

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390017

研究課題名 (和文) 疾患関連 IL-6/STAT3 シグナルの活性化とその制御に関する研究

研究課題名 (英文) Activation and regulation of the disease-related IL-6/STAT3 signaling

研究代表者

松田 正 (MATSUDA TADASHI)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：20212219

研究成果の概要 (和文)：

生体システムの恒常性を維持するためには液性の調節因子であるサイトカインのシグナル伝達系の破綻は様々な病気としてみとめられる。サイトカインシグナル伝達分子 STAT3 の活性化ならびに制御機構の解明は抗癌剤や自己免疫疾患の治療薬開発に非常に重要であり、STAT3 活性化の阻害剤の開発は疾患治療薬の開発へと直結するものであり、本申請研究においては STAT3 とその結合蛋白、特に STAT3 蛋白の核局在、核内貯留に関与する分子群との相互作用の分子機構の解析を中心に、STAT3 活性化機構の解明とその制御法の開発を目的として行う。

研究成果の概要 (英文)：

Since we cloned interleukin-6 (IL-6) as B cell stimulatory factor 2 in 1986, IL-6 has been reported to influence cell proliferation, differentiation, and survival as well as mature cell functions. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is a key molecule to mediate IL-6-induced cellular events. Indeed, STAT3 is activated in many tumor tissues, and the dimmer of STAT3 promotes cellular transformation, indicating that STAT3 itself can act as a proto-oncogene. In addition to oncogenesis, IL-6/STAT3 axis influences host immune systems. For example, IL-6/STAT3 axis is involved in the Toll-like receptor signaling pathways, the development and maturation of dendritic cells, and the differentiation of Th17 T-cell subset. These facts are likely to suggest that manipulation of IL-6/STAT3 signals could be suitable target for a variety of disease such as cancer and autoimmune diseases. We have energetically examined regulatory mechanisms of IL-6/STAT3-mediated signal transduction for the development of novel therapeutic strategies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：免疫、がん、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

生体システムの恒常性を維持するためには液性の調節因子であるサイトカインの存在が不可欠であり、そのサイトカインのシグナル伝達系はレセプターに会合する Jak キナーゼと、その主要な基質として転写因子 STAT により構成される。SH2 ドメインを有する STAT は Jak キナーゼによりリン酸化、活性化され、2 量体を形成すると核に移行し、標的遺伝子の転写を活性化することが明らかになり、Jak、STAT 両蛋白の存在意義が大きくクローズアップされる様になった。なかでも種々の細胞の増殖分化に関与する IL-6 ファミリーサイトカインの作用は主に STAT3 によるものであることが明らかにされている。STAT3 の活性化は免疫系細胞の癌化にも非常に重要とされており、実際、ミエローマや種々の癌細胞において恒常的な活性化型 STAT3 の存在が報告されている。さらに興味深いことに二量体を形成する活性化型 STAT3 によって直接細胞の癌化が誘導されることが明らかになり、STAT3 自身がオンコプロテインとしても注目されている。また、最近 IL-6/STAT3 シグナル伝達系の活性化が免疫系疾患の発症に関与するヘルパーT 細胞群 Th17 細胞や、病気の発症を制御する T 細胞群 (Treg) の産生において非常に重要なことが明らかにされている。

我々は種々のサイトカインシグナル伝達系の簡便なモデルシステムを再構築することに成功し、その再構築系を用いることに Jak、STAT とその結合蛋白の機能的な相互作用を明らかにすることが可能としている。

また、我々は STAT3 の機能を制御する蛋白の同定並びのその機能解析が、癌や自己免疫疾患の治療薬、診断薬開発の手掛かりとなるものと考え研究を進めてきており、STAT3 に特異的に結合する多くの新規結合分子を Two-hybrid システムによりクローニングし、それらの機能について報告してきた。

2. 研究の目的

上記の点からもサイトカインシグナル伝達分子 STAT3 の活性化ならびに制御機構の解明は抗癌剤や自己免疫疾患の開発に非常に重要であり、STAT3 活性化の阻害剤の開発は疾患治療薬の開発へと直結するものであり、本申請研究においては STAT3 とその結合蛋白、特に STAT3 蛋白の核局在、核内貯留に関与する分子群との相互作用の分子機構の解析を中心に、STAT3 活性化機構の解明とその制御法の開発を目的として行う。

3. 研究の方法

我々が Two-hybrid システムによりクローニングしたサイトカインシグナル伝達分子 STAT3 結合蛋白のうち一つは STAT3 の核内貯留に関与する蛋白であることも明らかとなっている。本申請研究においては我々が新規に同定した STAT3 核内貯留因子を含めた STAT3 結合蛋白群の機能解明に向けて以下の研究を進めた。

