

腎臓への核酸導入技術の開発

向井英史,^a 川上 茂,^a 橋田 充^{*,a,b}

Development of Nucleic Acid Transfection Technology to the Kidney

Hidefumi MUKAI,^a Shigeru KAWAKAMI,^a and Mitsuru HASHIDA^{*,a,b}

^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, and ^bInstitute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University, 69 Konoe-cho, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received July 22, 2008)

The kidney is one of the most important organs that play a crucial role in homeostasis and, therefore, congenital or acquired renal dysfunction causes refractory diseases, *i.e.*, Alport's syndrome, Fabry's disease, diabetic nephropathy, IgA nephropathy, kidney cancer, transplant glomerulopathy. Nucleic acid transfection technology to the kidney is indispensable for the progress of biomedical research and the realization of gene therapy and nucleic acid drug for renal diseases. Control of renal nucleic acid transfection was difficult because of the structural complexity; however, the study of recombinant virus, synthetic carrier and physical force-mediated nucleic acid transfection to the kidney has advanced. Recombinant virus and synthetic carrier-mediated methods require long-term block of the blood or urinary flow for efficient transfection of nucleic acid because of the rich blood flow of the kidney. In contrast, physical force-mediated methods that transfect with nucleic acid *via* transient membrane permeability do not apprehend ischemia-reperfusion injury and, therefore, may be beneficial for nucleic acid transfection to the kidney. In this article, we collect the information of therapeutic gene, target molecule of the nucleic acid drug and target cells for renal diseases and structural property of the kidney from the point of view of nucleic acid transfection. Additively, current status of nucleic acid transfection technology to the kidney is reviewed.

Key words—transfection; kidney; gene therapy; nucleic acid drug; renal press mediated transfection method

1. はじめに

腎臓は、電解質並びに水の排泄を調節して体液の量や組成を一定に保つと同時に、代謝により生じた老廃物を除去し必須物質を選択的に保持する役割を果たしており、生体の恒常性維持に重要な臓器である。その先天的・後天的機能異常は、個体の生存や quality of life (QOL) に多大な影響を与え、難治性疾患が多く存在するため、腎臓は基礎医学研究、並びに、医療において重要な対象である。代表的な腎疾患として、アルポート症候群やファブリー症候群等の遺伝性疾患、糸球体が主に障害される IgA 腎症や糖尿病性腎症、また、薬物誘発性尿細管間質

性腎炎が挙げられ、疾患進行に伴い、線維化が進み腎不全状態に陥ると、透析、移植治療を必要とする。加えて、腎細胞がん、移植腎拒絶等も重要である。^{1,2)}

近年、全ヒトゲノム配列情報及びマイクロアレイ技術を基盤とした網羅的遺伝子発現解析や、高分解能質量分析装置開発が可能にしたプロテオーム解析により、多様な疾患に対して関連遺伝子が同定されており、腎疾患に関しても、糸球体腎炎等の関連遺伝子同定が報告され始め、³⁾ 今後情報の蓄積が予想される。主に、遺伝子のタンパク質合成段階を制御して治療効果を得る戦略である、遺伝子治療や核酸医薬品開発は根治療法提供に大きな可能性を秘め、透析患者人口の増加等による医療費高騰を抑制する社会的要請もあり、将来の腎疾患治療において、一定の貢献が求められる。

核酸は負電荷を帯びたデオキシリボ核酸 (DNA) やリボ核酸 (RNA) であり、細胞膜透過性や標的

^a京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29), ^b京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS) (〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町 69)

*e-mail: hashidam@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 128 年会シンポジウム GS3 で発表したものを中心に記述したものである。

指向性が乏しいため、生体内での核酸導入技術が遺伝子治療、及び核酸医薬品の実現に必須であり、⁴⁾ また、基礎医学研究の段階においても、個体レベルでの遺伝子機能解析、疾患モデル構築、遺伝子治療・核酸医薬品開発の戦略検証等において汎用される必要不可欠な基盤技術である。腎臓の構造が、肺、肝臓、がん組織等^{5,6)}と比較し複雑・精緻であるため、腎臓への生体内核酸導入制御は困難であったが、リコンビナントウイルス、合成キャリア、あるいは物理刺激を利用した導入技術に関する情報が蓄積されつつある。

本総説では、動態学的観点から、遺伝子治療・核酸医薬品開発の対象となる腎疾患の特徴、及び、腎臓の構造について整理し、腎臓への核酸導入技術の現状について概説する。

2. 遺伝子治療や核酸医薬品開発の対象となる腎疾患

従来有効な治療法のない致死性疾患、あるいは QOL への影響の大きい慢性疾患等を主な対象に遺伝子治療や核酸医薬品開発が進められている。現在の腎疾患に対する遺伝子治療や核酸医薬品の臨床試験は、腎がん組織への発現ベクター直接投与や、全身に分泌されて機能するタンパク質の発現ベクター筋肉内投与、核酸医薬品の静脈内投与をプロトコルとするものに限られているが、^{7,8)} 疾患モデル動物を用いた評価において多様な腎疾患に対する遺伝子治療や核酸医薬品開発戦略の有効性が証明され始めている。ここでは、1) 遺伝子発現ベクター及び核酸医薬品導入の標的細胞、2) 外来遺伝子産物であるタンパク質や核酸医薬品標的分子の動態学的特性、3) 各疾患の病態時における臓器・組織構造等を整理する。

2-1. アルポート症候群

アルポート症候群は、主に X 染色体上の IV 型コラーゲン α_5 鎖を規定する部分の変異や欠失に起因する、伴性優性遺伝を示す感音性難聴を伴う進行性腎炎の一群であり、血尿、タンパク尿がみられ、X 染色体が 1 本しかない男性の場合特に、腎機能が次第に低下し腎不全に陥る。現在、腎不全への進行を阻止する治療法はなく、最終的に透析・移植療法が行われる。IV 型コラーゲン α_5 鎖は細胞質内で合成後分泌され、 α_3 鎖、 α_4 鎖とトロポコラーゲンを形成し、成人の糸球体基底膜を構成する。アルポート症候群の患者ではそ

