

200500844A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

特発性拡張型心筋症の原因解明に関する臨床
研究 (H15-難治-07)

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成 18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
特発性拡張型心筋症の原因解明に関する臨床研究-----	1
小室 一成	
II. 分担研究報告書	
1. 拡張型心筋症心臓片の提供-----	5
磯村 正	
2. DNAchip による解析-----	7
油谷 浩幸	
3. 心臓の組織的解析-----	9
寺崎 文生	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	15

研究要旨

特発性拡張型心筋症に対して行われた心臓縮小形成術（バチスタ手術）により得られた不全心筋を用いて遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果に基づきマウスモデルを作成して検討し、これまでに心不全防御因子として、心筋特異的転写因子 *Csx*、熱ショック分子制御因子 *HSF-1*、上皮細胞増殖因子ファミリー（*EGF*、*HB-EGF*）、神経増殖因子、血管新生関連因子（*VEGF*、*VEGF* レセプター）、カベオリン関連遺伝子（*caveolin-3*）などを、また心不全増悪因子として酸化酵素 *12-lipoxygenase*、オートファジー関連遺伝子を同定した。平成 17 年度には特に新たに油谷らが同定した不全心で発現亢進のみられる小胞体ストレス関連遺伝子についてのマウスモデルの作成・解析を行い、それらの心不全保護因子としての意義を示唆するデータを得ている。以前寺崎らは、心筋細胞変性・細胞死に対する自己貪食（*autophagy*）やユビキチン-プロテアソーム系（*ubiquitin-proteasome system*）などのタンパク質分解系の関与について解析を進め、それらの亢進に心筋内の酸化タンパクの集積が重要であることを明らかにした。平成 17 年度には、不全心筋細胞におけるアグリゾームについて免疫組織学的検索を行った。その結果、変性した心筋細胞内に *HDACs* 陽性顆粒や封入体が認められ、それらはユビキチンにも陽性であったことから、不全心筋細胞においてアグリゾームが増加し心筋細胞の変性や細胞死に関与する可能性が示唆された。また須磨らは平成 15 年度には、炎症性サイトカインの発現亢進と抗炎症性サイトカインの発現低下が特発性拡張型心筋症の予後不良因子であることを確認していたが、平成 17 年度には炎症の結果生じる心筋線維化の重症度が心室縮小術後の予後決定因子であることを明らかにした。寺崎らのデータや須磨らのデータは *DNA chip* やマウスの解析で得られた結果、特に不全心で発現亢進のみられる遺伝子群と密接に関連している可能性も示唆されることから、今回同定された遺伝子群は、今後特発性拡張型心筋症を含めた心不全治療のターゲットとなりうると思われた。

A. 研究目的

特発性拡張型心筋症の原因は未だ不明である。本研究では、心臓縮小手術（バチスタ手術）にて得られた不全心筋を用いて網羅的な遺伝子発現解析、病理解析を行う。その結果得られた情報をもとにマウスモデルを作成し、特発性拡張型心筋症の原因遺伝子の同定を目指すとともに心不全病態生理の解明を行う。

B. 研究方法

心臓縮小手術（バチスタ手術）にて得られた不全心筋から *RNA* サンプルを調整し、*DNA chip* 解析を行った。その結果によって得られたいくつかの遺伝子について

はマウスモデルを作成し、心不全病態生理への関与を検討した。不全心筋の病理学的検討も行った。また、一部のサンプルを利用してこれらの遺伝子発現に影響を及ぼす可能性のある因子についても検索した。

（倫理面への配慮）

バチスタ手術にて切除された心筋片を用いた研究に関しては、それぞれの施設の倫理委員会の承認に基づき進めた。特に、患者からのインフォームドコンセントの取得や情報の匿名化による個人情報の保護には十分留意した。マウスの取り扱いに関しては、各施設の動物取り扱い規定に従い、動物愛護の精神にのっとり、不要な苦痛を与えることがない様十分な配慮をした。

C. 研究結果

インフォームドコンセントを得、バチスタ手術の際に切除した症例の不全心筋サンプルを準備した。平成15-16年度には炎症性サイトカインの発現亢進と抗炎症性サイトカインの発現低下が特発性拡張型心筋症の予後不良因子であること、その原因のひとつとして coxsackie B virus の持続性感染の関与が考えられることを示唆したが、平成17年度には、それらの炎症の結果としての心筋線維化がバチスタ手術後の予後と相関があることを実験モデルにより明らかにした。

以前病理学的検討によって、自己貪食 (autophagy) やユビキチン-プロテアソーム系 (ubiquitin-proteasome system) などのタンパク質分解系が特発性拡張型心筋症において認められる心筋細胞変性・細胞死に関与していることを報告した。細胞内の酸化タンパク質など、折りたたみ不全 (misfolding) を起こした不要なタンパク質がユビキチン-プロテアソーム系の処理能力をこえて増加するか、またはユビキチン-プロテアソーム系の処理能力が低下すると不要タンパク質は凝集体を形成し、能動的に輸送されてアグリゾームを形成するとされる。最近、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) がアグリゾーム形成に関与することが報告された。そこで平成17年度には、不全心筋細胞におけるアグリゾームについて組織学的検討を加えた。その結果、変性した心筋細胞内に HDACs 陽性顆粒や封入体が認められ、それらはユビキチン、pericentrin および tubulin にも陽性であったことから、不全心筋細胞においてアグリゾームが増加し心筋細胞の変性や細胞死に関与する可能性が示唆された。

DNA chip のデータから心不全防御因子として、心筋特異的転写因子 Csx や熱ショック分子制御因子 HSF-1、上皮細胞増殖因子ファミリー (EGF)、小胞体ストレス関連遺伝子 (SIP)、神経増殖因子、血管新生関連因子 (VEGF、VEGF レセプター)、カベオリン関連遺伝子 (caveolin-3) などを、また心不全増悪因子として酸化酵素 12-lipoxygenase、オートファジー関連遺伝子などを

同定した。EGF ドミナントネガティブ過剰発現マウスを作成したところ、生後20週以内に心不全で死亡する拡張型心筋症に似た形質を示すマウスモデルが確立され、EGF シグナルが心不全の病態生理に深く関与していることが分かった。DNA chip 解析により神経増殖因子の一つが心不全に関与している可能性が示唆されたが、その因子のノックアウトマウスホモ接合体は胎生致死のためこれまでヘテロで解析している。その結果、心不全モデルにおいてその因子が保護的に働くことが明らかとなってきた。平成17年度はその因子の心筋特異的ノックアウトマウス、血管内皮特異的ノックアウトマウスを作成し検討した結果、血管内皮細胞から分泌される神経増殖因子が、心筋保護に働いていることが明らかとなった。Caveolin-3 は心筋細胞のカベオラを構成する分子で、eNOS を含む様々なシグナルコンポーネントを制御している。平成16年度の caveolin-3 ドミナントネガティブ発現マウスの解析では、様々な心不全シグナルに対して抵抗性があることが明らかとなった。平成17年度には、さらにその分子メカニズムに NO が関与しているかどうかを検討するため、NO 阻害剤の投与により解析したところ、NO がアポトーシスに重要なカスパーゼ活性を抑制することにより心筋保護に働いていることが明らかとなった。心不全増悪因子として同定した酸化酵素 12-lipoxygenase のノックアウトマウスを用いた実験では、心筋梗塞後のアポトーシス抑制、線維化、リモデリングの縮小がみられ、新たな治療のターゲットとなりうると考えられた。平成17年度には、心臓特異的な過剰発現マウスを確立した。12-lipoxygenase 活性の上昇は、低酸素により誘導されること、その合成産物である 12HETE が心筋細胞のアポトーシスを誘導することなどを明らかにした。Autophagic cell death 誘導マウスモデルでは、autophagic cell death 誘導後約2-3週間で拡張型心筋症に似た心不全を発症し死亡する。平成17年度は本マウスを用いて心筋細胞の autophagic cell death 発症を抑制する薬物のスクリーニングを行い、いくつかの候補を得た。新た

