



Stat3 activation is required for cell proliferation and tumorigenesis but not for cell viability in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines

住田, 奈穂子

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3664

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003664>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 125 】

氏　名・(本　籍)　　住田　奈穂子　　(　埼玉県　　)
博士の専攻分野の名称　　博士 (医学)
学　位　記　番　号　　博い第1747号
学位授与の　要　件　　学位規則第5条第1項該当
学位授与の　日　付　　平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

Stat3 activation is required for cell proliferation and
tumorigenesis but not for cell viability in cutaneous
squamous cell carcinoma cell lines
(皮膚有棘細胞癌細胞株において、Stat3の活性化は増殖と
腫瘍化には必要だが細胞の生存には不可欠ではない)

審　查　委　員

主　查　教　授　横崎　宏
教　授　田原　真也
教　授　丹生　健一

はじめに

近年、分子生物学を基礎とした研究の発展により、癌遺伝子を制御することが癌征圧につながるという考え方のもとで、特定の遺伝子を対象とした癌治療が試みられてきた。しかし、細胞の増殖にはひとつのシグナル伝達経路だけでなく、多数の経路が関わっていることより、複数の遺伝子の活性に関わる転写因子が治療戦略の新たな標的として注目を集めている。転写因子Stat3の活性化が、様々な癌で観察され、細胞の増殖、生存、分化、悪性化などにStat3が関連していることが最近の研究で明らかになってきた。活性化したStat3はアポトーシスを抑制することより、Stat3は癌遺伝子であることが示唆されている。我々は、皮膚有棘細胞癌で恒常的なStat3の活性化がみられることを見出した。食道の有棘細胞癌ではStat3の抑制による治療効果が報告されているが、皮膚有棘細胞癌におけるStat3の役割は解明されていない。本研究の目的は、Stat3活性を阻害することにより皮膚有棘細胞癌におけるStat3の役割を明らかにすることである。Stat3の阻害手段として、特異的で且つ阻害効率の高いRNA干渉法を用いた。RNA干渉法は標的遺伝子のみを特異的に抑制することができる画期的な手法として注目されており、今後の臨床応用が期待される。

材料と方法

細胞

ヒトの皮膚有棘細胞癌の細胞株である HSC-1, HSC-3, HSC-4 は 10% 血清と抗生素含有の Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM)にて培養した。

ウエスタンプロッティング

Stat3, Bcl-2, Bcl-xL, cyclinD1, p27, actin, involucrin の蛋白発現をみるとためにウエスタンプロッティングを行った。細胞から抽出した蛋白を 20 μ g ずつ 10% SDS-PAGE ゲルにて電気泳動で分離し、それぞれの一次抗体を用いて分離した蛋白を検出した。

細胞増殖の評価と形態

1 \times 10⁴ 個の細胞について、トリパンブルー染色を行い、生存細胞数を第 2、4、6 日目に数えた。細胞形態は位相差顕微鏡を用いて観察した。

small interfering RNA (siRNA) と Stat3 ノックダウン細胞の作成

一過性の阻害には、2 本鎖 RNA の Stat3 siRNA (5'-AAC UUC AGA CCC GUC AAC AAA dTdT-3'; 3'-dTdT GAA GUC UGG GCA GUU GUU U-5') とコントロール siRNA (5'-AAU UCU CCG AAC GUG UCA CGU dTdT-3'; 3'-dTdT AAG AGG CUU GCA CAG UGC A-5') を用いた。継続阻害には、U6-siRNA ベクターを用いた Stat3 siRNA (pU6i hStat3)(5'-AAG AAU CAC AUG CCA CUU UGG dTdT-3'; 3'-dTdT CUU AGU GUA CGG UGA AAC C-5') を、もしくはコントロールとして空のベクターを組み込んだプラスミドを細胞に導入し、細胞系列を確立した。

フローサイトメトリーによるアポトーシスの解析

細胞に 2 本鎖 Stat3 siRNA を、もしくは control siRNA を導入し、2 日後に回収し、Annexin V と propidium iodide (PI) の 2 重染色後フローサイトメトリーを用いてアポトーシスの解析を行った。

TUNEL 染色によるアポトーシスの解析

スライドグラス上で培養した細胞を TUNEL 染色し、蛍光顕微鏡にて解析した。

細胞周期

培養開始 48 時間後に回収し、PI 染色し、フローサイトメトリーにて解析した。

免疫細胞染色

スライドグラス上で培養した細胞をホルマリン固定し、一次抗体として抗インボルクリン抗体と抗 CK10 抗体を用いて染色し、その発現を蛍光顕微鏡にて観察した。

ヌードマウスへの細胞移植

生後 6 週の雌のヌードマウスの背部へ 5 \times 10⁶ 個の Stat3 ノックダウン細胞もしくはコントロールとして空のベクターを導入した細胞を皮下注射した。毎週腫瘍の大きさを計測し、49 日目に全てのヌードマウスを安楽死させ腫瘍を切除して組織学的検討を行った。

