

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	宮 腰 昌 明
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Stat3 Serine727 Phosphorylation Is an Early Change in Multi-Step Mouse Hepatocarcinogenesis (マウス多段階肝発癌過程における初期変化としての Stat3セリン727リン酸化) に関する研究</p> <p>共 著 者</p> <p>田中 宏樹、橋本 典和、山本 雅大、玉川 進、吉江 真澄、 徳差 良彦、柳沼 裕二、小川 勝洋</p> <p>未 公 表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>Stat3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) は細胞増殖、細胞生存、免疫機能など多岐にわたる生理機能に関わる転写因子である。Stat3は不活性型として細胞質に局在するが、さまざまなサイトカイン、増殖因子の作用によりTyrosine 705がリン酸化されると2量体を形成して核内に移行し、転写因子として働く。さらにStat3 の活性化にはSerine 727のリン酸化も重要とされている。近年、多くのヒト癌においてStat3の恒常的活性化が見られることから発癌との関連が注目されている。一方、肝発癌過程では最初に周囲の正常肝細胞に対して優位な増殖能を持つ前癌肝細胞が生じ、これらが増殖して前癌病変を形成し、さらに多段階的に肝癌に進展する。前癌肝細胞は発生の初期から正常肝細胞と異なる特異な遺伝子発現を示すが、それらの遺伝子の中にはStat3の転写標的となる癌関連遺伝子が多数含まれる。本研究では、マウス肝化学発癌モデルを用いて肝発癌過程におけるStat3の活性化を検討し、さらにマウス肝癌細胞を用いてStat3活性のメカニズムおよびその抑制の影響を検討した。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>1) 材料 2週齢雄B6C3F1マウスにDEN (5 µg/g体重) を1回腹腔内投与し、5-15ヶ月後に屠殺して肝腫瘍組織を採材した。核出した腫瘍は一部を用いて組織学的にAdenoma、肝癌に分類し、他の部分は液体窒素にて凍結後、-80℃に保存した。また、一部の肝腫瘍組織についてはホルマリン固定後、組織標本を作製した。</p>			

- 2) 細胞および培養法 マウス肝腫瘍細胞株 (HCC3、HCC8) をWilliams' E液にて培養し、10% FBS、IL-6により細胞内シグナルを活性化した。また、さまざまな阻害剤を用いてStat3活性化に関わる細胞内シグナルを解析した。
- 3) ウエスタンブロット法 蛋白を8-13% SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動したのち、PVDF膜へ転写した。各種の1次抗体で処理後、2次抗体処理、ECL plus発光を行い、LAS-3000にて特異的バンドを検出した。
- 4) 免疫沈降 肝癌細胞株から調製した蛋白を用いて抗Ser727リン酸化Stat3抗体で免疫沈降し、ウエスタンブロット法によりNFκB p65とリン酸化Stat3との結合を検討した。
- 5) 免疫組織化学 組織切片を脱パラフィン後、0.1% NP-40添加0.1Mクエン酸バッファーでオートクレーブ処理を行い、抗Stat3抗体にて処理した後、CSA II キットを用いて反応を検出した。
- 6) 細胞蛍光染色 細胞をコラーゲンコート処理カバースリップ上で培養し、80%メタノール固定、ブロックした後、抗Stat3、抗NFκB p65抗体で処理し、蛍光標識2次抗体処理、DAPI染色後、蛍光観察した。
- 7) Real Time RT-PCR SepazolにてRNAを抽出し、Oligo dTプライマー、M-MLV逆転写酵素によりcDNAを合成した。特異的プライマー、SYBR green qPCR mixを使用し、LightCyclerにてreal time PCRを行った。それぞれのmRNAはGAPDHを内因対照とし定量した。
- 8) 細胞数測定 6穴プレートへ 10^5 個の細胞を播種し、24、48、72、96時間後に回収してヘモサイトメーターを用いて細胞数を測定した。
- 9) Stat3ノックダウン Stat3 siRNAベクターをリポフェクション法にてHCC3、HCC8細胞へ導入し、Hygromycin Bで選択することによりStat3 knockdown細胞株を樹立した。また、陰性対照としてGFP siRNA導入細胞を作製した。
- 10) フローサイトメトリー 細胞をtrypsin/NP-40添加クエン酸バッファーで裸核化し、trypsin inhibitor、RNase Aを添加後、PIでDNA染色し、核あたりのPI量をフローサイトメーターで計測した。データはModifitソフトウェアにて解析した。
- 11) 造腫瘍性評価 HCC3親株、GFP siRNA導入株、Stat3 siRNA導入株をそれぞれ 2×10^6 個B6C3F1マウスの腹部皮下へ移植し、ノギスを用いて経皮的に腫瘍径を計測して腫瘍体積を算出した。
- 12) 統計解析 Student t検定にて解析し、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

