

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791397

研究課題名(和文) 下肢虚血組織下の血管新生における、骨格筋細胞の役割

研究課題名(英文) Impaired Angiogenesis During Hindlimb Ischemia in Skeletal Muscle-Specific STAT3 Deficient Mice

研究代表者

大島 英樹 (ohshima, hideki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：90569419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：STAT3が血管新生において重要であることが示されているが、虚血下血管新生における骨格筋のSTAT3の役割は不明である。マウス下肢虚血モデルにおいて、急性期に骨格筋STAT3が活性化し、STAT3を活性化するインターロイキン6やG-CSFなどの発現が高いことを見いだした。骨格筋特異的STAT3欠損マウスでは、下肢虚血後の血流の回復、血管新生やインターロイキン1などの炎症性サイトカインおよびCXCL1などのケモカインの発現が障害されていた。これらの結果は、骨格筋のSTAT3が下肢虚血後の炎症反応を制御し、結果として血管新生に重要であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Although the STAT3 activating cytokines play an important role in angiogenesis, little is known about the STAT3 role in skeletal muscle during ischemia-induced angiogenesis. STAT3 was promptly phosphorylated within skeletal muscle, and STAT3-activating cytokine including interleukin-6 and G-CSF were increased during hindlimb ischemia (HLI). Blood-flow recovery after HLI was impaired in skeletal muscle-specific, STAT3 knockout mice (sm-STAT3-KO). The number of CD31 positive cells after HLI was significantly less in sm-STAT3-KO than that in wild-type mice. Real-time PCR array analysis for angiogenesis revealed that the expression levels of angiogenic chemokines and inflammatory cytokines were significantly much lower in sm-STAT3-KO than those in wild-type mice after HLI. These results suggested that angiogenesis during ischemia was impaired in sm-STAT3-KO, possibly through the inhibition of angiogenic chemokines and inflammatory cytokines expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：下肢虚血 血管新生 サイトカイン Jak-STAT

1. 研究開始当初の背景

生活様式や高齢化に伴い、末梢動脈疾患は急速に増加し、症状が重篤化した重症虚血肢 (Critical limb ischemia: CLI) 症例で四肢を切断している患者は、わが国でも年間数千人~1万人程度存在すると考えられ、重症下肢虚血の治療法の開発が急務である。CLI に対し単核球細胞移植による血管新生療法が臨床応用されているが、治療抵抗性の難治症例が多く存在する。最近、移植された単核球細胞が骨格筋細胞を著明に増加させ、骨格筋細胞から分泌される IL-1 β , VEGF, IL-6 などのサイトカインが血管新生に重要であることがマウスを用いた研究で示されている。すなわち、虚血組織における血管新生において、骨格筋細胞の再生やサイトカインに対する感受性が重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、虚血組織下の血管新生において、骨格筋細胞の再生がどのように調節されているのか、また、骨格筋細胞内のサイトカインシグナル伝達についても不明な点が多い。IL-6, G-CSF, LIF などのサイトカインは STAT3 経路を活性化し、suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) によって負に制御される。これらのサイトカインは血管新生を促進し、下肢虚血を改善することが *in vivo* で報告されている。また、これらのサイトカインは *in vitro* で骨格筋細胞の再生と増殖を促進することが示されている。従って、IL-6, G-CSF, LIF は骨格筋細胞に働きかけ、骨格筋細胞の再生と増殖を促進し、血管新生因子産生を促進させることによって下肢虚血を改善している可能性はあるが、下肢虚血後の血管新生における骨格筋の STAT3 の役割は不明であり、その機序を解明することが血管新生治療の新たなアプローチにつながり、重要であると考えられる。

2. 研究の目的

骨格筋細胞の再生やサイトカインシグナル伝達に重要な分子を骨格筋特異的に欠損させたマウスを作成し、下肢虚血組織下の血管新生

における、骨格筋細胞の STAT3 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス下肢虚血モデルを作成し経時的に評価を行い、生理学的、組織学的、分子生物学的データの収集を行う。

レーザードップラーによる下肢血流の評価。

モデル作成後、6時間後、1日、3日、7日、14日目に大腿の骨格筋を回収し、HE染色を行い、骨格筋障害、骨格筋再生、炎症細胞浸潤などについて評価。

モデル作成後、骨格筋を回収し、P-STAT3, P-AKT, P-ERK1/2, PAMPK, SOCS3 をウエスタンブロットで評価。また、P-STAT3 の免疫染色を行い、局在性を評価。

凍結切片にて CD31 で免疫染色を行

い、毛細血管の数を測定。

血管新生関連遺伝子、サイトカイン関連遺伝子を網羅的にリアルタイムPCRアレイによる発現遺伝子の解析。

骨格筋特異的 STAT3 欠損マウスにおいても下肢虚血モデルを作成し、前述の項目についてコントロールマウスと比較評価を行う。

4. 研究成果

マウス下肢虚血モデルにおいて、急性期に骨格筋 STAT3 が活性化し、骨格筋再生、血管新生の過程において、STAT3 を活性化するサイトカインである IL-6, IL-11, LIF, G-CSF などの発現が高いことを確認した。また、IL-1 β , TNF 等の炎症性サイトカイン、Ccl2, Cxcl1, Cxcl2 等のケモカイン及び血管新生因子の活性化を認めた。

