

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08232

研究課題名(和文) STAT3/Pimキナーゼ系を介した新規心筋保護シグナルの解明

研究課題名(英文) Study of Cardioprotective Signal through STAT3/Pim Kinase

研究代表者

前田 真貴子 (Makiko, Maeda)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：70461168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、哺乳類の心筋細胞の恒常性維持において、心筋細胞保護効果が重要な役割を担っていることを報告してきた。近年、eIF4A阻害剤であるシルベストロールが、がん原遺伝子の発現を低下させ、抗がん作用を示すこと及びeIF4ファミリーのeIF4Bの活性化にSTAT3/Pim-1キナーゼが関与することが報告されている。

本研究では、細胞間接着に関与するN-cadherinに着目し、STAT3/Pim-1/eIF4B/ N-cadherinシグナルを介する心筋細胞における保護効果を検討した。

本研究成果は、STAT3/Pim-1を介する細胞間接着構造の制御による心筋細胞保護効果の可能性を提唱するものである。

研究成果の概要(英文)：Cardioprotective effect is known to be very important to maintain cardiac homeostasis. Silvestrol, a naturally occurring member of the flavagline family of compounds, inhibits cap-dependent translation by targeting eIF4A, and it is known to decrease the expression of cancer genes. It is also reported that eIF4 family has cell protective effects and eIF4B, exhibits various kinds of biological functions. In cancer cells, eIF4B is activated by Pim-1 kinase. However, pathophysiological roles of Pim-1/eIF4B remain to be elucidated in cardiomyocytes.

In this study, we focused on N-cadherin, which is involved in cell-cell adhesion, and proved whether STAT3/Pim-1/eIF4B/ N-cadherin signaling pathway in cardiomyocytes could work for cardioprotective effects.

The proposal from the results of this study may support the possibility of cardioprotective effect by cell-cell adhesion control through STAT3/Pim-1 signaling pathway.

研究分野：医療薬学

キーワード：虚血性心疾患 心筋保護シグナル

### 1. 研究開始当初の背景

心不全は、心筋梗塞や心筋症等のあらゆる心疾患の終末像である。近年、社会の高齢化や食の欧米化に伴い、心不全患者数が増加し、「心不全パンデミック」と呼ばれる減少が起こっている。現在の治療薬として、アンジオテンシン変換酵素阻害薬やβ遮断薬等の神経体液性因子の活性抑制剤が用いられているが、心不全患者の5年生存率は、約50%と予後不良であり、新規心不全治療薬の開発が求められている。

心臓の収縮力を担う心筋細胞は、生後まもなく増殖能を失う終末分化細胞である。そのため、心血管病により細胞死が惹起され心筋細胞が失われると、心筋細胞は、脱落するが、ほとんど再生せず、代わりに線維組織に置換されることで心収縮力が低下する。従って、心筋細胞を保護し、細胞死を抑制する分子機構の解明は、心不全に対する有用な創薬ターゲットの提案につながるものと期待される。

近年、eIF4A阻害剤シルベストロールが、がん原遺伝子の選択的な発現低下を誘導することが報告され、eIF4 familyが、がん細胞における重要な細胞保護因子として機能することが示唆されている。翻訳開始因子であるeIF4 family分子は、外部シグナルによって活性化されると、mRNAの5'非翻訳領域(UTR)のグアニン4重鎖構造を認識して複合体を形成し、翻訳制御する。これまで、eIF4 familyの活性化機構としては、がん細胞において、eIF4 familyの一つであるeIF4Bがセリン/スレオニンキナーゼであるPim-1によりリン酸化されることが報告されている。興味深いことに、心筋細胞においても、Pim-1が細胞保護的に機能することが報告されているが、心筋細胞におけるeIF4 familyの機能は検討されていない。

一方、我々はこれまでに、IL-6ファミリーサイトカインの一つでありIL-11が、STAT3シグナルを介して、心筋保護効果を示すことを動物実験及び臨床研究によって報告してきた<sup>1,2</sup>。