成 績

- 1) 肝発癌過程におけるStat3の活性化 ウエスタンブロットでは、total Stat3の発現量は肝発癌過程で大きく変化しないが、正常肝組織と比較してAdenomaや肝癌 (HCC) ではStat3 Ser727のリン酸化が強く見られ、内因性のdominant negative formとされているStat3βの発現も低下していた。さらに肝癌ではStat3 Tyr705のリン酸化も認められた。また、免疫染色では、Stat3は正常肝細胞では細胞質にのみ陽性であったが、foci、Adenomaでは細胞質に加えて核にも陽性となり、さらにHCCでは核の染色が増強して細胞質の染色が低下していた。

2) Stat3転写標的遺伝子の発現 Stat3の転写標的でかつ肝癌細胞の増殖に関連するcyclin D1、c-myc、cdc25AについてmRNAを定量した結果、いずれの因子もStat3の活性化と相関して段階的な転写亢進がみられた。また、ウェスタンブロットングではそれぞれの蛋白の発現も段階的に亢進していることが確認された。

3) マウス肝癌細胞におけるStat3リン酸化 肝癌細胞(HCC8、HCC3)を血清非添加で24時間培養したところ、Stat3のリン酸化はHCC8ではほとんど認められず、HCC3でも弱く認める程度であった。IL-6処理では、両細胞株ともTyr705のリン酸化が強く誘導されたが、Ser727のリン酸化は強く影響されなかった。一方、10% FBS存在下ではSer727が強くリン酸化されたが、Tyr705のリン酸化は強く影響されなかった。また、IL-6単独処理では両細胞とも細胞増殖は誘導されなかったが、10% FBS存在下では活発な細胞増殖が認められた。なお、10% FBS、IL-6の同時処理では、Tyr705、Ser727がともに強くリン酸化され、10% FBS単独よりも高い増殖活性が見られた。

4) Stat3リン酸化、核内移行、細胞増殖に関わるシグナル伝達経路 10% FBS、IL-6を同時添加した条件で、Stat3 Tyr705、Ser727リン酸化、核内移行および細胞増殖活性化に関わる細胞内シグナルを検討した。JAK kinase阻害ではTyr705リン酸化は選択的に抑制されたが、核内移行および増殖活性には変化は見られなかった。一方、MAP kinase阻害ではERKとSer727のリン酸化が抑制され、また、核内移行及び細胞増殖が強く抑制された。さらに、PI3 kinaseの阻害によって細胞増殖は非常に強く抑制されたが、Stat3のリン酸化および核内移行には影響が見られなかった。以上よりJAK経路はTyr705のリン酸化には関わっているが、核内移行および増殖活性化には関わっていないこと、MAPK経路はSer727リン酸化、核内移行、増殖活性化のいずれにも関わっていること、さらにPI3K-Akt経路は増殖活性化には関わっているが、Stat3リン酸化、核内移行には関わっていないことが明らかになった。

5) Stat3とNFκB p65との結合 HCC8細胞を用いて蛍光2重染色法によりStat3とNFκB p65の局在を検討したところ、血清非添加の条件下ではStat3、NFκB p65ともに細胞質に局在し、10% FBS添加により両者とも核内へ移行した。しかし、この現象はIL-6処理では観察されなかった。10% FBSとともにMAP kinase阻害剤を加えたところ、Stat3、NFκB p65ともに核内移行が強く阻害されたが、PI3 kinase阻害剤ではその効果は見られなかった。また、HCC3株を用いた免疫沈降ではSer727リン酸化Stat3はNFκB p65と結合していることが証明された。

6) Stat3発現抑制による効果 HCC8細胞由来のStat3 knockdownクローンでは、親株に比較して10% FBS存在下では増殖活性に変化が認められなかったが、無血清条件下では急激に細胞数が低下した。このときフローサイトメトリーによる解析ではsub-G1細胞が増加し、アポトーシスに陥ることが明らかになった。また、高い増殖性を持つHCC3細胞に由来するknockdownクローンでは、10% FBS存在下での増殖活性も強く低下しており、また無血清下では著しく細胞数が減少した。