次に骨格筋特異的 STAT3 欠損マウスにおいて下肢虚血モデルを作成し、前述の項目についてコントロールマウスと比較評価した。下肢虚血後の血流の回復の障害、下肢虚血後の STAT3 の活性化の低下、CD31 免疫染色による血管内皮細胞数の低下、STAT3 を活性化するサイトカインである IL-6, G-CSF の発現低下、血管新生や IL-1 β などの炎症性サイトカインおよび CXCL1 などのケモカインの発現が障害さ

れていた。これらの結果は、骨格筋特異的STAT3欠損マウスにおいて炎症性サイトカイン、ケモカインが抑制されているために血管新生が抑制されていることが考えられた。主要な炎症性サイトカインで血管新生にも重要であるIL1betaの発現細胞を明らかにするために、In situ hybridizationを行いIL1beta mRNAの発現を調べたところ、コントロールマウスの下肢虚血24時間後の組織において、骨格筋細胞の隙間や血管周囲に浸潤している炎症細胞にIL1betaのmRNA発現を認めた。骨格筋特異的STAT3欠損マウスでは、コントロールマウスと比較して、陽性細胞数は少ない印象であり、骨格筋のSTAT3が血行改善の経路において、炎症経路を制御し、結果として血管新生に重要である事が示唆された。

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3件)

1. Mawatari K, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Togawa T, Tsukimura T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Sakubaba H, Imaizumi T. Screening for Fabry disease in patients with left ventricular hypertrophy. *Int J Cardiol* 167: 1059-1061, 2013 査読・有
 2. Oba T, Yasukawa H, Hoshijima M, Sasaki KI, Futamata N, Fukui D, Mawatari K, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Nakamura K, Kang D, Yajima T, Knowlton KU, Imaizumi T. Cardiac-Specific Deletion of SOCS-3 Prevents Development of Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 59:838-852, 2012. 査読・有
 3. Ohmura H, Yasukawa H, Minami T, Sugi Y, Oba T, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Aoki H, Imaizumi T. Cardiomyocyte-specific transgenic expression of lysyl oxidase-like protein-1 induces cardiac hypertrophy in mice. *Hypertens Res* 2012, 35: 1063-1068. 査読・有
- [学会発表](計12件)
1. Mawatari K, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Sugi Y, Imaizumi T: Screening for Fabry Disease in Patients with Left Ventricular Hypertrophy. 第17回日本心不全学会学術集会 2013年11月28~30日 埼玉
 2. Kyogoku S, Yasukawa H, Nagata T, Oba T, Ohshima H, Minami T, Yajima T, Hoshijima M, Aoki H, Knowlton KU, Imaizumi T. Cardiac-Specific Deletion of Suppressor of Cytokine Signaling-3 Prevents Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Mice. The American Heart Association, The 85th Scientific Sessions, Los Angeles, USA, November3-7, 2012
 3. Mawatari K, Tahara N, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Mizoguchi M, Sugi Y, Adachi H, Imaizumi T. Pioglitazone Decreases Plasma Fibroblast Growth Factor-21 Levels in Patients with Type 2 Diabetes. The American Heart Association, The 85th Scientific Sessions, Los Angeles, USA, November3-7, 2012
 4. Kyogoku S, Yasukawa H, Nagata T, Oba T, Ohshima H, Minami T, Fukui D, Sugi Y, Aoki H, Imaizumi T: Prevention of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Cardiac-Specific SOCS3 Deficient Mice by Preserving Energy Metabolism. 第29回 国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会 2012年10月26~27日; 福岡
 5. Ohshima H, Yasukawa H, Nagata T, Kyogoku S, Oba T, Mawatari K, Futamata N, Minami T, Sugi Y, Sasaki K, Imaizumi T: Impaired Angiogenesis During Hindlimb Ischemia in Skeletal Muscle-Specific STAT3 Deficient Mice. 第76回日本循環器学会 2012年3月16~18日; 福岡

6. Minami T, Yasukawa H, Nagata T, Oba T, Kyogoku S, Ohshima H, Aoki H, Yoshimura A, Imaizumi T : Prevention of Left Ventricular Remodeling after Acute Myocardial Infarction in Interleukin-17 Deficient Mice. 第 76 回日本循環器学会 2012 年 3 月 16~18 日 ; 福岡
7. 馬渡一寿、田原宣広、安川秀雄、大場豊治、二又誠義、永田隆信、京極幸子、大島英樹、南知子、溝口ミノリ、足達寿、今泉勉 ; Pioglitazone Decreases Plasma Fibroblast Growth Factor-21 Levels in Patients with Type 2 Diabetes. 第 76 回日本循環器学会 2012 年 3 月 16~18 日 ; 福岡

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
www.kurume-shinzo.com
www.med.kurume-u.ac.jp/med/kucri/

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大島英樹 (Hideki Ohshima)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号 : 90569419

(2) 研究分担者

()