の欠失により、糸球体基底膜の断裂・層状化がみられる。IV 型コラーゲン α_5 鎖が分泌性タンパクであるため、発現ベクターを本来の産生細胞と考えられている足細胞、あるいは、周囲の糸球体細胞に導入しタンパク質を高発現、分泌させることで、症状の改善が期待される。外来遺伝子から発現した IV 型コラーゲン α_5 鎖が培養細胞において α_3 、 α_4 鎖とトロポコラーゲンを形成すること、さらに、ブタを用いた検討で糸球体基底膜に分布していることが確認されている。⁹⁾

2-2. 腎炎、腎線維症

糸球体腎炎、並びに、尿管間質性腎炎は、慢性化すると次第に線維化が進み、最終的に腎不全に陥るため透析・移植療法を必要とし、QOL の低下を招く。糸球体腎炎は原発性の IgA 腎症や全身疾患である糖尿病等に起因し、尿管間質性腎炎は、薬物誘発性、感染性等が多い。詳細な病因や機序が解明されていない疾患もあり、炎症性サイトカイン等の産生抑制・線維化の予防、また、一部の糸球体腎炎ではメサンギウム細胞の増殖抑制により、腎不全状態を回避する戦略が有力である。

転写因子 NF κ B はインターロイキン (IL)-1, IL-6, IL-8, 接着分子である ICAM-1, VCAM, ELAM 等の発現を制御しているため、炎症抑制の標的であり、デコイ DNA 等を用い NF κ B の核内移行抑制による炎症軽減が期待される。ただし、上記遺伝子の発現抑制効果は核酸導入された細胞に限局されるため、比較的広範な細胞への導入技術が必要である。既に、マウス TNF- α 誘発腎炎モデルへの NF κ B デコイ DNA 投与による炎症性サイトカイン産生の抑制、¹⁰⁾ 並びに、ラットタンパク負荷モデルへの非分解型 I κ B α 発現ベクター投与による接着分子産生抑制、及び、線維化に関与する transforming growth factor (TGF)- β やフィブロネクチンの減少が確認されている。¹¹⁾



向井英史

京都大学大学院薬学研究科博士後期課程。1981年大阪府茨木市生まれ。京都大学工学部工業化学科卒業。同大学院工学研究科分子工学専攻修士課程修了。人工酵素・錯体触媒開発に携わった。2006年4月同大学院薬学研究科博士後期課程に進学。橋田充教授の主宰する薬品動態制御学分野に所属し、核酸 DDS 開発に従事している。

また、腎線維化及び腎不全と関連の重要性が知られている hepatocyte growth factor (HGF) と TGF- β 間の均衡を改善して治療につなげる試みも行われている。均衡が HGF 優位な状態では代償性再生が進み、TGF- β 優位の持続により腎線維化及び腎不全が引き起こされる。¹²⁾ ラット抗 Thy1 抗体誘発腎炎モデル、側輸尿管閉塞 (UUO) モデル、タンパク負荷モデル等を用いた検討において、HGF 発現ベクター、¹³⁾ TGF- β シグナル伝達を抑制する分子である Smad7 発現ベクター、^{14,15)} TGF- β アンチセンスオリゴヌクレオチド投与による、^{16,17)} 腎線維化並びに腎不全の抑制が報告されている。動態学的観点から考えると、HGF や抗 TGF- β 抗体は細胞外に分泌され機能するため、標的である糸球体又は尿細管周辺細胞で高発現させればよいが、一方、Smad7 や TGF- β アンチセンスオリゴヌクレオチドは細胞内で機能する分子であるため、広範な細胞への導入が必要である。

メサンギウム細胞増殖に関連する転写因子 E2F や Egr1 の活性化抑制による糸球体腎炎治療戦略では、ラット抗 Thy1 抗体誘発腎炎モデルに対し、E2F デコイ DNA¹⁸⁾ や Egr1 アンチセンスオリゴヌクレオチド¹⁹⁾ 投与による proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、又は、platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) 産生抑制、さらに、メサンギウム細胞増殖抑制が報告されている。有効な治療効果を得るためには広範なメサンギウム細胞への導入が重要である。最近、糸球体腎炎組織の網羅的遺伝子発現解析から、疾患関連遺伝子としてプロテインキナーゼ CK2 のサブユニット CK2 α が同定され、ラット抗 Thy1 抗体誘発腎炎モデルに対し、CK2 α 標的アンチセンスオリゴヌクレオチド導入による炎症抑制が確認され、³⁾ 新たな標的として期待されている。

2-3. 腎細胞がん 腎細胞がんは、尿細管上皮細胞由来の悪性腫瘍であり、従来の化学療法、放射線療法に対し耐性を示す場合が多く、新規な治療戦略として疾患関連遺伝子や細胞内伝達経路を標的とした戦略、免疫系活性化、血管新生阻害等の戦略に基づく遺伝子治療・核酸医薬品開発が検討されている。現在、免疫系活性化を目的とした IL-2, Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) 等のサイトカイン、HLA-B7/ β 2 ミクログロ

ブリンや B7-1 等の遺伝子導入による治療が、⁷⁾ また、核酸医薬品においては、アポトーシス経路を標的とする Bcl-2 アンチセンスオリゴヌクレオチド、薬剤耐性に係わるリボヌクレオチド還元酵素 R2 のアンチセンスオリゴヌクレオチド、VEGF の受容体チロシンキナーゼを標的とする抗 FLT-1 リボザイムに関して臨床試験が行われている。⁸⁾ サイトカイン類は分泌性タンパク質であるため、ある程度のがん細胞や周囲の正常細胞、又は、*ex vivo* 法により投与されたがん細胞において、発現、分泌すればよい。一方、細胞表面に分布して、免疫担当細胞に認識される HLA-B7 や B7-1、また、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等は細胞内で機能する分子であり、原理的にはすべてのがん細胞への導入が必要とされる。

