

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19592088  
研究課題名（和文） 腎不全における血管新生因子を用いた遺伝子治療の可能性  
研究課題名（英文） Angiogenic Therapy for Renal Failure with Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor in Rat.  
研究代表者  
木村 哲也 (KIMURA TETSUYA)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号：50195369

## 研究成果の概要：

ラットの腎不全モデルに対し、血小板由来内皮細胞成長因子 (Platelet-derived endothelial cell growth factor; PD-ECGF/TP) を腎に局所注入し、その効果を評価した。また、血管新生因子である VEGF (Vascular endothelial growth factor) との併用効果についても検討した。その結果、ラット腎不全モデルにおいて PD-ECGF/TP プラスミドベクターを腎へ局所注入することにより間質内に PD-ECGF/TP が発現することを認めた。PD-ECGF/TP 自体の腎保護効果、また VEGF との併用効果は認められなかったが、遺伝子の腎実質への局所導入による新たな治療の展開が期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：腎不全、血管新生因子、PD-ECGF、TP

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) はじめに

腎不全はさまざまな原因によって引き起こされ、医療現場の中でも主要疾患の一つと

なっている。なかでも糖尿病性腎症や慢性糸球体腎炎、出血などに起因するものが多くを占め、その一部は慢性腎不全へと移行する。腎機能が廃絶し、永久血液透析が必要となつ

た場合は、生涯にわたり高額な透析治療を必要とし、かつ患者の QOL (Quality of Life; 生活の質) の低下に伴い労働活動は制限され、さまざまな医療ならびに社会経済上の問題を生ずることになる。

現在このような症例に対しては、食事・薬物療法に加え、急性腎不全には一時的に血液濾過透析に代表されるような対症療法が行われているが、積極的に腎機能を改善させる治療法はいまだになく、最終的には永久透析に移行する例が多い。

近年、主に虚血性心疾患を中心とした動脈硬化性病変に対し、分子生物学的研究手法を用いた遺伝子治療の可能性についての研究が積極的に進められている。血管新生促進因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) や hepatocyte growth factor (HGF) などの局所的投与の有効性が認められ、一部臨床応用も開始されている。さらには、内皮細胞やその前駆細胞を虚血組織に移植し、血管新生を誘導して治療を行おうとする試みもなされている。しかしながら、腎臓においては、これら血管新生因子を用いた場合の腎機能に対する影響や、あるいは腎不全に対する血管新生因子の腎機能改善効果の可能性などについての研究はほとんどなされていない。

## (2) われわれのこれまでの取り組み

チミジンフォスホリラーゼ (TP) はピリミジンヌクレオシド代謝に関与する酵素であり、チミジンとチミンの間の変換を触媒する酵素である。この酵素活性が悪性腫瘍症例の血清中で高いことが示されたが、その機序やこの酵素の腫瘍増殖における役割等は不明であった。その後、TP が血管新生因子である PD-ECGF (血小板由来内皮細胞成長因子; Platelet-derived endothelial cell growth factor) と同一であること (以下 PD-ECGF/TP)、同酵素による血管新生にはその酵素活性が

必須であることなどが明らかとなった。われわれはこれまで、この血管新生因子である PD-ECGF/TP の動態に着目し、成犬の慢性虚血心筋モデルや家兎重症虚血肢モデルを用いて研究を進めてきた。その結果、PD-ECGF/TP によって血管新生が誘発され、アポトーシスの抑制において重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、家兎重症虚血肢モデルを用いて PD-ECGF/TP の血管新生効果を検討した結果、PD-ECGF/TP 遺伝子導入群では、組織学的に虚血部の脈管が増生し、血管造影検査で側副血行路が有意に発達し、下腿血圧左右差も有意に改善することを見出した (文献 1)。

1. Yamada N, Li W, Ihaya A, Kimura T, Morioka K, Uesaka T, Takamori A, Handa M, Tanabe S and Tanaka K. "Platelet-derived endothelial cell growth factor gene therapy for limb ischemia." J Vasc Surg 2006; 44: 1322 (平成 14~15 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C)) (2) 研究代表者: 木村 哲也)

