慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	慢性期脳梗塞の病態におけるStat3リン酸化の意義
Sub Title	Stat3 phosphorylation in pathogenesis of chronic cerebral ischemia
Author	鈴木, 重明(Suzuki, Shigeaki) 冨田, 裕(Tomita, Yutaka)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	脳梗塞患者の血清中に増加するサイトカインの細胞内情報伝達の系の1つであるJAK-STAT系には多くの分子が関与している。その中でStat3が最も注目されており、脳梗塞治療の標的になる可能性が考えられた。我々は急性期脳虚血モデルでStat3のリン酸化が神経保護に関与していることを証明し、他の研究グループでも神経保護作用を証明してきた。本研究では薬剤を用いて慢性期脳虚血におけるStat3の役割について検討を進めたものの、有意な効果を証明することはできず、現時点では脳梗塞の治療戦略の候補とはならないものと考えられた。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2008～2010 課題番号：20591029 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20591029seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20591029
研究課題名（和文）
慢性期脳梗塞の病態におけるＳｔａｔ３リン酸化の意義
研究課題名（英文）
Stat3 phosphorylation in pathogenesis of chronic cerebral ischemia
研究代表者
鈴木　重明　(SUZUKI SHIGEAKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：50276242

研究成果の概要（和文）：
脳梗塞患者の血清中に増加するサイトカインの細胞内情報伝達の系の 1 つである JAK-STAT 系には多くの分子が関与している。その中で Stat3 が最も注目されており、脳梗塞治療の標的になる可能性が考えられた。我々は急性期脳虚血モデルで Stat3 のリン酸化が神経保護に関与していることを証明し、他の研究グループでも神経保護作用を証明してきた。本研究では薬剤を用いて慢性期脳虚血における Stat3 の役割について検討を進めたものの、有意な効果を証明することはできず、現時点では脳梗塞の治療戦略の候補とはならないものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：An increase in serum cytokine level has been reported in acute ischemic stroke patients by many investigators. Among the various molecules involved in the JAK-STAT pathway activated by cytokine, Stat3 is the most important and has attracted much attention. We have already proven that Stat3 phosphorylation is associated with neuroprotection against acute cerebral ischemia. The neuroprotective effects of Stat3 phosphorylation are also supported by other reports. We observed the rapid enhancement of Stat3 phosphorylation was detected after the injection of high-dose recombinant LIF into the cerebral cortex on the ischemic side in rat focal ischemia. We examined the possible treatment strategy using Stat3 phosphorylation over a longer period, such as the first 2-3 months after cerebral ischemia using selective pharmacological agents of this signaling. However, we failed to prove definitive effects of Stat3 phosphorylation in chronic cerebral ischemia. This reason may be explained that Stat3 protein can be activated by a variety of signals, including other growth factors, cytokines, and oxidative stress

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
総　計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科
キーワード：臨床神経形態学

１．研究開始当初の背景

脳梗塞治療において経静脈的血栓溶解療法が保険適応となり、脳梗塞の早期治療の必要性が一般社会において啓蒙されている。しかし、都内中心部において救急医療を行っている慶應義塾大学病院において本治療を施行し得た頻度は脳梗塞で入院した患者の5%以下に過ぎず、また重篤な出血性の副作用もあり、充分な結果を得ていないのが現状である。また急性期病院からリハビリテーション病院への転院は発症から2ヶ月が目安となっており、この期間内にいかに機能回復につながる治療を行うべきかがより現実的な問題と言える。

近年、変性疾患を中心として神経細胞の再生治療の研究が進んでいる。脳梗塞においても虚血により障害された神経細胞を再生し、機能回復につながる治療の対象となり多くの施設で研究が進められている。しかし、これまで決定的な治療につながる知見は得られていない。その原因は、神経細胞以外のグリア系細胞と血管内皮細胞の関与が充分検討されていないこと、脳循環と脳代謝の病態の解析が行われていない点が挙げられる。

