

〔原著〕 松本歯学 33 : 291~298, 2007

key words : サイトカイン—三叉神経節細胞—STAT3—セカンドメッセンジャー—炎症

急性炎症時におけるサイトカインの関与 —三叉神経節細胞での STAT3 の変化—

飯島 暁子¹, 奥村 雅代¹, 田中 文也^{1,2},
姫野 勝仁³, 時崎 匡史^{1,2}, 金銅 英二¹

¹松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

²松本歯科大学 歯科矯正学講座

³松本歯科大学 歯科麻酔学講座

Involvement of cytokine intracellular molecules in the rat
trigeminal ganglion under acute inflammation
—A change of STAT3 molecules in the trigeminal ganglion—

AKIKO IJIMA¹, MASAYO OKUMURA¹, TAKEYA TANAKA^{1,2},
KATSUHITO HIMENO³, TADASHI TOKIZAKI^{1,2} and EIJI KONDO¹

¹*Department of Oral & Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

²*Department of Orthodontics, School of Dentistry, Matsumoto Dental University*

³*Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University*

Summary

This study investigated the involvement of a transcription factor STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) in acute inflammation of the maxillofacial area. We demonstrated localization of some inflammatory cytokine receptors and its downstream signal molecules, JAK (Janus kinases)–Tyk (Tyrosin kinase) family, in trigeminal ganglion (TG). Therefore, when the maxillofacial area is inflamed, it is expected that STAT3, a mediator of JAK/STAT signal transduction pathway, will be up-regulated in trigeminal ganglion neurons that innervate the irritated tissues.

Acute inflammation was produced by capsaicin injection to serially the unilateral upper lip, and expression of STAT3 in TG after injection was observed over a 7-day. By immunohistochemistry, STAT3-immunoreactivities (IR) were detected in small and medium size neurons, and the number of immunoreactive neurons increased both in the ipsi- and contralateral TG after injection. Immunoblot analysis showed that the total amount of STAT3 in TG did not change ipsilaterally, but was increased contralaterally. The amount of phospho-

rylated STAT3 was slightly increased in TG on both sides.

These data suggest that STAT3 expression in the bilateral TG is regulated by unilateral acute inflammation.

緒 言

歯科疾患は、歯髄炎や歯周炎といった炎症と関連するものが大半を占め、激的な「痛み」を伴って来院する症例が多く認められる。この「痛み」は医療現場における重要な課題であり「痛み」のメカニズム解明、特に炎症性疼痛の病態を解明することは重要であるといえる。その理由として、消炎鎮痛を目的とする適切な治療薬や治療法が確立されつつあるものの、まだ副作用の問題など課題も多いことがあげられる。炎症時の「痛み」のメカニズムに関する研究では、カプサイシンをラット上口唇に注入する急性炎症モデルを用いて研究されている¹⁻⁴⁾。カプサイシンは、唐辛子などの主成分であり、vanillyl基を有する化学構造をもつ。この物質は、皮下などの末梢組織に注入すると激的な痛みと急性炎症を惹起する物質として知られている。1997年にはカプサイシン受容体 TRPV1 (transient receptor potential V1) の立体構造、機能構造などが明らかにされ、現在の痛み研究において最も注目されている^{5,6)}。

炎症時の末梢組織においては各種のサイトカインが遊走され、炎症の病態に様々に関与していることが明らかにされ、さらに三叉神経節細胞におけるサイトカイン受容体 gp-130の局在やサイトカイン関連の細胞内セカンドメッセンジャーである JAK (Janus kinase)-Tyk (tyrosin kinase) ファミリーの局在が解析されてきた。その結果、多くの三叉神経節細胞において、サイトカイン受容体である gp-130蛋白の陽性反応および gp-130 mRNA の発現が明かにされた。また、JAK-Tyk ファミリーの特徴的な局在パターンも明らかにされた⁷⁾。

gp-130は、細胞膜一回貫通型の蛋白で各種サイトカイン受容体 α 鎖等とダイマーを形成して細胞内への情報伝達に不可欠な蛋白として知られている^{8,9)}。三叉神経節の小型細胞では JAK1, JAK2, Tyk2 が発現しており、さらに JAK-Tyk ファミリーの下流に存在するサイトカインの細胞内情報伝達分子である STAT (signal

transducer and activator of transcription) 分子¹⁰⁻¹⁵⁾の中でも特に STAT 3 経路が関与していることが示唆される⁷⁻⁹⁾しかし、炎症性サイトカインが三叉神経節細胞に与える影響についての詳細な報告はない。

