

# TGF- $\beta_1$ mRNA に対する DNA-RNA キメラ型 リボザイムによる被嚢性腹膜硬化症の遺伝子 治療の開発

丸山 範晃\* 福田 昇\*\* 岡田 一義\* 松本 絃一

Development of gene therapy for encapsulating peritoneal sclerosis by a chimeric DNA-RNA  
hammerhead ribozyme targeting TGF- $\beta_1$  mRNA

Noriaki MARUYAMA\*, Noboru FUKUDA\*\*, Kazuyoshi OKADA\*, and Koichi MATSUMOTO

\*Department of Medicine, Division of Nephrology and Endocrinology,

\*\*Advanced Research Institute of Science and Humanities, Life Science Program,  
Nihon University, Tokyo, Japan

## 要 旨

被嚢性腹膜硬化症は腹膜透析患者に発症する、稀ではあるが致死的な合併症として知られている。被嚢性腹膜硬化症の発症および進展に関与するサイトカインのなかで、transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) は中心的な役割を果たしていると考えられている。われわれは TGF- $\beta_1$  mRNA を特異的に認識して切断する DNA-RNA キメラ型リボザイムを開発してきた。今回われわれは、腹膜硬化症モデルラットを作製し、TGF- $\beta_1$  に対するキメラ型リボザイムをモデルラットの腹腔内へ投与した結果、腹膜の肥厚および硬化が有意に抑制され、また、腹膜組織中の TGF- $\beta_1$  mRNA および fibronectin mRNA の発現が有意に抑制された。

以上の結果より、TGF- $\beta_1$  に対するキメラ型リボザイムは腹膜の線維化、硬化を強力に抑制し、被嚢性腹膜硬化症に対する新規の遺伝子治療薬として有用であると考えられた。

**Background :** Encapsulating peritoneal sclerosis (EPS) is a rare and devastating fibrotic complication in patients treated with peritoneal dialysis. Transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) has been reported to be a pivotal factor in the induction of EPS. Ribozymes are RNA molecules that enzymatically cleave the target mRNAs and are expected to be utilized as a novel nucleic acid-based therapy. We examined the effects of the chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting TGF- $\beta_1$  mRNA on a peritoneal sclerosis rat model to develop a possible gene therapy for EPS.

**Methods :** To create an animal model of peritoneal sclerosis, rats were given a daily intraperitoneal injection of chlorhexidine gluconate and ethanol dissolved in saline (CHX) for 14 days. On day 4, the chimeric ribozyme or mismatch ribozyme was intraperitoneally injected. On day 15, samples of peritoneum were obtained from the rats, and expression of TGF- $\beta_1$  mRNA and fibronectin mRNA in peritoneal tissues were evaluated by quantitative real-time PCR analysis.

**Results :** Injections of CHX significantly increased the submesothelial thickness, and increased the expression of TGF- $\beta_1$  and fibronectin mRNA in the rat peritoneum. Treatment with the chimeric ribozyme significantly reduced the CHX-induced peritoneal thickness, and expression of TGF- $\beta_1$  and fibronectin mRNA in peritoneal tissues.

**Conclusions :** These results indicate that the chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting TGF-

$\beta_1$  mRNA has the potential for use as a gene therapy agent for EPS.

Jpn J Nephrol 2007; 49: 113-120.

**Key words** : encapsulating peritoneal sclerosis, transforming growth factor- $\beta_1$ , ribozyme, gene therapy

## はじめに

日本における慢性腎不全患者は25万人を超え、尿毒症に対し血液透析療法または持続性腹膜透析療法(continuous ambulatory peritoneal dialysis: CAPD)を受けている。CAPDは在宅でできる透析療法であるが、感染症の合併や血液透析の普及によりCAPDを受けている患者はここ10年間1万人を超えていない。また被嚢性腹膜硬化症(encapsulating peritoneal sclerosis: EPS)は腹膜透析に合併する稀な疾患であるが、発症すると重篤化しやすく死亡率も高い疾患であり、いまだ有効な治療法が確立しておらず、この合併症の存在が腹膜透析の普及を妨げている要因の一つとなっている。EPSの病態は、腹膜透析の継続によって生じる腹膜の肥厚および硬化といった慢性の腹膜劣化状態に細菌性腹膜炎などの炎症が加わることが契機となって、腹膜表面にフィブリンに代表される炎症性産物が多量に堆積して被膜が形成され、腸管同士が癒着して腸閉塞状態をきたすものであると考えられている<sup>1)</sup>。また、EPSの発症、進展にはさまざまな原因が関与しており、多因性であると考えられているが<sup>2)</sup>、腹膜硬化症はほぼすべてのEPSに合併する基礎的な病態である。この腹膜硬化に関与するサイトカインとしてtransforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )、connective tissue growth factor, vascular endothelial growth factorなどが知られている<sup>3,4)</sup>。なかでもTGF- $\beta_1$ はfibronectinやcollagenなどの細胞外マトリックス蛋白の産生を増加させることが知られており<sup>5)</sup>、細胞外基質の増生や線維化の進展において中心的な役割を果たすサイトカインであると考えられている。

