

マウスにおける肝細胞増殖因子遺伝子をコードする プラスミド DNA のソノポレーションによる 腹膜線維症の抑制

西村光洋*1 小川昂輝*1 川口真帆*1 麓伸太郎*2 向井英史*1 川上 茂*1

*1 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医薬品情報学分野 *2 同 薬剤学分野

key words : ソノポレーション, 肝細胞増殖因子, 腹膜線維症, 遺伝子導入

要 旨

長期間の腹膜透析に伴う深刻な問題である腹膜線維症の治療には、遺伝子治療薬の開発が期待されている。肝細胞増殖因子 (HGF) は、抗線維化作用を有することが知られている。本研究では、超音波照射とナノバブルを利用したソノポレーションによる腹膜組織に対する HGF 遺伝子導入システムを開発し、マウスにおいて腹膜線維症モデルに対する予防・治療効果の検証を行った。腹膜線維症のモデルは、マウスにクロルヘキシジンジグルコネートを腹腔内注射することで作成した。腹膜線維症の予防および治療効果は、腹膜の厚さ等により評価を行った。ソノポレーションの導入遺伝子発現特性は、多色深部イメージングの手法を駆使して評価を行った。マウス初期線維症モデルでは、ソノポレーションによるモデル遺伝子 ZsGreen1 の発現が中皮下層で観察され、組織深部まで遺伝子導入可能であることが示された。また、ソノポレーションを介した hHGF 遺伝子導入は、腹膜線維症に対する予防効果だけでなく、初期線維症マウスモデルに対する治療効果を有している可能性が示された。

1 背景と目的

慢性腎臓病 (CKD) 患者は世界中で増加している。腹膜透析は、末期 CKD 患者の代替療法である。一方、長期の腹膜透析はしばしば腹膜線維症を引き起こし、それは治療の中断につながる。したがって、腹膜透析患者の生活の質を改善するには、腹膜線維症の予防お

よび治療戦略の開発が不可欠である。非ウイルスベクターであるプラスミド DNA (pDNA) は安全性や調製の容易さの観点では有望であるが、pDNA 自体の遺伝子導入能は非常に低く、一般的には疾病の標的細胞への細胞選択性を有していないため、標的細胞に対する遺伝子導入を可能とするための遺伝子送達システムが必要である。

ソノポレーションは、バブル製剤と pDNA を投与後、生体深部へ到達可能な超音波の照射を行い、バブルが崩壊する際に生じるキャビテーションに基づく一過性の細胞膜穿孔を利用し、部位特異的に遺伝子導入させることができる¹⁾。我々の研究グループでは、ソノポレーションに基づく腹膜組織への部位特異的・高効率な遺伝子導入システムの開発を行っている。一連の研究の中で、腹膜へのソノポレーションでは、健常なマウスの腹腔内組織表面上の中皮細胞に対して選択的に効率的かつ安全に遺伝子導入できる一方、中皮下層へは遺伝子導入できないことを明らかにした^{2,3)}。

中皮細胞の上皮間葉転換 (EMT) は、腹膜線維症の進行における重要なプロセスである⁴⁾。したがって、腹膜へのソノポレーションに基づく中皮細胞の EMT 抑制は、腹膜線維症の効果的治療法になることが期待される。EMT が引き起こされると中皮細胞は中皮下層に侵入し、中皮下層の中皮細胞と線維芽細胞は筋線維芽細胞に変換されるため、コラーゲン線維を産生ようになる。EMT によって誘発される組織学的変化を考慮すると、EMT の前後で腹膜線維症治療の標的細胞が異なる可能性がある。EMT の前、すなわち、

腹膜線維症が進行する前の段階では、中皮表層の中皮細胞が標的であると考えられる。一方、腹膜線維症が進行した後では、中皮下層に存在する中皮細胞と線維芽細胞に遺伝子導入する必要がある。しかし、EMTが進行した際、細胞間結合（接着結合、密着結合）および基底膜が破壊されるため⁵⁾、腹膜線維症の初期段階においては、ソノポレーションにより中皮下層への遺伝子導入を可能にするかもしれないという仮説を立てた。

