

「色素細胞における STAT3 磷酸化の制御機構およびその意義」

神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野 岡 昌宏

1. 研究の背景と目的

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) は多くの重要遺伝子の転写を調節する転写因子である。細胞内では STAT3 は活性化されておらず、細胞外からの適当な刺激に応じて分子内の Tyr705 が磷酸化を受けて 2 量体となり活性化型となって核へ移行し、さらに Ser727 が磷酸化されてから目的遺伝子のプロモーター領域に結合して転写機能を発揮する。Ser727 磷酸化は Tyr705 磷酸化された STAT3 の転写機能を増強するが、あくまでも Tyr705 磷酸化に伴う二次的なもので、STAT3 の機能には Tyr705 磷酸化が主要な役割を果たすとされてきた。しかしながら、我々は正常色素細胞であるメラノサイトでは STAT3 の Ser727 の恒常的磷酸化が Tyr705 磷酸化を伴わずに起こっていることを見だし、メラノサイトの STAT3 は他の細胞とは異なった磷酸化制御を受け、Ser727 磷酸化は独自の磷酸化制御機構および役割を有していると想定するに至った(J. Invest. Dermatol. 2012; 132: 1877-1885)。

本研究では、メラノサイトの STAT3 Ser727 磷酸化の制御機構および役割を解明することを目的とする。

2. 研究方法・研究内容

我々は、予備実験においてメラノサイトに紫外線 B を照射すると、STAT3 の Ser727 磷酸化が Tyr705 磷酸化を伴わずに増強することを見出したので、紫外線 B 照射時のメラノサイトの Ser727 磷酸化増強の機構と役割を調べることを主眼に実験を行った。10 mJ/cm<sup>2</sup> (生理的紫外線量)の紫外線 B 照射によりメラノサイトは 72 時間後までアポトーシスは起こらなかった。紫外線 B 照射によりメラノサイト内では MEK-ERK1/2 を介して STAT3 の Ser727 が磷酸化され、STAT3 の核内移行が起こったが、STAT3 の Tyr705 の磷酸化は起こらなかった。また、紫外線 B 照射 12 時間後に、アポトーシスを抑制する分子である myeloid cell leukemia (Mcl)-1L の mRNA が増加し、24、48、72 時間後の Mcl-1L 蛋白発現が増加した。MEK-ERK1/2 阻害剤である U0126 を用いて紫外線 B 照射時の STAT3 Ser727 磷酸化を抑制すると、24 時間後の Mcl-1L 発現増加は抑制され、かつ、アポトーシスが起きた。7 種のメラノーマ細胞株について Mcl-1L と pS-STAT3 (Ser727 磷酸化はあるが Tyr705 磷酸化のない STAT3) の発現を

みたところ、すべての細胞株で種々の程度に両蛋白の発現がみられ、かつ、両者の発現程度は相関していた。特に癌化初期のメラノーマ由来の細胞である WM35 細胞と WM39 細胞は Mcl-1L と pS-STAT3 の発現が強く、かつ、pY-STAT3 (Tyr705 磷酸化はあるが Ser727 磷酸化のない STAT3) は発現していなかった。STAT3 は転写因子であり、また、上述したとおり、pS-STAT3 は核に移行することから、pS-STAT3 は転写因子として Mcl-1 のプロモーター領域に結合して Mcl-1L の発現を増加させると推定された。この仮説を検証するために、メラノサイトと同様に pS-STAT3 は発現するが、pY-STAT3 は発現せず、かつ pS-STAT3 と Mcl-1L の発現が強いメラノーマ細胞株 WM39 を用いて、ゲルシフトアッセイにより Mcl-1 のプロモーター領域中の pS-STAT3 結合配列の有無を検討したところ、pS-STAT3 結合配列が 1 ヶ所同定された。メラノサイトでは 50 mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線 B 照射により 48 時間後に細胞はアポトーシスを起こすのに対し、WM39 細胞はこの量の紫外線 B を照射してもアポトーシスは起こさなかった。

### 3. 研究成果

以上の結果から、メラノサイトにおいては、紫外線 B 照射は MEK-ERK1/2 活性化を介して Tyr705 磷酸化非依存性に Ser727 磷酸化を起こし pS-STAT3 が生じ、この pS-STAT3 は核へ移行し転写因子として Mcl-1 のプロモーター領域に結合し Mcl-1L の発現を増加させることが明らかとなった。さらに、紫外線 B 照射による STAT3 Ser727 磷酸化を介した Mcl-1L 発現増加は、メラノサイトのアポトーシスを抑制していることが明らかとなった(図 1)。今回の研究は、メラノサイトの STAT3 には、これまで一般に考えられていたような Tyr705 磷酸化を主とする活性化機構以外の活性制御機構が存在することを示すとともに、pS-STAT3 は独自の転写因子能を有していることを示す。