これまで行われてきた研究は脳梗塞の発症1週間以内である急性期の病態を解析したものであり、その中心は神経細胞を対象としてきた。臨床的な問題を解決し、また現在行われている基礎研究の弱点を克服するための研究が必須である。そこで、脳梗塞の発症1週間から2ヶ月（慢性期）における脳虚血に対する、Stat3による神経保護作用をグリア系・血管内皮細胞の動態に加え、脳代謝・脳代謝の面から解析するのが本研究課題である。

２．研究の目的

慢性期脳虚血における炎症反応が神経保護的に働くか否かを、神経症状ならびに組織学的により評価する。そのメカニズムとしてサイトカインの細胞内伝達、グリア系・血管内皮細胞の動態と脳循環・糖代謝の変化につき多角的に検証していく。

慢性期脳梗塞の実地臨床においては再発予防に主眼がおかれ、傷害された神経傷害についてはリハビリテーションだけである。神経修復への病態解析は、将来的には脳梗塞患者のQOLを改善する創薬への応用になるものと大いに期待できる。

３．研究の方法

体重250gの雄性SDラット (n = 48) を実験に使用した。既報告(Suzuki et al. J Cereb Blood Flow Metab 19: 1256-1626, 1999) の方法に従い、ラット中大脳閉塞モデルを作成し90分閉塞後、再灌流を行なった。皮下埋め込み式ポンプ(Alzet osmotic pomps) により、1週間かけて脳室内に持続的にLIFを投与 (recombinant mouse LIF 2μg/ 200μL, Chemicon Int) を行い、経時的に神経症状のスコアや血圧、体重のモニターを行った。コントロールとして生理食塩水を投与する群を置き比較検討した。

組織学的評価としては1, 2, 4, 8週間後に断頭し（各6匹）、灌流固定後クライオスタットで連続凍結切片 (16 μm)を作成した。虚血性障害の評価はcresyl-violet染色による梗塞面積の計測を行い、またLIF投与により活性化する、細胞内信号伝達の中心であるStat3のリン酸化については、免疫染色ならびにwestern blot法で評価を行った (Suzuki et al.

Exp Neurol 170: 63-71, 2001)。またグリア系細胞のマーカーとしては、アストロサイトについては抗 GFAP 抗体、ミクログリアについてはレクチン染色、抗 IbaI 抗体、オリゴデンドロサイトについては、抗 APC 抗体、抗 A2B5 抗体、抗 NG2 chondrotitin sulfate proteoglycan 抗体などによる免疫染色を行った。また血管構造ならびに血管内皮の評価としては、抗 vWF 抗体、抗 CD31 抗体による免疫染色を施行する。Stat3 のリン酸化とこれらのマーカーによる蛍光顕微鏡を用いた二重染色を施行した。

次に、Stat3 の阻害薬である AG-490 を用いて、雄性 SD ラット (n = 48) を実験に使用した。同様に、皮下埋め込み式ポンプ(Alzet osmotic pomps) により、1 週間かけて脳室内に持続的に AG-490 (Biomol Research Laboratories) 投与を行い、経時的に神経症状のスコアや血圧、体重のモニターを行う。コントロールとして生理食塩水を投与する群を用いた。ラットの神経症状を画像で記録し corner test, modified neurological severity score など神経症状の評価をより詳細に行った。グリア系細胞の変化を観察するとともに、炎症性サイトカインの発現についても免疫染色を用いて評価した。

