

Title	Interleukin-6に誘導される腎細胞癌の増殖における活性化型STAT3の役割
Sub Title	
Author	堀口, 明男(Horiguchi, Akio) 村井, 勝(Murai, Masaru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.T245- T259
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0245">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0245</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

Interleukin-6 に誘導される腎細胞癌の増殖における  
活性化型 STAT3 の役割

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

(指導：村井 勝教授)

はり くち あき お  
堀 口 明 男

(平成 16 年 3 月 23 日受付)

**Key Words** : renal cell carcinoma, interleukin-6, signal transducer and activator of transcription 3, extracellular signal-regulated kinases, apoptosis

Interleukin-6 (IL-6) は様々な種類の細胞に対して分化誘導や増殖の制御などの多彩な生物学的機能を有する多機能性サイトカインである<sup>1, 2)</sup>。IL-6 の受容体システムはリガンド結合能を有する gp80 と細胞内情報伝達を担う gp130 から構成される<sup>3, 4)</sup>。IL-6 は gp80 と結合することにより gp130 のホモ二量体形成を誘導し、gp130 に恒常的に会合している Janus kinase (Jak) を近接させることにより Jak 同士のリン酸化を促す<sup>5)</sup>。次いで、活性化された Jak は gp130 の細胞内領域に存在するチロシン残基をリン酸化する<sup>6)</sup>。これらのリン酸化されたチロシン残基は細胞内に存在している Src homology 2 (SH2) ドメインを有する Signal transducers and activators of transcription (STAT1 と STAT3) や SH2 domain containing phosphatase 2 (SHP2) などのアダプター分子と会合し、これらのアダプター分子はリン酸化され活性化する<sup>5, 6)</sup>。

リン酸化された STAT3 はホモ二量体または STAT1 とヘテロ二量体を形成後に核内へ移行し、特定の遺伝子発現を調節する転写因子として機能する<sup>7)</sup>。STAT3 は特に cyclin D1 などの細胞周期関連タンパクや bcl-2 などのアポトーシス関連タンパクの発現を制御する<sup>8, 9)</sup>。STAT3 は IL-6 の刺激によってチロシンのリン酸化 (Tyr705 のリン酸化) とセリンのリン酸化 (Ser727 の

リン酸化) を受ける<sup>10)</sup>。STAT3 におけるチロシンのリン酸化は STAT3 の二量体形成、さらに核内移行および DNA への結合に不可欠であるが、セリンのリン酸化の機能的意義については議論が分かれている<sup>5, 10~12)</sup>。一方、リン酸化された SHP2 は mitogen-activated protein kinase (MAPK) family の中で古典的 MAPK とよばれる extracellular signal-regulated kinases (ERKs) をリン酸化し、活性化する<sup>6)</sup>。

IL-6 の細胞内シグナル伝達において Jak-STAT3 経路と SHP2-ERKs 経路が主要な役割を果たしていることは論を待たないが、最近の知見では、それら以外にも、STAT family の一亜型である STAT5 や、MAPK family の一亜型である p38 が IL-6 の刺激によって活性化されるという報告も散見され、他のシグナル伝達経路の関連性も示唆されている<sup>13, 14)</sup>。これらの報告は IL-6 の刺激による細胞内シグナル伝達経路が細胞の種類、由来臓器、細胞環境などにより多種多様であることを示している。また ERKs の活性には様々な機序により STAT3 の活性を制御するクロストークが存在することも報告されている<sup>11, 12, 15, 16)</sup>。

IL-6 は血液系、免疫系など様々な疾患の病態形成に深く関与しており、特に悪性腫瘍では増殖因子として働くことが知られている<sup>2, 17~21)</sup>。泌尿器科領域の悪性腫瘍

本論文は Horiguchi A, Oya M, Marumo K, and Murai M : STAT3, but not ERKs, mediates the IL-6-induced proliferation of renal cancer cells, ACHN and 769P. *Kidney Int* 61 : 926-938, 2002 の一部、また、Horiguchi A, Oya M, Shimada T, Uchida A, Marumo K, and Murai M : Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma : a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome. *J Urol* 168 : 762-765, 2002 の一部を、許可を得て引用した。

では前立腺癌と腎細胞癌において IL-6 が増殖因子であることが指摘されてきた<sup>18, 19)</sup>。特に腎細胞癌においては腫瘍組織で IL-6 および IL-6 受容体の強発現が認められる点、さらに腎癌細胞が IL-6 の刺激により増殖し、抗 IL-6 抗体によって増殖が抑制される点から IL-6 が腎細胞癌の autocrine growth factor であることが以前から示唆されてきた<sup>19, 22)</sup>。また、腎細胞癌患者はしばしば発熱や白血球増加症などの腫瘍随伴症候群を呈するが、IL-6 は病態生理学的に腫瘍随伴症候群の原因の一つであると考えられている<sup>17)</sup>。さらに進行性腎細胞癌患者の多くは血清 IL-6 が高値を示し、血清 IL-6 が高値の症例は低値の症例に比べ予後不良であることが報告されている<sup>17)</sup>。このような背景から IL-6 に誘導される autocrine growth を抑制する治療が腎細胞癌の新たな治療戦略となる可能性が示唆される。しかしながら、IL-6 に誘導される腎細胞癌の増殖に関する細胞内シグナル伝達経路を含めた機序の詳細はいまだに解明されていない。

このような背景から、本研究では IL-6 により誘導される腎細胞癌の増殖に関与している細胞内シグナル伝達経路を解析し、シグナル阻害剤による細胞内シグナルの変化および増殖の抑制効果を検討した。また、IL-6 が autocrine growth factor である悪性腫瘍において、しばしば腫瘍組織内に STAT3 の活性化が認められる<sup>23)</sup>、腎細胞癌においても同様に STAT3 の活性化が認められる可能性があると考え、IL-6 の細胞内シグナルの解析に引き続き、腎細胞癌組織内の STAT3 の活性化を免疫組織学的に解析し、その臨床的意義につき検討した。

## 材料と方法

### 1. 細胞株

4 種のヒト腎癌細胞株 Caki-1 細胞 (以下 Caki-1)、ACHN 細胞 (以下 ACHN)、769P 細胞 (以下 769P)、A498 細胞 (以下 A498) を American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) より購入した。これらの細胞を 50 IU/ml の penicillin (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)、50 µg/ml の streptomycin (Gibco BRL)、10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地 (Gibco BRL) で 5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で培養した。

### 2. 試薬

ヒトリコンピナント IL-6 は Peprtech (Rocky Hill, NJ, USA) より購入し、20 ng/ml の濃度で使用した。抗ヒト IL-6 モノクローナル中和抗体 (以下抗 IL-6 Ab) は R&D systems (Minneapolis, MN, USA) より購入し、

