

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17074

研究課題名(和文) 新たな心筋保護サイトカインIL-22の梗塞後左室リモデリングにおける役割

研究課題名(英文) Title: Role of the novel cardioprotective cytokine IL-22 in left ventricular remodeling after myocardial infarction.

研究代表者

野原 正一郎 (Shoichiro, Nohara)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は心筋梗塞(MI)後左室リモデリングの病態におけるインターロイキン22(IL-22)の役割を明らかにすることである。IL-22欠損(IL-22KO)マウスでは野生型マウスに比べ、MI後に高率に心破裂を発症した。またMI3日目以降の心室ではIL-22受容体発現が亢進していた。IL-22KO群ではMI後3日目の心室にマクロファージおよび筋線維芽細胞が高発現していた。線維化関連分子のmRNAの発現、また細胞外マトリックス分解酵素であるMMP13発現も高く、組織破壊と線維化の亢進が示唆された。IL-22はMI後の心室における細胞浸潤、線維化の制御を行い、心破裂を抑制していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果からはIL-22が心筋梗塞後の心破裂抑制に寄与する可能性が示唆された。心筋梗塞後心破裂の発症率は高くないものの、一旦、発症すると致死的となり、予後不良な病態であるため、その意義は高いと考える。また、IL-22は梗塞後心室における細胞浸潤やECM分解および合成にも関連することが示された。経皮的冠動脈形成術により急性期死亡率は改善したものの、左室リモデリングによる慢性期の心不全発症は予後不良因子の一つであり、重要な課題である。梗塞後左室リモデリングの制御メカニズムを明らかにし、IL-22の有効性が示されれば、慢性期の心不全への発症を予防する新たな治療戦略の発展に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the role of interleukin 22 (IL-22) in the pathology of post-myocardial infarction (MI) remodeling. IL-22-deficient mice (IL-22KO mice) developed a high rate of cardiac rupture after MI compared with wild-type mice (WT mice). IL-22 receptor expression was enhanced in the ventricles 3 days after MI. This result suggests that IL-22 acts on the ventricles after MI. In the heart of the IL-22KO mice, macrophages and myofibroblasts were highly exist in the ventricles 3 days after MI. Furthermore, expression of mRNA for MMP13, which is an extracellular matrix degrading enzyme, and Collagen 1 were high in the IL-22KO mice. From these results, tissue destruction and fibrosis might be promoted in the heart of the IL-22 KO mice. It is considered that IL-22 controls cell infiltration and fibrosis in post-MI ventricle and suppresses cardiac rupture.

研究分野：循環器内科

キーワード：IL-22 梗塞後左室リモデリング 心破裂

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

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。しかし再灌流にも関わらず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の心不全を起す。レニン・アンジオテンシン系阻害剤や $\beta$ 遮断薬の左室リモデリングに対する効果は充分とは言えず、虚血性心不全は予後不良の病態である。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。

急性心筋梗塞後の組織修復において免疫応答の賦活化とそれに付随した炎症反応が不可欠であるが、過剰となった炎症は組織障害を進展させ、慢性期の梗塞後リモデリングを引き起こす(*J Am Coll Cardiol* 2002)。梗塞後リモデリングの抑制において炎症制御は重要な課題であるが、その機序については未だ不明な点も多い。

IL-22 は IL-10 ファミリーサイトカインの一つである。IL-22 は呼吸器や腸管、腎臓、肝臓などの上皮細胞に作用し、細胞内シグナルである JAK/STAT 経路を活性化し、組織保護効果を示すことが多臓器で報告されている (Mühl H, *British Journal of Pharmacology* 2013)。

申請者の研究グループでは、心筋細胞内の STAT3 活性化を効率良く増強させることで、マウス心筋梗塞モデルや虚血再灌流障害モデルにおける心筋障害が軽減し、左室リモデリングが抑制されることを明らかにした(大場, *J Am Coll Cardiol* 2012, 永田, *PLoS One* 2015)。

IL-22 は抗炎症性サイトカインである IL-10 と同様に心臓においても組織保護的に作用することが予想される。しかしながら、従来 IL-22 は上皮細胞に作用するとされており、非上皮細胞である心筋細胞での報告はほとんどない。

申請者は予備検証として適齢週野生型マウスに recombinant murine IL-22 を投与し、心臓における STAT3 の活性化をウエスタンブロット法で評価した。結果、IL-22 投与群ではコントロール群と比較して、心臓での STAT3 の活性化を認めた(図 1)。免疫染色においても同様に心筋細胞での