本研究では、急性炎症時に三叉神経節細胞にサイトカインがどのような影響を与えるか明らかにする目的で急性炎症時のサイトカイン細胞内情報伝達分子である STAT 3 の発現をカプサイシン投与によるラット急性炎症モデルを用いて検討した。

実験動物および方法

・実験動物

動物は、6週齢の Sprague Dawley 系 (SD) 雄性ラット (体重200~250 g; 日本 SLC, 静岡, 日本) を用いた。動物の三叉神経第2枝支配領域である右側上口唇にカプサイシン (Cap) (150 μg capsaicin in 10% ethanol, 10% Tween 80, 80%生理食塩水) を50 μl 注入し、炎症モデル動物を作製した。また、比較対照群 (Control: Cont) は無処置動物とした。実験動物数は、計53匹 (免疫組織化学30匹, Western blotting 用23匹) 無処置動物計27匹 (免疫組織化学15匹, Western blotting 12匹) 合計80匹を使用した。

なお、本研究は松本歯科大学動物実験委員会の承諾 (048-06号) を得て行なった。

・組織の摘出

モデル作製の後、30分、3時間、1日、3日、7日とタイムコースをとり、深麻酔下にて灌流固定 (4% PFA in 0.1 M PB: 4%パラフォルムアルデヒド+0.1 M phosphate buffer) 後、大後頭孔より頭蓋骨上部を切除し大脳、小脳部を除去した。脳底部の脳硬膜を丁寧に剥離し、三叉神経節を剖出、各枝を切断し慎重に摘出した。この組織は、免疫組織化学に供した。また、蛋白定量のための組織は、灌流固定をおこなわず、ジエチルエーテル (ナカライテスク, 京都, 日本) にて深麻酔後、剪刀にて断頭し、三叉神経節を摘出した。摘出した組織はすぐに液体窒素にて凍結し保

存した。

1. 免疫組織化学法による STAT 3 およびリン酸化 STAT 3 陽性細胞の検討

1) 切片の作製

摘出した組織は、灌流固定液にて後固定し、その後30%蔗糖液にて脱水した。さらに粉末状ドライアイスにて凍結し、クライオスタットにて凍結切片 (15–20 μm) を作製し、シランコーティングしたスライドグラス (Matsunami 社製, MSコート, 大阪, 日本) に順次貼付した。

2) 免疫組織化学

スライドグラスに貼付した切片は、リン酸緩衝液 (0.1 M PB) にて洗浄し、非特異的反応を除去するため3% NGS (正常ヤギ血清) 3% BSA (bovin serum albumin) にてブロッキングをおこなった。再度洗浄し一次抗体として抗 STAT 3 抗体 (Cell Signaling 社, Massachusetts, USA #9132, 500倍希釈) と抗リン酸化 STAT 3 (p-STAT 3) 抗体 (Cell Signaling 社 Massachusetts, USA, #9134, 500倍希釈) を用い、作製した切片上で免疫反応 (4 $^{\circ}\text{C}$, 108~120時間) を行なった。その後、0.1 M PB にて洗浄 (室温, 15分間, 4回) し、ビオチン化抗ラビット抗体 (biotinylated anti-rabbit IgG, Vector 社, California, USA #BA-1000, 1000倍希釈) にて反応 (4 $^{\circ}\text{C}$ 48~60時間) し、0.1 M PB にて洗浄 (室温15分間4回), 次にABCキット (Vector 社, California, USA) にて反応した。さらにDAB (3,3'-diaminobenzidine, 同仁化学研究所, 熊本, 日本) にて発色し、光学顕微鏡 (OLYMPUS BX 51, 東京, 日本) にて観察した。なお、各切片での全細胞数における陽性細胞数の割合を鏡視下でカウントし、統計処理を行なった。統計データの解析は、クラスカル・ウォリスの検定並びに Cap 注入と対側間はウィルコクソン検定を行ない有意水準 $P < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

2. Western blotting による STAT 3 およびリン酸化 STAT 3 蛋白の検出

三叉神経節を各タイムコースの条件下で摘出し、すぐ左右別に蛋白を抽出精製した。これら組織の蛋白抽出には、TRIZOL (Invitrogen 社, USA) を用いて通法により行なった。精製した

