

平成21年 6月 2日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390375

研究課題名（和文） 虚血耐性の内在性神経細胞保護作用における細胞内情報伝達系の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of ischemic tolerance and application

研究代表者

木内 博之 (KINOCHI HIROYUKI)

山梨大学 大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30241623

研究成果の概要：

脳虚血耐性現象は、短時間の非致命的虚血負荷により、引き続く致命的脳虚血に対して強力な脳保護効果が誘導される内因性神経保護機構であり、脳梗塞治療の観点から注目されている。我々は心筋虚血や癌細胞の細胞死の制御に重要な役割を果たしている細胞内伝達機構の一つの JAK-STAT 経路に注目し、ラットの一過性前脳虚血モデルを使用して脳虚血耐性現象への関与を検討した。研究の結果、脳虚血に対して脆弱な海馬の CA1 という特定の領域の神経細胞において、脳虚血後リン酸化 STAT3 の一過性発現の増幅がみられ、これが虚血耐性の脳保護機序に強く関与している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2008 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管障害

## 1. 研究開始当初の背景

生体は、非致命的な侵襲に暴露されると、引き続く致命的侵襲に対して、一過性に抵抗性を獲得する。脳虚血においても短時間の虚血負荷をはじめとする種々の刺激により、この虚血耐性現象が誘導されることが明らかとなっており、強力な内因性神経保護機構とし

て、脳梗塞治療の観点から注目されている。しかし、この脳虚血における細胞内情報伝達機構については、未だ断片的な報告がなされているのみで、多くが未知のままである。脳虚血研究の長年のゴールである、「虚血耐性現象の内在性保護機構の脳梗塞治療への応用」の達成のためには、この虚血性神経細胞死の

分子機構を正確に理解する必要があり、癌研究を通じて急速に解明が進んでいる、細胞死と細胞増殖を制御するシグナル伝達機構の脳虚血および虚血耐性現象における役割を明らかにすることが重要である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、脳虚血による神経細胞死を制御する細胞内情報伝達機構の解明を通じて遅発性神経細胞死の分子生物学的保護機構を解明し、臨床応用につなげることを目的とする。

(2) The Janus-kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling pathway は、炎症や apoptosis などに関わるシグナル経路である。心筋虚血時の細胞死の制御や癌細胞の制御に関与し心筋虚血や癌治療に向けた研究が進められているが、脳虚血におけるその役割は十分に解明されていない。今回我々は、脳虚血及び虚血耐性現象における JAK-STAT pathway の関与について明らかにすることを目的として、研究を計画した。

## 3. 研究の方法

(1) 両側頸動脈の遮断と低血圧を併用したラット一過性前脳虚血モデル (Smith モデル) を使用した。このモデルでは、3 分間の非致死虚血負荷単独では遅発性神経細胞死は生じないが、5 分間の致死的前脳虚血後、3 日目以降にほとんどの海馬 CA1 錐体細胞に遅発性細胞死が生じる。しかし、preconditioning として 3 分間の非致死虚血負荷後、48 時間後に 5 分間の致死虚血を負荷すると虚血に対する耐性が獲得され、約 85% の CA1 神経細胞が保護される。これを虚血耐性モデルとして使用した。

(2) Western blot : 3 分虚血群、5 分虚血群、3 分虚血後 5 分虚血の虚血耐性群の各群で、

虚血再灌流後 1, 4, 8 時間、1, 2, 3, 7 日の各タイムポイントにおいて断頭後、海馬 CA1 のサンプリングを行い、蛋白を抽出後、STAT3 およびリン酸化 STAT3 抗体を用いて Western blot を行い、検出されたバンドを NIH image を用いて半定量的に解析し、一過性前脳虚血後の海馬 CA1 における STAT3 の発現と動態を調べた。

(3) 免疫染色 : 3 分虚血群、5 分虚血群、虚血耐性群の各群で、パラフォルムアルデヒドで灌流固定後、脳を摘出し、ビブラトームで 50  $\mu\text{m}$  厚の脳冠状切片を作成し、リン酸化 STAT3 抗体を用いて、リン酸化 STAT3 の局在と発現の経時的変化について検討した。また NeuN, GFAP, Bcl-2 との蛍光二重染色を行い、リン酸化 STAT の局在を検討した。

(4) STAT3 阻害薬投与 ; 虚血耐性現象におけるリン酸化 STAT3 の役割を解析するため、3 分の非致死虚血前に STAT3 阻害薬を投与し、preconditioning ischemia によって誘導される脳保護効果に与える影響を検討した。細胞障害の評価は、灌流固定後、パラフィン包埋した切片をマイクロトームで 6  $\mu\text{m}$  に薄切し、クレシルバイオレット染色を行い、CA1 神経細胞をカウントし定量的評価を行った。また、TUNEL 染色によりアポトーシスの組織学的検出を行い、陽性細胞をカウントし定量的評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) 一過性前脳虚血後の海馬 CA1 におけるリン酸化 STAT3 の一過性上昇 :