に不全心で発現亢進のみられる遺伝子群として、小胞体ストレス関連遺伝子が同定された。それらの活性の亢進が心保護的に働くことを明らかにした。また、同時に同定された癌抑制遺伝子 p53 が抗血管新生作用により心不全増悪因子として働くことも明らかとなった。

D. 考察

特発性拡張型心筋症の変性心筋細胞においては、ユビキチン-プロテアソーム系が亢進し、ユビキチン陽性顆粒の集簇が観察されると同時に種々の酸化タンパク質の集積がみられることが分かった。また、折りたたみ不全 (misfolding) を起こした不要なタンパク質がユビキチン-プロテアソーム系の処理能力をこえて増加すると生成されるアグリゾームが変性心筋細胞に増加していることも観察された。すなわち、特発性拡張型心筋症の心筋細胞においては、ユビキチン-プロテアソーム系の破綻あるいはアグリゾームの増加蓄積がおこり、それらが心筋細胞変性や細胞死に関与する可能性があると考えられた。これらの結果は、不全心における酸化酵素 12-lipoxygenase やオートファジー関連遺伝子の発現亢進に合致する結果であると考えられた。

DNA chip を用いた網羅的遺伝子発現の解析とそれらに基づくマウスモデルの作成・解析によって、すでにいくつかの心不全関連遺伝子が同定した。とくに、阻害薬の存在する 12-lipoxygenase や p53、神経増殖因子や血管新生促進による心不全の治療は、現実的にも施行可能であり、今後治療のターゲットとなりうると考えられた。

また抑制型 EGFR のマウスモデルや autophagic cell death 誘導マウスモデルは、特発性拡張型心筋症にきわめて類似した病態を示すことから、治療薬の開発にも重要なモデルとなりうる。実際、これまでにいくつかの薬剤に対してスクリーニングを行い、その有用性が証明された。

E. 結論

不全心筋を用いた網羅的な遺伝子発現解析と病理学的解析、分子生物学的解析、あるいは発生工学を応用した総合的な解析は、特発性拡張型心筋症の原因遺伝子の同定や心不全病態生理の解明に有用である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Harada, M., Qin, Y., Takano, H., Minamino, T., Zou, Y., Toko, H., Ohtsuka, M., Matsuura, K., Sano, M., Nishi, J., Akazawa, H., Kunieda, T., Zhu, W., Hasegawa, H., Kunisada, K., Nagai, T., Nakaya, H., Yamauchi-Takahara, K., Komuro, I. G-CSF prevents cardiac Remodeling after myocardial infarction by activating Jak/Stat in cardiomyocytes. *Nat Med* 11:305-311, 2005.

・Ge X, Yamamoto S, Tsutsumi S, Midorikawa Y, Ihara S, Wang SM, Aburatani H. Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth-of-expression in normal tissues. *Genomics* 86(2):127-141, 2005.

2. 学会発表

・Akazawa H, Komuro I, et al. A pathogenic role of autophagic cardiomyocytes death in experimentally induced heart failure in mice. Gordon Research Conference on Autophagy in Stress, Development and Diseases, April 24-29, 2005, Il Ciocco, Italy.

・油谷浩幸: Genome Structural Variation Symposium (Toronto, 7/21, 2005) New Algorithms for Mining Copy Number Imbalances using Affymetrix SNP Arrays.

・油谷浩幸: 2nd Annual Asia Pacific Affymetrix User Group Meetings (シンガポール、10/24, 2005) From genome to epigenome.

・磯村 正 種々の拡張型心筋症に対する自己心温存手術と中期成績 第 58 回日本胸部外科学会（平成 17 年 10 月 5 日～10 月 7 日、岡山）。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

研究要旨

炎症性のサイトカインが心不全の発症、進展に関与していることが示唆されている。平成15年度に我々は、手術で得られた心筋サンプルを用いて不全心におけるサイトカインの発現を調べ、その臨床的意義について検証し、炎症性サイトカインの発現亢進と抗炎症性サイトカインの発現低下は特発性拡張型心筋症の予後不良因子であることを示唆した。平成16年度には炎症を惹起させる原因としてのvirus感染について検討した。その結果、特発性拡張型心筋症の心臓には持続性のvirus感染が特異的にみられ、炎症性サイトカインの発現変化だけでなく、その他の心不全増悪因子の発現亢進などにも関与している可能性があることが示唆された。本年度は、ミオシン投与による拡張型心筋症のラットモデルを確立し、心室縮小術に与えるパラメータについて検討したところ、炎症の結果生じる心筋線維化の重症度が術後の予後決定因子であることが明らかとなった。

ここで本年度は、炎症後の心筋線維化の重症度が心室縮小術後の予後に与える影響について検討した。

A. 研究目的

重症心不全を伴う心筋症に対して各種の薬剤治療が試みられているが今なお心移植の必要性は高い。しかし移植治療の特殊性に基づく種々の制約により、移植を望む全ての人々に必要な時にいつでも提供出来る訳ではない。このような状況の下で、薬剤治療の限界と臓器置換との大きな間隙を埋めるべく自己心修復手術が注目され、左室部分切除術、心室内パッチ形成術、僧帽弁修復術などが試みられている。我々は以前より特発性拡張型心筋症を含めた重症心不全患者に対し左室縮小手術を行っており良好な成績をおさめているが、長期予後の改善に関しては未だに不良である。平成15年度は手術で得られた心筋サンプルを用いて不全心におけるサイトカインの発現を調べ、その臨床的意義について検証し、特発性拡張型心筋症の病態生理には心臓における炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの発現のバランスが重要であり、術後臨床経過の予後にも関与している可能性があることを示唆した。平成16年度には、特発性拡張型心筋症の病態生理にvirus感染が関与していることを示唆するデータを得た。そ

B. 研究方法

Lewis ラットにミオシンにて immunization を行ない、拡張型心筋症モデルを作成した。心室縮小術前と術後4週間に心エコーやカテーテルによる心機能評価を行った。また4週間後に病理学的検討による心筋線維化の評価を施行した。

（倫理面への配慮）

マウスの取り扱いに関しては、当施設の動物取り扱い規定に従い、動物愛護の精神にのっとり、不要な苦痛を与えることがない様十分な配慮をした。

C. 研究結果

心室縮小術はすべてのラットにおいて、術直後の心機能改善をもたらした (Emax 0.28 ± 0.14 mmHg/ μ l から 0.48 ± 0.18 mmHg/ μ l、左室拡張末期圧 21.0 ± 6.1 mmHg から 13.3 ± 5.1 mmHg)。4週間後の病理学的検討では、心筋線維化の範囲は4.7%から45.2%と幅広く分布して

いた。4週間後の心室径が維持されていた群、心室径が拡大した群と比較すると、中隔の心筋線維化率が拡大群で有意に高かった。また、全ての集団において、中隔の心筋線維化率と術後の心室径拡大率は有意な相関があった ($r=0.951, P<0.01$)。

D. 考察

心室縮小術は、急性期には全てのケースで効果があるが、長期の術後の成績は、心筋線維化率に影響を受けることが明らかとなった。心筋線維化は、炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの発現のバランスによって、影響を受けることも示唆されている。これらの結果は、炎症性サイトカインの発現亢進と抗炎症性サイトカインの発現低下は特発性拡張型心筋症の予後不良因子であることを示した平成15年度の結果と合致するものであると考えられた。

