

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 17 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791758

研究課題名（和文） 敗血症性心不全に対する心筋細胞保護の分子機構-サイトカインシグナル制御の視点から

研究課題名（英文） The molecular mechanism of cardiomyocyte protection against LPS-induced heart failure -From the regulation of cytokine signaling

研究代表者

二又 誠義 (FUTAMATA NOBUYOSHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70412509

研究成果の概要（和文）： Balb/c マウスと心筋特異的 SOCS3 欠損マウス（以下 SOCS3CKO マウス）に LPS を腹腔内投与した。SOCS3CKO マウスでは LPS 投与後の生存率を改善した。SOCS3CKO マウスでは LPS 投与後の LVEF の低下を抑制していた。SOCS3CKO マウスでは LPS 投与後の DHE 陽性細胞の発現を抑制していた。SOCS3CKO マウスでは LPS 投与後の p-STAT3 の発現が増強し持続していた。SOCS3CKO マウスでは Bcl-xl は LPS 投与後より発現が亢進し、チトクロム c の細胞質への放出を抑制していた。SOCS3CKO マウスでは LPS 投与後の Oxphos complex I、III の発現の低下を抑制していた。SOCS3CKO マウスで LPS 投与後に superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin reductase, peroxide thioredoxin の mRNA が亢進していた。以上より、心筋での SOCS3CKO の欠失は p-STAT3 の増強と心筋内の抗酸化物質の発現の増加、ミトコンドリア膜の安定化により、LPS 投与後の心不全を改善したことが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Lipopolysaccharide(LPS) was injected intraperitoneally in Balb/c and cardiac-specific SOCS3 knockout mice (SOCS3-CKO). SOCS3-CKO mice showed greater survival rate than WT mice after LPS injection. Left ventricular ejection fraction (LVEF) was restored to the baseline in SOCS3-CKO mice after LPS injection. DHE positive cells in cardiomyocytes were reduced in SOCS-CKO mice. The duration and intensity of STAT3 phosphorylation after LPS injection was greater in SOCS3-CKO mice than WT mice. Bcl-xL expression was increased and cleaved caspase3 expression and cytochrome c release were decreased in SOCS3-CKO mice. SOCS3-CKO mice prevents the depletion of Oxphos complexes I and III after LPS injection. We found that expressions of multiple antioxidants genes including superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin reductase, peroxide thioredoxin were markedly upregulated in SOCS3-KO hearts after LPS injection. Our data show that the deletion of SOCS3 in cardiomyocytes prevents the LPS-induced LV dysfunction in mice via augmenting the STAT3 signaling and stabilizing mitochondria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：(1) 敗血症 (2) 心不全 (3) JAK/STAT (4) SOCS3 (5) ミトコンドリア (6) 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症(sepsis)はグラム陰性桿菌の細胞膜にある lipopolysaccharide(LPS)の血中への流入とそれによる全身の炎症反応によるものであり、発症後早期に循環不全、凝固系の亢進、臓器障害などを合併し、ショック、DIC、多臓器不全などから早晩死に至る予後の悪い疾患である。治療成績も決して良好ではない。(Parrillo JE et al. N Eng J Med 2005)

(2) 敗血症患者の血液内には TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインが高濃度に存在している。(Crit Care Med 2000) このため、TNF- α 中和抗体や IL-1 抗体などの抗サイトカイン治療の臨床試験が行われたがいずれも失敗に終わった。これは、種々のサイトカインが分泌されている状態で、単一サイトカインの中和が効果をなさないことが意味される。現在のところ、敗血症性ショックの治療は、適切な輸液と昇圧による循環維持しかなく、炎症性メディエーターに対する特異的な治療は特にない。(Dünser MW et al. Crit Care Med 2008)

(3) 敗血症患者の 40-50%に左心機能の障害を合併し、敗血症の予後をさらに悪化させることが知られている。敗血症発症 24 時間以内に左室収縮能低下が観察されるが、数日経つと心機能は改善するため、可逆性の心機能障害が示唆されている。近年、動物実験により、エンドトキシン誘発心不全モデルにおけるいくつかの知見が得られてきている。心収縮能の低下のメディエーターとしてエンドトキシン、炎症性サイトカイン、フリーラジカルなどが挙げられ、心機能低下の病態生

理としてはミトコンドリア機能不全、心筋細胞のアポトーシス、微小循環不全などが考えられているが、そのメカニズムは明らかではなく、(Weber C et al. circulation 2007)臨床応用もまだなされていない。

(4) 敗血症性心不全は可逆性である。マウス敗血症モデルでは敗血症の際の心筋灌流は低下していないものの、解糖系のエネルギー産生の亢進が見られており、心筋虚血の際の hibernation の状態に類似していることが証明されてきた。(LevyWJ et al. Crit Care Med 2005)

しかしながら心不全状態でのミトコンドリアの回復の機序は不明である。

(5) 生存シグナルとしての JAK-STAT 経路と SOCS による制御

IL-1 や TNF α などの炎症性サイトカインは細胞死を誘発する因子として働く一方で、Leukocyte Inhibitory Factor(LIF)、cardiotrophin1 (CT1) などの gp130 受容体に結合するサイトカインは細胞死を抑制する因子として働くことが示されている。gp130 の下流の Jak、STAT3 の活性化により生存シグナルの増強が促される。Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3)はSTAT3 によって発現が誘導され、サイトカインの機能を負に調節する。(Yasukawa H, EMBO J. 1999, Yasukawa, Annu Rev Immunol. 2000)