### 2. 研究の目的

本研究において、IL-11/STAT3/Pim-1経路を中心にeIF4Bの翻訳制御機構を解析し、IL-11/STAT3/Pim-1/eIF4B経路を介する心筋保護効果について、検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

先ず初めに、C57BL/6マウスの左冠動脈を結紮して心筋梗塞(MI)を作製し、MIモデルとし、Pim-1活性とeIF4Bのリン酸化(p-eIF4B)のタンパク質発現を、ウエスタンブロッティング法を用いて評価した。

次に、新生仔ラット心筋培養細胞(以下、培養心筋細胞)において、STAT3/Pim-1シグナル経路を活性化させるサイトカインであるIL-11によるN-cadherinの発現について、real-time RT-PCR法及びウエスタンブロッ

ティング法を用いて評価した。

更に、IL-11によるN-cadherinの発現上昇に、STAT3/Pim-1シグナル経路が関与しているかを検証するため、機能抑制型STAT3発現アデノウイルスベクター(ad-dnSTAT3)を用い、培養心筋細胞におけるSTAT3シグナルの阻害実験を行い、ウエスタンブロッティング法により確認し、Pim-1活性化の関与をPim-1 siRNA及び野生型Pim-1発現アデノウイルスベクター(ad-wtPim-1)を用いて検証した。また、eIF4Bの関与について、心筋細胞にeIF4B siRNAをトランスフェクションし、IL-11で24時間刺激した後、N-cadherinの発現をウエスタンブロッティング法により評価した。

最後に、STAT3/Pim-1/eIF4B経路を介するIL-11によるN-cadherinの発現制御による心筋細胞間接着への影響について、培養心筋細胞のeIF4BをsiRNA法によりノックダウンした後に、蛍光免疫染色法を用いて観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 梗塞後心筋組織においてp-eIF4Bの発現は上昇する

マウスにMI作製後、1、4、7日目のp-eIF4Bタンパク質発現は、1日目から確認され、発現量は4日目で最大となった(Figure 1A)。

eIF4Bをリン酸化することが知られているリン酸化酵素Pim-1の発現について、MI後1、4、7、14日目のmRNAをreal-time RT-PCR法により経時的に評価した結果、MI後1日目に最も発現が上昇していた(Figure 1B)。mRNAの発現上昇に伴い、Pim-1タンパク質もMI後1、4日目に発現が上昇していた(Figure 1C)。

以上の結果より、心筋梗塞時にeIF4Bが重要な役割を担い、Pim-1の活性とeIF4Bのリン酸化が相関することが示された。

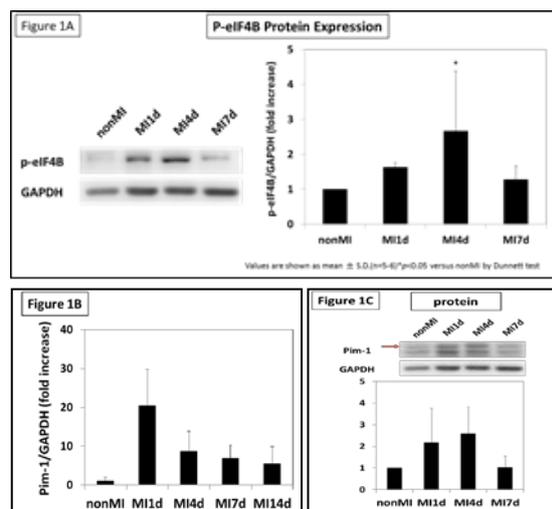


Figure 1. (A) The lysates from hearts was immunoblotted with anti-p-eIF4B and anti-GAPDH antibodies. The left panel is representative images. Right panel is for quantitative analyses by densitometry. Data are mean ± S.D. (n=5-6). \*p<0.05 versus non-MI by Dunnett test. (B) Total RNA of the murine hearts after MI was used to measure the expression of Pim-1 transcripts by real time RT-PCR and normalized with that of GAPDH. Data are shown as fold

increase of the expression levels in the hearts without operation (control). (n=3) \*\*p<0.01 by ANOVA versus non-MI with Dunnett test. (C) The lysates from hearts at the indicated time points after MI and were immunoblotted with anti-Pim-1 and anti-GAPDH antibodies. Representative images are in the left panel. Quantitative analyses by densitometry were shown in the right panel. Data are mean  $\pm$  S.D. (n=5-6) \*p<0.05 versus non-MI by Dunnett test.

