ラット自己免疫性心筋炎に対するハイドロダイナミック法によるインターロイキン13-Ig遺伝子導入による治療効果

ラファト　エルナガー
新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器分野
（主任：相澤義房教授）

The Effect of Hydrodynamic-based Delivery of an Interleukin-13-Ig Fusion Gene for Experimental Autoimmune Myocarditis in Rats

Raafat ELNAGGAR

Division of Cardiology, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
(*Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA*)

要　旨

インターロイキン13（IL-13）はTh2-T細胞から分泌される多様な作用を持つサイトカインである．ラットの自己免疫性心筋炎（EAM）においてTh1サイトカインは心筋炎を増悪させるが，Th2サイトカインは改善すると考えられている．今回我々は，ラット自己免疫性心筋炎に対するIL-13の効果を検討するために，ハイドロダイナミック法によるIL-13-Ig遺伝子導入による治療を試みた．EAMを作成するため，第0日目に20匹のラットにブタ心筋ミオシンを免疫し，第1日目に10匹ずつpCAGGS-IL-13-Igを注射した治療群とpCAGGS-Igを注射したコントロール群の2群に分け，第17日目に屠殺し，効果を評価した．IL-13-Ig治療群はコントロール群に比較し，有意に心体重比の減少，心筋炎面積率の減少，心不全のマーカーである心房性利尿ペプチドの心臓での遺伝子発現の減少がみられ，著明な効果がみられた．次に，IL-13の治療効果の作用機序を検討するため，まずIL-13の標的細胞であるIL-13受容体α1を発現している細胞を，EAMの心臓から細胞を分離精製し検索した．その結果，線維芽細胞，内皮細胞，平滑筋細胞などが含まれる非心筋非炎症細胞分画とマクロファージ分画にIL-13受容体α1がみられた．そこでEAMの心臓から分離した細胞に，IL-13-Ig治療をしたラットの血清あるいはコントロール群のラットの血清を加え，いくつかの免疫関連蛋白の遺伝子発現を比較した．プロスタグランジンE合成酵素，シクロオキシゲナーゼ2，誘導型NO合成酵素，IL-1β，TNFαの発現はIL-13-Ig治療群の血清によって有意に抑制され，IL-1受容体アンタゴニスト（IL-1RA）は増加した．ハイドロダイナミック法によるIL-13-Ig遺伝子導入に

Reprint requests to: Haruo HANAWA, M.D.
Division of Cardiology
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-754 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先： 〒951-8510　新潟市旭町通り1-754
新潟大学教育研究院医歯学系器官制御医学講座
循環器分野　　塙　晴雄

よる治療はEAMに対して著効を示し，その効果は，非心筋非炎症細胞やマクロファージに対して，様々な免疫関連蛋白に影響を与えることが作用機序と考えられた．

キーワード：心筋炎，自己免疫，拡張型心筋症，インターロイキン-13，遺伝子治療

はじめに

ラット自己免疫性心筋炎（EAM）はヒトの巨細胞性心筋炎に類似し[1]，慢性期には拡張型心筋症様病態をとる[2]．EAMはT細胞依存性の自己免疫疾患であり[3]，Th1サイトカインとTh2サイトカインのバランスが，進展，回復に重要であると考えられている．Th1サイトカインと Th2サイトカインは異なる時期にEAMの病変部位で産生される[4)5)]．Interleukin（IL）-2 and interferon（IFN）γなどのTh1サイトカインは，病初期に発現し，IL-10などのTh2サイトカインはそれよりも遅くなって発現がみられる．いくつかの研究でIL-10は自己免疫疾患に有効との報告がなされており[6)-8)]，我々もエレクトロポレーションによるIL-10遺伝子筋肉内導入がEAMに効果があることを報告した[9]．しかしながら，他のTh2サイトカインであるIL-4やIL-13と違って，IL-10は造血細胞以外の細胞からも産生され，IL-4やIL-13とは大きく異なっている[10]．

IL-13はTh2 T細胞から分泌され，様々な免疫担当細胞に多様な作用を有する．ヒトのIL-13遺伝子は5q23-31に存在し，IL-4遺伝子の近傍に存在する．IL-13とIL-4はしばしば一緒に発現し[11]，それらの受容体もシグナル伝達のための同じIL4 receptor（IL-4R）α鎖を有する[12]．ヒトのT細胞のようにコモンγ鎖とIL-4Rのみを持つ細胞は，IL-4には反応するが，IL-13には作用しない[13]．一方，コモンγ鎖を持たずIL4 receptor（IL-4R）αとIL-13 receptor（IL-13R）α1鎖を有する細胞，たとえばX-SCID B細胞，線維芽細胞，おそらく内皮細胞などは，IL-4とIL-13の両方に対して作用する[14]．IL-13はリポ多糖で活性化された単球が産生する炎症性サイトカインを抑制し[15)16)]，IgG_4やIgEのB細胞からの産生を誘導する[17]．また線維芽細胞の主要な活性化因子であり[18]，一方，滑膜の線維芽細胞のプロスタグランジンE2産生の抑制因子でもある[19]．

ラットのアジュバント誘導関節炎に対して，IL-13産生アデノウイルスの関節内投与治療は，有意に関節炎を軽快することが報告されている[20]．しかしながら，IL-13の治療は限られた自己免疫疾患に対して試みられているのみで，プラスミドを用いた遺伝子治療の報告はない．ハイドロダイナミック法によるプラスミドDNA導入による遺伝子治療は[21)22)]，高い蛋白の発現がえられ，正常ラット[23]，糸球体腎炎ラットモデルに有用であることが報告されている[24]．さらにimmunoglobulin（Ig）Fcとのキメラ蛋白は，ホモダイマーとして分泌され，半減期が長く，高い受容体との結合が期待できるなど有利な点が指摘されている[25]．今回我々は，ハイドロダイナミック法によるIL-13-Ig遺伝子を組み込んだプラスミドDNA導入のEAMに対する効果とその想定される機序を検討した．

方　法

1．動物

日本チャールズリバーよりLewisラットを購入し，8週齢まで育て，実験に用いた．

2．プラスミドの作成

治療実験に使うプラスミドを作成するため，まず，PCRにてSwaIとNotIの制限酵素部位を含むpCAGGS-Ig-glucagon（Glu）-標識のプラスミドを以下のように作成した[26]．つまり，はじめにラットの脾細胞から得たcDNAからSwaIとNotIの制限酵素部位を含む5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGCcgtgcccagaaactgtg-3'と5'-tcaaccactgcacaaaatcttgggctttacccggagagtgggagagact-3'にてKOD Plus DNA polymerase（TOY-

