

## 9430 腎Na排泄調節機構としてのメサンギウム細胞機能の異常発生機転に関する研究

助成研究者：藤原 芳廣 (大阪大学 医学部)

共同研究者：上田 尚彦 (大阪大学 医学部)

金田 安史 (大阪大学 細胞生体工学センター)

今井 圓裕 (大阪大学 医学部)

越智 聡 (大阪大学 保健体育部)

和田 晃 (大阪大学 医学部)

鎌田 武信 (大阪大学 医学部)

ナトリウムの排泄は腎臓の重要な機能の1つであり、慢性糸球体腎炎や他の原疾患による糸球体硬化症ではこの体内Naの恒常性を維持する腎の機能が障害される。従って糸球体硬化症の進展機序を解明し、その制御を可能にすることが腎不全の防止に不可欠である。以前よりレニン-アンギオテンシン系の亢進が糸球体硬化症の進展に関与すると考えられてきたが、これまでにそれをin vivoで直接的に証明する研究はなされていなかった。そこで我々はレニン、アンギオテンシノーゲン両遺伝子をHVJ-リポソーム法でラット腎臓の糸球体細胞に導入し、これらを糸球体局所で過剰に発現させた後に糸球体組織を検討した。その結果、遺伝子を導入したラットの糸球体で細胞外基質の増加が認められた。また、メサンギウム細胞の形質転換のマーカーと考えられている間質型コラーゲン、 $\alpha$ -smooth muscle actinの発現も認められた。これらのことからレニン-アンギオテンシン系は糸球体硬化症に対して直接の促進因子として働くことが示唆された。

次に、メサンギウム細胞の表面抗原のひとつであるThy-1抗原に対する抗体を静注して作製するメサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルラットの腎臓糸球体にTGF- $\beta$ のアンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN)をHVJ-リポソーム法で導入し、糸球体硬化病変に対する効果を観察した。その結果、AS-ODNを導入した腎臓では糸球体硬化病変の減弱が認められた。このことよりHVJ-リポソーム法によるAS-ODN療法が糸球体硬化症の抑制に有効であることが示唆された。



## 9430 腎Na排泄調節機構としてのメサンギウム細胞機能の異常発生機転に関する研究

助成研究者：藤原 芳廣 (大阪大学 医学部)

共同研究者：上田 尚彦 (大阪大学 医学部)

金田 安史 (大阪大学 細胞生体工学センター)

今井 圓裕 (大阪大学 医学部)

越智 聡 (大阪大学 保健体育部)

和田 晃 (大阪大学 医学部)

鎌田 武信 (大阪大学 医学部)

## 研究目的

ヒト慢性糸球体腎炎はその原因や初期の病理像等により、幾つかのカテゴリーに分類されるが、いずれの疾患もその末期には糸球体硬化病変という共通の病理像を呈する。糸球体硬化病変の主な特徴はメサンギウム細胞の増殖ならびにメサンギウム基質の増加であり、これらは慢性糸球体腎炎での尿中Na排泄低下の原因の1つとされている。すなわちメサンギウム細胞はその収縮弛緩により糸球体限外濾過係数(Kf)を変化させ、結果的に糸球体濾過値(GFR)を調節する役割を担っているが、メサンギウム細胞増殖があるとアンジオテンシンIIによる細胞収縮反応を介したKfの低下が増幅されGFRの過剰な低下反応が起こり尿中Na排泄の低下をきたすと考えられている。また、メサンギウム基質の異常蓄積による糸球体有効濾過面積の減少はGFRの低下をきたし、最終的には体内Naの恒常性を維持できなくなる。従ってメサンギウム細胞の増殖とメサンギウム基質の異常蓄積を惹起する因子を明らかにし、その制御法を開発することが、慢性糸球体腎炎患者の腎機能を維持する上で極めて重要であることがわかる。

従来メサンギウム細胞の増殖および細胞外基質産生を促進する因子の研究は主として培養メサンギウム細胞を用いたin vitroの実験によりなされてきた。その結果主要な血管作働性物質であるアンジオテンシンIIが培養メサンギウム細胞の増殖のみならず細胞外基質の産生を促進することが明らかにされてきている。また、アンジオテンシンII刺激が培養メサンギウム細胞のサイトカイン (IL-6やTGF-βなど) 分泌を促進することも多くの研究者が報告している。

一方アンジオテンシンIIがin vivoで糸球体病変にどのような影響を与えるかについても既に幾つかの報告がなされている。まずJohnsonらはsystemic blood pressureの中等度の上昇をきたす量のアンジオテンシンIIをラットに持続静注することにより糸球体メサンギウム細胞の形質転換が惹起されることを示した。しかしながら、この結果はアンジオテンシンII投与による全身の循環動態の変化を介して間接的に糸球体病変をきたした可能性が残る。また、アン