E. 結論

特発性拡張型心筋症の心臓には持続性の virus 感染が特異的にみられ、炎症性サイトカインの発現変化等を介して、心筋線維化に関与している可能性がある。これらの程度は、移植を除く唯一の外科的治療法である左室縮小手術の予後に強く影響することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

磯村 正 種々の拡張型心筋症に対する自己心温存手術と中期成績 第58回日本胸部外科学会(平成17年10月5日-10月7日、岡山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

研究要旨

特発性拡張型心筋症は一部の原因遺伝子が解ってきたものの大部分は原因不明である。そこで本研究では特発性拡張型心筋症に対して行われた心臓縮小形成術（バチスタ手術）により得られた不全心筋を用いて遺伝子発現を網羅的に解析（DNA chip 解析）することによって、特発性拡張型心筋症あるいは心不全発症の分子機序を明らかにすることを目的とした。平成 16 年度までの解析の結果、心筋保護作用があると報告されている遺伝子を含めた発現低下遺伝子群とアポトーシス促進因子を含んだ発現増加遺伝子群を確認したが、本年度もさらにサンプルの解析をすすめた。その結果、心筋保護因子として小胞体ストレス関連因子を、心不全増悪因子として癌抑制遺伝子 p53 を同定した。これらの遺伝子の改変マウス作成や遺伝子発現と臨床データとの関連の検討は、新たな心不全治療のターゲット開発の基盤研究となりうると考えられる。

A. 研究目的

特発性拡張型心筋症は一部の原因遺伝子が解ってきたものの大部分は原因不明であり、また原因遺伝子が判明したものでも、その遺伝子の変異により収縮不全をきたす分子機序については未だ不明である。また、欧米における心不全のほとんどは虚血性であり、拡張型心筋症は少ないことより、多数の拡張型心筋症の不全心筋を用いた網羅的な遺伝子発現の解析は行われていない。分担研究者の須磨は 10 年以上前より特発性拡張型心筋症に対する心不全治療として積極的にバチスタ手術を行っており、現在既に解析可能な心筋片が 50 以上となっている。バチスタ手術で得られる心筋片は大変新鮮であることより、RNA の分解が少なく、DNAchip 解析には最適である。そこでこれらのサンプルを用いて遺伝子発現を網羅的に解析することによって、特発性拡張型心筋症あるいは心不全発症の分子機序を明らかにする。

B. 研究方法

左室縮小形成術を受けた特発性拡張型心筋症患者 30 例を対象とした。対照には正常組織所見を示した心筋生

検サンプルを用いた。RNA の抽出にはグアニジン-フェノール法を用いた。Chip 解析には、Affymetric 社製ヒト Gene Chip を用いて解析した。

（倫理面への配慮）

バチスタ手術にて切除された心筋片を用いた研究に関しては、それぞれの施設の倫理委員会の承認に基づき進めた。特に、患者からのインフォームドコンセントの取得や情報の匿名化による個人情報の保護には十分留意した。

C. 研究結果

不全心を用いて DNAchip 解析をした結果、100 前後の遺伝子においてその発現が大きく変化していることが確認された。平成 16 年度までの解析にて不全心で発現の低下していた主な遺伝子としては心筋特異的転写因子 Csx/Nkx2.5、増殖因子受容体 FGFR や EGFR、カベオラの形成に重要な caveolin-3、熱ショック分子制御因子 HSF-1、神経増殖因子、血管新生関連因子などが確認された。これに対して、不全心にて発現の亢進していた主な遺伝子としては、アポトーシス促進因子 AIF、酸化酵素 12-lipoxygenase、オートファジー関連遺伝子が確認

された。本年度もさらに解析を進め、心保護因子として小胞体ストレス関連因子を、心不全増悪因子として癌抑制遺伝子 p53 を同定した。

D. 考察

特発性拡張型心筋症の不全心筋では、様々な遺伝子の発現パターンが変化していることが明らかとなった。不全心で発現低下のみられた心筋特異的転写因子 Csx/Nkx2.5 については小室らがすでに報告しているように心筋保護作用があり、一部の拡張型心筋症の病態生理に重要である可能性が示唆された。平成 16 年度までに我々が同定した心不全防御因子である増殖因子受容体 EGFR や熱ショック分子制御因子 HSF-1 については小室らがマウスモデルを作成・解析した結果、ともに心不全の病態にきわめて重要であることが分かった。また、12-lipoxygenase 欠失マウスを用いた検討も進められ、12-lipoxygenase が心不全増悪因子として重要であることが明らかとなった。本年度同定した小胞体ストレス関連因子については、薬理的な阻害などを用いて検討が加えられ、心不全に保護的に働くことを見いだしている。以上のように本研究に用いられた網羅的な遺伝子発現の解析は信頼性があり、より特異的で重要な遺伝子を同定できる可能性があると考えられた。

E. 結論

多数の拡張型心筋症の不全心筋を用いた網羅的な遺伝子発現の解析は非常に有用であり、得られた結果をマウスモデルにて解析することによって特発性拡張型心筋症あるいは心不全発症の分子機序を明らかにしうることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

I. 論文発表

- (1) Naito AT, Akazawa H, Takano H, Minamino T,

Nagai T, Aburatani H, Komuro I. Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Plays a Critical Role in Early Cardiomyogenesis by Regulating Canonical Wnt Signaling. **Circ Res.** 97(2):144-51, 2005

- (2) Ge X, Yamamoto S, Tsutsumi S, Midorikawa Y, Ihara S, Wang SM, Aburatani H. Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth-of-expression in normal tissues. **Genomics** 86(2):127-141, 2005

2. 学会発表

- (1) Aburatani K. Genome Structural Variation Symposium. New Algorithms for Mining Copy Number Imbalances using Affymetrix SNP Arrays. Toronto, 7/21/2005.
- (2) Aburatani K. 2nd Annual Asia Pacific Affymetrix User Group Meetings. From genome to epigenome. Singapore, 10/24/2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

心臓の組織的解析

分担研究者 寺崎 文生 大阪医科大学第三内科 講師

研究要旨

特発性拡張型心筋症の進行過程において心筋細胞変性や細胞死が証明され、さらに近年、心筋細胞変性・細胞死に自己貪食（autophagy）やユビキチン-プロテアソーム系（ubiquitin-proteasome system）などのタンパク質分解系が関与している可能性が報告されている。これまで我々は特発性拡張型心筋症患者心筋においてユビキチン-プロテアソーム系の発現が亢進していることを報告した（平成15年度）。また、それらのタンパク質分解系が亢進する理由やそれにより分解される基質について明らかにするため、心筋細胞変性・細胞死におけるユビキチン-プロテアソーム系の発現と酸化ストレスとの関連に焦点をあて、心臓縮小形成術（パチスタ手術）で切除した不全心筋の免疫組織学的検索を行った。その結果、特発性拡張型心筋症の変性心筋細胞においてユビキチン-プロテアソーム系が亢進し、ユビキチン陽性顆粒の集簇が観察されると同時に種々の酸化タンパク質の集積が観察された。不全心の進展過程において発生する酸化物質が心筋細胞変性に関与し、酸化ストレスによって生成される酸化タンパク質がユビキチン-プロテアソーム系の基質となっている可能性が考えられた（平成16年度）。細胞内の酸化タンパク質など、折りたたみ不全

（misfolding）を起こした不要なタンパク質がユビキチン-プロテアソーム系の処理能力をこえて増加するか、またはユビキチン-プロテアソーム系の処理能力が低下すると不要タンパク質は凝集体を形成し、能動的に輸送されてアグリゾームを形成するとされる。最近、ヒストン脱アセチル化酵素（HDACs）がアグリゾーム形成に関与することが報告された。今回は、不全心筋細胞におけるアグリゾームについて検討するため拡張型心筋症患者心筋の免疫組織学的検索を行った。その結果、変性した心筋細胞内にHDACs陽性顆粒や封入体が認められ、それらはユビキチンにも陽性であった。不全心筋細胞においてアグリゾームが増加し心筋細胞の変性や細胞死に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

