

主論文の要旨

Wnt11 gene therapy with adeno-associated virus 9 improves the survival of mice with myocarditis induced by coxsackievirus B3 through the suppression of the inflammatory reaction

アデノ随伴ウイルス9を用いたWnt11遺伝子治療は炎症反応の抑制を介してコクサッキーウイルスB3性心筋炎に罹患したマウスの生存率を改善させる

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

青山 豊

【背景】

ウイルス性心筋炎は無症候な経過から心原性ショックや致死的な経過を辿る場合まで様々な臨床経過を呈する疾患である。現在までに特別な治療方法が確立されていないため、昇圧剤や機械的なサポートでの支持療法が第一選択となっているのが現状である。

Wnt シグナル伝達経路の構成要素は、成人において造血器腫瘍ならびに 2 型糖尿病のような炎症と関わりを持つ疾患と関連することが報告されている。特に、Wnt11 は非古典的な Wnt シグナル伝達経路を介して心臓や腎臓の発生過程の調節に関わっていることが知られており、また小腸上皮細胞において炎症を抑制したという報告もあることより、炎症を伴う心疾患において、Wnt シグナル伝達を変化させるような治療が有効となる可能性があると考えられる。

今回、代表的な炎症性心筋疾患であるウイルス性心筋炎における Wnt11 遺伝子治療の効果を検討した。

【方法と結果】

マウスにおける組み換えアデノ随伴ウイルス 9(rAAV9)ベクターによる心筋特異的な遺伝子発現(Fig. 1)

6 週のおスの BALB/c マウスに 3×10^{11} GC(genome copy) の LacZ を組み込んだアデノ関連ウイルス 9(rAAV9-LacZ) を尾静脈より静脈投与し、4 週間 LacZ の発現を X-gal 染色にてモニターしたところ、2 週間以内に心筋の大部分に LacZ の発現が認められ(Fig. 1A)、また、心臓における LacZ の発現は、肝、骨格筋、腎における発現よりもはるかに強く認められた(Fig. 1B)。また、Wnt11 を組み込んだ rAAV9-Wnt11 を尾静脈より静脈投与した BALB/c においては、2 週間後に心筋組織において Wnt11 の強い遺伝子発現が確認された(Fig. 1C)。

コクサッキーウイルス B3(CVB3)性心筋炎マウスモデルにおける Wnt11 遺伝子治療による生存率の改善及び左室収縮能維持への効果(Fig2)

コクサッキーウイルスを投与する 2 週間前に 3.0×10^{11} GC の rAAV9-LacZ もしくは rAAV9-Wnt11 の静脈投与を行った。rAAV9 投与 2 週間後に 1×10^6 PFU の CVB3 を腹腔内投与し、ウイルス性心筋炎を誘発した。rAAV9-LacZ を投与した群では CVB3 投与後 2 週間以内に 40%以上のマウスが死亡したのに対し、rAAV9-Wnt11 を投与した群では CVB3 投与後 2 週間で 87.5%の生存率を示した(Fig. 2A)。また、CVB3 投与後 4 日目、7 日目、10 日目及び 14 日目に全身状態を反映する指標として体重を測定したところ、rAAV9-LacZ を投与した群では経過とともに体重が減少したのに対し、rAAV9-Wnt11 を投与した群では良好な全身状態を反映し順調に体重が増加した(Fig. 2B)。また、心エコーでは rAAV9-LacZ を投与した群に比べ rAAV9-Wnt11 を投与した群では左室収縮末期径(LVEDs)がより小さく、左室駆出率(LVEF)や左室内径短縮率(FS)はより高く維持されていた(Fig. 2C, 2D)

CVB3 性心筋炎マウスモデルにおける Wnt11 遺伝子治療による心筋の炎症および壊死

の抑制効果(Fig3)

rAAV9-LacZ を投与した群では CVB3 投与後 10 日目及び 14 日目において、心筋の変性や壊死を伴う中等度から高度の炎症が観察されたが、rAAV9-Wnt11 を投与した群においては炎症細胞の浸潤および心筋の変性や壊死はほとんど見られず(Fig3A), 病理学的なスコアにおいても有意な差を認めた(Fig3B)。

CVB3 性心筋炎マウスモデルにおける Wnt11 遺伝子治療による心筋への炎症細胞の浸潤の抑制効果(Fig4, 5)

rAAV9-LacZ を投与した群では、CVB3 投与後 14 日目まで炎症性マーカーである CD45 陽性細胞の浸潤が遷延していることが観察されたのに対し、rAAV9-Wnt11 を投与した群においては CVB3 投与後 7 日目以降では心筋への炎症細胞の浸潤はほとんど観察されなかった(Fig4A)。心筋における CD45 の mRNA の発現レベルも同様の傾向を示しており、この現象を支持していた(Fig4B)。

CD68 陽性マクロファージ、CD3 陽性 T 細胞および Ly6G 陽性好中球それぞれの浸潤も rAAV9-Wnt11 を投与した群において、劇的に抑制されていることが観察され、Wnt11 の発現によって炎症細胞全般の浸潤が抑制されていた(Fig5)。

CVB3 性心筋炎マウスモデルにおける Wnt11 遺伝子治療による炎症性因子の発現の抑制効果(Fig6)

rAAV9-LacZ を投与した群に比べ、rAAV9-Wnt11 を投与した群では、CVB3 投与後に炎症性サイトカインである IL-1 β , IL-6 及び INF- γ の mRNA の発現が有意に低下していた。また、CVB3 性心筋炎において重大な役割を果たしているケモカインである IP-10 も rAAV9-Wnt11 を投与した群において有意に抑制されていた(Fig6)。

【考察】

組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)は、長期的な遺伝子発現が得られることと有害な免疫反応が少ないことが評価され、ヒトの臨床試験におけるベクターとして使用されることが多くなってきている。rAAV9 は心筋に対する親和性が高いことが知られており、本試験でも rAAV9 を介した遺伝子導入は効率的であり、心筋特異的かつ持続的であることが確認された。

Wnt シグナル伝達経路は、T 細胞及び B 細胞の発生に不可欠であるだけでなく、末梢での免疫細胞の活性化にも重要な役割を果たしている可能性がある。Wnt シグナル伝達経路の活性化因子と抑制因子はどちらも、炎症を伴う病的状態の治療に使用できる可能性があるため、本試験では CVB3 性心筋炎に罹患したマウスにおける rAAV9 を用いた Wnt11 遺伝子治療の有効性の検討を行った。

Wnt11 遺伝子治療によって、CVB3 性心筋炎に罹患したマウスの生存率は有意に改善したとともに、心機能の改善及び心筋の変性や壊死の抑制がみられた。また、マクロファージ、T 細胞および好中球を含む炎症細胞の浸潤も抑制され、さらに IL-1 β , IL-6 および INF- γ といった炎症性サイトカインも有意に抑制されていた。また、CVB3 性心筋炎において重要な役割を果たしている Th-1 が媒介するケモカインである IP-10 も劇的

に抑制されており,ケモカインによる炎症やそれに続く心筋障害も軽減されたと考えられた。

【結論】

CVB3 性心筋炎に罹患したマウスにおいて,rAAV9 を介した Wnt11 遺伝子治療は炎症細胞の浸潤や炎症性サイトカインの抑制を通して心機能や生存率を改善させる。