OBO, 大阪）を用いてPCRを行った後，その希釈したものを鋳型として，同様に5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGCcgtgcccagaaactgtg-3'と5'-gagagagaGAATTCtcaggtattcatcaaccactgcacaaaatcttgggc-3'にてPCRを行い，そのPCR産物をpCAGGSのEcoRIに挿入した．プラスミドは大腸菌JM109コンピテント細胞にトランスフォーメーションした後，Quantum Prep Plasmid Maxiprep kit（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA）を用いて精製した．次にコントロールプラスミドであるpCAGGS-signal peptide (SP)-Ig-Gluは分泌型白血球セリンプロテアーゼのsignal peptideをEAMの心臓のcDANからSwaIの制限酵素部位を含む5'-gaGAATTCATTTAAATgaagtccagcggcctcttcccc-3'とNotIの制限酵素部位を含む5'-gcagcatcGCGGCCGCtccttccacactccagggtgccag-3'で同様にPCRを行い，その産物をpCAGGS-Ig-Gluのプラスミドに挿入し，同様にプラスミドを精製した．治療に用いたpCAGGS-rat IL-13-Ig-Gluは，PHAで刺激した培養脾細胞のcDNAからSwaIの制限酵素部位を含む5'-gaGAATTCATTTAAATggcactctgggtgactgcagtc-3'とNotIの制限酵素部位を含む5'-gcagcatcGCGGCCGCgtggccatagcggaaaagttgctt-3'で同様にPCRを行い，その産物をpCAGGS-Ig-Gluのプラスミドに挿入し，同様にプラスミドを精製した．

3．EAMラットの作成

心筋ミオシンをブタの心臓から以前報告した方法を用いて精製した[27]．EAMラットを作成するため，0.3mol/l KClに溶かした10mg/mlのブタ心筋ミオシンを，10mg/ml結核菌死菌を含む完全フロイントアジュバントと混和した後，第0日目に足底に0.2mlずつ2カ所注射した．

4．プラスミドDNA遺伝子導入

第1日目に，ハイドロダイナミック法にてプラスミドDNA遺伝子導入を行った．つまり，800 μgのpCAGGS-rat IL-13-Ig-Glu（IL-13-Ig群；n＝10）あるいは800μgのpCAGGS-SP-Ig-Glu（SP-Ig群；n＝10）をそれぞれ80ml/kgあたりのリンゲル液で希釈し，尾静脈から約15秒で急速静注し，遺伝子導入した[23]．

5．血中キメラ蛋白の測定

第2, 7, 12, および17日目に血液を採り，グルカゴンRIAキット（第一ラジオアイソトープ，東京）にて測定し[28]，以下の式で，キメラ蛋白の濃度を計算した．キメラ蛋白濃度（nmol/l）＝（グルカゴン濃度の実測値）/（全グルカゴンモル数）．

6．心臓の組織病変の評価

第17日目の心臓を取り出し，心重量と体重を測定し，心体重比（g/g）を計算した．心臓のパラフィン包埋組織から心室中部で横断切片を作成し，ヘマトキシリン・エオジンとアザン・マロリー染色をした．心筋炎面積率はアザン・マロリー染色した組織からカラーイメージ分析装置（Mac SCOPE ver. 2.6, MITANI Corporation）で解析した．

7．免疫組織

第17日目の心臓をO.C.T.コンパウンド上に乗せ，－80℃で凍結した．クリオスタットを用いて心室中部で6mmの厚さの横断切片を作成し，10分間エタノール固定した．マクロファージ，CD4＋T細胞，CD8＋T細胞をマウス抗ラットマクロファージ抗体（ED1, Serotec, Oxford, UK），マウス抗ラットCD4抗体（W 3/25, Serotec）あるいはマウス抗ラットCD8抗体（OX-8, Serotec）でインキュベートした後，ヤギビオチン標識抗マウスIgG_1抗体とHRP標識ストレプトアビジンで染色した．比較的多くの細胞浸潤がみられたIL-13-Ig群，SP-Ig群の標本から4標本ずつ選び，それらの全細胞数をそれぞれ数え，その割合を測定した．

8．RNAの抽出

心不全のマーカーである心房性利尿ペプチド（ANP）のmRNA量を測定するため，心臓の心尖部側1/3から総RNAをトリゾール試薬（Invitrogen）を用いて抽出した（IL-13-Ig群；n＝9, SP-Ig群；n＝8）．また，IL-13の標的細胞つまりIL-13R α 1 mRNAを発現している細胞を調べるため，以下に記述するように，以前報告されているランゲンドルフ還流装置を用いてコラゲナーゼ処理を20分間行った後[29)30)]，心筋

表1　培養非心筋細胞の特異細胞マーカーmRNAの絶対コピー数

	mRNAの絶対コピー数 /総RNA μg
	培養非心筋細胞 (n=6)
CD3	19,100±12,100
コラーゲンタイプ III	228,000,000±91,800,000
カルポニン	2,220,000±1,090,000
CD11b	4,330,000±1,670,000
von Willebrand 因子	82,300±36,700
心筋ミオシンα鎖	未検出

結果は平均 ± 標準誤差で示す。

炎の構成細胞を分離精製し，それらの分画のIL-13Rα1mRNAを定量的RT-PCRにて測定した．つまり，まずランゲンドルフ還流後単離された細胞をステンレス製の金属ふるいで心筋細胞と非心筋細胞に分離した．EAMの心臓の炎症細胞はほとんどがCD11b陽性のマクロファージとαβT細胞であることから[31]，非心筋細胞を適当な抗体，つまりPE標識抗TCRα/β抗体（R73）あるいはPE標識抗CD11b抗体（OX-42）(Pharmingen, San Diego, CA）と抗PEマイクロビーズ抗体，MACSマグネティクマイクロ細胞分離システムを用いて分離精製した．TCRα/β陰性かつCD11b陰性の非心筋非炎症（NCNI）細胞は，線維芽細胞，平滑筋細胞，内皮細胞を多く含む細胞と考えられた．これら分離精製された心筋細胞，αβT細胞，CD11b$^+$細胞，非心筋非炎症細胞は，特異的なマーカーと考えられる心筋ミオシンα鎖，CD3，CD11b，コラーゲンタイプⅢ，カルポニン，von Willebrand因子の遺伝子発現を定量的RT-PCRで確かめ，10％以下のコンタミネーションであることを確かめた（データ未提示）．分離精製された細胞から，上述したようにトリゾール試薬を用いて総RNAを抽出し，2-5mgの総RNAからMMLV逆転写酵素を用いて計20μlのcDNAを作成した．

9．細胞培養

EAMの心臓内における標的細胞のIL-13-Igの作用を検討するため，第18日目のEAMの心臓から，非心筋細胞を培養し，IL-13-Igの添加によるいくつかの免疫関連遺伝子の発現の変化を以下のように測定した．つまり，EAMの心臓をコラゲナーゼ（40mg/100ml）で処理した後，非心筋細胞を単離し，10％胎児ウシ血清を含むRPMI溶液2mlでファイブロネクチンコートされた培養皿で1週間ほど培養し，コンフルエントとなった時点で，60ngのIL-1αを添加し，同時にpCAGGS-IL-13-Ig-Glu-tagあるいはpCAGGS-SP-Ig-Glu-tagをハイドロダイナミック法で遺伝子導入したラットの翌日の血清をそれぞれ加え，24時間後のプロスタグランジンE2合成酵素（PGES），シクロオキシゲナーゼ2(Cox2)，誘導型NO合成酵素（iNOS），IL-1β，TNFαおよびIL-1受容体アンタゴニスト（IL-1RA）の免疫関連遺伝子の発現の変化を測定した(IL-13-Ig＋IL-1α群n＝6，SP-Ig＋IL-1α群n＝6)．これらの培養細胞は，特異的なマーカーの遺伝子発現の検索より，主に線維芽細胞，CD11b$^+$細胞，平滑筋細胞，内皮細胞を含んでいると考えられた（表1）．

