

総説 腎移植シリーズ

腎移植と遺伝子治療

大阪大学大学院病態情報内科学

猪 阪 善 隆 今 井 圓 裕

はじめに

カルシニューリン阻害薬の登場により、移植は医療として定着するようになったが、最近のミコフェノール酸モフェチルやバシリキシマブは、移植腎の短期生着率を飛躍的に向上させ、長期生着率の向上についても期待されるところである。移植医療の問題点の一つである後期移植腎廃絶は、慢性移植腎症とよばれる進行性の腎機能障害に起因する。慢性移植腎症は、生検により必ずしも区別できるわけではないいくつかの病態(慢性拒絶反応、カルシニューリン阻害薬による腎毒性、高血圧性血管障害など)を含んでいる。Nankivell らがプロトコールバイオプシーによる慢性移植腎症の自然経過を報告した貴重な研究によるとり、移植後1年以内に慢性移植腎症が患者の94%に発現し、慢性移植腎症のリスクは急性虚血または無症候性拒絶反応の既往と相関関係を示した。また、驚くべきことに、カルシニューリン阻害薬による腎毒性は、移植後7~10年の患者で50~100%で診断されたという。

本稿では、移植腎の長期生着を目指した治療戦略としての遺伝子治療の基礎的研究について概説したい。

慢性移植腎症の原因

慢性移植腎症の原因は、免疫学的な機序によるものと非免疫学的な機序によるものに分類されるが、両者が混在することは少なくない。急性拒絶反応を経験しない患者には慢性移植腎症が少なく、慢性移植腎症に免疫学的機序が関与することは疑いようがない。急性拒絶反応の程度の強さ、回数、6カ月以降の急性拒絶反応などは長期生着に対する危険因子である。しかしながら、一卵性双生児間の移植においても慢性拒絶反応が認められることや、新たな免疫抑制剤の登場にも関わらず、移植腎の長期生着の改善が芳しくないことから、慢性移植腎症の主たる原因が非免疫学的機序であるとする考えもある。

Brenner らは、腎障害の進行の過程において、機能ネフロン数の減少が重要な因子であることを報告している。この理論は移植腎においてもいくつかの臨床的な報告から支持されうる。例えば、機能ネフロン数が加齢により減少している老人をドナーとして行った腎移植や、解剖学的に機能ネフロン数が白人より少ない黒人から白人への腎移植では、慢性移植腎症の発症時期が早くなることなどが良い例である。これらの事実から、慢性移植腎症の発症・進展には機能ネフロン数の減少が要因の一つとなると考えられる。

このような機能ネフロン数の減少が慢性移植腎症へ与える影響については、移植前のドナー腎の状態だけでなく、移植時および移植後早期のドナー腎の傷害についても考慮すべきであることは言うまでもない。慢性移植腎

症のトリガーは多様であり、腎虚血再灌流傷害、急性拒絶反応をはじめウイルス感染など、機能ネフロンを減少させるすべての要因が原因となりうる。高血圧症や高脂血症もまた、リスクファクターとなる。したがって、機能ネフロンを温存させるためのあらゆる手段を講じて治療にあたることが重要であり、遺伝子治療もまた、その治療戦略となりうると思われる。

慢性移植腎症に対する HGF 遺伝子治療

肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor：HGF)は、肝細胞を増殖させる因子として見出されたが、その後、細胞増殖のみならず細胞運動や器官形成などにも重要な役割を果たしていることが見出された。また、薬剤などによる腎傷害の軽減ならびに傷害後の尿細管上皮細胞の修復に関しても HGF は重要な働きをすることが示され、シクロスポリンあるいはタクロリムスなど、カルシニューリン阻害薬による急性毒性に対する腎保護効果も報告されている²⁾。

Azuma ら³⁾は、慢性拒絶モデルラットに HGF を移植直後に4週間だけ投与すると、慢性拒絶反応に特徴的な腎間質の線維化、糸球体硬化、マクロファージの浸潤が抑制され、腎生着率も改善することを報告している。この結果は、前述したような移植後早期の腎傷害による機能ネフロンの減少が移植腎の廃絶につながり、逆に移植直後の適切な治療がその後の移植腎の生着に大きな影響を与えることを示唆している。すなわち、HGF が移植直後の虚血再灌流傷害を抑制する可能性を示すものであり、移植早期に HGF にて治療を行うことにより、慢性拒絶反応への進展を抑制または遅延できる可能性を示すものと考えられる。