Jak 阻害剤 AG490 と MEK 1 阻害剤 PD98059 は Calbiochem (LaJolla, CA, USA) より購入し、dimethylsulfoxide (DMSO) を溶媒として 50 mM に溶解し、暗所で -70°C に保存した。Phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA) は Calbiochem より購入した。抗 total STAT1 ポリクローナル抗体、抗リン酸化 STAT1 (p-STAT1 (Tyr701)) ポリクローナル抗体、抗 total STAT3 ポリクローナル抗体、抗リン酸化 STAT3 (p-STAT3 (Tyr705)) ポリクローナル抗体、抗リン酸化 STAT5 (p-STAT5 (Tyr694)) ポリクローナル抗体、抗 total p38 ポリクローナル抗体、抗リン酸化 p38 (p-p38 (Thr180/Tyr182)) ポリクローナル抗体、抗 total ERKs ポリクローナル抗体、抗リン酸化 ERKs (p-ERKs (Thr202/Tyr204)) ポリクローナル抗体は New England Biolabs (Beverly, MA, USA) より購入した。抗 total STAT5 モノクローナル抗体、抗 bcl-2 モノクローナル抗体、抗 bcl-xL モノクローナル抗体、抗 bax モノクローナル抗体、抗 mcl-1 モノクローナル抗体は BD Transduction Laboratories, Inc. (Franklin Lake, NJ, USA) より、抗 β-actin モノクローナル抗体は DAKO JAPAN (Tokyo, Japan) より購入した。

### 3. 培養細胞上清中の IL-6 濃度の測定

6 well plate を用いて 1 well に  $1 \times 10^6$  個の細胞を、10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地中で 24 時間前培養した。その後、各 well を無血清培地で洗浄し、培地を 1 ml の無血清培地に交換し、さらに 24 時間培養した。培養上清を回収し、3000 g で遠心分離した後 IL-6 濃度を HS human IL-6 immunoassay kit (R&D systems) を用いた ELISA 法にて測定した。

### 4. RNA の抽出と IL-6 受容体 (gp80, gp130) の RT-PCR 解析

$1 \times 10^7$  個の細胞から Trizol (Gibco BRL) を用いて total RNA を抽出した。1 µg の RNA を Molony murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) とランダムプライマーを用いて逆転写反応を起こした。得られた 2 µl の cDNA を 2 U の Taq polymerase (Boehringer Mannheim) を用いて PCR 法を施行した。35 サイクルの反応後、15 µl の PCR 産物を 1.5% agarose gel で泳動し、ethidium bromide で染色した。PCR に使用した各 primer の塩基配列と予想される PCR 産物の分子量は以下の通りである。

- 1) gp130 (product size 720 bp)  
5'-ACC TAT GAA GAT AGA CCA TCT AAA-3' (sense)  
5'-GGT TCT ATA AAA TAT AGT ATA ATT-3' (antisense)
- 2) gp80 (product size 768 bp)  
5'-ATG CTG GCC GTC GGC TGC GCG CTG-3' (sense)  
5'-TCT GAG CTC AAA CCG TAG TCT-3' (antisense)
- 3) GAPDH (product size 983 bp)  
5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3' (sense)  
5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3' (antisense)

#### 5. ウェスタンブロット解析

細胞を無血清 RPMI 1640 培地で 24 時間前培養した後に IL-6 で刺激した。刺激後に細胞を 100  $\mu$ M Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> を添加した phosphate-buffered-saline (PBS) で洗浄し、lysis buffer (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 50 mM NaF, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>) を加え、細胞溶解液を抽出した。サンプルを SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA) に転写した。次いで、5% スキムミルクを含む Tris-buffered saline (TBS) で非特異的な抗体の結合に対するブロッキングを行った後、一次抗体と反応させた。Amplified alkaline phosphatase system (Bio-Rad) を用いて目的とするバンドを可視化した。Jak 阻害剤 AG490 と MEK1 阻害剤 PD98059 の細胞内シグナルに対する影響を解析する場合は IL-6 による刺激前に AG490 と 16 時間または PD98059 と 1 時間前培養した。アポトーシス関連タンパクの変化を解析する場合は細胞を 100  $\mu$ M AG490 と IL-6 を加え 48 時間から 96 時間培養した後にタンパクを抽出し、同様の方法でウェスタンブロット解析を行った。その後バンドをイメージスキャナーで取り込み、NIH Image 1.52 program (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて定量化した。

#### 6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

核内抽出液を lysis buffer (20 mM HEPES pH7.9, 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20% glycerol, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1

mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin) により抽出した。20  $\mu$ g の核抽出液を 2  $\mu$ g の polydeoxyinosinic-polydeoxycytidylic acid (poly dI-dC; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) と <sup>32</sup>P でラベルされた sis-inducible-element (SIE; 5'-GTG CAT TTC CCG TAA ATC TTG TCT AGA-3') に相同の塩基配列を有する double-strand oligonucleotides とともに binding buffer (10 mM HEPES pH 8.0, 80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT) に室温で 20 分反応させた。サンプルを 4% polyacrylamide gel で泳動分離し、乾燥後に解析した。

#### 7. 細胞量の判定

平底 96 well plate の各 well で、200  $\mu$ l の 10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地中で  $1 \times 10^4$  個の細胞を 24 時間前培養後、試薬を含む無血清 RPMI 1640 培地に交換した。培養後に plate を洗浄し、2% エタノールを含む 0.2% クリスタルバイオレット溶液で細胞を染色し、細胞量を判定した。

#### 8. アポトーシス

アポトーシスを核染色による形態学的観察とフローサイトメトリーを用いた terminal deoxynucleotide transferase-mediated nick-end labeling (TUNEL) 法により判定した。核染色では、細胞を 4% パラホルムアルデヒドにて室温で 30 分固定し、1 mM の Hoechst 33258 (Sigma, St. Louis, MO, USA) で 37°C, 10 分間染色した。細胞の形態を 365 nm に励起した蛍光顕微鏡で観察した。TUNEL 法では、 $1 \times 10^6$  個の細胞を 1% パラホルムアルデヒドで固定した後、断片化した DNA を Apotag Plus Fluorescein (FITC) kit (Oncor, Gaithersburg, MD, USA) で検出した<sup>24)</sup>。FITC でラベルされた細胞を Propidium iodide (PI; Sigma) で対比染色し、EPICS ALTRA flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) で解析した。

#### 9. 腎細胞癌組織の免疫組織染色

1989 年 10 月から 2001 年 8 月の期間に国立埼玉病院において外科的治療を施行した腎細胞癌 48 例 (男性 39 例, 女性 9 例) から得た腫瘍組織と周囲の正常腎組織を対象とした。手術検体の免疫組織染色については施設内の了承を得て施行した。手術日を観察開始日、最終観察日を観察終了日として観察期間を計算した。観察期間は 2 ヶ月から 116 ヶ月 (平均 40 ヶ月) であった。ホ

ルマリン固定後のパラフィン包埋切片を5 μmの厚さに薄切した。切片をキシレンで脱パラフィン、エタノールで親水化した後、抗原賦活の目的で10 mM, pH 6.0のクエン酸バッファーに浸しマイクロウェーブにより60分間加熱した<sup>23, 25</sup>。内因性ペルオキシダーゼ活性を不活性化するために切片に0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を滴下し30分間反応させた。次いで非特異的な抗体の結合を阻止するために10%正常ヤギ血清を滴下し室温で60分間反応させた後、1:25に希釈した抗STAT3ポリクローナル抗体または抗p-STAT3ポリクローナル抗体と4℃で一晩反応させた。そしてSimple stain Max PO (Nichirei Corp., Tokyo, Japan)を滴下し、室温にて60分間反応させ、diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB)を滴下し、室温で10分間反応させ発色させた。TBSにて洗浄した後にヘマトキシリンで対比染色した。切片全体を観察しp-STAT3の陽性細胞率を判定した。腫瘍の病理組織学的診断はWHO分類およびTNM分類にしたがった。

