

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
大塚 薫	主査 教授 北 浦 泰 副査 教授 勝 間 田 敬 弘 副査 教授 吉 田 龍 太 郎 副査 教授 朝 日 通 雄 副査 教授 花 房 俊 昭
主論文題名 Suppression of inflammation in rat autoimmune myocarditis by S100A8/A9 through modulation of the proinflammatory cytokine network (S100A8/A9 は、炎症促進性サイトカインネットワークを修飾することによりラット自己免疫性心筋炎における炎症を抑制する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《背景および研究目的》</p> <p>S100A8/A9 は、S100A8(10.6 kDa)および S100A9(13.5 kDa)の 2 つのサブユニットからなる S100 ファミリー蛋白である。これまで S100A8/A9 は、ヒトにおいて活性化したマクロファージや好中球に発現し炎症を促進するとされているが、その機能は十分には明らかにされていない。最近、Ikemotoらはラットの lipopolysaccharide を用いた肝障害モデルにおいて、本蛋白が炎症に抑制的に作用していることを発見した。また、この研究において本蛋白が炎症促進性サイトカインと複合体を形成することが <i>in vitro</i> で証明され、これが炎症を抑制する機序である可能性が推測された。</p> <p>そこで、急性期の炎症においてマクロファージが重要な役割を担うとされているラットの実験的自己免疫性心筋炎モデル(EAM)を用いて、リコンビナント(R-)S100A8/A9 の投与効果を検討した。</p> <p>《方 法》</p> <p>8 週齢の雄 Lewis ラットにブタ心筋ミオシンを 1 週間間隔で 2 回皮下注射(第 0 日、第 7 日)し EAM を作成、投与群(S 群、n=20)に R-S100A8/A9(1 mg/日)を第 8 日より第 13 日まで連日腹腔内投与した。対照(非投与)群(C 群、n=20)には生理的食塩水を同様に投与した。第 14 日(S₁₄ 群、C₁₄ 群ともに n=10)および第 21 日(S₂₁ 群、C₂₁ 群ともに n=10)にペントバルビタールによる浅麻酔下で、1) 心エコー検査により左室駆出率および心膜液貯留の有無を評価後、2) 体重を計測、心臓を摘出して心重量を計測し心体重比を求めた。3) 心臓を 10%ホルマリンにて固定、両心室横断面標本(HE 染色)において心筋炎病巣の占める割合を求めた。4) 内因性 S100A8/A9 蛋白の存在と局在を確認するため抗 S100A8/A9 抗体と抗 CD68 抗体を用いて心筋組織の二重蛍光免疫染色を行なった。また、リアルタイム RT-PCR により心筋における炎症促進性サイトカイン(IL-1β、IL-6、TNF-α) の mRNA 発現を検索し、ELISA 法により血清中の炎症性サイトカイン濃度を測定した。5) 抗 nuclear factor kappa-B (NF-κB) p65 抗体を用いて免疫組織学検索を行った。また、6) 心筋ホモジネートの遠心分離上清について、1 次抗体に抗 S100A8/A9 抗体、2 次抗体に抗炎症性サイトカイン抗体を使用した。さらに、ELISA 法により R-S100A8/A9 と炎症性サイトカイン結合複合体の濃度を測定した。</p>	

