

エマルジョン化治療用遺伝子経皮デリバリー技術による内シャント狭窄の新規遺伝子治療法の開発

森下義幸

自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門

key words : 内シャント, 遺伝子治療, ドラッグデリバリー

要旨

血液透析（HD）に必要不可欠である内シャントは、経年的に過大な血流量と内圧の上昇や血液乱流等により、静脈壁が肥厚し狭窄をつくり閉塞に至る。現在、内シャント狭窄を抑制する特異的な治療法はなく、その開発はHD療法においてきわめて意義深い。本研究では、エマルジョン化治療用遺伝子経皮デリバリー技術による、HD患者の内シャント狭窄抑制の新しい遺伝子治療法を開発することを目的にした。ラットで大腿動脈を静脈に吻合し、内シャント動物モデルを作製した。本内シャントモデルでは、シャント作製から3週間でシャント静脈の著明な肥厚を認めた。続いて、細胞外マトリクスメタロプロテアーゼ（MMP-2）siRNAをクリーム基剤でエマルジョン化することを試みた。この調合について現在まで調節を重ねているが、複合体の安定性が十分でなく治療効果が得られていない。この点を改良するため、クリーム基剤を複数準備し調整を行っている。今後はsiRNAより高い安定性と、強い標的遺伝子ノックダウン率が報告されている架橋化核酸（bridged nucleic acids; BNA）を用い、それぞれの基材と最適な混和条件を調整し、内シャント狭窄治療のエマルジョン化治療用遺伝子経皮デリバリー技術開発を継続して行っていく予定である。

はじめに

血液透析（HD）では体外循環に十分な血液量を得

るためにシャントが不可欠であるが、シャントは経年的に静脈壁が強く肥厚し、狭窄をつくりシャント閉塞に至る。現在シャント狭窄の特異的な治療法はない。したがって、シャント狭窄を特異的に抑制する治療法の開発はHD療法においてきわめて意義深い。

治療薬の開発において、遺伝子治療は、これまで創薬化が困難であった病因分子を標的とした新しい治療法となるため注目されているが、生体内で有効な治療効果を得るための最大の課題は、標的部位への治療用遺伝子デリバリー技術の開発である。本研究ではシャント静脈が皮膚直下にあることに注目し、皮膚を浸透可能なクリーム基剤でエマルジョン化した治療用遺伝子を、シャント狭窄部位の皮膚に塗布する方法により、治療用遺伝子を狭窄シャントにデリバリーするシャント狭窄治療の新しい遺伝子治療法を開発することを目的にした。

1 材料と方法

すべての研究は自治医科大学動物実験委員会の承認を得たうえで、自治医科大学動物実験センターの規則を遵守し遂行した。

① 内シャントモデル動物作製

6週齢のオスWistarラットの右大腿部の皮膚を切開し、皮下組織、脂肪、筋肉を慎重に剥離し大腿動脈と大腿静脈を露出した。その後、大腿動脈と大腿静脈を端側吻合し、内シャント動物モデルを作製した。

② エマルジョン化治療用遺伝子作製

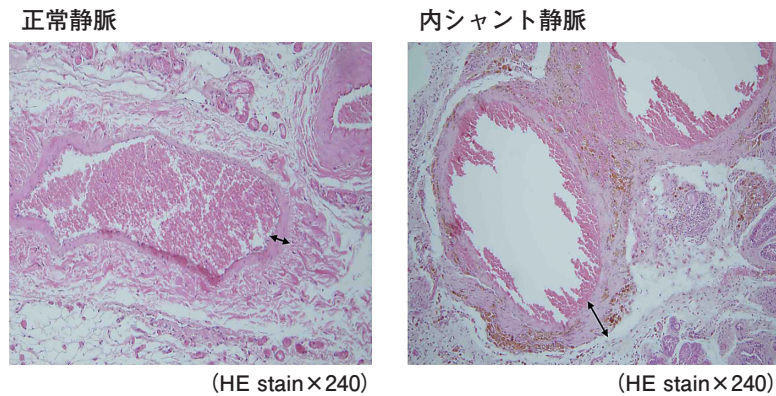


図1 内シャント静脈

人工合成したMMP-2スモールRNA (small interfering RNA; siRNA) と基剤 (油中水滴クリーム基剤, 水中油滴クリーム基剤, 水溶性ゲル基剤, 速乾性の水溶性ゲル基剤) をそれぞれ混合し, エマルジョン化治療用遺伝子作製を試みた. siRNA と基剤の複合体の安定性を siRNA と基剤の配合前後の 260 nm の吸光度, およびエレクトロフェーシス法により評価した.

2 結果

① 内シャントモデル動物

内シャント動物モデルをシャント作製3週間後に解剖し, 内シャント部静脈の状態を組織学的に評価したところ, 対側の正常な静脈と比較して, 静脈内膜, 中膜の著明な肥厚を認めた (図1: 黒矢印: 静脈径).

② エマルジョン化治療用遺伝子作製

siRNA を上記の基剤と配合したが, siRNA が分解し複合体の十分な安定性を保つことができなかった.

3 考察

HD 患者の内シャント狭窄治療の遺伝子治療として, クリーム基剤でエマルジョン化した治療用遺伝子デリバリー技術の開発を試みた. ラット大腿動脈と静脈を端側吻合することにより, 内シャントモデル動物を作製した.

本内シャントモデル動物では, 内シャント作製後3週間でシャント静脈の内膜, 中膜の著明な肥厚を伴う静脈径の肥厚を認め, HD 患者の内シャントの病態観察に有用であると考えられた. 次に, 内シャント障害に対する治療用遺伝子デリバリー技術として人工合成した siRNA を, 皮膚浸透性が強い複数の基剤と配合し, エマルジョン化治療用遺伝子作製を試みたが,

配合過程で siRNA が分解してしまい複合体の安定性が保てなかった. 現在まで様々な条件下で配合を繰り返して検討している. また, siRNA 分解が siRNA に普遍的に由来する可能性も考えられたため, 今後, siRNA より高い安定性と強い標的遺伝子ノックダウン効果が報告されている BNA を用いて, 保存している基剤と混和し, エマルジョン化治療用遺伝子開発を継続していく予定である.

また近年, 内シャント狭窄に, シャント周囲脂肪組織から放出される TNF- α が強く関与しており, TNF- α ノックアウトマウスで内シャントを作製したところ, 野生型マウスと比較して有意に内シャント狭窄が抑制されたとの報告があった (Annual meeting of American Society of Nephrology, 2013). この結果は, 内シャント狭窄を治療するさい, シャント血管のみが標的なのではなく, シャント周囲の脂肪組織も含めた治療が必要であり, 逆に, 治療用遺伝子が皮膚表面さえ突破すれば, 血管内腔にまで浸透しなくても経皮的な治療用遺伝子デリバリーにより, 内シャント狭窄の治療効果が得られる可能性を示唆している. 今後 TNF- α -BNA も用いて, エマルジョン化治療用遺伝子による, 内シャント狭窄の治療用遺伝子経皮デリバリー技術開発をさらに継続していく予定である.

おわりに

HD 患者の内シャント狭窄の新規遺伝子治療法として, エマルジョン化治療用遺伝子経皮デリバリー技術の開発を試みた. 現在まで有効な結果は得られていないが, 今後も研究を継続し, 時間はかかったとしても科学的に確実に再現性のある結果を発表したいと考えている.

この研究は、平成 24 年度日本透析医会公募研究助 成によって行われた。