Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells

坂口，正展

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2012-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲5607
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005607

※ 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。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells

メラノサイトとメラノーマ細胞に於ける
STAT3のセリン727リン酸化の役割と制御

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
皮膚科学
（指導教員　錦織　千佳子教授）

坂口　正展

内容要旨

題目

Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells

背景

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) は、多くの重要遺伝子の転写に関わる転写因子である。STAT3 は正常細胞では通常細胞質に存在し、種々のポリペプチド性の刺激（成長因子、サイトカイン、ホルモンなど）が細胞表面の受容体に結合すると、チロシン 705 残基 (Tyr705) の燐酸化を経て 2 量体となり核内に移行し、さらにセリン 727 残基 (Ser727) が燐酸化を受けた後、目的遺伝子のプロモーター領域に結合し転写を促進する。STAT3 の活性化には Tyr705 の燐酸化が必要不可欠とされ、STAT3 活性化の指標として Tyr705 の燐酸化が用いられてきた。一方、Ser727 燐酸化は Tyr705 の燐酸化の後に生じる二次的な燐酸化とされ、STAT3 活性化における意義については注目されてこなかった。

目的

今回私共は正常メラノサイトと悪性黒色腫細胞における STAT3 Ser727 燐酸化の役割と制御機構について研究を行った。

方法と結果

まず、正常メラノサイト、悪性黒色腫細胞株 7 種（原発病巣から樹立された 4 種 (WM35、WM39、WM98-1、WM115) および、転移病巣から樹立された 3 種 (WM164、WM239A、WM1205Lu)）における Ser727 と Tyr705 の燐酸化状態を、Ser727 が燐酸化された STAT3（以下 pS-STAT3）、Tyr705 が燐酸化された STAT3（以下 pY-STAT3）に対する抗体を用いてウエスタンブロット法にて調べた。すべての細胞で恒常的な STAT3 Ser727 燐酸化が起っていた。一方、Tyr705 燐酸化は正常メラノサイトと原発病変から樹立された 2 種の黒色腫細胞株 (WM35、WM39) では起っていなかったが、他の 5 種の黒色腫細胞株では恒常的な Tyr705 燐酸化が起こっていた。

正常メラノサイトは増殖因子を枯渇させると cell survival activity の低下をきたすが、腫瘍プロモーターである 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) はこの低下を抑制することが示されている。増殖因子枯渇によるメラノサイトの cell survival activity

の低下がTPAにより抑制される機序にSer727 燐酸化が関与しているか否かをみるために、静止期のメラノサイトを TPA で刺激したあと Ser727 燐酸化レベル、および cell survival activity を測定したところ、TPA 刺激により Ser727 燐酸化は 1 時間後まで時間依存性に亢進し、その後減少に転じ 24 時間後にほぼ元のレベルに戻った。また、1 時間後の cell survival activity は亢進していた。これらの結果はメラノサイトにおいて、TPA 刺激により Ser727 燐酸化が亢進し、Ser727 燐酸化と cell survival activity は相関があることを示唆する。

Ser727 燐酸化が STAT3 の細胞内局在に影響を与える可能性を蛍光免疫染色により検討した。静止期のメラノサイトでは総 STAT3（燐酸化を受けている STAT3 と受けていない STAT3 の和）は主に細胞質に存在し、一方、pS-STAT3 は核内にわずかに存在していた。細胞を TPA で刺激すると 1 時間後には核内の総 STAT3 は増加し、また核内の pS-STAT3 も増加していた。これらの結果はメラノサイトにおいては、燐酸化を受けていない STAT3 は細胞質に存在するが pS-STAT3 は核内に存在し、細胞が TPA で刺激されると細胞質の STAT3 が Ser727 燐酸化を受け核内に移行することを示唆する。