サンプルの蛋白濃度を、Protein 595 assay (Bio-Rad 社, California, USA) を用いて吸光度測定した。Laemmli の方法¹⁰⁾に従い、7.5%のアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE にて分画した。作製した7.5%アクリルアミドゲルを泳動槽にセットし running buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) で満たした後、総蛋白量を合わせたサンプルをゲルのウエルに装填した。次に20mA 約45分間電流を流し電気泳動した。電気泳動後 PVDF 膜 (polyvinylidene fluoride membrane; immun-blot PVDF, Bio-Rad 社) に転写した (15 V, 90分間; セミドライ法)。転写済みのメンブレンを1% BSA/TBS (Tris buffered saline: 20mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) に入れて、非特異的反応をブロッキングした (室温, 30分間)。その後、一次抗体である抗 STAT 3 抗体および抗リン酸化 STAT 3 抗体を用い、免疫反応をおこなった (室温, 1時間)。反応後、Tween-TBS (0.1% Tween 20 in TBS) にて洗浄した (室温, 15分間3回)。さらに2次抗体 (アルカリホスファターゼ結合抗ラビット抗体: anti rabbit IgG-Alkaline phosphatase conjugated; 5000倍希釈, 室温, 30分間) にて反応し、洗浄した。発色は NBT/BCIP (0.45 mg/ml nitro-blue tetrazolium chloride, 0.175 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphatase, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl_2) にて行なった。発色反応が落ち着いたところで、5 mM EDTA にて停止、乾燥させて保存した。明らかになったバンドは、画像解析装置 (Versa Doc 5000, Bio Rad 社 California, USA) にて数値化した。

統計データの解析は、クラスカル・ウォリスの検定にて多重比較を行った。

結 果

1. 免疫組織化学法による STAT 3 およびリン酸化 STAT 3 陽性細胞の検討

抗 STAT 3 抗体 (STAT 3) を用いてカプサイシン処理3時間後のラット三叉神経節における STAT 3 発現細胞を免疫組織学的に検討した。その結果、カプサイシンを注入した動物 (以下 Cap-saicin 注入群) (Fig. 1 Cap; 上段) とカプサイシンを注入しない動物 (以下無処置動物) (Fig. 1

