

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 ラット関節リウマチモデルにおける新規遺伝子治療法の開発

指導教官 高戸 毅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 島 誠一

背景・目的

一酸化窒素 (NO) は炎症反応において重要な因子の 1 つと考えられる。NO 合成酵素 (NOS) の中でも誘導型 (iNOS, NOS II) は骨吸収活性を促進する腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン β (IL-1 β) などの炎症性サイトカインの刺激により大量の NO を産生するだけでなく、スーパーオキシド (O_2^-) と反応して強い細胞障害作用を示すペルオキシナイトライト (ONOO $^-$) を生成することが知られている。このことから、炎症性の骨吸収における NO 由来の ONOO $^-$ の細胞障害作用を防ぐためには iNOS を抑制することが有効ではないかと考えられた。

本研究では慢性骨破壊疾患である関節リウマチ (RA) において iNOS 発現を特異的に抑制可能で、薬理学的な副作用を起こさないアンチセンス遺伝子導入法について検討した。生体への遺伝子導入は病原性がなく、ヒトの遺伝子治療において安全かつ有効であると考えられているアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた。また AAV は長期間遺伝子を発現できるため、RA のような慢性炎症疾患には非常に有効であると考えられる。本研究は 1) アジュバント誘導型関節炎 (AIA) ラットにおいて、現在使用可能な 1 型から 5 型までの 5 種類の AAV セロタイプ (AAV1-AAV5) の中でどの AAV セロタイプが最も遺伝子発現が高いか検討し、2) その AAV ベクターを用いた iNOS antisense 遺伝子治療が AIA ラットにおいて有効であるか否か検討することを目的とした。

材料と方法

本研究の指標として、まず 1) AAV ベクターによるセロタイプ間の遺伝子発現効率を検討するため、各セロタイプの AAVLacZ ベクターを作製し、正常ラットおよび AIA ラット（ともに 9 週齢）の右側足関節に遺伝子導入し、導入後 28 日目に LacZ 遺伝子の発現効率を比較した。次に、最も効率の高かった AAV3 ベクターを用いて iNOS antisense が関節炎発症後の炎症および骨破壊の抑制に有効であるかを検討するため、2) 3 種の AAV3 ベクター (AAV LacZ, AAV iNOS sense, AAV iNOS antisense) を作製し、それぞれを AIA ラット（9 週齢）の右側足関節に遺伝子導入し、7 日毎に後肢足の腫脹および体重の測定を行った。3) 遺伝子導入後 28 日目に屠殺し、右側後肢足のレントゲンおよび組織学的評価を行い、4) 白血球数および血中 nitrate/nitrite を測定した。最後に、5) 導入後 28 日目に右側後肢足の iNOS の免疫組織学的検討を行った。

結果

1) AAV ベクターによるセロタイプ間の遺伝子発現効率の検討：AIA ラット群において 5 種類の AAV セロタイプの中で AAV3 が最も発現が高く、他のセロタイプを遺伝子導入した群の 2 倍以上の値を示した。また LacZ 遺伝子の発現は骨芽細胞、破骨細胞および滑膜細胞に認められた。一方、正常ラット群における LacZ 遺伝子の発現量は 5 種類のセロタイプがすべて AIA ラット群より低値を示した。これより AAV ベクターによる遺伝子導入において長期間（28 日）遺伝子が発現し、正常ラットより関節炎ラットにおいて高い遺伝子発現量が得られ、そのなかで AAV3 が最も遺伝子発現量が高いことが示された。

2) 後肢足の腫脹および体重の測定：AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群における後肢足の腫脹は AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群に比較し有意に減少していた。また体重についても同様に、AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群で有意に増加していた。以上より iNOS antisense を導入した AIA ラットにおいては後肢足の腫脹を減少するとともに体重も増加しており関節炎の症状が改善することが示された。

3) レントゲンのおよび組織学的評価：レントゲンの評価において、正常ラット群と比較して AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群では重度の骨浸潤および破壊像が認められた。これらの骨破壊が AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群において改善された。組織学的評価において、

AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群ではパンヌス形成に伴う骨破壊が認められた。これに対して、AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群では滑膜組織による骨浸潤および骨破壊が抑制されていた。またレントゲンのおよび組織学的スコアにおいて、AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群では AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群より有意に低いスコアを示した。以上から AAV3 iNOS antisense は AIA ラットにおける炎症および骨破壊を抑制することが示された。

4) 白血球数および血中 nitrate/nitrite の測定：正常ラットに比べ、AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群では白血球数が増加していた。これに対し AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群では白血球数が減少した。以上から AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群では関節における炎症の抑制に伴い白血球数も減少することが示された。また、血清中の nitrate/nitrite の産生は正常ラット群と比較し、AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群において増加していた。これに対し AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群における血清中の nitrate/nitrite の産生は AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群に比べ有意に減少した。以上から iNOS antisense を導入した AIA ラット群では血清中の nitrate/nitrite の産生が抑制された。

5) iNOS 発現量の免疫組織学的検討：iNOS 蛋白は AAV3 LacZ または AAV3 iNOS sense を投与した AIA ラット群において強い染色性が認められた。これに対し AAV3 iNOS antisense を投与した AIA ラット群では iNOS の染色性は大幅に減弱した。これにより iNOS antisense を導入した AIA ラット群における iNOS 蛋白の発現は LacZ または iNOS sense を導入した AIA ラット群と比較し、著明に減少していた。

考察

今回 AAV3 を用いた iNOS antisense 遺伝子導入により関節炎による骨破壊は著明に抑制されることを示した。LacZ や iNOS sense を発現する AAV ベクターを投与しても関節炎は改善されず、この遺伝子治療の効果は iNOS antisense 遺伝子に特異的であった。したがって、iNOS の経路を antisense によりブロックすることは骨吸収過程を抑制し関節リウマチの治療に有用であると考えられる。

また今回、AAV LacZ を AIA ラットの足関節に注入し、LacZ 遺伝子および AAV

ベクターが骨芽細胞、破骨細胞および滑膜細胞に導入されることを初めて示した。また AAV iNOS antisense を投与することで関節における iNOS 蛋白の発現が抑制された。これらの細胞に導入された iNOS antisense が足関節での NO の産生を抑制することで関節炎を抑制していると考えられる。

関節リウマチ患者の血液および滑液の NO 濃度が上昇しているが、変形性関節症やシェーグレン症候群等のリウマチ性疾患患者からも同様の報告がある。このことからヒトにおいて NO 産生経路の活性化は、病態と相関することが示唆される。本研究から AAV3 iNOS antisense を用いることは関節リウマチだけでなく様々なリウマチ性疾患や炎症性骨疾患に対して有効な手段と期待される。

AAV には、血清型に基き数種類同定されている。通常使用されている AAV は AAV2 であり、ほとんどの研究はこの血清型を用いている。AAV2 に対する抗体は健康成人の過半数が自然感染の結果有している。AAV2 の抗体はヒトに対する遺伝子治療を行う上でその障害となり得る重要なファクターである。各血清型間において交叉反応はないとされていることから、非 AAV2 型ベクターを用いることはヒトに対する遺伝子治療や、追加投与方法として有用であると考えられる。本研究において AAV2 を含むほかのどの血清型よりも AAV3 による遺伝子発現が最も高かった。このことから AAV3 を用いた遺伝子治療はヒトへの関節リウマチにおいて重要なベクターとなりうると考えられる。

結語

本研究は AAV ベクターを用いた iNOS antisense 遺伝子導入による関節リウマチモデルへの治療効果を検討した。その結果 AAV3 iNOS antisense は関節炎および骨破壊の抑制において有効であることが示された。このことは RA の骨破壊の治療において iNOS をターゲットとした治療法が有用であり、また安全性の高い AAV ベクターによる遺伝子治療により臨床応用が可能であると示唆される。