

慢性腎臓病に対する新たな治療戦略

遠藤守人¹・松本紘一²
福田昇³・丸山高史⁴
北井真貴⁴・上野高浩⁴
松本太郎⁵

要 旨

慢性腎臓病（CKD）とは、慢性に経過する腎疾患を全て包括する概念として提唱されたものである。透析療法や腎移植を必要とする末期腎不全症例が増加の一途をたどる現状において、CKDの進行を阻止することは極めて重要な医療課題となっている。我々は、腎障害に対する新規遺伝子治療薬 pyrrole-imidazole polyamide を用いた遺伝子治療の試み、あるいは成熟脱分化脂肪細胞やレニン・アンジオテンシン系阻害薬による再生療法の可能性等の基礎的な研究に取り組んできた。今後、これらの研究が臨床応用へと展開して、新たなCKDの治療戦略へと進展することが期待される。

キーワード：慢性腎臓病，遺伝子治療，pyrrole-imidazole polyamide，再生医療，脱分化成熟脂肪細胞

目 次

1. はじめに
2. 慢性腎臓病における遺伝子治療の開発
3. 慢性腎臓病における再生療法の開発
4. 保存的再生医療の開発
5. おわりに

1. はじめに

2002年に米国腎臓財団から慢性腎臓病（CKD）の概念が提唱されてから10年が経過した。CKDは慢性に経過する腎疾患を全て包括した概念であり¹⁾、今後に向けて解決すべき

多くの問題点が残されている。CKDは我が国における国民病の一つに数えられ、その予防および治療は末期腎不全や心血管疾患の発症阻止に直結する重要課題として取り上げられており、CKD治療におけるレニン・アンジオテンシン系（RAS）阻害薬、すなわちアンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACE-I）やアンジオテンシンII（AngII）受容体拮抗薬（ARB）の有効性が大規模臨床介入試験により明らかにされてきた²⁾。しかしながら、現在のところCKDの進行を阻止する根治的療法は確立されていないという実情がある。CKDの進展阻止を目指す根

¹ 八戸大学人間健康学部

² 日本大学総合科学研究所

³ 日本大学大学院総合科学研究科生命科学

⁴ 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

⁵ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学系分野

本的な治療戦略の開発は、患者の QOL (Quality of Life) と逼迫する医療経済の改善に繋がるのが期待される。ここでは新たな CKD 治療戦略の開発を目指した我々の研究成果を中心にその概略について述べる。

再生医療の細胞源としては胚性幹細胞や体性幹細胞を利用する方法が一般的であるが、倫理上の問題や細胞採取に伴う侵襲性が大きいことなど実際の治療に向けては高いハードルが存在する。我々はこれらの難題を解決すべく、ドナー細胞として大量に調達可能な脱分化成熟脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells; DFAT) に注目し、腎臓再生や組織修復におけるその有用性を実験動物で解析している³⁾。DFAT は採取に伴う侵襲性が低く、新生児から高齢者までその調整が可能であり、均一性が極めて高い細胞である。既にバンキングシステムが構築されており、将来の新規再生医療のドナー細胞として多いに期待出来る。さらに我々は、酸化ストレスのモデルである脳卒中易発症高血圧ラット (SHR-SP) の血管内皮前駆細胞 (EPS) の機能低下と ARB 投与後の EPS の機能改善による腎障害の進展抑制に関しても検討を行っており、この研

究成果についても論述する。

これらの基礎研究の進展が、将来の保存的再生医療の礎に繋がるものであることは間違いなく、今後は基礎的研究段階から実用的な臨床応用段階への展開が期待される。これまでの研究成果がさらに醸成され、CKD の新たな治療手段の開発に発展していくことが俟たれる。

2. 慢性腎臓病における遺伝子治療の開発

CKD の基礎疾患である IgA 腎症や糖尿病性腎症をはじめとした各種腎疾患においては、糸球体障害のみならず尿細管間質障害の程度が腎機能低下に大きく関与している。腎疾患での糸球体メサンギウム基質の増加や間質の線維化促進への関与が示唆される transforming growth factor- β (TGF- β) の産生を抑制する手法として、数種類の核酸医薬が研究段階で使用されてきた。新規遺伝子治療薬 pyrrole-imidazole polyamide (PI ポリアミド) は抗生剤から作成された化学合成物質であり、任意の二本鎖 DNA に塩基特異的に結合し、遺伝子発現を特異的に抑制することが出来る⁴⁾ (図 1)。PI ポリアミドは

