

学 位 論 文 題 名

サイトカイン、増殖因子及びステロイドホルモンの シグナル伝達系のクロストークに関する研究

学位論文内容の要旨

1. はじめに

細胞間の情報伝達分子としてサイトカイン、増殖因子及びホルモン等の因子がある。これら因子は種々の細胞から産生され、細胞の増殖や分化を含めた多彩な生物活性を示す。生体の恒常性はこれらの因子のバランスの上に成立している。そのため、これら因子の生体における本来の機能を明らかにするためには、単独因子のシグナル伝達系の解析では不十分であり、因子間のクロストークの解析が重要であると考えられる。本研究では Interleukin-6 (IL-6)¹⁾、Transforming growth factor- β (TGF- β)²⁾、ステロイドホルモン³⁾のシグナル伝達系とのクロストークのメカニズムを解析した。

2. IL-6 シグナル伝達系とアンドロゲンシグナル伝達系のクロストーク⁴⁾

IL-6 は B 細胞刺激因子として同定されたサイトカインであり、免疫応答、炎症反応等の多彩な機能を有する。IL-6 の IL-6 レセプターへの結合により JAK キナーゼが活性化され、転写因子 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)が核移行し、標的遺伝子の発現を誘導する。男性ホルモンであるアンドロゲン(Dihydrotestosterone:DHT)は、その受容体であり転写活性を有するアンドロゲンレセプター (Androgen receptor:AR)と共に前立腺癌の進行に大きく関わっている。最近、前立腺癌の発症に IL-6 の関与が知られている。そこで、前立腺癌細胞株 LNCaP を用いて IL-6 と AR シグナルのクロストークを検討したところ、IL-6 刺激によって誘導される C/EBP δ 遺伝子発現は DHT の存在下により増強され、IL-6 とアンドロゲンシグナルのクロストークの存在が確認された。さらに、LNCaP 細胞及びヒト胎児性腎癌細胞株 293T を用いたレポータージーンアッセイにおいて DHT による STAT3 転写活性増強作用が観察された。なお、293T 細胞における STAT3 活性化には IL-6 に比べその作用が強い IL-6 ファミリーサイトカインに属する Leukemia inhibitory factor (LIF)を用いた。また、ドミナントネガティブ型 STAT3 (DN-STAT3)や抗アンドロゲン剤 Flutamide により、DHT による増強作用が消失したことから、DHT が AR を介して STAT3 活性を増強すると考えられた。さらに種々の欠失変異型 AR を用いた共沈実験から AR の N 末側領域が STAT3 との会合に必須であることがわかった。

3. IL-6 シグナル伝達系とエストロゲンシグナル伝達系のクロストーク⁵⁾

女性ホルモンであるエストロゲン(17 β -Estradiol:E2)は、エストロゲンレセプター(Estrogen receptor:ER)と共に乳癌や骨粗鬆症への関与が知られている。これまでに E2 は IL-6 誘導性の骨吸収を抑制し、骨代謝に寄与していることが報告されており、IL-6 とエストロゲンシグナルのクロストークの存在が示唆されていた。そこでヒト乳癌細胞株 MCF-7 を用いて IL-6 刺激による STAT3 の活性化と C/EBP δ 遺伝子発現に対する E2 の効果を検討したところ E2 存在下で抑制作用が認められ、IL-6 とエストロゲンシグナルのクロストークの存在が確認された。さらに、MCF-7 細胞及び 293T 細胞を用いたレポータージーンアッセイにおいて E2 による STAT3 転写活性抑制作用が観察された。また、抗エストロゲン剤 Tamoxifen によってこのような抑制作用が消失したことから、E2 が ER を介して STAT3 活性を抑制すると考えられた。