表2　定量的RT-PCRに用いたプライマー

	センスプライマー	アンチセンスプライマー
心房性利尿ペプチド	5'-atggatttcaagaacctgctagac-3'	5'-gctccaatcctgtcaatcctac-3'
心筋ミオシンα鎖	5'-acaaggttaaaaacctgacagagg-3'	5'-tactgttctgctgactgatgtcaa-3'
CD3	5'-gatcccaaactctgctatatgcta-3'	5'-ctttcatgccaatctcactgtag-3'
CD11b	5'-gggatccgtaaagtagtgagaa-3'	5'-aaaggagctggtacttcctgtct-3'
コラーゲンタイプ III	5'-cgcaattgcagagacctgaa-3'	5'-acagtcatgggactggcatttat-3'
von Willebrand 因子	5'-agaggctacacatctctcagaagc-3'	5'-gaccttcttcttcttgaaaccttg-3'
カルポニン	5'-aacataggaaatttcatcaaagcc-3'	5'-gtagactgatagttgcctgatcca-3'
IL-13Rα1鎖	5'-gaagcgctgagtataggtaaggag-3'	5'-ccgctttctttaggttttctatca-3'
IL-13Rα2鎖	5'-ctatgtttttctggtatgagggct-3'	5'-aatatcatcttctcggaccacaat-3'
IL-4Rα鎖	5'-taccggagttttagtgacttctcc-3'	5'-gagaaagccttgtaaccagtgtct-3'
コモンγ鎖	5'-tgccatctagatccttcttactcc-3'	5'-tcttttgagaacagatagtggctg-3'
PGES	5'-gtgatggagaacagccagg-3'	5'-gaggaccacgaggaaatgtatc-3'
Cox2	5'-tgtgatattctcaaacaggagcat-3'	5'-aaggaggatggagttgttgtagag-3'
iNOS	5'-ttctactattaccagatcgagccc-3'	5'-gtagttgttcctcttccaaggtgt-3'
IL-1β	5'-gctagtgtgtgatgttcccattag-3'	5'-cttttccatcttcttctttgggta-3'
TNFα	5'-atgggctccctctcatcagt-3'	5'-actccagctgctcctctgct-3'
IL-1RA	5'-agaagaaaagatagacatggtgcc-3'	5'-actttgtgactgtacagggctctt-3'
γアクチン	5'-agccttccttcctgggcatggagt-3'	5'-tggaggggcctgactcgtcatact-3'

10. 定量的RT-PCR

定量に用いるためのスタンダードとなるプラスミドは，EAMの心臓から得られたcDNAと表2に示すプライマーをそれぞれ用いてPCRで増幅し，それらをpGEM-T easyベクターに挿入し，MagExtractor plasmid Kit（TOYOBO，大阪）にて精製した．プラスミドは，シリコン化したチューブに10ng/ml MS2 RNA（Roche, Indianapolis, IN）を含むDNAse free水で壁に吸着しないように希釈した．cDNAは同様に，シリコン化したチューブに10ng/ml MS2 RNA（Roche, Indianapolis, IN）を含むDNAse free水で100倍希釈して，その5μlを定量的RT-PCRに用いた．cDNAと希釈したプラスミドは，スタンダードのプラスミドを作成したプライマーと同じものとLightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I kit（Roche, Indianapolis, IN）を用い，LightCyclerで解析した（denaturation 95℃，10秒，annealing 62℃，10秒，extension 72℃，13秒，40サイクル）．絶対コピー数は，LightCyclerソフトウエアーにより，5つのプラスミドのスタンダードを用いて計算した[5]．

11. 統計学的解析

統計学的評価は，対応のないt-検定あるいは一元配置分散分析後Bonferroniの多重比較検定にて行い，$p < 0.01$を有意とした．特異的マーカーと免疫関連遺伝子の定量のデータは，平均±標準誤差で，ANPの絶対コピー数と心体重比，心筋炎面積率および免疫組織データは，平均±標準偏差で示した．

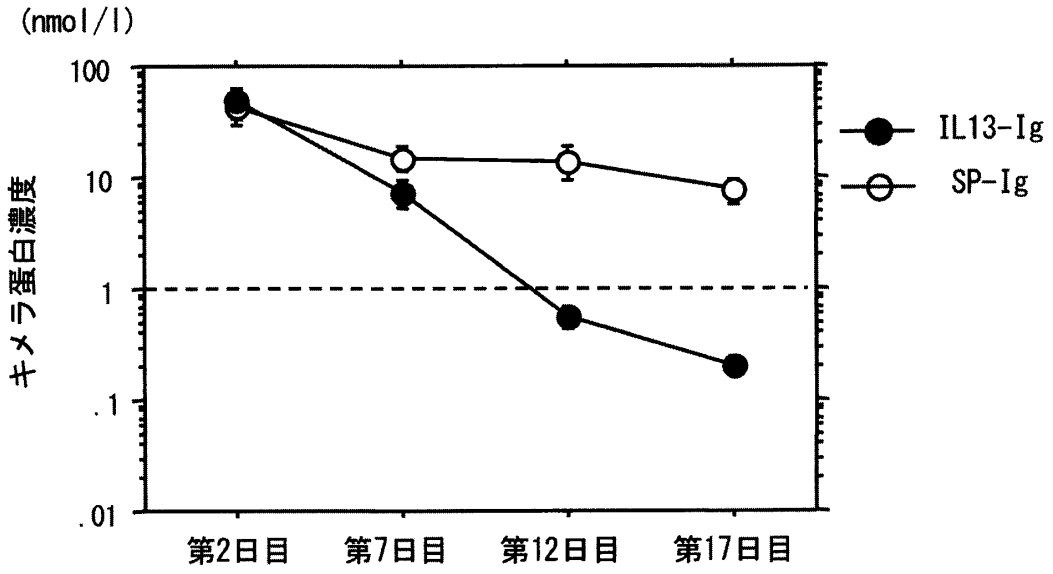


図1 血漿Ig-Glu-標識蛋白（SP-Ig）とIL-13-Ig-Glu-標識蛋白（IL13-Ig）濃度

SP-Ig，ラットはpCAGGS-ラットSP-Ig-Glu-標識を尾静脈から急速大量静注；IL13-Ig，ラットはpCAGGS-ラットIL-13-Ig-Glu-標識を尾静脈から急速大量静注．キメラ蛋白はGlu-標識を用いて濃度を測定後計算した．エラーバーは標準誤差を示す．