またメタボリックシンドロームのモデル動物である OLET-F ラットでも脳梗塞モデルの作成に成功しており、上記と同様な方法で実験を行った。

４．研究成果

（１） 研究期間内における当該分野における研究の進達状況の総括：IL-6 が炎症性サイトカインとして脳虚血増悪として働くよりむしろ神経保護的な作用を有している可能性が示唆されている。実際、脳虚血以外の中枢神経系の障害においても、IL-6 が神経保護的な作用を有していることが報告されている。IL-6 が神経保護的に作用する根拠としては IL-6 と共通の受容体から JAK-STAT 系などの細胞内信号伝達を共有するいわゆる IL-6 type cytokine family の存在が挙げられる。この family に含まれる leukemia inhibitory factor (LIF) や ciliary neurotrophic factor (CNTF) は、中枢神経系では神経栄養因子として働くサイトカインである。これらのサイトカインは脳虚血後に IL-6 より遅れて発現し、その起源の中心は神経細胞である。脳虚血の増悪に働く炎症反応との関連はなく、実験的脳虚血でも神経保護的に働くことが証明されており、IL-6 と共に神経修復に関与しているものと考えられる。さらに IL-6 の細胞内信号伝達は JAK-STAT 系、特に Stat3 のリン酸化が中心と考えられている。我々は脳虚血後の Stat3 のリン酸を観察し、細胞内信号伝達として重要性を報告した。さらにラット中大脳閉塞モデルにおいてリコンビナント LIF の脳実質内の投与により Stat3 のリン酸化を介して、虚血巣の縮小、アポトーシスの抑制、神経症状の改善などが急性期の病態で存在することが確認された。Stat3 のリン酸化については多様な実験系や薬剤を用いた系から神経保護や再生に関与している実験結果が蓄積されている。

（２） 慢性期脳虚血モデルにおける投与実験の結果：Stat3 をリン酸化するサイトカインとして LIF の脳室内投与を試みた。LIF 投与群とコントロールとして生理食塩水を投与する群と比較したところ神経学的所見や脳虚血における組織学的傷害の程度に有意差はなかった。急性期の動物モデルで LIF 投与により Stat3 のリン酸化の活性化を観察したが、慢性期では薬剤の効果が充分に得ることができなかった。薬剤投与法の変更を中心としたプロトコール自体の見直す必要性があった。

次に、Stat3 の阻害薬である AG-490 によるラット中大脳閉塞モデルを用いた神経保護効果の検討では、実験手技を改良した追加実験でも有意な差を証明することはできなかった。

以上、慢性期脳梗塞の病態における Stat3 リン酸化の意義について総括すると、すべてが神経保護作用を有しているとは考えにくい。予想に反する結果となった理由として、①神経保護因子の細胞情報伝達が Stat3 以外にも ERK, Akt 系など多岐にわたっているため、②Stat3 の上流には神経保護因子以外にも、脳梗塞の炎症増悪の寄与するサイトカインも存在し、必ずしも一元的な効果のみではないものと考えられる。本研究成果より得られた知見からは、Stat3 細胞伝達を慢性期脳梗塞の治療に応用することは困難と考えられる。

メタボリックシンドロームのモデル動物である OLET-F ラットを用いた検討では、コントロール動物と比較しラット中大脳閉塞モデルの 24 時間後の神経障害や脳梗塞領域は明らかに増悪した。今後、IL-6 などの炎症性サイトカインやその細胞内情報伝達の中心となる Stat3 に対して検討をすすめることにしている。

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 2 件）

1.鈴木重明：脳組織障虚血性傷害のメカニズム、炎症反応。Brain Medical 22: 43-48, 2010　（査読なし）

2. Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory vs. neurotrophic aspects. J Cereb Blood Flow Metab 29: 464-479, 2009（査読あり）

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 関守信、鈴木重明、高橋愼一、伊澤良兼、河野一弥、鈴木則宏：OLETF ラットを用いたメタボリックシンドロームの脳梗塞予後の及ぼす影響の検討。第 21 回日本脳循環代謝学会総会、2009.11.19（大阪）

６．研究組織

(1)研究代表者
鈴木　重明（SUZUKI SHIGEAKI）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：50276242

(2)研究分担者
冨田　裕（TOMITA YUTAKA）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60276251