(1) STAT3 核内貯留因子結合蛋白質の同定と機能解析

我々は現在までに STAT3 の核貯留に関与する新規 STAT3 核貯留因子 (KAP1 や Y14) を

同定し、STAT3 と結合し、STAT3 の核貯留に影響することを観察しており、STAT3 核貯留複合体の全貌を明らかにするため STAT3 核貯留因子をベイトにした酵母 two-hybrid 法にて結合蛋白を同定し、機能解析を行う。また同時に、抗 STAT3 核貯留因子抗体を用いて免疫沈降法による新たな結合蛋白群の同定を進めた。また、同時に他の新規 STAT3 結合蛋白 (STAP-2、BRK 等) と STAT3 との機能的相互作用の解析も進めた。

(2) STAT3 結合蛋白ノックアウトのフェノタイプ解析による機能解明

新規 STAT3 蛋白の生体内での役割を明らかにするために STAT3 結合蛋白 (特に STAP-2) の遺伝子ノックアウト (KO) マウスのフェノタイプ解析を行い、新たな生理的役割を明らかにした。

4. 研究成果

我々はすでに STAT3 結合蛋白として ZIPK、BRK や STAT3 核内制御蛋白 Daxx、STAT3 核内貯留制御因子 BART を同定しており、本年度はこれらの蛋白に加え、新たに同定した STAT3 結合蛋白 KAP1 や Y14 の機能解析を行った。特にこれら分子の STAT3 の活性化機構への関与を STAT3 のリン酸化、2量体化、核移行、核排出、DNA 結合能、転写活性化等の種々の STAT3 活性化ステップにて詳細に検討し、以下に記す新たな相互作用の分子メカニズムを明らかにした。さらに STAT3 結合蛋白の遺伝子ノックアウトマウスのフェノタイプ解析においても新たな知見を得た。

(1) STAT3 リン酸化酵素 ZIPK 結合蛋白の同定と機能解析

核内における STAT3-ZIPK 複合体の生理的意義を明らかにするため、ZIPK をベイトにした酵母 two-hybrid 法にて新規結合

蛋白 NLK を同定し、両者の機能的相互作用を明らかにした。

(2) STAT3 核内制御蛋白の機能解析

核蛋白 KAP1 が STAT3 と結合しその機能を制御することを見出した。両者の機能的相互作用を明らかにし、KAP1 を介した STAT3 と NF- κ B のクロストークを明らかにした。

(3) STAT3 転写制御因子の機能解析

STAT3 の核以降に關与する新規 STAT3 結合蛋白 Y14 と複合体を形成する MAGOH が STAT3 転写活性化を制御することを明らかにした。さらに Daxx が STAT3 依存的な細胞増殖に抑制的に作用することも明らかにした。

(4) 乳癌細胞増殖における STAT3/BRK の機能解析

乳癌特異的チロシンキナーゼ BRK による STAT3 の活性化には STAT3 結合蛋白 STAP-2 の細胞膜指向性を有するとされる PH ドメインが必要で、BRK の融合蛋白 PH-BRK が強力に STAT3 の活性化を誘導することを、明らかにした

(5) STAT3 結合蛋白 STAP-2 KO マウスフェノタイプ解析

我々が STAT3 活性化を正に制御する STAT3 結合蛋白として同定した STAP-2 の T 細胞における新たな機能を明らかにした。

STAP-2 KO マウスより分離した T 細胞では、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンへの接着能が野生型マウス T 細胞と比較し増強し、STAP-2 KO T 細胞では、細胞接着に重要なキナーゼ Fak タンパク量が顕著に増加していることを明らかにした。また、SDF-1 α (CXCL12) や CCL19 といったケモカインの刺激による T 細胞の遊走能が STAP-2 KO により減弱し、STAP-2 により GEF の一つ Vav1 の SDF-1 α 刺激によるリン酸化と、small GTPase である Rac1 や Cdc42 の活性化が亢進される

ことを明らかにした。これらの結果から STAP-2はT細胞の遊走を制御する新規分子であることが示された。

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19件)

