

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790698

研究課題名（和文）Wnt11による心保護メカニズムの解明と治療応用技術の開発

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of cardioprotective effect by wnt11 and development of therapeutic application

研究代表者

小林 光一（KOBAYASHI KOICHI）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20567010

研究成果の概要（和文）：アデノ関連ウイルスを利用した wnt11 治療によりウイルス性心筋炎マウスの生存を約 3 割改善することが可能であった。またその機序の解明のためマクロファージ系の培養細胞を使い wnt11 を作用させたところ活性化されたマクロファージからの炎症誘導物質の産生が有意に抑制されることが確認された。副作用が少なく、持続的な発現誘導が可能なアデノ関連ウイルスを利用することで wnt11 が心筋炎に対して治療効果を示すことが確認された。

研究成果の概要（英文）：Wnt11 therapy using adeno-associated virus improved survival of mice with myocarditis by about 30%. We tried to clarify the mechanism to improve survival. We found wnt11 significantly suppressed the production of inflammatory cytokines from activated Raw cells which are cell line of macrophage. We showed wnt11 has therapeutic effect on virus-induced myocarditis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：虚血性・炎症性心疾患

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：wnt11、アデノ関連ウイルス-9（AAV9）、心筋炎、炎症抑制

1. 研究開始当初の背景

Wnt11 は発生学の研究により腎臓、心臓の形成に重要な働きを持っていることが報告されてきた。しかし成体における wnt11 の働きや疾患における作用については報告はこれまでなかった。当初我々は心臓に wnt11 を作用させることにより心筋保護や稀ではあると思われる心臓内の未分化な細胞の心筋細胞への分化誘導を促進できないかマウスを

利用して検討を進めた。同実験においては明らかでない未分化細胞の心筋細胞への分化誘導を確認することはできなかったが、興味深いことにコントロールのマウスの半数近くが 2 カ月の経過中に死亡したのに対し wnt11 を作用させた場合すべてのマウスが 2 カ月間生存していた。詳細な検討の結果 wnt11 が心筋梗塞に伴う炎症を強力に抑制することでその生存率を改善することが確認された。炎症

抑制をしている根拠としては梗塞心への炎症性細胞動員の抑制、RNA レベルの炎症性サイトカインの産生抑制が明らかであった。特に心筋梗塞後の炎症で重要な役割を果たすと考えられている TNF- α が著明に抑制されていた。

2. 研究の目的

(1) wnt11 が過剰な炎症反応を抑制することにより心筋梗塞マウスの生存を改善することが確認されたことから、炎症が主体となっている心疾患での wnt11 による治療効果に興味をもたれた。多くの疾患において炎症反応が関与することが明らかとなっているが、炎症の代表的な心疾患である心筋炎での wnt11 の治療効果をまず検討することを計画した。心筋炎ではウイルスによる直接的な細胞障害と損傷を受けた心筋細胞に対する二次的な自己免疫の反応が病態に深く関与していることが分かっている。いずれのメカニズムも炎症がその病態の基本的反応であり、炎症を抑制することにより有益な結果を期待することができる。ステロイドのように炎症を抑制するがウイルスに対する免疫力を抑制してしまう治療が現実的には応用することができない。そこで我々が確認した wnt を介した炎症の抑制が新たな治療法になることを仮説としてたて検証することとなった。治療の最終目的はその生存率の改善である。そして改善がみられた場合は組織破壊や炎症の状態がどのように変化するかを組織や遺伝子発現を調べることで評価する。

(2) wnt11 の炎症抑制に中心的に関与する細胞を特定し、その反応やメカニズムを解明する。以前の心筋梗塞の実験においてもマウスモデルでは明らかに炎症を抑制していることが確認されているが、いずれの細胞がその治療効果に重要な働きをしているのかは解明されていなかった。in vitro の実験として wnt11 が効果を示す細胞をまず特定することが必要と考えられた。炎症性細胞、血管内皮細胞、心筋系細胞、線維芽細胞などそれぞれの株化細胞を利用してその効果を観察する。

