

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

ナノバイオテクノロジーを用いた腎糸球体を標的としたチロシン水酸化酵素 siRNA 導入の腎機能改善効果

河原崎 千晶

### 【背景・目的】

腎交感神経は血圧調節や腎機能保持に重要な役割を果たすとされており、近年、腎交感神経除神経術によって難治性高血圧患者で有意な血圧の低下を認めたことが報告され、注目されている。我々は最近、慢性腎臓病 (CKD) モデルラットにおいて、交感神経活動亢進が血圧上昇並びに腎障害に関与しており、交感神経を抑制することにより降圧および腎機能改善効果が認められることを報告した。他施設からも腎障害と交感神経の関連について多くの報告がなされている。CKD 患者では健常人に比べて筋交感神経活動が亢進しており、また、微量アルブミン尿を有する高血圧患者では交感神経抑制薬であるモキシノジンを投与することにより尿中アルブミン排泄が抑制された。腎障害モデル動物においても同様に交感神経の関与が示されており、例えば 5/6 腎摘ラットでは、腎皮質でカテコラミンの放出が亢進していること、モキシノジンにより尿中アルブミン排泄が抑制されたことが報告されている。このように腎障害における交感神経の重要性を示唆する報告は多数あるが、腎臓は糸球体・尿細管・間質など様々な組織からなり、個々の腎組織における交感神経の役割を区別して評価することは容易ではない。

東京大学工学部マテリアル工学専攻の片岡研究室では Drug Delivery System (DDS) を発展させ、ナノバイオテクノロジーを用いたブロックコポリマーを開発した。これは polyethylene glycol (PEG) を代表とする親水性ポリマーと poly-L-lysine (PLL) に代表される疎水性ポリマーを工学的に結合させたものである。疎水性ポリマーの部分が薬物や陰性荷電のある DNA などと疎水性相互作用や静電作用を利用して結合し、結果としてウイルス様形態のナノ粒子を形成する。外殻は親水性の構造を呈し、生体適合性に優れている。一方、内側に薬物を内包し、目的細胞にこのキャリアが到達すると、中の薬物を放出することが可能となる (以下このキャリアを polyion complex [PIC] nanocarrier と称する)。この血中の薬物-PIC nanocarrier 複合体は、ナノサイズで生体適合性・血中安定性に優れている。血液内を移動する途中、細網内皮系からの貪食を免れ、肝での取り込みも抑えられ、腎排泄が遅延し、目的臓器である腎糸球体へ到達する。この PIC nanocarrier に内包するものとして、我々は small interfering RNA (siRNA) に着目した。siRNA は 21 塩基対の相補的な RNA で、メットとして、特異的な遺伝子を抑制すること、抑制効果に優れ低濃度でも効果がみられること、mRNA を破壊するだけで遺伝子自体には影響を及ぼさないこと、細胞質内で作用することなどがある。現在、治療対象として着目されて、欧米では臨床試験も試みられている。しかし短所として、陰性荷電のため細胞に取り込まれにくい、血中で不安定・血中半減期が短い、適切な DDS がない などの問題もある。しかし、私達の用いた PIC nanocarrier は内側の疎水

基が陽性に荷電しているため、陰性荷電である siRNA の方が、むしろ好都合となる。また、siRNA-PIC nanocarrier は血中での安定性も示されており(J Am Soc Nephrol 21:622-633, 2010)、PIC nanocarrier はむしろ siRNA 投与に適した DDS と考えられる。さらに、PIC nanocarrier が腎臓糸球体に特異的に取り込まれることが既に確認されている(J Am Soc Nephrol 21:622-633, 2010)。すなわち、この siRNA-PIC nanocarrier は 10-20 nm のサイズである。ここで腎糸球体の解剖学的構造を考えると、基底膜の間隙のサイズは約 4 nm である。他方、外側のポドサイト間には 50 nm の間隙が、内皮細胞には 70-100 nm の間隙がある。よって siRNA-PIC nanocarrier はサイズの観点から、基底膜の通過は困難であるが、糸球体毛細血管血管内皮の間隙を通過することは可能である。この解剖学的な特徴に、腎臓は多臓器に比し単位重量当たりの血流量が多いこと、糸球体毛細血管は他の毛細血管に比し血管内圧が高いことも加わり、メサンギウム内に長時間留まり、メサンギウム細胞に取り込まれ、ここで作用を発揮する。

交感神経終末のカテコラミン産生の律速段階となっているのはチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase: TH) である。そこで、糸球体の交感神経系を抑制することを目的として、TH の siRNA をこの PIC nanocarrier を用いて糸球体に導入し、血圧や腎機能に及ぼす影響について検討し、腎糸球体交感神経の血圧調節や腎機能に関する役割を調べた。