われわれは、最近、エレクトロポレーション法による遺伝子導入法を開発した。細胞を高電圧下に置くと細胞膜に小さな穴(10 nm)が短時間(10 nsec)あき、この穴を通じて濃度圧勾配によって物質が流入することがエレクトロポレーション法による遺伝子導入の機序と考えられている。プラスミドを含む生食液を腎動脈から注入し、ピンセット型電極で腎臓を挟み、腎臓に75 Vの電圧を100 msec間、数回掛けることにより、ほとんどの糸球体メサンギウム細胞と間質の線維芽細胞に遺伝子が導入される⁴⁾。

HGF はすでに述べたように、移植後急性期の虚血再灌流傷害およびそれに起因する慢性移植腎症に対して有効である可能性がある。蛍光ラベルしたオリゴ DNA をミニブタの腎動脈から注入し、エレクトロポレーション法により遺伝子導入を行うと、糸球体および間質細胞に遺伝子が導入されることをすでに確認している(図1)。そこでわれわれは、ヒトへの臨床応用のために、ブタの腎臓に HGF 遺伝子をエレクトロポレーション法を用いて導入し、移植腎に対する HGF 遺伝子治療の安全性と有効性に関する検討を行った⁵⁾。エレクトロポレーション法により、プラスミドベクターで導入した HGF が1週間後に発現することを免疫組織化学および ELISA により確認した。また、HGF 遺伝子導入後1, 3, 6 カ月目に腎臓を摘出し、組織への影響を検討したところ、コントロール群に比較して間質の線維化が抑制されていることが確認された。また、移植腎以外の臓器への導入は認められず、遺伝子導入が局所的に行えることが確認された。現在、ヒト移植腎への臨床応用に向け、倫理委員会に申請中である。

薬剤性腎障害に対する遺伝子治療

シクロスポリンやタクロリムスなどのカルシニューリン阻害薬は強力な免疫抑制剤であるが、慢性腎毒性を有し、腎臓以外の臓器移植などにおいても不可逆性の腎機能障害をきたすことが知られている。前述の Nankivell らの報告¹⁾によると、1年目以降の拒絶反応は、境界型潜在性の拒絶反応まで含めても20%以下であるが、一