特発性拡張型心筋症（以下 DCM）における不全心筋において酸化などの種々のストレスが増加し、細胞内のシグナル伝達など細胞の恒常性に悪影響を及ぼすことが明らかとなっている。そのような恒常性の破綻は心筋細胞の変性や細胞死に関与し、不全心の増悪因子となる。近年、ユビキチン-プロテアソーム系がシグナル伝達などに関与する短寿命タンパク質の分解に主たる役割を果たし、細胞の恒常性維持に重要であるこ

とが示されている。さらに、ユビキチン-プロテアソーム系が種々のストレスにより破綻すると、処理できないタンパク質が蓄積し細胞死を引き起こすことがある。これまで、我々は DCM 患者心筋においてユビキチン-プロテアソーム系の発現が亢進し、とくに変性した心筋細胞において顕著で、陽性所見が核近傍に集簇することを報告した。また、そのようなユビキチン-プロテアソーム系が反応する基質タンパク質について検討した。その結果、不全心の進展過程において発生

する酸化物質が心筋細胞変性に関与し、酸化ストレスによって生成される酸化タンパク質がユビキチン-プロテアソーム系の基質となっている可能性が考えられた（平成15年度および16年度）。

細胞内の酸化タンパク質など、折りたたみ不全（misfolding）を起こした不要なタンパク質がユビキチン-プロテアソーム系の処理能力をこえて増加するか、またはユビキチン-プロテアソーム系の処理能力が低下すると不要タンパク質は凝集体を形成し、能動的に輸送されてアグリゾームを形成するとされる。最近、ヒストン脱アセチル化酵素（HDACs）がアグリゾーム形成に関与することが新たに報告された。今回我々は、不全心筋細胞におけるアグリゾームについて検討するため心臓縮小形成術（バチスタ手術）で切除した不全心筋の免疫組織学的検索を行った。

B. 研究方法

左室縮小形成術を受けたDCM患者30例を対象とした。左室縮小形成術時切除心筋の一部を光顕的に検索した。また、ユビキチンおよびプロテアソームに対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行いユビキチンおよびプロテアソームの発現と局在を検討した。さらに、HDAC6、pericentrin および tubulin を標識する抗体を用いて免疫染色を行いその発現と局在を検討した。

なお、研究対象者に研究目的と方法につき説明を行い承諾を得た。対照には正常剖検心4例を用いた。

C. 研究結果

正常心筋においては、HDAC6、ユビキチンおよびプロテアソームの発現は軽度であった。DCM心筋の組織学的検索では、光顕的に細胞質内の空胞形成や筋原線維の粗少化、核の変形などの変性所見を示す心筋細胞を認めた。これらの変性心筋細胞において、HDAC6陽性の顆粒や封入体が認められ、それらは、ユビキチン、pericentrin および tubulin にも陽性であった。

D. 考察

細胞は生理的な環境において転写因子などの種々のタンパク質を細胞内の恒常性の維持のために合成している。一方、ユビキチン-プロテアソーム系はそれらの短寿命タンパク質の選択的タンパク分解に寄与し、細胞の恒常性維持に必要不可欠である。

病的な不全心筋において心筋細胞の変性や脱落が観察される。我々は、心筋細胞において、ネクローシスやアポトーシス以外に自己貪食（autophagy）を主体とする心筋細胞変性が認められ、一部の変性心筋細胞は多数の自己貪食空胞を伴い細胞死（autophagic cell death）に陥ることを報告した。また、DCM患者心筋の心筋細胞変性に伴ってユビキチンおよびプロテアソームの高度発現が認められたことより、心筋細胞変性に、長寿命タンパク質の処理系である自己貪食（autophagy）以外にも短寿命タンパク質の処理系であるユビキチン-プロテアソーム系が関与している可能性が示唆された。

さらに、不全心筋細胞において酸化ストレスなどの細胞内ストレスが増大していることが報告されており、折りたたみ不全タンパク質（misfolded proteins）の増加に伴ってユビキチン-プロテアソーム系が代償機能として亢進し、不全心筋細胞の機能および形態の恒常性維持を行っているものと推察される。

今回我々は、不全心筋細胞におけるアグリゾームについて検討するため心臓縮小形成術（バチスタ手術）で切除した不全心筋の免疫組織学的検索を行った。その結果、変性した心筋細胞において、HDAC6陽性の顆粒や封入体が認められた。それらは、ユビキチン、pericentrin および tubulin にも陽性でありアグリゾームと考えられた。不全心筋細胞においては、酸化タンパク質など、折りたたみ不全（misfolding）を起こした不要なタンパク質がユビキチン-プロテアソーム系の処理能力をこえて増加するか、またはユビキチン-プロテアソーム系の処理能力が低下しているため、アグリゾームが形成されていると考えられた。また、

ユビキチン-プロテアソーム系の破綻あるいはアグリゾームの増加蓄積が心筋細胞変性や細胞死に關与する可能性が示唆された。

第 69 回日本循環器学会 2005 年 3 月

6) Histone deacetylase 6 accumulates in ubiquitin-positive aggresomes in dilated cardiomyopathy.

第 70 回日本循環器学会 2006 年 3 月

E. 結 論

DCM の心筋細胞変性において、HDAC6 陽性の顆粒や封入体が認められ、それらは、ユビキチン、pericentrin および tubulin にも陽性であった。DCM の不全心筋細胞においてアグリゾームが増加蓄積していることが示唆された。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし

2. 学会発表

1) Lysosomal destruction of cardiomyocytes in patients with dilated cardiomyopathy.

第 3 回日本心不全学会 1999 年 10 月

2) 拡張型心筋症患者心筋における ubiquitin-proteasome 系の免疫組織化学的検索.

第 35 回日本臨床電子顕微鏡学会 2003 年 10 月

3) The ubiquitin-proteasome system is enhanced in degenerated cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy.

第 68 回日本循環器学会 2004 年 3 月

4) The ubiquitin-Proteasome system is enhanced in degenerating cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy

第 8 回日本心不全学会 2004 年 9 月

5) Ubiquitin-proteasome system is enhanced in protective response to oxidative stress in cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Harada M, Komuro I, et al.	G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating Jak/Stat in cardiomyocytes	Nat Med	11	305-311	2005
Naito AT, Komuro I, et al.	Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Plays a Critical Role in Early Cardiomyogenesis by Regulating Canonical Wnt Signaling.	Circ Res	97	144-151	2005
Hasegawa R, Komuro I, et al.	Effect of mental stress on coronary flow velocity reserve in healthy men.	Am J Cardiol	96	137-140	2005
Akazawa H, Komuro I, et al.	Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases.	Pharmacol Ther	107	252-268	2005
Saegusa N, Komuro I, et al.	Kir6.2-deficient mice are susceptible to stimulated ANP secretion: K(ATP) channel acts as a negative feedback mechanism?	Cardiovasc Res	67	60-68	2005
Yokoyama M, Komuro I, et al.	Plasma low-density lipoprotein reduction and structural effects on coronary atherosclerotic plaques by atorvastatin as clinically assessed with intravascular ultrasound radio-frequency signal analysis: a randomized prospective study.	Am Heart J	150	287 e1-e7	2005
Urano A, Komuro I, et al.	Infertility with defective spermiogenesis in mice lacking AF5q31, the target of chromosomal translocation in human infant leukemia.	Mol Cell Biol	25	6834-6845	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Daimon M, Komuro I, et al.	Physiologic assessment of coronary artery stenosis without stress tests: noninvasive analysis of phasic flow characteristics by transthoracic Doppler echocardiography.	J Am Soc Echocardiogr	18	949-955	2005
Nagai T, Komuro I, et al.	Promotion of cardiac regeneration by cardiac stem cells.	Circ Res	97	615-617	2005
Ueda M, Komuro I, et al.	Pulmonary vein morphology before and after segmental isolation in patients with atrial fibrillation.	Pacing Clin Electrophysiol	28	944-953	2005
Funabashi N, Komuro I, et al.	Large collateral conus branch to the left anterior descending branch of the coronary artery in a subject with angina pectoris demonstrated by multislice computed tomography.	Int J Cardiol	103	105-106	2005
Niitsuma Y, Komuro I, et al.	Atherosclerotic right internal thoracic arterial aneurysm demonstrated by multislice computed tomography.	Int J Cardiol	106	270-272	2006
Funabashi N, Komuro I, et al.	Patency of gastroepiploic arterial graft to left circumflex branch with distal portion of the anastomotic site demonstrated by multislice computed tomography.	Int J Cardiol	107	130-131	2006

