

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20406

研究課題名(和文) 虚血再灌流後心筋障害におけるIL-22の役割の解明

研究課題名(英文) The role of IL-22 in myocardial injury after ischemia-reperfusion

研究代表者

高橋 甚彌 (Takahashi, Jinya)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30647813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：IL-22は、上皮細胞を標的として組織保護効果を有するが、心筋に対する作用は不明である。本研究では、IL-22による心臓でのSTAT3活性化と心筋虚血後再灌流障害(心筋IRI)の抑制効果を検証した。マウス冠動脈を60分間結紮後に再灌流を行うin vivo IRIモデルにおいて、再灌流24時間後の梗塞サイズはPBS投与群に比べ、IL-22投与群において有意に減少した。再灌流後3時間におけるTUNEL陽性細胞比率はPBS投与群と比較し、IL-22投与群で有意に減少した。IL-22は心筋細胞のSTAT3経路の活性化を介したアポトーシス抑制によって、心筋IRIを抑制する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine whether IL-22 administration could activate myocardial STAT3 signaling pathway and prevent the myocardial ischemia-reperfusion injury (IRI) in mice. Immunostaining revealed that phospho-STAT3 positive cardiomyocytes were markedly higher in IL-22-treated mice compared to PBS-treated mice. Real-time PCR revealed that IL-22 receptor subunit alpha 1 (IL-22RA1) was expressed in the heart. Next, we examined the effect of IL-22 on the myocardial infarction after IRI. Evans blue and TTC staining after a 24 h reperfusion showed a significant reduction in myocardial infarct size in IL-22-treated mice compared to PBS-treated mice. TUNEL staining revealed that apoptotic cells were significantly decreased in IL-22-treated mice compared to PBS-treated mice. Thus, IL-22 treatment directly activates myocardial STAT3 signaling pathway and prevents the myocardial infarction and apoptosis after IRI.

研究分野：循環器

キーワード：急性心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞(AMI)の急性期死亡率は経皮的冠動脈形成術(PCI)等の初期治療の進歩により著しい改善が得られたが依然死亡率は高い。我が国において急速な糖尿病、高血圧、脂質異常症の罹患率増加と同様に、AMI患者数は増加している。緊急PCIによる再灌流療法が普及した現在においても、傷害を受けた心臓はリモデリングを起し慢性期に左心機能低下を来して心不全を発症する。現在治療を受けている多くの慢性心不全患者の原因疾患として、この虚血性心不全の割合が半数を占めている(Packer M, *Am J Cardiol* 1999)。虚血性心筋症の予後は5年生存率40%前後と拡張型心筋症と並ぶ予後不良疾患である(Ito A, *Internal Med* 1992)。したがって心筋梗塞後の細胞死を抑制する事、及び梗塞後リモデリングを予防する事は非常に重要な課題である。

近年、IL-10ファミリーサイトカインの一つであるIL-22はJAK/STAT3経路を活性化し、肺、腸管、肝臓、腎臓等の組織保護や線維化抑制作用を有することが報告された(Mühl H, *British Journal of Pharmacology* 2013)。特に肝臓、腎臓においては、虚血再灌流障害に対する組織保護効果が示された(Ming-Jiang Xu, *J Am Soc Nephrol* 2014)。いずれの報告もIL-22によるJAK/STAT3経路の活性化が組織保護のメカニズムの一つとして挙げられている。自施設は心筋細胞におけるJAK/STAT3経路の活性化がマウス心筋梗塞後の心筋障害や、虚血再灌流障害を抑制し、結果梗塞範囲を縮小し、リモデリングを抑制することを報告している(Nagata T, *PLoS One* 2015)。

そこでIL-22が前述の肝臓、腎臓においてJAK/STAT3経路活性化を介し抗虚血作用を発揮したことと同様に、心筋細胞のJAK/STAT3経路を活性化し、心筋梗塞後再灌流障害、その後のリモデリングを抑制する可能性があると着想した。

2. 研究の目的

急性心筋梗塞による心筋障害、虚血再灌流障害に対するIL-22の作用を明らかにし、その機序を解明することである。

3. 研究の方法

野生型マウスで虚血再灌流モデルを作成し、IL-22関連分子の動態を解析する。また同モデルでIL-22投与群と非投与群でその障害の評価、比較を行い、メカニズム解明を行う。さらにIL-22K0マウスで虚血再灌流モデルを作成し、野生型マウスと比較し、裏付けを行う。並行してヒトの急性心筋梗塞患者の血清を採取しIL-22の動態を解析し、梗塞範囲や心機能評価との関連を解析する。

<IRモデルの解析>

A) IL-22、IL-22関連受容体、IL-22 binding protein(IL-22BP)の評価

野生型マウスでIRモデル作成後(0.5h、1h、3h、6h、24h)の心臓を摘出し、RT-PCRでIL-22、IL-22関連受容体、IL-22BPの動態をShamと比較し解析する。

B) IL-22投与による心筋障害への影響の評価
野生型マウスにIRモデルを作成し、IL-22投与群と非投与群に分け、24時間後の心臓を摘出し、EB、TTCの二重染色を行うことで梗塞範囲の2群間比較を行い評価する。

C) アポトーシス(細胞死)の評価
IRモデル作成24時間後、心臓を摘出しTUNEL染色を行い、アポトーシスの程度をIL-22投与群と非投与群で比較、評価する。

D) 細胞内シグナル伝達の評価
IRモデル作成後(0.5h、1h、3h、6h、24h)、心臓を摘出し、ウエスタンブロット法を用いて各種シグナル伝達分子の評価を行う。