10. 統計学的解析

相対的細胞量の差はunpaired t testにて判定した。p-STAT3の発現と病理組織学的所見との関連はchi-square testにて検討した。低発現群と高発現群の疾患特異的生存率に関するKaplan-Meier生存曲線を作成し、log-rank testにて有意差を検定した。多変量解析には多変量Cox比例ハザードモデルを用いた。IL-6濃度、相対的細胞量は平均値±標準偏差で表示した。P<0.05を統計学的に有意差ありと判定した。

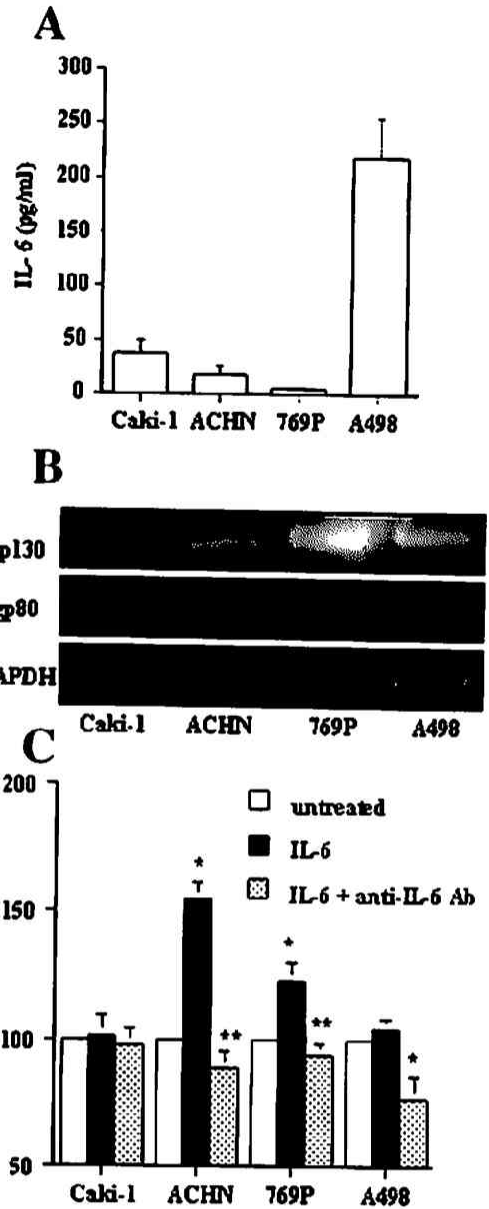
結 果

1. 腎癌細胞におけるIL-6の産生とIL-6受容体の発現

腎癌細胞が培養上清中に産生するIL-6濃度をELISA法により測定した。培養上清中のIL-6濃度はCaki-1が35.3±13.8 pg/ml, ACHNが16.3±9.3 pg/ml, 769Pが4.2±2.0 pg/ml, A498が219±37 pg/mlであった(第1図A)。また、IL-6受容体(gp80とgp130)のmRNAの発現をRT-PCR法で解析した。gp80の発現(768 bp)は全ての細胞に認められたが、gp130の発現(720 bp)はACHN, 769P, A498で認められたが、Caki-1では認められなかった(第1図B)。

2. 外因性に添加されたIL-6と抗IL-6 Abの腎癌細胞の増殖に与える影響

外因性に添加されたIL-6と抗IL-6 Abの腎癌細胞の増殖に与える影響をクリスタルバイオレット法にて検討



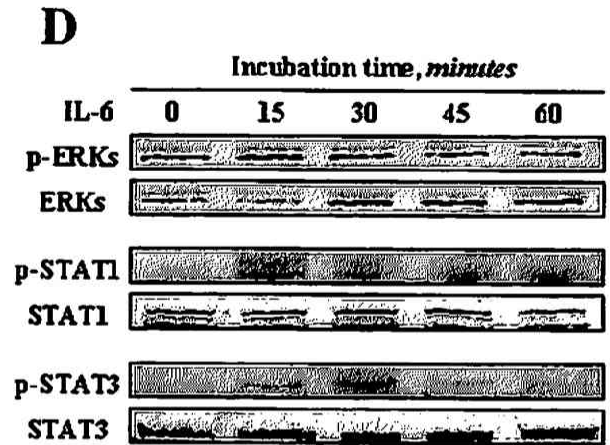
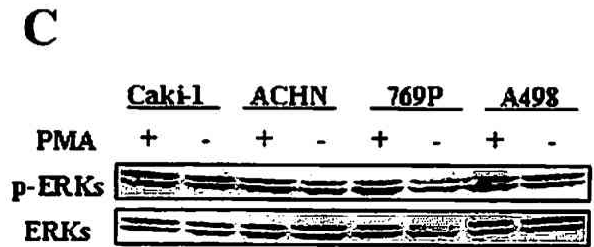
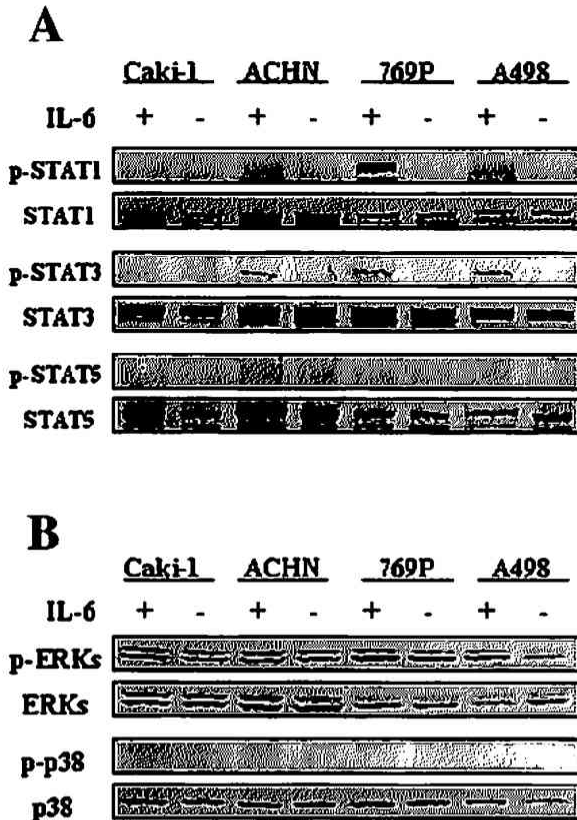
第1図 (A) 腎癌細胞が培養上清中に産生するIL-6濃度の測定。6 well plateの各wellに1×10<sup>4</sup>個の細胞を前培養し、無血清培地に交換した24時間後に上清を回収しELISA法により測定した。結果は独立した3回の測定結果の平均値±標準偏差で表示した。(B) RT-PCR法による腎癌細胞におけるIL-6受容体(gp80とgp130)mRNA発現の解析。gp80, gp130, GAPDHのproduct sizeはそれぞれ720 bp, 768 bp, 983 bpであった。GAPDHはinternal controlとして用いた。(C) IL-6添加による細胞増殖。無治療群(□), 20 ng/ml IL-6を添加した群(■), 1.5 μg/mlの抗IL-6 Abと20 ng/ml IL-6を添加した群(⊞)をそれぞれ96時間培養し、細胞生存率をクリスタルバイオレット染色にて判定した。結果は独立した3回の測定結果の平均値±標準偏差で表示した。\*無治療群に比べ有意な変化(p<0.05), \*\*IL-6添加群に比べ有意な変化(p<0.05) (Horiguchi A et al: Kidney Int 61: 926-938, 2002のFig. 1を許可を得て転載)



