

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 9 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20355

研究課題名(和文) 心筋梗塞後左室リモデリングにおけるマクロファージSOCS3の役割

研究課題名(英文) The role of macrophage SOCS3 in cardiac remodeling after myocardial infarction.

研究代表者

野原 正一郎 (Nohara, Shoichiro)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20647812

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)：本研究の目的は心筋梗塞の病態におけるマクロファージSOCS3の役割を明らかにすることである。マクロファージ特異的にSOCS3を欠損させた(SOCS3-mKO)マウスでは野生型と比較し、心筋梗塞後の死亡率が高かった。これはマクロファージSOCS3が何らかの機序で心筋保護的に作用することを示唆する。さらにKO群では心破裂が高率に発症することを明らかにした。梗塞後3日目の心臓ではKO群で心筋内出血が多く認められた。今後、心破裂に関連する因子として細胞外マトリックス分解酵素(MMP)の評価を行う。またマクロファージの機能分化とサイトカインシグナルの関連を明らかとし、心破裂発症の機序解明に取り組む。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the role of macrophage SOCS3 in acute myocardial infarction. Macrophage specific SOCS3-KO(SOCS-mKO) mice had high mortality more than control mice. This result suggests that macrophage SOCS3 has protective effect for myocardium after myocardial infarction. LV rupture rate after myocardial infarction was high in the SOCS3-mKO mice than in the control mice. Third day after myocardial infarction, myocardium internal hemorrhage was greater in SOCS3-mKO mice than in the control mice. We will evaluate MMP to clarify the mechanism of LV rupture.

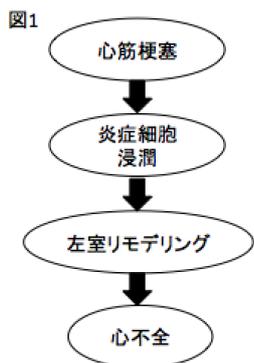
研究分野：循環器

キーワード：急性心筋梗塞 SOCS3 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

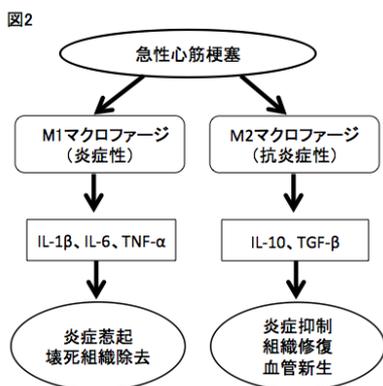
経皮的再灌流療法の登場によって急性心筋梗塞の死亡率は著しく改善した。しかし、再灌流によって心筋障害・細胞死が生じ、心筋虚血再灌流障害が誘発される。虚血傷害は心筋の機能的、基質的な変化から左室リモデリングを起し慢性期心不全の原因となる(図1)。



これまでにレニン・アンジオテンシン系阻害剤や遮断薬の予後改善効果が明らかとなっているが、虚血性心不全の予後は進行胃がんと比較しても不良である。また、繰り返す再入院、及び医療費の増大も大きな問題となっており、梗塞後リモデリングの抑制は依然として重要課題である。

ヒト急性心筋梗塞患者では血清および梗塞巣周囲の炎症性サイトカイン IL-6 が高値である。梗塞後リモデリングは炎症応答の一側面と考えられ、梗塞後の過剰な炎症は心筋治癒過程を障害する(*J AM Coll Cardiol* 2002)。しかし、単に梗塞後の炎症を抑制しても逆にリモデリングや心破裂が助長することも知られている。炎症応答には組織破壊と修復の両側面があり、梗塞後の時間経過に沿って変遷することが病態の解明を困難にしている。

梗塞巣には種々の炎症細胞浸潤が認められ、中でもマクロファージは急性期から慢性期まで観察され、種々のサイトカインを分泌して組織環境を制御する。マクロファージ自身も組織環境により、炎症・組織破壊作用を持つ M1(炎症性)や抗炎症・組織修復作用を持つ M2(抗炎症性)に機能分化することで炎症応答の中樞を占める(図2)。マクロファージの機能解明は梗塞後リモデリングの病態解明に繋がると期待される。