《結果》

- 1) 心エコー検査による左室駆出率は S₁₄ 群 81±2% に対し C₁₄ 群 70±3%(*p*=0.017)、S₂₁ 群 78±2% に対し C₂₁ 群 67±4%(*p*=0.049)といずれも投与群で高かった。また、心膜液貯留は両群ともに認めなかった。
- 2) 心重量/体重比は S₁₄ 群 0.41±0.02%、C₁₄ 群 0.55±0.03%(*p*=0.002)、S₂₁ 群 0.39±0.02%、C₁₄ 群 0.48±0.02%(*p*=0.009)と投与群で小さかった。
- 3) 心筋組織標本で心筋炎病巣が占める割合は、S₁₄ 群で 15.4±4.2% であるのに対し C₁₄ 群は 37.2±7.3%(*p*=0.036)、また S₂₁ 群 16.0±3.8%、C₂₁ 群 44.3±4.4% (*p*<0.001)と第 14、21 日ともに投与群で病巣の占める割合が小さかった。
- 4) EAM 心筋において抗 CD68 抗体陽性のマクロファージの高度浸潤を認め、S100A8/A9 を発現している単核球はすべてマクロファージであった。また、心筋における炎症促進性サイトカイン mRNA 発現は S₁₄ 群で IL-1 β (*p*<0.05)、IL-6 (*p*<0.01)および TNF- α (*p*<0.01)がいずれも C₁₄ 群に比較して抑制されていた。炎症性サイトカインの血清濃度も S₁₄ 群において IL-1 β (*p*<0.01)、IL-6 (*p*<0.05)が C₁₄ 群に比べ低値であり、S₂₁ 群においても IL-1 β (*p*<0.01)が C₂₁ 群に比べ低値であった。
- 5) 心筋組織における NF-κB の発現は S₁₄ 群で C₁₄ 群に比較して抑制がみられた。
- 6) 心筋ホモジネート上清に R-S100A8/A9 と IL-1 β、IL-6、TNF- α の各サイトカインとの結合複合体を認めた。

《考察》

R-S100A8/A9 投与により心筋炎急性期に病巣の縮小が認められ、R-S100A8/A9 投与は EAM ラットにおける急性心筋炎を抑制することが明らかになった。心筋において、炎症促進性サイトカインである IL-1 β、IL-6、TNF- α の mRNA の発現が非投与群に比較し投与群で抑制され、また、血清 IL-1 β、IL-6 濃度も低値であった。さらに、心筋における NF-κB の発現も抑制されていた。In vivo において心筋で S100A8/A9 と炎症促進性サイトカインとの結合複合体が認められた。従って、EAM ラット心筋炎に対する R-S100A8/A9 投与は、炎症促進性サイトカイン mRNA 発現抑制および血清濃度低下、また、本蛋白が炎症促進性サイトカインと結合し、トラップすることにより炎症促進性サイトカインネットワークを修飾することにより炎症を抑制したと考えられる。

《結論》

S100A8/A9 投与によりラット EAM が抑制された。その機序として、本蛋白が炎症促進性サイトカインと結合し複合体を形成することにより炎症促進性サイトカインネットワークを修飾していることが示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	大塚 薫
論文審査担当者		主 査 教 授	北 浦 泰
		副 査 教 授	勝 間 田 敬 弘
		副 査 教 授	吉 田 龍 太 郎
		副 査 教 授	朝 日 通 雄
		副 査 教 授	花 房 俊 昭
<p>主論文題名</p> <p>Suppression of inflammation in rat autoimmune myocarditis by S100A8/A9 through modulation of the proinflammatory cytokine network (S100A8/A9 は、炎症促進性サイトカインネットワークを修飾することによりラット自己免疫性心筋炎における炎症を抑制する)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者は、実験的自己免疫性心筋炎(EAM)ラットにリコンビナント(R-)S100A8/A9を1mg/日を6日間投与し、S100A8/A9の急性心筋炎に対する効果を検討した。R-S100A8/A9の投与により急性心筋炎が組織学的に抑制され、心筋において炎症促進性サイトカインであるIL-1β、IL-6、TNF-αのmRNAの発現、血清IL-1β、IL-6濃度やNF-κBの発現が抑制されることを認め、S100A8/A9投与による炎症抑制作用を明らかにした。さらに申請者は、炎症抑制機序として、<i>in vivo</i>でS100A8/A9と炎症促進性サイトカインとの結合複合体が証明されることより、本蛋白が炎症促進性サイトカインをトラップし炎症促進性サイトカインネットワークを修飾する可能性を指摘した。</p> <p>従来、S100A8/A9は炎症促進作用を示すとされ、炎症抑制作用についての報告は殆どない。本研究はEAMに対するS100A8/A9の投与の効果と炎症抑制作用の機序を初めて提唱したものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第11条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌)</p> <p>European journal of heart failure 11(3): 229-237, 2009</p>			