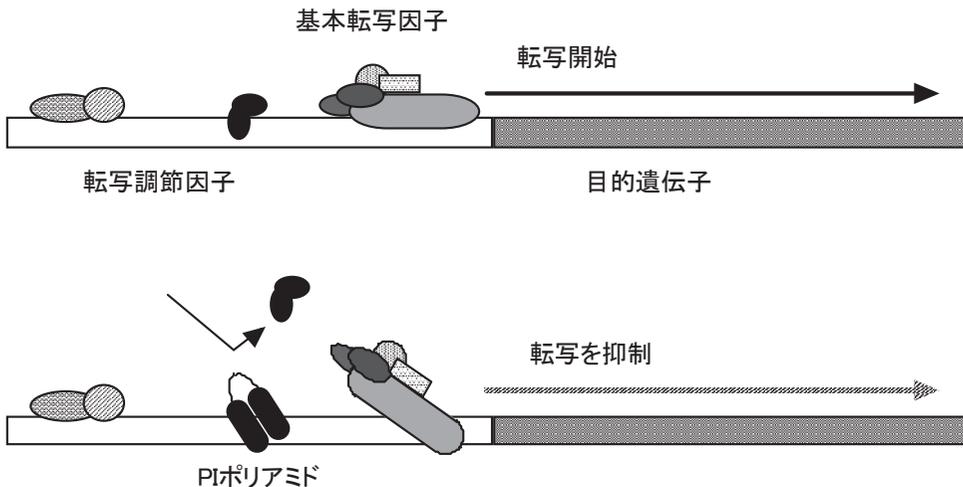


図 1. Pyrrole-imidazole (PI) ポリアミドの作用。合成された PI ポリアミドは目的遺伝子の転写調節領域に結合することで、転写に関わる因子の結合を阻害して遺伝子の発現を制御する。

これまでの核酸医薬の易分解性、ベクターの必要性などの欠点を克服した経口可能な遺伝子治療薬である。CKDの遺伝子治療の開拓を目指して、研究段階ではあるがTGF- β 1に対するPIポリアミドの創薬開発が進行中である。

特に現在の医療では根治が困難とされるCKDに対して、遺伝子治療が新しい戦略として臨床応用に結びつく可能性が予想される。PIポリアミドは抗生物質から合成された有機化合物であるため、生体内で安定性があり、ベクター無しで細胞・組織にとり込まれ易いなどの長所があり、種々の分子に対しても自由に設計することが可能であるという特性を有する。さらに、PIポリアミドは疾病で増加した遺伝子活性のみを抑制するため、生理的に発現している遺伝子は抑制しないことが実験的に確認されている⁴⁾。これらの研究は進行性腎障害に対する経口可能な遺伝子治療薬の開発に繋がること期待される。

我々はTGF- β 1遺伝子発現を抑制する新規遺伝子制御薬PIポリアミドの効果を、高血圧性腎障害モデルであるDahl食塩感受性ラットで検討した⁵⁾。蛍光抗体をラベルしたPIポリアミドをラットの尾静脈から投与したところ、腎臓では尿細管上皮細胞の核に集積するのみならず糸球体内にも多くの取り込みが認められ、TGF- β 1を標的としたPIポリアミドの投与により、進行性腎障害モデルにおける糸球体硬化の進展は有意に抑制されることが確認された⁶⁾。PIポリアミドは腎メサンギウム細胞の核に存在する二本鎖DNAに結合する事により、TGF- β 1の転写活性を抑制する。PIポリアミドを2週間投与したところ、血圧や体重には影響を与えず、微量アルブミン尿・尿蛋白の排泄を有意に抑制することが示された。この事実は、動物実験のレベルではあるが、遺伝子治療薬としての有効性と安全性を示唆しているものと考えられる。実際のCKD治療では、より長期作用可能な医薬品としての遺伝子治療薬が必要であり、当然のことながら有効性と安全性確立の