遺伝子治療は、遺伝子欠損もしくは遺伝子異常に伴う疾患に遺伝子そのものを補う方法と、遺伝子の過剰発現によりもたらされる疾患に対し遺伝子発現を抑制する方法に分かれるが、後者にはリボザイム、アンチセンスDNAなどの核酸による遺伝子制御法がある。リボザイムはRNAを酵素的に切断するRNA核酸であり、人工的に設計、作製することによりアンチセンスDNAと同様、遺伝子発現を抑制できる。リボザイムはアンチセンスDNAと違い細胞内での非特異的作用がなく、ターゲット遺伝子への特異性が高く、癌やAIDSなど各種難治性疾患への新しい遺伝子治療法として開発が進められている。

しかしリボザイムはRNA構造であるため、単独では生体内で速やかに分解されてしまうという欠点がある。われわれはラットのTGF- $\beta_1$  mRNAの二次構造を解析して標的的部位を選択し、ラットTGF- $\beta_1$  mRNAに対するハンマーヘッド型リボザイムを分子設計した。このリボザイムは生体内においてより安定して作用するように、DNA-RNAキメラ型のリボザイムに合成され核酸医薬として開発されてきた<sup>6-9)</sup>。

今回われわれは、EPSに対するリボザイムによる遺伝子治療法の開発を目的として、EPSの進展においてTGF- $\beta_1$ が中心的な役割を果たしていると想定し<sup>10-12)</sup>、腹膜硬化症モデルラットを作製し、その腹腔内へTGF- $\beta_1$ に対するリボザイムを投与してTGF- $\beta_1$ の発現を抑制することを試み、腹膜の肥厚と硬化への影響を観察して生体レベルにおけるリボザイムの効果を検証した。

## 材料および方法

**1. ラットTGF- $\beta_1$  mRNAに対するリボザイムの合成**  
われわれはラットTGF- $\beta_1$  mRNAの二次構造を解析して、mRNAがループ構造をとり、その切断により立体構造が大きく変化すると考えられる部位にあるGUC配列を特定し、その領域を認識して切断する38塩基から成るDNA-RNAキメラ型ハンマーヘッド型リボザイムを合成した(Fig. 1A)。このリボザイムは切断酵素活性を持った保存配列(Fig. 1Aの下線)のみRNA構造で、他の塩基をDNA構造として核酸合成機で合成し、さらにRNA分解酵素に耐性を持たせるために3'末端から2塩基間をphosphorothioate型(Fig. 1Aの\*)に化学修飾した。またリボザイムのコントロールとして、リボザイムの切断活性部位の塩基配列を1塩基のみ置換した(AからCに)ミスマッチリボザイムを合成した(Fig. 1B)。

## 2. 腹膜硬化症モデルラットの作製

すべての動物実験は1980年の学会会議決議による実験動物取り扱い指針に基づいて行われた。

既報の方法に基づき<sup>13)</sup>、7週齢雄性、体重約200gのSprague-Dawleyラット(SDラット、日本クレア、東京)に対して、0.1%グルコン酸クロルヘキシジン、15%エタノール、生理食塩水混合液(以下、CHX)を1日1回、3

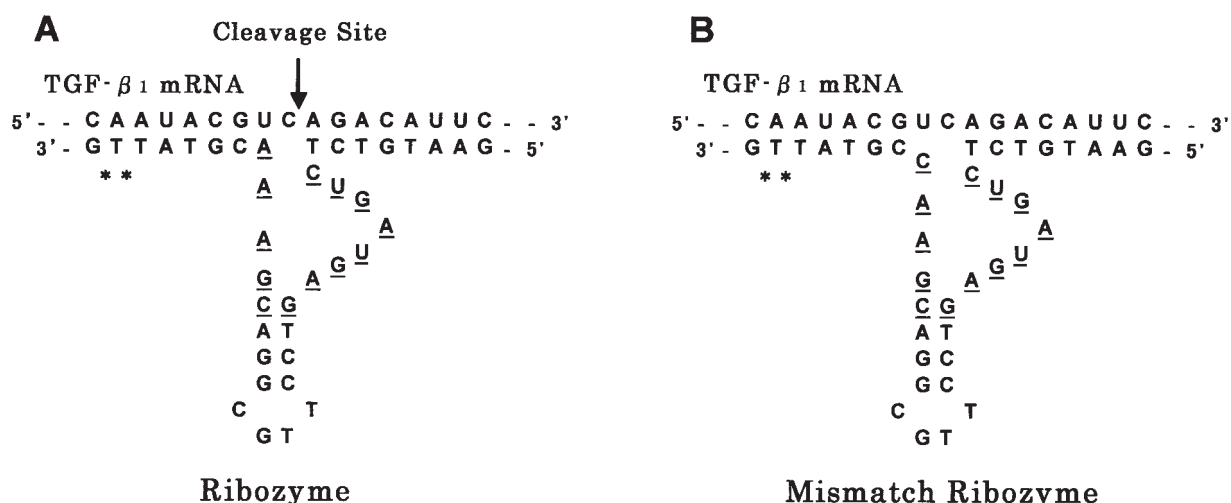


Fig. 1. Structures of the chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme

A : Ribozyme specific to rat TGF- $\beta$ <sub>1</sub> mRNA

B : Mismatch ribozyme. Mismatch ribozyme contains a single altered base (A to C) in the catalytic loop region.

mL ずつ腹腔内へ 14 日間連日投与して腹膜硬化症モデルラットを作製した。

### 3. 腹膜組織へのリボザイムの移行性の検討

CHX を 3 日間腹腔内へ投与し、第 4 日目にラット TGF- $\beta$ <sub>1</sub> mRNA をターゲットとした fluorescein-isothiocyanate (FITC) ラベルしたキメラ型リボザイム 20  $\mu$ g を、3.6  $\mu$ L の polyethylenimine (ExGen 500 *in vivo*, fermentas) をデリバリー試薬に使い、製品プロトコールに沿って調整後、腹腔内へ投与した。投与 12 時間後に解剖し腹膜組織を摘出、新鮮凍結切片を作製して腹膜組織へのリボザイムの取り込みを蛍光顕微鏡 (Nikon, TE2000-U) 下に組織学的に検討した。

### 4. 腹膜硬化症モデルラットへのリボザイムの投与

以下の 4 実験群を設けた。

- 1) 生理食塩水 (normal saline : NS) 3 mL を腹腔内へ連日 14 日間投与する群、6 匹
- 2) CHX 溶液 3 mL を連日 14 日間腹腔内へ投与する群、6 匹
- 3) CHX 溶液 3 mL を連日 14 日間腹腔内へ投与し、実験開始 4 日目にミスマッチリボザイム 200  $\mu$ g を単回腹腔内へ投与する群、6 匹
- 4) CHX 溶液 3 mL を連日 14 日間腹腔内へ投与し、実験開始 4 日目に TGF- $\beta$ <sub>1</sub> mRNA に対するリボザイム 200  $\mu$ g を単回腹腔内へ投与する群、6 匹

なお、ラット TGF- $\beta$ <sub>1</sub> mRNA をターゲットとしたリボザイムまたはミスマッチリボザイム 200  $\mu$ g は、36  $\mu$ L の polyethylenimine をデリバリー試薬に使い腹腔内へ投与した。

### 5. 腹膜組織摘出

実験開始第 15 日目にラットを安楽死させ、壁側腹膜を腹直筋と一括して摘出、直ちに一部は RNA 抽出用に -80°C に保存し、残りの腹直筋については 4% リン酸緩衝パラホルムアルデヒド溶液 (Wako Chemicals, Osaka, Japan) にて固定後、パラフィン切片を作製した。

### 6. 組織学的検討

各個体の組織切片は Masson's trichrome 染色を行い、光学顕微鏡にて腹膜組織の形態変化を観察した。

### 7. 腹膜肥厚度の計測

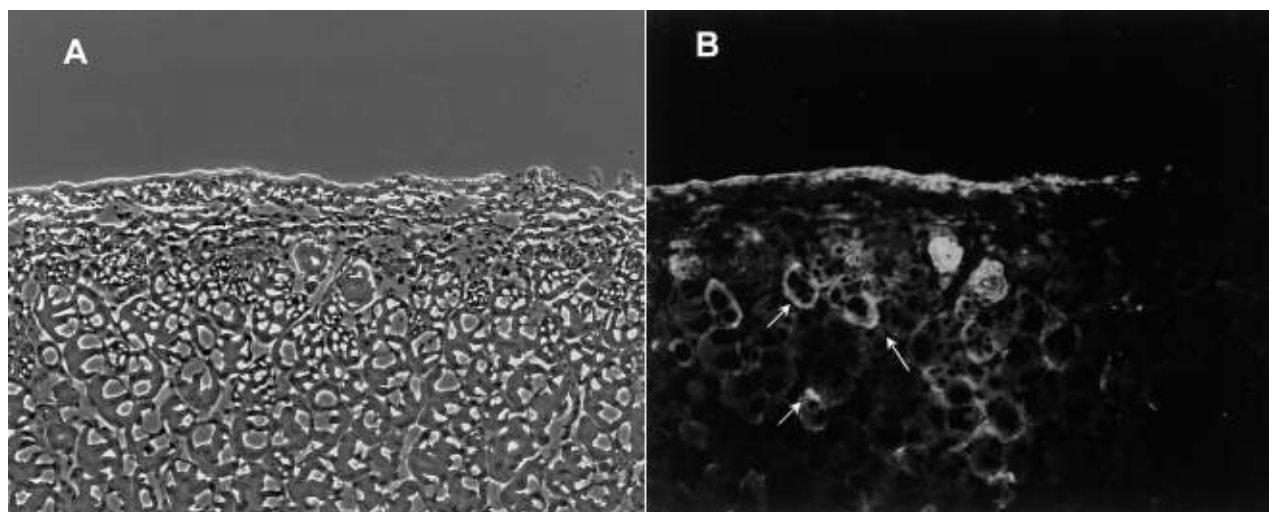
各標本について、Masson's trichrome 染色において青色に染まる線維化部位を腹膜表面から腹直筋筋層まで垂直にランダムに 10 カ所計測して平均値を計算し、各群間の腹膜肥厚度を統計学的に検討した。

