

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16492

研究課題名（和文）ヒト心房筋に対する抗炎症性サイトカインIL-10の直接的及び間接的効果

研究課題名（英文）Direct and indirect effect of anti-inflammatory cytokine, IL-10 on human atrial myocytes

研究代表者

近藤 秀和（Kondo, Hidekazu）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90724170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：IL-10はヒト心房筋に対して直接的な心保護効果を発揮することが判明した。その機序はNOSカップリングの改善及びNADPHオキシダーゼ活性を抑制することでヒト心房筋細胞の活性酸素を減少させることが主要な機序であった。更にヒト心外膜脂肪細胞にも修飾効果を発揮し、炎症性サイトカインの発現量を減少させることが判明した。このことからIL-10は心外膜脂肪の心筋細胞に対するパラクラインエフェクトを改善する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-10の心保護作用は動物実験レベルでは数多く報告されてきたが、ヒト心筋細胞及び脂肪細胞を用いた実験はこれまでになかった。本研究ではiPS由来ヒト心房筋細胞及びヒト心外膜脂肪由来前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞に分化させたものを用いてIL-10の心筋細胞への心保護効果を直接的及び間接的（心外膜脂肪のパラクライン効果を改善することで）に証明できた。マウスやラットの心外膜脂肪量は極めて少なく心筋へのパラクライン効果を調べるには適していないことが知られている。本研究はヒト組織及び細胞を用いた研究であり、より臨床に即している点で意義がある。

研究成果の概要（英文）：Our results demonstrated that IL-10 has a direct cardio-protective effect on human atrial myocardium. IL-10 exerts the effect by the reduction of superoxide via the improvement of NOS coupling and suppression of NADPH oxidase activity in human atrial cardiomyocytes, which is the main mechanism. In addition, IL-10 has an indirect effect, that is, IL-10 modulates the paracrine secretome profile of human epicardial adipose tissue, leading to the decrease of pro-inflammatory cytokines production.

研究分野：循環器内科学

キーワード：IL-10 パラクライン効果 心外膜脂肪

1. 研究開始当初の背景

肥満、高血圧、糖尿病は心房細動発症の危険因子として知られており、左房で惹起される。炎症性線維化が心房細動基質を形成、促進する。申請者は、これらの疾患モデルマウスを作成し、抗炎症性サイトカイン IL-10 の重要性を報告してきた。これらの研究より、IL-10 は直接的な心筋保護作用を有するのみならず、心外膜脂肪を介した間接的な心筋保護作用を有する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

ヒト心筋においても、IL-10 の直接的な心筋保護効果が認められるか? ヒト心外膜脂肪を介した IL-10 の間接的な心筋保護効果は認められるか? に関して、心臓外科手術より採取された右心耳と心外膜脂肪、更にヒト心筋培養細胞を用いて検討する。

3. 研究の方法

(1)【ステップ1 - ヒト右心耳組織およびヒト培養心筋細胞を用いて、心筋への IL-10 の直接作用を検討する】

まず心臓手術で採取された新鮮なヒト右心耳組織を可及的速やかに(30分以内)研究室へ運び、4つに切り分け、それぞれクレスヘーペスバッファーの入ったプレートに入れ、通常のインキュベーター設定(温度:37℃, O₂:20%, CO₂:5%, 湿度95%)で20分間培養する。その後、4つのプレートを1. コントロール(IL-10非投与)群, 2. IL-10低濃度群, 3. IL-10中等度濃度群, 4. IL-10高濃度群に分類し、それぞれの濃度に応じてヒトリコンビナント IL-10を投与し、更にインキュベーターで1時間培養を行う(培養時間は実験結果によって変更される可能性あり)。その後、それぞれ組織を取り出してホモジナイゼーションし、一部はルミノメーターで酸化ストレスの産生源となるスーパーオキシドの生成量、更に e-NOS アンカップリング(NOS阻害薬を使用)を評価する。一部はウェスタンブロットにより、I B などの炎症に關与するシグナルの評価を行う。スーパーオキシドおよび炎症關連シグナルの抑制効果を認められた際には、ampk, Akt, Erk, JNK, p38の活性化をウェスタンブロットで評価し、關連する因子を同定する。e-NOS カップリングの改善が認められた場合は、e-NOS のリン酸化をウェスタンブロットで評価すると共に、テトラヒドロピオプテリンとピオプテリンの測定を HPLC 法で行い、テトラヒドロピオプテリンの増加の有無を評価する。スーパーオキシドの第2の評価法として、ジヒドロエチジウム染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で評価する。

ヒト培養心筋細胞を用いて、上記で行った測定・評価法を再度行い、再現可能か評価する。右心耳組織から心筋細胞を培養する手法は困難であるため、ヒト心筋細胞に関してはセルラー・ダイナミクス・インターナショナルからセルライン(iCell製品)を購入する。心筋細胞に関しては、心筋へ最終分化した細胞を用いたため、顕微鏡でマイオチューブが多く認められるかを使用前に確認し、トロポニン T もしくは I の発現をウェスタンブロット法及び PCR 法で確認する。

