

草場 麻里子 論文内容の要旨

主 論 文

Abrogation of constitutive STAT3 activity sensitizes human hepatoma cells
to TRAIL-mediated apoptosis

STAT3 恒常的活性化の阻害は、ヒト肝癌細胞の
TRAIL 誘導アポトーシスへの感受性を高める

草場 麻里子、中尾 一彦、後藤 貴史、西村 大介、川下 浩、柴田 英貴、
本吉 康英、田浦 直太、市川 辰樹、濱崎 圭輔、江口 勝美

Journal of Hepatology • Volume 47, Issue 4, 546-555, 2007

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：江口 勝美 教授)

緒 言

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)は、サイトカイン等のシグナルを伝達する転写因子であり、細胞の増殖、生存、分化に関与している。近年、STAT3 の恒常的活性化が種々の癌細胞の増殖やアポトーシス抵抗性に関与していることが報告され、STAT3 やその活性化に関わるチロシンキナーゼは癌治療の分子標的候補の一つと考えられている。本研究では、肝癌細胞における STAT3 の恒常的活性化の有無、ならびに肝癌細胞の増殖、アポトーシス抵抗性における STAT3 の関与を明らかにし、次に STAT3 の活性化を阻害することで肝癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討を行った。

方 法

ヒト肝癌細胞株 Huh-1, Huh-7, HepG2, Hep3B を用いた。恒常的 STAT3 リン酸化の有無を western blot により確認し、JAK2/STAT の阻害剤である AG490 を添加し STAT3 のチロシン残基リン酸化、転写活性に与える影響を western blot, luciferase assay により検討した。AG490 による細胞増殖抑制、アポトーシス誘導の有無を生細胞数測定と PI 染色により検討した。次に AG490 がアポトーシス関連蛋白 (Bcl-xL, survivin, XIAP, Bax) や細胞周期蛋白 (cyclinD1) の発現に及ぼす影響を western blot により検討した。また、AG490 と TRAIL を併用し、アポトーシスや細胞周期に与える影響を PI

染色で確認した。さらに、AG490, TRAIL の単独、併用治療による抗腫瘍効果を、ヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて検討した。

結 果

全ての肝癌細胞株において、STAT3 チロシン残基の強いリン酸化を認めた。一方、SOCS3 の発現は低下ないし消失していた。AG490 は肝癌細胞株において STAT3 のリン酸化と活性化を阻害した。AG490 は Huh-1, Huh-7, HepG2 において細胞周期停止 (G0/G1 arrest) を引き起こし、Hep3B では著明なアポトーシスを誘導した。全ての肝癌細胞株で AG490 は cyclin D1 の発現を抑制し、抗アポトーシス蛋白である Bcl-xL, survivin, XIAP の少なくとも 1 つの発現を抑制した。

AG490 は Huh-1, Huh-7, HepG2 の TRAIL 感受性を高め、著明なアポトーシスを誘導した。AG490 により、これらの細胞株で TRAIL の death receptor である DR4, DR5 の発現亢進が認められた。ヌードマウス皮下腫瘍モデルにおいて、AG490 の腹腔内投与は、Huh-7 腫瘍の増大を抑制した。AG490 と TRAIL の併用投与はさらに強い抗腫瘍効果を示した。

考 察

Huh-1, Hep3B における STAT3 の恒常的活性化はすでに報告されているが、本研究から Huh-7, HepG2 を含む 4 種のヒト肝癌細胞株において STAT3 の恒常的活性化が確認された。これは JAK/STAT3 シグナル伝達系の negative regulator である SOCS3 の発現がメチル化により低下しているためと考えられた。

AG490 はすべての肝癌細胞株で cyclinD1 の発現を抑制し、Huh-7 と Hep3B において Waf/p21 の発現を促進した。これらの変化が AG490 による肝癌細胞の G0/G1 arrest と関連していると考えられた。一方、Hep3B においては、AG490 により Bax の発現が著明に増強し、この変化がアポトーシス誘導に繋がったと考えられた。また、AG490 は Bcl-xL, survivin, XIAP などの抗アポトーシス蛋白の発現を抑制しており、STAT3 の不活化によって、肝癌細胞はアポトーシスを起こしやすい状況に陥ると推測された。

よって、AG490 が肝癌細胞の TRAIL 誘導アポトーシスへの感受性を高めるかを検討した。TRAIL は腫瘍特異的 death ligand として知られているが、肝癌細胞は TRAIL に抵抗性を示す。AG490 を TRAIL と併用することで Huh-1, Huh-7, HepG2 において著明なアポトーシスが誘導された。また、Huh-7 移植ヌードマウスにおいて、AG490 と TRAIL の併用投与は強い抗腫瘍効果を示した。これらの増強効果は AG490 による TRAIL の death receptor (DR4, DR5) の発現誘導ならびに抗アポトーシス蛋白の発現抑制によるものと考えられた。

本研究によって、JAK2 特異的阻害剤である AG490 を用いて肝癌細胞の STAT3 恒常的活性化を阻害することで、正常肝細胞に影響することなく in vitro と in vivo の両方において、TRAIL の抗腫瘍活性 (アポトーシス誘導) が増強されることが明らかとなった。このことは、JAK/STAT3 が肝癌分子標的治療の候補となりうることを示唆する。