### 8. 組織からの RNA 抽出

凍結した腹直筋の腹膜表面を 5×5 mm の大きさに統一して腹直筋も含めて切り出し (重量約 75 mg)、RNA 抽出試薬 TRIzol® (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) を 1 mL 加え、メス刃にて細かく断片化してから組織をホモジナイズし、その後 AGPC 法<sup>15)</sup> にて RNA を抽出した。抽出した RNA は滅菌水を加えて最終濃度 1  $\mu$ g/ $\mu$ L の RNA 溶液とした。

### 9. cDNA 作製

抽出した RNA 1  $\mu$ g に対して逆転写酵素 AMV Reverse Transcriptase XL (TaKaRa Biochemicals, Osaka, Japan) 5 単位、ランダムプライマー (9 mers 50  $\mu$ M, TaKaRa) 1.0  $\mu$ L、10×RNA-PCR バッファー (TaKaRa) 2.0  $\mu$ L、25



**Fig. 2. Distribution of fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labeled chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting TGF- $\beta_1$  mRNA into the rat anterior abdominal wall**

A : A fresh frozen section image of the anterior abdominal wall. Control bright field (Magnification,  $\times 200$ )

B : A tissue section image with a fluorescence microscope. (White arrows indicate the distribution of FITC-labeled ribozymes in muscle cells) (Magnification,  $\times 200$ )

mM MgCl<sub>2</sub> 4.0  $\mu$ L, 10 mM dNTP Mix (TaKaRa) 2.0  $\mu$ L, 0.1 M RNase inhibitor (TaKaRa) 0.5  $\mu$ L および精製水を加えて総量 20  $\mu$ L として、サーマルサイクラーにて 1st strand cDNA を作製した。

#### 10. Real-time PCR 測定

腹膜組織に発現している TGF- $\beta_1$  mRNA, fibronectin mRNA を定量する目的にて、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用して定量 real-time PCR を施行した。定量にあたっては、ラット TGF- $\beta_1$ , ラット fibronectin, ラット GAPDH に対するプライマー・プローブ混合液 (TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays, TGF- $\beta_1$ : Rn00572010-m1, TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays, fibronectin 1: Rn00569575-m1, TaqMan<sup>®</sup> Rodent GAPDH control reagents, Applied Biosystems) を使用した。1 ウェル当たりの反応液の組成は、作製したサンプル cDNA 4  $\mu$ L, TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix (Applied Biosystems) 12.5  $\mu$ L, TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Applied Biosystems) 1.25  $\mu$ L および精製水を加えて総量 25  $\mu$ L として TaqMan<sup>™</sup> PCR 法にて測定した。測定した TGF- $\beta_1$  の値は内在性コントロールである GAPDH にて補正後、Comparative Threshold Cycle (Ct) 法 (User Bulletin # 2, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, December 11, 1997) を用いて定量測定を行った。

#### 11. 統計処理

上記の 4 実験群に対して、多群間解析を Kruskal-Wallis 検定および Scheffe 検定にて行った。p < 0.05 を有意とし、統計解析は StatView 5.0 (SAS Institute Inc., San Francisco, CA, USA) を使用した。