肝細胞増殖因子（HGF）は、TGF- β シグナル伝達の阻害を介して作用する抗線維化タンパク質であり、EMTを阻害し、腹膜線維化を改善することが期待できるため、腹膜線維症に対する遺伝子治療への応用が期待される。実際、腹膜中皮細胞への HGF 投与は、高血糖によって誘発される線維症を予防し、また、注入された間葉系幹細胞（MSC）によって分泌された HGF は、クロルヘキシジンジグルコネート（CG）によって誘発された腹膜線維症を改善したことが報告されている^{6,7)}。

そこで本研究では、腹膜線維症に対する治療用遺伝子としてヒト HGF（hHGF）をコードしたプラスミド（pCpGfree-hHGF）を構築し、ソノポレーションを介した hHGF 遺伝子導入による腹膜線維症に対する予防効果、初期段階の腹膜線維症に対する治療効果に関する検証を行った。

2 実験方法

2-1 動物および腹膜線維症モデル

雄性 ddY マウス（5 週齢，26~33 g）は、日本エスエルシー株式会社から購入した。動物実験は、長崎大学の動物実験のガイドラインに従って実施した。腹膜線維症モデルマウスは、15% エタノールおよび 150 mM 塩化ナトリウム中の 0.1%（w/v）グルコン酸クロルヘキシジン（CG）を 0.1 mL/g 腹腔内注射し作成した⁸⁾。初期の腹膜線維症モデルを作成するために、CG を 3 日間連続してマウスに腹腔内注射した。

2-2 pDNA

pCMV-Luc は、以前の論文で報告したものをを用いた⁹⁾。CpG を含まない hHGF 発現ベクターである pCpGfree-hHGF は、CpG を除去した hHGF 遺伝子を pCpGfree-mcs ベクターへサブクローニングすること

によりカスタムメイドオーダーした。

2-3 ナノバブル製剤の調製

ナノバブル製剤は以前の研究の報告に従って調製した¹⁰⁾。

2-4 *in vivo* 腹腔内遺伝子導入

3 種混合麻酔薬を筋肉内注射によってマウスに麻酔を施行した。まず、60 μ g の pDNA と 250 μ g のナノバブル製剤の混合物をマウスの腹腔内に注射した。直ちに、超音波処理装置 Sonopore-4000 を使用して、腹部側から直径 20 mm のプローブを用いて、経皮的に超音波照射を行った。陽性対照には、*in vivo* jetPEI を用いた。

2-5 導入遺伝子発現の定量

ルシフェラーゼの発現は、遺伝子導入の 6 時間後に測定した。hHGF の測定のために、腹膜壁および腹膜液をマウスから採取した。腹膜壁は、3 倍量の RIPA バッファーでホモジナイズした。hHGF は、Human HGF Quantikine ELISA Kit を使用して測定した。腹膜壁の総タンパク質（450 mg）と腹膜壁の 50 mL を ELISA に使用した。

2-6 腹膜平衡試験による腹膜機能の評価

腹膜透析液（ダイアニール PD-4 4.25 腹膜透析液（PDF））をマウスに腹腔内注射した。腹膜液（D0）をマウスから直ちに採取した。腹膜液（D2）と血漿（P2）PD の注射の 2 時間後に収集した。サンプルのグルコースおよびクレアチニン濃度は、LabAssayTM グルコースおよび LabAssayTM クレアチニンをそれぞれ使用して測定し、D2/D0 および D2/P2 の比率を計算した。

2-7 マッソンのトリクローム染色

腹膜壁を収集し、4% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液で固定した。その後、O.C.T に包埋し、80°C で凍結した。ミクロトームを使用して 5 μ m の切片を作製し、マッソンのトリクローム染色で染色した。染色されたサンプルは、20 倍の対物レンズを備えた AxioVert A1 顕微鏡を使用して観察を行った。中皮下層の厚さは、ImageJ ソフトウェアを使用して計算した。