## (2) IL-11 は翻訳を介して N-cadherin の発現を上昇させる

培養心筋細胞を用いて、IL-11 による N-cadherin の発現を評価した結果、経過的に N-cadherin のタンパク質が発現上昇していた (Figure 2A)。一方、mRNA 発現には有意差は認められなかった (Figure 2B)。また、N-cadherin タンパク質の発現は、IL-11 の濃度 (0.5、5、20、100ng/mL) に依存して上昇した (Figure 2C)。

以上の結果より、心筋細胞において、IL-11 は、転写後発現調節機構を介して N-cadherin の発現を誘導していると判断し、以降は、eIF4B を介した翻訳制御機構の関与に焦点をあて研究を進めた。

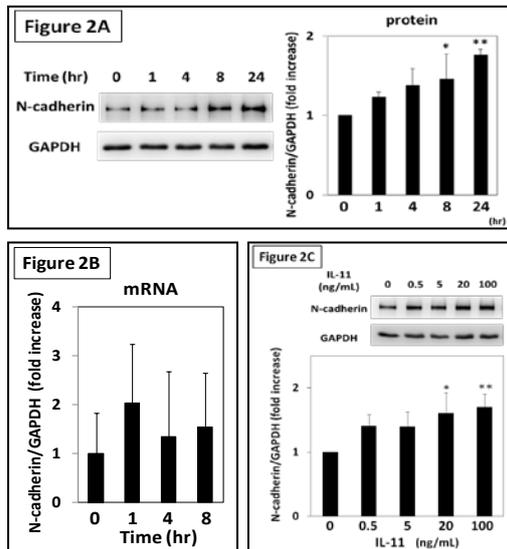


Figure 2. (A) Neonatal rat cardiomyocytes were stimulated with IL-11 (100ng/mL) for the indicated time. Immunoblot analyses were performed. The expression was normalized with that of GAPDH. Representative data are in the left panel and quantitative analyses by densitometry were in the right. Data are mean  $\pm$  S.D. (n=3) \*p<0.05, \*\*p<0.01 versus 0 hour by ANOVA with Dunnett test. (B) Cells were stimulated with IL-11 (100ng/mL) for the indicated time. N-cadherin transcript was measured by quantitative RT-PCR. Data are mean  $\pm$  S.D. (n=3) \*p<0.05, \*\*p<0.01 versus 0 hour by ANOVA with Dunnett test. (C) Neonatal rat cardiomyocytes were stimulated with various concentrations of IL-11 for 24 hour. Immunoblot analyses were performed. The expression of N-cadherin was normalized with that of GAPDH. Representative data are in the above and quantitative analyses by densitometry were in the bottom. Data are mean  $\pm$  S.D. (n=3) \*p<0.05, \*\*p<0.01 versus 0 ng/mL by ANOVA with Dunnett test.

## (3) STAT3/Pim-1 の活性化は IL-11 による N-cadherin の発現上昇に必要かつ十分である

IL-11 による N-cadherin の発現上昇につ

いて、STAT3/Pim-1 シグナル経路の関与を ad-dnSTAT3 による STAT3 シグナルを阻害して評価した。その結果、コントロール (ad- $\beta$ -gal 感染) 群と比較して、ad-dnSTAT3 感染群において、IL-11 による N-cadherin の発現上昇が有意に抑制された (Figure 3A)。また、Pim-1 siRNA によって Pim-1 シグナルを阻害した結果、control siRNA 群と比較して、Pim-1 siRNA 群において、有意に抑制された (Figure 3B)。ad-wtPim-1 による変化は、ad-wtPim-1 の重複感染度 (MOI) 依存的に上昇した (Figure 3C)。