した。抗IL-6 Abは20 ng/mlのIL-6の生物学的活性を完全に中和可能とされている1.5  $\mu$ g/mlの濃度で使用した。96時間のIL-6との培養によりIL-6非添加群に比べACHN (154.6 $\pm$ 6.7%)と769P (122.8 $\pm$ 7.1%)で有意な増殖の促進が認められた ( $p < 0.05$ , 第1図C)。また、その増殖促進効果は抗IL-6 Abの添加によって有意に抑制された ( $p < 0.05$ , 第1図C)。A498ではIL-6の添加による有意な増殖促進効果は認めなかったが、IL-6非添加群に比べ抗IL-6 Abの添加によって増殖は有意に抑制された ( $p < 0.05$ , 第1図C)。gp130のmRNAの発現が認められなかったCaki-1ではIL-6、抗IL-6 Abともに増殖に有意な影響を与えなかった (第1図C)。

### 3. 腎癌細胞におけるIL-6刺激による細胞内シグナルの解析

腎癌細胞におけるIL-6刺激による細胞内シグナルを抗リン酸化特異的抗体によるウェスタンブロット法により解析した。まず、IL-6によるSTAT1, STAT3, STAT5のチロシンリン酸化を検討した。無血清培地中で飢餓状態にある細胞をコントロールとして、IL-6で15分刺激した細胞とSTATのリン酸化レベルを比較した。活性化型、非活性化型を含むtotal STAT1, total STAT3, total STAT5の発現は全ての細胞で認められ、その発現レベルはIL-6刺激により変化しなかった (第2図A)。gp130の発現を認めなかったCaki-1以外でSTAT1とSTAT3のチロシンリン酸化が認められた (第2図A)。一方、全ての細胞でSTAT5のチロシン



第2図 腎癌細胞におけるIL-6刺激による細胞内シグナル経路の解析。無血清培地中の細胞を20 ng/mlのIL-6で15分間刺激した。STAT1, STAT3, STAT5のリン酸化(A)、ERKsとp38のリン酸化(B)を活性化型のみを認識するリン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロット法によって解析した。(C)無血清培地中の細胞を無治療、または100 ng/mlのPMAで刺激し、ERKsのリン酸化レベルをウェスタンブロット法により解析した。(D)IL-6で刺激したACHNにおけるSTAT1, STAT3, ERKsのリン酸化の経時的変化。無血清培地中の細胞を15分から60分間IL-6で刺激し、ウェスタンブロット法により解析した。(Horiguchi A et al: *Kidney Int* 61: 926-938, 2002のFig. 2を許可を得て転載)

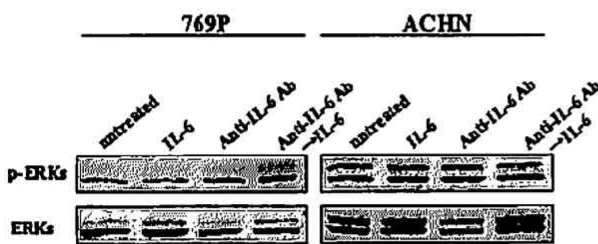
リン酸化は認められなかった (第2図A).

次いで、IL-6刺激によるERKsとp38のリン酸化を検討した。活性化型、非活性化型を含むtotal ERKs, total p38, の発現は全ての細胞で認められ、その発現レベルはIL-6刺激により変化しなかった (第2図B). ERKsはIL-6の刺激前から全ての細胞で恒常的にリン酸化されており、そのレベルは外因性に添加されたIL-6により上昇しなかった (第2図B). p-ERKsの陽性コントロールとして、ERKsの強い刺激物質であるPMAを加えERKsのリン酸化レベルの変化を観察したところ、Caki-1と769PではERKsのリン酸化レベルの上昇が認められた (第2図C). 一方、全ての細胞でp38のリン酸化は認められなかった (第2図B).

さらに、ACHNにおけるIL-6刺激後15分から60分のSTAT1, STAT3, ERKsの経時的なリン酸化の変化を検討した。STAT1とSTAT3のリン酸化は一過性で、IL-6刺激後15分以内にリン酸化の上昇が認められ、60分後には非刺激時のレベルに戻った (第2図D). しかしERKsのリン酸化レベルは終始変化しなかった (第2図D).

#### 4. 恒常的なERKsのリン酸化と腎癌細胞が産生する内因性IL-6の関連

ERKsがIL-6の主要なシグナル伝達経路である点<sup>6, 26)</sup>、腎癌細胞が検出可能なレベルのIL-6を培養上清中に産生している点 (第1図A) から、腎癌細胞が産生している内因性IL-6が恒常的なERKsのリン酸化の原因である可能性を考え、抗IL-6 Abとの培養による内因性IL-6活性の抑制を介したERKsのリン酸化レベルの変化



第3図 内因性IL-6の中和によるERKsのリン酸化レベルの変化。無血清培地中の769PとACHNの無治療群、IL-6で15分刺激した群、抗IL-6 Abと24時間培養した群、抗IL-6 Abと24時間培養後にIL-6で15分間刺激した群から得たサンプルを用いてウェスタンブロット法で解析した。ERKsのリン酸化レベルに変化は認めなかった。(Horiguchi A et al: Kidney Int 61: 926-938, 2002のFig. 3を許可を得て転載)

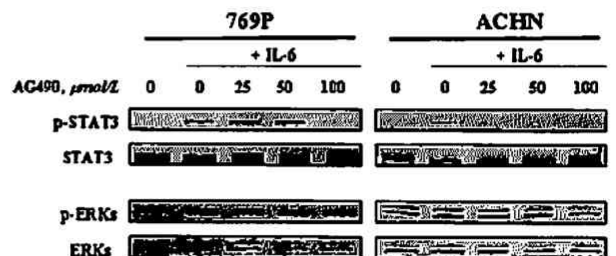
を検討した。ACHN, 769Pの無治療群、15分間外因性のIL-6で刺激をした群、24時間抗IL-6 Abと培養した群、24時間抗IL-6 Abと培養した後にIL-6で15分間刺激した群でERKsのリン酸化レベルをウェスタンブロット法で比較検討した。ACHN, 769Pの両者とも抗IL-6 AbによるERKsのリン酸化レベルの低下は認めず、また引き続きIL-6刺激でもリン酸化レベルの上昇は認められなかった (第3図). Caki-1, A498でも同様の結果であった。