これまでに種々の燐酸化酵素（extracellular-regulated kinase (ERK) 1/2、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、 c-Jun N-terminal kinase (JNK)、protein kinase C (PKC)、mammalian target of rapamycin (mTOR)、および cdk5）が STAT3 の Ser727 燐酸化を起こすことが報告されている。黒色腫細胞における Ser727 燐酸化制御機構を調べるために、これらの酵素の阻害剤が黒色腫細胞の恒常的 Ser727 燐酸化に及ぼす影響を WM35、WM39、WM98-1、WM1205Lu 細胞において見たところ、ERK1/2 阻害剤である U0126 は Ser727 燐酸化レベルを 30～50% 減少させたが、他の燐酸化酵素の阻害剤は Ser727 燐酸化レベルに影響を与えなかった。よって、黒色腫細胞の恒常的 Ser727 燐酸化の一部は ERK kinase (MEK)–ERK1/2 経路で制御されていることが示された。

黒色腫細胞においては B-Raf kinase の活性化変異 (V600E) が頻繁にみられ、この変異が MEK–ERK1/2 経路の活性化を起こすことが示されている。黒色腫細胞において B-Raf の活性化変異が MEK–ERK1/2 経路で誘導される Ser727 燐酸化に関与しているかどうかを active B-Raf (V600E) kinae 阻害剤である PLX4720 を用いて調べた。B-Raf kinase の活性化変異 (V600E) が起こっている WM35、WM39、WM1205Lu 細胞において PLX4720 は Ser727 燐酸化レベルを減少させた。よって、黒色腫細胞の恒常的 Ser727 燐酸化の一部は B-Raf–MEK–ERK1/2 経路で行われていることが示された。

黒色腫細胞における Ser727 燐酸化と STAT3 分子の細胞内局在の関係を WM39 細胞（恒常的 Ser727 燐酸化は起こっているが Tyr705 燐酸化は起こっていない細胞）を用いて蛍光免疫染色により検討した。WM39 細胞では総 STAT3 は核内に多く存在し、細胞質にも少量存在していた。pS-STAT3 は専ら核内に存在していた。Ser727 燐酸化を抑制する U0126 で 2 時間処理すると、核内の総 STAT3 および pS-STAT3 は処理前に比べて減少し、細胞質の総 STAT3 は増加していた。よって黒色腫細胞では pS-STAT3 は主として核に存在し、Ser727 の脱燐酸化を受けると核内の STAT3 分子は細胞質に移行すると考えられた。

黒色腫細胞における cell survival activity と Ser727 燐酸化の関係を調べるために、WM39 細胞内の STAT3 を siRNA により枯渇させて cell survival activity への影響をみたところ、STAT3 の減少により cell survival activity は低下した。WM39 細胞では大部分の STAT3 は pS-STAT3 として存在することが上記の蛍光免疫染色実験で示されているので、この結果は WM39 細胞においては cell survival activity と Ser727 燐酸化との間には相関があることを示す。WM35、WM39、WM98-1、WM1205Lu 細胞に U0126 処理を行い Ser727 燐酸化レベルを減少させた際も cell survival activity は低下したことからも黒色腫細胞においては cell survival activity と Ser727 燐酸化との間には相関があることが示された。

ヒト黒色腫組織における pS-STAT3、pY-STAT3 発現をヒト黒色腫 4 病型の一つである末端黒子型黒色腫 (acral lentiginous melanoma: ALM) の原発病巣 15 症例について免疫組織化学染色法により検討した。表皮内病巣のみ有する 9 症例では 5 症例において表皮内腫瘍細胞に pS-STAT3 が主として核に検出されたが、pY-STAT3 は 15 症例のいずれにも検出されなかった。表皮内病巣と真皮内病巣の両方を有する 6 症例においてはすべての症例で pS-STAT3 は表皮内および真皮内の腫瘍細胞に発現していた。一方、pY-STAT3 は 4 症例において真皮内の腫瘍細胞にのみ発現していた。

考察

ポリペプチドリガンドによる STAT3 活性化の場合、STAT3 はまず細胞質で Tyr705 の燐酸化を受け核内に移行し、核内で Ser727 が燐酸化を受ける。しかしながら、今回の研究で私共は、正常メラノサイトと調べた 7 種のすべての黒色腫細胞株で Ser727 は恒常的に燐酸化を受けていることを見いだした。恒常的 Ser727 燐酸化の機序は不明であるが、メラノサイトおよび一部の黒色腫細胞では Tyr705 が燐酸化を受けていないにもかかわらず Ser727 は恒常的に燐酸化を受けていることから、色素細胞における恒常的 Ser727 燐酸化は、ポリペプチドリガンドによる Ser727 燐酸化の場合のように Tyr705 燐酸化の後二次的に起こるものではないことは明らかであり、未知の Ser727 燐酸化制御機構の存在が示唆される。