## 結 果

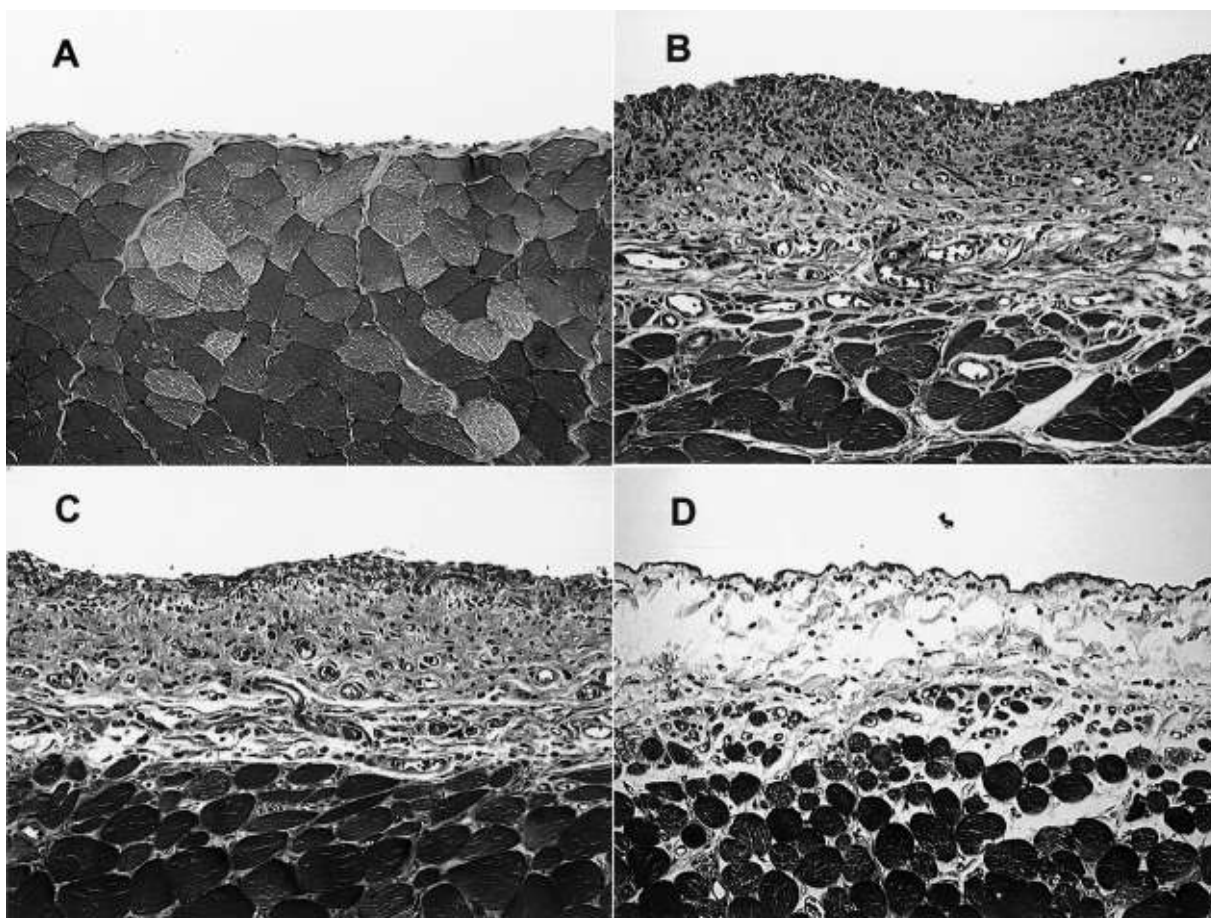
### 1. 腹膜組織へのリボザイムの取り込み

腹腔内へ投与された FITC ラベルをしたキメラ型リボザイムが腹直筋表層の腹膜組織層に取り込まれていることが蛍光顕微鏡下の観察にて確認された (Fig. 2)。また、腹直筋においても筋細胞内へのリボザイムの取り込みが観察された (Fig. 2B の矢印)。

### 2. 腹膜構造の変化

生理食塩水のみを投与した群においては (Fig. 3A), 腹膜中皮細胞は 1 層のままであり、腹膜肥厚の所見は見られなかった。CHX のみ投与した群 (Fig. 3B), CHX およびミスマッチリボザイムを投与した群 (Fig. 3C) では腹膜中皮細胞下から筋層の間の細胞成分が著明に増加し、新規血管形成も著明に生じ、全体として明らかな腹膜の肥厚を形成した。一方、CHX およびリボザイム投与群 (Fig. 3D) においては腹膜中皮細胞下から筋層までの間の細胞成分の増加は目立たず、膠原線維の増生および新規血管形成も抑制されており、間質の浮腫様所見が観察された。また、表層





**Fig. 3. Histological assessment of the rat anterior abdominal wall**

- A : Treated with NS for 14 days  
 B : Treated with CHX for 14 days  
 C : Treated with CHX for 14 days and mismatch ribozyme on day 4  
 D : Treated with CHX for 14 days and the ribozyme specific to TGF- $\beta_1$  mRNA on day 4  
 All sections were stained with Masson's trichrome. (Magnification,  $\times 200$ )

の腹直筋細胞には変性および萎縮の所見が他群よりも強く観察された。

### 3. 腹膜肥厚度

Fig. 4 に腹膜肥厚度の定量比較を示す。CHX およびリボザイム投与群の腹膜肥厚は、CHX 単独投与群に比べて有意に ( $p < 0.001$ ) 抑制され、また CHX およびミスマッチリボザイム投与群に比べても有意に ( $p < 0.01$ ) 抑制されていた。

### 4. リボザイムの TGF- $\beta_1$ mRNA 発現への作用

Fig. 5 に TGF- $\beta_1$  に対する DNA-RNA キメラ型リボザイムの TGF- $\beta_1$  mRNA 発現に対する効果を示す。CHX およびリボザイム投与群では CHX 単独投与群に比べて有意に ( $p < 0.01$ ) TGF- $\beta_1$  mRNA の発現が抑制され、また CHX およびミスマッチリボザイム投与群に比べても有意