以上の結果より、IL-11 による N-cadherin の発現上昇は、STAT3/Pim-1 シグナル経路を介することが示唆された。

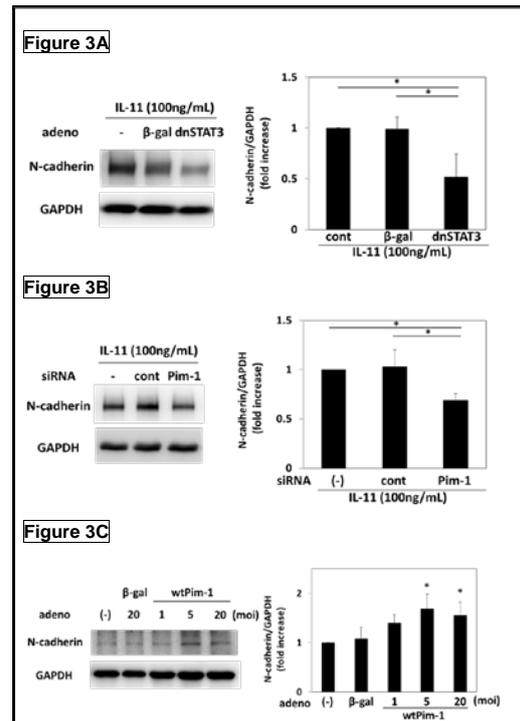


Figure 3. The expression of N-cadherin was analyzed by immunoblot and normalized with that of GAPDH. Representative data are in the left and quantitative analyses by densitometry were in the right. Data are mean  $\pm$  S.D. (n=3). (A) Cells were transfected with adenovirus vector expressing dominant negative STAT3 (dnSTAT3, 50 MOI) or  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal, 50 MOI), as a control. Cells were stimulated with IL-11 (100ng/mL) for 24 hour. \*p<0.05 by ANOVA followed by Tukey-Kramer test. (B) Neonatal rat cardiomyocytes were transfected with control or Pim-1 siRNA. \*p<0.05 by ANOVA followed by Tukey-Kramer test. (C) Cells were transfected with ad-wild type Pim-1 (1, 5, 20 MOI) or ad- $\beta$ -gal (20 MOI). \*p<0.05, versus control by ANOVA with Dunnett test.

## (4) 心筋細胞において、eIF4B のノックダウンは IL-11 誘導性の N-cadherin の発現上昇を抑制する。

IL-11 による N-cadherin の発現上昇が STAT3/Pim-1 シグナル経路を介していることが示唆されたため、N-cadherin の発現増強における eIF4B の関与を eIF4B siRNA を用いて検討した結果、control siRNA 群と比較して、eIF4B siRNA 群において、有意に抑制

された (Figure 4)。従って、IL-11 による N-cadherin の発現上昇は、eIF4B の活性化を介していることが示唆された。

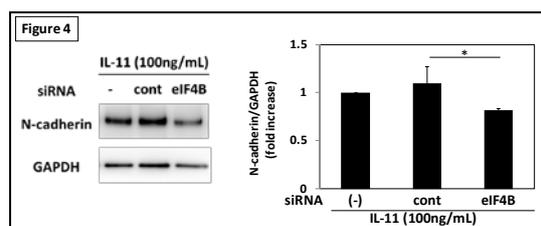


Figure 4. Neonatal rat cardiomyocytes were transfected with control or eIF4B siRNA. The expression of N-cadherin was analyzed by immunoblot. Representative data are in the left and quantitative analyses were in the right. Data are mean±S.D. (n=3). \* $p$ <0.05 by one-way ANOVA followed Tukey-Kramer test.

