

論 文 要 旨

Direct Injection of Kit Ligand-2 Lentivirus Improves Cardiac Repair and Rescues Mice Post-myocardial Infarction

レンチウイルスを用いた心臓での Kit Ligand-2 発現は
マウス心筋梗塞後のリモデリングおよび生命予後を改善する

樋口 公嗣

【序論および目的】

虚血性心疾患は、我が国でも死因の第二位と近年増加傾向を示している。急性心筋梗塞では、急性期に不整脈や心破裂などの合併症により死亡することが多い。現在、心筋梗塞に対する急性期の治療として、経皮的冠動脈形成術や冠動脈バイパス手術が行われているが、これらの治療で急性期の死亡を回避し得たとしても、心機能の悪化により慢性期に心不全症状を呈することも多い。ひとたび心不全を発症するとその予後は不良であり、寛解することは困難である。

これまでに、心筋梗塞に対するサイトカイン療法が有効であることが報告され、我々も c-kit レセプターが心筋梗塞後のリモデリング抑制に重要であることを最近報告した。c-kit レセプターのリガンドである kit ligand (KL; 幹細胞因子、stem cell factor と呼ばれる) には選択的スプライシングにより KL-1 と KL-2 のアイソフォームが存在する。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 が保たれるか、失われるかである。主要な切断部位を失った KL-2 は細胞膜上に発現した後、切断されにくくなるため可溶型とはなりにくく局所に留まる傾向にある。

本研究の目的は、KL-1、KL-2 を発現可能なレンチウイルスベクターをそれぞれ作製し、心筋梗塞モデルマウスの心臓で KL を発現させることが心筋梗塞後のリモデリングを抑制し、マウスの生命予後を改善するか否かを検討することである。

【材料および方法】

KL の 2 種類のアイソフォーム、KL-1、KL-2 を発現可能なレンチウイルスベクターをそれぞれ作製 (LV/KL-1・LV/KL-2) し、KL ノックアウト細胞 (SI/SI^d) に感染させ、2 種類のアイソフォームの発現をフローサイトメトリー、ウエスタンブロットで評価した。また、LV/KL-1 または LV/KL-2 を感染させた細胞の培養上清中の KL 濃度を ELISA 法で計測し、切断された可溶型 KL の濃度を評価した。

次に、膜型 KL 欠損マウス (SI/SI^d) および正常マウス (wild type; WT) を用いて、冠動脈左前下行枝を結紮することにより心筋梗塞を作製し、その後 phosphate buffered saline (PBS) またはレンチウイルス LV/KL-1 または LV/KL-2 を心筋梗塞周辺部に直接注入した。心筋梗塞作製 35 日後に圧・容積カテーテルを用いて心機能評価および予後の解析を行った。一部のマウスは、組織標本や臓器の蛋白抽

出のため心筋梗塞作成 3・7 日後に安楽死させた。

【結 果】

In vitro の実験において、LV/KL-1 または LV/KL-2 を感染させた SI/SI4 細胞では、約 95% の細胞で KL の発現がフローサイトメトリー法で確認され、ウエスタンブロットでも予想される分子量に一致したバンドが検出された。また、LV/KL 感染細胞の培養上清中の KL 濃度は、LV/KL-1 を感染させた細胞培養上清で LV/KL-2 感染細胞培養上清と比し、高値であった。これは、LV/KL-1 では主要な切断部位が存在するため、容易に可溶型となったのではないかと推測された。