#### 5. Jak阻害剤AG490のSTAT3とERKsのリン酸化への影響

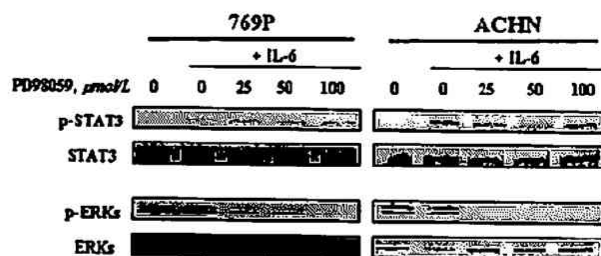
IL-6刺激はgp130の二量体形成を促し、Jak1, Jak2, Tyk2をリン酸化し、引き続きSHP2, STAT3が活性化する<sup>5, 6)</sup>。腎癌細胞のIL-6の細胞内シグナルにおけるJakの役割を検討するために、Jak阻害剤AG490によるSTAT3とERKsのリン酸化への影響を検討した。ACHNと769Pを16時間AG490と前培養した後にIL-6で刺激したサンプルでウェスタンブロット法を施行した。ACHNでは25 μMのAG490で、769Pでは100 μMのAG490でIL-6刺激によるSTAT3のリン酸化が抑制された (第4図). しかしながら、ERKsの恒常的なリン酸化は100 μMのAG490でも抑制されなかった (第4図).

#### 6. 恒常的なERKsのリン酸化の抑制によるSTAT3のリン酸化への影響

ERKs活性とSTAT3活性のクロストークは細胞の種類や活性の状態により多岐にわたることが報告されてい



第4図 IL-6で刺激した腎癌細胞におけるJak阻害剤AG490のSTAT3とERKsのリン酸化への影響。無血清培地中の769PとACHNの無治療群、IL-6で15分間刺激した群、様々な濃度のAG490と16時間混合培養した後にIL-6で15分間刺激した群から得たサンプルを用いてウェスタンブロット法で解析した。(Horiguchi A et al: Kidney Int 61: 926-938, 2002のFig. 4を許可を得て転載)



第5図 IL-6で刺激した腎癌細胞におけるMEK1阻害剤PD98059のSTAT3とERKsのリン酸化への影響。無血清培地中の769PとACHNの無治療群、IL-6で15分間刺激した群、様々な濃度のPD98059と1時間混合培養した後にIL-6で15分間刺激した群から得たサンプルを用いてウェスタンブロット法で解析した。(Horiguchi A et al: *Kidney Int* 61: 926-938, 2002のFig. 5を許可を得て転載)

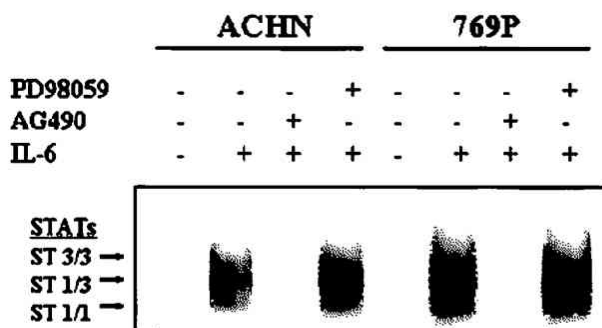
る<sup>11, 12, 15, 16)</sup>。ERKsがSTAT3のセリンのリン酸化を通じてSTAT3の活性を上昇させるという報告がある一方で、ERKsがSTAT3のチロシンリン酸化よりも上流レベルでSTAT3の活性を抑制するという報告も存在する<sup>11, 16)</sup>。我々が検討した全ての腎癌細胞でERKsの恒常的リン酸化が認められたため、ERKsがSTAT3の活性に何らかの影響を与えている可能性があると考えた。ACHNと769Pを1時間MEK1阻害剤PD98059と培養した後にIL-6の刺激を加えたサンプルでERKsとSTAT3のリン酸化を比較検討した。ERKsのリン酸化はACHN, 769Pともに25  $\mu\text{M}$ のPD98059で抑制されたが、STAT3のチロシンリン酸化は100  $\mu\text{M}$ のPD98059でも変化しなかった(第5図)。

#### 7. AG490とPD98059によるSTATとDNAの結合能に与える影響

次いで、IL-6によるSTATのチロシンリン酸化に加え、STATとDNAの結合能の上昇とAG490またはPD98059による抑制の有無を検討した。32Pでラベルした、活性化したSTAT1とSTAT3が高い親和性で結合することが自明であるSIEプローベを用いたEMSAを施行した。ACHNと769PではIL-6刺激により速やかにSIEプローベに結合するSTAT-DNAの複合体が確認され、その結合能はAG490によって著明に抑制されたが、PD98059に影響されなかった(第6図)。

#### 8. AG490によるIL-6誘導性の腎癌細胞の増殖抑制

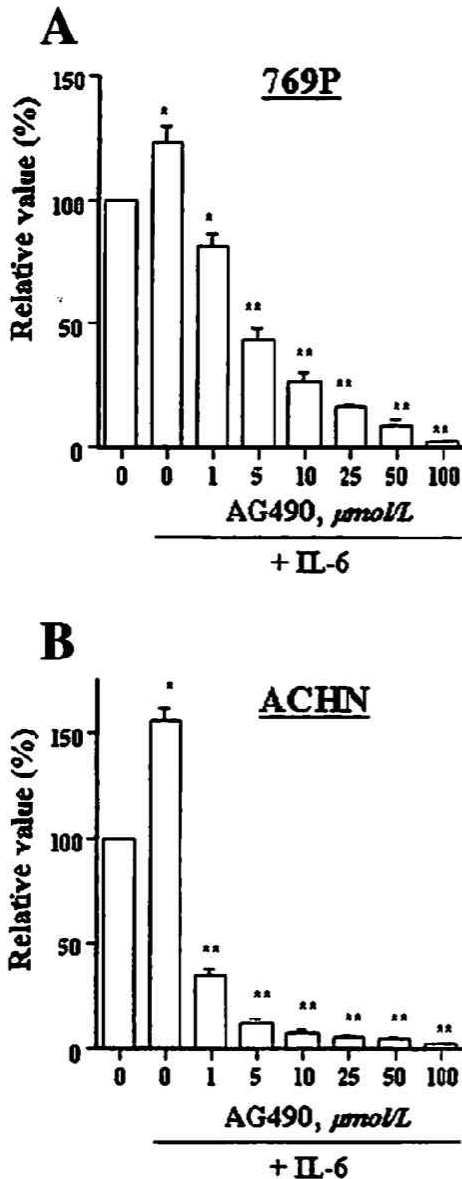
これまでの結果から腎癌細胞ACHNおよび769Pに



第6図 IL-6刺激により亢進したSTAT-DNA結合能のAG490とPD98059による影響。無血清培地中のACHNと769Pの無治療群、IL-6で15分間刺激した群、100  $\mu\text{M}$ のAG490(16時間)またはPD98059(1時間)と混合培養した後にIL-6で15分間刺激した群から得た核抽出液を、活性化したSTAT1とSTAT3に結合する<sup>32</sup>PでラベルしたSIE oligonucleotideプローベと反応させ、EMSAで解析した。左にSTAT3のホモ二量体(ST3/3と表示)、STAT1とSTAT3のヘテロ二量体(ST1/3と表示)、STAT1のホモ二量体(ST1/1と表示)を記す。(Horiguchi A et al: *Kidney Int* 61: 926-938, 2002のFig. 6を許可を得て転載)