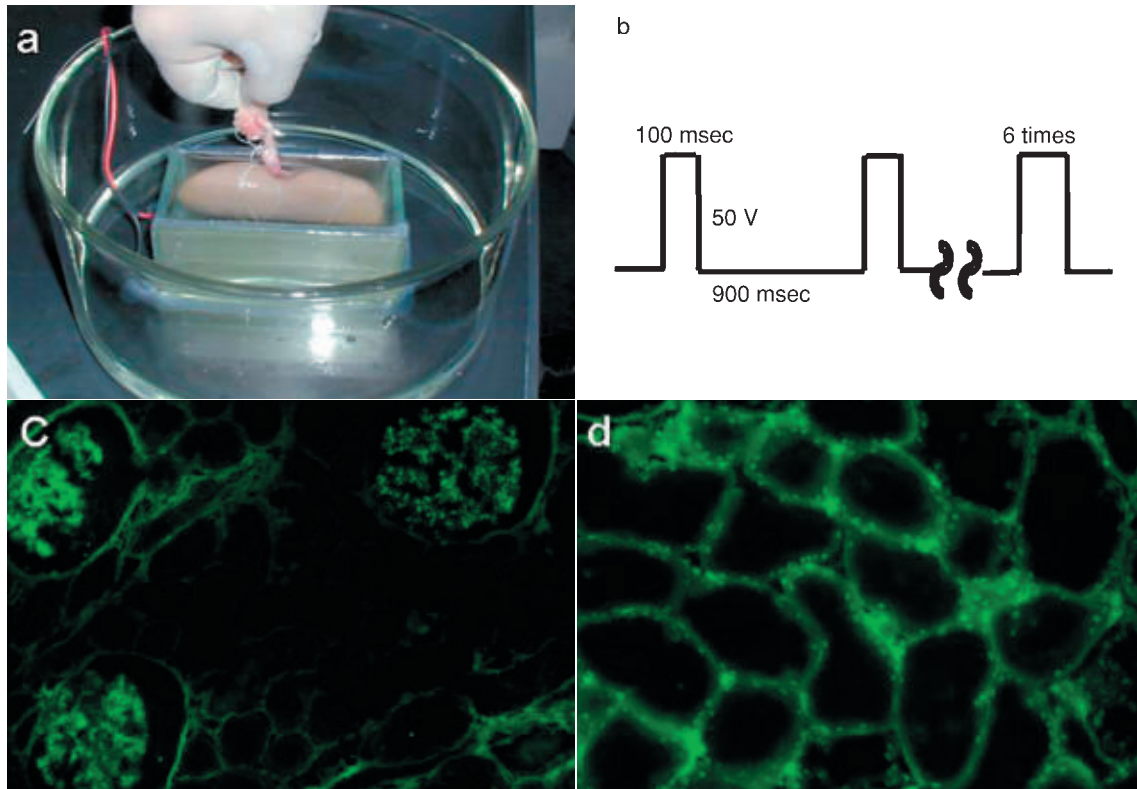


図 1 エレクトロポレーション法によるブタ腎への遺伝子導入

摘出したブタ腎臓に腎動脈より FITC オリゴ DNA を注入し、バスタブ型電極(a)を用いて、100 msec、50 v のスクエア型パルス波 6 回(interval 900 msec)により遺伝子導入を行った(b)。FITC オリゴ DNA は糸球体のみならず(c)、間質細胞(d)にも集積している。(c, d ; $\times 400$)

方、カルシニューリン阻害薬による腎傷害は年々増加し、3 年目以降になると 50 %を超え、10 年目ではほぼ 100 %カルシニューリン阻害薬による腎傷害を示すという。カルシニューリン阻害薬による腎傷害は尿細管細胞の空胞変性、尿細管間質の縞状の線維化、輸入細動脈の硝子化などを特徴とするが、その傷害は薬剤量を軽度～中等度減量しても回復できないとされる。つまり、カルシニューリン阻害薬は、腎移植においては、拒絶反応と薬剤性傷害の標的臓器がともに腎臓であり、腎移植における初期の免疫学的機序による拒絶反応に対しては保護的に作用するものの、長期にわたる腎毒性により腎傷害を惹起するというパラドックスを内包している。逆に、カルシニューリン阻害薬による腎毒性を軽減すれば、移植腎の長期生着につながると考えられる。

われわれは、前述した HGF を用いたラットシクロスポリン腎症に対する遺伝子治療の可能性についても検討している⁹⁾。減塩下でラットを飼育し、連日シクロスポリン(CsA)を皮下注射し、CsA 腎症モデルを作成した。投与開始 1 週、2 週後にエレクトロポレーション法にて CsA 腎症モデルラットの筋肉に HGF 遺伝子を導入し、3 週後に無治療群と比較し、HGF 遺伝子導入の効果を検討した。組織学的検討により、vehicle を導入した CsA 群では、2 週後、3 週後ともに細動脈硝子化や尿細管細胞傷害、間質の線維化を認めたが、HGF 遺伝子導入群では、これらの病変はいずれも抑制されていた(図 2)。また、間質の形質転換のマーカーである smooth muscle α actin(SM α A)の発現や、マクロファージのマーカーである ED1 も CsA 群では増加していたが、HGF 群では改善が認められた。CsA 群で認められた TUNEL 陽性の尿細管細胞のアポトーシスは、HGF 群では軽減し、リン酸化 Bad 陽性細胞が増加していた。一方、細胞増殖のマーカーである Ki-67 陽性尿細管細胞は HGF 群で増加しており、HGF 遺伝子導入は、尿細管細胞を保生し、再生を促進していると考えられた。また、腎皮