7) Stat3発現抑制の造腫瘍性に及ぼす効果 造腫瘍性をもつHCC3細胞およびGFP siRNA、Stat3 siRNA導入細胞をマウス皮下組織に移植したところ、親株、対照株では腫瘍は著しく増大したが、Stat3 siRNA導入株では腫瘍は増大せず、内部の広範な壊死と周囲組織に高度の炎症反応を認めた。

考 案

肝発癌過程では、初期段階からStat3のSer727リン酸化、核局在およびdominant negative formとされるStat3 β の発現低下が認められ、肝癌へ進展するとさらにTyr705のリン酸化が加わり、核局在も増強した。これらと比例してStat3転写標的であるcyclin D1、c-myc、cdc25A mRNA、蛋白の発現がともに亢進したことから、肝発癌過程では段階的にStat3が活性化するものと考えられた。

マウス肝癌細胞株を用いてStat3リン酸化を検討したところ、Stat3ダイマー形成に重要とされるTyr705のリン酸化はIL-6によって誘導され、転写活性に重要とされるSer727のリン酸化は血清処理によってほぼ選択的に誘導された。また、Stat3の核内移行については血清では誘導されたが、IL-6では誘導されなかった。一方、血清では細胞増殖が誘導されたのに対してIL-6単独では誘導されなかった。したがって、血清ではStat活性化と細胞増殖が相関するが、IL-6ではTyr705リン酸化が誘導されるにもかかわらず核内移行が起こらず、単独では増殖因子にはならないことが明らかになった。しかし、血清とIL-6で同時に処理した場合には、血清単独よりも増殖活性がさらに上昇したことから、IL-6は血清存在下では他の因子と共役して増殖因子となるものと考えられた。

血清、IL-6同時に処理した条件下で阻害剤を用いた結果から、JAK kinaseはTyr705リン酸化に関わっているが、細胞増殖には関わっていないことが明らかになった。これに対してMAPK経路はSer727リン酸化に関わっており、MAPK経路を抑制するとStat3の核内移行と増殖能も同時に抑制された。一方、PI3K-Akt経路を抑制した場合には増殖能は抑制されたが、Stat3リン酸化および核内移行には影響は見られなかった。したがって、Stat3の活性化にはMAPK経路が最も強く関わっているものと推察された。

これまでの報告ではStat3のダイマー形成、核移行にはTyr705のリン酸化が重要とされてきた。しかし、IL-6ではTyr705が強くリン酸化されるにもかかわらずStat3の核移行は見られず、また血清刺激ではTyr705がリン酸化しないにもかかわらず、核移行が誘導された。最近、NF κ BはStat3の共役因子となることが報告されていることからNF κ B p65について検討したところ、血清刺激下でSer727リン酸化Stat3はNF κ B p65と結合して核内移行することが明らかになり、両者が共役しているものと思われた。

さらにStat3の機能を明らかにするためにStat3 siRNAを用いて肝癌細胞でStat3をknockdownしたところ、特に無血清下ではアポトーシスに陥り、急激に細胞数が低下した。このことからStat3は肝癌細胞の増殖のみではなく、生存にも重要であることが明らかとなった。また、Stat3 knockdown細胞を皮下移植したところ、腫瘍は増大することができず、内部の広範な壊死と周囲の高度の炎症反応が認められた。このことは、生体内ではStat3は肝癌細胞の増殖、生存に

加えて、免疫寛容や血管新生など腫瘍組織を維持する上で重要な働きをする可能性を示唆する。以上より Stat3は肝癌治療における新たな分子標的となるものと思われる。

結 論

Stat3は肝発癌過程で段階的に活性化し、肝癌細胞の増殖、生存や造腫瘍性に関与する。

引 用 文 献

1. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19(1), 2474-2488, 2000
2. Yang UJ, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFκB. *Genes Dev* 21(11), 1396-1408, 2007