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腎不全における対する血管新生因子を用いた遺伝子治療の可能性を検討することであり、具体的には以下の 2 点である。

(1) 腎臓に、血管新生因子の一つである PD-ECGF/TP を導入することで、腎に機能的・形態的にどのような変化がもたらされるかを検討すること。

(2) さらに、機能低下腎に VEGF と PD-ECGF/TP の 2 つの血管新生因子を併用することにより、腎機能の改善あるいは、腎不全進行の予防・抑制効果が得られないか、について検討すること。



#### 4. 研究成果

(1) 実験に先立ち、ラットの腎動静脈を遮断した状態で、腎にカーボンインクを一穿刺点より 30G 注射針より直接注入し、色素粒子の広がりを観察した。腎剖面で色素は腎全体に限らず分布し (図 2-1)、HE 染色した組織像では腎皮質から髄質の間質領域に粒子が存在することが確認された (図 2-2)。



図 2-1 腎剖面：色素は腎全体に広がっている

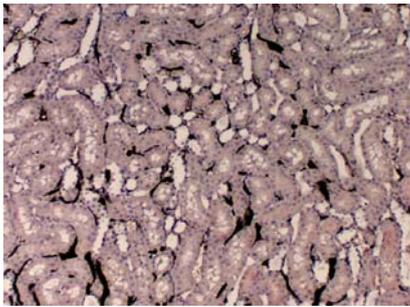


図 2-2 HE 染色×100

また、PD-ECGF/TP プラスミドベクターを家兔下肢筋に導入し、8 週後に核酸増幅反応試験 (PCR) を行ったところ、PD-ECGF/TP が発現していることが確認された (図 3)。

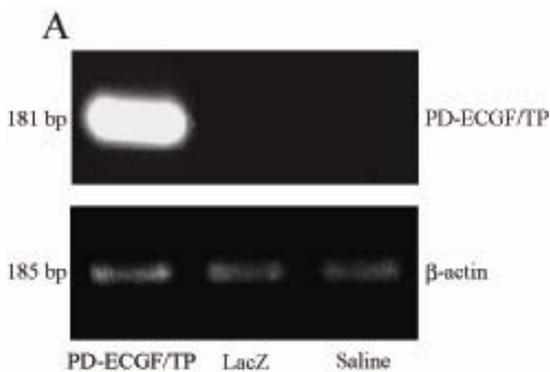


図 3 PCR

#### (2) 腎不全モデル

ラットを犠牲死させ、残存腎を摘出し組織標本を作製し、病理組織的に腎障害の程度を検討したところ、7 日目までの組織像では、尿細管の壊死、蛋白円柱など急性腎障害の像を軽度認めたが、8 週間後においては、尿細管の拡張・糸球体の肥大などの他に糸球体硬化病変の進行が認められた (図 4-1、図 4-2)。糸球体係数 (下記参照) は  $0.55 \pm 0.13$  であ

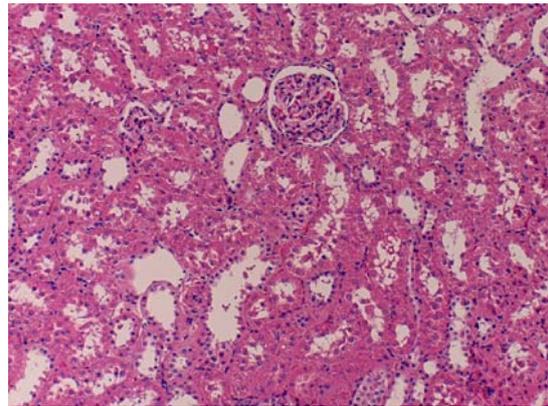


図 4-1 コントロール (HE 染色×100)