3. 研究の方法

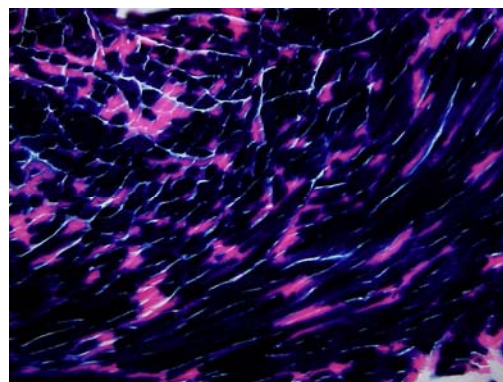
(1) コクサッキーウイルスをマウスの腹腔内投与することでウイルス性心筋炎を誘導する。Vero 細胞を利用して実験に必要なコクサッキーウイルスを準備する。またその Titer を細胞障害効果を利用して測定する。続いてマウス心筋炎モデルとして適切な投与ウイルスの量の設定を行う。半数程度のマウスが生存できる投与方法の設定が必要と思われる。また wnt11 の効果を評価するために、予めコントロールもしくは wnt11 を発現

するアデノ関連ウイルス 9 (AAV9) を静脈内投与しておく。これにより wnt11 は心筋炎が引き起こされている間持続的かつ強く心臓で発現することになり wnt11 の心臓での治療効果を調べることができる。アデノ関連ウイルスはその細胞内で形成可能な特異的な細胞を利用し大量に作成した。また動物投与が可能な精製・濃縮過程を超遠心機を利用して行う。

(2) in vitro の実験においては、活性の高い wnt11 蛋白を直接利用することは難しいため、wnt11 を産生する安定細胞株を樹立し、その細胞培養液に含まれる wnt11 を利用する。この安定細胞株から得られた培養液をそれぞれの株化細胞に応用し、細胞に炎症を誘導した時の反応をコントロールの培養液と wnt11 が産生されている培養液とで比較検討する。炎症性サイトカインの誘導の抑制を仮説としてもっていたため、RNA レベルでのサイトカイン産生抑制効果の有無を定量的 PCR を使って検討する。さらに炎症の抑制が確かめられた場合その機序の解明のため NF- κ B などの転写活性の変化を評価する。

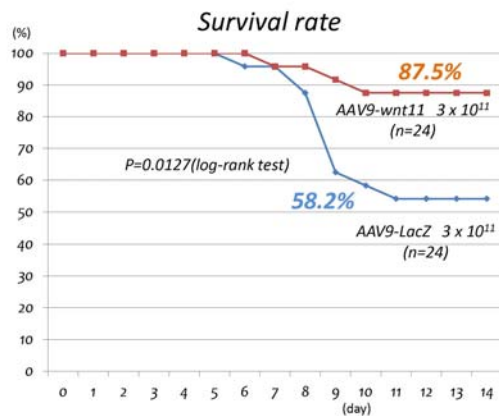
4. 研究成果

(1) マウス実験に十分な濃度と量・精製度のアデノ関連ウイルスをコントロール、wnt11 についてそれぞれ作成することができた。またコクサッキー B3 をマウスの腹腔内投与することで心臓において組織学的にも明らかな炎症を誘導し、適当な心筋炎モデルを作成することができた。BALBc マウスを利用することで約 50%のマウスが生存しうる心筋炎モデルの確立ができた。また投与量を変化させたが、生存率に関しては大きな差を認めず、投与後急激にマウス成体内もしくは心臓組織内で増殖していることが予測された。治療目的で投与する AAV9 ウイルスの心臓組織内での発現を確認するため AAV9-LacZ ウイルスを静脈内投与し 1 週間から 2 カ月後までの組織の X-gal 染色をおこなった。写真にあるように 1 カ月後の組織では 80%を超える心筋細