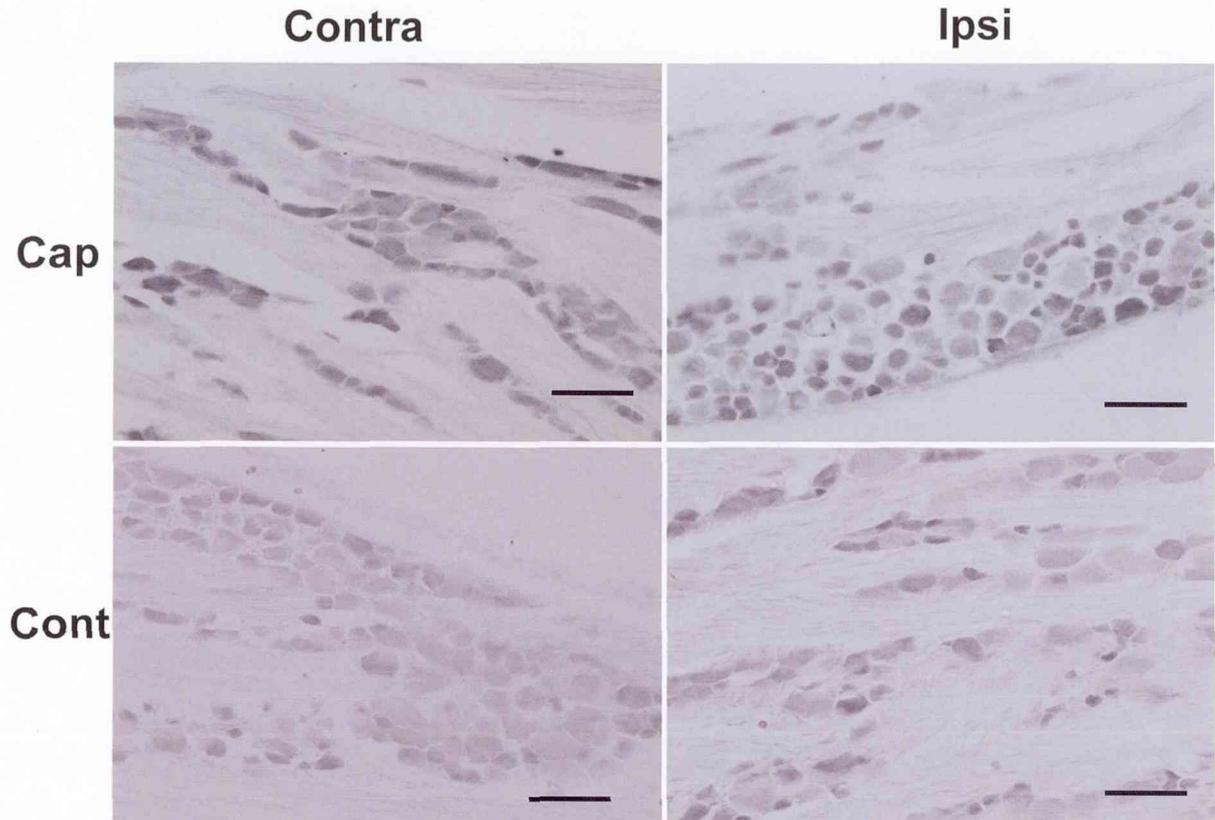


Fig.1: 抗 STAT 3 抗体による免疫組織化学像

三叉神経節での抗 STAT 3 抗体による免疫組織化学像を示す. ($\times 200$)

上段は Capsaicin 注入 3 時間後 (Cap) の組織像. 右は注入側 (Ipsi) 左は対側 (Contra) を示す. 下段は無処置 (Cont) 動物より摘出した三叉神経節の組織像. Capsaicin 注入群は両側ともコントロール群に比較して中型・小型細胞で濃染する傾向が見られた. (Scale bar = 100 μm)

Cont; 下段) の三叉神経節組織を比較すると, カプサイシンを注入した神経節細胞の細胞質に, STAT 3 が濃染する傾向がみられた (Fig. 1). これら STAT 3 陽性細胞は, 主に中型 (直径 30–40 μm) や小型 (直径 30 μm 以下) の神経節細胞であった. 一方, リン酸化 STAT 3 (p-STAT 3) に対する抗体 (抗リン酸化 STAT 3 抗体) を用いてカプサイシン注入後 3 時間の神経節を染色したところ, 注入側と対側ともに 7–8 割の神経節細胞の核が濃染したものの, 注入側 (Fig. 2 上段; 右 Ipsi) と対側 (Fig. 2 上段; 左 Contra) 間, また Cap (Fig. 2 上段) と Cont (Fig. 2 下段) 間で染色性に差は認められなかった (Fig. 2). さらに, カプサイシン注入後 30 分, 3 時間, 1 日, 3 日, 7 日の経時変化を検討したところ, STAT 3 陽性細胞の割合は, Cont では全神経細胞に対し約 30% であったのに対し, 急性炎症モデル動物群 (30m–7d) では, 注入 3 時間 (3h) 後に STAT 3 陽性細胞の割合が Cap 注入側で 67.3% まで増加

した. その後, STAT 3 陽性細胞は Cap 注入側では 60% 台を維持し 7 日 (7d) には 66% となった. 一方, 対側では 3 時間まで 20–30% とコントロール値に近い割合であったが, 1 日で 44.9%, 3 日で 63.7%, 7 日で 57.5% と上昇した (Fig. 3). 次に p-STAT 3 陽性細胞の割合は, Cont で約 80% であった. カプサイシン注入以降, p-STAT 3 陽性細胞の割合は, 徐々に低下し, 7 日では 69.4% であった. 対側は, 注入 30 分で 64.8% に低下し, その後 60–70% 間を変動した (Fig. 4).

2. Western blotting による STAT 3 およびリン酸化 STAT 3 蛋白の検出

抗 STAT 3 抗体または抗 p-STAT 3 抗体を用いた Western blotting では, それぞれ約 80 kDa 相当部位に蛋白バンドが検出された. (Fig. 5). 検出された蛋白バンドの濃度を Cont を 1.0 としてデンシトメトリーで比較したところ, カプサイシン注入後 30m–7d の注入側三叉神経節の STAT 3 蛋白量は, Cont 群と差が認められなかつ

