

令和 5 年 3 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2013～2017

課題番号：25460392

研究課題名（和文）STAT3による細胞老化誘導とその後のクリアランス機構の解明

研究課題名（英文）Role of STAT3 in cytokine-induced 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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：サイトカイン情報伝達分子gp130の下流で動き、細胞老化誘導にも関わるStat3の活性制御機構解明の一環として質量分析法により新規STAT3タンパク質修飾を見いだした。この部位の変異は標的遺伝子発現に部分的に影響した。詳細機構解明のため新規STAT3修飾部位認識抗体の作成を行い、条件により使用可能な抗体が得られた。正常2倍体細胞におけるgp130-Stat3下流で機能発揮に関与する分子であるIGFBP5遺伝子の転写活性化にStat3シグナルが直接働く可能性が示唆された。更に gp130-Stat3下流で動く老化関連分子群を見だし、これらも併せて協調的に細胞老化誘導に働く可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「サイトカイン」と呼ばれる主に糖タンパクからなる生体物質は、老化、恒常性、代謝系、免疫応答、神経系などの高次機能の発揮に重要な働きをもつ物質である。またその機能の破綻ががんや自己免疫など様々な疾患に繋がることがある。疾患の機構解明や治療法の開発には細かな分子レベルでの作用機構の理解が必要とされる。本研究で見いだされたサイトカインシグナル伝達分子Stat3の修飾の意義と、細胞老化制御における機構を究端として、新たなサイトカインシグナルの機構と役割の解明並びに制御法の開発に繋がっていくと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism of gp130, a common cytokine signal transducer for the Interleukin-6 family of cytokines, and downstream Stat3 signaling in the induction of cellular senescence, we identified a new modification site on Stat3 by mass spectrometry-based proteomic analysis. Mutation at this site partially affected target gene expression. To elucidate the detailed mechanism, affinity-purified polyclonal antibodies recognizing the novel STAT3 modification site were generated and revealed it works under certain conditions. The results suggest that Stat3 signaling may act directly on transcriptional activation of the IGFBP5 gene, a molecule that exerts its function downstream of gp130-Stat3 in normal diploid cells. We found a group of senescence-associated effector molecules that were induced downstream of gp130-Stat3 signaling and revealed that they might act cooperatively in the induction of cellular senescence.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：サイトカイン 細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

老化は様々な要因が複雑に絡みあって引き起こされる。したがって機序解明には個体レベルの研究はもちろん細胞レベルでの機序解明の必要があり、両解析アプローチにより統合的に判断していく必要がある。培養細胞レベルにおいて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、がん遺伝子・がん抑制遺伝子の異常な振る舞いや、DNA 損傷などの様々なストレスによって早期に細胞老化が誘導される現象がみだされてきている。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・制御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 (CD130)の主要な伝達路として知られている signal transducer and activator of transcription 3 (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で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。Stat3 は正常細胞において老化の促進に働くことを明らかにすることができたので、将来的な制御系開発も見据え、更に詳細な Stat3 の活性化機序の解明と、Stat3 の下流のエフェクター分子の活性化に至る経路の解明が必要であると考えた。

2. 研究の目的

(1) Stat3 活性制御による老化制御系を利用した疾患治療応用への基礎的検討のため、Stat3 の活性制御に関わるような新規のタンパク質修飾を見だし修飾状況の変動と活性の相関の機序を調べる。

(2) 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を行う。特に Stat3 の機能の発揮に関連するエフェクター分子の同定と活性化機序について解明する。

3. 研究の方法

(1) Stat3 の活性化制御に関与する新規の Stat3 修飾系の同定

3xFlag-tag ペプチドを N 末端に付加した Stat3 を発現させた細胞を Interleukin-6 (IL - 6) で刺激し gp130-Stat3 シグナルを活性化した後、細胞抽出液を調製した。抗 Flag 抗体で精製後、SDS-PAGE で更に精製を行った。タンパク質染色で可視化されたバン

ドを切り出し、プロテアーゼでゲル内消化後、溶出物を得た。ナノフロー逆相カラムで分離後 QSTAR-QqTOF Tandem Hybrid 型質量分析機をもちいた質量分析を行った。質量分析機は研究の協力者である大阪市立大学医学研究科 鱈淵英樹教授が所有する機器を用いた。RNA 干渉法により Stat3 をタンパク質ノックダウンした細胞株を作成し、その細胞において RNA 干渉効果に影響されずかつ新規の修飾部位に変異を与えた Stat3 変異体発現できるような細胞株をレンチウイルスベクター発現系で樹立した。

