

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年12月31日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590316

研究課題名（和文）サイトカインによる老化誘導機序の解明とがん治療応用への基礎的検討

研究課題名（英文）Mechanism of cytokine-induced cellular senescence

研究代表者

小島 裕正 (KOJIMA HIROTADA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40336772

研究成果の概要（和文）：正常二倍体細胞細胞において gp130 シグナルを活性化すると、各種老化マーカーの誘導を伴う細胞老化が認められた。gp130 刺激で産生される細胞老化誘導においては IGFBP5 が関与しその発現は gp130 シグナル系の主要なシグナル伝達分子 Stat3 に依存していた。IGFBP5 をノックダウンしたところ老化マーカーの低下が認められた。gp130 誘導性の早期細胞老化は活性化された Stat3 の下流で IGFBP5 が働き引き続き活性酸素種の産生といった老化誘導に伴うカスケードを引き起こし最終的な老化に至るものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Normal cells undergo senescence in response to various stresses, such as DNA damage and certain cytokines. One such cytokine, interleukin-6 (IL-6), a multifunctional cytokine, can act on multiple lineages of cells combination with soluble IL-6 receptor  $\alpha$  (sIL-6R $\alpha$ ) to induce cell proliferation, differentiation and even promotion of tumorigenesis. We studied the molecular mechanisms by which IL-6 and sIL-6R $\alpha$  cause premature senescence using primary human fibroblasts. Stimulation of fibroblasts cells with IL-6/sIL-6R $\alpha$  sequentially caused generation of reactive oxygen species (ROS) as early as day 1, followed by DNA damage, p53 accumulation, and finally senescence. STAT3 was required for the early and late events leading to senescence, including the early-phase increase of ROS and senescence-associated secretary phenotype occurring 4 days after IL-6/sIL-6Ra stimulation. Interestingly, Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) secreted into the supernatants was identified as the STAT3-downstream molecule responsible for the IL-6/STAT3-induced ROS generation and premature senescence. IGFBP-5 was consistently expressed from the initial phase through the entire senescence process, the profile being quite different from that of senescence-associated secretary phenotype. Thus, IL-6/sIL-6R $\alpha$  forms a senescence-inducing circuit involving the STAT3-IGFBP5 axis as a key triggering and reinforcing component.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：基礎医学・医化学一般

キーワード：サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

細胞レベルでの老化誘導は様々な要因が複雑に絡みあって引き起こされるものであるが、従来から知られていた一定の分裂回数を過ぎると誘導される分裂老化以外にも、様々なストレスによって早期に誘導されることが明らかにされてきている。一方で、様々な細胞の運命決定に関わる液性因子であるサイトカインの老化誘導における位置づけを明らかにした研究は少なく、詳細な分子機構は不明であった。サイトカインシグナル伝達分子 gp130 の主要な伝達路として知られている Stat3 はその過剰な活性化ががん化に寄与するという様々な報告があるが、がん細胞と正常細胞とはどうやらその位置づけが異なるものと考えられた。近年、老化誘導ががん化の抑制をはじめ様々な疾患に拮抗的に働くことが明らかになってきていることもあり、正常細胞における gp130 を介する情報伝達経路によって活性化される Stat3 を中心とした情報伝達系の位置づけを再考することは意義があるものと考えた。

### 2. 研究の目的

(1) 正常 2 倍体細胞におけるサイトカインシグナル伝達分子 gp130 から老化に至る機序の解明。特に Stat3 の役割、機能の発揮に働く分子の同定と機序の解明を行う。

(2) Stat3 活性制御による将来的な老化誘導系を利用したがん治療応用への基礎的検討のため、Stat3 のリン酸化修飾の変動と活性の相関機序を調べる。

### 3. 研究の方法

(1) 正常 2 倍体細胞における gp130 シグナルから老化に至る経路の詳細を明らかにするため、gp130 シグナル活性化後の老化関連ベータガラクトシダーゼ活性・活性酸素種 (ROS) の産生並びに炎症性サイトカインの変動といった各種の老化マーカーの変動を調べた。

(2) 特に Stat3 の役割を明らかにするために、劣勢抑制変異体の Stat3 発現細胞における gp130 シグナル依的な老化マーカーの変動を調べた。

(3) Stat3 下流で変動する老化関連分子の mRNA の変動をリアルタイム定量的 PCR 法によって調べた。

(4) Stat3 下流で変動が認められた老化関連分

子、特に IGFBP5 の遺伝子発現の Stat3 依存性を証明するため、劣勢抑制変異体の Stat3 発現細胞における IGFBP5 の遺伝子変動を調べた。

(5) Stat3 は、各種のサイトカイン下流で活性化されるチロシンキナーゼにより Stat3 のチロシン 705 にリン酸化修飾を受けることで、2 量体を形成し、核移行を経て標的遺伝子 DNA 上の遺伝子発現調節領域に結合し転写の活性化に働く。標的遺伝子によっては、更に STAT3 のセリン 727 リン酸化修飾が転写制御に役割を持つことから、セリン 727 の役割を Stat3 ノックダウン細胞に STAT3 を戻す再構成系を用いて検討した。