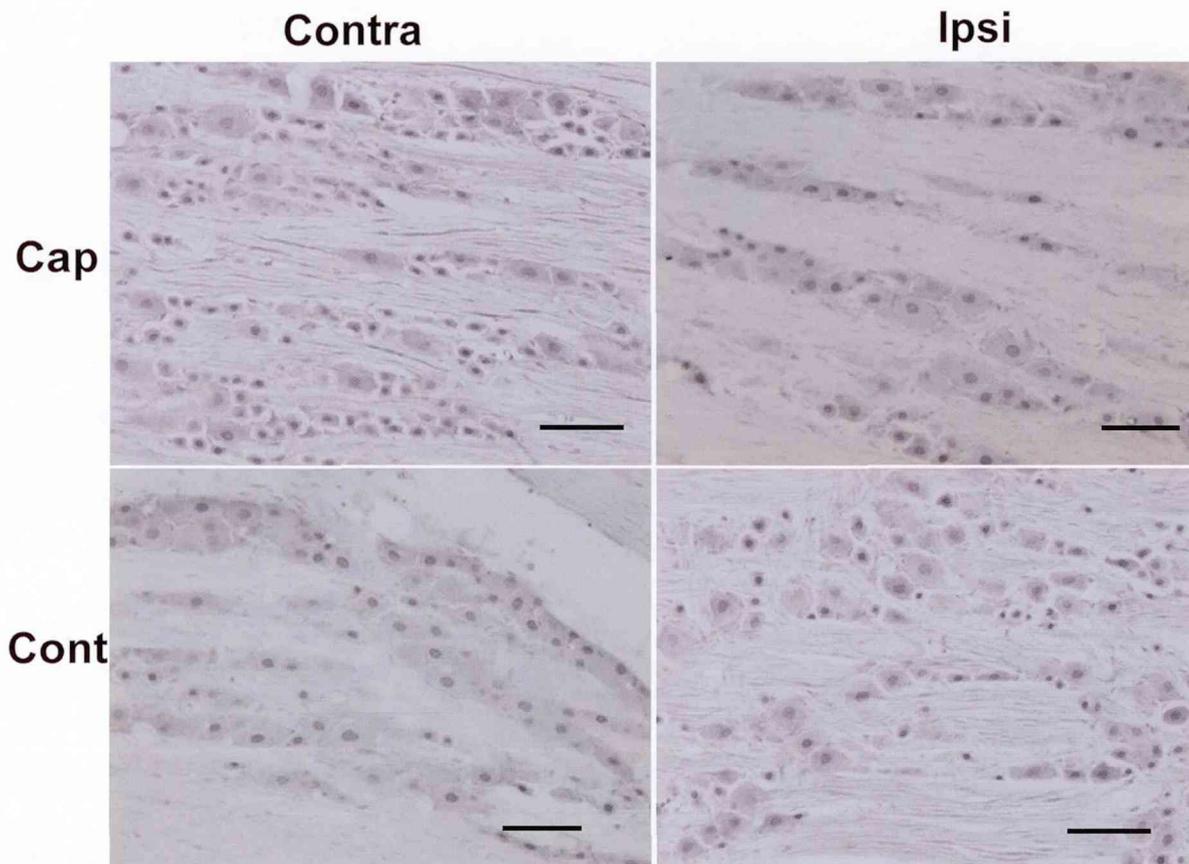


Fig.2: 抗リン酸化 STAT 3 抗体による免疫組織化学像

三叉神経節での抗リン酸化 STAT 3 抗体による免疫組織化学像を示す. (×200)
 上段は Capsaicin 注入 3 時間後 (Cap) の組織像. 右は注入側 (Ipsi) 左は対側 (Contra) を示す. 下段は無処置 (Cont) 動物より摘出した三叉神経節の組織像. いずれの群も核が染色し, リン酸化した STAT 3 が核内移行している像が得られた. (Scale bar = 100 μm)

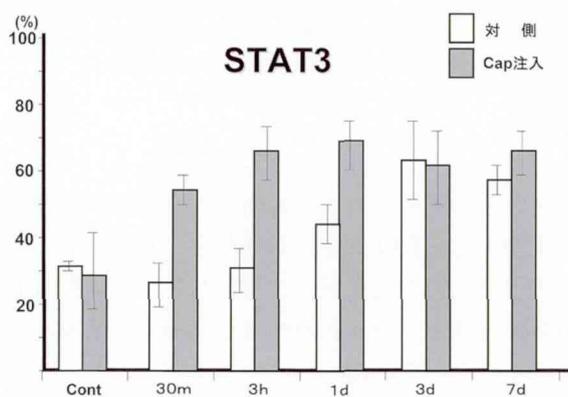


Fig.3: 抗 STAT 3 抗体陽性細胞数の経時的変動

抗 STAT 3 抗体での免疫組織化学における陽性細胞の割合を示す. 横軸に時間経過 (コントロール, 30分, 3時間, 1日, 3日, 7日) を, 縦軸には全細胞数に対する陽性細胞数の割合 (%) を示す. 3 時間の Capsaicin 注入群で陽性細胞の割合が上昇傾向を示した.