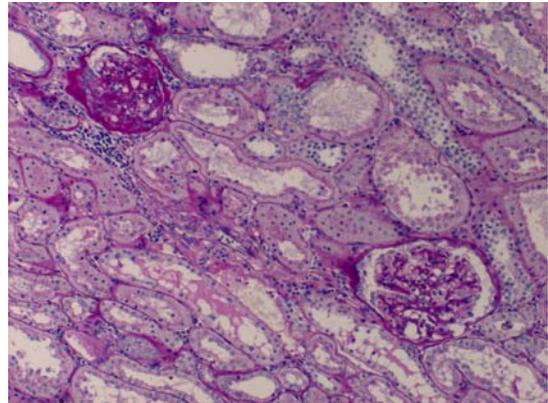


図 4-2 8 週後 (PAS 染色×100) った。

#### (3) 遺伝子導入

摘出した残腎を X-gal 染色、抗 TP 抗体免疫染色において、LacZ および PD-ECGF/TP は皮質から髄質にかけての間質領域に発現していた (図 5)。

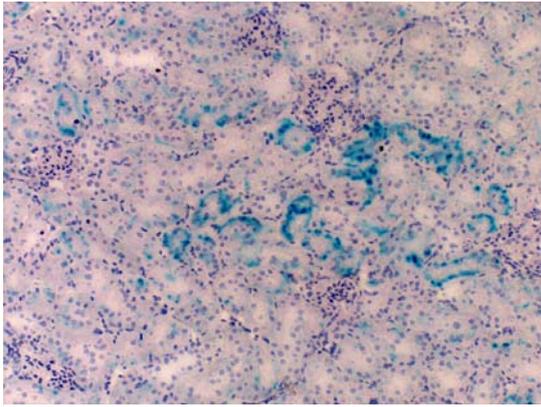


図 5-1 X-gal 染色

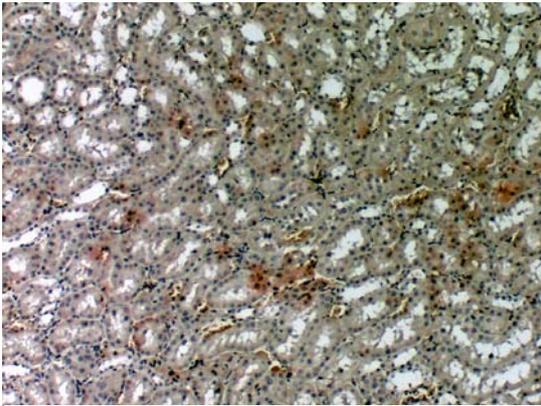


図 5-2 抗 TP 抗体免疫染色

#### (4) 糸球体係数

無作為に 40 個の糸球体を、下記の基準に従って分類した後、 $(0a+1b+2c+3d+4e) / (a+b+c+d+e)$  の式により糸球体係数を算出し、糸球体病変の程度を評価した。

- a: 正常な糸球体係数 (係数 0)
- b: 硬化部が 25%未満の糸球体数 (係数 1)
- c: 硬化部が 25~50%未満の糸球体数 (係数 2)
- d: 硬化部が 50~75%未満の糸球体数 (係数 3)
- e: 硬化部が 75 以上の糸球体数 (係数 4)

その結果、8 週後の残腎の糸球体係数は、LacZ 群に比し、TP 群で低い傾向にあったが有意差は認められなかった (図 6)

