

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591305
 研究課題名（和文） 悪性黒色腫細胞の恒常的 IL-8 産生における STAT3 の役割及びその活性制御機構
 研究課題名（英文） Role and regulation of STAT3 in constitutive production of IL-8 in malignant melanoma cells
 研究代表者
 岡 昌宏 (OKA MASAHIRO)
 神戸大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：30252761

研究成果の概要：

悪性黒色腫細胞において、STAT3 は IL-8 遺伝子のプロモーター領域の-245 to -237 bp に存在する STAT3 結合 sequence TTCACCAA に結合することにより、IL-8 発現を gene transcription レベルで促進することができる可能性を示した。悪性黒色腫細胞では恒常的に STAT3 が活性化されているため、上記メカニズムで IL-8 発現が恒常的に起こっていると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：色素細胞学

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫細胞は多種のサイトカイン・増殖因子を恒常的に産生し、これらは黒色腫の癌化進展過程に影響を及ぼすことが明らかになっているが、産生されるサイトカイン・増殖因子の種類は細胞によって異なる (J. Invest. Dermatol. 100 (Suppl 2),

196S-203S, 1993; Semin. Oncol. 23, 673-681, 1996)。Interleukin-8 (IL-8) は、ほとんどすべての黒色腫細胞株および黒色腫患者組織から産生されることが明らかとなっているサイトカインで、その普遍的発現から黒色腫の病態における重要性が推測され、私共を含めた研究者により、黒色腫細胞の増殖や転移に重要な役割を担っていることが明らか

にされている (Cancer Res. 54, 3242-3247, 1994; Cancer Res. 55, 3669-3674, 1995; Int. J. Cancer 103, 335-343, 2003)。よって、IL-8 の産生制御機構の解明は悪性黒色腫の治療戦略上重要な課題である。しかしながら、黒色腫細胞の恒常的 IL-8 産生機序についての解析は、Fidler らのグループが NF- κ B の関与を指摘した論文 (Cytokines Cellular Molecular Therapy 6, 9-17, 2000) が 1 報存在するのみである。彼等は NF- κ B が黒色腫細胞の恒常的 IL-8 産生を転写レベルで制御することを示しているが、彼等の報告以後、一般的に IL-8 の転写には NF- κ B 以外に別の転写因子が同時に必要であることが明らかにされていることから、黒色腫細胞における IL-8 の転写因子解析としては彼等の検討のみでは不十分である。

2. 研究の目的

私共は種々の悪性度由来のヒト黒色腫細胞株を用いてこれら細胞株の IL-8 産生機序を検討中に、転写因子の一つである signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の活性化程度と IL-8 産生能が非常によく相関することを見出した。そこで、黒色腫細胞において STAT3 活性化は何らかの機序で恒常的 IL-8 産生を誘導するという仮説をたて、本研究においてはこの仮説を検証することを目的とする。一方私共は従来、腫瘍プロモータ - 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) が黒色腫細胞に及ぼす種々の作用について検討してきた (Biochem. Biophys. Res. Commun. 294, 1109-1113, 2002; FEBS Letters 554, 179-183, 2003; J. Biol. Chem. 279, 27774-27780, 2004) が、最近 TPA が黒色腫細胞の STAT3 活性化を STAT3 分子のチロ

シン脱リン酸化により抑制することを見出し、黒色腫細胞内の STAT3 活性が、TPA で活性化されるチロシンホスファターゼにより調節されうる可能性を考えた。先に述べた STAT3 による IL-8 産生制御の可能性と、TPA の細胞内の主要ターゲットは protein kinase C (PKC) と考えられていることを合わせ、私共は現在のところ、TPA \rightarrow PKC 活性化 \rightarrow STAT3 脱リン酸化酵素 (チロシンホスファターゼ) 活性化 \rightarrow STAT3 脱リン酸化 (=STAT3 活性抑制) \rightarrow IL-8 産生抑制という図式を想定している。本研究では、この仮説の妥当性も検討する。

3. 研究の方法

(1) IL-8 が STAT3 により制御されている可能性の検討

黒色腫細胞中の STAT3 の活性化程度と IL-8 産生能が非常によく相関するという知見をもとに、黒色腫細胞内の STAT3 活性を人為的に変化させた場合の IL-8 産生変動解析から、IL-8 産生が STAT3 により制御されているか否かを検討する。IL-8 産生が STAT3 により制御されていることが確認された場合、その制御が転写レベルで行われているかどうかを、IL-8 遺伝子について luciferase アッセイを行い検討する。

