

## 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 金 慧 玲

横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学

### 審 査 員

主 査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 大 橋 健 一

副 査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 五 嶋 良 郎

副 査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 石 上 友 章

## **Epac activation inhibits IL-6-induced cardiac myocyte dysfunction**

### **Epac の活性化は IL-6 による心筋細胞機能障害を抑制する。**

心機能障害を伴った場合、敗血症の予後が著明に増悪することが報告され、敗血症に伴う心筋障害の治療、予防法の確立が強く求められている。敗血症時の心機能障害原因の一つとして、サイトカインによる心筋細胞の Janus kinase-signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) 系の活性化は、誘導型 nitric oxide synthase (iNOS) の発現を高め、NO を過剰に誘導することで心機能障害を発症させる。本研究では内皮細胞で検証された exchange proteins directly activated by cAMP (Epac) の JAK/STAT 系を抑制するタンパクである Suppressors of cytokine signalling 3 (SOCS3) 誘導作用が心筋細胞でも同様に SOCS3 を誘導し、サイトカインによる心機能障害を抑制することを目的とした。

今回検討した結果サイトカインのうち、interleukin-6 (IL-6) が唯一 STAT3 のリン酸化を増強させ、IL-6 と IFN- $\gamma$  が STAT1 のリン酸化を増強させた。SOCS3 の mRNA、タンパク質の発現は Epac 刺激剤により有意に上昇し、PLC、PKC に依存していることが明らかになった。また、Epac 刺激薬により、IL-6 による STAT3 のリン酸化と iNOS の発現は有意に抑制された。更に、IL-6 刺激によりカテコラミン受容体刺激による心筋細胞内カルシウム濃度上昇や、心筋細胞短縮率の増強反応は抑制されたが、この反応は Epac 刺激薬の存在下で有意に減弱した。

これらの結果は、Epac1 は SOCS3 を誘導し、Jak/STAT/iNOS 経路を抑制することで、サイトカインによる心機能障害を抑制する可能性が示唆された。

以上の結果の説明の後に、質疑応答が行われた。

まず、石上副査からインターロイキンについて今回は心筋細胞での実験で結果を示したが、心筋細胞で IL-6 と IL-6 受容体との関係について質問がなされた。これに対して、IL-6 は可溶性受容体と膜結合型 IL-6 受容体が存在している。IL-6 は IL-6 受容体に結合し複合体を形成し、細胞膜にある gp130 に結合することによってシグナルを伝達する。今回の実験では培養した心筋細胞に IL-6 を刺激し、その下流である STAT3 のリン酸化の上昇や iNOS のタンパク発含量が上昇していることが見られたため、今回の実験では IL-6 は心筋細胞に存在する IL-6 受容体に結合してシグナルを伝達すると考えられる、との返答がなされた。

また、動物レベルでの見通しと心筋に対しての IL-6 動態についてはどう思うか、との質問がなされた。これに対して、以前は LPS 投与により作成した敗血症モデルでの結果を示したが、また、盲腸結紮穿刺などの敗血症モデルを作成し、違う敗血症モデルの検討を加えて行く必要がある。また、この論文では細胞レベルで IL-6 による作用を検討しているが動物では IL-6 を含め様々なサイトカインの上昇のタイミングが違うため動物モデルでサイトカインの上昇時間や作用についても今後検討する必要がある、との返答がなされた。

次に、五島副査から新生児とアダルトの心筋細胞を両方使っているが、どのように分けて実験を行い、その理由と新生児とアダルト心筋細胞でSOCS1とSOCS3の割合が異なるのではないかと、質問がなされた。これに対して、この論文で新生児ラットの心筋細胞を使って、STAT, SOCS, iNOSなどのメッセンジャーRNA発現量とタンパクはタンパク発現量を検討し、アダルトラットの心筋細胞を使ってCa<sup>2+</sup>の濃度と収縮率を検討した。その理由は新生児からはアダルトと比べて、より多く、簡単に細胞が取れるので本論文では新生児の心筋細胞を主に使った。本論文では新生児とアダルト心筋細胞でSOCS1とSOCS3の割合を検討してないが、今後検討を加えて行きたい、との返答が得られた。

また、この論文に使ったEpacの刺激剤8-cpt-AMは本当にEpacだけを刺激しているかと、質問がなされた。これに対して、8-cpt-AMはcAMPと構造が似ているEpacに対して高い親和性を持っているアナログで多く使われている。そのため、本論文では8-cpt-AMをEpacの刺激剤として使用した。

また、この論文ではEpac阻害剤CE3F4を使用したがる心筋細胞での他の方法でEpacの選択性を確認できる検討はしたかと質問がなされた。これに対して、EpacのSiRNA (short interfering RNA) を使用し心筋細胞のEpacの発現を抑制することでEpacの選択性を検討するなどの方法があるが、まだ検討できていないため、今後検討して行きたいと思う、との返答が得られた。

次に、大橋主査から早い段階でSOCSが上昇し、遅い時間でiNOSが上昇していたが、整合性あるのか、それとも課題として検討する必要があるかと質問がなされた。これに対してはEpacの刺激によりSOCS3は0, 1, 3時間での検討においては刺激1時間でmRNAの上昇のピークであるが、もっと詳しい時間を検討できればと思う。SOCS1に関してはEpac刺激3時間でより上昇しているが、更に、長い時間刺激後のSOCS1の発現量を検討する必要があると思う。また、iNOSに関してはEpac刺激0, 0.5, 2, 6, 17, 24時間後の発現量を見た結果刺激6時間でより上昇しているが刺激30分から上昇始めていることが見られているため整合性がある、との返答が得られた。

また、IFN- $\gamma$ とIL-6の経路は共通であるかとの質問とアポトーシス病態に関してEpcacの役割についての質問がなされた。これに対して、IFN- $\gamma$ とIL-6両方Jak/STAT経路を活性化する共通した部分があるが、IFN- $\gamma$ は主にSTAT1を活性化し、IL-6はSTAT1とSTAT3を両方活性化するが、STAT3をより活性化する違いがあるとの返答がなされた。またアポトーシス病態に関しては、以前の研究でTACモデルを用いて、心臓組織のアポトーシスを調べたところ、Epcac欠損したマウスが野生型マウスと比べて有意にアポトーシスを抑制する結果を得られた。このことはEpcacのアポトーシスを抑制することが考えられる。との返答がなされた。

次に、今回の研究をどのように活かせるかと質問がなされた。これに対して、現在勤めている循環器病センターでのラボでは主に動物モデルで実験を行っているが、今回の研究で私は細胞実験の方法や知識を身につけることができたため、今後の研究では動物と細胞レベル両方検討しながら研究することができると思う、との返答がなされた。

上記以外にも、審査員の様々な質問に対して的確な返答を得た。これらの結果も踏まえ、本論文はEpcac1はSOCS3を誘導し、Jak/STAT/iNOS経路を抑制することで、サイトカインによる心機能障害を抑制することを示したもので、医学博士の学位に値するものと判断した。