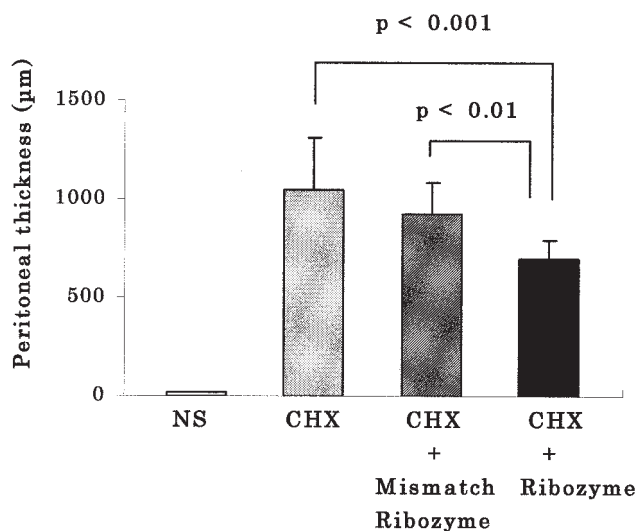
に ( $p < 0.05$ ) TGF- $\beta_1$  mRNA の発現が抑制されていた。

### 5. リボザイムの fibronectin mRNA 発現への作用

Fig. 6 に TGF- $\beta_1$  に対する DNA-RNA キメラ型リボザイムの fibronectin mRNA 発現に対する効果を示す。CHX およびリボザイム投与群では CHX 単独投与群に比べて有意に ( $p < 0.05$ ) fibronectin mRNA の発現が抑制された。

## 考 察

今回われわれは、TGF- $\beta_1$  の発現を特異的に阻害する DNA-RNA キメラ型リボザイムを腹膜硬化症モデルラットの腹腔内に投与して、腹膜の組織学的な変化および TGF- $\beta_1$  mRNA と fibronectin mRNA の発現量の変化を

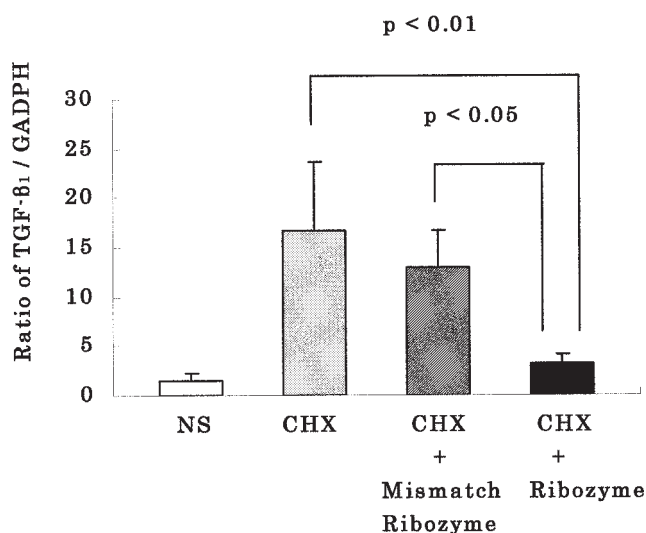


**Fig. 4. Effects of the ribozyme specific to TGF- $\beta_1$  mRNA on submesothelial thickness in rats injected with CHX**

Data are mean  $\pm$  SD.

$p < 0.001$ , CHX with ribozyme vs. CHX alone.

$p < 0.01$ , CHX with ribozyme vs. CHX with mismatch ribozyme



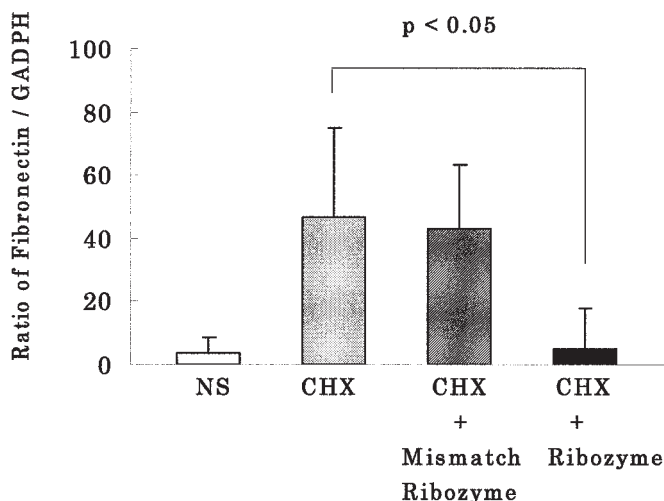
**Fig. 5. Effects of the ribozyme specific to TGF- $\beta_1$  mRNA on the expression of TGF- $\beta_1$  mRNA in anterior abdominal wall tissues in rats injected with CHX**

The amount of mRNA expression was determined by quantitative real-time PCR analysis.

Data are mean  $\pm$  SD.

$p < 0.01$ , CHX with ribozyme vs. CHX alone.

$p < 0.05$ , CHX with ribozyme vs. CHX with mismatch ribozyme



**Fig. 6. Effects of the ribozyme specific to TGF- $\beta_1$  mRNA on the expression of fibronectin mRNA in anterior abdominal wall tissues in rats injected with CHX**

The amount of mRNA expression was determined by quantitative real-time PCR analysis.

Data are mean  $\pm$  SD.

$p < 0.05$ , CHX with ribozyme vs. CHX alone.