さらに、共沈実験から ER と活性型 STAT3 である STAT3-C の会合が認められた。

4. TGF- β シグナル伝達系とエストロゲンシグナル伝達系のクロストーク^{6,7)}

TGF- β は細胞増殖抑制、免疫抑制、アポトーシス誘導等の作用を有する増殖因子であり、そのレセプター型キナーゼの活性化により転写因子 Smad が核移行し、標的遺伝子の発現を誘導する。また、TGF- β は細胞外マトリックスの産生促進やマトリックス分解酵素阻害因子の産生を介して細胞外マトリックスの蓄積を誘導し、組織修復や恒常性の維持に寄与することが知られており、その過剰状態は動脈硬化や腎線維症等の組織の線維化を伴う疾患の要因となると考えられる。女性における糸球体硬化の進行遅延はエストロゲンによる TGF- β 依存性遺伝子の発現抑制が関与すると考えられ、両シグナルのクロストークが示唆されていた。ヒト腎メサンギウム細胞において TGF- β 刺激により誘導される I 型コラーゲン遺伝子発現への E2 の効果を検討したところ E2 存在下で抑制作用が認められ、TGF- β とエストロゲンシグナルのクロストークの存在が確認された。さらに、MCF-7 細胞や活性型レセプターである T β R-I(T204D)を導入した 293T 細胞を用いたレポータージーンアッセイにおいて E2 による Smad 転写活性抑制作用が観察された。また、Tamoxifen によってこのような抑制作用が消失したことから、E2 が ER を介して Smad 活性を抑制すると考えられた。なお、興味深いことに TGF- β シグナルは E2 により誘導される ER 転写活性を増強する作用を示した。共沈実験より活性型 ER と Smad3 の会合が認められ、ER が Smad3 の co-factor として機能することが示唆された。また、種々の欠失変異型 Smad3 を用いた実験から Smad3 の C 末側の MH2 ドメインが TGF- β シグナルとエストロゲンシグナルの双方向のクロストークにおいて必須であることが明らかとなった。

5. IL-6 シグナル伝達系と TGF- β シグナル伝達系のクロストーク⁸⁾

炎症期の血中 IL-6 の上昇は肝細胞において種々の急性期タンパクを誘導するが、TGF- β はこれに対して正負に作用することが知られている。近年、神経上皮細胞において LIF と TGF- β スーパーファミリーに属する Bone morphogenetic protein-2 のシグナルのクロストークが認められ、各々のシグナル伝達分子である STAT3 と Smad1 が核内で p300 を介して複合体の形成することが明らかになった。そこで、ヒト肝癌細胞株 Hep3B を用いて IL-6 と TGF- β シグナルのクロストークをレポータージーンアッセイで検討したところ IL-6 刺激によって誘導される STAT3 の活性化は TGF- β 存在下で増強され、IL-6 と TGF- β シグナルのクロストークの存在が確認された。293T 細胞における DN-STAT3 や種々の Smad を用いた解析から、TGF- β は Smad3 を介して STAT3 活性を増強することが明らかとなった。この増強作用は p300 の過剰発現によって上昇し、共沈実験より STAT3 は p300 を介して Smad3 と結合することが明らかとなった。

6. まとめ

本研究により IL-6 シグナルとそれに影響するシグナルのクロストークのメカニズムが明らかとなった。すなわち、前立腺癌細胞において認められたアンドロゲンシグナルによる IL-6 シグナルの増強は両者のシグナル伝達分子である AR と STAT3 が会合することにより生じることが示された。また、乳癌細胞で認められたエストロゲンシグナルによる IL-6 シグナルの抑制は ER と STAT3 の会合によることが示された。また、腎メサンギウム細胞や乳癌細胞で認められたエストロゲンシグナルによる TGF- β シグナルの抑制は ER が Smad3 と MH2 ドメインを介して会合することにより生じることが示された。さらに、肝癌細胞において認められた TGF- β シグナルによる IL-6 シグナルの増強は Smad3 と STAT3 が p300 を介して会合することにより生じることが明らかとなった。サイトカイン、増殖因子及びステロイドホルモンの作用は前立腺癌、乳癌、骨粗鬆症及び糸球体硬化症等の疾患の発症や進行に複雑に影響し合いながら深く関与している。これらシグナルクロストークに関する研究は生体内での種々の因子の本来の機能や疾患の発症を考える上で非常に重要である。本研究で確立した各種シグナル伝達系の再構築系やそれらを用いることにより得られた知見は今後のシグナル伝達分子を標的にした種々の治療薬の開発に極めて有用であると考えられる。これらの結果から AR が STAT3 の co-activator として機能することが示唆され