査読有りの英文原著論文のみ記載

- 1) Muromoto, R., M. Kuroda, S. Togi, Y. Sekine, A. Nanbo, K. Shimoda, K. Oritani and T. Matsuda Functional involvement of Daxx in gp130-mediated cell growth and survival in BaF3 cells. **Eur. J. Immunol.** 40: 3570-3580, 2010
- 2) Ikeda, O., Y. Sekine, A. Mizushima, M. Nakasuji, Y. Miyasaka, C. Yamamoto, R. Muromoto, A. Nanbo, K. Oritani, A. Yoshimura and T. Matsuda Interactions of STAP-2 with Brk and STAT3 participate in cell growth of human breast cancer cells. **J. Biol. Chem.** 285: 38093-38103, 2010
- 3) Muromoto, R., O. Ikeda, K. Okabe, S. Togi, S. Kamitani, M. Fujimuro, S. Harada, K. Oritani and T. Matsuda Epstein-Barr virus-derived EBNA2 regulates STAT3 activation **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 378: 439-443, 2009
- 4) Togi, S., S. Kamitani, S. Kawakami, O. Ikeda, R. Muromoto, A. Nanbo, and T. Matsuda HDAC3 influences phosphorylation of STAT3 at serine 727 by interacting with PP2A **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 379: 616-620, 2009
- 5) Muromoto R., N. Taira, O. Ikeda, K. Shiga, S. Kamitani, S. Togi, S. Kawakami, Y. Sekine, A. Nanbo, K. Oritani, and T. Matsuda The exon-junction complex proteins, Y14 and MAGOH regulate STAT3 activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 382: 63-68, 2009
- 6) Ikeda, O., S. Togi, S. Kamitani, R. Muromoto, Y. Sekine, A. Nanbo, M. Fujimuro, and T. Matsuda Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone Receptor Regulates Enhanced Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 by Epstein-Barr Virus-derived Epstein-Barr Nuclear Antigen 2 **Biol. Pharm. Bull.** 32: 1283-1285, 2009
- 7) Ikeda, O., Y. Miyasaka, Y. Sekine, A.

Mizushima, R. Muromoto, A. Nanbo, A. Yoshimura and T. Matsuda STAP-2 is phosphorylated at tyrosine-250 by Brk and modulates Brk-mediated STAT3 activation **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 384: 71-75, 2009

8) Sekine, Y., C. Yamamoto, O. Ikeda, R. Muromoto, A. Nanbo, K. Oritani, A. Yoshimura and T. Matsuda The protein content of an adaptor protein, STAP-2 is controlled by E3 ubiquitin ligase Cbl **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 384: 187-192, 2009

9) Sekine, Y., O. Ikeda, S. Tsuji, C. Yamamoto, R. Muromoto, A. Nanbo, K. Oritani, A. Yoshimura and T. Matsuda Signal-Transducing Adaptor Protein -2 Regulates Stromal Cell-Derived Factor-1 α -Induced Chemotaxis in T Cells. **J. Immunol.** 183: 7966-7974, 2009

10) Yamamoto, M., D. M. Standley, S. Takashima, H. Saiga, M. Okuyama, H. Kayama, E. Kubo, H. Ito, M. Takaura, T. Matsuda, D. Soldati-Favre, and K. Takada A single polymorphic amino acid replacement in Toxoplasma gondii ROP16 influences its direct Stat3 activation **J. Exp. Med.**, 206: 2747-2760, 2009

11) Shide, K., Shimoda, K. S., Kumano, T., Karube, K., Kameda, T., Takenaka, K., Oku, S., Abe, H., Katayose, K. S., Kubiki, Y., Kusumo, K., Hasuike, S., Tahara, Y., Nagata, K., Matsuda, T., Ohshima, K., Harada, M., and Shimoda, K. Development of Et, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F **Leukemia** 22: 87-95, 2008

12) Muromoto, R., Sekine, Y., Imoto, S., Ikeda, O., Okayama, T., Sato, N. and T. Matsuda BART is essential for nuclear retention of STAT3 **Int. Immunol.** 20: 395-403, 2008

13) Kamitani, S., Ohbayashi, N., Ikeda, O., Togi, S., Muromoto, R., Sekine, Y., Ohta, K., Ishiyama, H., and T. Matsuda KAP1 regulates type I interferon/STAT1-mediated IRF -1 gene expression **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 370: 366-370, 2008

14) Tsuruma, R., Ohbayashi, N., Kamitani, S., Ikeda, O., Sato, N., Muromoto, R., Sekine, Y., Oritani, K., and T. Matsuda Physical and functional interactions

between STAT3 and KAP1 **Oncogene** 27: 3054-3059, 2008

15) Ohbayashi, N., Kawakami, S., Muromoto, R., Togi, S., Ikeda, O., Kamitani, S., Sekine, Y., Honjoh, T., and T. Matsuda The IL-6 family of cytokines modulates STAT3 activation by desumoylation of PML through SENP1 induction **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 371: 823-828, 2008

16) Ohbayashi, N., N. Taira, S. Kawakami, S. Togi, N. Sato, O. Ikeda, S. Kamitani, R. Muromoto, Y. Sekine and T. Matsuda An RNA binding protein, Y14 interacts with and modulates STAT3 activation **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 372: 475-479, 2008

17) Ohbayashi, N., K. Okada, S. Kawakami, S. Togi, N. Sato, O. Ikeda, S. Kamitani, R. Muromoto, Y. Sekine T. Kawai, S. Akira and T. Matsuda Physical and functional interactions between ZIP kinase and UbcH5 **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 372: 708-712, 2008

