

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860061

研究課題名(和文) 心筋組織幹細胞におけるSTAT3/Pim-1シグナルの解析と創薬標的の探索

研究課題名(英文) Analyses of biological significance of STAT3/Pim-1 signaling in cardiac stem cells

研究代表者

毛利 友美 (Mohri, Tomomi)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20572960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心臓は再生能が低い組織と考えられてきたが、心筋組織に幹細胞が存在することが知られるようになり、その生物学的機能に注目が集まっている。我々はこれまで、IL-6ファミリーサイトカインが、STAT3/Pim-1シグナルを介して、心筋組織幹細胞を血管内皮細胞に分化誘導し組織修復に寄与する可能性を提唱してきた。本研究では、同ファミリーに属するIL-27が、心筋梗塞や心筋炎モデルにおいて傷害慢性期に発現増強すること、IL-27がSTAT3/Pim-1シグナルを介して心筋組織幹細胞を血管内皮細胞に分化誘導することを見出した。併せて、Pim-1の下流にあるPim-1キナーゼの基質となる分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Since cardiomyocytes cease to proliferate immediately after birth, it has been believed that hearts have limited capacity of regeneration. Recently, several kinds of cardiac resident stem cells have been identified and much attention has been paid to their biological functions. So far, we revealed that that IL-6 family cytokines induce endothelial differentiation of cardiac Sca-1+ stem cells through STAT3/Pim-1 pathway. In this study, we have demonstrated that the myocardial expression of IL-27, a member of IL-6 cytokine family, is upregulated at chronic phase of myocardial infarction and myocarditis and that IL-27 functions as a novel regulator of the trans-differentiation of cardiac stem cells into endothelial cells through STAT3/Pim-1 pathway. We also explored the downstream targets of STAT3/Pim-1 pathway and identified a candidate substrate of Pim-1 kinase in cardiac stem cells.

研究分野：循環薬理学

キーワード：サイトカイン 心筋組織幹細胞 IL-27

1. 研究開始当初の背景

これまで、研究代表者は、IL-6 ファミリーサイトカインが、心筋組織幹細胞を血管内皮細胞へと分化誘導し、血管形成を介して心筋組織の恒常性維持に寄与する可能性を提唱してきた。また、その過程で、STAT3/Pim-1 シグナルが重要な役割を演じていることを報告してきた。しかしながら、IL-6 ファミリーサイトカインの多くは、組織傷害の急性期に発現増強するものの、血管形成が盛んに誘導される炎症後期に発現増強するサイトカインはあまり知られていない。また、STAT3/Pim-1 シグナルの下流に関して、どのような分子が機能しているかは不明であった。

2. 研究の目的

上述の背景に基づき、本研究では、

(1) STAT3/Pim-1 シグナルの上流の解析：心筋組織傷害慢性期に発現増強するサイトカインを同定し、心筋組織幹細胞の分化に対する影響を検討すること

(2) STAT3/Pim-1 シグナルの下流の解析：Pim-1 キナーゼの基質を同定し、血管内皮細胞への分化における意義を明らかにすること

を目的とする。

3. 研究の方法

心筋組織幹細胞として、Sca-1 陽性心筋組織幹細胞を用いた。成体 (Adult) マウス心臓をコラゲナーゼで分解し、magnetic cell sorting 法により調整した。調整した細胞は、bFGF、Insulin、LIF を含む幹細胞維持培養液で維持し、実験は、これらのサイトカインを含まない培養液に IL-27 を加えて行った。サイトカイン、サイトカイン受容体、細胞マーカー等 mRNA の発現に関しては、RT-PCR および定量的 RT-PCR 法を用いた。使用したプライマーを下表に示す；