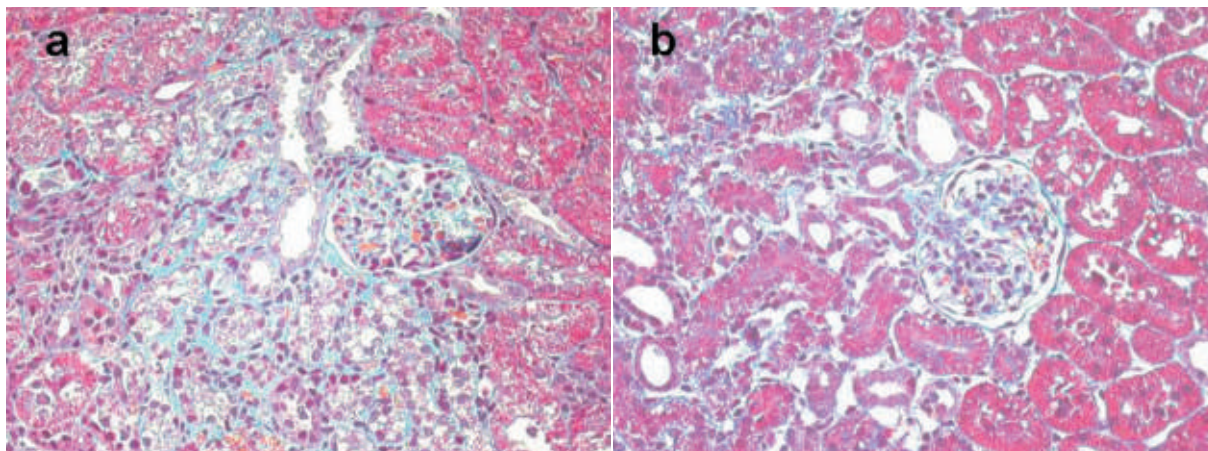


図 2 CsA 腎症に対する HGF 遺伝子治療の効果

CsA 群では尿細管障害、間質の縞状の線維化を認めるが(a), HGF 群ではこれらの障害は抑制されていた(b)。マッソントリクロム染色(×200)

質の $TGF\beta 1$ 発現を検討したところ、CsA 群では $TGF\beta 1$ が上昇していたが、HGF 群ではその発現が減少していることが確認された。ヒト近位尿細管細胞株(HK-2)を用いて CsA に対する HGF の抗アポトーシス効果を検討した。CsA により尿細管細胞にアポトーシスが誘導され、HGF がこれを抑制していることがカスパーゼ 3 活性測定により確認された。また、そのメカニズムとして bcl-2, リン酸化 Akt の上昇を介していることが確認された。

以上の検討により、HGF 遺伝子治療は、CsA 腎症に対しても、尿細管上皮細胞の抗アポトーシス効果、尿細管上皮細胞の増殖、および $TGF\beta 1$ 抑制を介した抗線維化作用というメカニズムにより治療効果を有すると考えられ、前述したブタ移植腎モデルでの検討結果と併せて、HGF 遺伝子治療は、腎移植に対して有効な治療戦略となる可能性がある。

急性拒絶反応に対する遺伝子治療

急性拒絶を抑制することは慢性拒絶反応を起こす可能性を低下させることが報告されている。急性拒絶反応は、T 細胞を介した免疫反応であり、nuclear factor κ B(NF κ B)が重要な転写因子の一つとして働いていることが報告されている。実際、免疫抑制剤として使用されているグルココルチコイドやカルシニューリン阻害薬の作用機序の一つとして、NF κ B 活性化の抑制があげられている。NF κ B は、TNF- α , IL-1, フィブロネクチン, トロンピンなどの刺激により活性化され、IL-1, IL-6, ICAM, VCAM, MCP-1, I 型コラーゲンなど炎症に関する多くの遺伝子のプロモーターに結合することにより、これらの遺伝子を発現させる。Azuma らは NF κ B をターゲットとした、おとり型核酸医薬(デコイ)を利用した移植腎急性拒絶反応に対する遺伝子治療を報告している⁷⁾。このデコイのメカニズムは、遺伝子のプロモーターNF κ B の結合部位と同じ塩基配列をもつ二重鎖 DNA を細胞内に大量に導入し、NF κ B の遺伝子プロモーター領域への結合を競合阻害するものである。

Azuma らは、超音波とマイクロバブル造影剤(オプチゾン)を組み合わせた遺伝子導入法を用いると、NF κ B デコイは移植腎モデルラットの糸球体や尿細管細胞に導入されることを確認している。コントロールの移植腎モデルラットに比べて、NF κ B デコイを導入した移植腎では、炎症性サイトカインや接着因子など(IL-1, TNF- α , MCP-1, ICAM-1, iNOS)の発現が抑制され、腎傷害も軽減し、移植腎の生着期間もコントロールの 7 日か