(2) 抗 Stat3 修飾部位認識抗体の作成

新規 Stat3 修飾部位を含むペプチドを設計・合成し、キャリアタンパクに結合させた後に家兎に対して複数回免疫した。部分採血した血清中の抗体価の上昇を ELISA 法で確認した後、全採血を行った。更に非修飾ペプチド固定化クロマトグラフィーにより未修飾部位認識抗体を除去し、Stat3 の修飾された部位を含むペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより特異抗体の精製を行った。

(3) Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) の転写活性測定系の構築

活性化された Stat3 の下流でエフェクター分子として老化誘導に関わる分子である IGFBP5 の転写活性に与える影響について検討を試みた。IGFBP5 遺伝子の 5' 非翻訳領域の遺伝子をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターアッセイ用のプラスミドに組みこんだ。コントロールとして恒常的に発現する Renilla ルシフェラーゼを用いたデュアルレポーターアッセイ法の構築を行った。

(4) Stat3 の新規老化関連標的分子の同定

老化に関与すると報告がなされている分子群の遺伝子発現における、gp130-Stat3 シグナルの関与を調べるため、野生型細胞と Stat3 ドミナントネガティブを発現させたヒト正常繊維芽細胞において、IL-6 刺激有無での遺伝子発現の変化を qRT-PCR 法によって調べた。

4. 研究成果

(1) Stat3 の新規の修飾系の同定と役割の解明

Stat3 の新規のタンパク質修飾部位の同定と制御機序の解明を目的として、gp130 シグナル活性化下の Stat3 を精製し修飾状況を質量分析法で調べた。その結果、新規の Stat3 修飾部位の同定に成功した。ヒト肝実質細胞株において Stat3 を RNA 干渉法によりノックダウンした細胞株において、ノックダウン効

果に影響されずかつ新規の Stat3 修飾部位に変異を与えた Stat3 変異体を発現できるような細胞株をレンチウイルスベクター発現系で樹立した。野生型 Stat3 復帰株と比較して、変異体導入細胞株においては、IL-6 応答性の SOCS3 遺伝子発現が 38% 程度に抑制されていた。一方で活性化型 Stat3 の新規修飾部位に変異を与えた場合は、抑制効果が認められなかった。これらのことより、Stat3 の活性化に新規の修飾が部分的に寄与している可能性が示唆された。新規の Stat3 修飾の変化を質量分析法による定量的な捉える試みを行った。条件検討を行ったが、対象物の物性的にも困難と考えられた。抗体を用いた新たな検出系の樹立が必要と考えられた。以上より、Stat3 の活性化に関わると考えられる新規の修飾部位を見だし、新しい活性制御機序の解明につながる知見が得られた。結果の一部をまとめ、学会報告を行った。

(2) Stat3 の新規修飾部位に対する抗体の作成

gp130 シグナル下の Stat3 の活性化には複数の修飾が関与し、それらが連動することにより活性の ON/OFF が制御されている。新規 Stat3 修飾部位の修飾状態を認識する抗体を作成し、修飾部位の役割の連動性を明らかにするとともに、更に新たな修飾部位の解明、修飾に関わる分子の同定と機序の解明並びに表現型における位置づけを明らかにしていきたいと考えた。新規修飾を付加したペプチドを作成し家兎に免疫した。採取血清中の抗体価の上昇を ELISA 法で確認後全採血を行った。非修飾ペプチド固定化セファロース素通り画分を、修飾部位ペプチド固定化セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーに供し、精製抗体を作成した。活性化 Stat3 を変性条件下で SDS-PAGE で展開後、常法によるウェスタンブロッティング法で検出を試みたが検出できなかった。更には抗体検出賦活化条件でも試みたが、検出はできなかった。一方で活性化 Stat3 を非変性条件下ドットプロット法において検出を試みた結果、特異性を確認でき使用できるものとして判断した。HepG2 細胞において非刺激・IL-6 刺激条件下で細胞抽出液を調製し、ドットプロット法を用いて新規 Stat3 修飾部位の gp130 シグナル依存的な修飾変化を確認した。今後は、更に多様途で使用出来る抗体の作成を検討する余地が残された。結果の一部をまとめ学会報告を行った。

(3) Stat3 の修飾と制御機序については、Stat3 のセリン 727 のリン酸化が、これまで知られる転写活性の増強作用に加えて、核内のチロシン脱リン酸化酵素 TC45 を通じてリン酸化チロシン 705 の脱リン酸化を促進することで、Stat3 活性の持続を短くするという新規役割を見いだしてきたが、更に詳細な機

序を明らかにするために Stat3 の各種の変異体を作成し、リン酸化チロシン 705 の脱リン酸化に寄与する新たな部位を特定した。この部位を含む合成アミノ酸並びに大腸菌発現精製タンパクを調製し表面プラズモン共鳴法での結合・解離の状況を解析したが結合は認められなかった。結果の一部をまとめ、学会発表を行った。