Genes	Direction	Sequence
VE-cadherin	Forward	5'-ATCTTCCTCTGCATCCTCAC-3'
	Reverse	5'-GTAAGTGACCAACTGCCTCGT-3'
CD31	Forward	5'-GAGCCCAATCAGCTTTCAGTTT-3'
	Reverse	5'-TCCTTCCTGCTCTCTGCTAGCT-3'
Flk-1	Forward	5'-TGCCGGCATGGTCTCTCTGAGG-3'
	Reverse	5'-CATTGAGCTCTGTTCTCGCTGTAC-3'
Nlx-2.5	Forward	5'-CAGTGGAGCTGGACAAGCC-3'
	Reverse	5'-TTGTAGCCAGCGTTCTGGAA-3'
Calponin	Forward	5'-GCACATTTTAAACGAGGTCC-3'
	Reverse	5'-TGACCTTCTTCAAGAAACC-3'
IL-12Rβ1	Forward	5'-CAGGGACCAGCAAAACATC-3'
	Reverse	5'-TTCCTGGGTCTAAGGGTGA-3'
IL-12Rβ2	Forward	5'-GACTCGACAGCACAACTGA-3'
	Reverse	5'-TTGGGGACTTTCACCAGCAG-3'
IL-23R	Forward	5'-TTGGTATGGTCCAAAGCTGT-3'
	Reverse	5'-TCGTTTGTAGTCTCAGCCCT-3'
IL-27R	Forward	5'-AAGGCACAGGAAACCGTTG-3'
	Reverse	5'-AATCCCAAACCTGAGGGTGC-3'
p28	Forward	5'-AGCCTGTTGCTGCTACCTTGC-3'
	Reverse	5'-GTGGACATAGCCCTGAACCTCA-3'
EBI3	Forward	5'-TCTTCCTGCTCACTGCGCTCTG-3'
	Reverse	5'-AGTTGGGAGCTGGAGAGGAGT-3'
GAPDH	Forward	5'-CATCACCATTCTCCAGGACCG-3'
	Reverse	5'-GAGGGCCATCCACAGTCTTC-3'

Pim-1 キナーゼの基質の探索には、Phos-tag と抗リン酸化 RXXXS/T 抗体を用いて探索することとした。抗リン酸化 RXXXS/T 抗体を用いた根拠としては、Akt と Pim-1 との基質

特異性に共通性があることによる。また、リン酸化蛋白質を粗精製するために Phos-tag カラムを用いた。

動物実験は、大阪大学薬学研究科動物実験委員会の承認のもとに行った。

心筋梗塞モデルは、雄性 C57Bl/6 マウスを人工呼吸器で呼吸管理し開胸、冠動脈前下行枝を結紮後閉胸することにより作製した。

自己免疫性心筋炎モデルに関しては、雄性 Balb/c マウスをミオシン重鎖ペプチドで2回免疫することにより作製した。このモデルでは、初回免疫後3週目に傷害のピークを向かえ、その後組織修復がはじまる。

4. 研究成果

(1) STAT3/Pim-1 シグナルの上流の解析

マウス病態モデルとして、心筋梗塞 (MI) モデル、実験的自己免疫性心筋炎 (EAM) モデルを用いて、病態の進行と IL-6 ファミリーサイトカインの発現を検討したところ、IL-27 の構成サブユニットである p28 と EBI3 の mRNA 発現が、何れのモデルにおいても慢性期にまで持続上昇していることを見出した (図 1)。

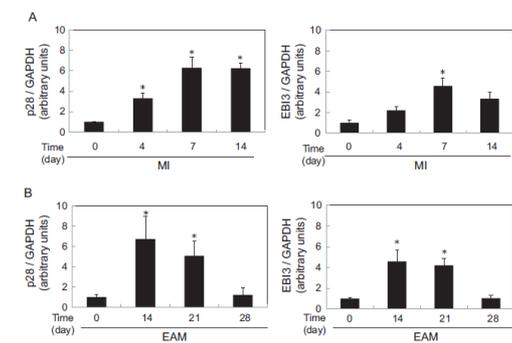


図 1. IL-27 は MI、EAM 心筋で発現増強する

そこで、次に、心筋組織幹細胞が IL-27 の受容体を発現しているかどうかを RT-PCR により検討した。その結果、心筋組織幹細胞に IL-27 受容体 (IL-27R) が発現していること、また、免疫組織学的検討から、Sca-1 陽性細胞のほぼ 100% が IL-27R を発現していることを確認した (図 2)。

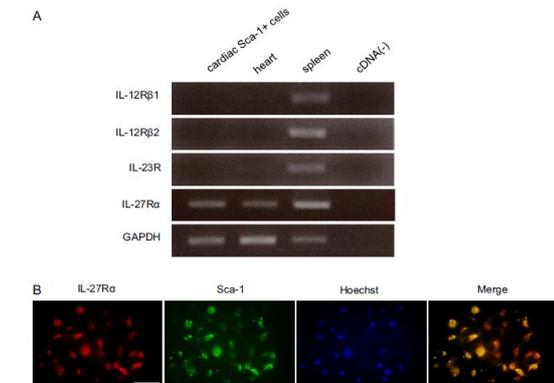


図 2. 心筋組織幹細胞における IL-27 受容体の発現 A. RT-PCR による解析、B. 蛍光免疫染色による解析

次に、IL-27 刺激が心筋組織幹細胞を血管内皮細胞に分化誘導するかどうかを検討した。その結果、用量依存性に血管内皮マーカーである VE-カドヘリン、CD31 の発現を誘導した (図 3)。