両面からの更なる研究結果の蓄積が必須である。

ある種の自己免疫性糸球体腎炎はFC受容体(R) γ 鎖ノックアウトマウスでは惹起されないことから、その発症にはFC R γ 鎖の役割が重要であるとされている⁷⁾。治療戦略としてFC R γ 鎖をターゲットにする遺伝子治療の開発が提起されており、慢性に進行する難治性の免疫学的機序による腎疾患において腎障害を制御できる治療方法の一環になる可能性が考えられる。そこで、現在、我々はFC R γ 鎖に対応するPIポリアミドの分子設計と創薬開発を推進させている。

将来のPIポリアミドの臨床応用には解決すべき多くの難題が残されているが、その有用性にはかなりの期待がもたれている。前述のように今後の研究の蓄積が必要となるが、特に、特異性、基礎物性、薬物動態、細胞透過性、臓器への取り込み、致死量、最適投与量、投与間隔、投与方法などについての詳細な検討が急務であり、これらの解析研究が加速されることによりCKDの根治的療法開発の突破口になり得るものと考えられる。

3. 慢性腎臓病における再生療法の開発

近年、再生医学研究の急速な進歩に伴い、腎臓病学の領域においてもこの恩恵に浴することへの期待が高まっている。腎臓の組織は様々な損傷を受けても回復する能力を備えていることはよく知られている。例えば急性尿細管壊死等の急性腎不全回復期には、修復の機転が作動することによって尿細管上皮が再生して腎障害の進行を抑制する。すなわち障害を可逆性の変化に止める一連の反応が存在していることが推測される。腎臓の再生に関して、骨髄細胞、胚性幹細胞(ES細胞)や組織幹細胞であるside population(SP)細胞、label-retaining cell(LRC)⁸⁾などが細胞源として使用され、研究が進められている。実際の臨床応用への道程はまだ

まだ長いものと考えられるが、ここ数年来、腎臓の再生医療を目指す研究は着実に成果を上げてきている。

CKDの経過においては障害進展因子と修復因子のバランスが重要であり、その進行に大きく影響している。再生医学の視点からの腎障害進行を抑制する研究が注目されており⁸⁾、骨髄細胞（造血幹細胞、間葉系幹細胞）を用いた細胞治療が検討されて再生医療進展の大きな推進力になった⁹⁾。骨髄造血幹細胞や間葉系幹細胞の可塑性が解明され、腎臓構成細胞の中にもこれらの細胞から分化可能な細胞が存在すると考えられている。IgA腎症の経過中に急性白血病を併発した症例で、IgA腎症患者ではないドナーからの同種骨髄移植を施行したところ、尿所見が改善するとともに移植前の腎組織にみられた糸球体のIgAと補体C3の沈着が消失したことが報告された^{10,11)}。このことから、骨髄細胞が腎障害の修復機序に関与し得ることが推測され、骨髄が生体の恒常性維持に働く多能性幹細胞の源泉としての役割を有することが示唆されている。

我々も糸球体修復機序における骨髄細胞の関与について詳細に検討を行っている¹²⁾。B6マウスを全身照射してからgreen fluorescence protein (GFP) マウスの骨髄を移植、その後ハブ毒投与により糸球体メサンギウム基質の融解を主病変とする腎炎モデルを作成した。その腎組織の修復を組織学的に評価し、再生組織におけるGFP陽性細胞の存在について検討を行った。その結果から、この腎炎モデルの糸球体修復にGFP陽性細胞すなわち骨髄細胞が関与している可能性が示された。さらに腎不全モデルであるtenascin-Cノックアウト(KO)マウスに自家骨髄細胞を投与した結果、骨髄細胞の腎臓へ動員が認められ、障害部位を修復することが証明された。骨髄細胞が糸球体内皮細胞とメサンギウム細胞のturn overに関与しており、微小血管の修復を助長することが報告されている⁹⁾。このことに関しては、骨髄細胞が腎

臓構成細胞へ直接分化する可能性よりも、骨髄細胞から分泌されるサイトカイン、成長因子等の液性因子がパラクライン、エンドクラインに作用し、抗アポトーシス作用、血管新生作用、細胞増殖作用を介して腎障害の改善に関与する可能性が高いものと考えられている。骨髄細胞の腎組織再生や修復メカニズムに果たす役割の詳細については今後の研究の進展により明確にされていくものと思われる。