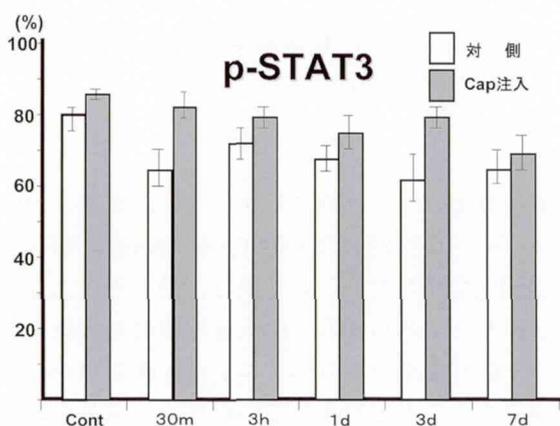


Fig.4: 抗リン酸化 STAT 3 抗体陽性細胞数の経時的変動

抗リン酸化 STAT 3 抗体での免疫組織化学における陽性細胞の割合を示す. 横軸に時間経過 (コントロール, 30分, 3時間, 1日, 3日, 7日) を, 縦軸には全細胞数に対する陽性細胞数の割合 (%) を示す. コントロールに比べ陽性細胞の割合が両群共に下降傾向を示した.

た. これに対し, 対側では30分後に0.8に減少し, 3日, 7日と増加した (Fig.6) 一方, p-STAT 3 蛋白バンドの濃度は, カプサイシン注入側にお

いて, 30分で1.38, 3時間で1.3と増加した後, 3日目以降に Cont 値まで減少した. また, 対側では3日, 7日に再び増加する傾向がみられた

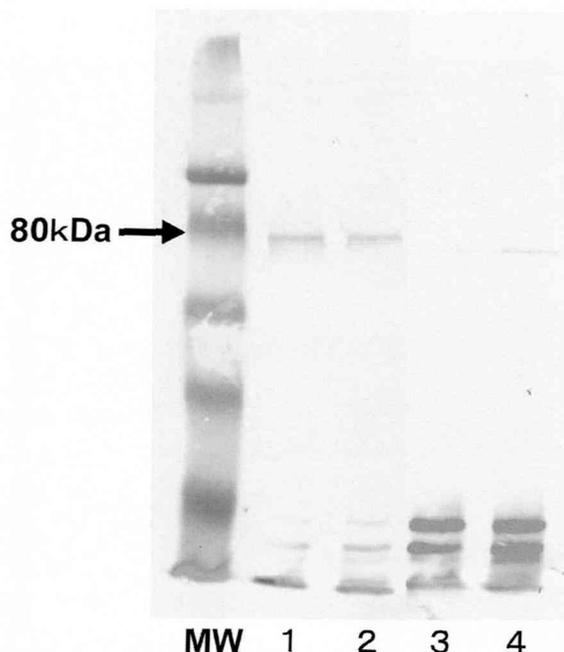


Fig.5: 三叉神経節組織における STAT3 およびリン酸化 STAT3 の発現

Western Blotting のバンド像を示す。

レーン 1: Cap 注入後 3 時間の注入側の STAT3 蛋白を示す。

レーン 2: レーン 1 と同一動物の対側の STAT3 蛋白を示す。

レーン 3: Cap 注入後 3 時間の注入側の p-STAT3 蛋白を示す。

レーン 4: レーン 3 と同一動物の対側の p-STAT3 蛋白を示す。

MW: 左端レーン, 分子量マーカー。

矢印は約 80 kDa を示す。

(Fig. 7). しかし, 有意差検定では有意な差を見出すことは出来なかった。

考 察

本研究では, カプサイシン注入 3 時間後において炎症側三叉神経節の STAT3 陽性細胞の割合が増加傾向を示した。この結果は, 動物疼痛逃避行動試験などでみられる急性炎症時の潜時の減少, つまり痛覚過敏やアロディニアの症状発現が約 3 時間であることと一致していた^{2,3)}。ウエスタンブロットの結果から, カプサイシン注入側の神経節では, p-STAT3 が 30 分で 1.38, 3 時間で 1.3 倍に増加傾向を示し, その後減少していることから, 急性炎症を惹起し, 急激な STAT3 のリン酸化が進み, その代償反応として 3 時間経過時に炎症側三叉神経節細胞内で STAT3 産生亢進が起きたと考えられる。また, p-STAT3 陽性反応は, 神経細胞の核に濃染している像が得られたことよ