梗塞後組織で高値となる IL-6 は JAK/STAT シグナルを活性化しマクロファージ機能を調節するとともに、ネガティブフィードバック因子 SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling-3) を誘導する。マクロファージ特異的に SOCS3 遺伝子をノックアウトすると(mSOCS3-KO)、IL-6 による炎症応答が大きく変化し(安川, *Immunity* 2003)、in vitro の分化系では M1 に強くシフトするようになる(*J Immunol* 2012)。この事実は、マクロファージ特異的 SOCS3 ノックアウトが、マクロファージ機能解明のための重要なツールになることを強く示唆する。

(2) 申請者独自の知見

申請者は、マクロファージの IL-6 感受性を操作すれば梗塞後リモデリングにおけるマクロファージの役割解明に結びつく可能性があると考えて着想した。野生型マウスと SOCS3-mKO マウスで心筋梗塞モデルを作成したところ、mSOCS3-KO 群では野生型と比較して、生存率が低下することを発見した(図3)。

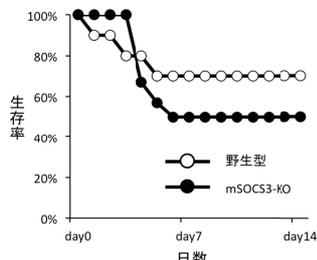


図3. マウス心筋梗塞モデル  
SOCS3-mKO は野生型より予後不良である

予備実験の結果からはマクロファージ SOCS3 は、何らかの機序で梗塞後の心筋に保護的に働くと考えられた。その機序解明によりマクロファージ機能の調節、ひいては梗塞後リモデリングの理解に大きく前進すると期待される。今回、マクロファージ機能の面から SOCS3 の機能を明らかにするために、マクロファージの機能分化とサイトカイン分泌による組織環境調節に焦点を当て、梗塞後リモデリングの機序を明らかにする。マクロファージの機能は梗塞後の経過と共に変化するため、時間経過に沿ってその意義を明らかにする。

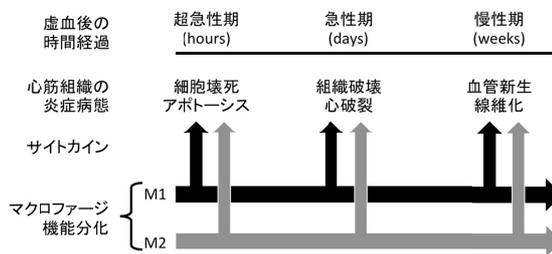


図4. 本研究の概要

梗塞後の時間経過の中で、野生型と SOCS3-KO を比較する。マクロファージ分化、サイトカイン環境、組織炎症の観点からリモデリングの病態を明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、急性心筋梗塞の病態におけるマクロファージ SOCS3 の役割を明らかにすることである。まず、臨床的に梗塞後リモデリングが重要となる慢性期におけるマクロファージの意義を明らかにする。さらに、急性リモデリングの時期に起こる心破裂に対するマクロファージ機能変化の影響を明らかにすることで、梗塞後の全経過におけるマクロファージの意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

8 週齢の雄性マウスを使用する。野生型マウスと SOCS3-mKO マウスにおいて定法に従い左冠動脈前下行枝の恒久的結紮にてマウス心筋梗塞モデルを作成する。

まず、観察期間内で生存率の評価を行う。また、左室リモデリングの評価として、梗塞 2 週間後の形態学的、生理学的、組織学的評価を行い、野生型マウス SOCS3-mKO マウスで比較検討を行う。

### (1) 生存率

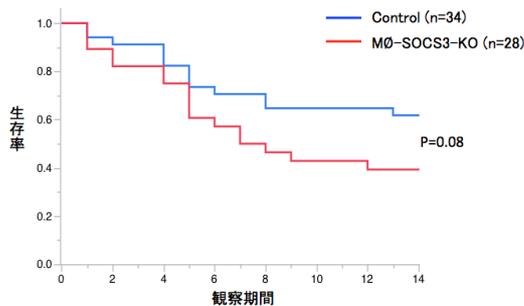
#### (2) 慢性期梗塞後リモデリングの評価

左室重量/体重比、肺重量/体重比  
心エコー[%FS, IVSTd, PWTd, LVDd/Ds]  
組織評価[HE 染色・Picrosirius Red 染色]、  
心筋内出血、線維化面積/左室面積の評価