ギオテンシン変換酵素阻害剤がヒト慢性糸球体腎炎やラット糸球体硬化症モデルの糸球体硬化病変の進行を抑制するという多くの報告は、アンギオテンシンIIが糸球体硬化病変の進展を促進する可能性を示すものの、アンギオテンシンIIの関与を間接的に示唆するにすぎない。

以上からわかるように、アンギオテンシンIIがin vivoで糸球体硬化病変の進展を促進する、という仮説を支持する傍証は多く報告されているが、この仮説をin vivoで直接的に証明する研究はなされていなかった。そこで今回我々はレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子をHVJ-リポソーム法で直接腎臓糸球体細胞に導入することによって糸球体局所のアンギオテンシンII過剰状態を引き起こし、糸球体にいかなる組織変化が惹起されるかを検討した。また、この方法によって引き起こされる糸球体組織変化が糸球体局所のレニン-アンギオテンシン系亢進に基づくものかどうかを確認するため、本実験系に対するアンギオテンシン変換酵素阻害剤の効果も追って検討した。

さらに、腎臓糸球体細胞への遺伝子導入は、様々な生理活性物質の糸球体に対する直接的な作用をin vivoで検討する上で極めて有用な実験系であるとともに、慢性糸球体疾患に対する遺伝子治療への可能性を秘めている。すなわち糸球体硬化病変の進展には糸球体構成細胞自身が産生するautocrine/paracrine因子が関与すると考えられているが、これらの因子に対するアンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN)を糸球体細胞内に効率よく導入することができれば硬化病変の進行を阻止あるいは抑制することができる筈である。我々はAS-ODNによる腎炎治療の可能性を模索する目的で、HVJ-リポソーム法によるオリゴヌクレオチドの糸球体細胞への導入効率を検討し、次いでメサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルであるラット抗Thy-1抗体腎炎に対するTGF- $\beta$ のAS-ODNの効果を検討した。

## 研究方法

### 1. 発現ベクターの作製

ヒトプロレニン、アンギオテンシノーゲンのcDNA全長を発現ベクターpUC-CAGGSのXho I サイトに挿入した。この発現ベクターはサイトメガロウイルスエンハンサーおよびチキン $\beta$ アクチンのプロモーターを持つ。作製したヒトプロレニンのcDNAを含む発現ベクターをリン酸カルシウム法にてNRK細胞に導入したところ、培養液中にプロレニンおよびレニン蛋白、活性が検出され、本発現ベクターが動物細胞で作用することが確認された。

### 2. HVJ-リポソームの調製およびラット腎への遺伝子導入

HVJ-リポソームは金田らの方法に従って作製した。phosphatidylserine, phosphatidylcholine, cholesterolの混合物と発現ベクター、核蛋白HMG-1を混和し、短時間超音波処理をしてリポソームを作製した。リポソームに不活化したセンダイウイルス(HVJ)を加え、ショ糖勾配遠心によりHVJ-リポソームを調製した。遺伝子はプロレニン、アンギオテンシノーゲンのcDNAを含む発現ベクターを1:1に混じたものを使用した。コントロール群としてはこれらのcDNAのかわりにchloramphenicol acetyltransferase(CAT)のcDNAを組み込んだベクターを用いた。

8週令の雄性Sprague-Dawley(SD)ラットを麻酔し、開腹して腹部大動脈、左腎動脈を露出

し、左腎動脈にカテーテルを挿入しDNAを含むHVJ-リポソームを注入した。術後3、5、7日目に血圧測定、代謝ケージによる畜尿、採血をおこない血清電解質、尿素窒素、血清クレアチニン、尿蛋白、電解質濃度を分析した。

### 3. 組織学的検索

遺伝子導入の3、7日後（以下それぞれDay 3、Day 7）にラットを屠殺。Day 3のラット腎臓では、導入したヒトレニン遺伝子の発現の有無、分布を抗ヒトレニンモノクローナル抗体を一次抗体とする酵素抗体法で確認した。また、Day 7のラット腎臓は光顕標本(PAS染色)を複製して組織変化を観察するとともに、間質型コラーゲン、 $\alpha$ -smooth muscle actinが糸球体内に発現するかどうかを免疫組織化学的に検討した。

4. レニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入によって惹起される糸球体病変に対するアンギオテンシン変換酵素阻害剤の効果の検討

遺伝子導入の方法については上記に準ずる。これと平行して遺伝子導入前日よりエナラプリルを1日1回投与する群とエナラプリルを投与しない群とを作成し、Day 7の腎組織を比較した。