(2)【ステップ2 - ヒト心外膜脂肪組織およびヒト心外膜脂肪細胞を用いて、心外膜脂肪への IL-10 の効果を検討する】

上記ステップ1と同様に、まず心臓手術で採取された新鮮なヒト心外膜脂肪組織を可及的速やかに(30分以内)研究室へ運び、4つに切り分け、それぞれクレスヘーペスバッファーの入ったプレートに入れ、通常のインキュベーター設定(温度:37℃, O₂:20%, CO₂:5%, 湿度95%)で20分間培養する。その後、4つのプレートを1. コントロール(IL-10非投与)群, 2. IL-10低濃度群, 3. IL-10中等度濃度群, 4. IL-10高濃度群に分類し、それぞれの濃度に応じてヒトリコンビナント IL-10を投与し、更にインキュベーターで16時間培養(培養時間は実験結果によって変更される可能性あり)を行う。その後、組織を取り出し十分に洗浄し、一部をルミノメーターおよび PCR での評価に用いる(RNA抽出を行い、アディポネクチンや炎症性サイトカインの mRNA 発現量を qPCR で評価する)。残りの組織を共培養実験に割り当てる。上ずみの培養液も回収・保存し、後に ELISA キットを用いてアディポカイン及びサイトカイン量を測定する。

ヒト培養心外膜脂肪細胞をプレートで培養し、上記で行った実験方法を用いて測定・評価法を再度行い、再現可能か評価する。ヒト心外膜脂肪細胞に関しては、ヒト心外膜脂肪組織からコラゲナーゼを用いて脂肪前駆細胞を抽出・培養したのちに、分化誘導し脂肪滴が認められるようになってから実験に使用する。

(3)【ステップ3 - ヒト右心耳組織または培養心筋細胞と、ヒト心外膜脂肪組織または培養脂肪

細胞の共培養により、IL-10 の心外膜脂肪を介した心筋への間接作用を検討する】

． 心臓手術で採取された新鮮なヒト右心耳組織を4等分し、1. コントロール(IL-10 非投与)、2. IL-10 低濃度、3. IL-10 中等度濃度、4. IL-10 高濃度、を含む培養液で培養した心外膜脂肪それぞれと共培養しインキュベーターで16時間培養する。その後、右心耳組織をステップ1と同様に、ルミノメトリー、ウェスタンブロット法、HPLC 法、ジヒドロエチジウム染色等で評価する。

． ヒト培養心筋細胞とヒト培養脂肪細胞を用いて、上記と同様の実験方法を行い、組織で得られた結果が再現可能か評価を行う

4 . 研究成果

ヒト右心耳を用いた IL-10 による incubation 実験を施行した。容量依存性にスーパーオキシドの減少、e-NOS カップリングの改善を認めた。AMPK, Akt, JNK のリン酸化は認めず ERK のリン酸化を抑制しているため ERK シグナリングを抑制することで酸化ストレスの低下に寄与している可能性が示唆された。ジヒドロエチジウム染色を用いた実験でも同様に IL-10 のスーパーオキシド産生減少が確認できた。ヒト心筋細胞のセルラインを用いた実験でも IL-10 による心筋細胞保護作用を証明できた。さらなる機序を追究するために抑制されるスーパーオキシドは NADPH 由来なのかミトコンドリア由来なのかを確認した。NADPH による刺激を行い調査してみたところ、NADPH 由来のスーパーオキシドを有意に抑制していた。超遠心法により細胞膜からのタンパクを抽出しウェスタンブロット法で確認したところ、Rac-1 及び p47phox の膜移行も抑制されていた。ERK inhibitor と p38MAPK inhibitor でどちらのシグナリングが関与しているか確認したところ、p38MAPK シグナリング抑制が Rac-1 と p47phox の膜移行を抑制し NADPH 由来のスーパーオキシドを抑制していることが判明した。さらに、IL-10 によるテトラヒドロピオプテリンが上昇しており、こちらは NOS カップリング改善の機序と考えられた。IL-10 のオフターゲット効果であることを否定するために培養心筋細胞の IL-10 レセプターを siRNA でノックダウンし IL-10 負荷実験を行った。IL-10 レセプターノックアウト(70-80%)心筋細胞に IL-10 を作用させたところ IL-10 による活性酸素抑制効果は減弱していた。また、成熟ヒト心外膜脂肪細胞への効果を確認する実験に移った。ヒト心外膜脂肪から前駆脂肪細胞を抽出培養した。その後独自の方法で脂肪細胞の分化方法を見出し、成熟脂肪細胞へ再現性をもって分化させることに成功した。このヒト心外膜由来前駆脂肪細胞を用いて IL-10 の負荷実験を行ったところ、負荷24時間で脂肪細胞中の炎症性サイトカインの mRNA 発現量は有意に減少していた。これは培養細胞上澄み液中分泌においても同様の結果であった。このことから、IL-10 はヒト心外膜脂肪のセクレトームプロファイルを修飾する可能性があることが判明した。時間及び費用の関係で IL-10 投与下培養脂肪細胞と心筋細胞との共培養実験は行うことが出来なかったが、IL-10 投与下で培養した心外膜脂肪細胞のセクレトームを含む培養液を(IL-10 は除去された状態)心筋細胞へ負荷すると、NADPH オキシダーゼで刺激した際の活性酸素の発現量が減少することが判明した。結論として、IL-10 はヒト心筋に対して直接的な心保護効果を発揮すること、ヒト心外膜脂肪細胞にも修飾効果を発揮し、炎症性サイトカインの発現量を減少させることが判明した。ヒト心筋に対する直接心保護効果の機序はヒト心筋細胞の活性酸素を減少させることが主要な機序であった。このことから IL-10 は心外膜脂肪の心筋細胞に対するパラクラインエフェクトを改善する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	高橋 尚彦 (Takahashi Naohiko)		
研究協力者	宮本 伸二 (Miyamoto Shinji)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関