また、Sham に対し LacZ 群では糸球体係数が高い傾向にあった。

これは、TP 投与により腎障害の進行が抑制されることが期待できる一方、プラスミドの腎への直接注入自体が腎組織に障害を与えている可能性もあり、今後も検討を要する。

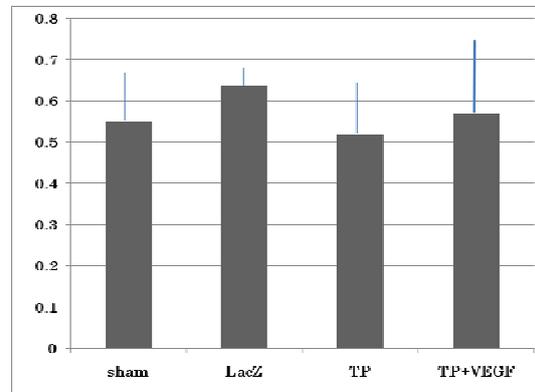


図 6 糸球体係数

#### (5) 腎機能パラメーター

術後 5 日、7 日、8 週後の各腎機能パラメーターの経時的変化では、5 日後、7 日、8 週後の PCr、BUN は各々前値に比べ有意に上昇しており、6 分の 5 腎切除モデルでは、経時的に腎機能障害が進行していくことが示された。しかしながら、PD-ECGF/TP、VEGF の腎機能障害に対する影響の検討においては、5 日後の PCr 値が LacZ 群に比し TP+VEGF 群で、低下傾向にあったものの、各パラメータでは、各群間に明らかな有意差はなかった。(図 7、8、9)

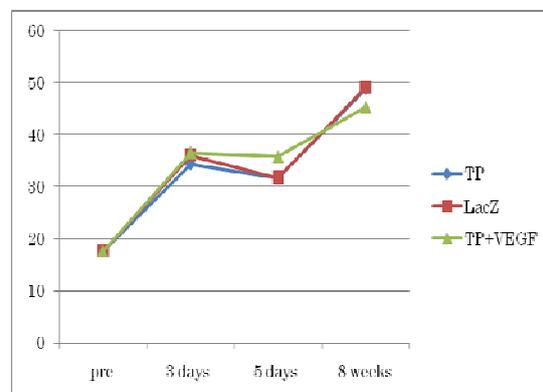


図 7 BUN

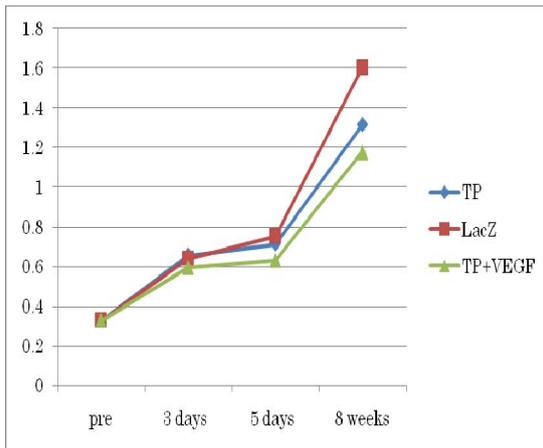


図 8 PCR

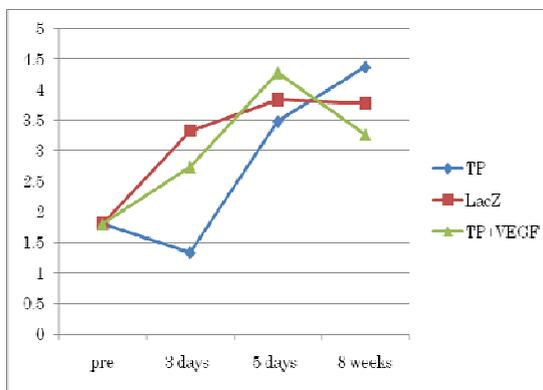


図 9 UA

## まとめ

ラット 5/6 腎摘出モデルにおいて PD-ECGF/TP 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターを腎動脈遮断下に腎実質に局所注入しその効果を評価した。PD-ECGF/TP 自体の腎保護効果、また PD-ECGF/TP と VEGF との併用効果は認められなかったが、腎実質に直接プラスミドベクターを注入することで間質内に PD-ECGF が発現することが確認され、腎実質への遺伝子の局所導入による新たな治療の展開が期待された。

## 5. 主な発表論文等

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 哲也 (KIMURA TETSUYA)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：50195369

### (2) 研究分担者

寺澤 秀一 (TERASAWA HIDEKAZU)

福井大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30324164

小淵 岳恒 (KOBUCHI TAKETSUNE)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10401986

又野 秀行 (MATANO HIDEYUKI)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00412213

北野 史浩 (KITANO FUMIHIRO)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00444216

本報告を終えるにあたり、研究のご協力をいただいた法木左近先生（福井大学医学部病因病態医学講座腫瘍病理学准教授）、ならびに木村秀樹先生（福井大学医学部病態制御医学講座腎臓病態内科学准教授）に深謝いたします。