In vivo の SI/SI^d マウスを用いた実験において、コントロールの PBS 治療群では心筋梗塞作製 35 日後の生存率は 12% であったのに対し、LV/KL-2 治療群では 71% と有意に改善していた ($p < 0.05$)。この結果より、KL-2 が心筋梗塞後の生命予後改善に寄与していることが考えられた。さらに、より臨床に近いと考えられる WT マウスを用いた実験でも、心筋梗塞作製 35 日後の生存率がコントロール群と比較して LV/KL-2 治療群では 35% から 73.1% へと有意に改善していた ($p < 0.05$)。この生命予後改善効果は、LV/KL-1 治療群では認められなかった。また、心臓組織標本の形態学的評価では、梗塞範囲が LV/KL-2 治療群では PBS 治療群に比し、有意に減少していた ($37.2 \pm 2.5\%$ vs $59.3 \pm 3.0\%$; LV/KL-2 治療群 vs PBS 治療群, $p < 0.001$)。心筋梗塞作製 35 日後の左室壁厚は、LV/KL-2 治療群で PBS 治療群と比し有意に保たれていた (0.78 ± 0.24 mm vs 0.30 ± 0.03 mm; LV/KL-2 治療群 vs PBS 治療群, $p < 0.05$)。左室拡張末期容量は、LV/KL-1 および LV/KL-2 治療群では PBS 治療群と比し有意に減少していた。さらに、左室収縮末期容量も LV/KL-1 および LV/KL-2 治療群では PBS 治療群と比し有意に減少していた。

【考察及び結論】

レンチウイルスは、心筋を含めた非分裂細胞への感染能力があり、ゲノム DNA への遺伝子導入が可能であるため、導入遺伝子の長期の発現が認められることが報告されている。本研究では、心筋梗塞作製直後に KL-1 または KL-2 遺伝子をコードしたレンチウイルスの心筋内注入を行った。その結果、持続した KL-2 の発現により心筋梗塞後のリモデリングの抑制およびマウス生命予後の改善を認めた。今後、一時的な KL-2 発現でも同様の結果が得られるか否か、また至適な KL-2 発現時期はいつか等の検討を行うことにより、心筋梗塞後のリモデリングの機序や至適な治療介入時期が明らかとなる可能性がある。

心筋梗塞に対するサイトカイン療法の機序に関しては不明なことが多い。以前はサイトカインにより誘導された骨髄細胞が心筋に分化すると考えられていたこともあった。近年では、誘導された骨髄細胞が心筋に分化することはないが、心筋梗塞後のリモデリングに重要な役割を果たしていると考えられている。本研究において、LV/KL-2 治療群で見られたマウス生命予後改善効果は LV/KL-1 では認めなかった。これは、心筋梗塞後の生命予後改善効果には膜型 KL が必要とされている可能性を示唆するものと考えられた。一方、LV/KL-2 感染細胞の培養上清では分泌型 KL も認めており、KL-2 の治療効果は自己分泌・傍分泌作用によると推測される。

本研究により、膜型 KL 欠損マウスおよび正常マウスにおける心筋梗塞後の心筋でのレンチウイルスを用いた KL-2 の発現は、心筋梗塞後のリモデリングを抑制し、生命予後を改善させることが明らかとなった。

論文審査の要旨

報告番号	総論第	7号	学位申請者	樋口 公嗣
審査委員	主査	松山 隆美	学位	博士(医学)
	副査	小賤 健一郎	副査	橋口 照人
	副査	濱崎 秀一	副査	新村 英士

【記入例】

Direct Injection of Kit Ligand-2 Lentivirus Improves Cardiac Repair and Rescues Mice Post-myocardial Infarction

(レンチウイルスを用いた心臓での Kit Ligand-2 発現はマウス心筋梗塞後のリモデリングおよび生命予後を改善する)

虚血性心疾患は、本邦でも近年増加傾向を示している。心筋梗塞に対する急性期の治療として、経皮的冠動脈形成術や冠動脈バイパス手術が行われているが、これらの治療で急性期の死亡を回避し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も多い。また、心不全を発症するとその予後は不良かつ寛解することは困難である。そのため、新たな治療法の開発が待たれる中で、心筋梗塞に対するサイトカイン療法が有効であることが報告されている。そこで、学位申請者らは c-kit レセプターのリガンドである kit ligand (KL) を心筋梗塞モデルマウスの心臓にレンチウイルスを用いて発現させることにより、心筋梗塞後のリモデリング抑制やマウス生命予後が改善するかを検討した。KL には選択的スプライシングにより KL-1 と KL-2 のアイソフォームが存在する。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 が保たれるか、失われるかである。主要な切断部位を失った KL-2 は細胞膜上に発現した後、切断されにくくなるため可溶性になりにくく局所に留まる傾向にある。これら 2 種類の KL アイソフォームの治療効果の差を検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) マウス心筋において、レンチウイルスによる kit ligand の発現を確認した。
- 2) kit ligand-2 を心筋内に発現させることにより、心筋梗塞後のリモデリングが抑制された。
- 3) kit ligand-2 を心筋内に発現させることにより、kit ligand 欠損マウスと wild type マウスの心筋梗塞後の予後を改善した。