た。ER が STAT3 の co-factor として機能することが示唆された。

7. 参考文献

1. Matsuda, T. *et. al.* (2000) *Cytokine Reference* (Oppenheim, J. J., Feldmann, M., Eds), pp537-563, Academic Press, London.
2. Shi, Y. *et. al.* (2003) *Cell* **113**, 685-700.
3. Mangelsdorf, D. J. *et. al.* (1995) *Cell* **83**, 835-839.
4. Matsuda, T., Junicho, A., Yamamoto, T. *et. al.* (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 179-187.
5. Yamamoto, T. *et. al.* (2000) *FEBS Lett.* **486**, 143-148.
6. Matsuda, T., Yamamoto, T. *et. al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 42908-42914.
7. Yamamoto, T. *et. al.* (2002) *Endocrinology* **143**, 2635-2642.
8. Yamamoto, T. *et. al.* (2001) *FEBS Lett.* **492**, 247-253.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 正
副 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 助教授 高 橋 和 彦
副 査 助教授 大 熊 康 修

学 位 論 文 題 名

サイトカイン、増殖因子及びステロイドホルモンの シグナル伝達系のクロストークに関する研究

細胞間の情報伝達分子としてサイトカイン、増殖因子及びホルモン等の因子がある。これら因子は種々の細胞から産生され、細胞の増殖や分化を含めた多彩な生物活性を示す。生体の恒常性はこれらの因子のバランスの上に成立している。そのため、これら因子の生体における本来の機能を明らかにするには、単独因子のシグナル伝達系の解析では不十分であり、因子間のクロストークの解析が重要であると考えられる。本研究ではIL-6、TGF- β 、ステロイドホルモンのシグナル伝達系とのクロストークのメカニズムを解析した。

1. IL-6 シグナル伝達系とアンドロゲンシグナル伝達系のクロストーク

IL-6 は B 細胞刺激因子として同定されたサイトカインであり、免疫応答、炎症反応等の多彩な機能を有する。IL-6 の IL-6 レセプターへの結合により転写因子 STAT3 が活性化され、標的遺伝子の発現が誘導される。男性ホルモンであるアンドロゲンは、その受容体であり転写活性を有する AR と共に前立腺癌の進行に大きく関わっている。最近、前立腺癌の発症に IL-6 の関与することも報告されており、前立腺癌細胞株 LNCaP を用いて IL-6 刺激によって誘導される C/EBP δ 遺伝子発現に対するアンドロゲンの効果を検討したところアンドロゲン存在下で増強作用が認められ、IL-6 とアンドロゲンシグナルのクロストークの存在が確認された。また、LNCaP 細胞及びヒト胎児性腎癌細胞株 293T を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいてアンドロゲンの STAT3 転写活性増強作用が観察され、ドミナントネガティブ型 STAT3 や抗アンドロゲン剤を用いた解析から、この現象に AR と STAT3 が介することが明らかになった。さらに、種々の欠失変異型 AR を用いた共沈実験から AR の N 末側領域が STAT3 との会合に必須であることがわかった。