(4) gp130-Stat3 シグナル系が IGFBP5 の転写活性に与える影響

gp130 シグナルの下流で活性化された Stat3 の更に下流でエフェクター分子として老化誘導に関わる分子である IGFBP-5 遺伝子の 5' 領域の遺伝子をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子と融合させたレポーター遺伝子を作成した。トランスフェクション効率補正のための恒常的発現型 renilla ルシフェラーゼ遺伝子とともにヒト正常繊維芽細胞に一過性に導入しデュアルルシフェラーゼアッセイを実施した。gp130 シグナルを活性化させた場合のレポーターの応答性を調べた結果、2.5 倍程度の上昇が認められた。一方で、gp130 シグナル活性化に IGFBP5 の遺伝子発現を qRT-PCR 法によって調べたところ 8 倍の上昇が認められた。レポーターアッセイの結果は低い結果になったが、クローニングした領域がプロモーター領域として転写活性の一部に加担しているものと考えた。

(5) gp130-Stat3 シグナル下流下の新規老化関連標的分子の同定

これまでに老化誘導に関わると報告がなされている分子群の中に正常 2 倍体細胞に於ける gp130-Stat3 シグナル下の老化制御系に於いても影響するものがあるかどうかを調べた。正常繊維芽細胞に Stat3 ドミナントネガティブを発現させ細胞 Stat3 活性化を抑えた細胞を作成するに当たり、gp130 シグナルを活性化させた場合の遺伝子発現の変化を調べるに当たり、レンチウイルスベクター発現系を用いて継代数が少ない細胞に対して効率的に導入することができ、継代数を経ずに実験が可能な系を構築した。正常並びに Stat3 ドミナントネガティブを発現繊維芽細胞、それぞれに対し gp130 シグナルを活性化させ、qRT-PCR 法によって発現に違いがでる遺伝子の同定を行った。その結果、gp130 シグナルで活性化されるものの Stat3 活性化を抑えた場合発現がなくなる遺伝子 2 種を見いだした。見いだされた 2 つの分子は gp130-Stat3 の下流で動く IGFBP5 を RNA 干渉法によりタンパク質レベルをノックダウンさせた場合でもなおも残る gp130-Stat3 シグナル下流下細胞老化誘導を担う分子である可能性が考えられた。

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4件)

Kojima H, Inoue T, Kunimoto H, Nakajima K, IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *JAKSTAT*. 2(4):e25763, 1-15, 2013 査読有、doi: 10.4161/jkst.25763.

Xiao SJ, Wang LY, Kimura M, Kojima H, Kunimoto H, Nishiumi F, Yamamoto N, Nishio K, Fujimoto S, Kato T, Kitagawa S, Yamane H, Nakajima K, Inoue A. Xiao SJ, Wang LY, Kimura M, Kojima H, Kunimoto H, Nishiumi F, Yamamoto N, Nishio K, Fujimoto S, Kato T, Kitagawa S, Yamane H, Nakajima K, Inoue A. S1-1/RBM10: multiplicity and cooperativity of nuclear localisation domains. *Biol Cell*. 105(4):162-174, 2013 査読有. doi: 10.1111/boc.201200068.

Inoue T, Nakayama Y, Li Y, Matsumori H, Takahashi H, Kojima H, Wanibuchi H, Katoh M, Oshimura M. SIRT2 knockdown increases basal autophagy and prevents postslippage death by abnormally prolonging the mitotic arrest that is induced by microtubule inhibitors. *FEBS J*. 281(11):2623-37, 2014, 査読有. doi: 10.1111/febs.12810.

Suematsu T, Li Y, Kojima H, Nakajima K, Oshimura M, Inoue T. Deacetylation of the mitotic checkpoint protein BubR1 at lysine 250 by SIRT2 and subsequent effects on BubR1 degradation during the prometaphase/anaphase transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 453(3):588-94. 2014, 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.128.

[学会発表](計4件)

Yang J, Kojima H, Kunimoto H, Nakano S, Nakajima K, The role of STAT3-C terminal region in the regulation of STAT3 stability.第87回日本生化学会, 2014年10月

Kojima H, The role of post-translational modification in the regulation of signal transducer and activator of transcription 3 activity, 第88回日本生化学会大会・第

38回日本分子生物学会年会合同大会, 2015年12月

Kojima H, Characterization of STBP-1, 第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月

Ohira T, Kojima H, Kuroda Y, Inaoka D, Moriwaki K, Kasuga K, Ktataoka M, Inoue T, Oshimura M, Kugoh H. PITX1 protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription, 第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月

[図書](計1件)

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 2*, 2013, 53-60

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/immune1/>.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小島 裕正 (Kojima Hirotsada)
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

井上 敏昭 (Inoue Toshiaki)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号: 80305573