

学位論文の要旨

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.)

Huiling Jin

金 慧玲

Cardiovascular Research Institute
Yokohama City University Graduate School of Medicine
横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 循環制御

(Doctoral Supervisor : Yoshihiro Ishikawa, Professor)
(指導教員 : 石川 義弘 教授)

学位論文の要旨

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.)

<http://rd.springer.com/article/10.1007%2Fs12576-016-0509-5>

第1章 要 旨

[序論]

敗血症は病原体によって引き起こされる全身性炎症反応症候群であるが、死亡率が高く増加傾向にあると報告されている。敗血症時に心機能障害が生じることがあり、敗血症性心筋症と呼ばれる。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ており、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 [Hunter J D and M Doddi. 2010, 日本集中治療医学会Sepsis Registry委員会., 2013].

敗血症時の心機能障害は、サイトカインの刺激による心筋細胞のJanus kinase-signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT)系の活性化が重要であると報告されている。活性化したJAK/STAT系は、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 [Yu X et al., 2003].

近年新規cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)標的タンパクとして注目されているexchange proteins directly activated by cAMP (Epac)は、このJAK/STAT系を抑制するタンパクであるSuppressors of cytokine signalling 3(SOCS3)の発現を誘導することが、内皮細胞等で報告された [Sands W A et al., 2006].

これらのことから我々は、Epacの機能亢進は心筋細胞においてもSOCS3を誘導し、JAK/STAT系を抑制することで、サイトカインによる心機能障害を抑制する可能性があると考えた。本研究はこれを検証することを目的とした。

[方法]

まず心筋細胞において JAK/STAT 系を活性化するサイトカインを明らかにするために、ラ

ット新生児由来の培養心筋細胞を様々なサイトカインで刺激し、STAT のリン酸化をウェスタンブロッティングで検討した。次に、サイトカインによる JAK/STAT 系活性化に対する Epac の作用を評価するために、Epac 活性化剤 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-Me-cAMP-AM (8-CPT-AM)等の存在、非存在下でサイトカインによる STAT3 のリン酸化反応を比較検討した。また Epac 活性化による心筋細胞における SOCS の messenger RNA (mRNA)とタンパクの発現量変化をそれぞれ、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法とウェスタンブロッティングで評価した。加えて Epac による SOCS3 の誘導のメカニズムを検討するために、phospholipase C (PLC), protein kinase C (PKC)阻害薬の存在下でも同様の実験を行った。またサイトカインによる iNOS の発現誘導に対する Epac の作用を明らかにするために、Epac 活性化剤存在、非存在下での、サイトカイン刺激後の iNOS 発現量をウェスタンブロッティングで検討した。またサイトカインは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、心筋細胞短縮率増強反応を抑制する。これらへの Epac の作用を検討するために、最後に我々は成体ラット培養心筋細胞を用いて、Epac 活性化剤存在、非存在下でこれらの検討を行った。

[結果]

今回検討したサイトカインのうち、IL-6が唯一STAT3のリン酸化を増強させ、interleukin-6 (IL-6)と IFN- γ が、STAT1 のリン酸化を増強させた。これを踏まえ以後のサイトカイン刺激の検討は IL-6 刺激によって行った。Epac 刺激剤により SOCS3 の mRNA、タンパク質の発現は有意に上昇し、その上昇は、PLC, PKC, に依存していることが明らかになった。Epac 刺激薬により、IL-6 による STAT3 のリン酸化は有意に抑制され、また iNOS の発現誘導も抑制された。また、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。

[結語]

Epacの活性化は、IL-6による心筋細胞のカルシウム上昇反応の抑制や、心筋細胞収縮能の抑制を有意に減弱させることが明らかとなった。またEpac活性化はPLC/PKCを介してSOCS3を誘導し、IL-6によるJAK/STAT経路活性化や、iNOSの発現誘導を抑制することが明らかとなり、これがEpacの、IL-6による心機能障害に対する保護的作用のメカニズムであることが示唆された。

本研究で明らかとなった、心筋細胞におけるEpacによるサイトカインシグナルの制御が、敗血症性心筋症に対する新たな治療法の確立につながる可能性があると考えられた。

[キーワード]

exchange proteins directly activated by cAMP (Epac), interleukin-6 (IL-6), Janus kinase-signal transducers and activators of transcription, Suppressors of cytokine signalling (SOCS)

[引用文献]

1. 日本集中治療医学会 Sepsis Registry 委員会., (2013), The japanese guidelines for the management of sepsis, *日集中医誌*, 20, 124-173
2. Yu X., Kennedy R.H., Liu S.J., (2003), JAK2/stat3, not erk1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes, *J Biol Chem*, 278, 16304-16309
3. Sands W.A., Woolson H.D., Milne G.R., Rutherford C., Palmer T.M., (2006), Exchange protein activated by cyclic amp (epac)-mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (socs-3) in vascular endothelial cells, *Molecular and cellular biology*, 26, 6333-6346

論文目録

I. 主論文

Huiling Jin, Takayuki Fujita, Meihua Jin, Reiko Kurotani, Yuko Hidaka, Wenqian Cai, Kenji Suita, Rajesh Prajapati, Chen Liang, Yoshiki Ohnuki, Yasumasa Mototani, Masanari Umemura, Utako Yokoyama, Motohiko Sato, Satoshi Okumura, Yoshihiro Ishikawa : Epac activation inhibits IL-6-induced cardiac myocyte dysfunction. *J Physiol Sci.* (in press)

II. 副論文

なし

III. 参考論文

1. Satoshi Okumura, Takayuki Fujita, Wenqian Cai, Meihua Jin, Iyuki Namekata, Yasumasa Mototani, **Huiling Jin**, Yoshiki Ohnuki, Yayoi Tsuneoka, Reiko Kurotani, Kenji Suita, Yuko Kawakami, Shogo Hamaguchi, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Takashi Tsunematsu, Yunzhe Bai, Sayaka Suzuki, Yuko Hidaka, Masanari Umemura, Yasuhiro Ichikawa, Utako Yokoyama, Motohiko Sato, Fumio Ishikawa, Hiroko Izumi-Nakaseko, Satomi Adachi-Akahane, Hikaru Tanaka, and Yoshihiro Ishikawa : Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J Clin Invest*, 124(6):2785-801, (2014)
2. Wenqian Cai, Takayuki Fujita, Yuko Hidaka, **Huiling Jin**, Kenji Suita, Rajesh Prajapati, Chen Liang, Masanari Umemura, Utako Yokoyama, Motohiko Sato, Satoshi Okumura, Yoshihiro Ishikawa : Disruption of Epac1 protects the heart from adenylyl cyclase type 5-mediated cardiac dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, 475(1):1-7, (2016)