### (5) 心筋細胞において、eIF4B のノックダウンは Pim-1 誘導性の N-cadherin の発現上昇を抑制する

心筋細胞において、Pim-1 が eIF4B をリン酸化することを確認できたため、IL-11 による N-cadherin 発現上昇に、STAT3/Pim-1/eIF4B 経路が関与していると考え、蛍光免疫染色法により心筋細胞間接着との関連を評価した。その結果、ad-wtPim-1 を感染させた心筋細胞では N-cadherin を介した心筋細胞間の接着が促進されたが、eIF4B のノックダウン条件下では、N-cadherin の発現上昇と細胞間接着形成の抑制が観察された (Figure 5)。これらのことより、IL-11/STAT3/Pim-1/eIF4B シグナル経路により N-cadherin の発現が上昇し、心筋細胞間の接着を促進させる可能性があると考えた。

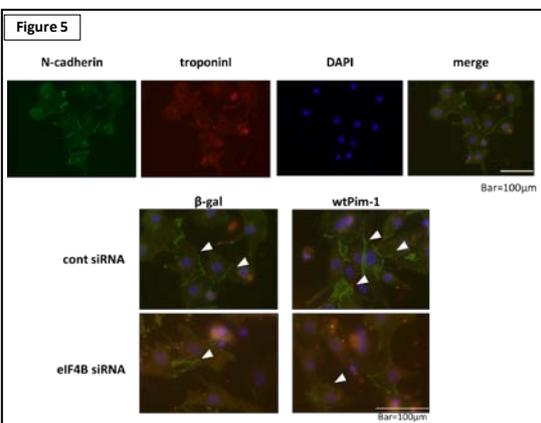


Figure 5. Neonatal rat cardiomyocytes were transfected with control or eIF4B siRNA and transfected with ad-wtPim-1 (20MOI) or ad- $\beta$ -gal (20MOI) for 24 hour. Immunocytochemical analysis was performed with anti-N-cadherin and troponin I antibodies. Nuclei were identified by DAPI staining. Upper; 4 representative images are for each micrograph and merged one. Middle and Bottom r; 4 images show the effects of eIF4B siRNA on N-cadherin expression in Pim-1-expressing cardiomyocytes.

### まとめ

N-cadherin は、細胞膜に存在するカルシウム依存性の糖タンパク質で、接着分子の一つである。また、心筋細胞に発現する主要な cadherin で、心筋細胞同士の接着を媒介する

ことで、心臓組織全体の構造的統合性を維持していることが知られている。本研究において、IL-6 ファミリーサイトカインが、STAT3/Pim-1 シグナルを活性化し、eIF4B の翻訳を介したタンパク質発現制御機構による心筋細胞保護に関与することを明らかにした。本研究は、心筋細胞における eIF4B ファミリーの機能を追究した最初の研究である。

### <引用文献>

- Kimura R, Maeda M, Fujio Y, Azuma J, et. al. Identification of cardiac myocytes as the target of interleukin 11, a cardioprotective cytokine. *Cytokine* 2007; 38(2):107-115.
- Nakagawa M, Maeda M, Fujio Y, et. al. Four cases of investigational therapy with interleukin-11 against acute myocardial infarction. *Heart Vessels*. 2016; 31(9):1574-1578.
5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計 6 件)
- Enomoto D, Matsumoto K, Yamashita T, Kobayashi A, Maeda M, Nakayama H, Obana M, Fujio Y. ROR $\gamma$ t-expressing cells attenuate cardiac remodeling after myocardial infarction. *PLoS One*. 2017; 12(8): e0183584.
- Miyawaki A, Obana M, Mitsuhashi Y, Orimoto A, Nakayasu Y, Yamashita T, Fukada SI, Maeda M, Nakayama H, Fujio Y. Adult murine cardiomyocytes exhibit regenerative activity with cell cycle reentry through STAT3 in the healing process of myocarditis. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 1407.
- Miyawaki A, Mitsuhashi Y, Orimoto A, Nakayasu Y, Tsunoda S, Obana M, Maeda M, Nakayama H, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Fujio Y. Moesin is activated in cardiomyocytes in experimental autoimmune myocarditis and mediates cytoskeletal reorganization with protrusion formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; 1:311(2):H476-486.
- Nakagawa M, Owada Y, Izumi Y, Nonin S, Sugioka K, Nakatani D, Iwata S, Mizutani K, Nishimura S, Ito A, Fujita S, Daimon T, Sawa Y, Asakura M, Maeda M, Fujio Y, Yoshiyama M. Four cases of investigational therapy with interleukin-11 against acute myocardial infarction. *Heart Vessels*. 2016; 31(9):1574-1578.
- Tanaka T, Obana M, Mohri T, Ebara M, Otani Y, Maeda M, Fujio Y. Interleukin-27 induces the endothelial differentiation in Sca-1<sup>+</sup> cardiac resident stem cells. *Cytokine* 2015; 75(2):365-372.
- Enomoto D, Obana M, Miyawaki A, Maeda M, Nakayama H, Fujio Y. Cardiac-specific ablation of the STAT3 gene in the subacute phase of myocardial infarction exacerbated cardiac remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015; 309(3):H471-480.

