

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461137

研究課題名(和文) 拡張型心筋症を呈する心筋特異的SOCS3欠損マウスを用いた心不全の発症機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of dilated cardiomyopathy phenotype in cardiac-specific SOCS3 deficient mice.

研究代表者

安川 秀雄 (Yasukawa, Hideo)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：60289361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：拡張型心筋症の発症機序を解明することは、心不全の新しい治療法の開発に極めて重要である。心筋特異的SOCS3ノックアウトマウス(SOCS3-CKO)は生後24週目には左心収縮能の低下と左心室径の拡大、心筋細胞のthinningと脱落を認め、STAT3のリン酸化も同時期より遷延増強していた。SOCS3-CKOマウスの心臓のLC3-II/LC3-I比、parkinとPINK1の発現が低値でありparkinとPINK1の発現低下に伴うオートファジーが傷害によって拡張型心筋様の左心収縮能の低下を来すと考えられた。心筋細胞のSOCS3の発現抑制が拡張型心筋症の新たな発症機序であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) is a cytokine-inducible negative regulator of JAK-STAT signaling pathway. Cardiac-specific SOCS3 deficient mice (SOCS3-CKO) spontaneously develop cardiac dysfunction with advanced age. In this study, we analysed the underlying mechanism of age-related cardiac dysfunction in SOCS3-CKO mice. We found that developed cardiac dysfunction estimated by echocardiogram and increased activation of STAT3 from 25 weeks of age in SOCS3-CKO. In SOCS3-CKO mice hearts from 25 weeks of age, LC3II/LC3I ratio was significantly decreased. Western blot analysis revealed that expression of parkin and PINK1 but not p62 and Bnip3 were decreased in SOCS3-CKO mice compared with control mice from 25 weeks of age. These results suggest that age-related cardiac dysfunction in SOCS3-CKO mice may be due to impaired autophagy through sustained STAT3 activation.

研究分野：分子心臓学

キーワード：心不全 拡張型心筋症 心筋細胞 SOCS3 JAK-STAT オートファジー

1. 研究開始当初の背景

心不全はすべての心疾患の終末的な病態である。レニンアンジオテンシン系阻害薬や遮断薬により生命予後の改善が示されているが、その生命予後は極めて不良であり、今後も著しい患者数と治療費の増加が予想されている。

拡張型心筋症は左心室の収縮不全と拡大を特徴とし心不全を来す。拡張型心筋症の約20%に遺伝子異常を伴うが、多くは原因不明である (McNally, J Clin Invest 2013)。したがって、このような左心室の収縮不全と拡大の機序を解明することは、心不全の新しい治療法の開発に極めて重要であると考えられる。

Signal transducer and activator of transcription (STAT3) 経路は、interleukin-6 (IL-6)などのサイトカインによって活性化される転写因子で、心筋細胞の生存、ミトコンドリアの安定化や心筋の線維化などにおいて重要であることが明らかにされている (Fujio, J Pharmacol Sci 2011; Wegrzyn, Science 2009)。

Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3)は、活性化 STAT3 によって発現誘導され、STAT3 の活性を抑制しサイトカインの機能を負に制御する Yasukawa, EMBO J 1999; Yasukawa, Nat Immunol 2003)。われわれ、ウイルス性心筋炎による急性心不全や梗塞後心不全において、心筋の SOCS3 抑制により心不全の病態が改善することを報告している (Yasukawa, J Clin Invest 2003; Oba, J Am Coll Cardiol 2012)。一方、心筋特異的 SOCS3 欠損マウス (SOCS3-cKO) が加齢とともに左心室の収縮不全と拡大を呈し心不全を発症することを明らかにしている (Yajima, Circulation 2011)。

2. 研究の目的

サイトカイン機能を負に制御する Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3)の心筋特異的ノックアウトマウスは、加齢に伴い左心室の収縮不全と拡大を呈し心不全を発症する。この拡張型心筋症の病態における心筋障害に、オートファジーが関与していることを見いだしている。本研究の目的は、心筋特異的 SOCS3 ノックアウトマウスの拡張型心筋症様の病態における STAT3 の活性化とオートファジーの役割を明らかにし、心不全の新しい病態の解明と治療法開発のための基盤となる研究を行うことである。

