



Title	Angiotensin II Interferes with Leukemia Inhibitory Factor-Induced STAT3 Activation in Cardiac Myocytes
Author(s)	刀禰, 央朗
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42766">https://hdl.handle.net/11094/42766</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	刀 補 央 朗
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15761 号
学位授与年月日	平成12年10月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Angiotensin II Interferes with Leukemia Inhibitory Factor-Induced STAT3 Activation in Cardiac Myocytes (アンジオテンシンIIは心筋細胞における白血病阻止因子によるSTAT3活性化を阻害する)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次
	(副査) 教授 多田 道彦 教授 萩原 俊男

## 論文内容の要旨

## 【目的】

心筋細胞において、インターロイキン(IL) - 6 サイトカインファミリーであるカルジオトロフィン-1や白血病阻止因子(LIF)が、共通の信号伝達分子であるgp130を介して肥大シグナルを伝達することが報告されている。gp130の下流のシグナル伝達系は、主に Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) 系および mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系の2つの異なる系により構成される。アデノウイルスベクターを用いた心筋細胞への遺伝子導入により、野生型および変異型STAT3を発現させた実験系において、JAK-STAT 系、特に STAT3を介する系が gp130依存性の心筋肥大に重要な役割を果たすことが示唆されている。一方、gp130を介する STAT1の活性化は細胞死を抑制する遺伝子の一つである bcl-xL の発現を誘導し、心筋細胞保護効果を発揮することが示されている。

アンジオテンシンII (AII) は心筋肥大を含む心血管系に対する様々な効果を有することが知られている。近年、AIIは血管平滑筋細胞や心筋細胞において AII type 1 (AT1) 受容体を介して、MAPK 系だけでなく JAK-STAT 系も活性化することが報告されている。AT1受容体を強制発現させた細胞では、IL-6による STAT3のチロシンリン酸化を AII が一過性に阻害することが観察されている。また、AIIは心筋細胞や血管内皮細胞のアポトーシスを誘導することも報告されている。これまでに、心筋細胞における肥大や細胞保護効果を誘導する情報伝達系の解明は進められてきたが、別々の刺激によって誘導される異なるシグナル間のクロストークについてはまだ不明な点が多く存在する。そこで本研究では、心筋細胞における gp130を介するシグナルと、AIIのシグナルの間の相互作用の有無について、細胞死および STAT3のチロシンリン酸化を指標に検討することを目的とした。

## 【方法ならびに結果】

## 1) 方法

新生児ラット培養心筋細胞を用い、LIF および AII により刺激した。

①DNA 断片化および MTT アッセイ：LIF ( $1 \times 10^3$ U/ml) および AII (1  $\mu$ M) で24時間刺激した培養心筋細胞より抽出したDNAを、2%アガロースゲルにて電気泳動しエチジウムプロマイド染色を行ない、DNA 断片化の有無を検討した。また、MTT (0.5mg/ml) 添加5時間後に細胞を溶解し、取り込まれたMTT色素量を吸光度により測定、細胞生存率を検討した。

②免疫沈降およびウエスタンプロッティング：LIF あるいは A II で刺激した培養心筋細胞を一定時間毎に溶解した後に超遠心を行ない、その上清を抗 STAT3 抗体にて免疫沈降後、SDS-PAGE にて電気泳動を行なった。次にナイロンメンブレンに転写し、抗チロシンリン酸化抗体にてプロッティングを行ない、STAT3活性化の有無を検討した。また、A II の前処置 15 分後に LIF 刺激を行ない、5 分後に細胞を溶解し同様の方法で STAT3 の活性化を検討した。AT1受容体の特異的阻害剤である CV11974 前処置の影響も検討した。

## 2) 結果

心筋細胞における DNA 断片化は血清存在下には認められず、24時間無血清培養にて明らかに観察された。この無血清により誘導される DNA 断片化は LIF 存在下では減弱したが、A II 存在下では増強され、血清存在下にても A II により DNA 断片化が観察された。また、LIF による DNA 断片化の減弱作用は A II により阻害された。MTT アッセイによる心筋細胞生存率の検討では、無血清培養のコントロールに比べ、LIF 存在下では約 2 倍の生存率が認められたが、A II 存在下ではコントロールと有意差を認めなかった。さらに、A II 存在下では LIF による生存率増強効果は有意に減少した。

心筋細胞における LIF の細胞保護効果が A II により阻害されたことから、次に gp130 を介するシグナルと A II のシグナルの間にクロストークが存在するか否かを STAT3 の活性化を指標に検討した。心筋細胞において STAT3 のチロシンリン酸化すなわち活性化は LIF 刺激後 5 分をピークに認められ、30 分後までに徐々に減弱し、60 分後には観察されなかった。一方、A II では刺激 5 分後から 30 分後までの早期には STAT3 の活性化を認めず、60 分後に一過性の微弱な活性化をみるのみであった。さらに、A II の前処置は濃度依存性に心筋細胞における LIF 刺激による STAT3 の活性化を阻害した。AT1受容体の特異的阻害剤である CV11974 をさらに前処置することにより、この A II による STAT3 活性化阻害作用は完全に抑制された。

### 【総括】

心筋細胞において LIF 刺激による gp130 の活性化の後にもたらされる細胞保護効果および STAT3 活性化に対し、A II が AT1受容体を介して阻害作用を有することを明らかにした。しかしながら、その阻害の詳細なメカニズムについては不明であり、今後は心筋肥大などの病態との関連も含めて検討する必要があると考えている。

## 論文審査の結果の要旨

インターロイキン-6 関連サイトカインは、心筋細胞において高い発現を示す情報伝達分子 gp130 を介し、細胞肥大および細胞保護効果を誘導する。アンジオテンシン II も心血管系に対する様々な効果を有する。心筋細胞における肥大や細胞保護効果を誘導する個々の情報伝達系の解明は進められてきたが、別々のリガンドによって誘導される情報伝達系の間の相互作用については不明な点が多い。本研究は、gp130 を介する細胞保護効果がアンジオテンシン II により抑制されることを心筋細胞において初めて明らかにし、アンジオテンシン II type1受容体を介する系により gp130 の下流の情報伝達分子 STAT3 の活性化が阻害されるという相互作用の存在を示した。今後、この相互作用の詳細なメカニズムと、心筋肥大等の病態との関連性につき解明が期待される。

以上より、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。