特に、SOCS3 は gp130-STAT3 経路を強力に抑制することが明らかになっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は敗血症に合併する心不全の病態の解明と、細胞内シグナルである Jak2-STAT3 経路と、その制御因子である Suppressor of cytokine signaling (SOCS3) による心不全の抑制機序の解明を行う。

具体的な研究目的は以下のとおりである。

(1) 敗血症性心不全における心機能低下の原因について病態の解明を行う。

(2) SOCS3 欠損マウスにおける、敗血症性心不全を抑制する機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス敗血症性心不全モデルについての解析

8 週令の Balb/c マウスに lethal dose の LPS(30mg/kg/mouse)を腹腔内投与し、以下の項目を測定する。

① LPS 投与前、投与 3 時間後、6 時間後、9 時間後、12 時間後の心機能を心エコーにより評価を行う。

② LPS 投与 24 時間後の心筋組織における炎症細胞の浸潤を組織学的に評価する。

③ 心筋活性酸素量と心筋細胞アポトーシスの評価として LPS 投与後の心筋組織にて DHE 染色、TUNEL 染色を行う。LPS 投与前、投与 6 時間後の心筋組織において Real time super array やウエスタンブロットにて心筋細胞のアポトーシス関連分子 (チトクロム c, Bcl-x, Bcl-2, caspase 9, caspase 3) を測定する。

(2) 心筋特異的 SOCS3 欠損マウスにおける敗血症モデルについての解析

8 週令の Balb/c マウスと心筋特異的 SOCS3KO マウスに lethal dose の PS(30mg/kg/mouse)を腹腔内投与し、(1) で述べた項目について評価を行う。

(3) Jak-STAT 経路と心筋ミトコンドリア機能保持機構の関連についての研究

ミトコンドリアの機能保持に関与する項目として wild type と心筋特異的 SOCS3 欠損マウスの両群で次の項目を測定する。

① Van Remmenらの方法に従い(Van Remmen et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001)、心筋細胞より採取したミトコンドリア分画の蛋白において、LPS投与前、1 時間後、3 時間後、6 時間後、9 時間後の呼吸鎖複合体の各分画の

活性をウエスタンブロットにて測定する。

② LPS 投与前、1 時間後、3 時間後、6 時間後、9 時間後の STAT3、ERK、Akt などの細胞内シグナルの発現の経時的変化をウエスタンブロットにて評価する。

③ ミトコンドリア膜安定化作用を有する蛋白である Bcl-xl、Bcl-2 について、LPS 投与前、1 時間後、3 時間後、6 時間後、9 時間後の発現の変化をウエスタンブロットにて確認する。

4. 研究成果

(1) 8 週令の Balb/c マウスと心筋特異的 SOCS3 欠損マウス (以下 SOCS3CKO マウス)に LPS(30mg/kg/mouse)を腹腔内投与し、両群で比較を行った。Wild type では LPS 投与 6 時間後より死亡し、24 時間以内に全例死亡した。SOCS3CKO マウスでは LPS 投与 6 時間後より生存率を改善した。

(2) wild type と SOCS3CKO マウスの LPS 投与後の心機能を心エコーで評価した。wild type では LPS 投与 6 時間後より LVEF の減少、LVDd の拡大を認めたが、SOCS3CKO マウスではそれぞれを有意に抑制していた。

(3) LPS 投与 6 時間後の心筋組織を DHE 染色したところ、SOCS3CKO マウスでは DHE 陽性細胞の発現強度を抑制していた。これは SOCS3CKO マウスにおいて LPS 投与後の酸化ストレスの発生を抑制していることが示唆された。

(4) Wild type では LPS 投与 1 時間後より p-STAT3 の発現が増強したが、6 時間後以降では SOCS3 の発現により抑制されていた。SOCS3CKO マウスでは LPS 投与後の p-STAT3 の発現は増強し持続していた。

(5) wild type では LPS 投与後 6 時間後より、Bcl-xl の発現が低下し、cleaved caspase3 の発現、チトクロム c の細胞質への放出が増加していた。SOCS3CKO マウスでは Bcl-xl、の発現が亢進し、cleaved caspase3 の発現、チトクロム c の細胞質への放出を抑制していた。

(6) (5)はSOCS3CKOマウスではLPS投与後にミトコンドリア膜の安定化が行われていたことが示唆された。wild typeではLPS投与後のOxphos complex I、IIIの発現の低下を認めた。SOCS3CKOマウスではOxphos complex I、IIIの発現の低下を抑制していた。

(7)SOCS3CKOマウスにおいてLPS投与後にMnSOD, catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin reductase, peroxide thioredoxinのmRNAが亢進していた。

以上より、SOCS3CKOマウスではLPS投与後のp-STAT3の増強により、心筋内の抗酸化物質の発現の増加、ミトコンドリア膜の安定化により、心筋内の酸化ストレスの発生を抑制することで、心機能を保持し生存率を改善したことが示唆された。

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0件)

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

二又 誠義 (FUTAMATA NOBUYOSHI)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：70412509

(2)研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()
研究者番号：