2-8 多色深部イメージング解析

以前の我々の論文の方法に従い、組織透明化に基づいて行った^{2,3)}。サンプルは、ScaleSQ (0) を使用して組織透明化を行った¹¹⁾。

2-9 ヒドロキシプロリン (HP) アッセイ

均質化した腹膜壁のサンプル 10 mg に 12 モルの塩酸を加え、120°C で 3 時間加水分解を行った。加水分解したサンプルは、10,000×g で 5 分間遠心分離を行った。上澄み液の HP 濃度は、HP アッセイキットを使用して測定した。

2-10 統計解析

ANOVA を使用して、グループ間の統計的有意差を解析した。テューキー検定は、すべてのグループ間の多重比較に使用した。ダネット検定は、対照群と治療群の間の多重比較に使用した。P<0.05 の差は有意であるとみなした。

3 結果

腹腔内での hHGF 遺伝子発現の持続時間を評価するために、ELISA によって腹腔壁および腹腔液中の hHGF タンパク質レベルを測定した。その結果、遺伝子導入の 1 日後、hHGF タンパク質レベルは 0 日より有意に高かった。3 日後には、hHGF の発現は 0 日と同じレベルに減少した。

腹膜線維症に対するソノポレーションによる hHGF トランスフェクションの予防効果を評価するために、ソノポレーションにより hHGF 遺伝子を遺伝子導入し、その後、14 日間の CG 注射を行った。最後の CG 注射の 1 日後、コラーゲン合成の指標として腹膜壁の HP レベルを測定した。hHGF 遺伝子導入マウスの HP 濃度は、CG 注射マウスのみ濃度よりも低くなる傾向があったが、有意差は検出されなかった。

マッソンのトリクローム染色を行って、腹膜の厚さを評価した。CG 投与のみの群では、対照ベクター (LacZ) + US 群および hHGF-US 群により、中皮下層の厚さが増加した。一方、hHGF+US 群では、14 日目に他の CG 注射群と比較して中皮下層の肥厚が有意に抑制された。

腹膜機能は、腹膜平衡試験を使用して評価した。CG 注射の 14 日後、D2/D0 グルコース比および D2/

P2 クレアチニン比を、グルコース吸収能力およびクレアチニン除去率として測定した。CG 注射マウスの D2/D0 グルコース比は、対照マウスよりも低かった。ソノポレーションによる hHGF 遺伝子導入群では、D2/D0 グルコース比を部分的に改善したが、対照のマウスで観察されたレベルには達しなかった。逆に、hHGF+US 群の D2/P2 クレアチニン比は、CG のみ群または LacZ+US 群よりも低かった。

CG 注射を 3 日間続けた後、中皮細胞と腹膜表面をそれぞれ DiI と DiD で標識し、続いて多色深部イメージング解析を行うことにより、腹膜組織における中皮細胞の空間分布を評価した。健常マウスでは、DiI で標識された中皮細胞は DiD で標識された表層に位置していたが、CG を注射したマウスでは、いくつかの中皮細胞は中皮層の下に位置していた。

腹膜組織のトランスフェクション効率に対する CG 注射時間の影響を評価した。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼをコードした pDNA を用いた。ソノポレーションまたは *in vivo* ジェット PEI を使用し、CG (-) マウス、3 日間 CG 注射マウス、および 7 日間 CG 注射マウスで評価を行った。ソノポレーション群では、CG (-) マウスと 3 日間 CG 注射群との間でどの腹膜組織でも遺伝子導入効率は変化しなかったが、7 日間 CG 注射群では、腹膜壁でのルシフェラーゼ発現効果が有意に低下し、肝臓、胃、脾臓などの多臓器でのルシフェラーゼ発現には影響がなかった。陽性対照として、*in vivo* ジェット PEI を使ってマウスに遺伝子導入した群では、ソノポレーション群よりも低効率であり、また、CG (-) マウス群に比べ、CG 注射群のマウスのルシフェラーゼ発現が低下することが明らかとなった。