① 5 分間の致死的一過性前脳虚血後、再灌流後 1 時間の早期にリン酸化 STAT3 (ser727) の一過性上昇がみられ、ほとんどの CA1 神経細胞が遅発性神経細胞死を生じる 7 日目に減

少がみられた (図 1)。

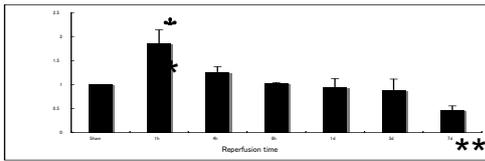


図 1: 5分虚血後の pSTAT3 の動態

②3分虚血後2日後に5分間の虚血を負荷した虚血耐性群では、同様に1-4時間の早期にリン酸化 STAT3 (ser727) の上昇が見られたが、7日目の減少は見られなかった (図 2)。

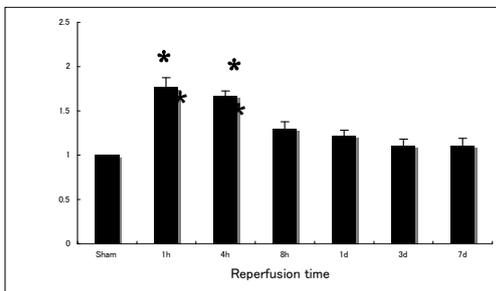


図 2: 虚血耐性群における pSTAT3 の動態

③3分間の非致死性虚血群では、再灌流後8時間以降にリン酸化 STAT3 (ser727) の上昇がみられ、再灌流から2日目でピークがみられた (図 3)。

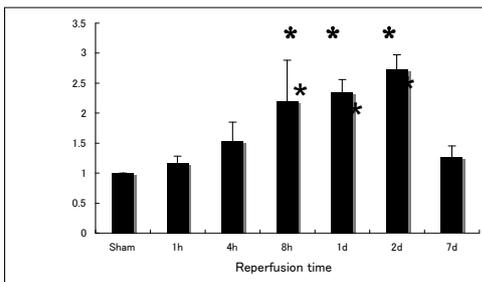


図 3: 3分虚血後の pSTAT3 の動態

## (2) 一過性前脳虚血後の海馬 CA1 における pSTAT3 (ser727) の局在

①ABC法でDABによる発色を行った免疫染色では、虚血再灌流後CA1錐体細胞層にリン酸化 STAT3 (ser727) の発現が見られた。この免疫染色性は経時的に変化がみられ、Western

blotの結果と一致していた。3分間の非致死性虚血後では、再灌流後2日目に免疫染色性のピークを認めた (図 4)。

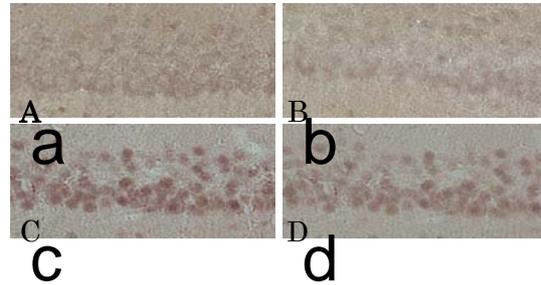


図 4 虚血再灌流後の海馬 CA1 における pSTAT3 (ser727) の免疫染色性 (A: sham, B: 1h after reperfusion, C: 2d after reperfusion, D: 7d after reperfusion)

②一過性前脳虚血後の海馬 CA1 における pSTAT3 の局在を調べるために行った蛍光二重染色では、非致死性虚血後、再灌流後2日目には pSTAT3 は主として神経細胞の核に局在がみられた (図 5: a, b, c)。少量の星状細胞にも発現がみられた (図 5: d, e, f)。また、抗アポトーシスの経路で生じる Bcl-2 との共存も確認された (図 5: g, h, i)。

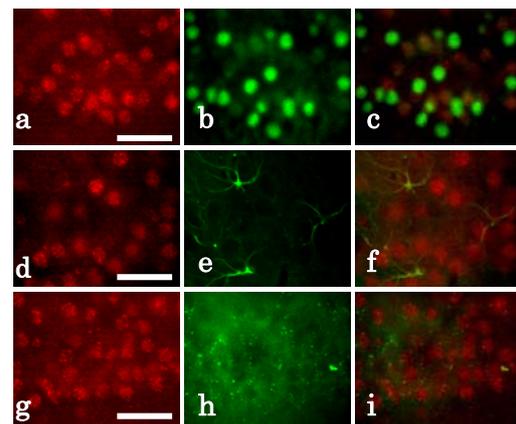


図 5; 非致死性虚血後海馬 CA1 における pSTAT3 の局在; ser727-pSTAT3 (赤, a, d, g) NeuN (緑 b) GFAP (緑 e) Bcl-2 (緑, h)

