

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461136

研究課題名(和文) IL-18の心不全発症保護作用の検討

研究課題名(英文) Effects of IL-18 on pressure overloaded-heart

研究代表者

廣谷 信一 (Hirotsu, Shinichi)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20584220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、IL-18ノックアウトマウスに横行大動脈縮窄(TAC)による圧負荷をかけたところ、心不全が野生型マウスに比較して重症であること、心筋の脂肪酸代謝の障害、ATP産生の低下を伴っていることを明らかにした。さらに、IL-18ノックアウトマウスでは、TACによるAMPKの活性化障害が生じていることも明らかにした。そこで、IL-18にAMPKの特異的活性化剤を投与して、TACをかけたところ、マウスの心筋障害が抑制されることを明らかにした。以上より、圧負荷では心臓でIL-18が産生され、脂肪酸代謝を亢進させ、圧負荷に代償していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Effects of IL-18 on pressure overloaded-heart have yet to be revealed. We introduced pressure overload by transverse aortic constriction (TAC) to wild type mice and IL-18 knockout mice. IL-18 knockout mice exhibited higher mortality and severer left ventricular remodeling after TAC. We examined myocardial AMPK activity. While TAC elevated AMPK activity in wild type heart, it did not in IL-18 heart. Therefore, we administered AMPK direct activator, AICAR, to IL-18 knockout mice. The administration attenuated higher mortality and severer left ventricular remodeling after TAC compared with wild type mice. These data suggest that IL-18 maturation by TAC activates AMPK and fatty acid metabolism, leading to adaptation to acute pressure overload.

研究分野：分子心臓病学

キーワード：IL-18 pressure overload energy homeostasis

1. 研究開始当初の背景

近年、心不全の治療の前進は目覚ましいが、心不全の有病率、死亡率は高いままである。心不全の新規の治療を進めるためには、心不全での心機能、病態生理の理解は必須である。炎症反応は心不全の進展に重要な役割を果たしている。そして、心不全の進展と炎症反応との間に緊密な関係があると考えられている。炎症性のサイトカインであるTNF- α 、インターロイキン1 β 、インターロイキン6などが、心不全の進展に重要な役割を果たしていることについて、数々のエビデンスが蓄積されている。

一方で、炎症性サイトカインが心不全の発症の段階において、保護的な役割を持つことが報告されるようになった。このように、現状では、炎症性サイトカインが心不全を進展させるものか、それとも保護的に働くかはまだ完全には明らかになっていない。この点を明らかにすることは、心不全の治療の進展に大きな影響をもつものと思われる。

インターロイキン 18 (IL-18) は、元来インターフェロン γ を誘導するサイトカインとしてクローニングされた。24-kDa の不活性の前駆体として産生され、NLRP3 により N 末端が切断され、活性を持つ成熟した IL-18 となる。IL-18 は、当初、自然免疫に関わる分子として注目されたが、近年、AMPK を介して、代謝、炎症、インスリン抵抗性などの多彩な現象に関与していることが明らかにされた。

2. 研究の目的

IL-18が急性の圧負荷心肥大モデルにおいての役割を明らかにする。また、その効果がどのような細胞内情報伝達機構を介して発現するのかも明らかにする。

3. 研究の方法

動物

C57BL6/J の野生型マウスおよび、C57BL6/J バックグラウンドの IL-18 ノックアウトマウスを用いて実験した。

横行大動脈縮窄 (TAC)

圧負荷は、横行大動脈を左右の内頸動脈の間で、27 ゲージの針と 7-0 シルク糸を用いて結紮する。

心エコー

心機能は、Aplio (Toshiba Medical Systems Co) の心エコーを用いて計測した。

血清 IL-18 レベル

血清 IL-18 レベルは、MBL (Nagoya, Japan) 製の ELISA キットを用いて測定した。

遺伝子発現 (RT-PCR)

TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて抽出した RNA をリアルタイム PCR 法を用いて測定した。TaqMan 法 (Applied Biosystems) を用いた。プライマーは下記の通りである。

ID Mm 1255747_g1 for nppa, assay

ID Mm 1255770_g1 for nppb, assay

ID Mm 808218_g1 for acta1, assay

ID Mm 801666_g1 for Col1a1, assay

ID Mm 802331_m1 for Col3a1, assay

ID Mm 840904_m1 for NLRP3, assay

ID Mm 00439344_m1 for HK1, assay

ID Mm 00441480_m1 for Glut1, assay

ID Mm 00436615_m1 for Glut4, assay

ID Mm 01208835_m1 for Ppargc1, assay

ID Mm 00440939_m1 for PPAR α , assay

ID Mm 01246834_m1 for Acox1 and assay

ID Rn 99999916_s1 for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

GAPDH をコントロールとした。

ウェスタンブロット

左室を 1 mM PMSF を含む (Cell Signaling Technology 製のバッファーを用いて、ホモジエナイズした。使用した抗体は以下である。rabbit anti phospho-Akt (Ser473), Akt, phospho-AMPK α (Thr172), AMPK α , phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) (Ser79), ACC (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; dilution 1:1000), mouse anti IL-18 (MBL, Nagoya, Japan; 1:1000), rabbit anti α -actinin and GAPDH (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; dilution 1:1000).