3. 研究の方法

平成26年度

・SOCS3-cKO マウス心臓の心筋障害、線維化と心機能の評価

SOCS3-cKO マウスは加齢と共に左心収縮不全により心不全を発症し、野生型マウスより早期に死亡することが明らかにされている。しかし、既報とは異なり、組織学的評価によ

り、SOCS3-cKO マウスは心筋細胞の thinning や脱落と間質の線維化が顕著であることを確認している。心エコーによる心機能の評価、H&E 染色による心筋障害とシリウスレッド染色による線維化を生後8、24、36週目に経時的に評価し、野生型マウスと比較評価する。

・SOCS3-cKO マウス心臓のシグナル活性化の評価

ウエスタンブロットにより、SOCS3-cKO マウス心臓のリン酸化 STAT3、リン酸化 AMP キナーゼの発現を生後8、24、36週目に経時的に評価し、野生型マウスと比較評価する。また、血清中の IL-6 濃度を ELISA で、心臓の IL-6 の発現を real-time PCR で評価する。

・SOCS3-cKO マウス心臓のオートファジーの生化学的解析

予備実験の LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain-3)のウエスタンブロットにより、野生型マウスに比べ SOCS3-cKO マウス心臓の LC3-II/ LC3-I が低値であることを見いだしている。Nを増やし経時的に LC3-II/ LC3-I やを測定し、リン酸化 STAT3 や心機能の指標との相関についても評価する。また、オートファジーを調節する分子である parkin、PINK1、P62、Bnip3 などについてもウエスタンブロットにより測定し野生型マウスと比較評価する。

・SOCS3-cKO マウス心臓のオートファジーの組織学的解析 (電顕)

電顕により、ミトコンドリア障害やオートファジーを示すオートファゴソームの所見を観察し、野生型マウスと比較評価する。

・SOCS3-cKO マウス心臓のマイクロアレイ解析

左心収縮不全を起こす直前の心臓を用いてジーンチップ解析を行う。これにより、特に細胞

死、オートファジーに関する遺伝子プロファイルを作成し野生型マウスと比較評価する。

・SOCS3-cKO マウスにおける飢餓によるオートファジー誘発時の心機能解析

左心収縮不全を発症する前のマウスを飢餓状態としオートファジーを誘発する。このときの心機能を心エコーで評価し野生型マウスと比較評価する。

平成27年度

・SOCS3-cKO マウスとオートファゴソーム蛍光標識マウスの交配により、SOCS3-cKO マウスのオートファジー障害を評価

GFP-LC3 マウスは、GFP-LC3 融合タンパク質を CAG プロモーター下に全身の臓器で発現するトランスジェニックマウスであり、オートファジーをモニターすることが可能であり、このマウスと SOCS3-cKO マウスを交配し、心臓でのオートファジーを経時的にモニターし野生型マウスと比較評価する。

・SOCS3-cKO マウスの左心収縮不全に対する JAK-STAT 阻害薬の効果検討

JAK 阻害薬である pyr idone6 もしくは

CP-690550 を SOCS3-cK0 マウスに投与し、STAT3 の活性化、左心収縮不全や線維化、オートファジーを評価し、その治療効果を検証する。

・SOCS3-cK0 マウスの左心収縮不全に対する IL-6 受容体抗体の効果検討
STAT3 を活性化する炎症性サイトカイン IL-6 と心不全の関連が報告されている (Maeda, J Am Coll Cardiol 2000)。
SOCS3-cK0 マウスの左心収縮不全は IL-6 の過剰なシグナル活性化とも考えられ、IL-6 受容体抗体 (MRA) を SOCS3-cK0 マウスに投与し、STAT3 の活性化、左心収縮不全や線維化、オートファジーを評価し、その治療効果を検証する。