### 5. 正常ラット糸球体細胞へのFITCラベル・オリゴヌクレオチドの導入

ラット左腎動脈からFITCラベル・オリゴヌクレオチドを内包するHVJ-リポソームを注入。リポソーム注入後1時間後にラットを屠殺し、ラット左腎におけるFITC発光の分布を調べた。なお、オリゴヌクレオチドの導入効率を高めるため、リポソーム注入にあたっては、約1気圧の注入圧を加えた。また、リポソーム注入後10分間は腎臓への血流を遮断し、リポソームをラット腎内に滞留させた。

### 6. 抗Thy 1抗体腎炎ラットの作成

6週齢SDラットの尾静脈より抗Thy 1抗体(OX-7)を静注し、メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルである抗Thy 1抗体腎炎ラットを作成した。

### 7. 抗Thy 1抗体腎炎ラットへのTGF- $\beta$ のアンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN)の導入

OX-7静注の2日後、抗Thy 1抗体腎炎ラットの左腎糸球体にTGF- $\beta$ のAS-ODNを導入した。導入するAS-ODNの30%はFITCラベルしたものを使用した。AS-ODNの導入方法は、研究方法5に準じて行った。

### 8. AS-ODNの糸球体細胞核内への移行の確認

TGF- $\beta$ のAS-ODN導入の30分後にラット左腎の皮質の一部を採取。O.C.T.コンパウンドに包埋して凍結後、薄切して蛍光顕微鏡で観察した。

### 9. TGF- $\beta$ のreverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

TGF- $\beta$ のAS-ODN導入の2日後、ラット左右両腎の皮質の一部を採取し、microdissection法によりそれぞれ糸球体5個を単離し、TGF- $\beta$ mRNAのRT-PCRを施行。その左右差を検討した。

### 10. 抗Thy 1腎炎の糸球体組織病変に対するTGF- $\beta$ のAS-ODN導入療法の効果の検討

TGF- $\beta$ のAS-ODN導入の7日後ラットから腎摘し、左右腎臓の光顕所見を比較した。また、酵素抗体法で $\alpha$ -smooth muscle actinを染色し、左右腎臓糸球体内での発現量を比較した。

## 研究結果

### 1. 導入遺伝子の発現

ヒトプロレニン遺伝子を導入3日後、ラット左腎を2%パラホルムアルデヒドで灌流固定して薄切し抗ヒトレニンモノクローナル抗体を用いたABC法にて免疫組織化学的にヒトレニン蛋白を証明した。Fig. 1に示すように約3~4割の糸球体にヒトレニンが検出された。糸球体以外の血管や尿管にはレニンは証明されなかった。用いた抗体はヒト活性型レニンに特異的であるため傍糸球体装置など内因性のレニンは染色されていない。

### 2. 血液、尿生化学的成績

プロレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子を導入したラットではCAT遺伝子を導入したラットと比較して血圧、尿量に差を認めなかった。ヒトプロレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子を腎に導入して3日後、5日後、7日後にラットをdecapitationにて屠殺し、血液を採取、血清電解質濃度、尿素窒素、クレアチニンおよびレニン活性(PRA)、レニン濃度を測定した。また代謝ケージで時間尿を採取し、尿中蛋白、クレアチニン、電解質を測定した。遺伝子導入後のヒトレニン濃度はレニン群、CAT群とも感度以下であり、またPRAはレニン群、CAT群で差を認めなかった。また血清Na、K、Cl濃度とも両群で差を認めなかった。さらに尿中蛋白排泄量は両群とも術直後一過性に増加するが3日日以降は正常レベルとなり明らかな蛋白尿の発現は認めなかった。

### 3. レニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入腎の組織学的変化

プロレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入群において、7日目の腎組織で一部の糸球体のメサンギウム基質の軽度の増加を認めた(Fig. 2)。これに対してCAT群ではこのような変化は認めず正常腎の組織像と異ならなかった(Fig. 2)。変化は約3~4割の糸球体で見られ、この比率は免疫組織化学でヒトレニン蛋白の陽性率とおおむね一致していた。糸球体の細胞数は両群とも正常腎と同じで有意の差を認めなかった。尿管、間質、血管壁には形態学的な変化を認めなかった。

ヒトおよび実験動物の糸球体硬化ではメサンギウム基質の増加は本来の基質成分であるIV型コラーゲンやフィブロネクチンなどの他、通常糸球体にはみられない型、III型コラーゲンといった間質型コラーゲンの増加をみるのが知られている。そこでレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入ラットの腎について糸球体のメサンギウム基質に含まれるコラーゲンのタイプを特異的な抗体を用いて調べた。CAT群では通常みられるIV型コラーゲンのみがみられたが、間質型コラーゲンはみられなかった。これに対してレニン、アンギオテンシノーゲン群ではIV型コラーゲンの他I型およびIII型コラーゲンの出現を認めた(Fig. 3)。

