

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 5月 31日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790717

研究課題名（和文）：レンチベクターを用いた kit ligand による心筋梗塞に対する遺伝子治療

研究課題名（英文）：Gene therapy for myocardial infarction by using lentivirus encoding kit ligand

研究代表者：樋口 公嗣 (HIGUCHI KOJI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：90448580

研究成果の概要（和文）：Kit ligand (KL) のアイソフォームによる心筋梗塞後の治療効果について検討する目的で本研究を行った。In vitro の実験で KL を感染させた細胞を用いて可溶性・膜型 KL の発現を確認した。マウス心筋梗塞モデルで内因性 KL-1、KL-2 と c-kit の心臓での発現を評価し、内因性の KL-2 は心筋梗塞後に低下しており、KL-2 レンチウイルスによる治療がマウス心筋梗塞後の予後を改善させる可能性が示唆された。心筋梗塞モデルマウスに対し遺伝子治療を行い評価予定であったが、ウイルス調製が遅れたため、今後継続して行う予定である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to evaluate the effect of kit ligand(KL) isoform against myocardial infarction(MI). The KL expression in transduced cells was confirmed by western blotting and flow cytometry. Endogenous KL-1, KL-2 and c-kit expression in infarcted mouse hearts were evaluated. We found that KL-2 expression in mouse hearts was diminished after MI. Therefore gene therapy using lentivirus encoding KL-2 may improve the prognosis after MI. We were supposed to finish in vivo experiments in this year, however we have difficulties in making large scale virus. We will continue to do in vivo experiments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

わが国でも食生活の欧米化により、虚血性心疾患は増加傾向を示している。なかでも、心筋梗塞は急性期に不整脈などの合併症に

より死亡することがある。現在の心筋梗塞に対する急性期の治療は経皮的冠動脈形成術やバイパス手術が行われている。しかし、これらの治療法では、急性期の死亡を回避することができても、心機能の悪化により慢性期

に心不全症状を呈することは稀ではない。また、ひとたび心不全を発症するとその予後は不良であり寛解することは難しい。そこで我々は急性心筋梗塞に対する新たな治療法として、c-kit およびそのリガンドに注目した遺伝子治療についての研究を行ってきた。遺伝子導入法については、心筋への感染力があり濃縮・保存可能な組換えレンチウイルスベクターを用いた。c-kit レセプター変異 (W/W^v) マウスと Wild Type (WT) マウスに心筋梗塞を作製すると、W/W^v マウスでは WT マウスと比較し心機能はより悪化していた。しかし、WT マウスの骨髄を W/W^v マウスに移植し心筋梗塞を作製すると、移植後マウスの心機能低下を WT マウスと同程度に抑制できることを報告した (Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 2304-2309)。この結果から、心筋梗塞後リモデリングの抑制に c-kit 陽性骨髄細胞が関与することが示唆された。

そこで、我々は c-kit レセプターに対するリガンドである KL を心臓で過剰発現させれば、心筋梗塞後リモデリングが抑制され、生命予後を改善させることができると仮定した。KL は stem cell factor や mast cell growth factor と呼ばれ、選択的スプライシングにより KL-1 または KL-2 の二つのアイソフォームが存在する。これまで我々は、KL-1 または KL-2 を組み込んだレンチウイルスベクター (LV/KL-1, LV/KL-2) を用いて、心筋での KL 過剰発現によりマウスの生命予後を検討したところ、KL-2 過剰発現の群では対照群よりも有意に生命予後を改善させたことを報告した (Mol Ther. 2009; 17(2): 262-268)。その後同様に、Xiang 等が心臓での KL-2 過剰発現により、心筋梗塞モデルマウスでの予後が改善したことを報告したが (Circulation. 2009; 120(12):1065-1074)、この研究では KL のアイソフォームの違いについては検討が

なされなかった。

2. 研究の目的

これまで KL-2 による遺伝子治療が効果的であった機序についての検討は行われておらず、今回その機序解明のために本研究を立案した。KL-1 と KL-2 の相違は、選択的スプライシングにより主要な切断部位を含むエクソン 6 が失われるか保たれるかである。主要な切断部位を失った KL-2 は、細胞膜上に発現した後、切断されるのに時間を要するため膜上に留まり可溶型とはなにくく、局所に留まる傾向にある。一方、KL-1 は、主要な切断部位が存在するために容易に可溶型となり得る。そして、膜型 KL が有効であるならば、これまで証明された KL の腹腔内投与により急性心筋梗塞の心機能回復効果が示せなかったこと (FASEB J. 2004; 18: 51-853) についても説明できる。また機序解明のため、主要でない切断部位まで除いた変異体 (LV/Mem) および可溶型のみを産生することのできる変異体 (LV/Sol) を作製した。これら 2 種類の KL 同位体と 2 種類の KL 変異体を用いて、心筋梗塞に対する遺伝子治療の効果を判定し、その機序を解明することである。