メラノサイトにおける恒常的 Ser727 燐酸化の制御機構については本研究では検討しておらず不明である。一方、TPA は Tyr705 の燐酸化を起こさずに恒常的 Ser727 燐酸化を亢進させた事実より、恒常的燐酸化のみならず TPA による Ser727 燐酸化もまた Tyr705 燐酸化に付随した二次的なものではないことを示す。

黒色腫細胞の恒常的 Ser727 燐酸化は一部 B-Raf–MEK–ERK1/2 経路で制御されていることが示された。B-Raf の活性化変異は黒色腫発生の鍵となるステップであるこ

とから、恒常的 Ser727 燐酸化は B-Raf の活性化によってメラノサイトに付与される普遍的な形質の一つとして癌化機序の一翼を担っている可能性が考えられ興味深い。

メラノサイトと黒色腫細胞において Ser727 が恒常的に燐酸化を受けていることは Ser727 燐酸化がこれらの細胞で何らかの役割を果たしていることを示唆する。メラノサイト、黒色腫細胞のどちらにおいても Ser727 燐酸化は STAT3 の核移行および cell survival activity と強く相関していたことから、Ser727 燐酸化は STAT3 の核移行および cell survival activity に関与していると予想される。

培養細胞で得られた結果と一致して、黒色腫患者の組織ではしばしば Tyr705 燐酸化を伴わない恒常的 Ser727 燐酸化が表皮内の初期の腫瘍細胞で起こっていた。一方、真皮に浸潤した腫瘍細胞では Ser727 燐酸化と Tyr705 燐酸化のどちらも起こっていた。しかしながら、Tyr705 燐酸化のみが起こっていた細胞は表皮内、真皮内の腫瘍細胞どちらにおいても見られなかった。

私共の研究結果は、(1) STAT3 の Ser727 燐酸化は従来考えられていたように必ずしも Tyr705 燐酸化に伴う二次的なものではないこと、(2) メラノサイト・黒色腫細胞における恒常的 Ser727 燐酸化には、ポリペプチドリガンドによる Ser727 燐酸化の場合とは異なる制御機構が存在すること、および、(3) メラノサイト・黒色腫細胞において Ser727 燐酸化は cell survival activity と STAT3 の核移行に関与する可能性があることを示す。メラノサイト・黒色腫細胞における Ser727 燐酸化のより詳細な制御機構および役割の解明は、黒色腫癌化進展機序の理解を深めると同時に、STAT3 研究において新たな視点を提供すると思われる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2263号	氏 名	坂口 正展
論文題目 Title of Dissertation	メラノサイトとメラノーマ細胞に於ける STAT3 のセリン 727 リン酸化の役割と制御 Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 中村俊一 副 査 Vice-examiner 南博信 副 査 Vice-examiner 片岡徹		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

STAT3 は、多くの重要遺伝子の転写に関わる転写因子である。成長因子などのポリペプチド性の刺激により、STAT3 はチロシン 705 残基の燐酸化を経て２量体となり細胞質から核内に移行し、さらにセリン 727 残基が燐酸化を受けた後、目的遺伝子のプロモーター領域に結合し転写を促進する。STAT3 の活性化には Tyr705 の燐酸化が必要不可欠とされ、STAT3 活性化の指標として Tyr705 の燐酸化が用いられてきた。一方、Ser727 燐酸化の意義については注目されてこなかった。今回申請者らは正常メラノサイトと悪性黒色腫細胞における STAT3 Ser727 燐酸化の役割ついて研究を行った。