STAT3 の活性化が認められたが、脾臓においては STAT3 の活性化は認められなかった。この結果は、IL-22 が直接心筋細胞に作用し、心筋保護シグナルである STAT3 を活性化させることを示唆する。

以上の知見より「IL-22 は心筋保護効果を有し、心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制する」という仮説を立案した(図 2)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋梗塞後左室リモデリングの病態における IL-22 の役割を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

雄性マウスに左冠動脈前下行枝の恒久的結紮によるマウス心筋梗塞を使用する。8-12 週齢の野生型マウス (WT マウス) 及び IL-22 欠損マウス (IL-22KO マウス) に心筋梗塞を作製し、心筋梗塞作製後 14 日間の生存率を比較する。梗塞後心室における IL-22 関連分子発現及び STAT3 活性化を評価する。左室リモデリングの評価として、梗塞 3 日後の心室における炎症、線維化を組織学的及び分子生物学的に評価・比較する。

図1. IL-22投与は心臓のSTAT3を活性化する

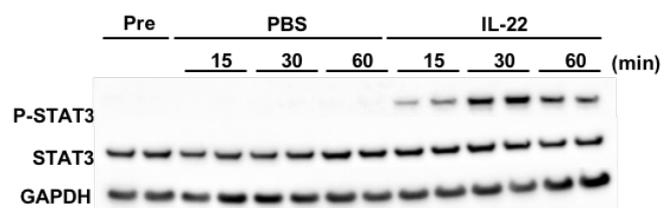
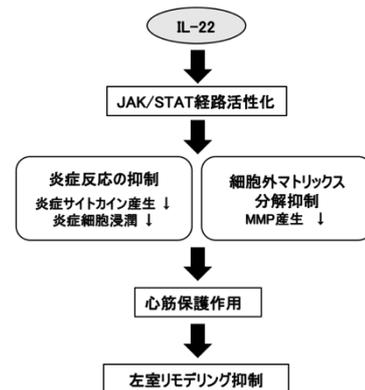


図2.本研究の病態仮説



#### 4. 研究成果

##### (1) 心筋梗塞後死亡率における IL-22 の影響

心筋梗塞後左室リモデリングにおける IL-22 の役割を検証するために、WT マウス及び IL-22KO マウスの MI モデルを作製し、MI 後 14 日間の死亡率を比較した。WT マウスの死亡率が 22%であったのに対して IL-22KO マウスの死亡率は 85%であり、IL-22KO マウスは WT マウスに比べて有意に死亡率が高かった ( $p < 0.05$ ) (図 3)。さらに IL-22KO マウスの死因の 77%は心破裂で、非梗塞領域に接する梗塞領域であるボーダー領域付近の組織が断裂していた。心破裂は MI 後 4-7 日の間に起こっており、MI day7 以降に死亡したマウスはいなかった。MI 作製前 (pre) および MI 後 day3 の体重、血圧、心拍数、梗塞範囲については、WT マウスと IL-22KO マウスで差はなかった。

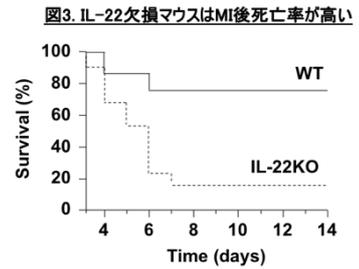
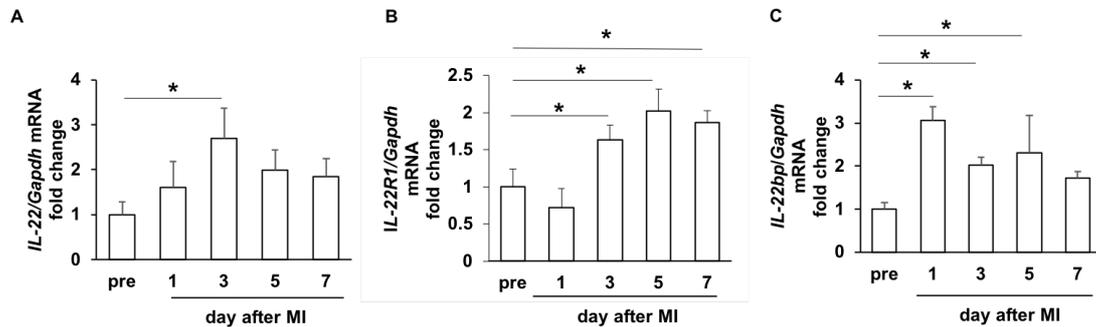


