

氏 名（本籍）	あ 安	だち 達	おさむ 理
学位の種類	博 士（医 学）		
学位記番号	医 博 第 1 8 7 4 号		
学位授与年月日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻		
学位論文題目	Fc融合サイトカインのgene delivery効果とその 応用		

（主 査）

論文審査委員	教授 田 林 暁 一	教授 貫 和 敏 博
	教授 松 原 洋 一	

論文内容要旨

背景

近年、様々なサイトカインや増殖因子が単離され、それらの機能が解析されているが、これらを生体に投与する実験系には以下のような問題点があった。すなわち、これらの蛋白は一般的に血中半減期が非常に短いため、その投与は大量かつ頻回に施行され、その結果、投与直後の急激かつ高度な血中濃度の上昇とその後の急激な低下が繰り返されることになり、必ずしもその蛋白の生理的機能を反映する結果が得られない可能性があった。一方で、ウイルスやプラスミド等を用いた遺伝子導入により、生体内で蛋白を作らせることが可能となっている。その中でも、非ウイルスベクターであるプラスミド DNA の筋肉内投与方法では、導入遺伝子を筋肉内で発現させることにより、持続的に天然の蛋白を全身投与することが可能となり、また、非ウイルス性であるため免疫系への影響も少なく、上記の問題点をクリア出来る方法の一つとして考えられる。しかし、この方法は導入効率が低く、また、発現されたサイトカインが急速に血中から消失し、発現蛋白を生体で機能解析するのに十分な血中濃度が得られないことも多かった。

目的

免疫グロブリン IgG2a の Fc 部分を融合させる免現プラスミドベクターを開発し、これを電気穿孔法を用いて筋肉内へ遺伝子導入し、発現サイトカインの血中安定性を向上させることにより、生体内での血中濃度を上昇させ、発現期間を延長させることを第一目的とし、更に、この発現サイトカインが本来のサイトカインの機能を保持していることを、*in vitro*、*in vivo* で確認することを第二の目的とした。

方法

発現ベクターは pCAGGS を用い、融合させる Fc 部分は、マウス IgG2a 由来で、Fc レセプター結合部位と補体結合部位に遺伝子変異を導入した (pCAGGS-Fcmut)。発現サイトカインは viral IL-10 を用い (pCAGGS-vIL10/Fcmut)、従来の発現ベクター (pCAGGS-vIL10) と以下の点で比較検討した。1. *in vivo* 電気穿孔法による vIL-10 血中濃度の推移。2. *in vitro* (CSIF assay) における、発現蛋白の機能。3. EMCV 心筋炎モデルに導入した時の生存率曲線および心筋内サイトカインの発現変化。

結 果

1. pCAGGS-vIL-10/Fcmut 筋注では、従来の pCAGGS-vIL-10 筋注と比し、ピーク値で約 60 倍 (250 ng/ml) の血中 vIL-10 が得られた。2. CSIF assay で、vIL-10/Fc は vIL-10 と同様に IFN- γ の産生を抑制した。3. 心筋炎モデルにて、pCAGGS-vIL 10/Fcmut 筋注群は pCAGGS-vIL 10 筋注群と同等の生存率の改善効果があった。ウイルス接種にて誘導される心筋内炎症性サイトカイン (IFN- γ , iNOS) も同様に発現が抑制されていた。

考 察

遺伝子変異を入れた免疫グロブリンの Fc 部分をサイトカインに融合させることにより、その機能を変化させることなく、更なる大量の持続的全身性投与が可能となった。この方法は in vivo におけるサイトカインの機能を調べる実験において、非常に有効な方法になると思われる。また、cDNA があれば、その遺伝子産物が安定性の低い蛋白であっても長期間安定して発現させることが可能であり、従来の方法に比し時間やコストもかからず簡便な操作で実験系に導入できることから、未知の遺伝子の機能を in vivo で解析するスクリーニングにおいても有効な方法になると思われる。

審査結果の要旨

(背景) 近年、様々なサイトカインや増殖因子が単離され、それらの機能が解析されているが、これらを生体に投与する実験系には以下のような問題点があった。すなわち、これらの蛋白は一般的に血中半減期が非常に短いため、その投与は大量かつ頻回に施行され、その結果、投与直後の急激かつ高度な血中濃度の上昇とその後の急激な低下が繰り返されることになり、必ずしもその蛋白の生理的機能を反映する結果が得られない可能性があった。一方で、ウイルスやプラスミド等を用いた遺伝子導入により、生体内で蛋白を作らせることが可能となっている。その中でも、非ウイルスベクターであるプラスミド DNA の筋肉内投与法では、導入遺伝子を筋肉内で発現させることにより、持続的に天然の蛋白を全身投与することが可能となり、また、非ウイルス性であるため免疫系への影響も少なく、上記の問題点をクリア出来る方法の一つとして考えられる。しかし、この方法は導入効率が低く、また、発現されたサイトカインが急速に血中から消失し、発現蛋白を生体で機能解析するのに十分な血中濃度が得られないことも多かった。

(目的) 免疫グロブリン IgG2a の Fc 部分を融合させる発現プラスミドベクターを開発し、これを電気穿孔法を用いて筋肉内へ遺伝子導入し、発現サイトカインの血中安定性を向上させることにより、生体内での血中濃度を上昇させ、発現期間を延長させることを第一目的とし、更に、この発現サイトカインが本来のサイトカインの機能を保持していることを、in vitro, in vivo で確認することを第二の目的とした。

(方法) 発現ベクターは pCAGGS を用い、融合させる Fc 部分は、マウス IgG2a 由来で、Fc レセプター結合部位と補体結合部位に遺伝子変異を導入した (pCAGGS-Fcmut)。発現サイトカインは viral IL-10 を用い (pCAGGS-vIL10/Fcmut)、従来の発現ベクター (pCAGGS-vIL10) と以下の点で比較検討した。1. in vivo 電気穿孔法による vIL-10 血中濃度の推移。2. in vitro (CSIF assay) における、発現蛋白の機能。3. EMCV 心筋炎モデルに導入した時の生存率曲線および心筋内サイトカインの発現変化。

(結果) 1. pCAGGS-vIL-10/Fcmut 筋注では、従来の pCAGGS-vIL-10 筋注と比し、ピーク値で約 60 倍 (250 ng/ml) の血中 vIL-10 が得られた。2. CSIF assay で、vIL-10/Fc は vIL-10 と同様に IFN- γ の産生を抑制した。3. 心筋炎モデルにて、pCAGGS-vIL10/Fcmut 筋注群は pCAGGS-vIL10 筋注群と同等の生存率の改善効果があった。ウイルス接種にて誘導される心筋内炎症性サイトカイン (IFN- γ , iNOS) も同様に発現が抑制されていた。

(考察) 遺伝子変異を入れた免疫グロブリンの Fc 部分をサイトカインに融合させることにより、その機能を変化させることなく、更なる大量の持続的全身性投与が可能となった。この方法は in vivo におけるサイトカインの機能を調べる実験において、非常に有効な方法になると思われる。また、cDNA があれば、その遺伝子産物が安定性の低い蛋白であっても長期間安定して発現させることが可能であり、従来の方法に比し時間やコストもかからず簡便な操作で実験系に導入できることから、未知の遺伝子の機能を in vivo で解析するスクリーニングにおいても有効な方法になると思われる。以上の結果は、基礎的研究において応用範囲が広く、臨床的意義も大きいことから学位に十分値すると考えられる。