結　　果

1．遺伝子導入による発現蛋白の血中濃度

Glu標識を用いて，IL-13-Ig群のIL-13-Ig-Glu標識蛋白の血漿中濃度を測定したところ，第2日目には，48.7±14.8nmol/l（平均±標準誤差）と高値を示し，その後，第7，12，17日目にはそれぞれ7.21±1.91nmol/l，0.55±0.13nmol/l，0.21±0.03nmol/lと低下した．一方SP-Ig群のIg-Glu標識蛋白の血漿中濃度は，第2，7，12，17日目に，それぞれ43.4±13.5nmol/l，15.0±3.7nmol/l，14.2±4.85nmol/l，7.59±1.98nmol/lであった（**図1**）[26]．5-10ng/mlのIL-13（5-10ng/ml≒0.4-0.8nmol/l）は，in vitroで，マクロファージのNO産生を抑制する報告がされていることから[32]，これらのハイドロダイナミック法で得られた血漿中蛋白濃度の結果は，第12日目以降にも，効果があると考えられる．この方法では，エレクトロポレーションを併用した骨格筋内注射による遺伝子導入よりもはるかに高い血漿中濃度が得られた．

2．IL-13-Ig遺伝子導入によるEAMに対する効果

IL-13-Ig群はSP-Ig群に比較して，食欲も旺盛で活発であり，また，心体重比も有意に小さかった（0.45±0.07％対0.64±0.09％，$p<0.0001$）（平均±標準偏差）（**図2A**）．心嚢液も，SP-Ig群は，中等度以上みられたが，IL-13-Ig群は，ほとんどみられず，あっても軽度であった．組織学的にも，SP-Ig群は，多くの炎症細胞や線維芽細胞がみられたが，IL-13-Ig群は有意にそれらが少なかった（1.94±1.73％対25.1±7.3％，$p<0.0001$）（**図2B**）．心不全のマーカーである，心臓内のANPの遺伝子発現は有意にIL-13-Ig群で低かった（$6.03\times10^6\pm3.31\times10^6$対$51.4\times10^6\pm39.9\times10^6$copy/総RNA μ g，$p=0.0038$）（**図2C**）．

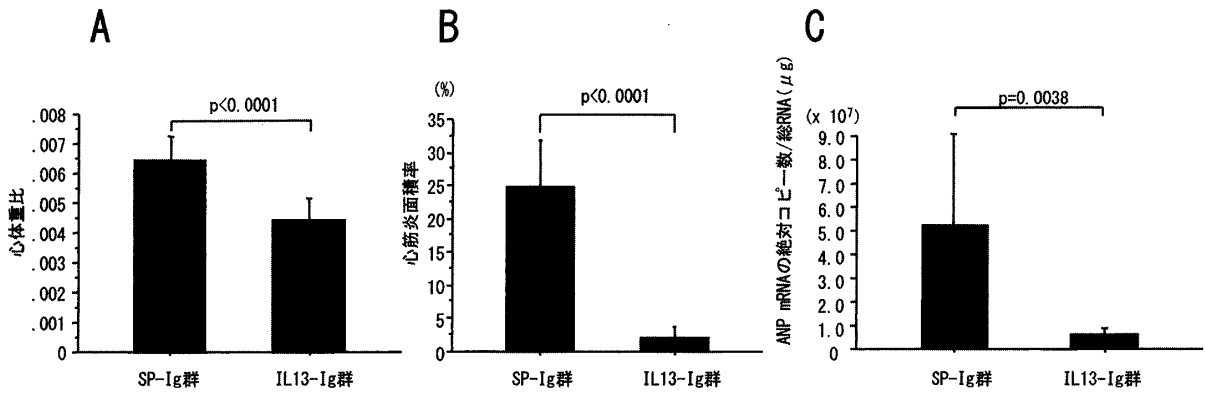


図2

(A)，心体重比．(B)，心筋炎面積率．面積はカラーイメージ分析装置を用いてアザンマロリー染色標本で測定後計算した．(C)，心不全マーカーである心臓中の心房性利尿ペプチドのmRNAの絶対コピー数．SP-Ig，ラットはpCAGGS-ラットSP-Ig-Glu-標識を尾静脈から急速大量静注；IL13-Ig，ラットはpCAGGS-ラットIL-13-Ig-Glu-標識を尾静脈から急速大量静注．エラーバーは標準偏差を示す．統計学的評価は，対応のないt-検定を用いた．

3．浸潤細胞のIL-13-Ig遺伝子導入による変化

比較的多くの細胞浸潤がみられたIL-13-Ig群（n＝4）とSP-Ig群（n＝4）のEAMの心臓内に浸潤している炎症細胞の解析で，ED1$^+$細胞は，有意にIL-13-Ig群で減少していた（287±110対1039±83/specimen, $p < 0.0001$）（**図3B**）．しかしながら，CD4$^+$細胞とCD8$^+$細胞は，有意な減少はみられなかった（CD4$^+$，154±22対181±30/specimen）（CD8$^+$，56±6対61±4/specimen）（**図3C, D**）．これらの結果は，IL-13-Ig治療が，炎症巣のT細胞に作用するよりも，マクロファージに強く作用したことを示唆していると考えられる．

4．EAM心臓中細胞のIL-13受容体およびIL-4受容体遺伝子発現

第18日目のEAM心臓から分離精製された心筋細胞，$\alpha\beta$T細胞，CD11b$^+$細胞および線維芽細胞，平滑筋細胞，内皮細胞を主に含むNCNI細胞中のIL-13受容体およびIL-4受容体の遺伝子発現を定量的RT-PCRにて解析した（**図4**）．IL-13Rα1鎖は，NCNI細胞およびCD11b$^+$細胞に多くの発現がみられ，IL-13Rα1鎖のヘテロダイマーであるIL-4Rα鎖はNCNI細胞と$\alpha\beta$T細胞に多くみられたが，すべての細胞分画に発現がみられた．IL-4Rα鎖のもう一つのヘテロダイマーであるコモンγ鎖は$\alpha\beta$T細胞に多くの発現がみられた．IL-13のデコイレセプターと考えられているIL-13Rα2鎖は，NCNI細胞に多くみられたが，その発現量はIL-13Rα1鎖に比べて少なかった．

5．EAM心臓から分離した培養非心筋細胞における免疫関連蛋白の遺伝子発現

IL-13-Igは，その受容体の検討から，EAM心臓中のCD11b$^+$細胞（単球/マクロファージ）あるいはNCNI細胞（線維芽細胞，平滑筋細胞，内皮細胞）に作用すると考えられたので，我々は，主に線維芽細胞，単球/マクロファージ，平滑筋細胞，内皮細胞からなる細胞をEAM心臓から分離し，培養した（**表1**）．PGES, Cox2, iNOS, IL-1β, TNFαおよびIL-1RAは，NCNI細胞あるいはCD11b$^+$細胞で遺伝子発現がみられたので（データ未提示），IL-13-Igによるそれらの変化を調べた（**図5**）．IL-13-Igは，IL-1αによって増強したPGES, Cox2, iNOS, IL-1βあるい