## 【方法】

交感神経亢進を伴う腎障害合併高血圧モデルとして deoxycorticosterone acetate (DOCA)-食塩ラット (Sprague-Dawley ラットに片腎摘を行い、3 週間の DOCA 投与[25 mg/週、皮下投与]+8%高食塩食負荷を施行) をモデル動物とした。

### ① *In vitro* experiment

まず、プライマリーカルチャーで作成した培養 DOCA-食塩ラット由来メサンギウム細胞と健常ラット由来メサンギウム細胞の TH 発現を real-time RT-PCR により比較検討した。次に、それらのメサンギウム細胞および培養メディアム内のカテコラミン含有量を microcolumn LC-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection 法により測定した。さらに、トランスフェクション試薬であるリポソームを用いて TH siRNA を導入し、TH 発現の抑制効果が認められるか否か検討した。

### ② *In vivo* experiment

コントロール群(片腎摘+普通食)、DOCA-食塩ラット群、scrambled siRNA 投与 DOCA-食塩ラット群、TH siRNA 投与 DOCA-食塩ラット群を作成した。TH siRNA 投与群は TH siRNA を PIC nanocarrier に混和し、8 週齢から週 2 回×3 週間、10 nmol/回を腹腔内投与した。偽薬群として scrambled siRNA-PIC nanocarrier を同様に投与した。これら 4 群のラットに対し、観血的血圧測定、尿蛋白・アルブミン測定、腎臓の組織学的変化、腎臓での TH 発現について評価を行った。

## 【結果】

### ① *In vitro* experiment

DOCA-食塩ラット由来メサンギウム細胞は、健常ラット由来メサンギウム細胞に比し、TH 発現の亢進を認めた。またメサンギウム細胞および培養メディアム内のカテコラミン含有量は、DOCA-食塩ラット由

来細胞で有意に増加していた。さらに、DOCA-食塩ラット由来メサンギウム細胞では TH siRNA の導入により TH 発現は抑制された。

## ② *In vivo* experiment

DOCA-食塩ラットはコントロールラットに比し著明な血圧上昇、尿蛋白・尿アルブミン排泄量増加と腎糸球体並びに間質病変の進展を認めた。また DOCA-食塩ラットでは腎糸球体における TH の発現亢進を認めたが TH siRNA 投与はこれを抑制した。TH siRNA 投与は血圧には影響しなかったが、尿蛋白・尿アルブミン排泄量を有意に減少させた。また、TH siRNA 投与は、糸球体病変の改善は認められたものの、間質病変に対する影響は認められなかった。scrambled siRNA は血圧や間質病変のみならず、尿蛋白・尿アルブミンや糸球体病変、糸球体の TH 発現において改善効果を認めなかった。

## 【考察】

*In vitro* 実験の結果、DOCA-食塩ラット由来メサンギウム細胞は、健常ラット由来メサンギウム細胞に比し TH 発現が亢進していた。さらに DOCA-食塩ラット由来メサンギウム細胞でカテコラミン産生は増加していたことから、糸球体局所における交感神経系が亢進している可能性が示唆された。また実験で用いた TH siRNA の有意な TH 抑制効果を確認できた。*In vivo* の実験では DOCA-食塩ラットに対する糸球体選択的な TH siRNA の投与は、降圧を来たさなかったものの、蛋白尿・アルブミン尿の改善効果を認め、さらに糸球体特異的に組織像を改善した。なお、糸球体 TH 発現に影響しない scrambled siRNA は血圧や間質病変のみならず、尿アルブミンや糸球体病変のいずれにも改善効果を認めなかった。したがって、TH siRNA 自体に糸球体保護効果があることが証明できた。なお、TH siRNA は血圧に影響がなかった。したがって、DOCA-食塩ラットにおいては腎糸球体局所の交感神経亢進が糸球体障害進展に重要な役割を果たしているものと考えられた。一方、腎交感神経系の血圧への影響は尿細管・間質における交感神経活動が重要である可能性が考えられた。

## 【まとめ】

DOCA-食塩ラットにおいて糸球体特異的な TH 抑制によって腎糸球体に限定した腎保護効果を認めた。PIC nanocarrier を用いた腎糸球体を標的にした TH siRNA 導入による交感神経抑制は明らかな糸球体保護効果を有することから、糸球体に分布する交感神経の亢進は腎糸球体障害の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(3695 字/4000 字制限)