においてIL-6は主にSTAT3を活性化することで増殖傾向を示し、Jak阻害剤AG490はIL-6の誘導するSTAT3のチロシンリン酸化と核内でのDNA結合能を抑制することが示された。次いで、IL-6による細胞内シグナルをJak阻害剤AG490で抑制した結果、IL-6の誘導する細胞増殖にどのような影響を与えるかを検討した。ACHNと769PをIL-6と様々な濃度のAG490の存在下で96時間培養したところ、両者で濃度依存性の増殖抑制効果が認められた(第7図)。ACHNでは1  $\mu\text{M}$ の濃度から有意な増殖抑制効果が認められ、その $\text{IC}_{50}$ 値は0.5  $\mu\text{M}$ であった。769Pでは1  $\mu\text{M}$ の濃度から有意な増殖抑制効果が認められ、その $\text{IC}_{50}$ 値は3.5  $\mu\text{M}$ であった。AG490の溶媒であるDMSOによる細胞障害は、検討したAG490の最高濃度である100  $\mu\text{M}$ 溶液を作成するのに要したDMSOとの混合培養で全く細胞障害が認められないことから除外可能と考えられた。AG490の非特異的反応を検討するために、IL-6非刺激下でAG490を反応させたところ、ACHN, 769Pとも有意な増殖抑制が認められた。しかし、増殖抑制に要した濃度はIL-6刺激下での濃度に比べ高濃度で、両者とも $\text{IC}_{50}$ 値は10.0  $\mu\text{M}$ であった。さらに、IL-6に反応を示さなかったCaki-1でもAG490による増殖抑制が認められたが、増殖抑制に要した濃度はIL-6刺激下での





第7図 IL-6刺激に誘導される腎癌細胞増殖に対するAG490の効果。96 well plateに $1 \times 10^4$ 個のACHN(A)または769P(B)を200  $\mu$ lの10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地に前培養した。24時間後に無血清培地、またはIL-6を含む無血清培地、または様々な濃度のAG490とIL-6を含む無血清培地に交換し、96時間後に細胞量をクリスタルバイオレット法にて判定した。結果は独立した3回の測定結果の平均値 $\pm$ 標準偏差で表示した。\*無治療群に比べ有意な変化( $p < 0.05$ )、\*\*無治療群に比べ有意な変化( $p < 0.01$ )。(Horiguchi A et al: Kidney Int 61: 926-938, 2002のFig. 7を許可を得て転載)

ACHNと769Pの増殖抑制に要した濃度よりも高濃度であり、 $IC_{50}$ 値は30.0  $\mu$ Mであった。

#### 9. AG490によるアポトーシスの誘導

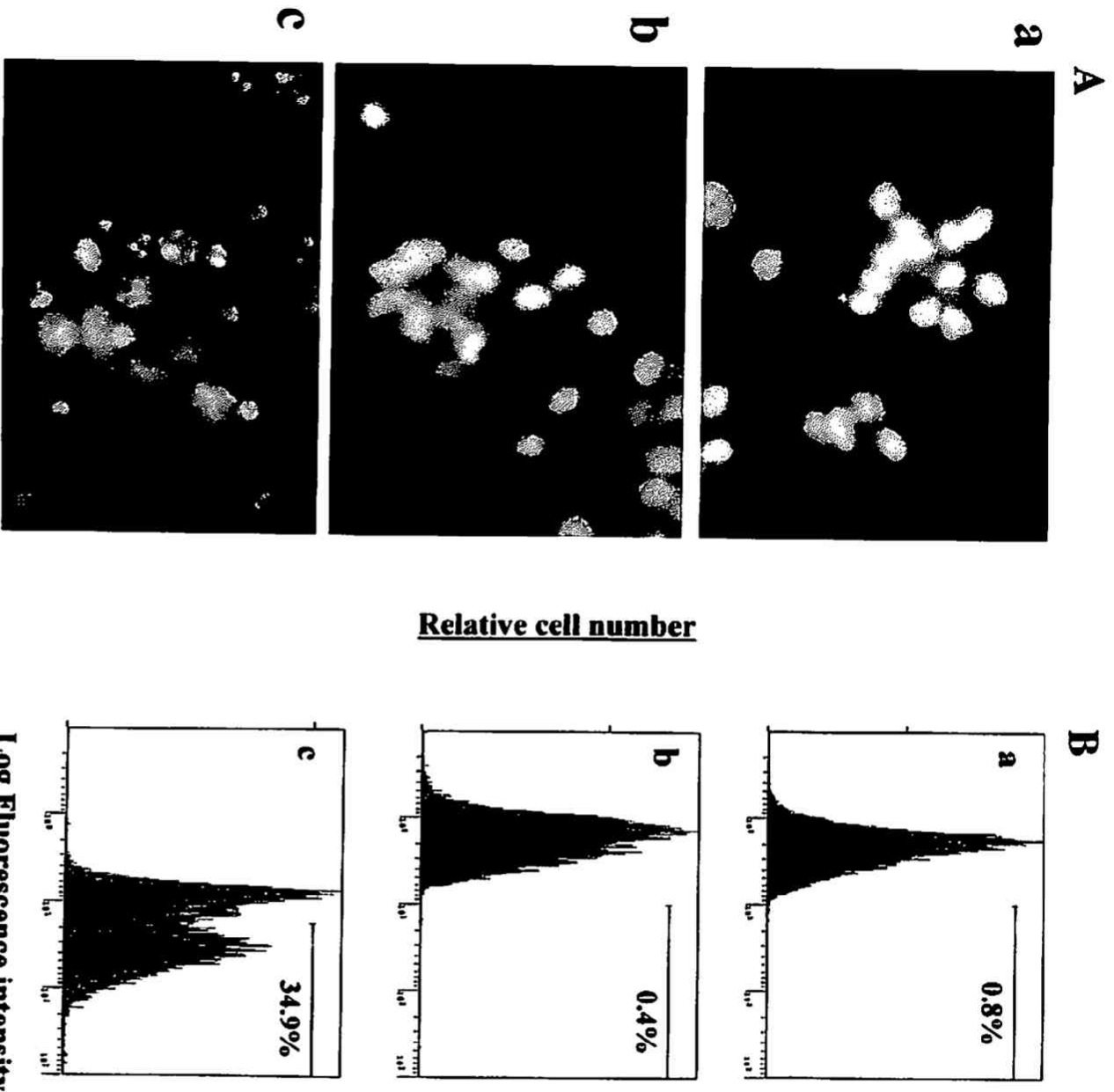
STAT3の活性化はアポトーシスを抑制することが報告されている<sup>8,9,21)</sup>。IL-6刺激による細胞内シグナルをAG490により抑制することでアポトーシスが誘導可能かをHoechst 33258を用いた核染色による形態学的観察とフローサイトメトリーを用いたTUNEL法により検討した。ACHNの無治療群、IL-6刺激をした群、100  $\mu$ MのAG490添加後にIL-6刺激をした群をそれぞれ96時間培養した。それぞれの細胞をHoechst 33258を用いて核染色したところAG490添加後にIL-6刺激をした群ではアポトーシスの典型的な所見である、核の断片化とクロマチンの濃縮が認められた(第8図A)。また、フローサイトメトリーを用いたTUNEL法ではアポトーシスが認められた細胞の割合は無治療群、IL-6刺激をした群でそれぞれ0.8%、0.4%であったのに対して、AG490添加後にIL-6刺激をした群では34.9%に認められた(第8図B)。769Pでも同様のアポトーシス誘導が確認された。

