

主論文の要旨

Wnt11 Gene Therapy with Adeno-associated Virus 9 Improves Recovery from Myocardial Infarction by Modulating the Inflammatory Response

〔 アデノ随伴ウイルス9を用いたWnt11遺伝子治療は
心筋梗塞からの回復を炎症反応の修飾によって改善する 〕

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)

森下 佳洋

【緒言】

心筋梗塞によって起こる炎症反応は傷害組織の恒常性を回復し、心機能の回復を促すために重要である。一方で、持続する炎症反応によって心破裂や心不全が引き起こされる可能性もある。炎症反応は心筋梗塞後の転帰を決定する一つの鍵であり、有力な治療介入の対象と考えられている。

Wnt 蛋白は胎生期の細胞増殖、細胞極性などを制御する分子としてよく知られている。Wnt 蛋白が炎症反応に関与するとの報告は多数あり、心筋梗塞後の患者にとって Wnt シグナル系に介入する治療は有益であると考えられる。

今回、心筋梗塞後における Wnt11 発現上昇の炎症反応修飾効果および生存率、心機能の改善効果の有無を検討した。我々は組換えアデノ随伴ウイルスベクターの一種である rAAV9 に Wnt11 または LacZ の遺伝子を導入し、実験に用いた。

【方法、結果】

rAAV9 は持続的かつ心臓特異的な遺伝子発現をもたらす

rAAV9-LacZ を C57BL/6J マウスの尾静脈から投与したところ、心組織における LacZ mRNA の発現上昇が定量的 RT-PCR で確認された。この心組織の凍結切片に X-gal 染色を行い、LacZ が心筋細胞のみに発現すること、投与後 2 週で十分に発現することを確認した。Western blot 法による検討で rAAV9-Wnt11 投与後 2 週において、心組織で高い Wnt11 蛋白発現を認めた。

rAAV9-Wnt11 投与により心筋梗塞後の生存率と心機能が改善する

骨髄移植により、骨髄細胞を GFP 陽性のものに置き換えた C57BL/6J マウスを作成した。このマウスに rAAV9-Wnt11 または rAAV9-LacZ を尾静脈より投与し、1 週後に左冠動脈前下行枝近位部の結紮により心筋梗塞を作成し比較した。心筋梗塞作成後 8 週時点において、rAAV9-LacZ 投与群（以下 LacZ 群）のマウスは 40%が死亡したのに対し、rAAV9-Wnt11 投与群（以下 Wnt11 群）のマウスはすべて生存した(Figure 1A)。心臓超音波画像による検討で梗塞後 8 週にわたり左室駆出率、1 回拍出量は、Wnt11 群が LacZ 群を有意に上回っていた(Figure 1B, C)。

rAAV9-Wnt11 投与により非梗塞領域の線維化が抑制される

シリウスレッド染色により心筋線維化領域の広がりを検討した。梗塞後 8 週において有意ではないものの Wnt11 群で線維化領域が小さかった(Figure 1D)。非梗塞領域の線維化および血管周囲の線維化の領域は Wnt11 群で有意に小さかった(Figure 1E, F)。

rAAV9-Wnt11 投与により梗塞領域への骨髄由来細胞と炎症細胞の動員が大きく抑制される

免疫組織染色による検討で、Wnt11 群では GFP 陽性細胞の動員が有意に少なかった(Figure 2A-C)。また、梗塞後 1 週の非梗塞領域の心組織において CD45、CD68、