統計

統計学的解析には、一元配置分散分析法と t 検定を用いた。P < 0.05 をもって統計学的有意差があると判定した。

結果

- 1 : ヒト皮膚有棘細胞癌細胞である HSC-1 細胞において 2 本鎖 Stat3siRNA の導入効率は 80 から 90 %と高く、導入による Stat3 活性の抑制効果は 96 時間まで続いたが、その間 Stat3 の標的遺伝子である Bcl-2, Bcl-xL, p27, cyclinD1 の蛋白発現は抑制されず、アポトーシスの誘導も見られなかった。
- 2 : ベクター型の Stat3 siRNA の導入に成功した皮膚有棘細胞癌細胞では、Stat3 活性の抑制効果は約 2 ヶ月間続き、プラスミド導入 45 日後の評価では、Bcl-2, Bcl-xL, cyclinD1 蛋白発現の抑制が確認された。また、同時期に行なった細胞増殖能と細胞周期の解析において、コントロールプラスミド導入細胞と比較して、有意な細胞増殖能の低下、G₀-G₁ 期にある細胞の増加がみられた。
- 3 : 細胞形態を比較すると、Stat3 ノックダウン細胞では、細胞の膨化、核の空胞化などの変化がみられた。この変化が、細胞死なのか細胞分化なのかを調べるために行なった免疫染色では、TUNEL 染色は陰性で表皮角化細胞の分化マーカーであるインボルクリンや CK10 が陽性であった。皮膚有棘細胞癌細胞において Stat3 活性の持続的阻害はアポトーシスではなく終末分化を誘導した。
- 4 : control siRNA を導入した有棘細胞癌細胞株ではヌードマウスへの造腫瘍性がみられたのに対して、Stat3 siRNA を導入した細胞では造腫瘍性がみられなかった。

考察

ヒト皮膚有棘細胞癌における Stat3 活性の阻害効果を 2 通りの方法で検討した。まず、効果は一過性（約 1 週間）であるが、高いトランスフェクション効率 (80-90%) を有する 2 本鎖 siRNA により検証した。Stat3 活性は高度に抑制されたが、短期間の抑制では Stat3 標的遺伝子の蛋白発現は変化なく、アポトーシスの誘導もみられなかった。星細胞腫瘍や前立腺癌の細胞株では Stat3 活性を完全に阻害できなくてもアポトーシスは誘導されていることより、皮膚有棘細胞癌では Stat3 活性を阻害するだけでは細胞は死に至らない可能性が考えられた。次に、長期の Stat3 阻害効果をみるためにベクター型 siRNA を導入し Stat3 ノックダウン細胞系列を確立した。Stat3 ノックダウン細胞では細胞増殖能の低下がみられ、多くの細胞が G₀-G₁ 期に停滞した。さらに、時間とともに細胞形態は変化し、空胞化や膨化が目立つようになり、免疫組織学的検討により分化していることが明らかになった。これらの結果を総合的に判断すると、Stat3 活性 の持続的阻害により皮膚有棘細胞癌はその悪性腫

瘍としての特徴である無秩序な増殖能を失い、正常角化細胞のように終末分化を来たすようになると考へた。ヌードマウスを用いた実験で Stat3 ノックダウン細胞が造腫瘍性を喪失していることからも、正常細胞に近くなっていることが考へられる。

癌細胞にとって、悪性腫瘍としての性質を維持するために Stat3 の活性化が必要であることは数々の研究で明らかにされているが、Stat3 がどのような役割を果たしているのかはまだ解明されていない。従来の研究は、とにかく Stat3 活性を抑制することで癌治療に応用できないかという考へのもとに、大きく分けて 2 つの方法により Stat3 活性抑制の効果が検討されている。ひとつは、Stat3 を直接抑制するのではなく、Stat3 を活性化する伝達経路を阻害することで Stat3 の活性を抑制する方法で、アポトーシスが誘導されている。それらの報告では、Stat3 の活性低下により引き起こされる鍵となる遺伝子の活性低下が重要であることを示唆している。もうひとつは、直接 Stat3 活性を抑制する方法で、星細胞腫瘍や前立腺癌でアポトーシスの誘導に成功している。両者の違いが細胞の種類や異なる実験条件からきているのかはっきりしていない。