18) Ikeda, O., Y. Sekine, T. Yasui, K. Oritani, K. Sugiyama, R. Muromoto, N. Ohbayashi, A. Yoshimura and T. Matsuda STAP-2 negatively regulates both canonical and non-canonical NF- κ B activation induced by Epstein-Barr virus-derived LMP1. **Mol. Cell. Biol.** 28: 5027-5042, 2008

19) Ikeda, O., Y. Sekine, R. Muromoto, N. Ohbayashi, A. Yoshimura and T. Matsuda Enhanced c-Fms/M-CSF receptor signaling and wound-healing process in bone marrow-derived macrophages of STAP-2 deficient mice **Biol. Pharm. Bull.** 31: 1790-1793, 2008

[学会発表] (計 16 件)

1. 志賀 要, 室本 竜太, 松田 正 : EJC 構成タンパク質 Y14, MAGOH による STAT3 活性の制御. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3. 28, 岡山.

2. 黒田 誠, 室本 竜太, 松田 正 : P. acnes 誘導性肉芽腫形成における Tyk2 の役割. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3. 28 岡山.

3. 関根 勇一, 松田 正 : 低分子量二重

特異性ホスファターゼ DUSP3 による STAT3 活性制御機構の解析. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3. 28, 岡山.

4. Kamitani S, Togi S, Ikeda O, Kawakami S, Sekine Y, Muromoto R, Matsuda T : TNF- α 誘発性 NF- κ B 活性化機構における核内コリプレッサー KAP1 の機能解析 /KAP1 negatively regulates TNF- α -induced NF- κ B activation. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009, 12. 3, 大阪.

5. Yamamoto C, Sekine Y, Ikeda O, Yoshimura A, Matsuda T : STAP-2 modulates activation-induced cell death by influencing caspase-8 activation. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009, 12. 3 大阪.

6. Mizushima A, Ikeda O, Miyasaka Y, Sekine Y, Yoshimura A, Matsuda T : STAP-2 regulates the Brk-mediated STAT5 activation. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009, 12. 3, 大阪.

7. Miyasaka Y, Ikeda O, Sekine Y, Mizushima A, Yoshimura A, Matsuda T : Physical and functional interactions among STAT3, STAP-2 and Brk. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009, 12. 3, 大阪.

8. 池田 収, 関根 勇一, 柿坂 道範, 松田 正 : アダプター分子 STAP-2 による M-CSF レセプターシグナル伝達系の制御. 日本薬学会第 128 年回, 2008, 3. 26, 横浜.

9. 上谷 晋也, 松田 正 : インターフェロンシグナル制御における核内コリプレッサー KAP1 の機能解析. 日本薬学会第 128 年会, 2008, 3. 26, 横浜.

10. Matsuda T, Ikeda O, Sekine Y : STAP-2 regulates integrin-mediated T-cell adhesion through protein degradation of

FAK. Experimental Biology, 2008, 47, San Diego, USA.

11. Ikeda O, Sekine Y, Kakisaka M, Yasui T, Yoshimura A, Matsuda T : STAP-2 negatively regulates both canonical and noncanonical NF- κ B activation induced by Epstein-Barr virus -derived latent membrane protein 1. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008, 12. 3, 京都.

12. Kamitani S, Muromoto R, Sekine Y, Ikeda O, Togi S, Matsuda T : KAP1 regulates type I interferon/STAT1-mediated IRF-1 gene expression. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008, 12. 3, 京都.

13. Muromoto R, Matsuda T : Daxx inhibits gp130/STAT3-mediated survival of BaF3 cells by influencing Bcl-2 expression. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008, 12. 3, 京都.

14. Kakisaka M, Sekine Y, Ikeda O, Yoshimura A, Matsuda T : STAP-2 is involved in activation-induced cell death in Jurkat T cell. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008, 12. 3, 京都.

15. Kawakami S, Muromoto R, Togi S, Ikeda O, Kamitani S, Sekine Y, Matsuda T : The IL-6 family of cytokines modulates STAT3 activation by desumoylation of PML through SENP1 induction. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008, 12. 3, 京都.

16. Taira N, Kawakami S, Togi S, Ikeda O, Kamitani S, Muromoto R, Sekine Y, Matsuda T : An RNA binding protein, Y14 interacts with and modulates STAT3 activation. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008, 12. 3, 京都.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/eisei/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 正 (MATSUDA TADASHI)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号 : 20212219

(2) 研究分担者

室本 竜太 (MUROMOTO RYUTA)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号 : 30455597

関根 勇一 (SEKINE YUICHI)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号 : 20396295

大林 典彦 (OHBAYASHI NORIHIKO) (H20)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号 : 40421979

南保 明日香 (NANBO ASUKA) (H21-H22)
北海道大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号 : 60359487

(3) 連携研究者

なし