また、我々のグループでは再生医療用細胞として成熟脱分化脂肪細胞(DFAT)に着目している。DFATは、少量の成熟脂肪細胞からコラゲナーゼ処理後の天井培養によって、単一な細胞群として採取することが出来る³⁾。この細胞は多分化能を有するのみならず、長期間継代培養しても形質転換することなく、均一な増殖能および分化能を保持している(図2)。したがって、従来型の幹細胞による再生医療から脱却した簡便で安全性の高い再生医療の実現に寄与出来るものと考えられる。さらに、この細胞は大量培養ができるため凍結によるバンキングが可能で、将来的には急性腎障害や進行性腎障害の病態に即応して移植し得る可能性も期待されている。

腎臓病領域におけるDFATの有用性と、この細胞の尿細管上皮細胞への分化転換に関する一連の研究を継続して我々は行ってきた。DFAT移植後14日後には糸球体と尿細管細胞にとり込まれることが確認されたため、糸球体硬化による腎不全モデルであるハブ毒投与tenascin-C KOマウスを使用してその投与効果を解析した¹²⁾。ハブ毒により糸球体メサンギウム基質の融解と内皮細胞障害が誘発され、tenascin-C KOマウスでは修復機転が作動せずに不可逆的な糸球体硬化を生じる。野生型すなわちtenascin-Cを発現するマウスのDFATを投与することで糸球体硬化は有意に抑制され、血清尿素窒素(BUN)増加の改善が認められた。この際、腎組織でのtenascin-C mRNA発現の増加とともに腎皮質TGF- β 1mRNAの発現低下が見ら

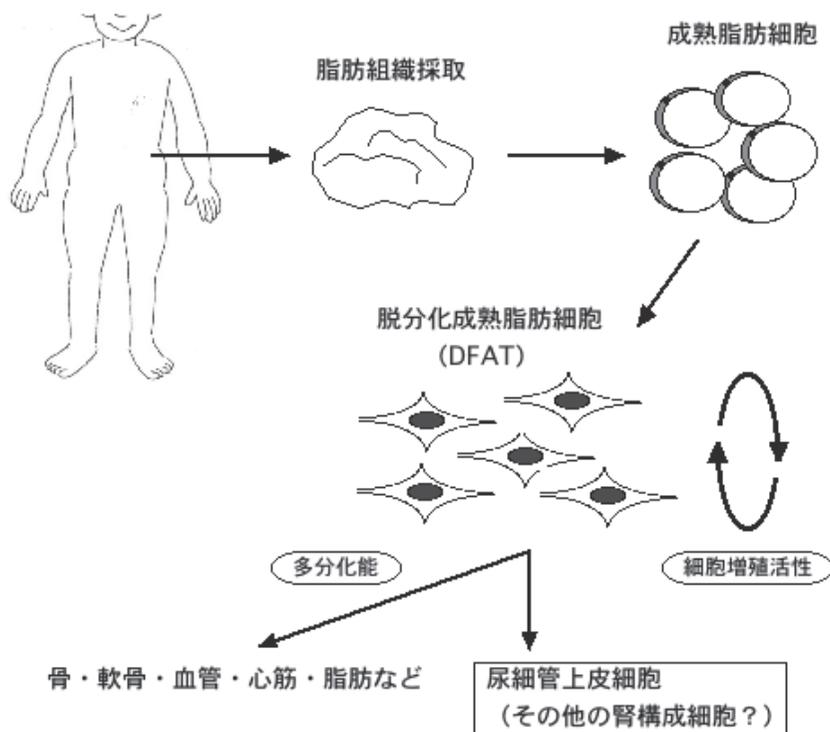


図2. 脱分化成熟脂肪細胞 (DFAT)。皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を脱分化させることにより得られる DFAT は、高い細胞増殖活性および多分化能を有する。

れ、間葉の上皮化現象 (mesenchymal to epithelial transformation; MET) が誘導されたことが示唆された。tenascin-C は発生中の胚芽器官で上皮の周囲にある間葉組織中に存在する蛋白質で上皮の誘導に関与するとされており、腎炎モデルの糸球体傷害の修復過程に DFAT が関与したものと推察される。