2. IL-6 シグナル伝達系とエストロゲンシグナル伝達系のクロストーク

女性ホルモンであるエストロゲンはその受容体である ER と共に乳癌や骨粗鬆症への関与が知られている。これまでにエストロゲンは IL-6 誘導

性の骨吸収を抑制し、骨代謝に寄与していることが報告されており、IL-6 とエストロゲンシグナルのクロストークの存在が示唆されていた。そこでヒト乳癌細胞株 MCF-7 を用いて IL-6 刺激による STAT3 の活性化と C/EBP δ 遺伝子発現に対するエストロゲンの効果を検討したところエストロゲン存在下で抑制作用が認められ、IL-6 とエストロゲンシグナルのクロストークの存在が確認された。さらに、MCF-7 細胞及び 293T 細胞を用いたレポータージーンアッセイにおいてエストロゲンによる STAT3 転写活性抑制作用が観察され、エストロゲンが ER を介して STAT3 活性を抑制すると考えられた。さらに、共沈実験から ER と活性型 STAT3 の会合が認められた。

3. TGF- β シグナル伝達系とエストロゲンシグナル伝達系のクロストーク

TGF- β は細胞増殖抑制、免疫抑制、アポトーシス誘導等の作用を有する増殖因子であり、そのレセプター型キナーゼの活性化により転写因子 Smad が核移行し、標的遺伝子の発現を誘導する。また、TGF- β は細胞外マトリックスの産生促進やマトリックス分解酵素阻害因子の産生を介して細胞外マトリックスの蓄積を誘導し、組織修復や恒常性の維持に寄与することが知られており、その過剰状態は動脈硬化や腎線維症等の組織の線維化を伴う疾患の要因となると考えられる。女性における糸球体硬化の進行遅延はエストロゲンによる TGF- β 依存性遺伝子の発現抑制が関与すると考えられ、両シグナルのクロストークが示唆されていた。ヒト腎メサンギウム細胞において TGF- β 刺激により誘導される I 型コラーゲン遺伝子発現へのエストロゲンの効果を検討したところエストロゲン存在下で抑制作用が認められ、TGF- β とエストロゲンシグナルのクロストークの存在が確認された。さらに、MCF-7 細胞や活性型 TGF レセプターを導入した 293T 細胞を用いたレポータージーンアッセイにおいてエストロゲンによる Smad 転写活性抑制作用が観察され、エストロゲンが ER を介して Smad 活性を抑制すると考えられた。さらに、共沈実験より活性型 ER と Smad3 の会合が認められ、ER が Smad3 のコファクターとして機能することが示唆された。また、種々の欠失変異型 Smad3 を用いた実験から Smad3 の C 末側の MH2 ドメインが TGF- β シグナルとエストロゲンシグナルの双方向のクロストークにおいて必須であることが明らかとなった。

4. IL-6 シグナル伝達系と TGF- β シグナル伝達系のクロストーク

炎症期の血中 IL-6 の上昇は肝細胞において種々の急性期タンパクを誘導するが、TGF- β はこれに対して正負に作用することが知られている。近年、神経上皮細胞において LIF シグナルと TGF- β スーパーファミリーに属する BMP-2 のシグナルのクロストークが認められ、各々のシグナル伝達分子である STAT3 と Smad1 が p300 を介して複合体の形成することが明らかになった。そこで、ヒト肝癌細胞株 Hep3B を用いて IL-6 と TGF- β シグナルのクロストークをレポータージーンアッセイで検討したところ IL-6 刺激によって誘導される STAT3 の活性化は TGF- β 存在下で増強され、IL-6 と TGF- β シグナルのクロストークの存在が確認された。さらに、TGF- β による Smad3 を介した STAT3 活性の増強は p300 の過剰発現によって上昇し、共沈実験より STAT3 は p300 を介して Smad3 と結合することが明らかとなった。

サイトカイン、増殖因子及びステロイドホルモンの作用は前立腺癌、

乳癌，骨粗鬆症及び糸球体硬化症等の疾患の発症や進行に複雑に影響しながら深く関与しており，本研究で確立した各種シグナル伝達系の再構築系やそれらを用いることにより得られた知見は今後のシグナル伝達分子を標的にした種々の治療薬の開発に極めて有用であると考えられる。

このように山本哲也は精力的にクロストークのメカニズム解析を行い，多くの成果を挙げた。これらの業績は山本哲也に博士(薬学)の学位授与に十分値し，推薦するものである。