

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09587

研究課題名(和文) 心筋リモデリングと心不全における非心室心筋細胞のJak/SOCS系の役割

研究課題名(英文) Role of Jak/SOCS within non-cardiomyocytes in cardiac remodeling and failure.

研究代表者

安川 秀雄 (Yasukawa, Hideo)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：60289361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではSTAT3の負の制御因子であるSOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3)の平滑筋特異的SOCSノックアウトマウス(SOCS3-smKOマウス)を作成し、心筋線維化、心外膜肥厚や梗塞後心不全における非心筋細胞のサイトカインシグナル制御の役割を解析した。SOCS3-smKOマウスが、加齢に伴い拡張不全、心筋線維化、心外膜肥厚、体重減少、血圧低下など多彩な表現型を確認した。これらの結果は、平滑筋細胞や線維芽細胞におけるSOCS3によるSTAT3の活性化制御が、拡張不全、心外膜肥厚、悪液質、血圧調節において重要であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではSTAT3の負の制御因子であるSOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3)の平滑筋特異的SOCSノックアウトマウス(SOCS3-smKOマウス)を作成し、心筋線維化、心外膜肥厚や梗塞後心不全における非心筋細胞のサイトカインシグナル制御の役割を解析した。SOCS3-smKOマウスが、加齢に伴い拡張不全、心筋線維化、心外膜肥厚、体重減少、血圧低下など多彩な表現型を確認した。これらの結果は、平滑筋細胞や線維芽細胞におけるSOCS3によるSTAT3の活性化制御が、拡張不全、心外膜肥厚、悪液質、血圧調節において重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we created smooth-muscle specific SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3) deficient mice (SOCS3-smKO), which is negative feedback regulator of JAK-STAT3 signaling pathway, and investigated the role of SOCS3 in non-cardiomyocyte in diastolic function, cardiac fibrosis, pericardial fibrosis, and post myocardial infarction heart failure. We found that SOCS3-smKO mouse exhibited a variety of phenotypes including diastolic function, pericardial fibrosis, cachexia, and hypotension. The expression of pro-fibrotic CTGF (connective tissue growth factor), PDGFb (platelet growth factor-b), and TGF (transforming growth factor) family genes including TGFb1, TGFb2, and TGFb3, were significantly increased in sm-SOCS3-KO mice hearts. Thus, smooth muscle cell-specific SOCS3 deletion induces increased pericardial fibrosis, cardiac interstitial fibrosis, and increased diastolic dysfunction in aging mice, possibly through the augmentation of pro-fibrotic growth factors.

研究分野：心臓病学

キーワード：心筋線維化 拡張不全 STAT3 SOCS3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全は様々な心疾患の終末的な病態であり、今後も著しい患者数と治療費の増加が予想されている。薬物療法やペースメーカー治療により生命予後の改善が示されているが、その生命予後は極めて不良であり新たな治療法の開発が期待されている。

梗塞後心不全のような左心室の収縮不全による心不全では、梗塞発症直後の心筋細胞死とその後の心筋リモデリングの進展をいかに予防するかが重要である。一方、加齢や高血圧が発症要因となる左心収縮能が保たれた心不全、即ち拡張不全による心不全が全体の3～5割存在し、有効な治療法がないため大きな問題となっている。拡張不全では心筋の線維化や炎症反応などが発症機序として重要と考えられる。また、心外膜の線維化、肥厚や硬化によって発症する収縮性心膜炎も拡張障害が主要な病態であり、難治性心不全となることが多く、発生分子機序に不明な点が多い。さらに、最近、心房のリモデリングや機能が心不全の発症に重要である可能性も報告されている。

Suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS)と SOCS3 は、活性化 STAT によって発現誘導され、JAK のキナーゼ活性を抑制しサイトカインの機能を負に制御する。われわれ、ウイルス性心筋炎による急性心不全や梗塞後心不全、再灌流心筋傷害マウスモデルにおいて、心筋の SOCS1 と SOCS3 抑制により心不全の病態が改善することを報告している。一方、心筋特異的 SOCS3 欠損マウス(SOCS3-cKO)が加齢とともに左心室の収縮不全と拡大を呈し心不全を発症することを明らかにしている。このように、心筋の JAK-STAT 経路とその制御系である SOCS 分子が、心筋保護機構や心筋リモデリング、心不全の発症に重要であることが次第に明らかになっている。