またヒトの糸球体腎炎およびThy1腎炎などの実験腎炎では糸球体メサンギウム細胞に通常みられない $\alpha$ -smooth muscle actinが出現し、メサンギウム細胞が形質転換して増殖、基質過剰産生をきたすと考えられている。そこでメサンギウム細胞の形質転換の指標として $\alpha$ -smooth muscle actinの出現をレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入腎で検討した。その結果

CAT遺伝子導入群では $\alpha$ -smooth muscle actinは平滑筋細胞が存在する輸出入細動脈にのみ発現し、糸球体内には証明されないが、レニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入群では糸球体内にも $\alpha$ -smooth muscle actinの発現が認められた(Fig. 4)。すなわちレニン、アンギオテンシノーゲンの過剰発現によりアンギオテンシンIIの局所濃度が上昇し、メサンギウム細胞の形質転換が起こって、通常みられない間質型コラーゲンを産生したと結論づけられた。

4. レニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入による腎組織学的変化に対するエナラプリルの効果

上記実験の後、新たに6匹の6週齢SDラットの腎臓にヒトレニン、ヒトアンギオテンシノーゲンの遺伝子を導入し、エナラプリル投与群3匹、コントロール群3匹の2群に分けた。遺伝子導入後7日目の腎臓を摘出して組織変化を検討したところ、コントロール群のうち1匹のみで糸球体細胞外基質の増加、糸球体内間質型コラーゲン、 $\alpha$ -smooth muscle actinの発現を認められたが、エナラプリル投与群3匹、コントロール群残り2匹には特に異常所見は認められなかった。

5. ラット腎臓へのFITCラベル・オリゴヌクレオチド導入

HVJ-リポソーム法によりラット左腎にFITCラベル・オリゴヌクレオチドを導入し、30分後の腎臓薄切切片を蛍光顕微鏡で観察したところ、実験に供した6匹のラット中4匹のラットで左腎内のほぼ100%の糸球体においてFITCの核内集積を認めた(Fig. 5)。FITCラベル・オリゴヌクレオチドを取り込んだ細胞は、その核の形態および糸球体内での分布状況から主にメサンギウム細胞であると推測された。また、各糸球体で認められたFITC集積核の個数は糸球体光顕像におけるメサンギウム細胞の個数とおおむね一致していた。

6. 抗Thy 1腎炎ラットの腎臓糸球体細胞へのTGF- $\beta$ アンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN)導入の効果

OX-7を静注して作成した6匹の糸球体腎炎モデルラットの左腎臓にTGF- $\beta$ のAS-ODNを導入した。導入30分後に腎皮質の一部を蛍光顕微鏡で観察したところ、6匹中2匹のラットのほとんどの糸球体でFITCラベルAS-ODNの核内集積が認められた。これら2匹についてのRT-PCRの検討の結果、TGF- $\beta$ のAS-ODN導入2日後の糸球体内TGF- $\beta$ のmRNA量は左腎(AS-ODN導入側)で有意に抑えられていることがわかった(Fig. 6)。また、AS-ODN導入7日後の糸球体病変(光顕像)は右腎に比較し左腎(AS-ODN導入側)で有意に減弱していた(Fig. 7)。また、糸球体内の $\alpha$ -smooth muscle actinの発現も免疫組織化学的に左腎で有意に減弱していた(Fig. 8)。

## 考察

我々はレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子をラット腎臓糸球体に導入し、糸球体細胞にこれらの蛋白を過剰発現させ、メサンギウム基質の増加が起こることを明らかにした。本実験では、遺伝子導入後ラットの血圧およびレニンの血中レベルに有意の変化が認められていないため、糸球体硬化病変の発現はレニン-アンギオテンシン系の最終産物であるアンギ

オテンシンIIが糸球体局所で過剰に作用したことに起因すると考えられる。

ヒトの慢性糸球体腎炎や実験腎炎、糸球体硬化症ではメサンギウム細胞に $\alpha$ -smooth muscle actinの発現をみたり、基質成分として間質型コラーゲンの出現をみることが知られている。これらは本来正常の糸球体ではみられないものであり、糸球体構成細胞の形質転換のマーカーとして認識されている。今回レニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子を糸球体細胞に導入することにより、糸球体内に $\alpha$ -smooth muscle actin、間質型コラーゲンの発現が認められたことから、糸球体局所のレニン-アンジオテンシン系の亢進がメサンギウム細胞の形質転換を起こしうることが示された。