E) IL-22K0マウスを野生型マウスにIRモデルを作成し、24時間後の心臓を摘出し、EB、TTCの二重染色を行うことで梗塞範囲の2群間比較を行い評価する。

4. 研究成果

IL-22もしくはIL-10投与後のマウス心臓と脾臓におけるSTAT3の活性化を、リン酸化STAT3のウエスタンブロットと免疫染色で測定した。IL-10による心臓での軽度のSTAT3活性化と比較し、IL-22による心臓でのSTAT3活性化は顕著であった(図1、2)。

図1

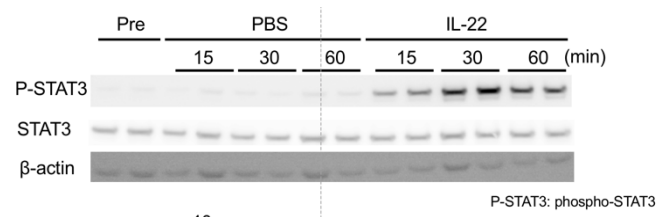
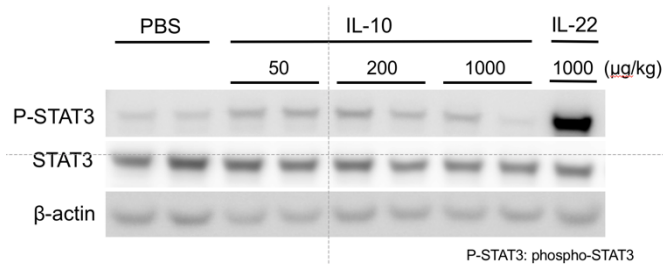
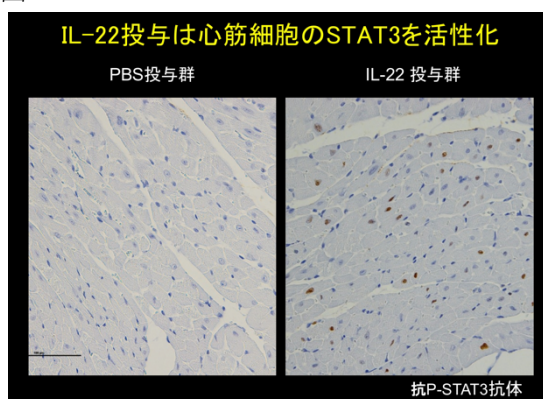


図2



免疫染色では IL-22 投与によって心筋細胞の STAT3 が活性化されていた (図 3)。

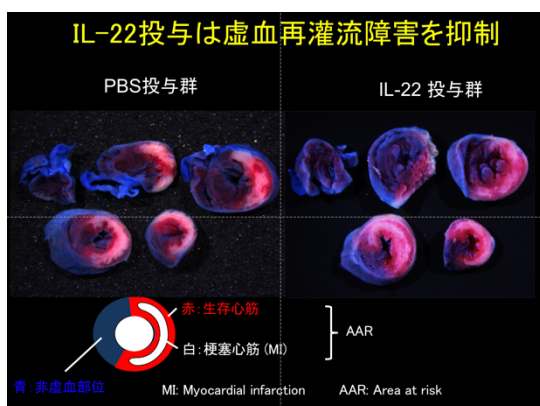
図 3



一方、IL-22 による脾臓での STAT3 活性化は観察されなかった。IL-22 の受容体である IL22RA1 の発現を real-time PCR と免疫染色で測定したところ、心臓および心筋細胞での IL22RA1 の発現を確認できた。次に、マウス冠動脈を 60 分間結紮後に再灌流を行う in vivo IRI モデルにおいて、IL-22 投与による梗塞サイズの抑制効果を Evans blue/TTC 染色で、アポトーシス抑制効果を TUNEL 染色で測定し PBS 投与群と比較評価した。再灌流 24 時間後の梗塞サイズは PBS 投与群に比べ、IL-22 投与群において有意に減少した。

再灌流後 3 時間における TUNEL 陽性細胞比率は PBS 投与群と比較し、IL-22 投与群で有意に減少していた (図 4)。

図 4



虚血再灌流後の細胞内シグナル伝達の評価に関しては、現時点で IL-22 投与群と PBS 投与群間で有意差がある分子は同定できていない。

<結果のまとめ>

- ① IL-22 は心筋細胞での STAT3 経路を活性化し、脾臓では活性化しない
- ② IL-10 と比較し、心臓での IL-22 による STAT3 活性化は顕著
- ③ IL22-RA1 mRNA は心臓に発現し、IL22-RA1 タンパクは心筋細胞に発現
- ④ IL-22 投与は心筋虚血再灌流後の心筋梗塞とアポトーシスを抑制

<結論>

IL-22 は心筋細胞の IL22RA1-STAT3 経路の活性化を介したアポトーシス抑制によって、心筋 IRI を抑制する。これらの結果は、IL-22 が造血・免疫系に作用しない直接心筋細胞に作用する心筋保護サイトカインであることを示している。

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)

The 82nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka, March 23, 2018

IL-10 Family Cytokine IL-22 Directly Activates Myocardial STAT3 Signaling Pathway and Prevents Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury

Jinya Takahashi, Mai Yamamoto, Hideo Yasukawa, Takanobu Nagata, Koutatsu Shimozono, Shoichiro Nohara, Toshiyuki Yanai, Daisuke Fukui, Tomoko Sasaki, Tatsuhiro Shibata, Kazutoshi Mawatari, Yoshihiro Fukumoto

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 甚彌 (TAKAHASHI JINYA)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 30647813

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()