3. 研究の方法

すでに作製した 4 種類の KL のアイソフォームを感染させた培養細胞の細胞溶解物・培養上清を用いて Western Blot 法により KL の発現および蛋白のサイズの確認を行う。また、KL は膜タンパクであり、感染細胞の膜タンパクを抽出し、Western Blot 法により KL の発現確認を行う。感染細胞のフローサイトメトリおよび ELISA による培養上清中 KL 濃度測定を行う。

次に、4 種類の KL アイソフォームの生理

活性を確認するために、4種類のアイソフォームを感染させた細胞の上清を利用して KL 依存的に増殖する TF-1 細胞を培養し、TF-1 細胞の増殖能を MTS 試験にて評価を行う。

In vivo 実験では、マウス心筋梗塞モデルにおいて内因性の KL-1 および KL-2 の経時的発現をリアルタイム PCR 法を用いて検討するとともに、KL のレセプターである c-kit についても同様の方法で心筋梗塞作製後 3・7・14 日後に検討する。また、マウス心筋梗塞モデルにおいて、作製した 4 種類の KL のアイソフォームを用いて遺伝子治療を行い、マウスの予後について観察し、アイソフォームでの効果の差についての検討を血管新生やアポトーシス細胞の差について心臓の組織病理学的に評価を行う。

4. 研究成果

すでに作製した 4 種類の KL のアイソフォームを感染させた培養細胞の細胞溶解物を用いて Western Blot 法により KL の発現および蛋白のサイズの確認を行い、それぞれの発現が確認された。また、感染細胞のフローサイトメトリーおよび ELISA による培養上清中 KL 濃度測定を行い、フローサイトメトリーで可溶性 KL 以外では感染細胞の膜表面上の KL が確認された。また、培養上清の ELISA では膜型 KL 以外では培養上清中に KL を高濃度で確認することができた (図 1)。また、感染細胞より膜蛋白を抽出し、抽出した蛋白を用いて Western Blot 法により KL の発現も確認することができた。4 種類のアイソフォームに関する生理活性・骨髄遊走能試験に関しては TF-1 細胞を用いてアイソフォームごとの増殖能を確認したが明確な差は現在のところ確認できていない。また、動物実験においては、マウス心筋梗塞モデルにおいて、内因性の KL の発現を KL-1、KL-2 それぞれと

KL のレセプターである c-kit の心臓での発現を経時的にリアルタイム PCR を用いて評価した。これにより、内因性の KL-2 は心筋梗塞後に低下しており (図 2)、この低下していた KL-2 を補うことにより、KL-2 レンチウイルスベクター治療が心筋梗塞モデルマウスの予後を改善させた可能性が示唆された。平成 23 年度に心筋梗塞モデルマウスに対して遺伝子治療を行い評価予定であったがウイルス作成および in vitro の実験が遅れたため完了できなかったため、今後継続して行う予定である。

図 1

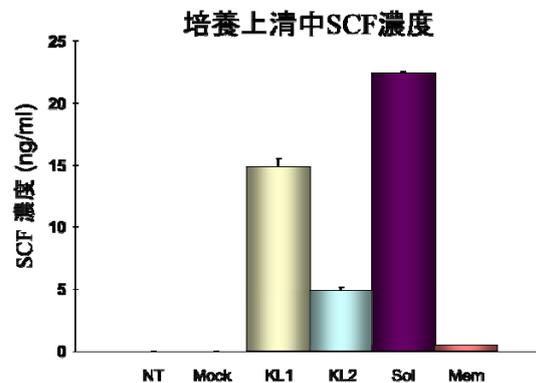
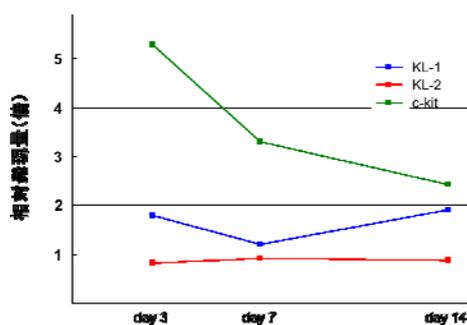


図 2



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)

[学会発表] (計 1 件)

①第 59 回日本心臓病学会学術集会

タイトル：急性心筋梗塞モデルマウスにおける kit ligand および c-kit 発現の検討

発表者：樋口公嗣

発表年月日：2011 年 9 月 23 日

発表場所：神戸ポートピアホテル (兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 公嗣 (HIGUCHI KOJI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：90448580