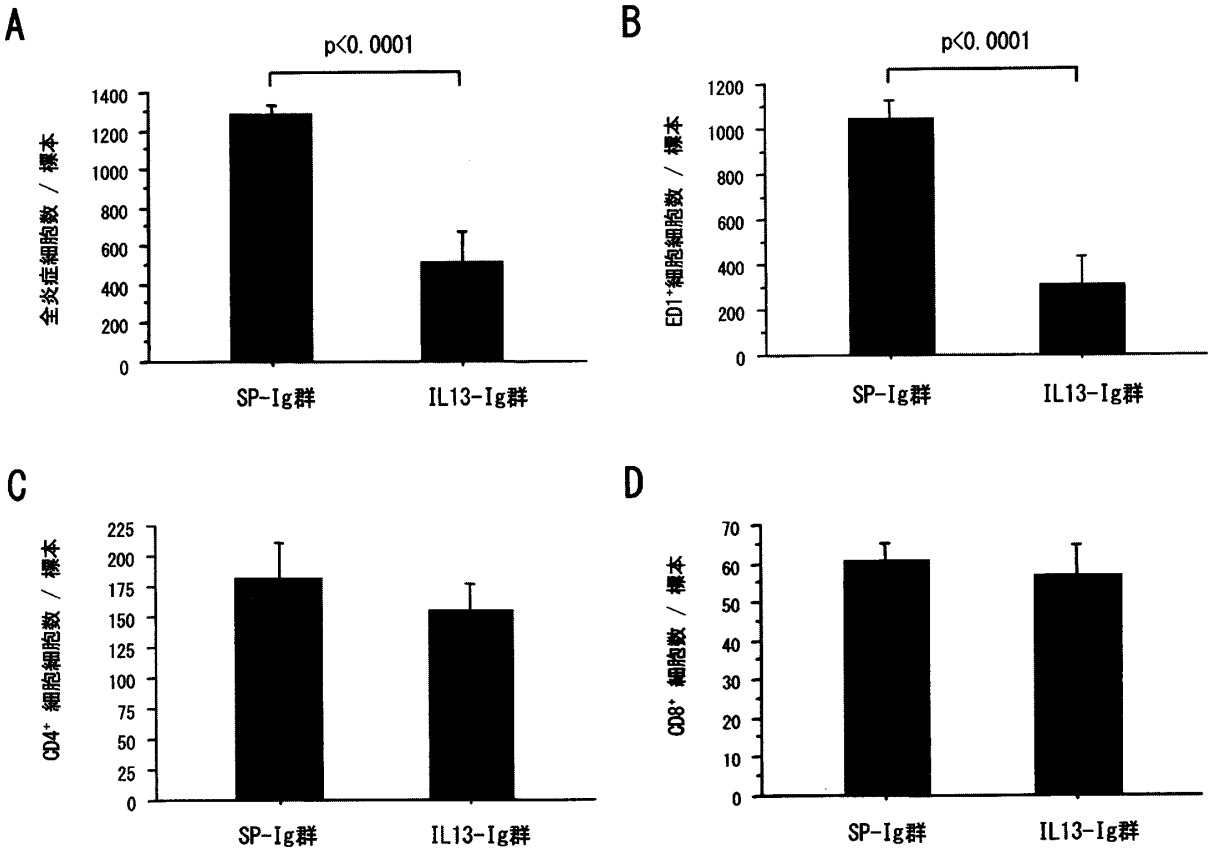


図3

SP-Ig群（n＝4）とIL-13-Ig群（n＝4）の心筋標本における炎症細胞の種類．SP-Ig，ラットはpCAGGS-ラットSP-Ig-Glu-標識を尾静脈から急速大量静注；IL13-Ig，ラットはpCAGGS-ラットIL-13-Ig-Glu-標識を尾静脈から急速大量静注．(A)，一つの心臓横断標本におけるED$^+$細胞，CD4$^+$細胞，およびCD8$^-$細胞を合計した細胞数．(B)，一つの心臓横断標本におけるED$^+$細胞数．(C)，一つの心臓横断標本におけるCD4$^+$細胞数．(D)，一つの心臓横断標本におけるCD8$^+$細胞数．エラーバーは標準偏差を示す．統計学的評価は，対応のないt-検定を用いた．

はTNF αの遺伝子発現をほとんど完全に抑制し，一方IL-1RAを有意に増強した（**図5**）．Th1サイトカインはEAM発症に関わる重要なサイトカインであるが，それらを産生する$\alpha\beta$T細胞が，IL-13R α1鎖を発現していないことから，解析しなかった．またTh1サイトカインを誘導すると考えられているIL-12はEAM心臓から得られた培養非心筋細胞あるいはEAMの培養脾細胞で同様に検討したが，IL-13-Igによって少し減少するものの，有意な変化ではなかった（データ未提示）．

考　　察

1．IL-13-Ig遺伝子導入によるEAMに対する効果

今回の我々が検討した結果，pCAGGS-IL-13-Igのハイドロダイナミック法による遺伝子導入で，EAMは非常に抑制され，改善がみられた．HSV-1を用いたIL-13あるいはIL-14の遺伝子導入で実験的自己免疫生脳脊髄炎にも効果が得られたと報告されている[33)34)]．IL-13-Ig治療群