初期段階の腹膜線維症マウスにおける ZsGreen1 のソノポレーション後の多色深部イメージング法を使用して、腹膜組織における導入遺伝子発現の分布を評価した。CG 注射の 3 日後にソノポレーションによる遺伝子導入を行い、ZsGreen1 発現分布を評価した。組織損傷部位では、ZsGreen1 発現は腹膜組織表面ではなく、内部組織で観察された。一方、CG 注射の 7 日後にソノポレーションによる遺伝子導入を行った場合、ZsGreen1 発現はほとんど観察されなかった。

腹膜線維症の進行に対する早期治療の効果を評価するために、3 日連続の CG 注射後に hHGF を遺伝子導

入し、マッソンのトリクローム染色と腹膜平衡試験を14日連続CG注射の翌日に実施した。腹膜の厚さの増加は、hHGF 遺伝子導入によって有意に抑制された。さらに、両方の D2/D0 グルコース比と D2/P2 クレアチニン比は hHGF 遺伝子導入によって大幅に改善した。

4 考察

マウスにおいてはカチオン性リポソームやカチオン性ゼラチンなど、腹腔内組織の中皮細胞への pDNA または siRNA 送達用のキャリアが開発されている。これらキャリアでは、CG 誘発性腹膜線維症に対する予防効果が報告されている^{12,13)}。ただし、腹膜線維症の組織学的特徴は、健常状態の腹膜組織とは異なると考えられる。したがって、腹膜の線維化の進行状態に応じて、最適な遺伝子導入システムと治療用遺伝子を選択する必要がある。この研究では、CG 誘発性腹膜線維症に対する予防効果を示した。そのうえ、本研究で明らかになったソノポレーションを介した腹腔内遺伝子発現特性の解析結果に基づいた治療的アプローチを試みた。治療遺伝子として、TGF- β シグナル伝達を弱めることにより腹膜線維症を含む組織線維症を抑制することが知られている hHGF を選択した¹⁴⁻¹⁶⁾。

予防効果を検証するため、CG 投与前にソノポレーションを行い、腹膜壁および腹腔液における hHGF 発現を評価した。遺伝子導入1日後、腹膜壁および腹腔液中の hHGF レベルは0日目よりも高かった。3日後、hHGF の発現は0日目に匹敵するレベルまで減少し、長期間に渡る遺伝子発現持続効果はみられなかった。これまで、pCpGfree ベクターの利用では、pDNA の免疫応答を回避することによって長期間発現が持続することが報告されており¹⁷⁾、実際、我々の健常マウスへの腹腔内投与においても28日間にわたって遺伝子発現期間を維持できることを報告している²⁾。これらの過去の知見は、今回の腹膜線維症マウスにおける本結果とは導入した遺伝子が異なるものの一致しない。しかし、一連の pCpGfree ベクターに関する報告では、健常なマウスで導入遺伝子発現が評価されていた。本研究では、ソノポレーションを介した hHGF 遺伝子導入後に TGF- β 1 の産生を促進し、免疫反応を活性化させる CG を注入した。したがって、今回 hHGF の発現が持続しなかったのは、CG 注射による免疫活性化

の影響があると考えている。炎症モデル動物における pCpGfree ベクターでの遺伝子発現持続化効果には今後のさらなる検証が必要である。

ソノポレーションを介した hHGF トランスフェクションの予防効果については、hHGF 遺伝子導入の14日後、腹膜の HP レベル、中皮下層の厚さ、および腹膜平衡試験によって測定された腹膜機能を治療基準として評価した。HP レベルは、ソノポレーションを介した hHGF 遺伝子導入によって抑制される傾向があった。さらに、マッソンの腹膜のトリクローム染色では、腹膜の厚さが抑制されていた。腹膜平衡試験については、D2/D0 グルコース比と D2/P2 クレアチニン比は、それぞれ水の除去効果と小さな溶質の輸送を示している¹⁸⁾。両方の指標は、CG を注射した対照群と比較して hHGF+US 群によって改善した。したがって、ソノポレーションを介した hHGF 遺伝子導入は、CG 誘発性腹膜線維症を予防する効果を有している可能性が示された。