以上の実験から、糸球体局所のレニン-アンジオテンシン系の亢進が、糸球体細胞の形質転換を引き起こし、その結果糸球体細胞による細胞外基質の産生・代謝の不均衡が生じ糸球体硬化病変が形成されるという仮説が導かれるが、この仮説を確かめるため、この遺伝子導入モデルに対するアンジオテンシンII変換酵素阻害剤（エナラプリル）の効果を検討した。その結果エナラプリル投与群全3例で糸球体細胞外基質の増加および糸球体内 $\alpha$ -smooth muscle actinの発現が完全に抑制され、エナラプリル非投与群3例中1例で糸球体細胞外基質の増加および糸球体内 $\alpha$ -smooth muscle actinの発現が認められた。本実験から、レニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子導入による糸球体病変の出現がアンジオテンシン変換酵素阻害剤によるレニン-アンジオテンシン系阻害によって抑制される傾向が窺われたが、エナラプリル非投与群においても3例中2例は糸球体病変が出現していないことから今回の実験では遺伝子の導入効率がラット間で異なった可能性が否定できず、追加実験による確認が必要である。

糸球体疾患に対する遺伝子治療法の選択肢のひとつとしてターゲット遺伝子に対するアンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN)の導入があげられる。今回我々はメサンギウム増殖性糸球体腎炎の実験モデルラットへのAS-ODN療法の可能性を模索した。ターゲット遺伝子としてはTGF- $\beta$ を選択した。TGF- $\beta$ が糸球体硬化病変の主要な進展因子のひとつであり、アンジオテンシンIIによる糸球体硬化病変促進作用も少なくともその一部はTGF- $\beta$ 産生・活性化の亢進を介していると考えられていることがその選択理由である。

糸球体腎炎モデルの糸球体組織変化をTGF- $\beta$ のAS-ODNで抑制するためには、AS-ODNが腎内のほとんどすべての糸球体に分布し、しかもできるだけ多くの糸球体細胞の核内に導入されなければならない。先のレニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子導入の実験では約30%の糸球体でしかその発現が認められなかったことから、我々はまずHVJ-リポソームの投与方法を改良した。その改良点は腎動脈からの注入時の注入圧を約1気圧に高めたこと、腎臓への血流遮断時間を設けてHVJ-リポソームの腎内インキュベート時間を延長したことであり、その結果腎臓内のほとんど100%の糸球体の大部分のメサンギウム細胞の核内にオリゴヌクレオチドを導入することが可能になった。但し、AS-ODN導入ラット全例の約1/3のラットでAS-ODNの糸球体細胞核内集積の不良なものがあったことからAS-ODN導入良好群と不良群の区別をつけてAS-ODNの治療効果を判定する必要があると考えられた。

以上のように実験条件を設定した上で、抗Thy 1腎炎ラットの糸球体細胞にTGF- $\beta$ のAS-ODNを導入した。その結果、AS-ODN導入の成否を判定する為にラベルしたFITCの核内



集積が認められたラットの左腎(治療側)では、右腎より糸球体のTGF- $\beta$ mRNA量が抑えられ、糸球体光顕病変も抑えられた。また、糸球体メサンギウム細胞の形質転換のマーカである $\alpha$ -smooth muscle actinの発現も左腎で抑制された。これらの結果、糸球体腎炎実験に対する治療法としてアンチセンス療法が有効であることが示唆された。

#### 今後の課題

##### 1. レニン-アンジオテンシン系阻害剤の効果の検討

レニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子導入ラットに対するアンジオテンシン変換酵素阻害剤の効果について、今回有効であるとの傾向が認められたが、遺伝子発現にラット間のばらつきがあった可能性があったので、再実験を行い確認する。また、レニン阻害剤、アンジオテンシンIIレセプター拮抗剤の効果についても検討する。

##### 2. 糸球体細胞へのアンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN)導入による実験腎炎の治療

今回の実験では抗Thy 1抗体腎炎に対するTGF- $\beta$ のAS-ODNの有効性が確かめられたが、本療法がレニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子導入ラットの糸球体病変に対しても有効かどうかを検討し、糸球体局所のレニン-アンジオテンシン系亢進による糸球体硬化病変の成立機序にTGF- $\beta$ が関与しているかどうかを明らかにする。又、PDGFなどTGF- $\beta$ 以外の増殖因子やInterleukin-6(IL-6)などのサイトカイン、さらにProliferating cell nuclear antigen(PCNA),cdc 2などの細胞周期調節遺伝子に対するAS-ODNによる腎炎治療の可能性についても検討する。