組織学的検討

心筋組織を 4% のパラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋し、4 μ m 厚にした。HE 染色、Masson's trichrome 染色を施行した。NIH Image-J software を用いて、細胞サイズ、線維化面積を測定した。組織活性酸素種計測は、OCT compound を用い、液体窒素で凍結固定した。8mm 厚の切片を作成し、DHE; 10 μ mol/L (Molecular Probes) を用いて、30 30 分インキュベーションの後測定した。

心筋 ATP 含有量

心筋の ATP 含有量は、TOYO Ink Group (Tokyo, Japan) 製を用いて測定した。

心筋内脂肪量測定

Cardiac Lipid Content

左室の総コレステロール、中性脂肪量は Sekisui. Medical Co., Ltd (Tokyo, Japan) 製のキットを用いて測定した。遊離コレステロールは Toyobo Co., LTD (Osaka, Japan) を用いて測定した。

AICAR の投与

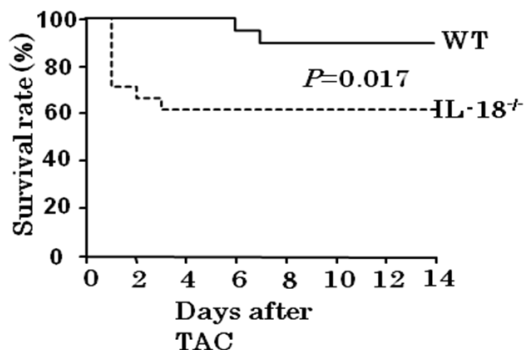
AMPK 直接の活性化薬である AICAR は、腹腔内に TAC 前 6 時間と 6 時間後に投与した。

統計

データは平均 \pm 標準誤差で表示した。2群間の比較はt検定を用いた。多重比較が必要な場合には、1-way ANOVA の後に、Bonferroni's post-hoc 検定を行った。生存曲線は Kaplan-Meier法を用いて表示し、生存率の差は log-rank検定を用いて検定した。EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University) を用いて統計解析を行った。P値 < 0.05 を有意とした。

4. 研究成果

IL-18 の急性圧負荷に対する役割を明らかにするために、10 週齢の野生型マウス、IL-18



ノックアウトマウスに対して、大動脈縮窄 (TAC) による急性圧負荷を行った。野生型マウスは、2週間で90%生存したが、IL-18ノックアウトマウスは60%しか生存しなかった ($p < 0.017$)。2週間後の解剖結果では、野生型マウスに比べ、IL-18ノックアウトマウスでは、有意に体格で補正した心重量、肺重量が重かった。また、心臓の収縮力は、TAC後2週後の心収縮力も野生型マウスに比べIL-18ノックアウトマウスで有意に低下していた。注目すること、IL-18ノックアウトマウスの死亡は3日以内に起こっていた。

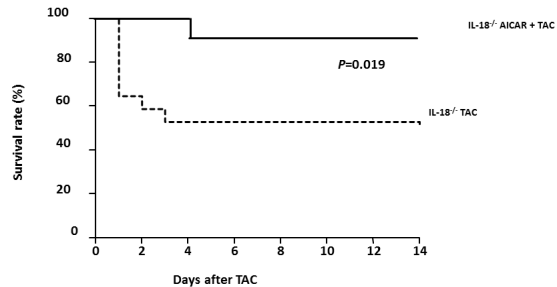
IL-18ノックアウトマウスがTAC早期に死亡する理由を明らかにするために、まず、TAC早期のIL-18産生を調べた。心臓と血清IL-18はTAC1日後にsham1日後と比べ有意に上昇していた。

次に、TAC1日目の血清乳酸値を調べたところ、血清乳酸値は、IL-18ノックアウトマウスで野生型マウスと比べ有意に上昇していた。また心筋での活性酸素種産生 (ROS) を調べたところ、ROS産生は、TACによりIL-18ノックアウトマウスで野生型マウスと比べ有意に上昇していた。また、心筋でのATP産生はIL-18ノックアウトマウスで野生型マウスと比べ有意に低下していた。これらより、IL-18では急性心不全による循環不全と心筋での嫌気性代謝が起こっている可能性が示唆された。

そこで、心筋のオイルレッド染色を施行した。TAC後1日のオイルレッド染色では、IL-18ノックアウトマウスで、野生型マウスに比べて有意に心臓での脂質含有量が上昇していることが明らかとなった。脂質の内容を調べると、中性脂肪が有意に上昇していることが分かった。

IL-18は、AktやAMPKを活性化させることが知られている。そこで、TAC後1日のAkt、AMPKのリン酸化を調べた。Aktのリン酸化はノックアウトマウスと野生型マウスで有意差を認めなかったが、AMPKは野生型ではリン酸化が亢進したにも関わらず、ノックアウトマウスではリン酸化の亢進が認められなかった。また、解糖系に関与する分子であるヘキソキナーゼ1やグルコーストランスポーター1,4の発現は、ノックアウトマウスと野生型マウスとでは有意差を認めなかったが、脂肪酸の酸化に関わる分子や、そ

これらの分子の上流に位置する転写因子は野生型マウスでは有意に上昇したが、ノックア



ウトマウスでは上昇が認められなかった。

IL-18のTACによる早期死亡は、AMPKの活性化障害によると考え、IL-18ノックアウトマウスに、AMPKの選択的活性化剤であるAICARを投与した。AICARの投与により、オイルレッド染色で調べたTACによる心臓への脂肪の蓄積は生じなくなった。また、心収縮能、生存率は、AICARの投与により優位に改善し、野生型マウスレベルにまで改善した。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

廣谷 信一 (HIROTANI, Shinichi)
兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20584220

(2)研究分担者

西村 晃一 (NISHIMURA, Koichi)
兵庫医科大学・医学部・病院助手
研究者番号：30724116

岩破 俊博 (IWASAKU, Toshihiro)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：00648230

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()