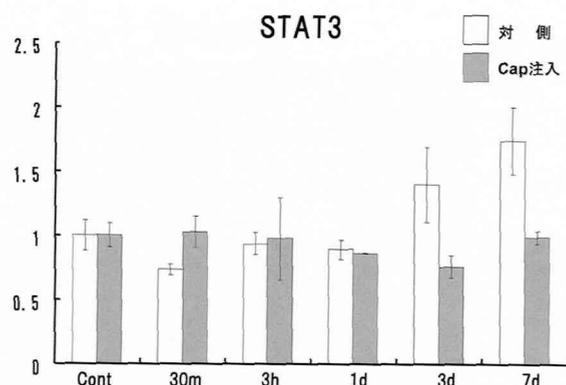


Fig.6: 三叉神経節組織における STAT3 蛋白量の経時的変動
Western Blotting のバンド (抗 STAT3 抗体; STAT3) を画像解析装置で数値化し, 無処置動物 (Cont) の値に対する各経過時間の変化の割合を示す。3 日・7 日目に対側で上昇傾向を示した。

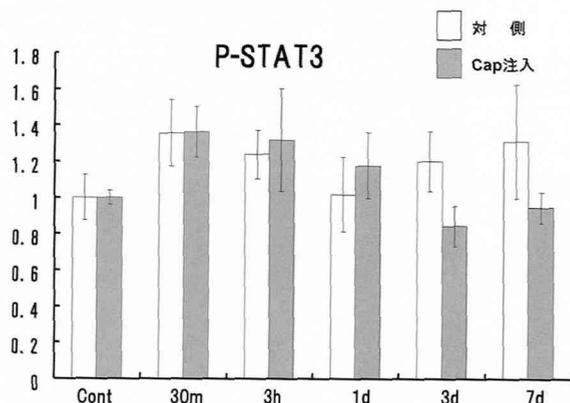


Fig.7: 三叉神経節組織におけるリン酸化 STAT3 蛋白量の経時的変動

Western Blotting のバンド (抗リン酸化 STAT3 抗体; p-STAT3) を画像解析装置で数値化し, 無処置動物 (Cont) の値に対する各経過時間の変化の割合を示す。

3 日・7 日目に対側において上昇傾向を示した。

り, カプサイシンに誘導された IL-6, OSM, LIF などのサイトカインの発現により, 三叉神経節細胞内で STAT3 がリン酸化し, 核内移行したものと考えられる。一方, STAT3 のリン酸化反応を炎症側と対側と比較すると, 両者に有意な差がみられないこと, さらにウエスタンブロットでは, カプサイシンを注入した対側では, 注入後 3 日と 7 日に再度 p-STAT3 の発現がみられることから, カプサイシンに誘導された炎症性変化は, 炎症側のみならず対側にも影響を与えることが示唆された。また, サイトカインは, 痛みの誘発物質として作用するよりも, 神経傷害後の修復因子として作用するとの報告²⁰⁾がある。したがって, カプサイシン注入後 3 日以降の神経節細胞における STAT3 と p-STAT3 の動態は, 急性炎

症による STAT3 シグナル伝達経路の活性化と、これに続いて生じる神経修復反応における STAT3 の活性化である可能性があり、STAT3 の多彩な役割が興味深い。今後、三叉神経節細胞への炎症性サイトカインの作用が、局所の微小循環によるものか、体循環による全身性反応の一徴候なのかを明らかにするとともに、急性炎症と神経修復に伴う STAT3 の活性化を誘導するサイトカインを明らかにする必要がある。

近年、STAT3 は、Neuropeptide Y (NPY), galanin, 内因性のオピオイドの前駆物質など、疼痛誘発および疼痛抑制遺伝子の転写活性化分子であることも明らかにされた¹⁷⁻¹⁹⁾。したがって、急性炎症時に誘導された STAT3 は、疼痛関連物質の他に疼痛抑制物質の発現に関与していることが推測される。本研究においても、カプサイシン注入側と対側間あるいは同一神経節内の神経細胞間でも STAT3 の発現やリン酸化が異なっていることから、神経細胞内で STAT3 とそのリン酸化によって疼痛誘発物質と疼痛抑制物質が同時に制御され、最終的にカプサイシンによる急性炎症性疼痛として、上位中枢に伝達されている可能性がある。したがって、神経節細胞内における疼痛関連物質と疼痛抑制関連物質の共発現について解析する必要がある。

本研究の免疫組織化学染色と Western blotting では、予想に反して三叉神経節の経時的な蛋白動態が異なっていた。この結果は、免疫組織化学では神経細胞を中心にして形態学的に局在パターンと発現率を検討したが、Western blotting では、組織をホモジネートして実験に供したことから、組織構成細胞の不均一性の影響を受けている可能性がある。また、経時的動態変化を検討したカプサイシン処理後30分、3時間、1日、3日、7日では、それぞれの時間で発現するサイトカインの種類と量ならびに STAT3 が担う役割が異なっている可能性が推察される。炎症性サイトカインは、生体内で多様な機能を発揮していることが既に知られていることから²⁰⁾、急性炎症モデル動物実験での STAT3 の経時的変動は、痛覚伝達の他、痛覚抑制、神経修復機転などさまざまな要因が複合的に作用した結果であると考えられた。