3日連続CG注射により、細胞間結合相互作用の喪失と中皮細胞浸潤が誘発される²⁰⁾。初期の腹膜線維症の病理を確認するために、中皮下層への中皮細胞の浸潤を観察することを試みた。本研究においては、我々の過去の報告に従い²⁾、CG 注射後、組織切除前に腹腔内に DiD を注射して腹膜表面の染色を行った。CG 注射マウスでは、DiI 標識中皮細胞が DiD 標識腹膜表面の下に位置しており、3日連続CG注射後に中皮細胞が中皮下層に侵入し始めたことが示唆された。以上、多色深部イメージング解析によりマウスの腹膜線維症モデルの初期段階を描写できることが示唆された。

腹膜線維症の初期段階では、中皮細胞の接合部が緩んでいる。CG 注射後の腹膜組織の遺伝子導入効率を評価した。膜壁における導入遺伝子発現レベルは、7日間連続のCG投与は発現が低下したが、3日間連続CG投与では変化しなかった。中皮細胞が中皮下層に脱落し、線維芽細胞が EMT を介してコラーゲンを産生すると予想されるため、7日間連続CG投与を受けた場合は産生された多くのコラーゲンに阻まれて遺伝子導入が困難になったと考えられる。一方、陽性対照の *in vivo* ジェット PEI の遺伝子導入効率は、3および7日間連続CG投与した場合は、ソノポレーションに比べて劇的に低下した。これは、ソノポレーションではジェット流を介して遺伝子導入できるため¹⁰⁾、3

日間連続 CG 投与の場合においてはコラーゲン量がまだ少なく、組織深部まで到達できたため、腹膜組織の中皮下層での外来遺伝子発現がみられたものと推察する。本結果は、ソノポレーションにより脳における遺伝子発現の脳内分布が広がったという結果とよく一致する²¹⁾。以上、初期の腹膜線維症モデルにおいてソノポレーションでは、腹膜組織の深部までの外来導入遺伝子導入が可能であることが示唆された。

これまで、hHGF 遺伝子導入による腹膜線維症の予防に関する報告があるものの⁶⁾、腹膜線維症の初期段階における腹膜線維症の進行に対する治療的アプローチに関する報告はない。本研究では、初期の腹膜線維症の外来遺伝子発現特性を考慮して、3日間連続のCG注射後におけるhHGF遺伝子導入における腹膜線維化の抑制効果を評価した。マッソンのトリクローム染色と腹膜平衡試験を実施して、腹膜の厚さと腹膜機能を評価した。その結果、CGによって誘発される中皮下層の肥厚はhHGF遺伝子導入によって有意に抑制された。さらに、D2/D0グルコース比とD2/P2クレアチニン比の両方が、CG注射群と比較して、有意に改善された。これらの結果は、ソノポレーションによるhHGF遺伝子導入が、腹膜線維症の予防的適用に加えて、初期段階の腹膜線維症に対する治療的治療にも適用できることを示唆している。以上、ソノポレーションを利用したhHGF遺伝子導入では、初期段階における腹膜線維症において治療効果を得ることができる可能性が示された。

5 結 論

本研究では、多色深部イメージング評価系を用いてソノポレーションでは、初期の腹膜線維化マウスの腹膜組織下層の中皮細胞に対して外来遺伝子を導入できることを明らかにした。また、ソノポレーションを介したhHGF遺伝子導入では、腹膜線維症に対する予防効果と初期線維化の治療効果を有している可能性が示された。

動物実験、組換え DNA 実験

本申請の動物実験に関しては、長崎大学動物実験委員会の承認を得ている（承認課題番号：180823-1）。また、本研究の組換え DNA 実験は、長崎大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けている（承認課題

番号：180301-2）。

本研究は平成 30 年度日本透析医学会公募研究助成によってなされた。なお、本研究成果の掲載論文は以下である。

Nishimura K, Ogawa K, Kawaguchi M, et al. : Suppression of peritoneal fibrosis by sonoporation of hepatocyte growth factor gene-encoding plasmid DNA in mice, *Pharmaceutics* 2021; 13, 115.