DFAT は尿細管上皮細胞に分化することが果たして可能なのであろうか？ この疑問に答えるべく、次のような検討を行った。マウス DFAT に後腎間葉の上皮化に重要な役割を果たす Wnt4 遺伝子を導入後、尿細管で産生される TGF- β の拮抗因子、bone morphogenic protein 7 を作用させて 15 日間 3 次元培養を行った。その結果、上皮細胞マーカーである E-cadherin と尿細管細胞のマーカーである aquaporin 2 mRNA の発現が確認された¹³⁾。さらに、DFAT

と尿細管上皮細胞株である MDCK 細胞を hepatocyte growth factor (HGF) の存在下で 3 次元培養すると MDCK 細胞の管腔形成が確認され、*in vitro* における尿細管上皮細胞への分化が示唆された¹³⁾。

4. 保存的再生医療の開発

我々は、臓器不全の要因あるいは疾病の成り立ちとして、幹細胞の機能低下およびその寿命の短縮が大きく関与しているとの仮説を立てている。幹細胞の寿命は酸化ストレスおよび酸化シグナルによって規定されてことが知られている¹⁴⁾。そこで抗酸化作用を有し幹細胞の寿命を延長する薬剤の腎組織幹細胞への作用を検討している。その詳細が判明することで薬剤による腎臓再生を体系づけることが可能になるものと

考え、保存的再生医療としての確立を目指している。末梢血には0.01%の幹細胞や血管内皮前駆細胞（EPC）が存在するとされ、組織障害部位から誘導因子が産生されると障害部位に集積して細胞融合によって組織に入り込むことで組織の修復を行う。幹細胞の維持と分化に必要な微小環境であるニッチに付着している細胞は、酸化ストレスに弱く、幹細胞の細胞周期が短縮していることが報告されている¹⁵⁾。幹細胞機能を高める抗酸化剤として、レニン・アンジオテンシン系（RAS）阻害薬やスタチン製剤の有効性が示唆されており、今後はこれらの薬剤も含めて腎臓の幹細胞機能を高める方法についての研究が益々重要になるものと予測される。

酸化ストレスのモデルとなる脳卒中易発症高血圧ラット（SHR-SP）では、EPCコロニー形成の低下がみられ、高食塩負荷によってその低下は更に加速されることが我々の研究で示されている。さらに、このモデルにアンジオテンシ

ンII（AII）受容体拮抗薬（ARB）を投与すると、EPCコロニー形成の増加と腎血管壁の活性酸素産生系であるNADPH oxidase活性の低下が見られる¹⁶⁾ことから、ARBには腎皮質血管壁酸化ストレスとEPCの機能を改善する作用があるものと考えられる。

最近、腎臓組織内にも組織幹細胞に近いSP細胞やLRCが存在し、腎障害の修復に関与していることが報告されている⁸⁾。LRCは主に近位尿細管に存在する細胞分裂が非常に遅い細胞であり、尿細管再生において中心的な役割を果たしている⁸⁾。我々はARBには腎髄質の幹細胞マーカーであるc-kitやPax-2 mRNAの発現を増加させると同時にLRCを増加させる作用があることを呈示した¹⁷⁾。このことから、ARBはAIIを抑制してEPCを活性化させ、腎組織幹細胞・LRCを増加させることによって腎障害を修復させる効力を発揮するものと推察している（図3）。

