

日本財団補助金による

1996 年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

1997年 3 月 4 日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 潘 静
研究機関 慶応義塾大学呼吸循環器内科 研究指導者 福田 恵一 職名 助手
所在地 〒160 東京都新宿区信濃町 35 番地 電話 03-3353-1211 内線 2310

II. 過去の研究歴

過去数年間、ラットなどの心筋梗塞モデル及びラット新生児の培養細胞を用いて、CO₂ Laser Transmyocardial revascularization により、虚血心筋への保護作用を研究してきた。1995年6月から心筋細胞において Angiotensin II などのサイトカインと JAK-STAT シグナル伝達経路の関与について研究を始めた。

III. 過去の研究実績

1. Laser Transmyocardial revascularization により、虚血心筋への保護作用を明らかにした。これらの成果は学会誌等に発表した。
2. 心筋細胞では、in vitro において Angiotensin II は JAK-STAT シグナル伝達系を介して、心筋細胞を肥大させることを明らかにした。研究成果は日本循環器学会、アメリカ心臓病学会にて報告した。

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

- I. 1997年日本循環器学会 1. ラット圧負荷肥大心における JAK-STAT シグナル伝達系の活性化と Angiotensin II の関与 2. ラット圧負荷肥大心における Cardiotrophin-1 の発現亢進と JAK-STAT シグナル伝達系の活性化
II. 1996年、69th アメリカ心臓病学会: 1. Angiotensin II directly stimulates JAK/STAT pathway through AT-1 receptor in rat cardiomyocyte. 2. LIF, a potent Cardiac Hypertrophic cytokine, Activates JAK/STAT pathway in Cardiac Myocyte.

(2) 学会誌等に発表した論文 (無) ・ 有 (雑誌名・論文名)

V. 今後の研究計画及び希望

in vitro の培養細胞を用いて、実験的心肥大において JAK-STAT 系を活性化する経路として何の因子が関与しているかを研究する予定です。希望としては、日本でもっと勉強して、いろいろな技術を身につけて、中国へ帰ると、これらの技術をいかして、つづけて循環器疾患の研究をすること。

VI. 研究報告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載して下さい。)

心筋細胞にとって肥大現象は重要な生理学的適応現象であるが、その機序はいまだ完全には明らかになっていない。最近の研究により Angiotensin II や、種々のサイトカインによって心筋細胞肥大を受けることが推測されている。これらのサイトカインは JAK-STAT pathway を介してシグナル伝達を行うことが知られている。しかし in vivo の心臓でこれらのサイトカインが実際に心肥大の形成に関与するかどうかは明らかではない。in vivo の心臓で JAK-STAT 系が心肥大の形成に重要な働きを持つのか否かを明らかにすることを目的として本研究を開始した。ラットの大動脈結紮による圧負荷心肥大モデルを作成し、JAK-STAT 系のシグナル伝達の活性化を分子生物学の方法や、免疫組織学的方法により研究した。圧負荷刺激を受けた心筋組織をホモジネートし、JAK、STAT の抗体を使って免疫沈降し、そして SDS-PAGE および Western blotting を行って、p-酸化チロシンの抗体でこれらの p-酸化の状態を検出した。また肥大刺激された心筋の核蛋白質を抽出し、Gel mobility shift assay を用いて、STAT が細胞質から核内に移動するのを、および STAT の転写活性化を検出した。さらに Angiotensin 転換酵素阻害剤や、Angiotensin II 受容体 II 型 blocker を使用して、Angiotensin II が圧負荷際の JAK-STAT シグナル伝達系の活性化との関与を明らかにした。その結果、ラットの大動脈結紮による圧負荷心肥大モデルでは JAK1、JAK2、Tyk2 がチロシリンと酸化されること、および STAT1、STAT2、STAT3 がチロシリンと酸化されることを明らかにした。この活性化に伴い GAS/ISRE および SIE の Gel shift が観察され、心肥大時には JAK-STAT シグナル伝達系が関与していることを明らかにした。さらに Angiotensin II 受容体 II 型 blocker などを用いて研究した結果、圧負荷肥大心における JAK kinase の活性化には Angiotensin II-dependent と independent の経路があることが示された。これらの成果は日本循環器学会、アメリカ心臓病学会にて報告した。今後、心肥大における JAK-STAT シグナル伝達系の活性化は Angiotensin II 以外、ほかのサイトカイン (Cardiotrophin-1, leukemia inhibitory factor など) がどの程度関与しているかを研究する予定です。

VII. 指導教官の意見

潘静君は我々の研究グループにおいて精力的に研究を続けてこられ、以下の研究を成就した。すなわち、潘静君はラットの心臓が圧負荷を受けた時に各種シグナル伝達系が活性化されるがこの際に JAK1, JAK2, Tyk2 の3種の JAK kinase family が活性化されること、その下流の STAT1, STAT2, STAT3 がリン酸化されること、さらにこれらの転写因子が活性化され、SIE および GAS/ISRE の転写活性が上昇することを gel shift assay により証明した。さらにこれらの因子の活性化には、angiotensin II dependent と angiotensin II independent の pathway が有ることを明らかにした。この間遺伝子工学の各種研究手法に習熟し、短期間に目覚ましい成長をされた。本研究の成果と潘静君の努力は賞賛に値するものであると確信している。