### 4. 研究成果

(1) インターロイキン-6 (IL-6), IL-11, LIF といった IL-6 ファミリーのサイトカインは、シグナル伝達性の受容体分子 gp130 を通じて複数の細胞内シグナル伝達系を活性化する。gp130 に由来するシグナルは、標的細胞の分化・増殖・死などの細胞運命の決定において重要な働きを担っている。gp130 受容体の活性化がヒト正常二倍体細胞を早期の細胞老化に導くことを明らかにした。正常二倍体細胞細胞において gp130 シグナル活性化すると、刺激 8 日目以降で、老化関連ベータガラクトシダーゼ陽性細胞の増加・活性酸素種の増加・炎症性サイトカインの増加といった各種の老化マーカーの誘導を伴う細胞老化が認められた。またこの細胞老化誘導は gp130 シグナル系における主要なシグナル伝達分子である Stat3 に依存していた。gp130 刺激で産生される細胞老化誘導性の液性因子を調べたところ、IGFBP5 の関与が示唆された。gp130 シグナル誘導性の IGFBP5 の発現は Stat3 に依存していた。IGFBP5 を RNA 干渉法でノックダウンしたところ gp130 刺激依的な老化関連ベータガラクトシダーゼの活性の上昇、活性酸素種、炎症性サイトカインの産生の減弱が認められた。これらのことより、gp130 シグナル誘導性の早期細胞老化は活性化された Stat3 の下流で IGFBP5 が働き引き続き活性酸素種の産生といった老化誘導に伴うカスケードを引き起こし最終的な老化に至っているものと考えられた。以上の知見をまとめ学会発表並びに原著論文発表を行った。

(2) Stat3 ノックダウン細胞に各種の Stat3 変異体を再構成した細胞株を作成した。それらの細胞株においてチロシンキナーゼ阻害剤存在下・非存在条件下でサイトカイン刺激を行い、経時下で Stat3 チロシン 705 のリン酸化の変動を調べた。Stat3 セリン 727 変異体 (STAT3S727A) は野生型に比べ、チロシンキナーゼ阻害後もチロシン 705 リン酸化が持続し、セリン 727 リン酸化状態がチロシン脱リン酸化酵素の活性化に影響することが明らかとなった。チロシン脱リン酸化酵素 TC45 のノックダウン並びに強制発現系を用いた結果より、TC45 がこの作用に重要であることを見いだした。Stat3 セリン 727 リン酸化は、主に TC45 による Stat3 チロシン 705 の脱リン酸化を促進することにより Stat3 活性を制御することが明らかになった。以上の知見をまとめ学会並びに論文発表を行った。

#### 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 7 件)

- ① Kojima H, Kunimoto H, Inoue T, Nakajima K. The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell Cycle*. 11:730-739. 2012, 査読有.  
doi: 10.4161/cc.11.4.19172.
- ② Wakahara R, Kunimoto H, Kojima H, Inoue A, Nakajima K. Phospho Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho Tyr705 largely through TC45. *Genes Cells*. 17: 132-145. 2012, 査読有  
doi: 10.4161/cc.11.4.19172
- ③ Li Y, Matsumori H, Nakayama Y, Osaki M, Kojima H, Kurimasa A, Ito H, Mori S, Katoh M, Oshimura M, Inoue T. SIRT2 down-regulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis. *Genes Cells*. 16:34-45. 2011 査読有  
doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01460.x.
- ④ Saitoh N, Oritani K, Saito K, Yokota T, Ichii M, Sudo T, Fujita N, Nakajima K, Okada M, Kanakura Y. Identification of functional domains and novel binding partners of STIM

proteins. *J Cell Biochem*. 112, 147-156. 2011 査読有  
doi: 10.1002/jcb.22910.

- ⑤ 中嶋弘一, 小島裕正 【サイトカインと疾患:あらたな病態モデルから治療へ】 サイトカインシグナル伝達機構 JAK-STAT の標準経路と非標準経路モデル. 医学のあゆみ, 234(5):325-330, 2010, 査読無
  - ⑥ Imanishi H, Tsuruta D, , Tateishi C, Sugawara K, Paus R, Tsuji T, Ishii M, Ikeda K, Kunimoto H, Nakajima K, Jones JC, Kobayashi H. Laminin-511, inducer of hair growth, is down-regulated and its suppressor in hair growth, laminin-332 up-regulated in chemotherapy-induced alopecia. *J Dermatol Sci*. 58:43-54, 2010 査読有  
doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.02.005.
  - ⑦ Igarashi H, Kuwahara K, Yoshida M, Xing Y, Maeda K, Nakajima K and Sakaguchi N. GANP suppresses the arginine methyltransferase PRMT5 regulating-IL-4-mediated STAT6-signaling to IgE production in B cells. *Mol Immunol*. 6:1031-41, 2009 査読有  
doi: 10.1016/j.molimm.2008.08.272.
- [学会発表] (計 4 件)
- ① Wakahara R, Kunimoto H, Kojima H, Nakajima K, Phospho-Ser727 of STAT3 shortens the duration of STAT3 activity by enhancing the dephosphorylation of pY705 through nuclear TC45. 2011 年 11 月 29 日 第 40 回日本免疫学会学術集会. (千葉市)
  - ② Kojima H, Kunimoto H, Nakajima K. gp130-Stat3 signaling induces premature cellular senescence. 2010 年 12 月 10 日, 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会合同年会 (神戸市)
  - ③ Kojima H, Kunimoto H, Nakajima K. Prolonged stimulation of gp130 leads to premature senescence of human diploid fibroblasts. 2010 年 8 月 27 日, 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (Kobe, Japan)
  - ④ Kojima H, Kunimoto H, Nakajima K. Prolonged stimulation of gp130 leads to premature senescence of human

diploid fibroblasts. 2009年12月17日, 第  
32回日本分子生物学会年会 (横浜市)

[図書] (計 1 件)

- ① Kojima H, Kunimoto H, Inoue T, Nakajima K. Aging, Cancer, and Noncancer Pathologies: Interleukin-6 Induces Premature Senescence Involving the STAT3 and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 5. ***Tumor Dormancy and Cellular Quiescence and Senescence*** in press 2013

[その他]

ホームページ;

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/immune/>.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小島 裕正 (KOJIMA HIROTADA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 40336772

### (2) 研究分担者

中嶋 弘一 (NAKAJIMA KOICHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00227787