まず、正常メラノサイト、悪性黒色腫細胞株７種 および、転移病巣から樹立された３種における Ser727 と Tyr705 の燐酸化状態を調べたところ、すべての細胞で恒常的な STAT3 Ser727 燐酸化が起っていた。一方、Tyr705 燐酸化は正常メラノサイトと原発病変から樹立された２種の黒色腫細胞株 (WM35、WM39) では起っていなかったが、他の５種の黒色腫細胞株では恒常的な Tyr705 燐酸化が起こっていた。正常メラノサイトは増殖因子を枯渇させると cell survival activity の低下をきたすが、TPA はこの低下を阻害することが示されている。メラノサイトを TPA で刺激すると、Ser727 燐酸化は１時間後まで時間依存性に亢進し、その後減少に転じ 24 時間後にほぼ元のレベルに戻った。また、１時間後の cell survival activity は亢進していた。一方、静止期のメラノサイトでは総 STAT3 は主に細胞質に存在し、pS-STAT3 は核内にわずかに存在していた。細胞を TPA で刺激すると１時間後には核内の総 STAT3 は増加し、また核内の pS-STAT3 も増加していた。

これまでに種々の燐酸化酵素 ERK1/2、p38 MAPK、JNK、PKC、mTOR および cdk5 が STAT3 の Ser727 燐酸化を起こすことが報告されている。黒色腫細胞では ERK1/2 阻害剤 U0126 は Ser727 燐酸化レベルを 30～50% 減少させたが、他の燐酸化酵素の阻害剤は影響を与えなかった。次に B-Raf kinase の変異(V600E) が起こっている細胞において B-Raf 阻害薬 PLX4720 は Ser727 燐酸化レベルを減少させた。また WM39 細胞内の STAT3 を siRNA により枯渇させて cell survival activity への影響をみたところ、STAT3 の減少により cell survival activity は低下した。次にヒト黒色腫組織における pS-STAT3、pY-STAT3 発現をヒト黒色腫４病型の一つ

である末端黒子型黒色腫の原発病巣15症例について免疫組織化学染色法により検討した。表皮内病巣のみ有する9症例では5症例において表皮内腫瘍細胞にpS-STAT3が主として核に検出されたが、pY-STAT3は15症例のいずれにも検出されなかった。表皮内病巣と真皮内病巣の両方を有する6症例においてはすべての症例でpS-STAT3は表皮内および真皮内の腫瘍細胞に発現していた。一方、pY-STAT3は4症例において真皮内の腫瘍細胞にのみ発現していた。

ポリペプチドリガンドによるSTAT3活性化の場合、STAT3はまず細胞質でTyr705の燐酸化を受け核内に移行し、核内でSer727が燐酸化を受ける。今回の研究で申請者らは、正常メラノサイトと調べた7種のすべての黒色腫細胞株でSer727は恒常的に燐酸化を受けていることを見いだした。また色素細胞における恒常的Ser727燐酸化は、Tyr705燐酸化の後二次的に起こるものではないことは明らかである。一方、TPAはTyr705の燐酸化を起こさずにSer727燐酸化を引き起こすことを示した。黒色腫細胞の恒常的Ser727燐酸化は一部B-Raf-MEK-ERK1/2経路で制御されていることが示された。メラノサイト、黒色腫細胞のどちらにおいてもSer727燐酸化はSTAT3の核移行およびcell survival activityと強く相関していた。一方、真皮に浸潤した腫瘍細胞ではSer727燐酸化とTyr705燐酸化のどちらも起こっていた。しかしながら、Tyr705燐酸化のみが起こっていた細胞は表皮内、真皮内の腫瘍細胞どちらにおいても見られなかった。メラノサイト・黒色腫細胞におけるSer727燐酸化のより詳細な制御機構および役割の解明は、黒色腫癌化進展機序の理解を深めると同時に、STAT3研究において新たな視点を提供すると思われる。

本研究は、メラノサイト及び黒色種細胞に於けるをSTAT3のSer727燐酸化の役割について研究したものであるが、これらの細胞に於いては従来提唱されていたようにSer727燐酸化はTyr705燐酸化に伴う二次的なものではなくSTAT3の細胞内局在と細胞生存活性を制御する重要な意味を有することは初めて明らかにし、悪性黒色腫の病態を知る上で価値ある集積と認める。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。