

外部刺激を利用した腎臓選択的遺伝子導入における

組織内空間分布の評価とその制御

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻 博士課程2年（助成時）
博士課程3年（現在）

大山 奈津子

【背景・目的】

腎臓は、生命維持に重要な機能を持つが、持続的な腎機能悪化により末期腎不全状態に陥ると、透析や移植を必要とすることから予後に大きな影響を与える。近年、線維化を伴う難治性疾患に対する根治療法として遺伝子・核酸が注目され、標的部選択的な *in vivo* 遺伝子・核酸導入が研究されている。一方で、腎臓は構造の複雑さと特異的リガンドの欠如により、*in vivo* 遺伝子導入法に関する報告が少ない臓器である。腎臓への *in vivo* 遺伝子導入の先行技術として、腎臓表面に針を直接穿刺し注入する直接注入法や電気刺激を利用するエレクトロポレーション法が報告されているが、腎障害性が問題となる。我々の研究グループでは、これまでに、外部刺激として吸引圧や超音波を利用することで、腎臓に対して高効率かつ安全にネイキッド核酸を送達可能である、組織吸引圧核酸導入法（以下、組織吸引圧法）¹⁾、超音波応答性ナノバブルによるソノポレーション法²⁾に関する研究をおこなってきた。しかしながら、外来遺伝子発現分布や遺伝子導入細胞に関する情報は未だ不明であり、遺伝子治療戦略の構築や機能解析を行うためには、腎臓内外来遺伝子発現・送達の分布特性を明らかにする必要がある。

近年、組織透明化による生体組織の深部イメージングが注目を浴びている。組織透明化と共焦点レーザー顕微鏡による観察を組み合わせることにより、高感度かつ簡便に外来遺伝子発現の空間分布を捉えることが可能である。一方、他の臓器と比較して、腎臓内外来遺伝子発現・構造物の可視化に関する検討は十分になされていない。そこで本研究では、生体膜保持可能な透明化試薬を利用して腎臓内構造物の染色を試み、異なる外部刺激を利用した腎臓への *in vivo* 遺伝子導入法における外来遺伝子発現・送達の空間分布を評価した。

【結果・考察】

まず、各遺伝子導入手法における外来遺伝子発現と血管との空間的位置関係の解明を試みた。蛍光蛋白発現 plasmid DNA (pDNA) を投与し、24 時間後、生体膜を保持可能な組織透明化試薬 *Scale SQ*³⁾ を使用して血管染色をおこない、空間分布を評価した。その結果、組織吸引圧法では、外来遺伝子発現は血管の外側の尿細管間質領域で広範に観察された⁴⁾。直接注入法やエレクトロポレーション法でも同様の傾向を示したが、組織吸引圧法と比較すると、

前者では注入部位に限局的な発現分布、後者では分散性が劣る結果となった。一方、超音波応答性ナノバブルでは、一視野での外来遺伝子発現は多くはないが、左右腎臓全体にわたり均等に発現がみとめられた。また、間質領域に加え、糸球体を含む血管でも発現が観察され、内皮細胞に遺伝子導入される可能性が示された。通常、pDNA を含む高分子の血管外漏出は制限されるため、血管から投与した pDNA が、血管バリアを透過して導入細胞に取り込まれるのかという点は明らかにすべき点である。そこで、組織吸引圧法に絞り、同様に透明化試薬 ScaLe SQ を用いて蛍光標識 pDNA の空間分布を評価した。その結果、吸引圧非処置群では、いずれの時点においても蛍光標識 pDNA は血管壁に局在していたのに対し、吸引圧処置群では、pDNA の血管外の間質細胞への移行が確認された (図 1)。これは、吸引圧刺激により pDNA が血管バリアを透過可能であることを示す。

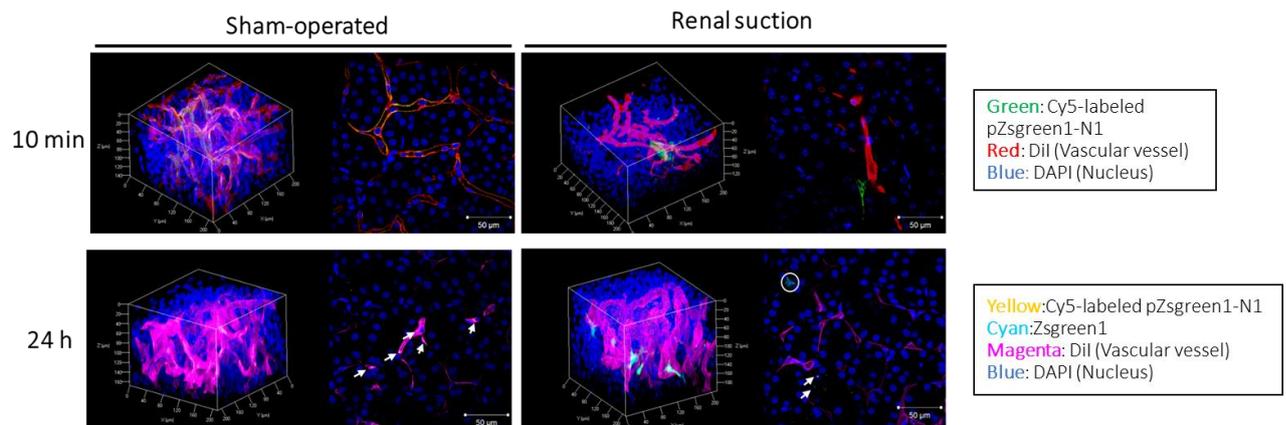


図1. 組織吸引圧法におけるpDNA送達の空間分布

得られた空間分布の結果をもとに、凍結切片の免疫染色をおこなったところ、組織吸引圧法、直接注入法、エレクトロポレーション法においては、主に尿細管周囲線維芽細胞 (CD73 陽性)、血管周皮細胞 (PDGFR- β 陽性) に遺伝子導入されることが明らかとなった。これらの間質細胞に加えて、超音波応答性ナノバブル製剤では、血管内皮細胞 (CD31 陽性) へ遺伝子導入されることが示唆された。

以上、組織吸引圧法では、エレクトロポレーション法や直接注入法等の既存の遺伝子導入手法と比較して、尿細管間質線維芽細胞へ効率的に遺伝子送達しうることを示された。一方、他の外部刺激である超音波応答性ナノバブル製剤では、間質細胞に加えて血管内皮細胞にも遺伝子導入しうることを示された。

【参考文献】

- 1) Shimizu K, et al., *PLoS One*, 7(7), e41319 (2012)
- 2) Kurosaki T, et al., *Nanomedicine*, 10, 1829-38 (2014)
- 3) Hama H, et al., *Nat Neurosci*, 18(10), 1518-29 (2015)
- 4) Oyama N, et al., *Drug Deliv*, 24(1), 906-917 (2017)