また、腎細胞がん関連遺伝子として、von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子が知られており、約 50% の患者において変異がみられ、約 10% の確率でメチル化が起こっている。²⁰⁾ VHL は hypoxia-inducible factor (HIF) と結合、プロテオソーム分解を誘導する役割を担っており、その発現低下により、HIF が恒常的に活性化し、VEGF や PDGF 等の増殖因子産生を促し、がん細胞の浸潤、転移に係わる。Lin らは、ヒト腎がん細胞移植モデルにおいて、VEGF デコイ受容体をコードした発現ベクター投与によるリンパ節転移抑制効果を報告した。²¹⁾ 近年、抗 VEGF 抗体静脈内投与による臨床試験において、全身性副作用が問題視されているため、²²⁾ 腎がん組織局所でタンパク質を産生させる代替戦略として期待される。

2-4. その他の腎疾患 ファブリー症候群は、リソソーム内糖脂質分解酵素の 1 つである α -ガラクトシダーゼ A の活性欠損・低下による先天性代謝異常症であり、セラミドトリヘキソシドという糖脂質が蓄積し、腎臓を含む多様な臓器に障害を引き起こす。 α -ガラクトシダーゼ A 遺伝子を筋肉内へ導入し、タンパク質を全身分泌させる戦略が検討された。⁷⁾ また、慢性腎疾患に伴う貧血に対しても、赤血球産生を促進するホルモンであるエリスロポエチンの筋肉内への遺伝子導入による臨床試験が進められている。⁷⁾

3. 腎臓の構造

腎臓は、高度に分化・組織化した複雑かつ精緻な

構造を有する。外縁部である腎皮質は、血管に富み、腎小体、近位尿細管が存在して腎機能の重要な部分を担っており、より内側の腎髄質は血管に乏しく、ヘンレの係蹄、集合管等を含む。腎臓は両腎合わせて数百グラム程度の全体重の1%にも満たない比較的小さな臓器であるが、尿生成のために多量の血液を受けており、腎血液量は心排出量の20-25%にも及ぶ。腎門から腎動脈、腎静脈、輸尿管が出入りし、これらは核酸導入の経路として重要である [Fig. 1(A)].

腎機能はネフロンを最小機能単位とする。腎血管は、腎動脈、輸入細動脈、糸球体、輸出細動脈、尿細管周囲毛細血管、腎静脈へ、尿細管はボウマン嚢にはじまり、近位尿細管、遠位尿細管、集合管、輸尿管へと流れ、両者は、腎小体とそれに続く尿細管部分で接しており、それぞれ糸球体ろ過、尿細管再吸収が行われ、併せて、血液量・組成の維持、老廃物除去を担っている [Fig. 1(B)]. 腎小体及び尿細管部分はその機能的重要性から腎疾患との関連も深く、核酸導入における重要な標的である。以下、腎臓への核酸導入の観点から重要な構成物質について整理する。

腎小体は糸球体及びボウマン嚢からなる。糸球体毛細血管壁は、血管側から内皮細胞、主にIV型コラーゲンからなりろ過障壁の主役である基底膜、足細胞及び近年同定された先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子産物であるネフリンを含む糸球体上皮細

胞スリット膜の3層で構成されており、血液はこれを通して加圧ろ過され、ろ液がボウマン嚢内に入る [Fig. 1(C)]. 糸球体ろ過は分子量依存的な限外ろ過であると同時に、基底膜内の負電荷を帯びたプロテオグリカンの存在により電荷依存的であり、一般的に負電荷を帯びた物質は透過し難いが、20 mer程度の一本鎖オリゴヌクレオチド (分子量 6000 程度)^{23,24)} や2本鎖の siRNA (分子量 13000 程度)²⁵⁻²⁷⁾ 静脈内投与後の尿中への排泄が報告されており、糸球体からろ過される。また、血管側から糸球体構造を支持する形でメサングウム細胞が存在する。この細胞はその増加及び IL-6 産生による IgA 腎症等の糸球体腎炎との関連が知られ、核酸導入の重要な標的である。基底膜より血管側に存在するため、血流を介して比較的容易に核酸導入が可能であると考えられる。

尿細管は糸球体でろ過された物質の再吸収における中心となる部位である。尿細管部分の毛細血管壁は、内皮細胞、内皮細胞基底膜、尿細管細胞基底膜、内腔側に刷子縁を有する尿細管細胞からなり [Fig. 1(D)], 周囲の間質部分と併せて薬物誘発性・感染性炎症の多発部位である。以上のように、腎臓のネフロンは、基底膜により、血管、尿細管、間質部分に分画されているため、核酸導入部位は投与経路に強く依存すると考えられ、経腎動脈、経腎静脈、経輸尿管投与、腎実質への直接注入等の腎臓局所投与が主に検討されている。²⁾

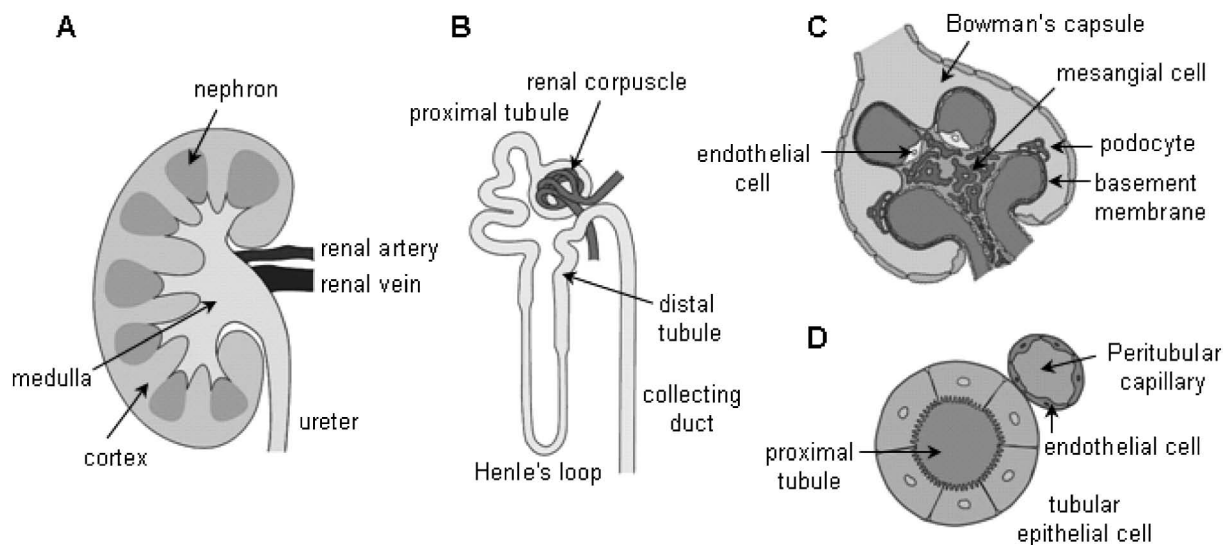


Fig. 1. Structure of the Kidney (A), Nephron (B), Renal Corpuscle (C) and Proximal Tubule (D)