レンチウイルスは、心筋を含めた非分裂細胞への感染能力があることが報告されている。本研究では、心筋梗塞作製後に KL-1 または KL-2 遺伝子をコードしたレンチウイルスを心臓へ注射した。その結果、KL-2 治療群では心筋梗塞後のリモデリング抑制およびマウス生命予後の改善を kit ligand 欠損マウスと wild type マウスで認めた。今後、臨床応用するためには適切なベクターの検討などを行い、治療効果や安全性の確保が必要と考えられた。

本研究は、心筋梗塞に対する kit ligand を用いた遺伝子治療の効果を検討したものであり、その結果 kit ligand-2 の心臓での発現は、心筋梗塞後のリモデリングを抑制し、生命予後を改善させることを示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総論第	7号	学位申請者	樋口 公嗣
審査委員	主査	松山 隆美	学位	博士 (医学)
	副査	小賤 健一郎	副査	橋口 照人
	副査	濱崎 秀一	副査	新村 英士
<p>主査および副査の5名は、平成24年5月29日、学位申請者 樋口 公嗣 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) モデルとなった kit ligand(KL)欠損マウスはホモで完全に KL が欠損しているのか？ (回答) 膜型 KL が欠損していますが、可溶型 KL は存在しています。</p> <p>質問2) KL-1 より KL-2 で効果があったということは、膜型で機能することが重要なのか？ (回答) 膜型が重要と考えており、図で示したように cardiac stem cell は c-kit 陽性であり、膜型 KL と結合することによりシグナルが入り心筋や血管の構成細胞に分化した可能性はあると考えます。</p> <p>質問3) cardiac stem cell の動員よりも骨髄細胞などに作用し KL-2 の効果が現れた可能性が強いのか？ (回答) ご指摘の通り、KL-2 により骨髄由来の細胞が動員される方が論理的と考えます。</p> <p>質問4) 増殖実験において、TF-1 細胞に KL を導入したということか？ (回答) はい。</p> <p>質問5) 使用したレンチウイルスの力価はどの程度か？ (回答) レンチウイルスを構成する蛋白の p24 に対する ELISA を行い $2.8 \mu\text{g/ml}$ にて各群のウイルス量を調整したが、粒子数や定量 PCR、感染力価などで評価すればさらに良かったと考えます。</p> <p>質問6) インテグレーションするウイルスは安全性において問題となりますが、臨床応用するときにはどのようなベクターを使用しようと考えているのか？ (回答) 臨床応用への障害は多いと考えます。これまで蛋白として腹腔内投与や皮下注射が行われていましたが、今回の遺伝子導入方法で心筋の膜上に発現させることで膜蛋白の役目や重要性が示されたと考えます。従って、今回の研究から遺伝子治療だけではなく膜型 KL を増加させるような薬剤をみつけ臨床に応用できればと思っております。</p> <p>質問7) “リモデリング” とは、組織レベルでのポジティブな現象を言っているのか？ (回答) 心筋梗塞後のリモデリングとは、心筋梗塞により低下した心機能のため減少した拍出量を維持させるために起こる左室拡大や健常部心筋の肥大のことを“リモデリング”と呼んでいます。</p> <p>質問8) 考察にあるような血管新生や組織再生を促すような所見が病理学的に認められたのか？また、その部位に mast cell の浸潤は認めなかったか？ (回答) 血管内皮細胞のマーカーである CD31 染色では、KL-2 治療群で血管新生を有意に認めましたが、鮮明な画像ではなく論文では示しておりません。私の研究では、mast cell の浸潤は認めませんでした。</p> <p>質問9) 論文中に血管新生や幹細胞の動員などに触れていないのは何故か？ (回答) 血管新生やアポトーシス・c-kit 陽性細胞の動員の病理学的証明ができていなかったため示していませんが、</p>				