胞での遺伝子発現が確認された。予め治療目的でアデノ関連ウイルス 9 (AAV9)

を静脈内投与し、wnt11 のウイルス性心筋炎に対する効果を検討した。コントロール群においては約60%のマウスのみが2週間生存したが、wnt11 治療により約90%のマウスが生存可能であった。これまでの我々の以前の結果では、wnt11 が心筋梗塞によって誘導される炎症反応を抑制することでマウスの生存率を著明に改善することが分かっていたが、ウイルス性の心筋炎においても劇的に生存率を改善する効果があることが確認された。



次のステップとして心筋炎を起こしている組織に侵潤している炎症性細胞の量的評価や心臓組織内で誘導されている炎症性サイトカインのRNAの定量評価が予定されている。

(2)

HEK293 細胞へのプラスミド遺伝子の導入により wnt11 蛋白を恒常的に産生する安定株を確立する。同時にコントロールの細胞株も樹立。これらの細胞を培養し、その培養液を各種の株化細胞に作用させることで wnt11 の効果を検討した。LPS の負荷により各細胞において炎症反応が誘導され、様々な炎症性サイトカインの発現誘導が引き起こされる。

まずマクロファージ系株化細胞である Raw 細胞に予め wnt11 を含む培養液を作用させておいた。その2時間後のLPSによる炎症誘導を行うとコントロールの培養液を作用させた場合と比較し、炎症性サイトカインの産生が有意に抑制されていた。炎症性サイトカインとしては代表的な IL-1、IL-6、TNF- α などが約60%抑制されていた。

続いて、Raw 細胞の LPS による炎症性サイトカイン産生が、wnt11 存在下でどれほど広範に抑制されているかを PCR Array にて広範な因子に関して評価した。その中で LPS により発現が明らかに誘導される因子に対する wnt11 の効果に注目した。

Wnt11 存在下に2倍以上の上昇を示した因子は全く存在しなかった。一方、50%以下に抑制された因子は10因子存在した。内訳は、Bcl6、C3、Ccl2、Ccl5、Cxcl11、IL10ra、IL15、

IL18、Ltb、TNF であった。このように多くの炎症性サイトカインの産生抑制が確認されたことから転写因子の、特に炎症で重要な役割を果たしている NF- κ B の転写活性への wnt11 の効果を確認することになる。

Raw 細胞にあらかじめ NF- κ B 活性の Luciferase による reporter プラスミドと細胞数の Reference として Renilla luciferase プラスミドを同時に導入する。続いて96 ウェルプレートに移し、細胞が安定した後にコントロールもしくは wnt11 の安定細胞株から回収した培地を投与する。2時間安定細胞株培地に作用させた状態で LPS を加え NF- κ B の転写を誘導する。8時間後の NF- κ B の転写活性を Luciferase により測定し、続いて細胞数の調整のため Renilla luciferase を測定する。Renilla luciferase で除した Luciferase 値を比較検討する。コントロール群では LPS により約7倍に NF- κ B 活性は促進されているが、wnt11 により2割程度その活性が抑制されていた。Wnt11 により炎症性サイトカインの産生が抑制される機序の一つとして NF- κ B の活性抑制が関与していることが想定された。

一方、内皮系細胞の HUVEC、線維芽細胞として 3T3 細胞、心筋系細胞として H9c2 細胞にも同様の実験を施行した。Raw 細胞と同様の実験を行うがこれら3種の細胞においては LPS による炎症性サイトカインの産生は wnt11 によってほとんど影響を受けなかった。これらの結果からは炎症の中心的役割を果たすマクロファージ系の細胞に wnt11 が作用して炎症を抑制していることが推定された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小林光一 AAV9-wnt11 Gene Therapy Improves Cardiac Recovery After Myocardial Infarction by Modulating the inflammatory Response
第19回日本血管生物医学学会学術集会
(第9回 Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology) 2011年8月25日 韓国ブサン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 光一 (KOBAYASHI KOICHI)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20567010

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()

研究者番号：