Ly6G、CD3 いずれの陽性細胞の浸潤も Wnt11 群で少なかった(Figure 3A-C)。一方、組織学的検討により Wnt11 は骨髄由来細胞の心筋への分化を誘導せず、心筋細胞のアポトーシス、肥大および血管新生に影響を与えないことが示された。

rAAV9-Wnt11 投与により心筋梗塞後の炎症性サイトカイン発現が抑制される

定量的 RT-PCR により $\text{TNF}\alpha$ および $\text{IL-1}\beta$ の mRNA 発現を検討した結果、いずれの発現も Wnt11 群で低かった(Figure 4)。遺伝子アレイ解析による検討では、IP-10、CXCL10、CCL8 発現が特に大きく抑制されていた。

rAAV9-Wnt11 投与は、全身放射線照射による骨髄抑制と類似した効果を示す

梗塞心における骨髄抑制の効果を検討した。全身放射線照射（以下 TBI）により末梢血中の白血球数が数日以内に減少するが、TBI を 2 回行うことで長期間の白血球数抑制が得られた(Figure 5A)。そこで rAAV9-LacZ 投与後 1 週のマウスに心筋梗塞を作成し、3 Gy の TBI を 2 回（心筋梗塞作成直後および 10 日後）受けるものと TBI を受けないものに分けて比較した。TBI を受けた群は梗塞後 8 週の時点で全て生存していた(Figure 5B)。組織学的検討では、TBI を受けた群で梗塞心への CD45 陽性細胞の浸潤が抑制されていた(Figure 5C)。

Wnt11 蛋白は in vitro で炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制する

Wnt11 の形質移入を受けた HEK293 細胞の培養により、ヘパリン添加メディウムから Wnt11 蛋白が検出された(Figure 6A)。

LPS 刺激によりマウスマクロファージの細胞株である Raw 264.7 細胞における $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 、 $\text{TNF}\alpha$ の遺伝子発現は大きく上昇するが、Wnt11 を含むメディウムはこれを抑制することが定量的 RT-PCR により確認された(Figure 6B)。

Wnt11 は $\text{NF-}\kappa\text{B}$ を介して炎症反応を修飾する

Reporter gene assay による検討で、LPS は $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の転写レベルを 5 倍に上昇させたが、この反応は Wnt11 を含むメディウムにより抑制された(Figure 6C)。

【考察】

Wnt11 は心臓の発生に重要な役割を果たす分子であるが、炎症反応を修飾するとの報告も見られ、Wnt11 の制御が炎症に関連する病態に対する新しい治療になりうると考えられる。今回 Wnt11 発現上昇により心筋梗塞後の生存率が改善した。また、心筋梗塞後の心機能が有意に改善するとともに、梗塞心における炎症細胞浸潤や線維化が抑制された。

Wnt11 群では炎症反応の様々な要素が持続的に抑制されていた。梗塞後 1 週の時点で炎症細胞浸潤が抑制され、骨髄由来細胞の動員や炎症性因子の発現の抑制は持続的であった。これらにより心筋線維化が抑制され、死亡率が減少したと考えられる。さ

らに TBI による骨髄抑制でも心筋梗塞後の生存率が有意に改善するとともに、梗塞心への CD45 陽性細胞の浸潤が減少するという Wnt11 発現上昇と同様の効果を認めた。これらの結果より、心筋組織内に放出された Wnt11 蛋白は、骨髄から動員された炎症細胞を修飾することで治療効果をもたらすと考ええる。

マクロファージは梗塞心における壊死細胞の貪食や炎症反応の制御において重要な役割を果たす。Wnt11 は Raw 細胞における炎症性サイトカインの遺伝子発現を NF- κ B の制御を介して抑制した。これは Wnt11 蛋白が心臓に動員されたマクロファージにより産生される炎症性サイトカインを制御することを示唆している。

野生型 AAV は腫瘍形成性や病原性がなく、安全なベクターであると考えられている。今回、rAAV9 を用いた遺伝子導入は効率が良く、発現が心臓特異的で長時間持続することが確認できたことから、rAAV9 のシステムは心臓に遺伝子を導入する方法として有望であると考えられた。

【結語】

rAAV9 を用いた Wnt11 発現上昇は、炎症細胞の浸潤抑制と炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制を通じ、心筋梗塞後の心機能を高め、心筋線維化を抑制し、生存率を大きく改善させた。