#### 10. AG490によるアポトーシス関連タンパクの発現変化

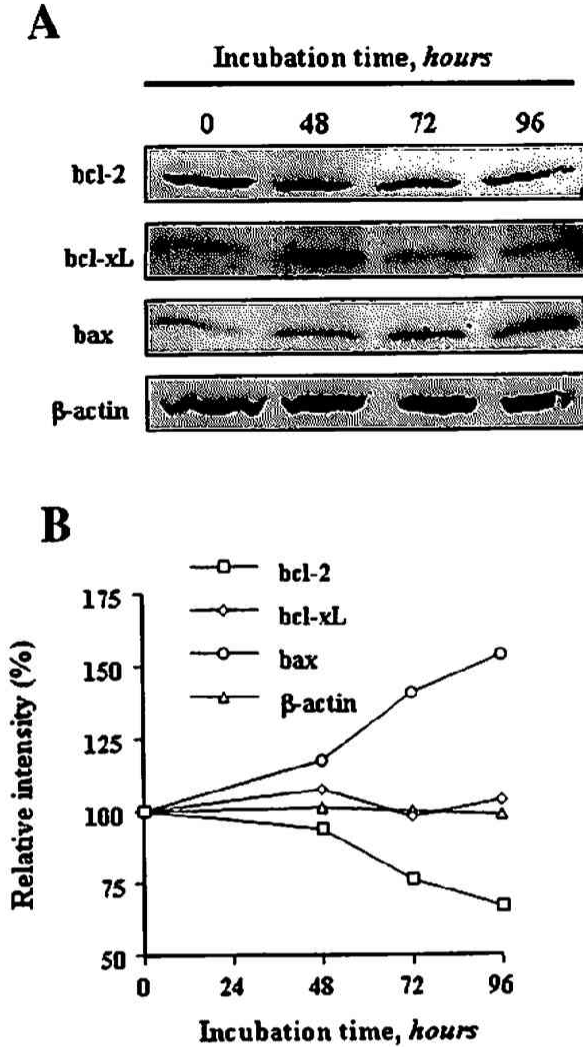
腎癌細胞でAG490に誘導されるアポトーシスの機序を検討するため、アポトーシス関連タンパクであるbcl-2、bcl-xL、mcl-1、baxのAG490による発現の変化をウェスタンブロット法で検討した。ACHNを用いて100  $\mu$ MのAG490添加後にIL-6で刺激し、48時間から96時間までの変化を観察した。治療開始前の発現レベルではbcl-2、baxの発現は認められたが、bcl-xLの発現は低く、mcl-1の発現は認められなかった。治療後96時間でbcl-2の発現は治療開始前の66.9%に低下し、baxの発現は153.5%に増加したが、bcl-xLの発現は変化しなかった(第9図)。

#### 11. 腎細胞癌組織におけるp-STAT3とtotal STAT3の発現

IL-6が腎細胞癌のautocrine growth factorである点、腎細胞癌患者の血清中及び腫瘍組織中には有意な量のIL-6が存在している点、またこれまでの結果から腎癌細胞におけるIL-6の細胞内シグナルが主にJak-STAT3経路を介している点から、腎癌組織中にSTAT3の活性化が認められる可能性が考えられた。48例の腎細胞癌組織のパラフィン包埋切片を対象にp-ST

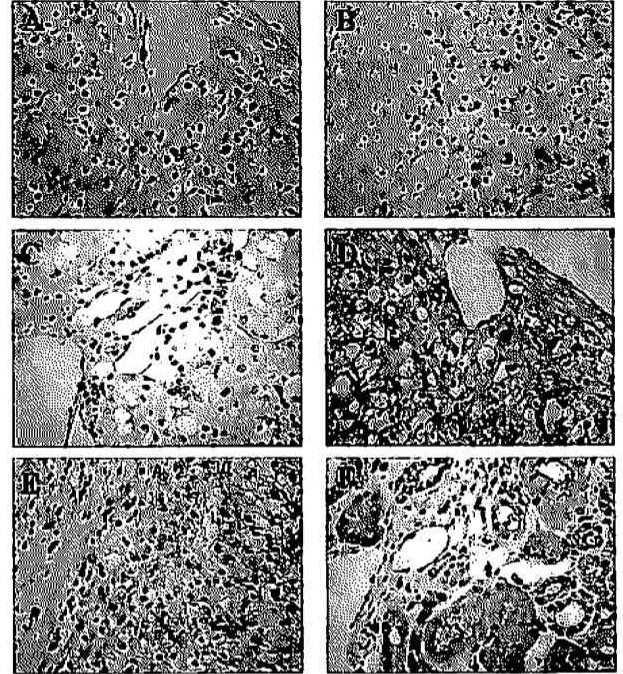


第8図 ACHNのAG490によるチロチンシスの誘導。無血清培地中の無治療のACHN (a), IL-6刺激下のACHN (b), 100  $\mu$ MのAG490とIL-6を投与したACHN (c)を96時間培養した。(A) Hoechst 33258で染色したACHNの蛍光顕微鏡所見。100  $\mu$ MのAG490とIL-6を投与したACHNではチロチンに特徴的な核の濃縮、断片化が認められた。(B) フローサイトメトリーを用いたTUNEL法によるチロチンシスの判定。ヒストグラムは細胞内のDNA断端の割合を示す。対数変換した蛍光強度が101を超える細胞をチロチンシス陽性と判定した。(Horiguchi A et al : *Kidney Int* 61 : 926-938, 2002のFig. 8を許可を得て転載)



第9図 (A) ウェスタンブロット法によるアポトーシス関連タンパク bcl-2, bcl-xL, bax の発現変化の解析。100 μM の AG490 と IL-6 を投与した ACHN を 48 時間から 96 時間培養したサンプルを用いて解析した。β-actin は internal control として用いた。(B) バンドの定量値の変化を治療開始直後を 100% とした相対値で表示した。□ は bcl-2, ◇ は bcl-xL, ○ は bax, △ は β-actin を示す。(Horiguchi A et al : *Kidney Int* 61 : 926-938, 2002 の Fig. 9 を許可を得て転載)

AT3, total STAT3 の発現を免疫組織学的に検討した。p-STAT3 の発現には腫瘍間の差が認められたが、発現例では腫瘍細胞の核内に強い p-STAT3 の染色像が認められた(第 10 図 A, B)。STAT3 は細胞質内で非活性化型の状態で存在し、刺激が加わることによりチロシンリン酸化が起こり、二量体を形成し核内へ移行する<sup>2)</sup>。したがって、核内に p-STAT3 の染色像が認められたこ