4. リコンビナントウイルスによる腎臓への遺伝子導入

現在、遺伝子治療における臨床試験では、その導入効率の高さから、治療遺伝子はウイルスベクターに組み込み、自己増殖能を欠失したリコンビナントウイルスとして投与することが多く、腎臓への遺伝子導入に対しても適用が検討されている。リコンビナントウイルス全身投与による腎臓への選択的導入は困難であり、経腎動脈、経腎静脈、経輸尿管投与、腎実質への直接注入等の腎臓局所投与が試みられている。一般的に、リコンビナントウイルスによる遺伝子導入は、特異的抗体産生のため、先天性疾患や慢性疾患において必要である複数回投与には適さない。

4-1. リコンビナントアデノウイルス リコンビナントアデノウイルス (Ad) は、coxsackie adeno-virus receptors (CAR) を受容体とし、核膜孔を介した核内移行機構を有するため、非分裂細胞を含む幅広い細胞に対する高効率な感染を特長とし、現在の遺伝子治療プロトコールにおいて最も多く利用されている。腎臓への遺伝子導入では5型 Ad を用いた検討が報告されている。腎臓は血流の多い臓器であり、投与した Ad は速やかに全身循環を介し、肝臓や脾臓に取り込まれると考えられるため、効率的な遺伝子導入を達成するためには、Ad と腎臓細胞との接触時間を長くする工夫が必要であり、多様な投与方法が検討されている。

Ad の経腎動脈投与による遺伝子導入では、ラットを用いた検討で、投与する腎臓の血流を一過性に遮断し、Ad 注入後さらに数分-十分程度血流を遮断し続ける方法が試みられ、尿細管上皮細胞への導入が報告されている。^{11,28)} 一方で、ブタに対する腎灌流法 (2 時間灌流) を利用した遺伝子導入や、²⁹⁾ ラット腎臓に対し経腎動脈的に 15 分間低速注入を行った場合には、³⁰⁾ 糸球体細胞へ効率的に導入される。報告により導入部位が一致しないため、さらなる検討が必要である。他の投与経路では、腎盂投与、腎実質への直接投与が検討されている。輸尿管を結紮し、Ad を腎盂投与後、さらに、5 分間尿路を遮断し続けると髓質や腎乳頭の集合管細胞に導入され、²⁸⁾ また、腎実質へ直接注入した場合には導入部位近傍のボウマン嚢や尿細管上皮細胞、また、ヘンレループの太い上行脚部分に導入されると報告さ

れている。^{31,32)}

4-2. リコンビナントアデノ随伴ウイルス リコンビナントアデノ随伴ウイルス (AAV) は、ヒト第 19 染色体 (19q3.3) に組み込む性質を有するパルボウイルス科の一本鎖 DNA ウイルスの非増殖性組み換え体であるが、治療遺伝子を挿入するため組み込みに係わる rep 遺伝子を欠損させた AAV が用いられることもあり、その場合は染色体に組み込まれない。免疫原性が低く、病原性がない利点があり、また、非分裂細胞に対しても遺伝子導入能があり、肝臓、肺をはじめ多様な臓器への導入においてアデノウイルスの代替として注目されている。5 型 AAV はヒトやマウスの初代培養系を用いた検討では、多様な腎臓細胞に対し同等の遺伝子導入効率を示すにも係わらず、マウス腎実質への直接注入において、導入部位近傍の尿細管上皮細胞に遺伝子発現が限局されることが報告されている。³³⁾ また、2 型 AAV をラット腎臓へ経腎動脈投与し、さらに、45 分間腎血流遮断した場合、同様に尿細管上皮細胞での遺伝子発現が報告されているが、遺伝子導入されている部位は、近位尿細管の S3 部分と集合管の間在細胞に限られている。³⁴⁾

4-3. リコンビナントレトロウイルス その他、リコンビナントレトロウイルスは、免疫原性が比較的 low、遺伝子の染色体挿入による高い発現持続性が利点であるが、その挿入は非特異的であり、発がんの危険性が懸念されている。腫瘍レトロウイルスは核内移行機構を持たず、分裂時の核膜消失期にしか核内移行できないために、非分裂細胞に対しては感染しない。基本的には腎臓細胞は分裂性に乏しいため、腎臓への遺伝子導入への適用は不向きであるが、葉酸腹腔内投与により、尿細管再生を促したラットに対し、マウス白血病ウイルスを基にしたリコンビナントレトロウイルスを腎実質へ直接注入した場合、注入部位近傍の一部の尿細管上皮細胞において発現がみられることが報告されている。³⁵⁾ レトロウイルスの一亜種であるレンチウイルスは、ブレインテグレーション複合体が核膜複合体を介して核内移行可能であり、非分裂細胞に対しても遺伝子導入が可能である。リコンビナントヒト免疫不全症ウイルスの経腎動脈、経腎静脈、経輸尿管投与、腎実質への直接注入によるマウス腎臓への遺伝子導入検討が行われた。腎実質への直接注入や経輸尿管投