Fig.1 Intraglomerular Expression of Human Renin on Day 3

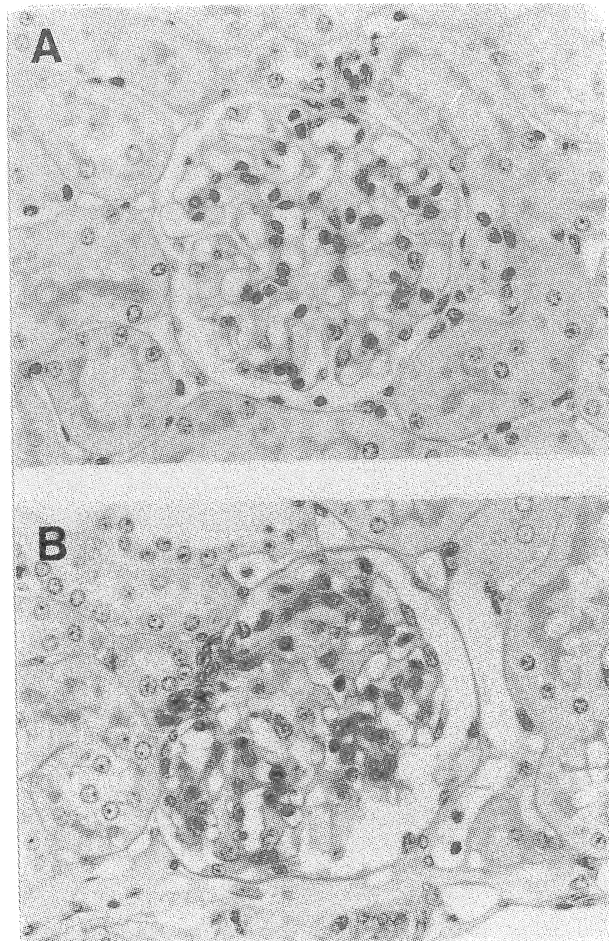


Fig. 2 Histological Change of the Glomerulus on Day 7 after the Gene-transfection  
A: Transfection of CAT (Control Kidney)  
B: Transfection of Human Renin and Angiotensinogen

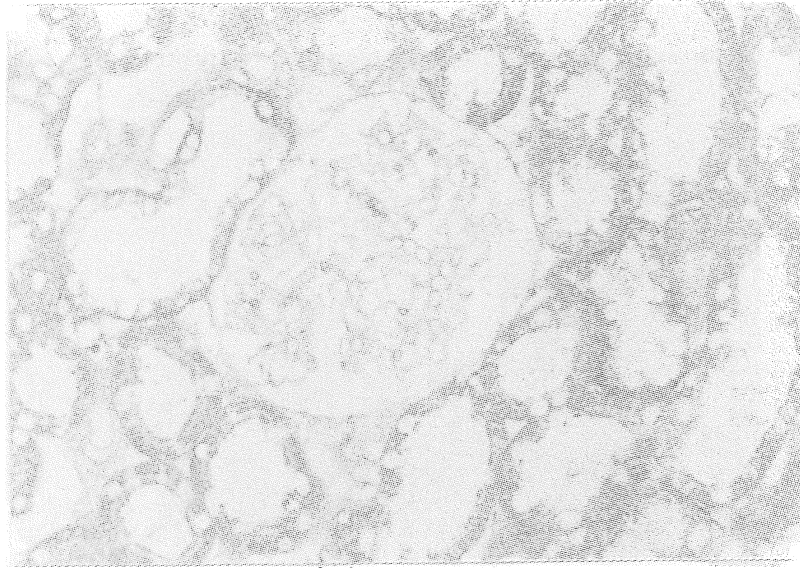


Fig. 3 Intraglomerular Expression of Type III Collagen on Day 7

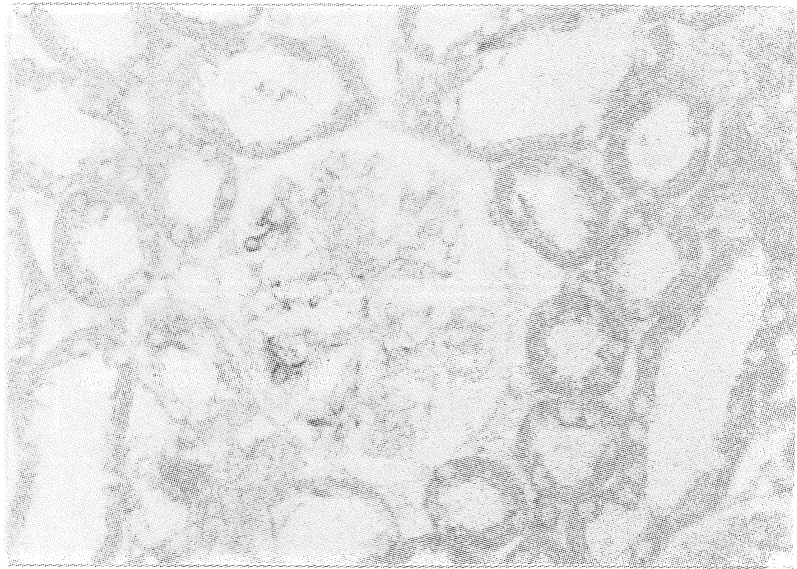


Fig. 4 Intraglomerular Expression of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin on Day 7