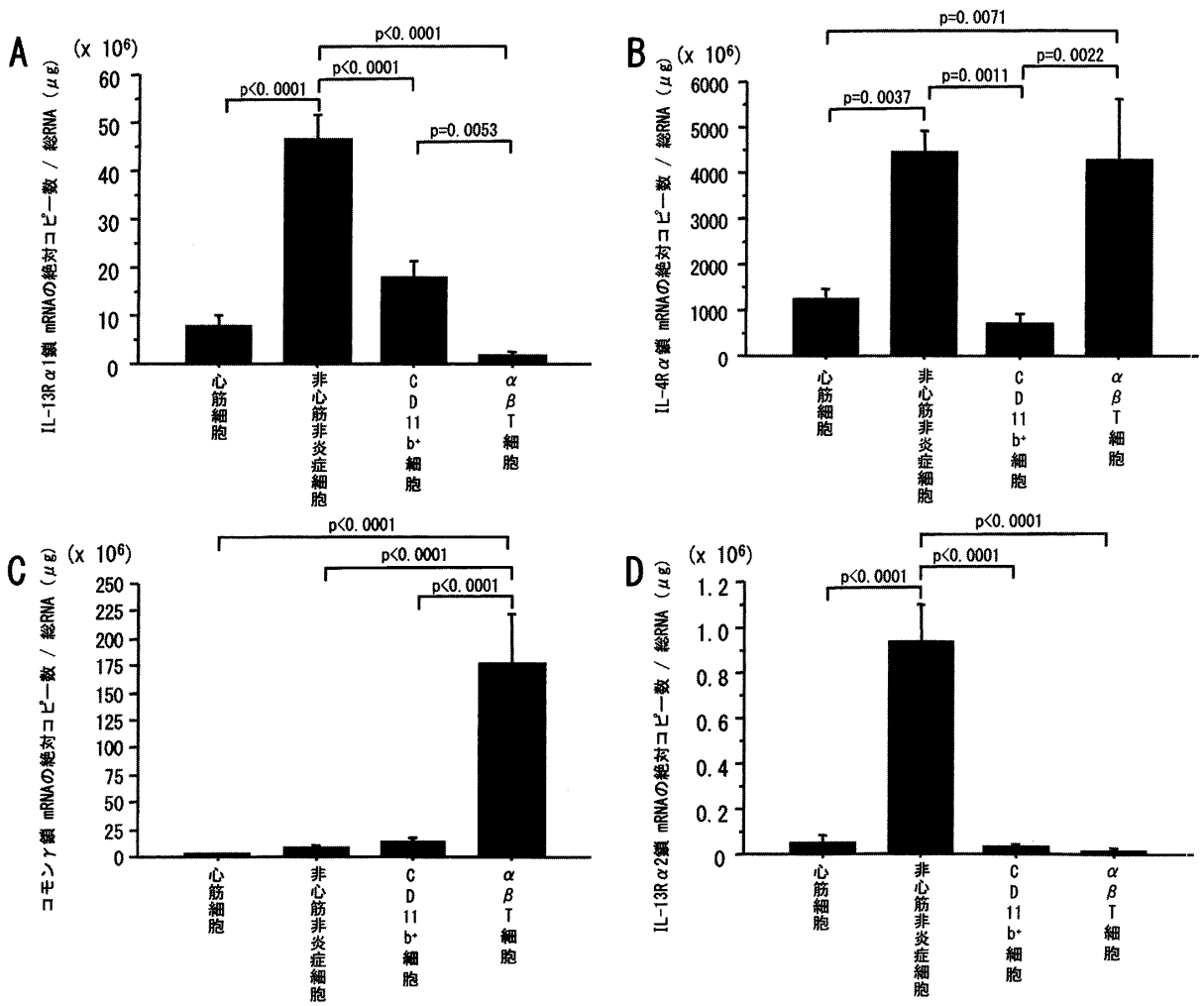


図4

IL-13Rα1鎖（A），IL-4Rα鎖（B），コモンγ鎖（C），およびIL-13Rα2鎖（D）のmRNAの絶対コピー数．各細胞は第18日目のEAMの心臓から分離精製された．非心筋非炎症細胞は主に線維芽細胞，平滑筋細胞，内皮細胞からなる．エラーバーは標準誤差を示す．統計学的評価は，一元配置分散分析後Bonferroniの多重比較検定にて行い，$p < 0.01$ を有意とした．

のラットは，食欲も旺盛で元気もよく，心筋炎も軽度にみられるのみであった．IL-13-Igはある自己免疫疾患に有用な治療薬になる可能性があるのではないかと思われた．

2．IL-13-Igの標的細胞

IL-13の標的細胞は，EAM心臓中のαβT細胞ではなく，NCNI細胞あるいはCD11b$^+$細胞であった．一方，IL-4は，IL-4Rα鎖とコモンγ鎖を発現していることからαβT細胞にも作用すると考えられた．一般に，IL-13は単球やB細胞に働き，直接はT細胞には働かないと考えられている[35]．実際に，今回の治療で浸潤が抑制された炎症細胞はCD11b$^+$細胞であった．IL-13が作用すると考えられるCD11b$^+$細胞はマクロファージ，一方NCNI細胞は線維芽細胞，内皮細胞，平滑筋細胞と考えられた[36)37)]．IL-13が直接作用する標的細胞は，一般にマクロファージ，線維芽細胞，平滑筋細胞，内皮細胞，B細胞などであると言われている[38]．

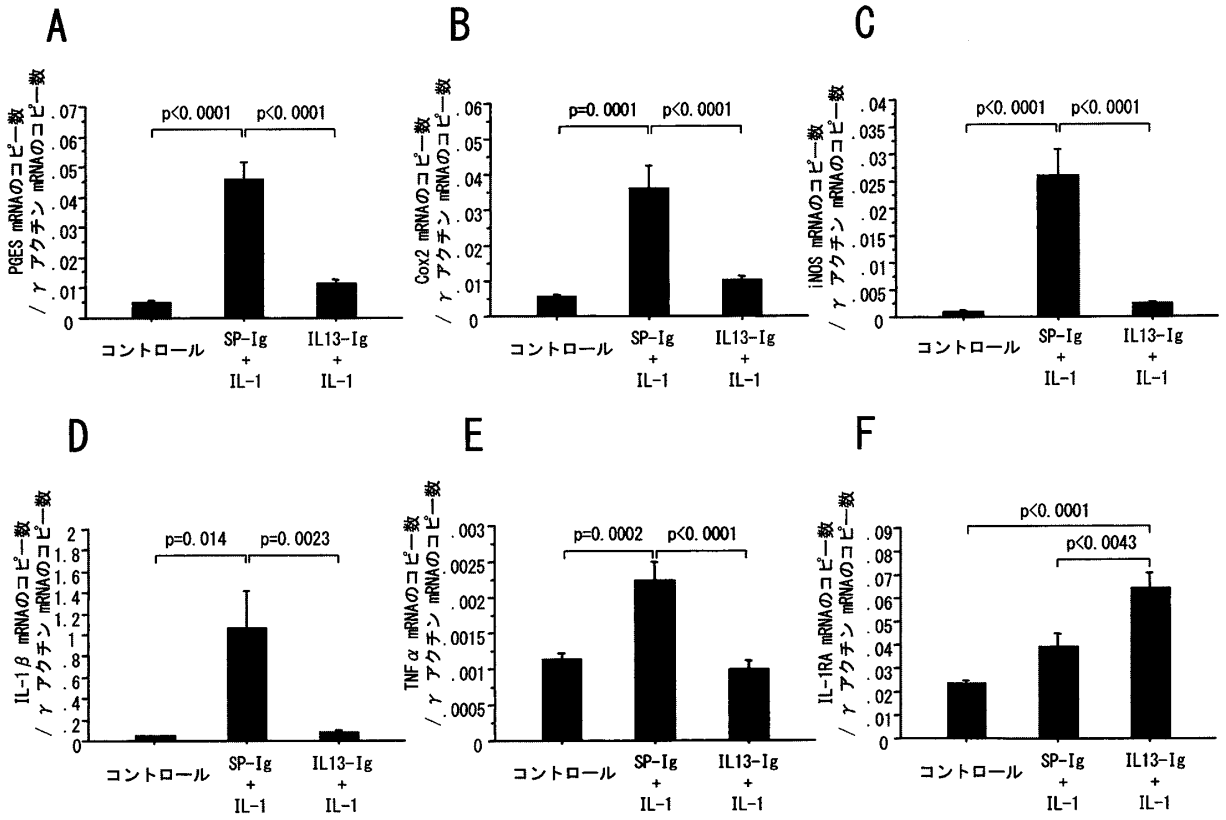


図5

EAM心臓から分離された培養非心筋細胞（n＝6）の免疫関連蛋白mRNAのコピー数/γアクチンmRNAのコピー数．培養非心筋細胞は主に線維芽細胞，平滑筋細胞，内皮細胞，CD11b^{+}細胞を含む．(A)，PGES; (B)，Cox2; (C)，iNOS; (D)，IL-1b; (E)，TNFα; (F)，IL-1RA; コントロール，細胞はIL-1αもラットの血清いずれも含まない培養液で培養した．SP-Ig＋IL-1，細胞はIL-1αおよびpCAGGS-SP-Ig-Glu-標識を注射したラットの血清（Ig-Glu-標識蛋白；最終濃度2nmol/l）を含む培養液で培養した．IL-13-Ig＋IL-1，細胞はIL-1αおよびpCAGGS-IL-13-Ig-Glu-標識を注射したラットの血清（IL-13-Ig-Glu-標識蛋白；最終濃度2nmol/l）を含む培養液で培養した．エラーバーは標準誤差を示す．統計学的評価は，一元配置分散分析後Bonferroniの多重比較検定にて行い，$p < 0.01$を有意とした．