### 4. 生活や産業への貢献および波及効果

メラノーマはメラノサイトが癌化して起こるきわめて悪性度の強い腫瘍で、その発生因子として紫外線 B 曝露が重要である。紫外線 B 曝露により遺伝子に変異を起こしたメラノサイトは、癌化する恐れがあるためアポトーシスにより排除されるが、アポトーシスがうまく起こらないと遺伝子変異を持つ細胞が生き残り癌化の危険性が高くなるため、紫外線 B によるメラノサイトのアポトーシス誘導機構およびアポトーシス回避機構の解明は重要な課題である。これまでメラノサイトが紫外線 B によりアポトーシス

を起こす際のアポトーシス誘導機構についての研究は多くなされてきたが、生理的量の紫外線 B 曝露を受けたメラノサイト内で、アポトーシス関連の反応が起こっているかどうかについてはほとんど顧みられてこなかった。我々の研究によって、生理的紫外線 B 曝露を受けたメラノサイトでは pS-STAT3 の発現が増強して抗アポトーシス分子である Mcl-1L 蛋白発現が増加することによってアポトーシスが回避されていることが明らかになった。また、癌化初期のメラノーマでは pS-STAT3 発現量および Mcl-1L 発現量がともに多く、大量の紫外線 B 照射に対してもアポトーシスは起こらないという性質を有していた。これらの結果より我々は、メラノーマは、pS-STAT3 高発現による Mcl-1L 高発現によって紫外線 B 照射によるアポトーシスから回避した特殊なメラノサイトから生じ、癌化初期のメラノーマでは由来するメラノサイトが有していた pS-STAT3 高発現、Mcl-1L 高発現、および紫外線 B によるアポトーシスに対する抵抗性という性質を有していると推測した。今回の研究は、メラノサイトの発癌機構への pS-STAT3 および Mcl-1L の関与の可能性を示すもので、メラノーマの癌化進展についての考え方に新たな視点を提供するものとする。

転写因子 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) は多くの重要遺伝子の転写を調節する転写因子である。細胞内では STAT3 は活性化されておらず、細胞外からの適当な刺激に応じて分子内の Tyr705 が磷酸化をうけて 2 量体となり活性化型となって核へ移行し、さらに Ser727 が磷酸化されてから目的遺伝子のプロモーター領域に結合して転写機能を発揮する。Ser727 磷酸化は Tyr705 磷酸化された STAT3 の転写機能を増強するが、あくまでも Tyr705 磷酸化に伴う二次的なもので、STAT3 の機能には Tyr705 磷酸化が主要な役割を果たすとされてきた。しかしながら、我々はメラノサイトでは STAT3 の Ser727 の恒常的磷酸化が Tyr705 磷酸化を伴わずに起こっていることを見だし、メラノサイトの STAT3 は他の細胞とは異なった磷酸化制御を受け、Ser727 磷酸化は独自の磷酸化制御機構および役割を有していると想定するに至った(J. Invest. Dermatol. 2012; 132: 1877-1885)。

本研究では、メラノサイトの STAT3 Ser727 磷酸化の制御機構および役割を解明することを目的として実験を行った。我々は、すでにメラノサイトに紫外線 B を照射すると、STAT3 の Ser727 磷酸化が Tyr705 磷酸化を伴わずに増強することを見出したので、紫外線 B 照射時のメラノサイトの Ser727 磷酸化増強の機構と役割を調べることを主眼に実験を行った。その結果、メラノサイトにおいては、紫外線 B 照射は MEK-ERK1/2 活性化を介して Tyr705 磷酸化非依存性に Ser727 磷酸化を起こし Ser727 磷酸化は起こっているが Tyr705 磷酸化は起こっていない STAT3 (pS-STAT3) が生じ、この pS-STAT3 は核へ移行し転写因子として Mcl-1 のプロモーター領域に結合し Mcl-1L の発現を増加させることが明らかとなった。さらに、紫外線 B 照射による STAT3 Ser727 磷酸化を介した Mcl-1L 発現増加は、メラノサイトのアポトーシスを抑制していることが明らかとなった。今回の研究は、メラノサイトの STAT3 には、これまで一般に考えられていたような Tyr705 磷酸化を主とする活性化機構以外の活性制御機構が存在することを示すとともに、pS-STAT3 は独自の役割を有していることを示す。