(2) TPA による STAT3 脱リン酸化機序の検討および STAT3 脱リン酸化チロシンホスファターゼの同定

私共が見出した TPA による STAT3 脱リン酸化の機序として次の 2 つが考えられる。

(A) TPA により活性化されたチロシンホスファターゼが STAT3 の脱リン酸化を起こす。

(B) 恒常的に STAT3 のリン酸化をおこなっているチロシンキナーゼが TPA により活性を阻害される。

(A)については、チロシンホスファターゼ阻害剤であるNa3V04存在の有無で、黒色腫細胞におけるTPAによるSTAT3脱リン酸化に変化がみられるかどうかで検討する。(A)の可能性が示された場合、種々のチロシンホスファターゼの発現をノックダウン法で抑えた細胞でのTPAによるSTAT3脱リン酸化の検討から、STAT3脱リン酸化チロシンホスファターゼの同定をめざす。また、TPAによるSTAT3脱リン酸化チロシンホスファターゼの活性化へのPKCの関与をPKC阻害剤およびPKCアデノウイルスベクターを用いた過剰発現の系を用いて検討する。(B)については、現在までのところ恒常的にSTAT3のリン酸化をおこなっている唯一の候補として挙げられているc-Src活性に着目し、c-Src活性がTPAにより阻害されるかどうかで判定する。

(3) TPAがIL-8産生におよぼす影響の解析

IL-8産生がSTAT3により制御されており、かつ、STAT3がTPAにより脱リン酸化をうけその活性が低下するのであれば、TPAは黒色腫細胞のIL-8産生を抑制するはずである。この可能性を黒色腫細胞をTPA処理したあの上清中のIL-8をELISAで定量することにより検討する。

4. 研究成果

(1) IL-8がSTAT3により制御されている可能性

siRNAによりSTAT3発現を減少させると黒色腫細胞のIL-8産生は抑制されたため、IL-8がSTAT3により制御されることが明らかとなった。さらに、その制御が転写レベルで行われているかどうかを、IL-8遺伝子についてluciferaseアッセイを行い検討したところ、STAT3はIL-8遺伝子のプロモーター領域の

-245 to -237 bpに存在するSTAT3結合sequence TTCACCAAに結合することにより、IL-8発現をgene transcriptionレベルで促進することができることが示された。

(2) TPAによるSTAT3脱リン酸化機序の検討

チロシンホスファターゼ阻害剤であるNa3V04存在の有無で、黒色腫細胞におけるTPAによるSTAT3脱リン酸化に変化がみられるかどうかをみたところ、Na3V04存在下ではTPAによるSTAT3脱リン酸化はほぼ完全に抑制された。この結果より、TPAによるSTAT3脱リン酸化にはチロシンホスファターゼが関与していることが明らかとなった。TPAの細胞内ターゲットはPKCであることからTPAによるSTAT3脱リン酸化チロシンホスファターゼの活性化へのPKCの関与をPKC阻害剤を用いて検討したところ、PKC阻害剤存在下ではTPAによるSTAT3脱リン酸化はほぼ完全に抑制された。以上より、TPAによるSTAT3脱リン酸化はPKCで活性化される何らかのチロシンホスファターゼによるものと考えられた。

c-Src阻害剤は黒色腫細胞のSTAT3活性化を部分的に阻害したため、c-SrcはSTAT3を正に制御していることが確認された。しかしながら、TPAはc-Src活性に影響を及ぼさなかったため、TPAによるSTAT3脱リン酸化にはc-Srcは無関係であると考えられた。

(3) TPAがIL-8産生におよぼす影響の解析

TPA処理により黒色腫細胞のSTAT3活性は低下したが、IL-8産生は予想と逆に増加した。これはIL-8産生がSTAT3以外の因子でも調節されており、これらの因子がTPA処理により影響を受けてIL-8産生を低下させたものと考えられた。

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 2 件)

Oka, M., Kikkawa, U., Nishigori, C.
Protein kinase C- β II represses
hepatocyte growth factor-induced invasion
by preventing the association of adapter
protein Gab1 and phosphatidylinositol
3-kinase in melanoma cells..

J. Invest. Dermatol. 128(1):188-195
(2008) 査読有り

Yoshimoto, T., Morishima, N., Mizoguchi,
I., Shimizu, M., Nagai, H., Oniki, S., Oka,
M. Nishigori, C., Mizuguchi, J
Anti-proliferative activity of IL-27 on
melanoma.

J. Immunol. 180(10):6527-6535 (2008)
査読有り

[学会発表] (計 4 件)

1. 岡 昌宏 第 67 回日本癌学会 (平成 20 年
10 月 28-30 日): Enhancement of ultraviolet
B-induced skin tumor development in
phospholipase C β knockout mice is
associated with decreased cell death

2. 岡 昌宏 34th Meeting of the American
Society for Photobiology (平成 20 年 6 月
20-25 日): Enhancement of UVB-induced skin
tumor development in *phospholipase C* β
knockout mice is associated with decreased
cell death

3. 岡 昌宏 第 5 回国際研究皮膚科学会 (平
成 20 年 5 月 14-17 日): Phospholipase C β
plays a crucial role in ultraviolet
B-induced skin inflammation

4. 岡 昌宏 XXth International Pigment Cell
Conference (平成 20 年 5 月 7-12 日) TPA
inhibits melanoma growth by inactivation
of STAT3 through PKC-activated tyrosine
phosphatase(s)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 昌宏 (OKA MASAHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 30252761

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し