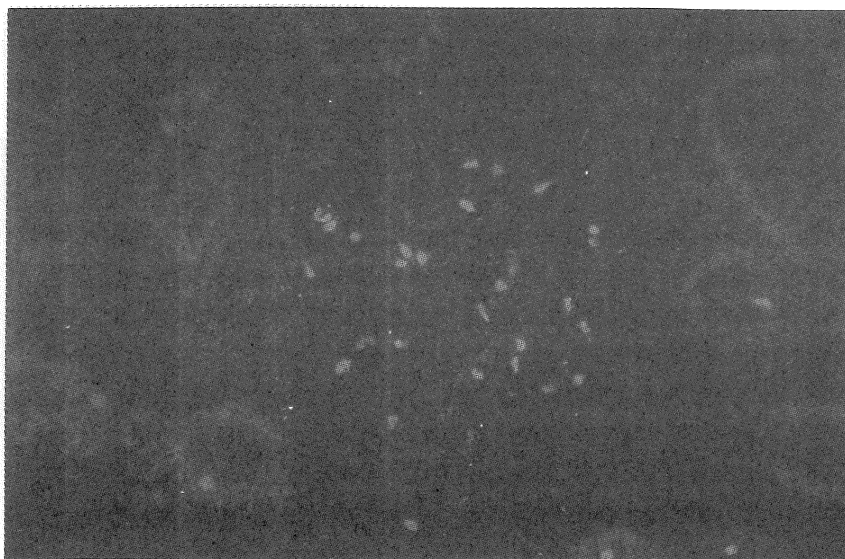


Fig. 5 In Vivo Transfection of FITC-labeled Oligonucleotide

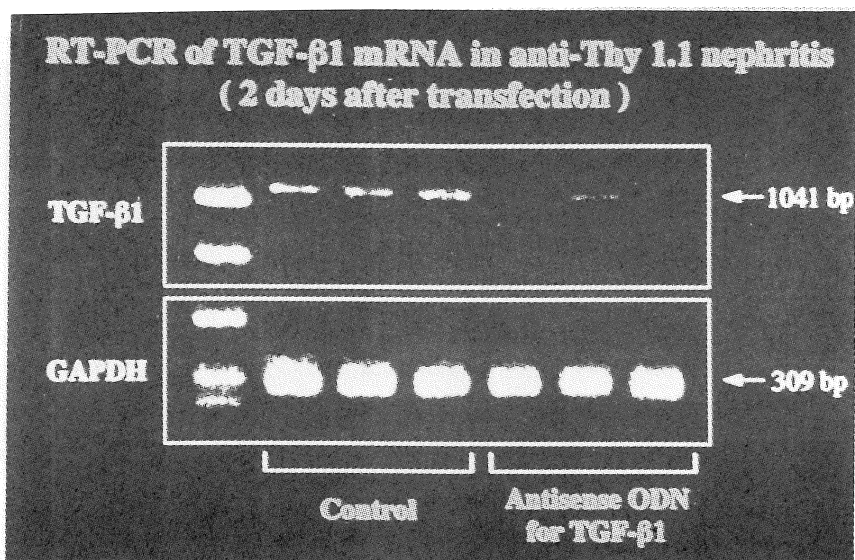


Fig. 6 RT-PCR of TGF- $\beta$ 1 mRNA 2 Days after Transfection of AS-ODN

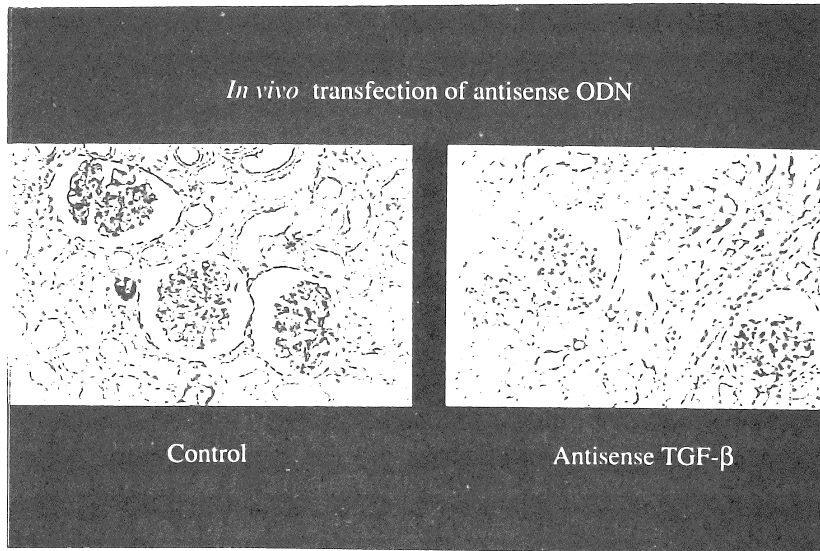


Fig. 7 Histological Change of Glomeruli 7 Days after Transfection of AS-ODN  
A:Control(Right Kidney)  
B:AS-ODN(Left Kidney)

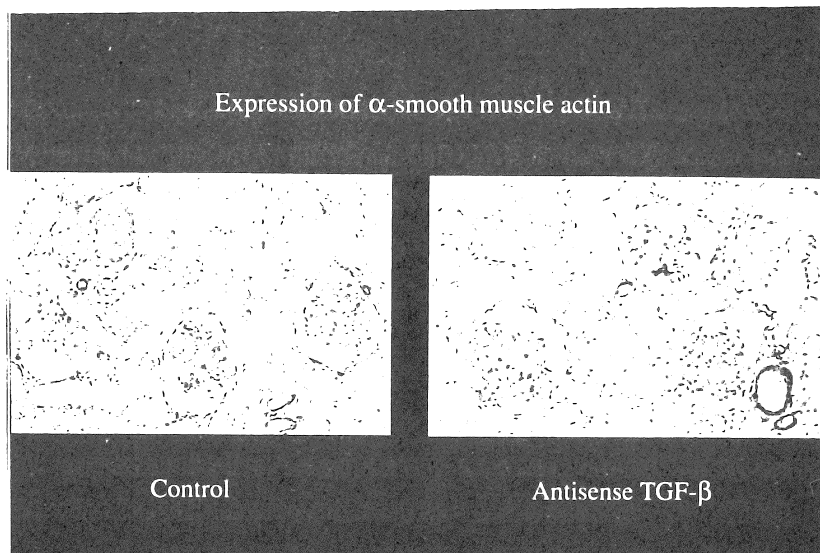


Fig. 8 Expression of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin  
A:Control(Right Kidney)  
B:AS-ODN(Left Kidney)

Glomerular sclerosis and activation of intraglomerular renin-angiotensin system (An experimental model of glomerular sclerosis induced by *in vivo* transfection of genes for renin and angiotensinogen and gene therapy by *in vivo* transfection of antisense oligonucleotide)

Yoshihiro Fujiwara, Naohiko Ueda, Yasufumi Kaneda, Enyu Imai,  
Satoshi Ochi, Akira Wada, Takenobu Kamada  
(First Department of Medicine, Osaka University  
Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University)

### Summary

We introduced human genes for renin and angiotensinogen into the rat kidney by hemagglutinating virus of Japan(HVJ)-liposome method to elucidate the local effect of overexpressed angiotensin II in the glomerulus *in situ*. Three days after transfection human renin was detected in the glomeruli by immunohistochemistry. Seven days after transfection extracellular matrix(ECM) was expanded in the glomeruli and  $\alpha$ -smooth muscle actin was expressed in the mesangial cells. These results suggest that locally activated renin-angiotensin system induces glomerular sclerosis and a phenotypic change in mesangial cells.

The intraglomerular expression of TGF- $\beta$  has been reported to increase in experimental and clinical glomerular diseases and there is a possibility that angiotensin II exerts its action on the glomeruli at least in part by inducing mesangial cells to produce TGF- $\beta$ . We tried to suppress the glomerular lesion of an experimental glomerulonephritis by introducing antisense oligodeoxynucleotide(ODN) for TGF- $\beta$  into the mesangial cells. Intravenous infusion of anti-Thy-1 antibody(OX-7) into rats causes mesangioproliferative glomerulonephritis characterized by glomerular hypercellularity and ECM expansion in glomeruli. Two days after infusion of OX-7 antisense ODN for TGF- $\beta$  was introduced into the left kidney by HVJ-liposome method. Nine days after infusion of OX-7 rats were sacrificed and their kidneys were examined histologically. Intraglomerular accumulation of ECM was suppressed in the left kidney compared with the right kidney of the same rat. In addition expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin was also suppressed by the introduction of antisense ODN for TGF- $\beta$ . In conclusion, inhibition of TGF- $\beta$  expression by antisense ODN can suppress the glomerular lesion of an experimental glomerulonephritis.