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Ge X, Aburatani H, et al.	Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth-of-expression in normal tissues.	Genomics	86	127-141	2005
Kano M, Aburatani H, et al.	A meta-clustering analysis indicates distinct pattern alteration between two series of Gene Expression profiles for induced ischemic tolerance in rats.	Physiological Genomics	21	274-283	2005
Komura D, Aburatani H, et al.	Multidimensional support vector machines for visualization of gene expression data.	Bioinformatics	21	439-444	2005
Muraoka H, Negoro N, Terasaki F, et al.	Re-entry circuit in ventricular tachycardia due to focal fatty-fibrosis in patients with myotonic dystrophy.	Internal Med	44	129-135	2005

G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes

Mutsuo Harada^{1,4}, Yingjie Qin^{1,4}, Hiroyuki Takano^{1,4}, Tohru Minamino^{1,4}, Yunzeng Zou¹, Haruhiro Toko¹, Masashi Ohtsuka¹, Katsuhisa Matsuura¹, Masanori Sano¹, Jun-ichiro Nishi¹, Koji Iwanaga¹, Hiroshi Akazawa¹, Takeshige Kunieda¹, Weidong Zhu¹, Hiroshi Hasegawa¹, Keita Kunisada², Toshio Nagai¹, Haruaki Nakaya³, Keiko Yamauchi-Takahara² & Issei Komuro¹

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) was reported to induce myocardial regeneration by promoting mobilization of bone marrow stem cells to the injured heart after myocardial infarction, but the precise mechanisms of the beneficial effects of G-CSF are not fully understood. Here we show that G-CSF acts directly on cardiomyocytes and promotes their survival after myocardial infarction. G-CSF receptor was expressed on cardiomyocytes and G-CSF activated the Jak/Stat pathway in cardiomyocytes. The G-CSF treatment did not affect initial infarct size at 3 d but improved cardiac function as early as 1 week after myocardial infarction. Moreover, the beneficial effects of G-CSF on cardiac function were reduced by delayed start of the treatment. G-CSF induced antiapoptotic proteins and inhibited apoptotic death of cardiomyocytes in the infarcted hearts. G-CSF also reduced apoptosis of endothelial cells and increased vascularization in the infarcted hearts, further protecting against ischemic injury. All these effects of G-CSF on infarcted hearts were abolished by overexpression of a dominant-negative mutant Stat3 protein in cardiomyocytes. These results suggest that G-CSF promotes survival of cardiac myocytes and prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction through the functional communication between cardiomyocytes and noncardiomyocytes.

Myocardial infarction is the most common cause of cardiac morbidity and mortality in many countries, and left ventricular remodeling after myocardial infarction is important because it causes progression to heart failure. Several cytokines including G-CSF, erythropoietin and leukemia inhibitory factor have beneficial effects on cardiac remodeling after myocardial infarction^{1–5}. In particular, G-CSF markedly improves cardiac function and reduce mortality after myocardial infarction in mice, possibly by regeneration of myocardium and angiogenesis^{1,2,6–8}. G-CSF is known to have various functions such as induction of proliferation, survival and differentiation of hematopoietic cells, as well as mobilization of bone marrow cells^{9–11}. Although it was reported that bone marrow cells could differentiate into cardiomyocytes and vascular cells, thereby contributing to regeneration of myocardium and angiogenesis in ischemic hearts^{12–15}, accumulating evidence has questioned these previous reports^{16–18}. In this study, we examined the molecular mechanisms of how G-CSF prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction.

RESULTS

G-CSF directly acts on cultured cardiomyocytes

G-CSF receptor (G-CSFR, encoded by *CSF3R*) has been reported to be expressed only on blood cells such as myeloid leukemic cells,

leukemic cell lines, mature neutrophils, platelets, monocytes and some lymphoid cell lines⁹. To test whether G-CSFR is expressed on mouse cardiomyocytes, we performed a reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) experiment by using specific primers for mouse *Csf3r*. We detected expression of the *Csf3r* gene in the adult mouse heart and cultured neonatal cardiomyocytes (Fig. 1a). We next examined expression of G-CSFR protein in cultured cardiomyocytes of neonatal rats by immunocytochemistry. Similar to the previously reported expression pattern of G-CSFR in living cells¹⁹, the immunoreactivity for G-CSFR was localized to the cytoplasm and cell membrane under steady-state conditions in cardiomyocytes (Fig. 1b). This immunoreactivity disappeared when the antibody specific for G-CSFR was omitted, validating its specificity (Fig. 1b). In addition to cardiomyocytes, we also detected expression of G-CSFR on cardiac fibroblasts by immunocytochemistry (see **Supplementary Fig. 1** online) and RT-PCR (**Supplementary Fig. 2** online).

The binding of G-CSF to its receptor has been reported to evoke signal transduction by activating the receptor-associated Janus family tyrosine kinases (JAK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cells^{9,10}. In particular, STAT3

¹Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan. ²Department of Molecular Medicine, Osaka University Medical School, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. ³Department of Pharmacology, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan. ⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to I.K. (komuro-ky@umin.ac.jp).