与により、近位尿細管細胞等で遺伝子発現がみられ、加えて、3 ヶ月以上の遺伝子発現持続が報告されている。³⁶⁾

5. 合成キャリアを利用した腎臓への核酸導入技術

治療遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、合成キャリアや物理刺激等を利用して遺伝子導入する方法は、リコンビナントウイルスによる遺伝子導入の場合に生じる、ウイルスに由来する免疫応答や特異的抗体産生による複数回投与時の発現低下等の懸念がないことが大きな利点である。これらの方法は同時に有効なオリゴ核酸導入法としても注目される。

合成キャリアとして代表的なカチオン性リポソームやポリエチレンジアミン (PEI) を用いた腎臓への遺伝子導入が検討されており、*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride (DOTMA)/dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) を脂質組成とするカチオン性リポソームとプラスミドベクター複合体の経腎動脈、経腎盂投与、³⁷⁾ 及び、側鎖構造を持つ分子量 25 kDa の PEI とプラスミドベクター複合体の経腎動脈投与による、³⁸⁾ 尿細管上皮細胞への遺伝子導入が確認されている。また、DOPE/dilauroylphosphatidylcholine/*N*-(α -trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride を脂質組成とするマルチメラ型リポソームとデオイオリゴ核酸複合体の経腎動脈投与では、メサンギウム細胞へ導入されることが報告されている。¹⁸⁾ それぞれ、核酸複合体を注入後、血管、あるいは、尿路を数分-十分結紮して腎臓細胞と接触させ、導入効率を高めている。

一方で、LipofectAmine を用いたラット及びヒト初代培養メサンギウム細胞への遺伝子導入実験において高い細胞毒性が、ラット腎臓への *in vivo* 遺伝子導入において血腫、出血、梗塞ネクロシスが報告されており、腎毒性が懸念されている。³⁹⁾ *In vivo* 核酸導入では、血球成分等の生体成分との相互作用のため、^{40,41)} 脂質組成、電荷等の *in vivo* での最適化が重要であるが、肺や肝臓等への核酸導入と比較して報告例は非常に少なく、詳細な毒性に関する検討もなされていないのが現状である。

また、hemagglutinating virus of Japan (HVJ) の膜融合を司る糖タンパク質 HN 及び F をアニオン性リポソーム脂質膜内に混在させた、リポソーム

分解を回避して効率的な核酸導入が期待される HVJ リポソームを利用した腎臓への核酸導入が検討されている。プラスミドベクター内封 HVJ リポソーム経腎動脈投与による 15-40% の糸球体細胞での遺伝子発現、^{42,43)} また、HIV エンベロープ脂質組成を模倣した HVJ リポソーム経輸尿管投与による、尿細管間質線維芽細胞への導入が報告されている。⁴⁴⁾

6. 物理刺激を利用した腎臓への核酸導入技術

物理刺激を利用しプラスミドベクター並びにオリゴ核酸の細胞内移行効率を向上させる戦略は、一過性の細胞膜透過性亢進を導入機構とするため、上記のリコンビナントウイルスや合成キャリアを用いた核酸導入において要求される長期間に亘る血管や尿路の遮断が不要であり、また、虚血再灌流時炎症に伴う組織傷害の懸念がなく、腎臓への核酸導入において特に有効な戦略であると考えられる。

一般的に、負電荷を帯び高分子量であるプラスミドベクター水溶液単独投与では遺伝子導入は達成されないが、大容量の水溶液を尾静脈から急速注入することによって肝臓で高い発現が得られることが示されている。⁴⁵⁾ この戦略を腎臓への遺伝子導入に適用した例として、ラットを用い、腎動脈、腎静脈をクランプしたのち、腎臓容積に匹敵する 1 ml のプラスミドベクター水溶液を 5 秒以内に経腎静脈投与することで尿細管周囲毛細血管網近傍の間質線維芽細胞において遺伝子発現が得られることが報告されている。⁴⁶⁾ 一方、静脈内投与されたオリゴ核酸は、糸球体ろ過されたのち、一部は Scavenger 受容体が関与したエンドサイトーシス等により、近位尿細管細胞に導入されることが示されている。^{23,24,47)}

6-1. エレクトロポレーション法 エレクトロポレーション法は、強力な電場パルスを経験した細胞や臓器、組織に与え、細胞膜透過性を一過性に亢進、導入効率を向上させる核酸導入法であり、既に、筋肉をはじめ様々な臓器、組織に対して適用されている。ラットを用いた検討で、腎動脈、腎静脈を結紮した上で、プラスミドベクター水溶液を経腎動脈投与し、腎臓に対し電場パルス照射すると、75% の糸球体メサンギウム細胞に遺伝子導入された。⁴⁸⁾ 同様の方法は siRNA 導入に対しても効果的であり、95% 以上の糸球体細胞で遺伝子発現抑制効果を示し、特に、メサンギウム細胞で顕著であると報告されて

いる。⁴⁹⁾ また、プラスミドベクター水溶液の腎実質直接投与、⁵⁰⁾ 及び、DNA enzyme 水溶液の経腎静脈投与⁵¹⁾によるエレクトロポレーション法において、尿細管間質線維芽細胞への核酸導入が確認されている。

6-2. ソノポレーション法 超音波診断用造影剤であるマイクロバブルに超音波照射すると、マイクロバブルが核になり効果的にキャビテーションが誘導でき、培養細胞や筋肉内投与において高効率な核酸導入が可能である。エレクトロポレーション法の場合と同様にラット腎動脈、腎静脈を結紮した上で、プラスミドベクターと造影剤 Optison 混合溶液を経腎動脈投与し、腎臓に超音波照射すると 70–80%以上の糸球体細胞、加えて、尿細管や間質領域で遺伝子発現が認められた。^{52,53)} デコイ DNA 導入においても同様の結果が得られている。⁵⁴⁾ ただし、Optison 高濃度条件では、細胞外マトリックス拡

