛容そして異種間移植へ—」
大阪大学 高原 史郎
2. 第54回 日本泌尿器科学会中部総会 平成16年11月 6日
特別講演 「腎機能改善のための新たな治療戦略」
大阪大学 高原 史郎