Stat3 の活性が癌で重要な役割を果たしていることは確かなようだが、具体的な役割については分かっていない。Chan らは皮膚角化細胞特異的な Stat3 ノックアウトマウスを用いて皮膚癌には Stat3 の活性化が重要で、イニシエーション、プロモーションの両方に関係していると報告している。では、癌治療には Stat3 の抑制で十分なのかという疑問が生じる。我々はこの問題に答えを出すために Stat3 siRNA を皮膚有棘細胞癌細胞に導入した。Stat3 ノックダウン細胞は正常角化細胞のような分化を示したが、アポトーシスには至らなかった。その形態的特徴、分化マーカーの発現より終末分化を來していると結論づけた。皮膚角化細胞で Stat3 のノックアウトが可能のように、角化細胞由来の有棘細胞癌では Stat3 の活性を阻害しても細胞死は生じないことが判明した。

まとめると、本研究で、Stat3 siRNA により皮膚有棘細胞癌細胞株で効果的に Stat3 活性は抑制され、癌細胞は増殖能を失い、正常細胞のような動態をとった。皮膚有棘細胞癌細胞株において、Stat3 の活性化は増殖と腫瘍化には必要だが細胞の生存には不可欠ではないと結論した。この結論に基づくと、Stat3 siRNA は、単独でも腫瘍の増殖の抑制が可能であり、化学療法や放射線療法などと組み合わせることで癌細胞にアポトーシスを誘導させることが期待でき、癌治療にとって新たな武器となることが考へられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1744号	氏名	住田 奈穂子
論文題目 Title of Dissertation	<p>Stat3 activation is required for cell proliferation and tumorigenesis but not for cell viability in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines</p> <p>皮膚有棘細胞癌細胞株において、Stat3 の活性化は増殖と腫瘍化には必要だが細胞の生存には不可欠ではない</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 横崎 克 Chief Examiner</p> <p>副査 田原 真也 Vice-examiner</p> <p>副査 丹生 緯一 Vice-examiner</p>		
審査終了日	平成 18 年 3 月 1 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

転写因子 Stat3 は、様々な癌において恒常的活性化が観察されており、増殖や生存、分化、癌化などで重要な役割を果たすことより癌遺伝子のひとつであることが示唆されている。皮膚有棘細胞癌においても Stat3 の恒常的活性化が見られることが証明されているが、その役割はまだ解明されていない。RNA 干渉法は、標的遺伝子のみを特異的に抑制することができる画期的手法として注目されているが、本研究では 2 本鎖 siRNA とベクター型 siRNA の 2 種類の RNA 干渉法を用いて Stat3 活性を特異的に阻害することにより皮膚有棘細胞癌における Stat3 の役割を検討した。得られた成果は以下のとくである。

まず、高い(80-90%)導入効率が得られる 2 本鎖 siRNA による一過性の Stat3 活性阻害では、その抑制効果は約 144 時間持続したが、その間、標的遺伝子であるアポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2、Bcl-xL と細胞周期関連因子である cyclinD1 の蛋白発現は影響をうけず、アポトーシスの誘導や形態の変化は見られなかった。星細胞腫瘍や前立腺癌の細胞株では完全に Stat3 の活性を阻害できなくてもアポトーシスは誘導されており、皮膚有棘細胞癌では Stat3 の阻害のみではアポトーシスは誘導されない可能性が考えられた。

一方、ベクター型 siRNA による Stat3 活性の持続的阻害では、その抑制効果は約 2 ヶ月間持続した。プラスミド導入 45 日後の評価では、上記標的遺伝子の蛋白発現の抑制がみられ、またコントロールプラスミドを導入した細胞と比較し、細胞増殖の有意な抑制と G₀-G₁ 期の細胞の有意な増加がみられた。Stat3 活性が阻害された細胞は、時間の経過とともに胞体の膨化、核の空胞化といった形態学的变化がみられるようになり、表皮角化細胞の分化マーカーであるインボルクリン、CK10 の発現を細胞質に認めた。この際 TUNEL 染色は陰性であり、形態的変化はアポトーシスではなく終末分化と考えられた。また、コントロールプラスミドを導入した有棘細胞癌細胞株を移植したヌードマウスでは腫瘍形成がみられたのに対して、Stat3 活性阻害細胞を移植したヌードマウスでは腫瘍の形成がみられなかった。これらの結果より、Stat3 活性の持続的阻害に

より皮膚有棘細胞癌の無秩序な増殖能は失われ、細胞は分化傾向を示し、ヌードマウスへの造腫瘍性を失い、癌としての特質を消失するが、Stat3 活性の阻害だけでは細胞死は生じないことが判明した。Stat3 活性は皮膚有棘細胞癌細胞の増殖や腫瘍化には必要であるが、細胞の生存には不可欠ではないと結論づけた。

本研究は、Stat3 特異的 RNA 干渉法による皮膚有棘細胞癌細胞株の細胞生物学的変化を検討したものであるが、従来殆ど行われていなかった皮膚有棘細胞癌における Stat3 の役割を初めて明らかにし、さらに Stat3 siRNA の臨床応用への可能性を示した点で画期的研究と考えられる。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。