参 考 論 文

1. Honmo S, Ozaki A, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tanaka H, Yoshie M, Tamakawa S, Tokusashi Y, Yaginuma Y, Ogawa K. Low p38 MAPK and JNK activation in cultured hepatocytes of DRH rat; a highly resistant to hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog* 46(9), 758-765, 2007.
2. Imai K, Yamamoto M, Tanaka H, Hashimoto N, Miyakoshi M, Honmou S, Yoshie M, Tamakawa S, Yaginuma Y, Kasai S, Ogawa K. Low selection of preneoplastic hepatocytes after treatment with the 2-acetylaminofluorene diet-partial hepatectomy regimen in the liver of hepatocarcinogenesis-resistant DRH strain rats. *Oncol Rep* 17(1), 55-60, 2007
3. Tanaka H, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tamakawa S, Yoshie M, Tokusashi Y, Yokoyama K, Yaginuma Y, Ogawa K. Hypoxia-independent overexpression of HIF-1α as an early change in mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 66(23), 11263-11270, 2006
4. Xia Y, Zhang B, Inagaki M, Arikura J, Miyakoshi M, Yoshie M, Ogawa K, Kasai S. F344 rat liver nonparenchymal cell transplantation can increase the number of albumin-positive hepatocytes in the liver following hematopoietic reconstitution in irradiated analbuminemic rats. *Eur Surg Res* 38(6), 533-539, 2006
5. Imamura E, Yamamoto M, Miyakoshi M, Honmo S, Ozaki A, Yoshie M, Tamakawa S, Yaginuma Y, Kasai S, Ogawa K. Different growth capacity between infant and adult mouse hepatocytes in vitro correlates to the cyclin D1 level without relation to oxidative DNA damage. *Liver Int* 25(5), 1036-1043, 2005

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	宮腰 昌明
<p>審査委員長 高 後 裕 ㊟</p> <p>審査委員 谷 口 隆 信 ㊟</p> <p>審査委員 小 川 勝 洋 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Stat 3 Serine727 Phosphorylation is an Early Change in Multi-Step Mouse Hepatocarcinogenesis (マウス多段階肝発癌過程における初期変化としての Stat3セリン727リン酸化に関する研究)</p>			
<p>Stat3(signal transducer and activator of transcription factor 3)は、細胞増殖、細胞生存、免疫機能などに関わる転写因子であるとともに、多くのヒト癌において Stat 3 の恒常的発現が報告され、発癌との関連が注目されている。Stat 3 には Ser705 と Ser727 の2つのリン酸化部位が存在しており、とくに Ser705 のリン酸化とその後の2量体形成が核内以降と転写活性の亢進に重要とされてきた。本研究は、マウス肝化学発癌モデルを用いて、肝癌発癌過程における Stat3 の活性化機構とその抑制の影響を検討したものである。</p> <p>実験には2週齢雄 B6C3F1 マウスに diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内に1回投与し、5-10ヶ月後に出現した腺腫、癌部を採取、Stat3 と関連標的遺伝子発現を検索した。さらに DEN 発癌系で樹立した HCC8 および HCC3 細胞を用いて IL-6 および血清刺激による Stat3 リン酸化、核内以降、細胞増殖に関わるシグナル伝達経路、Stat3 と NFκBp65 との結合、Stat3 ノックダウンクローンでの細胞増殖能評価を行うとともに、Stat3siRNA 導入細胞のマウス皮下での増殖を確認した。</p>			

その結果以下の成績が得られた。

- ① ウェスタンブロットでは、正常肝組織にくらべ腺腫、癌部で Stat3Ser727 のリン酸化が強くみられ、Ser705 では癌部でリン酸化がみられた。免疫染色では、癌部の核での Stat3 の染色が増強していた。
- ② Stat3 の標的遺伝子の cyclinD1, c-myc, cdc25AmRNA, 蛋白発現は亢進した。
- ③ IL-6 または血清刺激で Stat3 のリン酸化部位を検討したところ、IL-6 では Tyr705, 血清では Ser727 がリン酸化されたが、IL-6 処理では細胞増殖活性は認められなかった。
- ④ 血清、IL-6 を同時添加した条件で、阻害剤を用いたところ、JAK 経路では Ser705 が、MAPK 経路では Ser727 のリン酸化に関わり、後者で Stat3 の核内移行、細胞増殖が強く抑制された。
- ⑤ HCC3 株を用いた免疫沈降で Ser727 リン酸化 Stat3 は NFkBp65 と結合していた。
- ⑥ Stat3 ノックダウンクローンは、無血清培養で急激に細胞数を低下、アポトーシスがみられた。また、造腫瘍性をもつ HCC3 細胞に Stat3siRNA を導入したところ、腫瘍の広汎な壊死と周囲組織の高度の炎症反応が見られた。

本研究は、マウス発癌剤誘発性肝癌において細胞内情報伝達分子の1つである Stat3 に注目し、そのリン酸化状態と肝癌発生段階との関連を検討したものである。この中で、サイトカイン刺激との関連で知られていた Ser707 のリン酸化は細胞増殖に必須のものではなく、むしろ Ser727 のリン酸化が深く関わっていることを指摘したもので興味ある新知見である。また、Stat3 をノックダウンすることにより肝癌細胞の増殖を *in vivo* においても抑制できることを示し、これは肝癌治療の標的として Stat3 が有望である可能性を示すものと考えられた。論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。