4. 研究成果

SOCS3-cK0マウスは生後24週目には左心収縮能の低下と左心室径の拡大を認めた。組織染色ではSOCS3-cK0マウスにおいて心筋細胞の thinning、脱落を認め、WTマウスと比較し優位に間質の線維化の増加を認めた。SOCS3-cK0マウスはWTマウスに比べSTAT3のリン酸化が後24週目以降に増強し遷延化していた。ERK1/2とAKTのリン酸化は著編なかった。オートファジーの評価をLC3 (microtubule-associated protein 1 light chain-3)のウエスタンブロットにより行ったところ、WTマウスに比べSOCS3-cK0マウス心臓のLC3-II/LC3-Iが低値であり、オートファジーが傷害されていることが示唆された。オートファジーを調節する分子であるparkin、PINK1、P62/SQSTM1、Bnip3などのウエスタンブロットにより測定したところ、parkinとPINK1の発現がSOCS3-cK0マウスで優位に低値であった。P62/SQSTM1とBnip3の発現は明らかな差を認めなかった。これらの結果より、SOCS3-cK0マウスでは加齢に伴い次第にSTAT3が活性化し、parkinとPINK1の発現が抑制されオートファジーが傷害され拡張型心筋様の左心収縮能の低下を来すと考えられた。新たに作成した血管平滑筋細胞特異的なSOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3)欠損マウスにおいて、加齢とともに心筋間質の線維化や心外膜の著明な肥厚が起ることを見出したことである。これらの表現系は、アンジオテンシンII投与によってさらに増強されることから、血管平滑筋細胞におけるSOCS3によるアンジオテンシンIIの活性の制御が筋間質の線維化や心外膜の著明な肥厚に関わることも明らかとなった。

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8件)

1. Hara M, Takahashi T, Mistumasu C, Igata S, Takano M, Minami T, Yasukawa H,

Okayama S, Nakamura K, Okabe Y, Tanaka E, Takemura G, Kosai K, Yamashita Y, Matsuishi T. Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes Mecp2-null mice to arrhythmias. Sci Rep 5: 11204, 2015

2. 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, 2015
3. 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 I. Renal nerve-mediated erythropoietin release confers cardioprotection during remote ischemic preconditioning. Circ J 79: 1557-1567, 2015
4. Morita R, Suzuki M, Kasahara H, Shimizu N, Shichita T, Sekiya T, Kimura A, Sasaki K, Yasukawa H, Yoshimura A. The ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 112: 160-165, 2015
5. 安川 秀雄, 高橋 甚彌, 野原 正一郎, 福本 義弘: 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
6. Kataoka Y, Shibata R, Ohashi K, Kambara T, Enomoto T, Uemura Y, Ogura Y, Yuasa D, Matsuo K, Nagata T, Oba T, Yasukawa H, Numaguchi Y, Sone T, Murohara T, Ouchi N. Omentin prevents myocardial ischemic injury through AMPK- and Akt-dependent mechanisms. J Am Coll Cardiol 63: 2722-2733, 2014
7. Koike K, Ueda S, Yamagishi S, Yasukawa H, Kaida Y, Yokoro M, Fukami K, Yoshimura A, Okuda S. Protective role of JAK/STAT signaling against renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. Clin Immunol 2014, 150: 78-87.
8. Yasukawa H, Oba T, Fukumoto Y. Alterations in Cocksackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) Confer Susceptibility to Ventricular Arrhythmia with an Ischemic Event. J Am Coll Cardiol 2014, 63: 560-562.

〔学会発表〕(計15件)