図3. IL-22欠損マウスはMI後死亡率が高い

##### (2) MI 後心室における IL-22 関連分子発現

MI 後心室における IL-22 の作用機序を明らかにするために、MI 後 1 週間の心室における IL-22 および IL-22 受容体発現を RT-PCR で評価した。MI 後心室での IL-22 発現は pre に比べて day1 から増加し、day3 をピークに減少した (図 4A)。IL-22 の受容体である IL-22R1 発現は、pre に比べて MI 後 day1 で減少し、day3 以降は増加した (図 4B)。IL-22 の内因性阻害物質である IL-22BP 発現は pre に比べて MI 後 day1 で増加し、day3 以降は増加が抑制された (図 4C)。MI 後心室において IL-22 および IL-22R1 発現が増加したことから、IL-22 が心室で産生され、心室に作用していると考えられる。さらに IL-22 の内因性阻害物質である IL-22BP 発現が IL-22R1 に先行して発現することから IL-22BP が心室における IL-22 の作用を抑制していると考えられる。

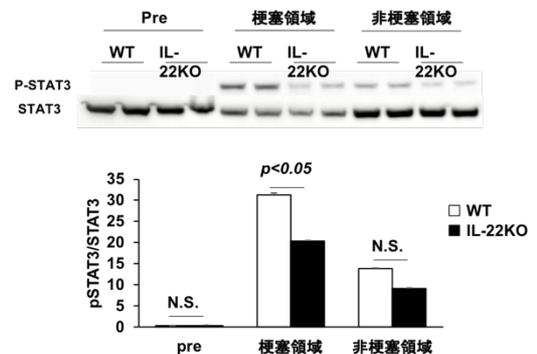
図4. MI後IL-22およびIL-22受容体発現は増加する



##### (3) MI 後心室における STAT3 活性化

IL-22 受容体発現の増加が MI 後 3 日目から増加することから、MI 後 3 日目以降の心臓には IL-22 が作用していると考えられた。IL-22 は STAT3 活性化サイトカインであり、IL-22 が心室に作用するのであれば STAT3 活性化が起こると考えられる。WT マウスと IL-22KO マウスの MI 後心室での STAT3 活性化を WB で評価・比較した。心破裂が梗塞領域内で起こっていたため、MI 後の心室は梗塞領域と非梗塞領域に分けて評価した。pre では WT マウスと IL-22KO 共に STAT3 活性化は見られなかった。WT マウスの MI 後 3 日目の心室では梗塞領域、非梗塞領域ともに STAT3 活性化していた (図 5)。IL-22KO マウスでも MI 後 STAT3 活性化は起こったが、梗塞領域では WT マウスに比べ、STAT3 活性化は有意に減弱していた (図 5)。非梗塞領域では WT マウスと IL-22KO マウスの STAT3 活性化に有意な差はなかったが、IL-22KO は減弱していた。

図5. IL-22KOマウスはMI後梗塞領域のSTAT3活性化が抑制される



#### (4) MI 後心室の炎症および線維化における IL-22 の作用

MI 後 day3 の心臓への細胞浸潤、炎症および線維化関連分子発現を評価した。MI 後 day3 の心臓への好中球浸潤は梗塞領域、非梗塞領域、ボーダー領域のいずれにおいても WT マウスと IL-22KO マウスで同程度であった。一方で、マクロファージ浸潤は IL-22KO マウスのボーダー領域に有意に多かった ( $p < 0.05$ ) (図 6)。炎症マーカーである IL-6、IL-1b、TNF $\alpha$ 、細胞外マトリックス分解酵素である MMP2、9 の mRNA 発現は WT マウスと IL-22KO マウスで同程度であった。しかし MMP13 の mRNA 発現は IL-22KO の梗塞領域で有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (図 7)。IL-22KO マウスでは WT マウスに比べ、マクロファージ浸潤や MMP13 発現が亢進し、組織分解の亢進が示唆される一方で、コラーゲン合成に重要な働きする筋線維芽細胞がボーダー領域で有意に多かった ( $p < 0.05$ ) (図 8)。また Collagen1 の mRNA 発現も IL-22KO マウスの梗塞領域では WT マウスに比べて有意に増加していた。しかし、ピクロシリウス染色による線維化の評価において、MI 後 day3, 4, 5 の組織では WT マウスと IL-22KO マウスで同程度であり、線維化に差は見られなかった。これらの結果から、IL-22KO マウスでは本来なら適切な順序で進行する炎症と線維化が同時に亢進していると考えられた。