以上、本研究によって、急性炎症時の三叉神経節では、STAT3 の活性化が炎症側のみならず対

側の神経節細胞に及ぶこと、さらに STAT3 の発現とリン酸化の経時的変動は、急性炎症による疼痛誘発のほか、疼痛の抑制や神経修復物質の発現など複数の要因が関与していることが示唆された。今後は STAT3 の変動を誘導するサイトカインの種類と量的変化を明らかにすることが三叉神経が関与する痛みのメカニズムを解明する上で必要であると考えられた。

結 論

急性炎症性変化が三叉神経節細胞にどのような影響を与えるか明らかにすることを目的とし、急性炎症で誘導される IL-6 スーパーファミリーの受容体シグナル伝達分子である STAT3 の発現を、ラットのカプサイシン注入による急性炎症モデルを用いて検討した。その結果、急性炎症時の三叉神経節細胞では、STAT3 の活性化が炎症側のみならず対側の神経節細胞に及ぶこと、さらに STAT3 の発現とリン酸化の経時的変動は、急性炎症による疼痛誘発のほか、疼痛の抑制や神経修復物質の発現など複数の要因に影響されることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、研究データについて統計学的な示唆を与えていただき且つ懇切なるご指導を賜りました松本歯科大学障害者歯科学講座小笠原正教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Nagy JI, Hunt SP, Iversen LL and Emson PC (1981) Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide-containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin. *Neurosci* **6** : 1923-34.
- 2) Jancso G, Kiraly E and Jancso-Gabor A (1977) Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons. *Nature* **270** : 741-3.
- 3) Holzer P (1991) Capsaicin : Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* **43** : 143-201.
- 4) Nagy JI, Iversen LL, Goedert M, Chapman D and Hunt SP (1983) Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *J Neurosci* **3** : 399-406.

- 5) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activate ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-24
- 6) 金銅英二 (2004) 最新の痛み分子基盤-Capsaicin 受容体を中心に-. *松本歯学* **30**: 219-27.
- 7) Mizuno M, Kondo E, Nishimura M, Ueda Y, Yoshiya I, Tohyama M and Kiyama H (1997) Localization of molecules involved in cytokine receptor signaling in the rat trigeminal ganglion. *Mol Brain Res* **44**: 163-6.
- 8) Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T and Kishimoto T (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp-130. *Cell* **63**: 1149-57.
- 9) Watanabe D, Toshimura R, Khalil M, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T and Kiyama H (1996) Characteristic localization of gp-130 (the signal-transducing receptor component used in common for IL-6/IL-11/CNTF/LIF/OSM) in the rat brain. *Eur J Neurosci* **8**: 1630-40.
- 10) Darnell Jr JE, Kerr IM and Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**: 1415-21.
- 11) Harpur AG, Andress AC, Ziemiecki A, Aston RR and Wilks AF (1992) JAK 2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* **7**: 1347-57.
- 12) Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto T, Thierfelder WE, Kleider B and Silvennoinen O (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci* **19**: 222-27.
- 13) Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, Chen YQ, Blake TB, Shibuya K, Ortaldo JR, McVicar DW and O'Shea JJ (1994) Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukine-2. *Nature* **370**: 151-3.
- 14) Kishimoto T, Taga T and Akira S (1994) Cytokine signal transduction. *Cell* **76**: 253-62.
- 15) Luttmack C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemicki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Barbieri G, Pellegrini S, Sendtner M, Heinrich PC and Horn F (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak 1 with the interleukin-6 signal transducer gp-130. *Science* **263**: 89-92.
- 16) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- 17) Muraoka O, Xu B, Tsurumaki T, Akira S, Yamaguchi T and Higuchi H (2003) Leptin-induced transactivation of NPY gene promoter mediated by JAK 1, JAK 2 and STAT 3 in the neural cell lines. *Neurochem Int* **42**: 591-601.
- 18) Hakansson M, de Lecea L, Sutcliffe JG, Yanagisawa M and Meister B (1999) Leptin receptor- and STAT 3-immunoreactives in hypocretin/orexin neurons of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol* **11**: 653-63.
- 19) Sahu A (1998) Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology* **139**: 795-8.
- 20) 木山博資 (1999) 神経栄養因子とサイトカインの観点からペインを考える. *ペインクリニック* **20**: 41-7.