張、糸球体径増加等の糸球体組織学的傷害がみられ、安全な核酸導入のためには Optison 濃度最適化が必要であることが示唆されている。⁵³⁾

6-3. Renal press-mediated transfection method

最近、われわれは、新規な物理刺激を利用した腎臓への核酸導入法として、renal press-mediated transfection method を報告している。⁵⁵⁾ 本方法は、核酸溶液をマウス尾静脈から注入したのち、腎臓に軽く 1 秒間、圧（プレス）を加えるだけの非常に単純で簡便な方法である [Fig. 2(A)]. レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ発現プラスミドベクター (pCMV-Luc) を用い評価すると、その遺伝子発現は全身投与にも係わらず腎臓特異的であり [Fig. 2 (B)], 腎臓における遺伝子導入効率 (約 4 ng/mg protein) は、リコンビナントアデノウイルス静脈内投与による肝臓、脾臓での遺伝子発現 (1–30 ng/mg protein) や、リポプレックスやポリプレックス

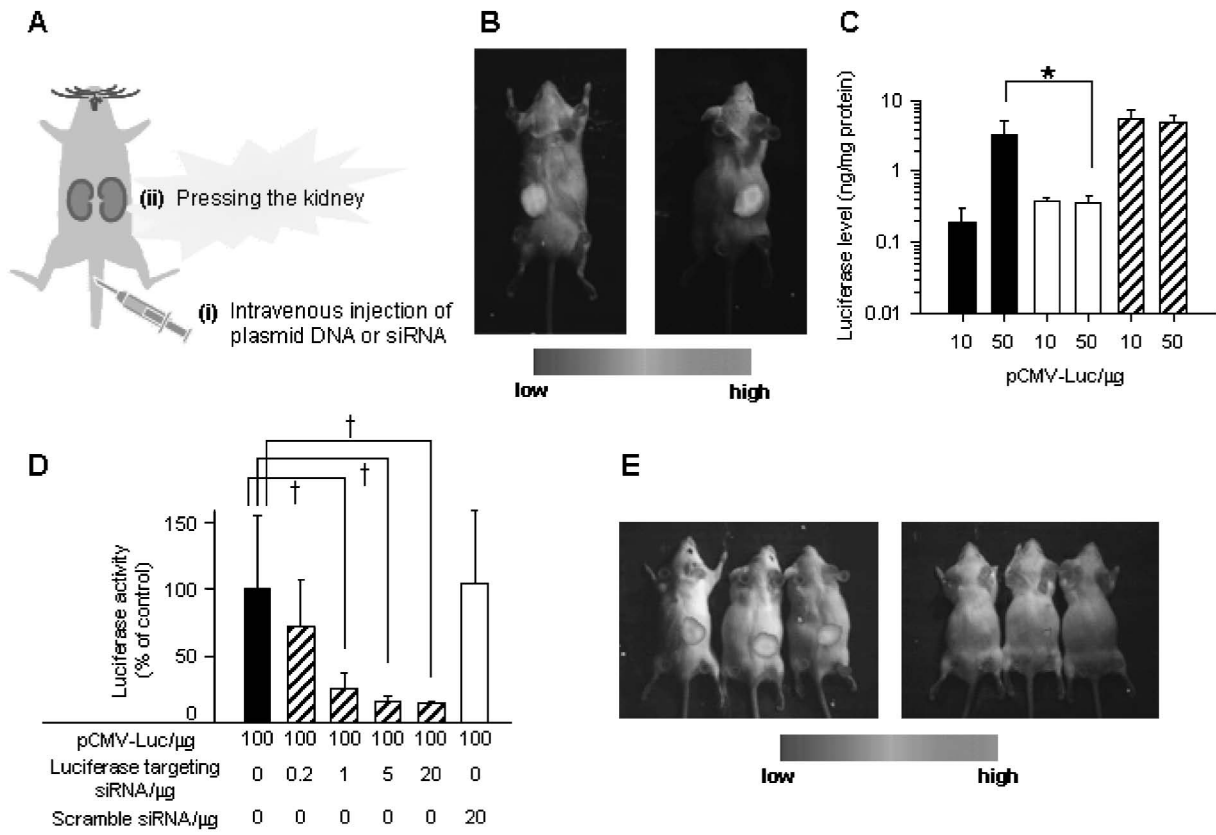


Fig. 2. Renal Press-mediated Transfection Method

(A): Scheme of renal press-mediated transfection method procedure. (B): *In vivo* imaging 12 h after 100 µg pCMV-Luc administration to the right (right picture) or left (left picture) kidney. (C): Luciferase levels obtained by the renal press-mediated transfection method (black) were compared with renal parenchymal injection (white) and electroporation (hatched). (D): Luciferase levels 12 h after co-administration with pCMV-Luc and luciferase targeting siRNA or scramble siRNA, normalized by only pCMV-Luc administration. (E): *In vivo* imaging 12 h after administration of 100 µg pCMV-Luc (left picture) and co-administration of 100 µg pCMV-Luc and 5 µg luciferase targeting siRNA (right picture). **p*<0.01. †*p*<0.05. Each value represents means + S.D. (Reprinted from Ref. 55) with permission of Elsevier).

による肺での遺伝子発現 (0.1–1 ng/mg protein) に匹敵し、腎実質への直接注入を用いたエレクトロポレーション法と比較しても同程度 [Fig. 2(C)] と高効率である。加えて、血流を介しているため、皮質、髄質外帯領域など広範囲に遺伝子導入される。

また、ルシフェラーゼを標的とした siRNA を pCMV-Luc と同時投与すると、siRNA 投与量依存的な遺伝子発現抑制がみられ、本方法は腎臓への siRNA 導入に対しても適用可能である [Fig. 2(D), (E)]。さらに、クレアチニン並びに血中尿素窒素を腎機能の指標として、本方法の腎機能に及ぼす影響について経時的に評価したところ、非処置群と比較し、変化はみられず、顕著な腎毒性は引き起こされないことが示唆された。Renal press-mediated transfection method は単純な戦略で、しかも、顕著な腎機能低下を引き起こすことなく、腎臓特異的に高効率かつ広範囲に核酸導入可能であることから、臨床応用実現へ向けた今後の研究推進が期待される。通常、腎臓への核酸導入を利用した実験ではラットの使用が必要となるが、本方法を用いる場合、簡便に小動物であるマウスを使った実験が可能であり、迅速な個体レベルでの遺伝子機能解析、疾患モデル構築、遺伝子治療・核酸医薬品開発の戦略検証等が可能になると考えられる。