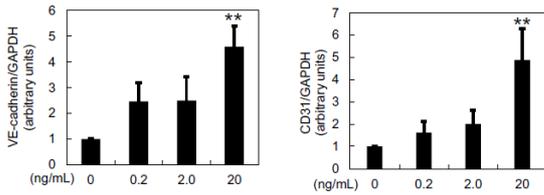


図 3. IL-27 による血管内皮マーカー遺伝子の発現誘導

IL-27 の心筋組織幹細胞におけるシグナル伝達系を検討した。その結果、IL-27 は心筋細胞において、STAT3 を活性化することが明らかになった (図 4)。また、その活性化は、IL-27 刺激後 5 分後から認められることを確認している。

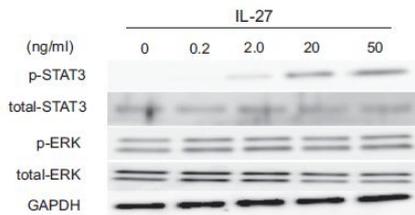


図 4. IL-27 は心筋組織幹細胞において STAT3 を活性化

これまで、IL-6 ファミリーサイトカインが心筋組織幹細胞を血管内皮細胞に分化誘導する過程で、STAT3/Pim-1 シグナル伝達系が必須であることを報告している。そこで、IL-27 刺激で、心筋組織幹細胞において、Pim-1 キナーゼが発現誘導されるかどうかを検討した (図 5)。その結果、IL-27 刺激により、Pim-1 mRNA (図 5A)、蛋白質 (図 5B) とともに発現が誘導されることを見出した。

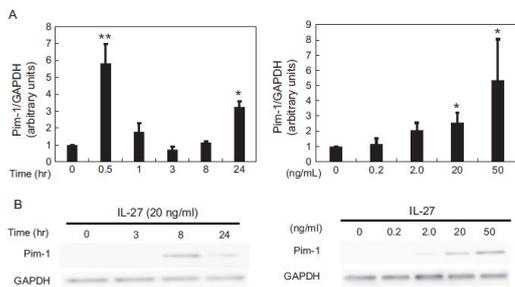


図 5. IL-27 刺激は、心筋組織幹細胞において Pim-1 の発現を誘導する A. mRNA B. 蛋白質

次に、IL-27 による Pim-1 の発現増強が STAT3 を介しているかどうかを抑制型 STAT3 (dnSTAT3) アデノウイルスベクターを用いて検討した。その結果、dnSTAT3 を過剰発現し

た細胞では、IL-27 刺激によっても Pim-1 の発現は認められなかったことから、IL-27 による Pim-1 の発現誘導には、STAT3 が必須であることが明らかになった (図 6)。

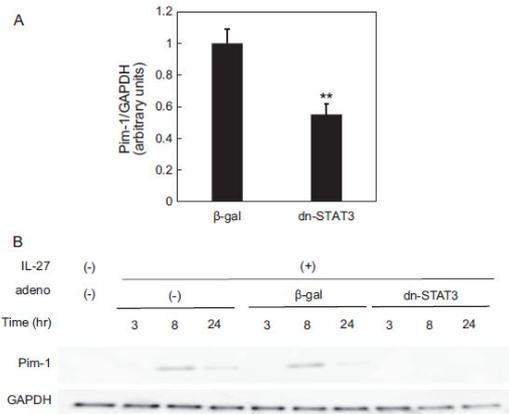


図 6. IL-27 による Pim-1 の発現誘導には、STAT3 の活性化が必須である A. mRNA、B. タンパク質、β-gal: コントロールベクター、dnSTAT3: 抑制型 STAT3 発現ベクター

最後に抑制型 Pim-1 (dn-Pim-1) が心筋組織幹細胞の分化に与える影響を検討した。その結果、dn-Pim-1 を過剰発現した細胞では、IL-27 刺激による血管内皮細胞への分化能が低下することが明らかになった (図 7)。

以上のことから、IL-27 が心筋傷害の慢性期に発現誘導されること、IL-27 は心筋組織幹細胞に作用し、STAT3/Pim-1 を介して血管内皮細胞への分化を誘導することが明らかになった。