1. Nohara S, Nagata T, Yasukawa H, Sugi Y, Mawatari K, Fukui D, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Takahashi J, Shimozono K, Shibata T, Fukumoto Y: Synergistic Reduction of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury by Ischemic Preconditioning and Myocardial SOCS3 Deficiency in Mice. The American Heart Association, The 89th Scientific Session (AHA 2016), New Orleans, USA, November 12-16, 2016
2. 下園弘達、安川秀雄、永田隆信、野原正一郎、高橋甚彌、佐々木知子、柴田龍宏、福井大介、馬渡一寿、杉雄介、福本義弘：心不全と睡眠時無呼吸症候群を合併したムコリピドーシス 型の一例。第64回日本心臓病学会学術集会(2016年9月23~25日：東京)
3. 馬渡一寿、安川秀雄、永田隆信、下園弘達、野原正一郎、高橋甚彌、佐々木知子、柴田龍宏、福井大介、杉雄介、福本義弘：当院循環器内科で経験したFabry病の12症例についてのまとめ。第64回日本心臓病学会学術集会(2016年9月23~25日：東京)
4. 下園弘達、安川秀雄、柴田龍宏、野原正一郎、高橋甚彌、佐々木知子、永田隆信、福井大介、馬渡一寿、杉雄介、福本義弘：Remote ischemic conditioningによるドキシソルピシン心筋症の予防効果。第2回日本リハビリテーション学会九州支部地方会(2016年10月29日：福岡)
5. Nohara S, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Takahashi J, Shimozono K, Minami T, Fukui D, Mawatari K, Sugi Y, Fukumoto Y. Cardiac-Specific SOCS3 deficiency leads to left ventricular dysfunction with advanced age through impaired autophagy. The American Heart Association, The 89th Scientific Sessions, Orland, USA, November7-11, 2015
6. 安川秀雄、大場豊治、永田隆信、南知子、高橋甚彌、野原正一郎、福本義弘：心筋特異的SOCS3ノックアウトマウスは加齢に伴いオートファジー障害によって左心収縮不全を呈する。第15回日本抗加齢医学会総会(2015年5月29~31日；福岡)
7. 京極幸子、安川秀雄、永田隆信、野原正一郎、高橋甚彌、下園弘達、南知子、馬渡一寿、杉雄介、今泉勉、福本義弘：心筋特異的SOCS3欠損マウスにおけるドキシソルピシン誘発性心筋障害の抑制機構。第63回日本心臓病学会学術集会(2015年9月18~20日；横浜)
8. 永田隆信、安川秀雄、京極幸子、下園弘達、野原正一郎、高橋甚彌、大島英樹、大場豊治、福井大介、馬渡一寿、杉雄介、今泉勉、福本義弘：心筋特異的SOCS3欠

- 損は持続的な心筋保護シグナルの活性化を介して心筋虚血再灌流障害を抑制する。第63回日本心臓病学会学術集会(2015年9月18~20日；横浜)
9. 永田隆信、安川秀雄、高橋甚彌、下園弘達、野原正一郎、南知子、大場豊治、馬渡一寿、杉雄介、福本義弘：心筋特異的SOCS3欠損による心筋虚血再灌流障害における転写プロファイリング応答の変化。第19回日本心不全学会学術集会(2015年10月22日~24日：大阪)
 10. 野原正一郎、安川秀雄、大場豊治、永田隆信、高橋甚彌、下園弘達、南知子、馬渡一寿、杉雄介、福本義弘：心筋特異的SOCS3ノックアウトマウスは加齢に伴いオートファジー障害によって左心収縮不全を呈する。第19回日本心不全学会学術集会(2015年10月22日~24日：大阪)
 11. Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Fukumoto Y. Mechanism of Cardioprotection against Myocardial Infarction by Renal Nerve-mediated Inter-organ Communication. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan, April 14-17, 2014
 12. 安川秀雄、大場豊治、永田隆信、今泉勉、福本義弘：エリスロポイエチンはremote ischemic preconditioningにおける心筋保護機構に重要である。第22回日本心臓病学会学術集会(2014年9月26~28日；仙台)
 13. 安川秀雄、馬渡一寿、今泉勉：心肥大症例におけるガラクトシダーゼのE66Q遺伝子変異について。第22回日本心臓病学会学術集会(2014年9月26~28日；仙台)
 14. Nagata T, Yasukawa H, Oba T, Pradervand S, Mawatari K, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Sasaki K, Yajima T, Hoshijima H, Knowlton KU, Imaizumi T, Fukumoto Y: Prevention of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Cardiac-Specific SOCS3 Knockout Mice by enhanced activation of cardioprotective signaling pathways. 第18回日本心不全学会学術集会(2014年10月10日~12日：大阪)
 15. Mawatari K, Yasukawa H, Oba T, Futamata N, Nagata N, Kyougoku S, Ohshima H, Imaizumi T: ERK1/2 Suppressor Sprouty4 Does Not Play an Important Role in the Development of Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. 第31回国際心臓研究学会(ISHR)(2014年11月28~29日；名古屋)

〔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

www.kurume-shinzo.com

www.med.kurume-u.ac.jp/med/kucrif/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安川秀雄（Hideo Yasukawa）

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：60289361

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：

(4) 研究協力者

（ ）