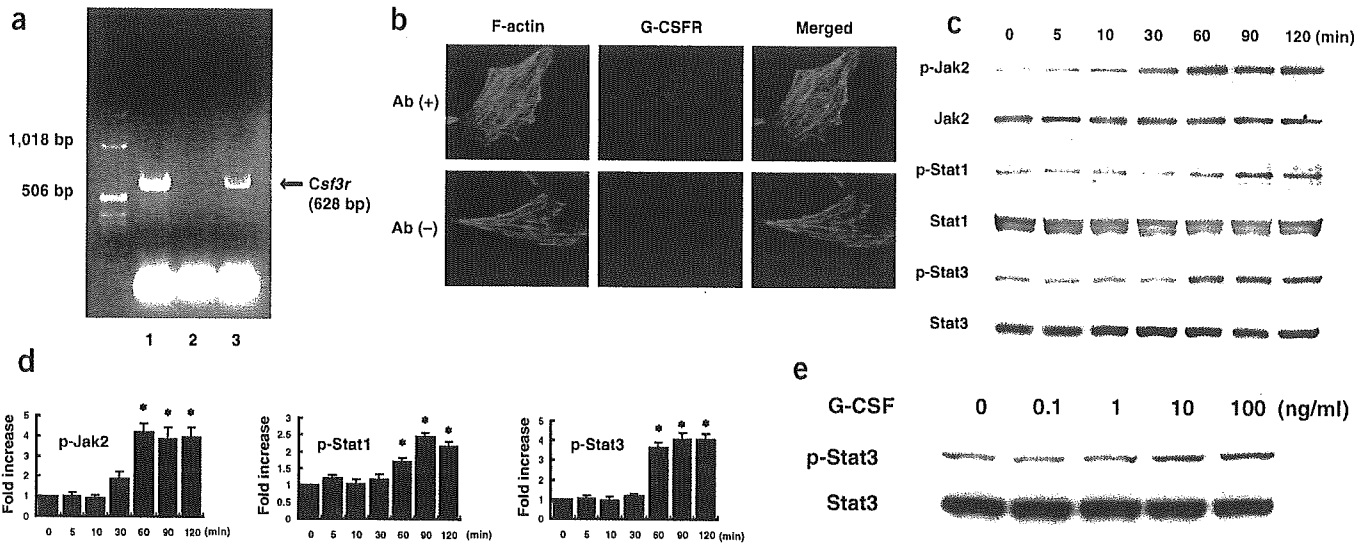


Figure 1 Expression of G-CSFR and the G-CSF-evoked signal transduction in cultured cardiomyocytes. (a) RT-PCR for mouse *Csf3r*. Expression of *Csf3r* was detected in the adult mouse heart (lane 1) and cultured cardiomyocytes of neonatal mice (lane 3). In lane 2, reverse transcription products were omitted to exclude the possibility of false-positive results from contamination. (b) Immunocytochemical staining for G-CSFR. Cardiomyocytes from neonatal rats were incubated with antibody to G-CSFR (red) and phalloidin (green) (upper panel). In the absence of antibody to G-CSFR, no signal was detected (lower panel). Original magnification, $\times 1,000$. (c) G-CSF induces phosphorylation of Jak2, Stat1 and Stat3 in a time-dependent manner in cultured cardiomyocytes. (d) Quantification of Jak2, Stat1 and Stat3 activation by G-CSF stimulation as compared with control (time = 0). $*P < 0.05$ versus control ($n = 3$). (e) G-CSF induces phosphorylation and activation of Stat3 in a dose-dependent manner in cultured cardiomyocytes.

has been reported to contribute to G-CSF-induced myeloid differentiation and survival^{20,21}. We therefore examined whether G-CSF activates the Jak-Stat signaling pathway in cultured cardiomyocytes. G-CSF (100 ng/ml) significantly induced phosphorylation and activation of Jak2 and Stat3, and to a lesser extent, Stat1 but not Jak1, Tyk2 or Stat5 in a dose-dependent manner (Fig. 1c–e and data not shown), suggesting that G-CSFR on cardiomyocytes is functional.

We next examined whether G-CSF confers direct protective effects on cardiomyocytes as it prevents hematopoietic cells from apoptotic death²¹. We exposed cardiomyocytes to 0.1 mM H_2O_2 in the absence or presence of G-CSF and examined cardiomyocyte apoptosis by staining with annexin V^{22,23}. Pretreatment with G-CSF significantly reduced the number of H_2O_2 -induced annexin V-positive cells compared with cells that were not given the G-CSF pretreatment

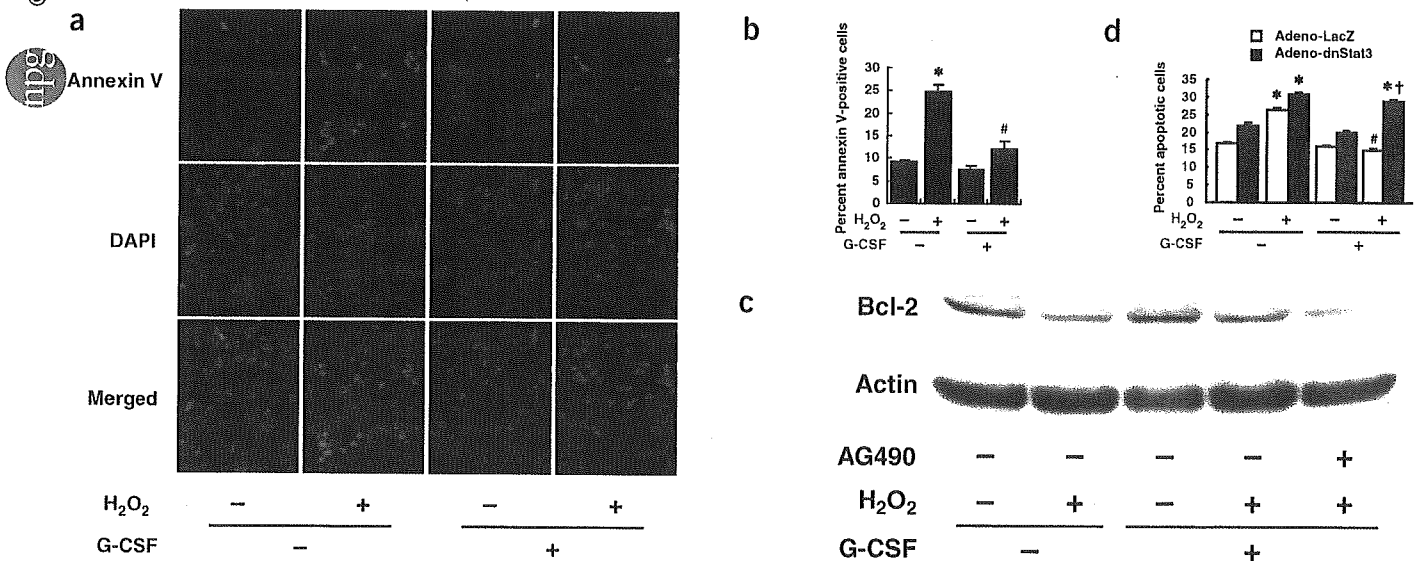


Figure 2 Suppression of H_2O_2 -induced cardiomyocyte apoptosis by G-CSF. (a) Detection of apoptosis by Cy3-labeled annexin V. Red fluorescence shows apoptotic cardiomyocytes stained with Cy3-labeled annexin V. Nuclei were counterstained with DAPI staining (blue). Original magnification, $\times 400$. (b) Quantitative analysis of apoptotic cells. The vertical axis indicates the ratio of the annexin V-positive cell number relative to that of DAPI-positive nuclei. $*P < 0.01$ versus nontreated cells, $\#P < 0.05$ versus H_2O_2 -treated cells without G-CSF ($n = 3$). (c) G-CSF prevents H_2O_2 -induced downregulation of Bcl-2 expression ($n = 3$). (d) Inhibition of antiapoptotic effects of G-CSF by Adeno-dnStat3. Bar graphs represent quantitative analysis of the apoptotic cell number relative to the total cell number. $*P < 0.001$ versus H_2O_2 (-)/G-CSF (-), $\#P < 0.001$ versus H_2O_2 (+)/G-CSF (-), $\dagger P < 0.001$ versus H_2O_2 (+)/G-CSF (+)/Adeno-LacZ ($n = 3$).

(Fig. 2a,b). To investigate the molecular mechanism of how G-CSF exerts an antiapoptotic effect on cultured cardiomyocytes, we examined expression of the Bcl-2 protein family, known target molecules of the Jak-Stat pathway²⁴, by western blot analysis. Expression levels of antiapoptotic proteins such as Bcl-2 and Bcl-xL were lower when cardiomyocytes were subjected to H₂O₂ (Fig. 2c and data not shown), and this reduction was considerably inhibited by G-CSF pretreatment (Fig. 2c). AG490, an inhibitor of Jak2, abolished G-CSF-induced Bcl-2 expression (Fig. 2c) but did not affect its basal levels (Supplementary Fig. 3 online), suggesting a crucial role of the Jak-Stat pathway in inducing survival of cardiomyocytes by G-CSF. To further elucidate the involvement of the Jak-Stat pathway in the protective effects of G-CSF on cardiomyocytes, we transduced cultured cardiomyocytes with adenovirus encoding dominant-negative Stat3 (Adeno-dnStat3). G-CSF treatment significantly reduced apoptosis induced by H₂O₂ in Adeno-LacZ-infected cardiomyocytes (Fig. 2d). This effect was abolished by introduction of Adeno-dnStat3 (Fig. 2d), suggesting that Stat3 mediates the protective effects of G-CSF on H₂O₂-induced cardiomyocyte apoptosis.