我々はすでに血管平滑筋特異的 SOCS3 欠損マウス(SOCS3-smKO)が、アンジオテンシン II を投与することによって、心筋線維化が増悪すること、また、興味深いことに心外膜の線維化と肥厚も増強されることを見いだしている。

2. 研究の目的

SOCS は JAK-STAT 経路の内因性のネガティブフィードバック因子である。我々はこれまでに心筋細胞の SOCS3 が虚血に対する心筋保護機構、梗塞後心筋リモデリングや心不全において重要であることを明らかにしてきた。本研究の目的は、心不全の病態における、心房心筋、血管平滑筋や内皮細胞における JAK-STAT 経路と SOCS1、SOCS3 の役割を明らかにし、心不全の新規治療法開発のための基盤となる研究を行うことである。

3. 研究の方法

血管平滑筋特異的 SOCS3 欠損(SOCS3-smKO)マウスにアンジオテンシン II 時に認められる心筋線維化や心外膜の肥厚の増強について、心筋肥大や収縮機能、拡張機能などを詳細に検討する。また、SOCS1-smKO マウス、STAT3-smKO マウスについても同様に詳細に解析を加える。さらに、心房筋特異的 SOCS3 欠損マウス(SOCS3-sInKO)と SOCS1-sInKO マウス、さらに、STAT3 sInKO マウスを作成し、アンジオテンシン II 投与モデル、梗塞後心不全モデルや圧負荷モデルを作成し、心室リモデリングと心不全の病態における心房心筋の JakSTAT 経路とその制御因子である SOCS1 と SOCS3 の役割が明らかにする。

【平成29年度】

1. 平滑筋遺伝子欠損マウスにおける AngII 投与モデルの解析

1-1: SOCS3-smKO マウスにおける心臓線維化の評価

SOCS3-smKO マウスに AngII を2週間持続投与し、H&E 染色とシリウスレッド染色による心筋線維

化や心外膜の肥厚などを評価し、野生型マウスと比較評価する。予備実験では、AngII 投与によって、SOCS3-smKO マウスにおいて心筋間質と血管周囲の線維化が増強し、心外膜の肥厚が顕著であることを見いだしている。TGF β や LOX など線維化関連遺伝子の発現を real-time PCR で評価する。また、心筋、平滑筋と線維芽細胞マーカーと BrdU 取り込み、Ki67 など細胞増殖のマーカーの2重免疫染色を行い細胞増殖についての2重免疫染色を行い細胞増殖についても評価する。

1-2: SOCS3-smKO マウスにおけるシグナル活性化の評価

ウエスタンブロットにより、心臓のリン酸化 STAT3、リン酸化 AKT などの発現をに経時的に評価し、野生型マウスと比較評価する。また、心筋、平滑筋と線維芽細胞のマーカーとリン酸化 STAT3 の2重免疫染色を行う。SOCS3 の発現は real-time PCR で評価する。

1-3: SOCS3-smKO マウスにおける心肥大と心機能の評価

心臓と体重比、H&E 染色や心エコーで AngII による心肥大を評価する。心エコーで心機能の評価を行い、ミラーカテテルを用いた心内圧の測定を行い、心収縮能と拡張能を測定する。

1-4: SOCS3-smKO マウスにおける炎症の評価

マクロファージ(Iba1)やT細胞(CD4)、好中球(Ly6g)などの免疫染色と炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を real-time PCR array で評価する。

1-5: SOCS1-smKO、STAT3-smKO マウスについても同様に評価する。

2. 平滑筋遺伝子欠損マウスにおける梗塞後心不全モデルの解析

SOCS3-smKO マウスに左前下降枝結紮により梗塞後心不全モデルを作成し、左心室体重比、AZAN 染色、心エコーなどを行い、梗塞サイズや心機能評価を行い野生型マウスと比較評価する。上述の AngII 投与モデルと同様に、細胞内シグナルの活性化、炎症細胞浸潤、線維化や遺伝子発現などの評価を行う。また、SOCS1-smKO、STAT3-smKO マウスについても同様に評価する。