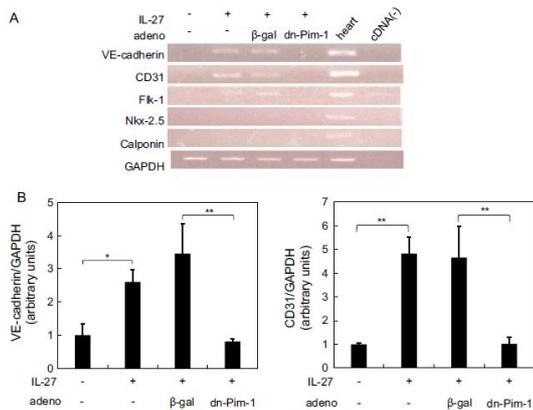


図 7. 抑制型 Pim-1 の過剰発現により IL-27 のよる血管内皮細胞への分化は阻害される A. RT-PCR、B. real time RT-PCR

(2) STAT3/Pim-1 シグナルの下流の解析 Pim-1 の基質を探索するために、野生型 Pim-1 アデノウイルスを作製した。その後心筋組織幹細胞に当該ウイルスを感染させ、リン酸化が促進されるタンパク質の同定を試みた。当初は、Phos-tag によるプロテオミクス法により intensity が増強するバンドを探索しよう

としたが、非特異的なシグナルが強すぎるために方針を変更した。

次に、Pim-1 キナーゼと Akt とのリン酸化モチーフに共通性があるため、Akt のリン酸化基質を検出する抗体である抗リン酸化 RXXXS/T 抗体を用いて探索した。すなわち、心筋組織幹細胞に野生型 Pim-1 アデノウイルスベクターを感染させ、抗リン酸化 RXXXS/T 抗体でウエスタンブロットしたところ 30kDa、50kDa、100kDa 程度の分子量を持った基質が存在することが明らかになった。そこで、野生型 Pim-1 アデノウイルスベクターを感染させた心筋組織幹細胞から蛋白を抽出し、Phos-tag カラムを用いてリン酸化蛋白質を粗精製し、SDS-PAGE 後ニトロセルロース膜にブロットした。ニトロセルロース膜のリン酸化バンド近辺を切り出し、プロテオミクス解析を行った。現在、Pim-1 の基質となる蛋白質を一つ同定した。

今後、当該分子のリン酸化が心筋組織幹細胞の血管内皮細胞への分化に関係するかどうか、

当該分子の siRNA によるノックダウン実験
リン酸化部位にアラニン変異を加えたアデノウイルスベクターの作製実験
により検討する予定である。

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 4 件)

Mohri, T., Ueno, M., Nagahama, Y., Gong, Z-Y., Asano, M., Oshima, H., Oshima, M., Fujio, Y., Takakura, N. Requirement of SLD5 for early embryogenesis. PLoS One 2013; 8: e78961

Kumagai, S., Matsui, K., Kawaguchi, H., Yamashita, T., Mohri, T., Fujio, Y., Nakayama, H. Cathelicidin antimicrobial peptide inhibits fibroblast migration via P2X7 receptor signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013; 437: 609-14

Matsuo, R., Morihara, H., Mohri, T., Murasawa, S., Takewaki, K., Nakayama, H., Maeda, M., Fujio, Y. The inhibition of N-glycosylation of glycoprotein 130 molecule abolishes STAT3 activation by IL-6 family cytokines in cultured cardiac myocytes. PLoS One 2014; 9: e111097

Tanaka, T., Obana, M., Mohri, T., Maeda, M., Fujio, Y. Interleukin-27 induces the endothelial differentiation in Sca-1+ cardiac resident stem cells. Cytokine 2015; 75: 365-372

〔学会発表〕(計 4 件)

熊谷渉平、中山博之、宮脇昭光、毛利友美、藤尾 慈 Deficiency of P2X7 receptor signaling promotes adverse cardiac remodeling after myocardial infarction through enhanced cardiac fibroblast migration. 第 21 回日本血管生物医学学会学術集会 2013.9.26-28 大阪

竹脇佳那、宮本香織、尾花理徳、山下朋美、毛利友美、中山博之、藤尾 慈 マクロファージによる死細胞貪食は心筋梗塞後の病態形成を抑制する 第 124 回日本薬理学会近畿部会 2013. 11. 1 京都

Kumagai, S., Nakayama, H., Miyawaki, A., Mohri, T., Fujio, Y. Inhibition of P2x7 receptor signaling promotes adverse cardiac remodeling after myocardial infarction through enhanced cardiac fibrosis migration. The American Heart Association Scientific Sessions 2013 2013.11.16-20 Dallas, USA

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 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 生体機能と創薬シンポジウム 2014 2014.9.28-29 大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 毛利 友美
(MOHRI, Tomomi)

大阪大学薬学研究科・助教
平成 26 年度より招聘教員
研究者番号：20572960

(2)研究分担者：該当なし

(3)連携研究者：該当なし