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- 1) Fumoto S, Kawakami S : Combination of nanoparticles with physical stimuli toward cancer therapy. *Biol Pharm Bull* 2014; 37 : 212-216.
- 2) Nishimura K, Fumoto S, Fuchigami Y, et al. : Effective intraperitoneal gene transfection system using nanobubbles and ultrasound irradiation. *Drug Deliv* 2017; 24 : 737-744.
- 3) Nishimura K, Yonezawa K, Fumoto S, et al. : Application of direct sonoporation from a defined surface area of the peritoneum: evaluation of transfection characteristics in mice. *Pharmaceutics* 2019; 11 : 244.
- 4) Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, et al. : Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348 : 403-413.
- 5) Onishi A : The mechanism of peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis. *J Nephrol Ther* 2012; 1 : 4.
- 6) Matsuo K, Maeda Y, Naiki Y, et al. : Possible effects of hepatocyte growth factor for the prevention of peritoneal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol* 2005; 99 : e87-94.
- 7) Ueno T, Nakashima A, Doi S, et al. : Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and inhibiting TGF- β 1 signaling. *Kidney Int* 2013; 84 : 297-307.
- 8) Lee RP, Lee CJ, Subeq YM, et al. : A model of chlorhexidine digluconate-induced peritoneal fibrosis in rats. *Tzu Chi Med J* 2012; 24 : 108-115.
- 9) Nomura T, Yasuda K, Yamada T, et al. : Gene expression and antitumor effects following direct interferon (IFN)- γ gene transfer with naked plasmid DNA and DC-chol liposome complexes in mice. *Gene Ther* 1999; 6 : 121-129.
- 10) Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, et al. : Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound. *J Control Release* 2007; 117 : 130-136.
- 11) Hama H, Hioki H, Namiki K, et al. : ScaleS : An optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci* 2015; 18 : 1518-1529.

- 12) Obata Y, Nishino T, Kushibiki T, et al. : HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres suppresses peritoneal fibrosis in mice. *Acta Biomater* 2012; 8 : 2688-2696.
- 13) Yoshizawa H, Morishita Y, Watanabe M, et al. : TGF- β 1-siRNA delivery with nanoparticles inhibits peritoneal fibrosis. *Gene Ther* 2015; 22 : 333-340.
- 14) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, et al. : Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor- β 1, through attenuation of connective tissue growth factor induction, and prevents renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice. *FASEB J* 2003; 17 : 268-270.
- 15) Panganiban RA, Day RM : Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32 : 12-20.
- 16) Matsuoka T, Maeda Y, Matsuo K, et al. : Hepatocyte growth factor prevents peritoneal fibrosis in an animal model of encapsulating peritoneal sclerosis. *J Nephrol* 2008; 21 : 64-73.
- 17) Lesina E, Dames P, Rudolph C : The effect of CpG motifs on gene expression and clearance kinetics of aerosol administered polyethylenimine (PEI)-plasmid DNA complexes in the lung. *J Control Release* 2010; 143 : 243-250.
- 18) Combet S, Van Landschoot M, Moulin P, et al. : Regulation of aquaporin-1 and nitric oxide synthase isoforms in a rat model of acute peritonitis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 : 2185-2196.
- 19) Ueno T, Nakashima A, Doi S, et al. : Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and inhibiting TGF- β 1 signaling. *Kidney Int* 2013; 84 : 297-307.
- 20) Lua I, Li Y, Pappoe LS, et al. : Myofibroblastic conversion and regeneration of mesothelial cells in peritoneal and liver fibrosis. *Am J Pathol* 2015; 185 : 3258-3273.
- 21) Ogawa K, Fuchigami Y, Hagimori M, et al. : Ultrasound-responsive nanobubble-mediated gene transfection in the cerebroventricular region by intracerebroventricular administration in mice. *Eur J Pharm Biopharm* 2019; 137 : 1-8.