Effects of G-CSF on cardiac function after myocardial infarction

Consistent with the *in vitro* data, G-CSF enhanced activation of Stat3 in the infarcted heart (Fig. 3a). Notably, the levels of G-CSFR were markedly increased after myocardial infarction in cardiomyocytes (Supplementary Fig. 4 online), which may enhance the effects of G-CSF on the infarcted heart. To elucidate the role of G-CSF-induced Stat3 activation in cardiac remodeling, we produced myocardial

infarction in transgenic mice which express dominant-negative Stat3 in cardiomyocytes under the control of the α -myosin heavy chain promoter (dnStat3-Tg). Administration of G-CSF was started at the time of coronary artery ligation (day 0) until day 4 in transgenic mice; we termed this group Tg-G mice. A control group of dnStat3-Tg mice given myocardial infarction received saline (Tg-cont) instead of G-CSF. We also included two groups of wild-type mice given myocardial infarction treated with G-CSF (Wt-G) or saline (Wt-cont). At 2 weeks after myocardial infarction, we assessed the morphology by histological analysis and measured cardiac function by echocardiography and catheterization analysis. The infarct area was significantly smaller in the Wt-G group than the Wt-cont group (Fig. 3b). The Wt-G group also showed less left ventricular end-diastolic dimension (LVEDD) and better fractional shortening as assessed by echocardiography, and lower end-diastolic pressure (LVEDP) and better +dp/dt and -dp/dt as assessed by cardiac catheterization compared with Wt-cont (Fig. 3c). The beneficial effects of G-CSF on cardiac function were dose dependent and were significantly reduced by delayed start of the treatment (Fig. 3d,e and Supplementary Fig. 5 online). Moreover, its favorable effects on cardiac function became evident within 1 week after the treatment (Fig. 3f). Disruption of the Stat3 signaling pathway in cardiomyocytes abolished the protective effects of G-CSF. There was no significant difference in LVEDD, fractional shortening, LVEDP, +dp/dt and -dp/dt between Tg-G and Tg-cont (Fig. 3c). We obtained similar results from infarcted female hearts (Fig. 3g). These results suggest that G-CSF protects the heart after myocardial infarction at least in part by directly activating Stat3 in cardiomyocytes, which is a gender-independent effect. We have previously shown that treatment with G-CSF significantly ($P < 0.05$) decreased myocardial infarction-related mortality of wild-type mice². In contrast, there were no significant differences in mortality between G-CSF-treated and saline-treated dnStat3-Tg mice (data not shown).

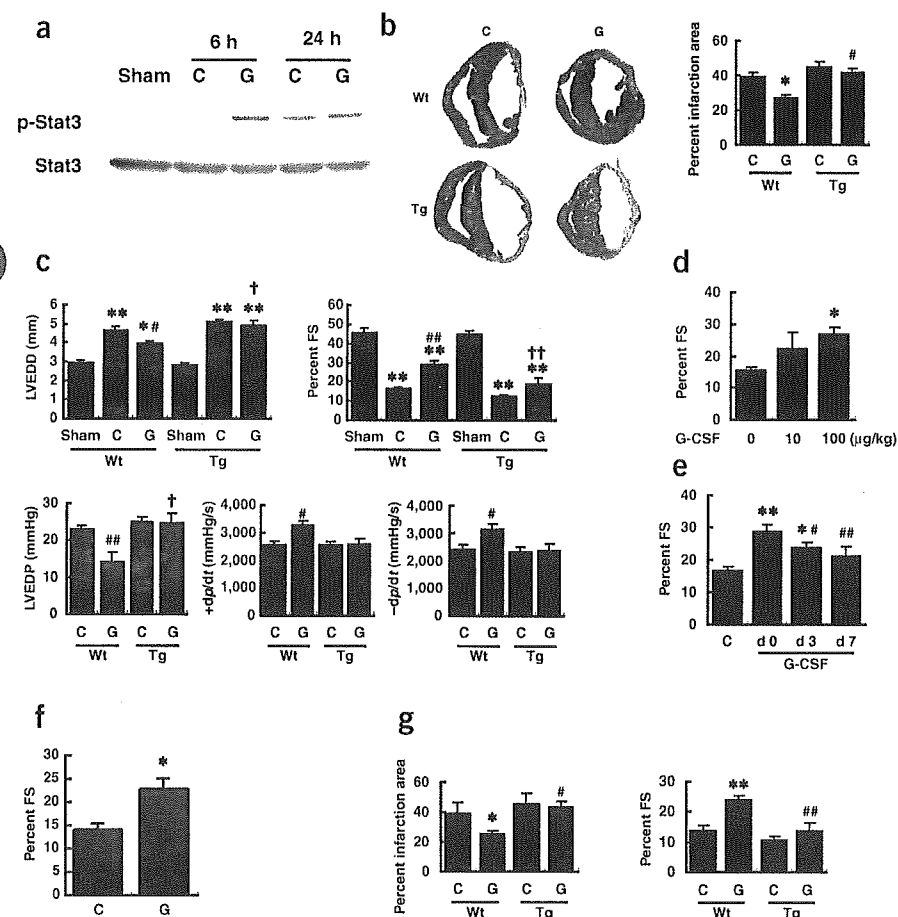


Figure 3 Effects of G-CSF on cardiac function after myocardial infarction. (a) Stat3 activation in the infarcted hearts. We operated on wild-type mice to induce myocardial infarction and treated them with G-CSF (G) or saline (C). (b) Masson trichrome staining of wild-type (Wt) and dnStat3-Tg (Tg) hearts. * $P < 0.001$ versus Wt-cont, # $P < 0.001$ versus Wt-G ($n = 11-15$). (c) G-CSF treatment preserves cardiac function after myocardial infarction. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ versus sham; # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$ versus Wt-cont; † $P < 0.01$, †† $P < 0.001$ versus Wt-G ($n = 10-15$ for echocardiography and $n = 5$ for catheterization analysis). (d) Dose-dependent effects of G-CSF. FS, fractional shortening. * $P < 0.01$ versus saline-treated mice (G-CSF = 0) ($n = 12-14$). (e) Wild-type mice were operated to induce myocardial infarction and G-CSF treatment (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) was started from the indicated day for 5 d. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ versus saline-treated mice (C); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus mice treated at day 0 (d 0) ($n = 11-12$). (f) Effects of G-CSF on cardiac function at 1 week. * $P < 0.05$ versus control ($n = 3$). (g) Effects of G-CSF on cardiac function of female mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ versus Wt-cont; # $P < 0.05$, ## $P < 0.005$ versus Wt-G ($n = 4-5$).