ら 14 日に延長させることが可能であったことが報告されている。

臓器移植後は再灌流により臓器傷害がみられるが、その一因に白血球の遊走による臓器傷害が認められる。この炎症反応に対する遺伝子治療が行われている。Chen らは ICAM-1 のアンチセンスオリゴをラット腎臓に *ex vivo* で灌流した後、同種移植を行い、ischemia/reperfusion 傷害が軽減するかを移植 24 時間後に検討した。この結果、アンチセンス導入により ICAM-1 の発現が減少し、腎機能悪化が抑制できたことを報告している⁸⁾。

免疫寛容導入を目指した遺伝子治療

移植医療において、免疫寛容導入はある意味で究極の治療法と言えるかもしれない。FTY720 や T 細胞共刺激因子の抗体なども開発されており、免疫抑制療法はかなり完成度が高いと考えられる。T 細胞を活性化するための刺激は抗原認識シグナルとしての T 細胞受容体と副刺激である CD28/CD80, CD86 系 CD40/CD40 リガンドにより伝えられる。この副刺激を遮断すると T 細胞は活性化されず、成熟 T 細胞が特定の MHC・ペプチド複合体を認識する TCR を発現しているにも関わらず、同 TCR リガンドを認識しても免疫応答を示さないアナジーに陥る。CTLA4 は CD28 の本来のリガンドである CD80, CD86 より 20 倍強力なリガンドである。CTLA4Ig はこの CTLA4 と IgGFc 部分を合成したキメラ蛋白であるが、この蛋白の遺伝子を用いた移植腎への遺伝子治療が試みられている。Tomasoni らは、アデノウイルスベクターを用いて CTLA4Ig 遺伝子を移植腎に導入することにより、ラットの慢性拒絶モデルで長期生着が可能であることを報告している⁹⁾。さらに心臓移植モデルでは、アデノウイルスベクターを用いて CTLA4Ig および CD40Ig 遺伝子を導入することにより、さらに強力な免疫寛容が導入できたと報告している¹⁰⁾。

おわりに

日本においても、1995 年から本格的な遺伝子治療臨床研究が開始され、現在ではその対象疾患も広がっており、最近では癌やエイズなど後天性疾患に対する遺伝子治療が主流となり、循環器疾患においても、閉塞性動脈硬化症などに臨床応用されるようになってきている。残念ながら、移植腎に対する遺伝子治療はまだまだ行われていないが、このような最先端の研究の臨床応用が期待されるところである。

文 献

1. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003 ; 349 : 2326-2333.
2. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor : renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 2001 ; 59 : 2023-2038.
3. Azuma H, Takahara S, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor prevents the development of chronic allograft nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12 : 1280-1292.
4. Tsujie M, Isaka Y, Nakamura H, et al. Electroporation-mediated gene transfer that targets glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12 : 949-954.
5. Isaka Y, Yamada K, Takabatake Y, et al. Electroporation-mediated HGF gene transfection protected the kidney against graft injury. *Gene Ther* 2005 : in press.
6. Mizui M, Isaka Y, Takabatake Y, et al. Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2004 ; 65 : 2041-2053.
7. Azuma H, Tomita N, Kaneda Y, et al. Transfection of NFkappaB-decoy oligodeoxynucleotides using efficient ultrasound-mediated gene transfer into donor kidneys prolonged survival of rat renal allografts. *Gene Ther* 2003 ; 10 : 415-

425.

8. Chen W, Bennett CF, Wang ME, et al. Perfusion of kidneys with unformulated “naked” intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotides prevents ischemic/reperfusion injury. *Transplantation* 1999 ; 68 : 880-887.
9. Tomasoni S, Azzollini N, Casiraghi F, et al. CTLA4Ig gene transfer prolongs survival and induces donor-specific tolerance in a rat renal allograft. *J Am Soc Nephrol* 2000 ; 11 : 747-752.
10. Yamashita K, Masunaga T, Yanagida N, et al. Long-term acceptance of rat cardiac allografts on the basis of adenovirus mediated CD40Ig plus CTLA4Ig gene therapies. *Transplantation* 2003 ; 76 : 1089-1096.