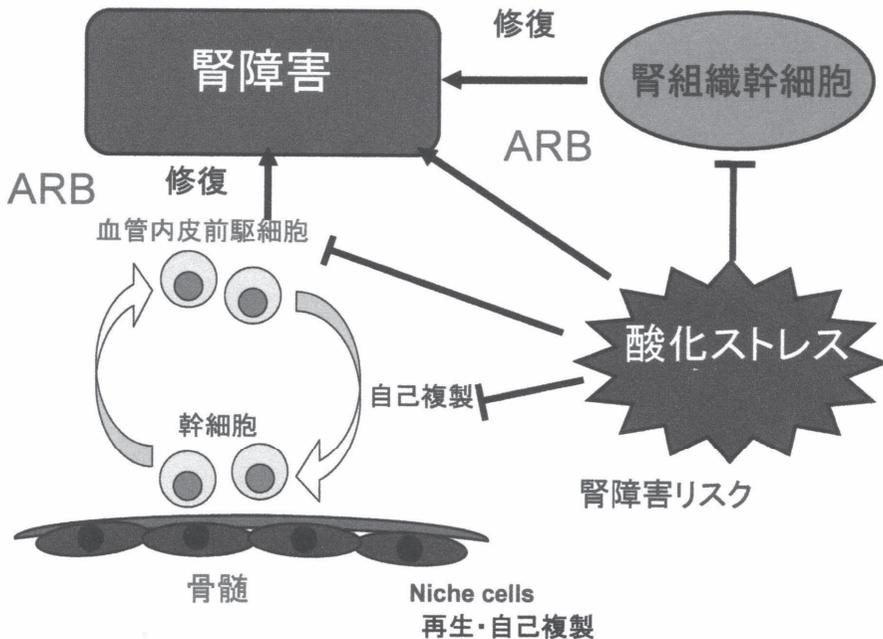


図3. 慢性腎臓病進展とレニン・アンジオテンシン系（RAS）阻害薬作用の作業仮説。酸化ストレスは腎障害を進展させ、RAS阻害薬（ARB）は血管内皮前駆細胞や組織幹細胞による腎障害の修復を助長する。

RAS 阻害薬は再生過程を促進する作用を有することが分かっているが、その作用機序として腎臓 LRC に対する保護作用が挙げられる。RAS 活性化による局所の酸化ストレスの増加に対して、ARB が RAS のブロックおよび直接的な抗酸化作用により、LRC のアポトーシスを抑制することが一つの要因として考えられる。したがって、RAS 抑制薬は腎臓幹細胞に保護的に作用することで腎再生のシステムに応用し得る薬剤としての側面を持つことが推測される。腎組織幹細胞と RAS が局所でお互いにパラクライン的にクロストークを行っていることが示唆され、RAS 抑制薬は腎障害進行を抑制すると同時に、腎組織再生を促進するという腎臓再生促進薬としての新たな役割も期待される。今後の保存的腎臓再生医療開発に追い風となる更なる知見の集積が俟たれる。

細胞移植による再生医療に加えて、より実用的と思われる腎臓幹細胞の寿命を延長し CKD の病態を改善する保存的再生医療の開発が進行中であり、腎の再生医学研究の潮流は益々その速度を増してきている。実際に基礎的研究段階から臨床応用研究段階へと進んで来た。免疫学、分子生物学や細胞生物学等の学際的研究の成果を礎として、効果的かつ安全が確保された腎臓再生医療の開発に寄与する一連の研究の更なる飛躍が期待される。

5. おわりに

CKD の根本的な治療法の開発は基礎的研究段階から臨床応用を視野に入れた研究段階へと進行しつつある。本稿では最近の遺伝子治療と再生医療の進歩に脚光を当てて我々の研究の足跡を中心に概説した。これらの分野における先端研究が醸成され、新たな CKD の治療戦略が普及することを期待したい。

謝 辞

本論文の研究は独立行政法人日本学術振興会平成 24 年度科学研究費助成事業 基盤研究(C) 24591216 (代表 松本紘一) の助成を受けたことを付記し、深謝する。

文 献

- 1) Go A.S., Chertow G.M., Fan D. et al. : Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Eng J Med* 351 (13) : 1264-1305, 2004.
- 2) Bakris G.L., Toto R., McCullough P.A., et al. : Effects of different ACE inhibitor combination on albuminuria : results of the GUARD study. *Kidney Int* 73 : 1303-1309, 2008.
- 3) Matsumoto T., Kano K., Kondo D., et al. : Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 215 : 210-222, 2008.
- 4) Ueno T., Fukuda N., Tsunemi A., et al. : A novel gene silencer, Pyrrole-imidazole polyamide targeting human LOX-1 gene improves endothelial cell function. *J Hypertens* 27 (3) : 468-475, 2009.
- 5) Matsuda H., Fukuda N., Ueno T., et al. : Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting the TGF- β 1 promoter for the treatment of progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17 : 422-432, 2006.
- 6) Matsuda H., Fukuda N., Ueno T., et al. : Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting of the transforming growth factor- β 1 promoter. *Kidney Int* 79 : 46-56, 2011.
- 7) Suzuki Y., Shirato I., Olumura K., et al. : Distinct contribution of FC receptors and angiotensin II dependent pathways in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int* 54 (4) : 1166-1174, 1998.