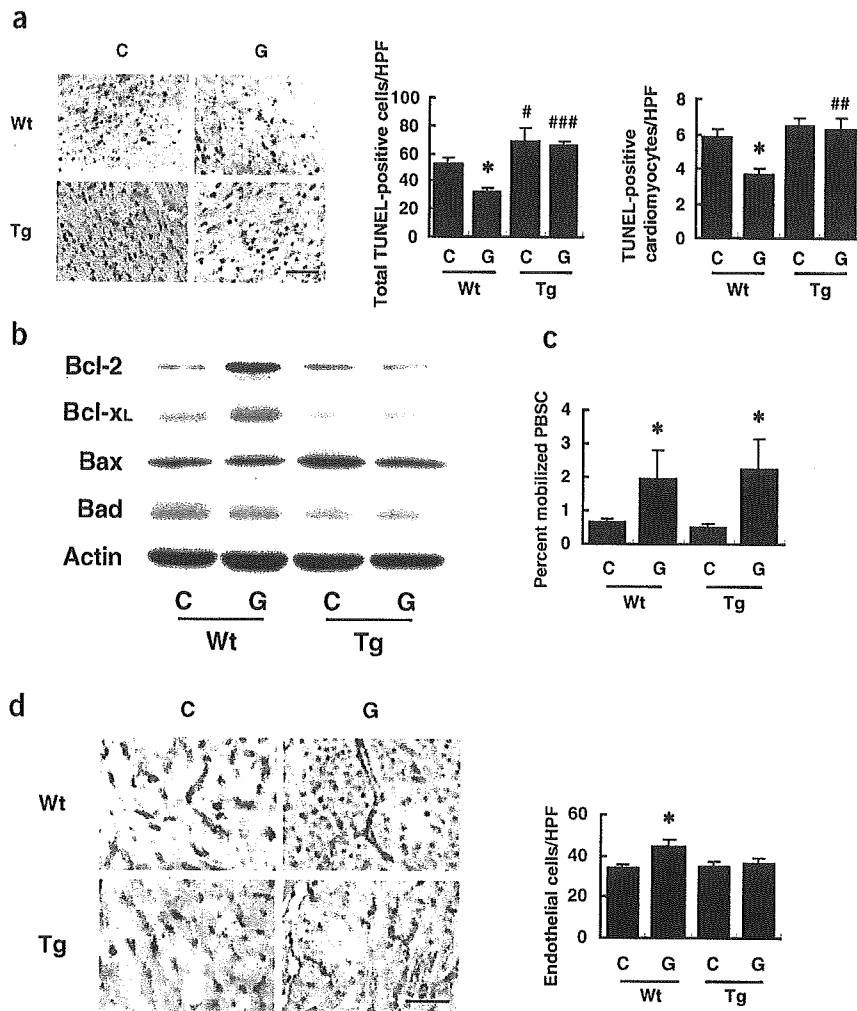


Figure 4 Mechanisms of the protective effects of G-CSF. (a) TUNEL staining (brown nuclei) in the infarcted hearts. The graphs show quantitative analyses for total TUNEL-positive cells (left graph) and TUNEL-positive cardiomyocytes (right graph) in infarcted hearts. * $P < 0.01$ versus Wt-cont; # $P < 0.05$, ## $P < 0.005$, ### $P < 0.001$ versus wild-type mice with the same treatment ($n = 5-7$). Scale bar, 100 μm . (b) Infarcted hearts treated with G-CSF (G) or saline (C) were analyzed for expression of Bcl-2, Bcl-xL, Bax and Bad by western blotting ($n = 3$). (c) Mobilization of hematopoietic stem cells into peripheral blood (PBSC). * $P < 0.05$ versus saline-treated mice ($n = 4$). (d) Capillary endothelial cells were identified by immunohistochemical staining with anti-PECAM antibody in the border zone of the infarcted hearts. Scale bar, 100 μm . The number of endothelial cells was counted and shown in the graph ($n = 6-8$). * $P < 0.05$.

cantly increased in the Wt-G group at 24 h after myocardial infarction compared with the Wt-cont group, whereas expression of the proapoptotic proteins Bax and Bad was not affected by the treatment (Fig. 4b). In contrast, expression levels of antiapoptotic proteins were not increased by G-CSF in the Tg-G group (Fig. 4b). Immunohistochemical analysis also showed increased expression of Bcl-2 in the infarcted heart of the Wt-G group but not of the Tg-G group (Supplementary Fig. 7 online).

To determine the effects of G-CSF on mobilization of stem cells, we counted the number of cells positive for both Sca-1 and c-kit in peripheral blood samples from mice treated with G-CSF or saline. The G-CSF treatment

Mechanisms of the protective effects of G-CSF

Our *in vitro* results suggest that the protective effects of G-CSF on cardiac remodeling after myocardial infarction can be attributed in part to reduction of cardiomyocyte apoptosis. To determine whether the Stat3 pathway in cardiomyocytes mediates the antiapoptotic effects of G-CSF on the ischemic myocardium, we carried out TUNEL labeling of left ventricular sections 24 h after myocardial infarction in wild-type mice and dnStat3-Tg mice. Although the number of TUNEL-positive cells was significantly less in the Wt-G group than the Wt-cont group, G-CSF treatment had no effect on cardiomyocyte apoptosis in dnStat3-Tg mice (Fig. 4a). The effects of G-CSF on apoptosis after myocardial infarction were also attenuated when mice were treated with AG490 (Supplementary Fig. 6 online). Myocardial infarction-related apoptosis was significantly increased in the Tg-cont group and AG490-treated wild-type mice compared with Wt-cont mice (Fig. 4a and Supplementary Fig. 6 online), suggesting that endogenous activation of Stat3 has a protective role in the infarcted heart, as reported previously²⁵. It is noteworthy that G-CSF treatment inhibited apoptosis of noncardiomyocytes including endothelial cells and that this inhibition was abolished in dnStat3-Tg mice (Fig. 4a and data not shown). To investigate the underlying molecular mechanism of the antiapoptotic effects of G-CSF *in vivo*, we examined expression of the Bcl-2 protein family by western blot analysis. Consistent with our *in vitro* results, expression of antiapoptotic proteins such as Bcl-2 and Bcl-xL was signifi-

cantly increased in the Wt-G group at 24 h after myocardial infarction compared with the Wt-cont group, whereas expression of the proapoptotic proteins Bax and Bad was not affected by the treatment (Fig. 4b). In contrast, expression levels of antiapoptotic proteins were not increased by G-CSF in the Tg-G group (Fig. 4b). Immunohistochemical analysis also showed increased expression of Bcl-2 in the infarcted heart of the Wt-G group but not of the Tg-G group (Supplementary Fig. 7 online). To determine the effects of G-CSF on mobilization of stem cells, we counted the number of cells positive for both Sca-1 and c-kit in peripheral blood samples from mice treated with G-CSF or saline. The G-CSF treatment similarly increased the number of double-positive cells in wild-type mice and dnStat3-Tg mice (Fig. 4c). To examine the impact of G-CSF on cardiac homing of bone marrow cells, we transplanted bone marrow cells derived from GFP transgenic mice into wild-type and dnStat3-Tg mice, produced myocardial infarction and treated with G-CSF or saline. FACS analysis showed that G-CSF did not increase cardiac homing of bone marrow cells in wild-type and dnStat3-Tg mice (Supplementary Fig. 8 online). We have shown that cardiac stem cells, which are able to differentiate into cardiomyocytes, exist in Sca-1-positive populations in the adult myocardium²⁶. But G-CSF treatment did not affect the number of Sca-1-positive cells in the infarcted hearts of wild-type or dnStat3-Tg mice (Supplementary Fig. 9 online). Thus, it is unlikely that G-CSF exerts its beneficial effects through expansion of cardiac stem cells. To determine the effects of G-CSF on proliferation of cardiomyocytes, we carried out immunostaining for Ki67, a marker for cell cycling, in conjunction with a labeling for troponin T. The number of Ki67-positive cardiomyocytes was increased in the infarcted hearts of wild-type mice and dnStat3-Tg mice compared with sham-operated mice (Supplementary Fig. 10 online). But G-CSF did not alter the number of Ki67-positive cardiomyocytes in wild-type or dnStat3-Tg mice, suggesting that G-CSF does not induce proliferation of cardiomyocytes (Supplementary Fig. 10 online). The number of Ki67-positive cardiomyocytes was less in infarcted hearts of dnStat3-Tg mice than in those of wild-type mice, suggesting that endogenous Stat3 activity is required