図6. IL-22KOマウスはMI後ボーダー領域にマクロファージが多い

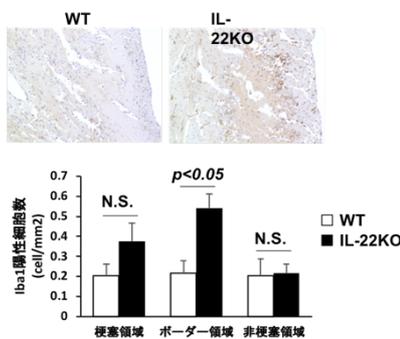


図7. IL-22欠損マウスは梗塞領域のMMP13発現が高い

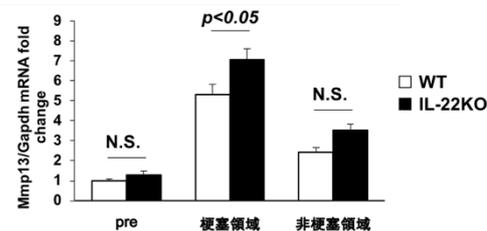
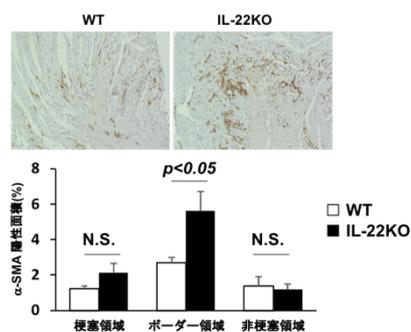


図8. IL-22欠損マウスはMI後ボーダー領域に筋線維芽細胞が多い



本研究で得られた結果から、IL-22 は MI 後の左室における細胞浸潤、組織分解、線維化の制御を行い、心破裂を抑制していると考えられる。IL-22KO マウスの 8 割が心破裂により MI 後一週間以内死亡したため、IL-22 の左室リモデリングへの作用を観察することはできなかったが、IL-22 が MI 後早期のマクロファージや筋線維芽細胞の浸潤に関与している事が示された。梗塞後左室リモデリングに対して IL-22 が抑制的に作用する可能性が示唆され、MI 後の心破裂や左室リモデリングを抑制することで予後改善に寄与する可能性がある。

現時点で IL-22 が心筋細胞に直接作用しているかについては明らかでなく、心保護作用のメカニズムについては不明である。今後、MI 後の IL-22 の産生細胞、および IL-22 のターゲット細胞を同定する。また IL-22 とマクロファージ、筋線維芽細胞との関係を明らかにする方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3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 Genetic deletion of IL-22 increased cardiac rupture after myocardial infarction in mice.
3. 学会等名 ESC Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

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 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

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 The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本真衣、安川秀雄、高橋基彌、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 2019年

1. 発表者名 山本真衣、安川秀雄、高橋基彌、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 2019年

1. 発表者名 Mai. Yamamoto, Shoichiro Nohara, Hideo Yasukawa, Jinya Takahashi, Koutatsu Shimozono, Kazutoshi Mawatari, Takanobu Nagata, Tomoko Sasaki, Tatsuhiro Shibata, Toshiyuki Yanai, Yoshihiro Fukumoto
2. 発表標題 Interleukin-22 Deletion Promotes Cardiac Rupture after Acute Myocardial Infarction in Mice
3. 学会等名 ESC Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mai Yamamoto, Shoichiro Nohara, Hideo Yasukawa, Jinya Takahashi, Tomoko Sasaki, Koutatsu Shimozono, Tatsuhiro Shibata, Toshiyuki Yanai, Kouta Okabe, Kazutoshi Mawatari, Yoshihiro Fukumoto
2. 発表標題 Lack of Interleukin-22 Increases Cardiac Rupture After Myocardial Infarction in Mice.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mai Yamamoto, Shoichiro Nohara, Hideo Yasukawa, Jinya Takahashi, Tomoko Sasaki, Koutatsu Shimozono, Tatsuhiro Shibata, Toshiyuki Yanai, Kouta Okabe, Kazutoshi Mawatari, Takanobu Nagata, Yoshihiro Fukumoto
2. 発表標題 Interleukin-22 Deletion Promotes Cardiac Rupture after Acute Myocardial Infarction in Mice
3. 学会等名 第82回日本循環器学学術集会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----