7. 腎がん組織への直接注入

腎がんに対しては、コンピューティッド・トモグラフィ (CT) ガイド下穿刺等による、腎がん組織への遺伝子発現ベクター直接注入を利用した遺伝子治療臨床試験が進められており、HLA-B7 や IL-2 の遺伝子発現プラスミドベクターリポソーム製剤である Allovectin⁷⁵⁶⁾ と Leuvectin⁵⁷⁾ が代表的である。これらリポソーム製剤は、1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium bromide (DMRIE)/DOPE の脂質組成からなるカチオン性リポソームとプラスミドベクターの複合体である。リコンビナントアデノウイルス (Ad) を利用した遺伝子導入も検討されているが、腎細胞がんにおいてアデノウイルスの受容体である CAR の発現は低いとされており、高発現が報告されている α V インテグリンを標的とした組み換え Ad による遺伝子導入が有効ではないかと推察されている。⁵⁸⁾

8. おわりに

本稿では腎疾患に対する遺伝子治療、核酸医薬品

において治療効果を左右し得る動態学的要因について重点的に論述した。近年、遺伝子治療、核酸医薬品開発において土台となる導入技術に関する情報が蓄積されつつあり、さらなる各腎疾患に対する核酸導入システムの最適化により、将来の腎疾患に対する遺伝子治療、核酸医薬品実現につながるものと期待している。

謝辞 有益な御助言及び多大な御支援を賜りました京都大学大学院薬学研究科山下富義准教授、また、実験に御協力頂きました大学院生、馬 凡、高橋晴之、大谷祐基さんに深謝致します。最後に、薬学会大学院生シンポジウム、並びに、薬学雑誌誌上シンポジウムにおける発表の機会を与えて頂きました薬学会関係者の皆様に改めて感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Knebelmann B., Antignac C., Gubler M. C., Grunfeld J. P., *Kidney Int.*, **44**, 1205–1216 (1993).
- 2) Kelley V. R., Sukhatme V. P., *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.*, **276**, F1–F9 (1999).
- 3) Yamada M., Katsuma S., Adachi T., Hirasawa A., Shiojima S., Kadowaki T., Okuno Y., Koshimizu T. A., Fujii S., Sekiya Y., Miyamoto Y., Tamura M., Yumura W., Nihei H., Kobayashi M., Tsujimoto G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 7736–7741 (2005).
- 4) Mahato R. I., Takakura Y., Hashida M., *J. Drug Target.*, **4**, 337–357 (1997).
- 5) Mahato R. I., Takakura Y., Hashida M., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **14**, 133–172 (1997).
- 6) Kawakami S., Higuchi Y., Hashida M., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 726–745 (2008).
- 7) <<http://www4.od.nih.gov/oba/rac/PROTOCOL.pdf>>, Office of Biotechnology Activities, U. S. National Institutes of Health Web, 5 June, 2008.
- 8) <<http://clinicaltrials.gov/>>, U. S. National Institutes of Health Web, 1 April, 2008.
- 9) Heikkila P., Tibell A., Morita T., Chen Y., Wu G., Sado Y., Ninomiya Y., Pettersson E., Tryggvason K., *Gene Ther.*, **8**, 882–890 (2001).
- 10) Tomita N., Morishita R., Tomita S., Gibbons

- G. H., Zhang L., Horiuchi M., Kaneda Y., Higaki J., Ogihara T., Dzau V. J., *Gene Ther.*, **7**, 1326–1332 (2000).
- 11) Takase O., Hirahashi J., Takayanagi A., Chikaraishi A., Marumo T., Ozawa Y., Hayashi M., Shimizu N., Saruta T., *Kidney Int.*, **63**, 501–513 (2003).
- 12) Matsumoto K., Nakamura T., *Kidney Int.*, **59**, 2023–2038 (2001).
- 13) Gao X. J., Mae H., Ayabe N., Takai T., Oshima K., Hattori M., Ueki T., Fujimoto J., Tanizawa T., *Kidney Int.*, **62**, 1238–1248 (2002).
- 14) Akagi Y., Isaka Y., Arai M., Kaneko T., Takenaka M., Moriyama T., Kaneda Y., Ando A., Orita Y., Kamada T., Ueda N., Imai E., *Kidney Int.*, **50**, 148–155 (1996).
- 15) Isaka Y., Tsujie M., Ando Y., Nakamura H., Kaneda Y., Imai E., Hori M., *Kidney Int.*, **58**, 1885–1892 (2000).
- 16) Terada Y., Hanada S., Nakao A., Kuwahara M., Sasaki S., Marumo F., *Kidney Int.*, **61**, S94–S98 (2002).
- 17) Lan H. Y., Mu W., Tomita N., Huang X. R., Li J. H., Zhu H. J., Morishita R., Johnson R. J., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 1535–1548 (2003).
- 18) Maeshima Y., Kashihara N., Yasuda T., Sugiyama H., Sekikawa T., Okamoto K., Kanao K., Watanabe Y., Kanwar Y. S., Makino H., *J. Clin. Invest.*, **101**, 2589–2597 (1998).
- 19) Carl M., Akagi Y., Weidner S., Isaka Y., Imai E., Rupperecht H. D., *Kidney Int.*, **63**, 1302–1312 (2003).
- 20) Rini B. I., Small E. J., *J. Clin. Oncol.*, **23**, 1028–1043 (2005).
- 21) Lin J. M., Lalani A. S., Harding T. C., Gonzalez M., Wu W. W., Luan B., Tu G. H., Koprivnikar K., VanRoey M. J., He Y. L., Alitalo K., Jooss K., *Cancer Res.*, **65**, 6901–6909 (2005).
- 22) Jain R. K., Duda D. G., Clark J. W., Loeffler J. S., *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **3**, 24–40 (2006).
- 23) Rappaport J., Hanss B., Kopp J. B., Copeland T. D., Bruggeman L. A., Coffman T. M., Klotman P. E., *Kidney Int.*, **47**, 1462–1469 (1995).
- 24) Oberbauer R., Schreiner G. F., Meyer T. W., *Kidney Int.*, **48**, 1226–1232 (1995).
- 25) van de Water F. M., Boerman O. C., Wouterse A. C., Peters J. G. P., Russel F. G. M., Masereeuw R., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 1393–1397 (2006).
- 26) Sato A., Takagi M., Shimamoto A., Kawakami S., Hashida M., *Biomaterials*, **28**, 1434–1442 (2007).
- 27) Kawakami S., Hashida M., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 142–151 (2007).
- 28) Moullier P., Friedlander G., Calise D., Ronco P., Perricaudet M., Ferry N., *Kidney Int.*, **45**, 1220–1225 (1994).
- 29) Heikkila P., Parpala T., Lukkarinen O., Weber M., Tryggvason K., *Gene Ther.*, **3**, 21–27 (1996).
- 30) Ye X. H., Liu X. H., Li Z. W., Ray P. E., *Human Gene Ther.*, **12**, 141–148 (2001).
- 31) Choi Y. K., Kim Y. J., Park H. S., Choi K., Paik S. G., Lee Y. I., Park J. G., *Gene Ther.*, **10**, 559–568 (2003).
- 32) Ortiz P. A., Hong N. J., Plato C. F., Varela M., Garvin J. L., *Kidney Int.*, **63**, 1141–1149 (2003).
- 33) Lipkowitz M. S., Hanss B., Tulchin N., Wilson P. D., Langer J. C., Ross M. D., Kurtzman G. J., Klotman P. E., Klotman M. E., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**, 1908–1915 (1999).
- 34) Chen S. F., Agarwal A., Glushakova O. Y., Jorgensen M. S., Salgar S. K., Poirier A., Flotte T. R., Croker B. P., Madsen K. M., Atkinson M. A., Hauswirth W. W., Berns K. I., Tisher C. C., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 947–958 (2003).
- 35) Bosch R. J., Woolf A. S., Fine L. G., *Exp. Nephrol.*, **1**, 49–54 (1993).
- 36) Gusella G. L., Fedorova E., Hanss B., Marras D., Klotman M. E., Klotman P. E., *Human Gene Ther.*, **13**, 407–414 (2002).
- 37) Lai L. W., Moeckel G. W., Lien Y. H. H., *Gene Ther.*, 426–431 (1997).
- 38) Boletta A., Benigni A., Lutz J., Remuzzi G., Soria M. R., Monaco L., *Human Gene Ther.*, **8**, 1243–1251 (1997).
- 39) Madry H., Reszka R., Bohlender J., Wagner J., *J. Mol. Med.*, **79**, 184–189 (2001).
- 40) Fumoto S., Kawakami S., Shigeta K., Higuchi Y., Yamashita F., Hashida M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**, 484–493 (2005).