3. 心房筋特異的遺伝子欠損マウスの作成

サルコリピン Cre ノックインマウス(慈恵医大医学部南沢亨教授より供与)と SOCS1-flox、SOCS3-flox マウスと STAT3-flox マウスをそれぞれ交配し、心房筋特異的 SOCS3 欠損マウス(SOCS3-slnKO)と SOCS1-slnKO と STAT3 slnKO マウスを作成する。

【平成30年度】

1. 心房筋特異的遺伝子欠損マウスにおける梗塞後心不全モデルの解析

SOCS3-slnKO マウス、SOCS1-slnKO と STAT3 slnKO マウスに上述のように、梗塞後心不全モデルを作成する。右心房重量・体重比、左心房重量・体重比の測定、心房の組織学的解析(HE 染色、AZAN 染色)、遺伝子発現(線維化、炎症関連遺伝子)、細胞内シグナル伝達分子の活性化(STAT3、AKT、ERK1/2)、TUNEL 染色によるアポトーシスなどを評価する。左心室についても同様に評価し、心エコーで心機能を含めた評価を行う。

2. 心房筋特異的遺伝子欠損マウスにおける圧負荷モデルの解析

SOCS3-slnKO マウス、SOCS1-slnKO と STAT3 slnKO マウスに大動脈縮窄圧負荷モデル(TACモデル)を作成し、同様に心房と心筋について解析を行う。

上記の実験と解析で、SOCS3-smKO マウスにおける AngII 投与モデルのように、興味深い表現型(心筋線維化亢進、心外膜の著明な肥厚)が得られた場合は、網羅的な遺伝子解析(RNA sequence、miRNA アレイ)やサイトカインの評価(マルチプレックスアッセイ)などを行う。

【平成31年度】

引き続き前年度までに得られた結果について解析を進める。

開胸術後に切開した心膜を温存させ、心臓を回収するときに心膜も観察できるようにする。このとき、心膜の線維化、肥厚や炎症反応などが、SOCS3-smKO マウスや STAT3-smKO マウスでどのようになるかを明らかにする。また、収縮性心膜炎患者の手術時に心外膜を採取し、同様に線維化、炎症細胞浸潤、STAT3 などのシグナル伝達分子の活性化、および SOCS ファミリーや炎症性サイトカインなどの遺伝子発現などを明らかにする。

4. 研究成果

平滑筋特異的 SOCS ノックアウトマウスの表現系の解析

平滑筋特異的 SOCS ノックアウトマウス(SOCS3-smKO マウス)の寿命が野生型マウスに比べて明らかに短いことを明らかにした。SOCS3-smKO マウスは生後半年より野生型マウスに比べ体重が減少した。また、半年以降は明らかに血圧が低値となることも明らかとなった。SOCS3-smKO マウスの心臓は生後半年より野生型マウスに比べ心重量が増加した。心エコーでは、一部のマウスで左心収縮能が低下し、拡張不全を来した。組織解析では、心筋線維化と心外膜肥厚が亢進していた。SOCS3-smKO マウスの心臓では、心外膜での STAT3 のリン酸化が亢進していた。Real-time PCR 解析では、SOCS3-smKO マウスの心臓で TGFbeta ファミリーサイトカインの発現が亢進していた。

