

ラファット エルナガー

氏 名 RAAFAT ELNAGGAR
学 位 博 士 (医学)
学 位 記 番 号 新大院博(医)第34号
学位授与の日付 平成17年 3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名 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

論文審査委員 主査 教授 相 澤 義 房
副査 教授 安 保 徹
副査 教授 木 南 凌

博士論文の要旨

【背景】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、逆に Th2 サイトカインは改善すると考えられている。一方ハイドロダイナミック法によるプラスミドの遺伝子導入は、従来行われてきたエレクトロポレーションによる骨格筋肉内遺伝子導入に比し、非常に高い血中濃度が得られることが報告されている。また、目的の治療に用いる蛋白を、免疫グロブリンの Fc 領域 (Ig) とのキメラ蛋白にすることにより、さらに高い血中濃度を保つことができ、かつ受容体とのアフィニティーを強めると言われている。【目的】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、その作用機序について検討した。【方法】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。また、IL-13 の標的細胞を検索するため、ランゲンドルフ還流装置を用いてコラゲナーゼ処理して EAM 心臓から細胞を分離後、金属ふるいおよび適当な抗体とマグネティックマイクロ細胞分離システムを用いて各細胞群を精製し、定量的 RT-PCR 法にて IL-13 受容体 $\alpha 1$ を発現している細胞を検索した。さらに、IL-13 の作用を検討するために、EAM の心臓から分離した IL-13 標的細胞群に、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、EAM の発症に重要と考えられるいくつかの免疫関連蛋白の遺伝子発現の変化を比較した。【結果】IL-13-Ig の血中濃度は、第 2 日目には、最も高い値 48.7 ± 14.8 nmol/l (平均 \pm 標準誤差) を示し、その後、第 7、12、17 日目にはそれぞれ 7.21 ± 1.91 nmol/l、 0.55 ± 0.13 nmol/l、 0.21 ± 0.03 nmol/l と低下した。第 17 日目の評価では、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、心不全マーカーである心房性利尿ペプチド (ANP) 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。IL-13

の標的細胞である IL-13 受容体 $\alpha 1$ の発現は、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みられ、IL-13R $\alpha 1$ 鎖のヘテロダイマーである IL-4R α 鎖は、すべての細胞分画に発現がみられた。一方、IL-4R α 鎖のもう一つのヘテロダイマーである γ 鎖は $\alpha \beta$ T細胞に多くの発現がみられた。これらの結果は、同様な作用を示すと考えられる Th2 サイトカインである IL-13 と IL-4 であるが、IL-13 は主に非心筋非炎症細胞とマクロファージに作用し、IL-4 は、それらに加え $\alpha \beta$ T細胞にも作用するものと考えられた。そこで、EAM の心臓から分離した IL-13 の標的細胞である非心筋非炎症細胞とマクロファージを含む細胞群に、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たところ、炎症時に重要なプロスタグランジン E2 産生に関わるプロスタグランジン E 合成酵素およびシクロオキシゲナーゼ 2、EAM の心筋細胞傷害に作用する誘導型 NO 合成酵素、炎症性サイトカインである IL-1 β や TNF α は、IL-13-Ig 治療群の血清によってそれらの発現が有意に抑制され、一方、炎症を抑制する役割を演じると考えられる IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1RA) は逆に増加した。【総括】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。

審査結果の要旨

申請者はラットにミオシンを感作して作成する実験自己免疫性心筋炎 (EAM) において、Th2-T 細胞から分泌される IL-13 の遺伝子導入の治療効果について検討した。

EAM モデルは既報の如く作成し、抗原注射後 pCAGGS-IL-13-Ig と対照群として pCAGGS-Ig をそれぞれ急速静注する hydrodynamic based delivery 法により遺伝子導入を図った。導入後 IL-130Ig が持続的に上昇することを確認した。

炎症が極期となる第 17 日にラットを屠殺し IL-13-Ig 群で、心臓/体重比の減少、炎症像の改善および心不全指標である ANP の発現の低下を認めた。心筋炎の心臓から細胞を分離精製した検討では、IL-13 受容体は CD11b+細胞と非心筋非炎症性細胞に発現を認め、これらが IL-13 の標的細胞であることを確認した。心筋炎の細胞培養で IL-13-Ig 群では、PGEsynthase、COX2、iNOS、IL-1 β 、TNF α の発現の抑制と IL-1 受容体抗体の発現亢進を認めた。

以上、IL-13-Ig の遺伝子導入による心不全と炎症所見の改善を認め、IL-13 が IL-13 受容体を介して CD11b+細胞や心筋以外の細胞に作用していることを明らかになった。この点に学位論文としての価値を認める