最終試験の結果の要旨

今後検討したいです。

質問 1 0) minor cleavage site で可溶型となった KL-2 はダイマーを形成するのか？

(回答) 確認をしておりません。

質問 1 1) 心筋直接注入ではなく、全身投与でウイルスを導入した場合同様な結果が得られたのか？

(回答) 全身投与を行うのであればプロモーターが心臓特異的である必要があります。しかし、現在知られている心筋特異的プロモーターは活性が弱く十分な発現量を得難いと考えます。

質問 1 2) Ly49 についてはどのように考察するのか。また、Ly49 の上昇がリモデリングの抑制に影響しているのか？

(回答) Ly49 は NK 細胞のマーカーであり、我々は c-kit 欠損マウスで NK 細胞を介して心筋梗塞後のリモデリングを抑制したことを報告しました。今回の実験では心筋梗塞後 35 日目に NK 細胞が KL-2 治療群で上昇していましたが、梗塞後から時間が経過しての変化でありリモデリングの抑制に影響しているとは考えておりません。

質問 1 3) ウイルスを心臓に注入する時、左室腔内へのもれの有無は確認できるのか？

(回答) 左室腔内に漏れると全身に感染をおこし、肝臓や脾臓での発現が認められるため、その臓器での遺伝子発現を検証することで確認できると考えます。

質問 1 4) 拡張末期左室容量や収縮末期左室容量は KL-1・KL-2 ともに効果を認めているが、心体重比では KL-2 のみが有効であったがその乖離はなぜか？

(回答) エクセントリックな心肥大が起きると心重量は増加するが、コンセントリックなリモデリングが起きると心重量は増加せず左室容量は小さいままであるのではないかと考えますが、なぜ KL-1 はコンセントリックなリモデリングだけを抑制し、KL-2 はどちらのリモデリングも抑制したかは不明です。

質問 1 5) KL の導入を心筋梗塞後どれくらいまでに行えば臨床的に有効であると考えるか？

(回答) 心筋の線維化が起きてしまうとこの治療でも回復は困難と考えます。実験モデルでは心筋梗塞作製直後にウイルス注射を行っておりますが、技術的な問題もあり時間をずらしての治療効果の判定は行なっていません。

質問 1 6) このシステムで臨床応用した時にネガティブな事象は何が考えられるか？

(回答) レンチウイルスを使用しておりインテグレーションサイトの影響で腫瘍を形成する可能性があります。また c-kit 陽性の癌細胞の報告があり、KL の刺激により腫瘍の増殖や転移を促進する可能性があります。

質問 1 7) ヒトでの応用として冠動脈注入を行ったらどうなるか。また、臓器特異的に感染させる方法はあるのか？

(回答) 一部のウイルスは感染せず冠静脈を経由して全身に感染を起こす可能性があると考えます。特異的に感染させるには、アブレーションカテーテルを改良して心筋に注入する方法が考えられます。

質問 1 8) ウイルス注入部はどの領域に行なっているのか？

(回答) 梗塞の境界領域に注入しています。

質問 1 9) in vitro 実験で可溶型と KL を固相化した比較実験は行なっているか？

(回答) 行なっておりません。

質問 2 0) Ly49 と Sca-1 陽性細胞の増加は KL-1 ではどうであったのか？また心筋内の c-kit 陽性細胞や NK 細胞は増えていたか？

(回答) n が少なくデータを測定できていません。免疫染色が成功せず心筋内の評価ができませんでした。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。