平滑筋特異的遺伝子欠損マウスにおける梗塞後心不全モデルの解析

SOCS3-smKO マウスに左前下降枝結紮により梗塞後心不全モデルを作成したところ、WT マウスに比べ、シリウスレッド染色で梗塞巣の心筋線維化の著名な亢進を認めた。心エコーでは心機能低下が抑制されていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohno-Urabe S, Aoki H, Nishihara M, Furusho A, Hirakata S, Nishida N, Ito S, Hayashi M, Yasukawa H, Imaizumi T, Akashi H, Tanaka H, Fukumoto Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Role of Macrophage Socs3 in the Pathogenesis of Aortic Dissection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc	6. 最初と最後の頁 e007389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.117.007389.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirakata S, Aoki, Ohno-Urabe, Nishihara, Furusho, Nishida, Ito, Hayashi, Hideo Yasukawa, Imaizumi, Hiromatsu, Tanaka, Fukumoto.	4. 巻 5
2. 論文標題 Genetic deletion of Socs3 in smooth muscle cells ameliorates aortic dissection in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JACC Basic Transl Sci.	6. 最初と最後の頁 126-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2019.10.010. eCollection 2020 Feb.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishida N, Aoki H, Ohno-Urabe S, Nishihara M, Furusho A, Hirakata S, Hayashi M, Ito S, Yamada H, Hirata Y, Yasukawa H, Imaizumi T, Tanaka H, Fukumoto Y	4. 巻 40
2. 論文標題 High salt intake worsens aortic dissection in mice: involvement of IL-17A-dependent extracellular matrix metabolism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arterioscler Thromb Vasc Biol	6. 最初と最後の頁 189-205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/ATVBAHA.119.313336. Epub 2019 Nov 7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 akahashi J, Yamamoto M, Yasukawa H, Nohara S, Nagata T, Shimozono K, Yanai T, Sasaki T, Okabe K, Shibata T, Mawatari K, Kakuma T, Aoki H, Fukumoto Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Interleukin-22 Directly Activates Myocardial STAT3 Signaling Pathway and Prevents Myocardial Ischemia Reperfusion Injury.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 e014814
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.119.014814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yamamoto M, Yasukawa H, Takahashi J, Shimozono K, Mawatari K, Nagata T, Nohara S, Sasaki T, Shibata T, Yanai T, Fukumoto Y
2. 発表標題 Interleukin-22 deletion promotes cardiac rupture after acute myocardial infarction in mice
3. 学会等名 European Society of Cardiology (ESC) Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto M, Yasukawa H, Takahashi J, Nohara N, Sasaki T, Shimozono K, Shibata T, Yanai T, Mawatari K, Nagata T, Fukumoto Y
2. 発表標題 Lack of Interleukin-22 Increases Cardiac Rupture After Myocardial Infarction in Mice
3. 学会等名 The American Heart Association, The 91th Scientific Sessions (AHA2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahashi J, Yamamoto M, Yasukawa H, Nagata T, Shimozono K, Nohara S, Yanai T, Fukui D, Sasaki T, Shibata T, Mawatari K, Fukumoto Y
2. 発表標題 IL-10 Family Cytokine IL-22 Directly Activates Myocardial STAT3 Signaling Pathway and Prevents Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本真衣、安川秀雄、高橋甚彌、野原正一郎、佐々木知子、下園弘達、柴田龍宏、楊井俊之、岡部浩太、福本義弘
2. 発表標題 心筋梗塞後の組織修復におけるIL-22の役割
3. 学会等名 第19回日本NO学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamamoto M, Yasukawa H, Takahashi J, Shimozone K, Mawatari K, Nagata T, Nohara S, Sasaki T, Shibata T, Yanai T, Fukumoto Y.
2. 発表標題 Interleukin-22 Deletion Promotes Cardiac Rupture after Acute Myocardial infarction in Mice.
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Researc (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本真衣、安川秀雄、高橋甚彌、野原正一郎、佐々木知子、下園弘達、柴田龍宏、楊井俊之、岡部浩太、馬渡一寿、福本義弘
2. 発表標題 心筋梗塞後の創傷治癒におけるIL-22の役割.
3. 学会等名 第127回日本循環器学会九州地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yanai T, Yasukawa H, Mawatari K, Sasaki T, Takahashi J, Nohara S, Shimozone K, Shibata T, Okabe K, Yamamoto M, Fukumoto Y
2. 発表標題 Increased pericardial fibrosis and cardiac dysfunction in smooth muscle cell-specific SOCS3 deficient mice
3. 学会等名 ESC Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----