## 4. 研究成果

### (1) 生存率

14 日間の観察期間内において、SOCS3-mKO 群では生存率が低い傾向にあった(p=0.08)



### (2) 左室リモデリングの評価

(心エコー、HE 染色、Azan 染色)

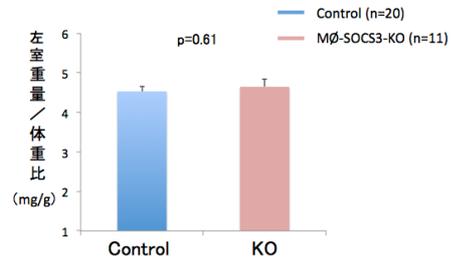
次に慢性期リモデリングの指標である心エコー(%FS)、左室重量/体重比、線維化面積/左室面積について評価を行った。

#### 心エコーでの心機能評価

心筋梗塞後 14 日目に心エコーでの心機能評価(%FS, IVSTd, PWTd, LVDd/LVDs)を行ったが、いずれの項目においても、野生型マウスと SOCS3-mKO 群で有意差は認めなかった。

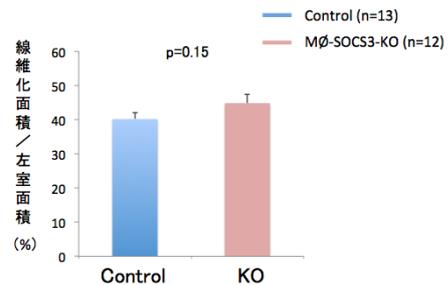
#### 左室重量/体重比

心筋梗塞後 14 日目に心臓を採取し、左室重量/体重比は二群間で有意差は認めなかった。



### 線維化の評価

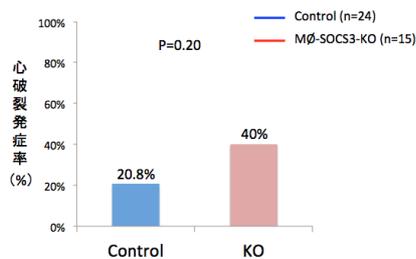
心筋梗塞後 14 日目に心臓を回収し、Azan 染色を行い線維化面積/左室面積の定量評価を行ったが、二群間で有意差は認められなかった。



当初、2 週間の観察期間であったが、慢性期リモデリングの評価項目について野生型と SOCS3-mKO 群で有意差は認められなかった。そこで、観察期間を 4 週間へと延長し、同様に比較検討を行ったが、やはり有意差は認められなかった。

### (3) 急性期リモデリング(組織破壊と心破裂)評価

SOCS3-mKO 群では梗塞後 5 日目前後の死亡が多く、その死因は全て心破裂であった。そこで、心破裂に着目し、両群間での発生率を比較した。結果、現時点では統計学的な有意差は認められないものの、SOCS3-mKO 群で心破裂の発生率が高い事が明らかになった。



申請者らは、複数の遺伝子改変マウスで梗塞後心破裂の頻度が大きく変化することから詳細な組織学的解析を行っており、心破裂と心筋内出血が良く相関することを見いだしている。この知見に基づき、Ter119 抗体免疫染色により心筋内出血面積の定量評価を行った。評価時期として心破裂に先行する組織変化を明らかにするため梗塞後 3 日目の心臓を採取した。結果、SOCS3-mKO 群で心筋内出血面積が大きいことが示された(n=2)。今後、個体数を重ねていく予定である。

今後は急性期リモデリングに焦点を当て SOCS3-mKO マウスで高率に梗塞後心破裂が 発症する機序を解明して予定である。具体的には細胞外マトリックス分解酵素(MMP-2, MMP-9) の発現に関して real-time PCR で評価を行う。また、マクロファージの機能分化とサイトカインシグナルの関連を明らかとするため下記の項目についても実験を重ねて行く予定である。

- ・マクロファージ機能分化  
浸潤マクロファージ数 M1/M2 比  
(フローサイトメトリー)
- ・サイトカイン環境: 各種サイトカインの発現  
(qRT-PCR)

#### 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 3 件)

Oba T, Yasukawa H, Nagata T, Kyogoku S, Minami T, Nishihara M, Ohshima H, Mawatari K, Nohara S, Takahashi J, Sugi S, Igata S, Iwamoto Y, Kai H, Matsuoka H, Takano M, Aoki H, Fukumoto Y, Imaizumi T.