## (3) STAT3 阻害薬による虚血耐性現象の脳保護効果への影響

非致死性な3分虚血の直前に STAT3 阻害薬

を脳室内に投与にすると、虚血再灌流後の pSTAT3 の発現増幅が抑制された。さらに、阻害薬投与後、組織障害の評価と TUNEL 染色を行うと、強力な神経細胞保護が得られる 3 分虚血後 5 分虚血の虚血耐性群と比較して有意な遅発性神経細胞死及び TUNEL 陽性細胞の増加を認め、虚血耐性による脳保護効果の減弱を認めた (図 6)。これらの結果からは、非致死的虚血後に海馬 CA1 神経細胞でみられる pSTAT3 (ser727) の発現増幅は、虚血耐性現象の脳保護効果獲得に重要な役割を果たしていることが示唆された。

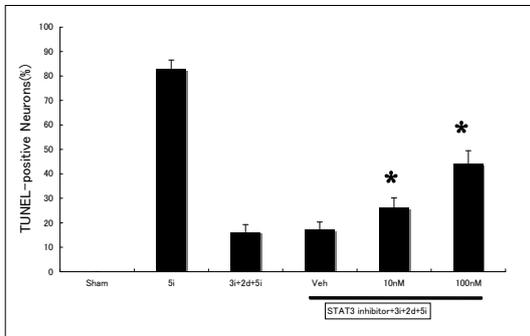


図 6: STAT3 inhibitor が虚血耐性の脳保護効果に与える影響

### 考察

本研究の主たる成果は、一過性前脳虚血後海馬 CA1 神経細胞において STAT3 (ser727) の一過性の発現増幅が見られること、5 分間の致死的虚血と 3 分間の非致死的虚血ではリン酸化 STAT3 の発現増幅の動態が異なり、3 分虚血後のリン酸化 STAT3 の上昇が虚血耐性の脳保護効果獲得に強く関与していることが示唆された点である。

JAK-STAT pathway は心疾患における炎症や虚血などの多くの病態に深く関与し、なかでも STAT3 は心筋の虚血耐性現象における細胞保護機序に関与していることが明らかにされている。心筋において、preconditioning ischemia 後の細胞保護に関与する遺伝子の発現には tyr705-pSTAT3 と ser727-pSTAT の

両者の活性化が必要とされる。心筋虚血における JAK-STAT pathway の関与の理解に比べ、脳虚血及び虚血耐性現象における理解はこれまで僅かである。これまでの研究において、局所脳虚血後、大脳皮質の神経細胞でリン酸化 STAT3 (tyr705) の一過性発現増幅がみられ、神経細胞保護に関与している可能性が示唆されているが、脳虚血後のリン酸化 STAT3 (ser727) の関与については未知のままであった。本研究では、一過性前脳虚血後、ラットの海馬 CA1 錐体細胞において、リン酸化 STAT3 (ser727) が一過性に上昇し、虚血耐性現象の脳保護効果に関与している可能性を初めて示し、脳虚血においても tyr705 および ser727-STAT3 の両者が関与していることが示唆された点で重要な意義をもつ。

脳虚血後のリン酸化 STAT3 の発現の局在は、これまでに神経細胞、グリア細胞、内皮細胞が報告されている。局所脳虚血後の神経細胞における pSTAT3 の発現に比べて、グリア細胞における発現はこれまで controversial であった。さらに、一過性前脳虚血後の海馬 CA1 における pSTAT3 の局在はほとんど知られていない。本研究では、一過性前脳虚血後、海馬 CA1 においても主として神経細胞に発現がみられ、虚血に対する神経細胞の内因性神経保護機序に関与していることが示唆された。一方で、一部の astrocyte にも pSTAT3 の発現が確認されたが、この意義については今回の研究のみでは十分説明できない。これまでに脳虚血後に astrocyte がエリスロポイエチンを産生し神経細胞保護に関与している可能性が示唆されているように、グリア細胞の虚血耐性現象への関与の更なる検討も今後の課題と考えられた。

虚血耐性現象における強い脳保護効果は、致死的虚血前と、後にそれぞれ preconditioning ischemia によって誘導され

る固有の保護機序が存在し、相互作用的に関与していることが考えられている。これまでは、非致命的虚血後に細胞生存シグナルの一つである extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) の活性化が虚血耐性の脳保護効果の誘導に関与すると報告され、さらに非致命的虚血後に Akt の活性化や、抗アポトーシス経路の一つ Bcl-2 の発現増幅が見られることが報告されている。我々の結果においても致命的虚血後には STAT3 の活性化が再灌流後短時間で増幅したのに対し、非致命的虚血後 8 時間以降に増幅がみられ、二日目までピークを認めたが、これは以前の研究で明らかにされている虚血耐性が獲得される時間経過とほぼ一致していた。これらの結果を併せて考えると、preconditioning ischemia 後の複数の機序の survival pathway の活性化が引き続く致命的虚血に対する耐性の獲得に関与していることが推測された。

脳虚血後における Ser727-pSTAT3 の機能に関してさらなる研究が必要であるが、本研究の結果は JAK-STAT pathway が今後の脳梗塞治療の重要なターゲットとなりうることを示された点で、重要な意義をもつと考えられた。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木内 博之 (KINOUCHI HIROYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号: 30241623

(2) 研究分担者

杉田 正夫 (SUGITA MASAO)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70235886

(3) 連携研究者

なし