- 41) Hohokabe M., Higuchi Y., Mukai H., Kawakami S., Hashida M., *J. Biomed. Nanotech.*, **3**, 277–284 (2007).
- 42) Tomita N., Higaki J., Morishita R., Kato K., Mikami H., Kaneda Y., Ogihara T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **186**, 129–134 (1992).
- 43) Isaka Y., Fujiwara Y., Ueda N., Kaneda Y., Kamada T., Imai E., *J. Clin. Invest.*, **92**, 2597–2601 (1993).
- 44) Tsujie M., Isaka Y., Ando Y., Akagi Y., Kaneda Y., Ueda N., Imai E., Hori M., *Kidney Int.*, **57**, 1973–1980 (2000).
- 45) Liu F., Song Y. K., Liu D., *Gene Ther.*, **6**, 1258–1266 (1999).
- 46) Maruyama H., Higuchi N., Nishikawa Y., Hirahara H., Iino N., Kameda S., Kawachi H., Yaoita E., Gejyo F., Miyazaki J. I., *Human Gene Ther.*, **13**, 455–468 (2002).
- 47) Sawai K., Mahato R. I., Oka Y., Takakura Y., Hashida M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**, 284–290 (1996).
- 48) Tsujie M., Isaka Y., Nakamura H., Imai E., Hori M., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **12**, 949–954 (2001).
- 49) Takabatake Y., Isaka Y., Mizui M., Kawachi H., Shimizu F., Ito T., Hori M., Imai E., *Gene Ther.*, **12**, 965–973 (2005).
- 50) Fujii N., Isaka Y., Takabatake Y., Mizui M., Suzuki C., Takahara S., Ito T., Imai E., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **21**, 2745–2753 (2006).
- 51) Nakamura H., Isaka Y., Tsujie M., Rupperecht H. D., Akagi Y., Ueda N., Imai E., Hori M., *Gene Ther.*, **9**, 495–502 (2002).
- 52) Lan H. Y., Mu W., Tomita N., Huang X. R., Li J. H., Zhu H. J., Morishita R., Johnson R. J., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 1535–1548 (2003).
- 53) Koike H., Tomita N., Azuma H., Taniyama Y., Yamasaki K., Kunugiza Y., Tachibana K., Ogihara T., Morishita R., *J. Gene Med.*, **7**, 108–116 (2005).
- 54) Azuma H., Tomita N., Kaneda Y., Koike H., Ogihara T., Katsuoka Y., Morishita R., *Gene Ther.*, **10**, 415–425 (2003).
- 55) Mukai H., Kawakami S., Hashida M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **372**, 383–387 (2008).
- 56) Rini B. I., Selk L. M., Vogelzang N. J., *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2766–2772 (1999).
- 57) Galanis E., Hersh E. M., Stopeck A. T., Gonzalez R., Burch P., Spier C., Akporiaye E. T., Rinehart J. J., Edmonson J., Sobol R. E., Forscher C., Sondak V. K., Lewis B. D., Unger E. C., O’Driscoll M., Selk L., Rubin J., *J. Clin. Oncol.*, **17**, 3313–3323 (1999).
- 58) Haviv Y. S., Blackwell J. L., Kanerva A., Nagi P., Krasnykh V., Dmitriev I., Wang M. H., Naito S., Lei X. S., Hemminki A., Carey D., Curiel D. T., *Cancer Res.*, **62**, 4273–4281 (2002).