3．EAMにおけるIL-13の標的細胞に対する効果

EAMの心臓に浸潤する単核球の70-80％がマクロファージであり[31]，IL-1，TNFαあるいはiNOSはEAMの発症に重要な役割を果たすと考えられている[4)39)]．また関節リウマチにおいて，線維芽細胞は軟骨の破壊に重要な役割を果たすと考えられている[41]．EAMは関節リウマチに類似しており，EAM心臓中の線維芽細胞も同様に発症に重要であるかもしれない．炎症の起こる前の心臓中の間質細胞の90％以上は線維芽細胞である[42]．それゆえ，炎症反応における重要な役割を十分担う細胞として考えられる．Cox2およびPGESによって産生されるPGE2は関節リウマチの病因にかかわり，炎症と骨破壊をもたらすといわれている[43]．IL-13は，線維芽細胞やマクロファージのIL-1やTNFαのようなサイトカインの刺激によるPGES, Cox2やiNOSの産生を抑制

し，IL-1RAの産生を促進することはよく知られている[18)19)32)38)44)-46)]．IL-1RAの組み換え体であるアナキンラはヒトの関節リウマチを抑制すると報告された[47)]．今回の検討で，IL-13-IgはEAMの心臓から分離した非心筋細胞（主に線維芽細胞，平滑筋細胞，内皮細胞，CD11b$^+$細胞からなる細胞群）のPGES，Cox2，IL-1β，iNOSとTNFαの遺伝子発現を抑制し，一方，IL-1RAの発現を増強した．それゆえ，IL-13-IgはIL-13Rのアゴニストとして作用したと考えられる．in vitroの実験で使われたIL-13-Igの濃度は，EAM第7日目の時の血中濃度よりも低濃度であり，おおよそ心筋炎が発症する時期の第10-11日目に相当する．ハイドロダイナミック法によって遺伝子導入され，発現したIL-13-Igはin vivoでのCD11b＋細胞やNCNI細胞に十分作用すると考えられる．IL-2やIFNγのようなTh1サイトカインは，EAMに重要であるが，今回の我々の検討では，それらの産生細胞である$\alpha\beta$T細胞はIL-13Rα1を発現しておらず，IL-13の直接作用は，Th1サイトカイン産生に関与しないと考えられた．さらに，Th1サイトカインを誘導すると考えられるIL-12の発現に関して，EAMから分離した培養非心筋細胞および脾細胞で検討したが，IL-13-Igによって，若干抑制されるものの有意なものではなかった．それゆえ，今回の検討では，Th1サイカトインに対する影響は指摘できなかった．

4. 疾患に対するハイドロダイナミック法によるプラスミドDNAの遺伝子導入

ハイドロダイナミック法による遺伝子導入は，逆行性に肝静脈から肝細胞に導入される．これは，以前されていたエレクトロポレーションを併用した骨格筋への導入よりも効率が良く，非常に高い血中濃度を得ることができる[9)]．プラスミドベクターによる遺伝子導入は，ウイルスベクターに比べて簡単かつ安全であり，様々な疾患での蛋白製剤の効果解析をするのにとても有効であると考えられる．一方，丸山らは，腎静脈から逆行性に腎へ遺伝子導入ができることを報告している[48)]．それゆえ，逆行性に冠静脈から心臓へ遺伝子導入ができれば[49)]，それはヒトの心筋炎に対しても有効な治療法になる可能性が考えられる．

参考文献

1）Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M Zhang SS, Hanawa H, Itoh E, Tsuda T, Izumi T and Shibata A: Characteristics of giant cells and factors related to the formation of giant cells in myocarditis. Circ Res 69: 1042-1050, 1991.

2）Kodama M, Hanawa H, Saeki M, Hosono H, Inomata T, Suzuki K and Shibata A: Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis. Circ Res 75: 278-284, 1994.

3）Kodama M, Matsumoto Y and Fujiwara M: In vivo lymphocyte-mediated myocardial injuries demonstrated by adoptive transfer of experimental autoimmune myocarditis. Circulation 85: 1918-1926, 1992.

4）Okura Y, Yamamoto T, Goto S, Inomata T, Hirono S, Hanawa H, Feng L, Wilson CB, Kihara I, Izumi T, Shibata A, Aizawa Y, Seki S. and Abo T: Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. J Mol Cell Cardiol 29: 491-502, 1997.

5）Hanawa H, Abe S, Hayashi M, Yoshida T, Yoshida K, Shiono T, Fuse K, Ito M, Tachikawa H, Kashimura T, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama S, Yamamoto T and Aizawa Y: Time course of gene expression in rat experimental autoimmune myocarditis. Clin Sci 103: 623-632, 2002.

6）Yang Z, Chen M, Wu R, Fialkow LB, Bromberg JS, McDuffie M, Naji A and Nadler JL: Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. J Immunol 168: 6479-6485, 2002.

7）Goudy K, Song S, Wasserfall C, Zhang YC, Kapturczak M, Muir A, Powers M, Scott-Jorgensen M, Campbell-Thompson M, Crawford JM, Ellis TM, Flotte TR and Atkinson MA: Adeno-associated virus vector-mediated IL-10

gene delivery prevents type 1 diabetes in NOD mice. Proc Natl Acad Sci USA 98: 13913-13918, 2001.

8) Saidenberg-Kermanac'h N, Bessis N, Deleuze V, Bloquel C, Bureau M, Scherman D and Boissier MC: Efficacy of interleukin-10 gene electro-transfer into skeletal muscle in mice with collagen induced arthritis. J Gene Med 5: 164-171, 2003.

9) Watanabe K, Nakazawa M, Fuse K, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y, Ohnuki T, Gejyo F, Maruyama H and Miyazaki J: Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation. Circulation 104: 1098-1100, 2001.

10) Ritchlin C and Haas-Smith SA: Expression of interleukin 10 mRNA and protein by synovial fibroblastoid cells. J Rheumatol 28: 698-705, 2001.

11) Dolganov G, Bort S, Lovett M, Burr J, Schubert L, Short D, McGurn M, Gibson C and Lewis DB: Coexpression of the interleukin-13 and interleukin-4 genes correlates with their physical linkage in the cytokine gene cluster on human chromosome 5q23-31. Blood 87: 3316-3326, 1996.

12) Mueller TD, Zhang JL, Sebald W and Duschl A: Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. Biochim Biophys Acta 1592: 237-250, 2002.

13) Zurawski SM, Vega F Jr, Huyghe B and Zurawski G: Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. Embo J 12: 2663-2670, 1993.

14) Callard RE, Matthews DJ and Hibbert L: IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? Immunol Today 17: 108-110, 1996.

15) Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B and et al: Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. Nature 362: 248-250, 1993.

16) de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G and de Vries JE: Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. J Immunol 151: 6370-6381, 1993.

17) Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R and de Vries JE: Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 3730-3734, 1993.

18) Jakubzick C, Choi ES, Kunkel SL, Joshi BH, Puri RK and Hogaboam CM: Impact of interleukin-13 responsiveness on the synthetic and proliferative properties of Th1- and Th2-type pulmonary granuloma fibroblasts. Am J Pathol 162: 1475-1486, 2003.

19) Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier JP, Kiansa K, Cloutier JM and Martel-Pelletier J: Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. Arthritis Rheum 42: 710-718, 1999.

20) Woods JM, Amin MA, Katschke KJ Jr, Volin MV, Ruth JH, Connors MA, Woodruff DC, Kurata H, Arai K, Haines GK, 3rd, Kumar P and Koch AE: Interleukin-13 gene therapy reduces inflammation, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. Hum Gene Ther 13: 381-393, 2002.

21) Zhang G, Budker V and Wolff JA: High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. Hum Gene Ther 10: 1735-1737, 1999.

22) Liu F, Song Y and Liu D: Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. Gene Ther 6: 1258-1266, 1999.

23) Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Kameda

S, Iino N, Kazama JJ, Takahashi N, Sugawa M, Hanawa H, Tada N, Miyazaki J. and Gejyo F: High - level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection. J Gene Med 4: 333 - 341, 2002.

24) Higuchi N, Maruyama H, Kuroda T, Kameda S, Iino N, Kawachi H, Nishikawa Y, Hanawa H, Tahara H, Miyazaki J and Gejyo F: Hydro - dynamics - based delivery of the viral inter - leukin - 10 gene suppresses experimental cres - centic glomerulonephritis in Wistar - Kyoto rats. Gene Ther 10: 1297 - 1310, 2003.

25) Jiang J, Yamato E and Miyazaki J: Sustained expression of Fc - fusion cytokine following in vivo electroporation and mouse strain differences in expression levels. J Biochem (Tokyo)133: 423 - 427, 2003.

26) Hanawa H, Watanabe R, Hayashi M, Yoshida T, Abe S, Komura S, Liu H, Elnaggar R, Chang H, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J and Aizawa Y: A novel method to assay proteins in blood plasma after intravenous injection of plasmid DNA. Tohoku J Exp Med 202: 155 - 161, 2004.

27) Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T and Shibata A: A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. Clin Immunol Immunopathol 57: 250 - 262, 1990.

28) Nishino T, Kodaira T, Shin S, Imagawa K, Shima K, Kumahara Y, Yanaihara C and Yanaihara N: Glucagon radioimmunoassay with use of anti - serum to glucagon C - terminal fragment. Clin Chem 27: 1690 - 1697, 1981.

29) Hwang TC, Horie M, Nairn AC and Gadsby DC: Role of GTP - binding proteins in the regulation of mammalian cardiac chloride conductance. J Gen Physiol 99: 465 - 489, 1992.

30) Isenberg G and Klockner U: Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a " KB medium". Pflugers Arch 395: 6 - 18, 1982.

31) Kodama M, Zhang S, Hanawa H and Shibata A: Immunohistochemical characterization of infil - trating mononuclear cells in the rat heart with experimental autoimmune giant cell myocarditis. Clin Exp Immunol 90: 330 - 335, 1992.

32) Bogdan C, Thuring H, Dlaska M, Rollinghoff M and Weiss G: Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by IL - 13: influ - ence of the macrophage population. J Immunol 159: 4506 - 4513, 1997.

33) Cash E, Minty A, Ferrara P, Caput D, Fradelizi D and Rott O: Macrophage - inactivating IL - 13 suppresses experimental autoimmune encepha - lomyelitis in rats. J Immunol 153: 4258 - 4267, 1994.

34) Furlan R, Poliani PL, Marconi PC, Bergami A, Ruffini F, Adorini L, Glorioso JC, Comi G and Martino G: Central nervous system gene therapy with interleukin - 4 inhibits progression of ongo - ing relapsing - remitting autoimmune encepha - lomyelitis in Biozzi AB/H mice. Gene Ther 8: 13 - 19, 2001.

35) Zurawski G and de Vries JE: Interleukin 13, an interleukin 4 - like cytokine that acts on mono - cytes and B cells, but not on T cells. Immunol Today 15: 19 - 26, 1994.

36) Doucet C, Brouty - Boye D, Pottin - Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW and Azzarone B: IL - 4 and IL - 13 specifically increase adhesion mole - cule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. Int Immunol 10: 1421 - 1433, 1998.

37) Kotowicz K, Callard RE, Friedrich K, Matthews DJ and Klein N: Biological activity of IL - 4 and IL - 13 on human endothelial cells: functional evidence that both cytokines act through the same receptor. Int Immunol 8: 1915 - 1925, 1996.

38) Wynn TA: IL - 13 effector functions. Annu Rev Immunol 21: 425 - 456, 2003.

39) Hirono S, Islam MO, Nakazawa M, Yoshida Y, Kodama M, Shibata A, Izumi T and Imai S: Expression of inducible nitric oxide synthase in rat experimental autoimmune myocarditis with special reference to changes in cardiac hemody - namics. Circ Res 80: 11 - 20, 1997.

40) Heim A, Zeuke S, Weiss S, Ruschewski W and

Grumbach IM: Transient induction of cytokine production in human myocardial fibroblasts by coxsackievirus B3. Circ Res 86: 753-759, 2000.

41) Morgan MP, Whelan LC, Sallis JD, McCarthy CJ, Fitzgerald DJ and McCarthy GM: Basic calcium phosphate crystal-induced prostaglandin E2 production in human fibroblasts: role of cyclooxygenase 1, cyclooxygenase 2, and interleukin-1beta. Arthritis Rheum 50: 1642-1649, 2004.

42) Eghbali M, Czaja MJ, Zeydel M, Weiner FR, Zern MA, Seifter S and Blumenfeld OO: Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. J Mol Cell Cardiol 20: 267-276, 1988.

43) Westman M, Korotkova M, af Klint E, Stark A, Audoly LP, Klareskog L, Ulfgren AK and Jakobsson PJ: Expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 in rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheum 50: 1774-1780, 2004.

44) Gabay C, Porter B, Guenette D, Billir B and Arend WP: Interleukin-4 (IL 4) and IL-13 enhance the effect of IL-1beta on production of IL-1 receptor antagonist by human primary hepatocytes and hepatoma HepG2 cells: differential effect on C-reactive protein production. Blood 93: 1299-1307, 1999.

45) Kolios G, Rooney N, Murphy CT, Robertson DA and Westwick J: Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. Gut 43: 56-63, 1998.

46) Saito A, Okazaki H, Sugawara I, Yamamoto K and Takizawa H: Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. Int Arch Allergy Immunol 132: 168-176, 2003.

47) Fleischmann RM: Addressing the safety of anakinra in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 42: ii 29-35, 2003.

48) Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Hirahara H, Iino N, Kameda S, Kawachi H, Yaoita E, Gejyo, F and Miyazaki J: Kidney-targeted naked DNA transfer by retrograde renal vein injection in rats. Hum Gene Ther 13: 455-468, 2002.

49) Hou D, Maclaughlin F, Thiesse M, Panchal VR Bekkers BC, Wilson EA, Rogers PI, Coleman MC and March KL: Widespread regional myocardial transfection by plasmid encoding Del-1 following retrograde coronary venous delivery. Catheter Cardiovasc Interv 58: 207-211, 2003.

(平成17年1月7日受付)