- 8) Maeshima A., Yamashita S., Nojima Y. : Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regulation processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 14 : 3138-3146, 2003.
- 9) Rookmaaker M.B., Smits A.M., Tolboom H., et al. : Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 163 (2) : 553-562, 2003.
- 10) Iwata Y., Wada T., Uchiyama A., et al. : Remission of IgA nephropathy after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation followed by immunosuppression for acute lymphocytic leukemia. *Intern Med* 2006 ; 45 : 1291-1295.
- 11) Park E.K., Jeon J.S., Noh H.J., et al. : Complete remission of IgA nephropathy after bone marrow transplantation for acute myeloid leukaemia. *Nephrol Dial Transplant Plus* 2008 ; 6 : 420-422.
- 12) Inoshita A., Okada K., Fukuda N., et al. : Bone marrow cells may repair mesangiolytic in Habu snake venom-inducing glomerulonephritis in mice. *Nihon Univ J Med* 51 (5), 107-118, 2009.
- 13) Nur R., Fukuda N., Matsumoto T., et al. : Implantation of dedifferentiated fat cells ameliorate habu snake venom-induced chronic dysfunction in tenascin-c-deficient mice. *Nephron Exp Nephrol* 110 : e91-e98, 2008.
- 14) 山元智衣, 松本太郎, 加野浩一郎, 他. 脂肪細胞から尿細管上皮細胞への transdifferentiation. *腎臓* 28 : 185-189, 2006.
- 15) Chan E.C., Jiang F., Peshavariya H.M., et al. : Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling : potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol Ther* 122 : 97-108, 2009.
- 16) Hosokawa K., Arai F., Yoshihara H., et al. : Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 ; 23 : 578-583, 2007.
- 17) Yao E-H., Fukuda N., Matsumoto T., et al. : Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. *Hypertens Res* 30 : 1119-1128, 2007.
- 18) Yoshida Y., Fukuda N., Maeshima A., et al. : Treatment with valsartan stimulates endothelial progenitor cells and renal labeled-retaining cells in hypertensive rats. *J Hypertens* 29(1) : 91-101, 2011.

Novel Therapeutic Strategies to Prevent the Development of Chronic Kidney Disease

Morito ENDO, Koichi MATSUMOTO, Noboru FUKUDA, Takashi MARUYAMA, Maki KITAI, Takahiro UENO and Taro MATSUMOTO

Abstract

We provide a research update about novel therapeutic strategies to prevent the development of chronic kidney disease (CKD) and summarizes the latest proceedings in this field. It carries severe consequences and has limited treatment options. The purpose of this review is twofold. The first purpose is to provide a concise overview of the strategies of gene therapy, including pyrrole-imidazole polyamides (PI polyamides). PI polyamides are nuclear-resistant novel compounds that inhibit gene expression by binding to the minor groove of DNA. A PI polyamide that targets rat transforming growth factor- β 1 was designed as a gene-silencing agent for progressive kidney disease. In the future, control of gene expression by PI polyamides may ameliorate progressive kidney diseases that are not treatable with current medicines. Future therapeutic strategies aimed at alteration of the immune responses through manipulation of Fc γ receptor interactions by the use of PI polyamides could be explored in the model of lupus nephritis. Thus Fc γ receptor gene therapy provides an attractive strategies to develop an immunotherapy as a generic treatment option. The second purpose is to summarize published data regarding the role of bone marrow stem cells in renal repair after acute and chronic kidney injury. Currently, much of our knowledge of renal protective effect of dedifferentiated fat (DFAT) cells is obtained through animal research. The results of the study indicate that DFAT cells may provide a source for cell therapy for severe progressive kidney disease. Our goal is to understand the mechanism of renal protection by DFAT cells and to develop strategies utilizing the DFAT cells for the eventual treatment of humans with CKD. The importance of conservative regenerative medicine has recently been demonstrated. It has been shown that angiotensin II receptor blocker (ARB) improves the proliferation and function of endothelial progenitor cells in hypertension, suggesting that ARB is useful to repair hypertensive renal injuries. In this review, we will focus on the role of gene therapy and regenerative medicine as therapeutic modalities in CKD.

Key words : chronic kidney disease, gene therapy, pyrrole-imidazole polyamides, regenerative medicine, dedifferentiated fat cells