ラット圧負荷肥大心におけるJAK-STATシグナル伝達系の活性化と Angiotensin II (Ang II) の関与

慶應義塾大学呼吸循環器内科 潘 静

福田恵一・小玉博明・牧野伸司・馬場彰泰・高橋暁行・

佐野元昭・楠原正俊・堀進悟・小川聡

【目的】我々は培養心筋細胞でAng IIがJAK2, Tyk2, STAT1, STAT2を介したシグナル伝達を行うことを前回報告した。本研究の目的は大動脈結紮によるラット圧負荷肥大心においてJAK-STAT系が活性化されるか否かとこれにAng IIが関与するか否かを明らかにすることである。【方法】ラット(300g)の腹部大動脈を結紮し0, 5, 15, 30, 60分後に心臓を摘出した。(1)JAK1, 2, Tyk2, STAT1-4の抗体により免疫沈降しチロシンリン酸化を観察した。(2)左室心筋の核分画を抽出し, GAS/ISREに対するゲルシフトアッセイを行った。(3)圧負荷後JAK kinaseとAT1受容体の結合が増強するか否かを共免疫沈降法により観察した。(4)AT1受容体拮抗薬E4177およびACE阻害薬cilazapril存在下に(1)の実験を行った。【結果】(1)圧負荷5分後よりJAK1, JAK2, Tyk2のチロシンリン酸化を認めた。STAT1, 3, 4は結紮後5分よりリン酸化を認め, 15分で最大となった。(2)結紮後5分のサンプルよりGAS/ISREのゲルシフトを認め, 30分で最大となった。(3)AT1受容体とJAK2, Tyk2の共免疫沈降は安静時より認められたが, 圧負荷後5分より増強し15分で最大約20倍となった。JAK1との共免疫沈降は認められなかった。(4)E4177およびACE阻害薬cilazapril存在下では圧負荷刺激によるJAK1のリン酸化の抑制は認めなかった。JAK2のリン酸化は部分的に抑制され, Tyk2のリン酸化は著しく抑制された。【総括】圧負荷肥大心ではJAK-STATを介したシグナル伝達系が活性化された。Ang IIはこのうちTyk2の活性化と一部のJAK2の活性化に関与していた。圧負荷肥大心におけるJAK kinaseの活性化にはAng II-dependentと-independentの経路があることが示された。

ラット圧負荷肥大心におけるCardiotrophin-1 (CT-1) の発現亢進とJAK-STATシグナル伝達系の活性化

慶應義塾大学呼吸循環器内科 潘 静

福田恵一・小玉博明・牧野伸司・馬場彰泰・高橋暁行・
佐野元昭・堀進悟・小川聡

【目的】CT-1は培養心筋細胞に対し強力な心肥大作用を持つサイトカインであるが、*in vivo*における生理学的・病態生理学的役割は解明されていない。本研究の目的はラット圧負荷肥大心においてCT-1の発現が亢進するか否かとCT-1のシグナル伝達系であるJAK-STATが活性化されるか否かを明らかにすることである。【方法】(1)ラット(300 g)の腹部大動脈を結紮後0分,30分,1,3,6時間目に心臓を摘出した。RNAを抽出し、CT-1のNorthern Blotを行った。(2)大動脈を結紮後0,5,15,30,60分後に心臓を摘出し、JAK1,2,Tyk2,STAT1,3に対し各抗体により免疫沈降しチロシンリン酸化を観察した。(3)圧負荷後にJAK kinaseとgp130受容体の結合が増強するか否かを共免疫沈降法により観察した。(4)左室心筋より核分画を抽出し、SIEに対するgel shift/super shift assayを行った。【結果】(1)CT-1mRNAは結紮前より発現を認めたが結紮後1時間をpeakとして著しく上昇した。(2)圧負荷5分後よりJAK1,2,Tyk2のリン酸化を認め、60分で最大となった。STAT1,3は結紮後5分よりリン酸化を認めたが、30分で一度減弱しその後60分で再び上昇し最大となった。(3)gp130受容体とJAK1,2,Tyk2の共免疫沈降は安静時より認められたが、圧負荷後5分より増強し15分で最大となった。(4)結紮後15分のサンプルよりSIEのゲルシフトを認め、60分で最大となり以後減少した。【総括】圧負荷肥大心では圧負荷後1時間をpeakとしてCT-1mRNAの発現亢進が観察された。JAK-STAT系のリン酸化およびSIEのgel shiftは圧負荷後早期より活性化が認められたが、peakは1時間でCT-1の発現と一致しており、圧負荷肥大心においてCT-1の関与が示唆された。