[学会発表] (計 9 件)

1. American Heart Association Scientific Sessions 2017. November 12, 2017 (Anaheim, California, USA) Safety and feasibility report of investigational therapy with interleukin-11 against acute myocardial infarction. Makiko Maeda, Masashi Nakagawa, Yasuko Owada, Yasukatsu Izumi, Shinichi Nonin, Kenichi Sugioka, Daisaku Nakatani, Shinichi Iwata, Kazuki Mizutani, Satoshi Nishimura, Asahiro Ito, Suwako Fujita, Takashi Daimon, Yoshiki Sawa, Masanori Asakura, Yasushi Fujio, Minoru Yoshiyama
2. 第90回日本薬理学会年会 2017年3月15日～17日 (長崎) 急性心筋梗塞に対するヒトIL-11製剤を用いた心筋保護治療. 藤尾慈、前田真貴子、大門貴志、中谷大作、杉岡憲一、岩田真一、澤芳樹、朝倉正紀、泉康雄、葎山稔
3. 第90回日本薬理学会年会 2017年3月15日～17日 (長崎) eIF4Bは、Pim-1キナーゼの下流における心筋細胞保護因子である. 横山由加里、松本浩太郎、木下真希、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾慈
4. 日本薬学会第136年会、2016年3月26日～29日 (横浜) 心筋炎病態においてSca-1陽性心筋組織幹細胞は心保護的性質へと変化する. 榎原正貴、松原由実、宮脇昭光、関谷有紀子、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾慈
5. 日本薬学会第136年会、2016年3月26日～29日 (横浜) 心筋炎病態化におけるSTAT3を介した成体心筋細胞増殖. 高家圭紀、宮脇昭光、密原佑介、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾慈
6. 日本薬学会第136年会、2016年3月26日～29日 (横浜) Pim-1を介したSTAT3による新規細胞保護機構の解明. 大谷勇太、横山由加里、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾慈
7. 第89回日本薬理学会年会、2016年3月9日～11日 (横浜) 心筋炎病態下におけるSTAT3を介した成体心筋細胞増殖. 宮脇昭光、高家圭紀、密原佑介、山下朋美、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾慈
8. 第1回国際心血管薬物療法学会日本部会、2015年6月20日～21日 (京都) Gp130サイトカインと心血管病. 藤尾慈、前田真貴子、朝倉正紀、中谷大作、泉康雄、葎山稔
9. 第1回 J-ISCP学術集会 (国際心血管薬物療法学会日本部会)、2015年6月20日～21日 (京都) 心筋梗塞慢性期における心筋特異的 STAT3の欠損は心筋リモデリングを悪化させる. 榎本大智、尾花理徳、宮脇昭光、毛利友美、前田真貴子、中山博之、藤尾慈

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田真貴子 (MAEDA MAKIKO)  
大阪大学大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：70461168

### (2) 研究分担者

藤尾 慈 (FUJIO YASUSHI)  
大阪大学大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：20359839