検討した。その結果、リボザイムを投与した群の腹膜組織では腹膜の肥厚、線維化、硬化が著明に抑制されていた。また、リボザイム投与群の腹膜組織中ではTGF- $\beta_1$

mRNA の発現が有意に抑制され、fibronectin mRNA の発現も有意に抑制されていた。この結果より、腹腔内に投与されたリボザイムが TGF- $\beta_1$  の発現を抑制し、組織線維化の過程において TGF- $\beta_1$  の下流因子で細胞外マトリクス蛋白の一つである fibronectin の発現も抑制していることが示され、組織線維化の一連の過程が上流に位置する TGF- $\beta_1$  の発現抑制によって抑制されて、組織所見における腹膜の肥厚、線維化、硬化の抑制に至ったものと考えられた。Margetts らは<sup>15,16</sup>、アデノウイルスをベクターとして TGF- $\beta_1$  遺伝子をラット腹腔内において過剰に発現させたところ、腹膜の肥厚と硬化が惹起されたことを報告している。今回のわれわれの結果および Margetts らの報告などから、TGF- $\beta_1$  の発現増加が腹膜肥厚や硬化において中心的な役割を果たし、著明な組織学的な変化を生じさせることが明らかになった。

また今回の実験において、CHX およびリボザイム投与群の組織所見では、腹膜の線維化と硬化は抑制されたものの、表層の腹直筋細胞に変性および萎縮の所見が明らかに観察された。一方、CHX 単独投与群、CHX およびミスマッチリボザイム投与群では著明な腹膜肥厚および硬化が観察されたが、腹直筋細胞への細胞傷害の所見は少なかった。これは、リボザイム投与群の腹腔内において、CHX

による強力な細胞傷害作用の存在にも関わらず、TGF- $\beta_1$ の発現がリボザイムによって強力に抑制された結果、腹膜中皮細胞下の線維化が発達せず、CHXに対する防御反応が取れなかったために直接表層の腹直筋細胞へ傷害が及んだためと考えられた。

TGF- $\beta_1$ は創傷や組織傷害で発現が亢進し、傷害部位を修復するため細胞外基質を増生させ、過剰になると線維化や硬化性変化が起こってくる。今回の動物実験レベルにおける組織所見からは、腹膜の肥厚が有害な刺激から細胞を保護している可能性があることが示唆された。この実験所見より、腹膜透析患者に生じる腹膜硬化症も、生体非適合性の腹膜透析液に対する生理的な防御反応による組織変化であることが類推された。現在、腹膜硬化症の延長線上にEPSがあるのではなく、この2つは別の病態であるという考えもあり<sup>17)</sup>、腹膜硬化の抑制が腹膜透析患者にとって有利なことであるのか、またEPSの発症予防に役立つのか、などといった詳細についてはいまだ明らかになっていない。一方、EPS発症後の病態においては、明らかに生理的防御反応を超えた過剰な細胞外基質の増生が生じるため、積極的な腹腔内の線維化や硬化の抑制が望ましいと考えられた。

現在、EPS発症後の治療法として副腎皮質ステロイドの使用報告が多く集積されているが、川西ら<sup>18)</sup>による本邦におけるEPSに対する多施設前向き調査の報告では、約半数にしか効果が認められなかった。ステロイドは、炎症反応全般を抑制することによって細胞外基質の過剰産生、析出状態を抑制し有効であると考えられるが、中山らは<sup>19)</sup>、ステロイドは炎症を伴わない時期に進展する癒着に対する効果は期待できず、ステロイドとは別の線維化を抑制する治療手段が必要であると述べている。今後のEPS治療の方向性として、EPSの発症および進展に関与するサイトカインを明らかにし、サイトカインレベルでの線維化の抑制が治療において有効になると考えられる。

リボザイムはRNA核酸であるため、RNA分解酵素によって分解されやすい欠点があり、核酸分解酵素に対する耐性を上げる課題がある。今回われわれが合成したDNA-RNAキメラ型リボザイムは、切断活性のある保存配列のみをRNAとし他の塩基配列をDNAに変更し、またリボザイムの3'末端をphosphorothioate型に化学修飾してRNA分解酵素に耐性を持たせるような工夫を行った。また、リボザイムを実際の医薬品として使用する場合、リボザイムの生体への投与方法をどうするかという課題がある。リボザイムを標的組織に特異的に作用させるた

めには組織への局所投与が望ましいが、実際の生体では困難であり、組織特異性を持つベクターなどの開発が今後の課題となる。核酸医薬のなかでリボザイムはターゲット遺伝子に対する特異性と副作用の少なさなどの利点があり、今後上記課題を解消できれば、実際の医薬品として登場すると考えられる。

今回われわれが開発したTGF- $\beta_1$  mRNAに対するDNA-RNAキメラ型リボザイムは生体内において失活せず強力に作用して、線維化の過程に関わる主要なサイトカインであるTGF- $\beta_1$ の発現を抑制し、過剰な細胞外基質の産生を抑制することを確認した。今後はリボザイム投与のタイミング、投与量、安全性などについて検討を重ねていくことによって、EPSに対するリボザイムによる遺伝子治療法が開発できる可能性があると考えられた。