Renal nerve-mediated erythropoietin release confers cardioprotection during remote ischemic preconditioning.

Circ J 79: 1557-1567, 2015 査読有

Nagata T, Yasukawa H, Kyogoku S, Oba T, Takahashi J, Nohara S, Minami T, Mawatari K, Sugi Y, Shimozono K, Pradervand S, Hoshijima M, Aoki H, Fukumoto Y, Imaizumi T.

Cardiac-Specific SOCS3 Deletion Prevents in vivo myocardial ischemia reperfusion injury through sustained activation of cardioprotective signaling Molecules.

PLOS ONE 10: e0127942:1-25, 2015 査読有

安川 秀雄、高橋 甚彌、野原 正一郎、福本 義弘、科学評論社、サイトカインシグナルの制御と心不全の病態 『特集 心不全の最近の話題』.

循環器内科 77(1), 68-74, 2015 査読無

(学会発表) (計 4 件)

Shoichiro Nohara, Takanobu Nagata, Hideo Yasukawa, Yusuke Sugi, Kazutoshi Mawatari, Daisuke Fukui, Sachiko Kyogoku, Hideki Ohshima, Tomoko Sasaki, Jinya Takahashi, Koutatsu Shimozono, Tatsuhiro Shibata, Yoshihiro Fukumoto

Synergistic Reduction of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury by ischemic Preconditioning and Myocardial SOCS3 Deficiency in Mice.

第 81 回日本循環器学会学術集会 2017.3.19 金沢市教育プラザ此花 特設テント(金沢市)

Shoichiro Nohara, Takanobu Nagata, Hideo Yasukawa, Yusuke Sugi, Kazutoshi Mawatari, Daisuke Fukui, Sachiko Kyogoku, Hideki Ohshima, Tomoko Sasaki, Jinya Takahashi, Koutatsu Shimozono, Tatsuhiro Shibata, Yoshihiro Fukumoto  
Synergistic Reduction of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury by ischemic Preconditioning and Myocardial SOCS3 Deficiency in Mice.  
American Heart Association, The 90th Scientific 2016.11.15. New Orleans(United States of America)

発表者: 野原正一郎

心筋特異的 SOCS3 欠損マウスにおける ischemic preconditioning による心筋虚血再灌流障害の顕著な抑制効果

Meet The Cardiologist in Hakata

2016 年 12 月 9 日 ホテル日航福岡(福岡市)

発表者: 野原正一郎

心筋特異的 SOCS3 欠損マウスにおける ischemic preconditioning による心筋虚血再灌流障害の顕著な抑制効果

第 3 回 iHF フォーラム

2016 年 8 月 7 日 ホテルオークラ東京(中央区)

Shoichiro Nohara, Hideo Yasukawa, Toyoharu Oba, Yusuke Sugi Kazutoshi Mawatari, Daisuke Fukui, Takanobu Nagata, Sachiko Kyogoku Hideki Ohshima, Tomoko Minami, Jinya Takahashi, Koutatsu Shimozono, Yoshihiro Fukumoto

Cardiac-Specific SOCS3 Deficiency Leads to Left Ventricular Dysfunction with Advanced Age through Impaired Autophagy

American Heart Association, The 89th Scientific 2015.11.10. Orlando(United States of America)

Shoichiro Nohara, Hideo Yasukawa, Toyoharu Oba, Yusuke Sugi Kazutoshi Mawatari, Daisuke Fukui, Takanobu Nagata, Sachiko Kyogoku Hideki Ohshima, Tomoko Minami, Jinya Takahashi, Koutatsu Shimozono, Yoshihiro Fukumoto

Cardiac-Specific SOCS3 Deficiency Leads to Left Ventricular Dysfunction with Advanced Age through Impaired Autophagy

第 19 回日本心不全学会学術集会

2015 年 10 月 23 日 グランフロント大阪(大阪市)

(図書) (計 0 件)

(産業財産権)

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

野原 正一郎(NOHARA Shoichiro)

久留米大学・医学部 助教

研究者番号:20647812

##### (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:

##### (4) 研究協力者 なし

( )