## 結 語

今回われわれが開発したTGF- $\beta_1$  mRNAに対するDNA-RNAキメラ型リボザイムは、EPSの主要な病態である細胞外基質の過剰な産生、堆積、線維化の過程において中心的に働くTGF- $\beta_1$ を生体内において特異的に抑制できることが明らかになった。このリボザイムの効果は、ステロイドなどを使用する従来の治療法に比べてより選択的にEPSの病因に対して加療することを可能とし、EPSの新規の有効な治療手段になり得ると考えられた。

本論分の要旨は第5回腎不全病態治療研究会(2004年東京)、第48回日本腎臓学会学術総会(2005年横浜)、第464回日大医学会例会(2005年東京)、第6回腎不全病態治療研究会(2005年東京)にて発表した。

## 文 献

1. 川西秀樹. 被嚢性腹膜硬化症(EPS)の病態と治療. 伊藤克己, 遠藤 仁, 御手洗哲也, 東原英二, 秋澤忠男(編): Annual Review 腎臓 2005. 東京: 中外医学社, 2005: 138-144.
2. Pollock C. Pathogenesis of peritoneal sclerosis. Int J Artif Organs 2005; 28(2): 90-96.
3. Nakamura S, Niwa T. Advanced glycation end-products and peritoneal sclerosis. Semin Nephrol 2004; 24(5): 502-505.
4. Io H, Hamada C, Ro Y, Ito Y, Hirahara I, Tomino Y. Morphologic changes of peritoneum and expression of VEGF in encapsulated peritoneal sclerosis rat models. Kidney Int 2004; 65(5): 1927-1936.
5. Igotz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta



- stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986 ; 261(9) : 4337-4345.
6. Fukuda N. Therapeutic application of ribozymes for cardiovascular disease. In : Levon Michael Khachigian(eds) *Synthetic Nucleic Acids as Inhibitors of Gene Expression*. Florida : CRC Press LLC, 2004 : 1-17.
  7. Teng J, Fukuda N, Hu WY, Nakayama M, Kishioka H, Kanmatsuse K. DNA-RNA chimeric hammerhead ribozyme to transforming growth factor- $\beta_1$  mRNA inhibits the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2000 ; 48 : 138-147.
  8. Ando H, Fukuda N, Kotani M, Yokoyama S, Kunimoto S, Matsumoto K, Saito S, Kanmatsuse K, Mugishima H. Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting transforming growth factor- $\beta_1$  mRNA inhibits neointima formation in rat carotid artery after balloon injury. *Eur J Pharmacol* 2004 ; 483(2-3) : 207-214.
  9. Yusa J, Fukuda N, Sato S, Matsumoto K, Mugishima H, Kamoi K. Inhibition of growth of human gingival fibroblasts by chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting transforming growth factor- $\beta_1$ . *J Periodontol* 2005 ; 76(8) : 1265-1274.
  10. Offner FA, Feichtinger H, Stadlmann S, Obrist P, Marth C, Klingler P, Grage B, Schmahl M, Knabbe C. Transforming growth factor- $\beta$  synthesis by human peritoneal mesothelial cells. Induction by interleukin-1. *Am J Pathol* 1996 ; 148(5) : 1679-1688.
  11. Medcalf JF, Walls J, Pawluczyk IZ, Harris KP. Effects of glucose dialysate on extracellular matrix production by human peritoneal mesothelial cells(HPMC) : the role of TGF- $\beta$ . *Nephrol Dial Transplant* 2001 ; 16(9) : 1885-1892.
  12. Oh KH, Margetts PJ. Cytokines and growth factors involved in peritoneal fibrosis of peritoneal dialysis patients. *Int J Artif Organs* 2005 ; 28(2) : 129-134.
  13. Ishii Y, Sawada T, Shimizu A, Tojimbara T, Nakajima I, Fuchinoue S, Teraoka S. An experimental sclerosing encapsulating peritonitis model in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2001 ; 16(6) : 1262-1266.
  14. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 ; 162(1) : 156-159.
  15. Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gauldie J. Gene transfer of transforming growth factor- $\beta_1$  to the rat peritoneum : effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12(10) : 2029-2039.
  16. Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, Hoff CM, Holmes CJ, West-Mays JA, Kelly MM. Transient overexpression of TGF- $\beta_1$  induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 2005 ; 16(2) : 425-436.
  17. Garosi G. Different aspects of peritoneal sclerosis. *Contrib Nephrol* 2003 ; 140 : 18-29.
  18. Kawanishi H, Kawaguchi Y, Fukui H, Hara S, Imada A, Kubo H, Kin M, Nakamoto M, Ohira S, Shoji T. Encapsulating peritoneal sclerosis in Japan ; prospective multicenter survey. *Am J Kidney Dis* 2004 ; 44 : 729-737.
  19. 中山昌明, 長谷川俊男. 被嚢性腹膜硬化症(EPS)に対する内科的治療—副腎皮質ステロイド薬と腹腔洗浄の効果—. *腎と透析 57 別冊腹膜透析* 2004 ; 57 : 83-87.