第 10 図 腎細胞癌組織および腫瘍周囲の正常腎組織における p-STAT3 および total STAT3 の免疫組織染色像 (400 倍)。(A) p-STAT3 高発現例の p-STAT3 染色像、腫瘍細胞核内に著明な染色像を認める。(B) p-STAT3 低発現例の p-STAT3 染色像。(C) 高発現例 (A) の正常腎組織の p-STAT3 染色像。(D) 高発現例 (A) と同部位の total STAT3 染色像。(E) 低発現例 (B) と同部位の total STAT3 染色像。(F) 正常腎組織 (C) と同部位の total STAT3 染色像を示す。(Horiguchi A et al : *J Urol* 168 : 762-765, 2002 の Fig. 1 を許可を得て転載)

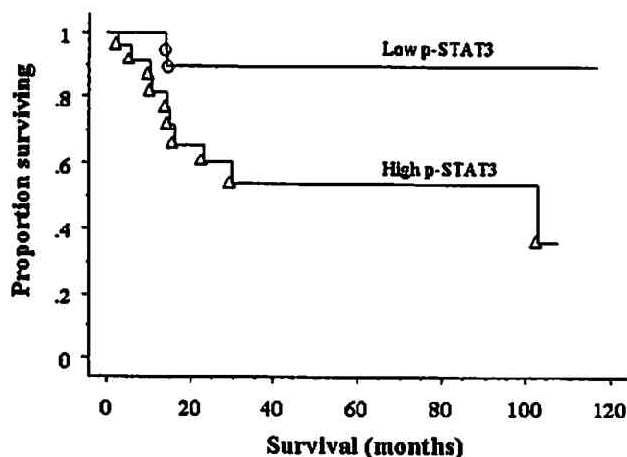
とは腎癌組織中で STAT3 の活性化が認められる有力な根拠になると考えられた。したがって、p-STAT3 の陽性像を STAT3 の活性化と考えた。p-STAT3 の陽性細胞率は腫瘍によって両極端であり、10%以下の陽性率を示す群と、90%以上の陽性率を示す群に分かれたため、それぞれを低発現群、高発現群と定義した。低発現群、高発現群はそれぞれ 24 例 (50%) であった。腫瘍周囲の正常腎組織では p-STAT3 の発現はほとんど認められなかった(第 10 図 C)。一方、total STAT3 は p-STAT3 の発現のレベルに関係なく、また正常腎組織においても、ほぼ同レベルの発現が認められた(第 10 図 D~F)。

## 12. p-STAT3 の発現と病理組織学的所見との関連

p-STAT3 の発現と進展度 (T 分類)、異型度、手術時の遠隔転移の有無、組織型との関連を第 1 表に示す。

第1表 p-STAT3の発現レベルと病理組織学的所見との関連  
Lowは低発現例、Highは高発現例を示す。有意差はchi-square testにより判定した。  
(Horiguchi A et al: J Urol 168: 762-765, 2002のTable 1を許可を得て転載)

	No. Pts	p-STAT3 staining		p Value
		Low	High	
<b>Pathological stage</b>				
T1-T2	36	19	17	N. S.
T3-T4	12	5	7	
<b>Metastatic disease</b>				
M0	41	24	17	0.0094
M1	7	0	7	
<b>Histological grade</b>				
G1	17	9	8	N. S.
G2-G3	31	15	16	
<b>Histological subtype</b>				
Clear cell	41	20	21	N. S.
Granular	4	2	2	
Papillary	1	0	1	
Sarcomatoid	2	2	0	



第11図 p-STAT3発現レベル別のKaplan-Meier疾患特異的生存曲線。低発現群対高発現群で比較し、log-rank検定により有意差ありと判定した(p=0.0117)。(Horiguchi A et al: J Urol 168: 762-765, 2002のFig. 2を許可を得て転載)

p-STAT3と病理学的進展度、異型度、組織型の間に関連は認めなかった。一方、手術時に遠隔転移を有する7例は全てp-STAT3高発現群であったが、遠隔転移のない41例ではp-STAT3高発現群は17例のみと有意差を認めた(p=0.0094, 第1表)。

### 13. p-STAT3の発現と予後の関連

p-STAT3高発現群と低発現群の疾患特異的生存率を単変量解析にて比較したところ、高発現群は低発現群に比べ有意に予後不良であった(p=0.0117, 第11図)。単変量解析にて判明した有意な予後因子はp-STAT3の高発現、手術時の遠隔転移の存在(p<0.0001)、異型度がgrade 2またはgrade 3(p=0.0181)、進展度がT3またはT4(p=0.0272)、clear cell carcinoma以外の組織型(p=0.0371)であった。多変量Cox比例ハザードモデルによる解析では手術時の遠隔転移の存在(p=

第2表 多変量Cox比例ハザードモデルによる独立予後因子の解析

Hazard Ratioはハザード比。95%CIは95%信頼区間を示す。(Horiguchi A et al: J Urol 168: 762-765, 2002のTable 2を許可を得て転載)

Variable	Hazard Ratio	95% CI	p Value
Pathological stage (T3-4)	3.749	0.840-16.728	0.0833
Metastatic disease (M1)	7.463	1.345-41.417	0.0215
Histological grade (G2-3)	5.804	0.505-66.656	0.1579
Histological subtype (other than clear cell)	19.556	2.396-159.577	0.0055
p-STAT3 staining (high)	9.293	1.345-41.417	0.0439

0.0215), clear cell carcinoma 以外の組織型 ( $p=0.0055$ ), そして p-STAT3 の高発現 ( $p=0.0439$ ) が独立した予後予測因子であった (第2表).

## 考 察

IL-6 が腎細胞癌の増殖に重要な役割を果たしていることは以前より指摘されていたが<sup>17, 19, 22)</sup>, その細胞内シグナルなどの詳細な機序は検討されていない. 本研究では IL-6 による細胞内シグナルの解析に先立って, 4種の腎癌細胞株 Caki-1, ACHN, 769P, A498 を用いて培養上清中への IL-6 の産生および IL-6 受容体の発現, 外因性 IL-6 による増殖促進効果について確認した. ACHN と 769P において外因性 IL-6 による有意な増殖促進効果が認められたが, 他の細胞株より高い IL-6 産生能を有し, IL-6 受容体の発現が認められた A498 では増殖促進効果は認められなかった. しかしながら, A498 で無治療群および外因性 IL-6 投与群に比し, 抗 IL-6 Ab 投与群の増殖に有意な抑制が認められたことから, A498 の増殖に少なくとも部分的には IL-6 が関与していると考えられた. Caki-1 が外因性 IL-6, 抗 IL-6 Ab とともに反応を示さなかったのは IL-6 による細胞内シグナル伝達に不可欠な gp130 の発現が認められなかったためと考えられる<sup>3, 4)</sup>. これらの結果から過去の報告と同様に, IL-6 が腎癌細胞に対して autocrine あるいは paracrine growth factor として働いていることを確認した<sup>19, 22)</sup>.

腎癌細胞における IL-6 の細胞内シグナルを解析するにあたり, IL-6 が腎細胞癌以外の様々な悪性腫瘍の growth factor である点に着目した<sup>18, 21, 26, 27)</sup>. IL-6 による増殖を介するシグナル経路は細胞によって大きく異なる. 例えば, IL-6 依存性 hybridoma である B9 細胞やいくつかの多発性骨髄腫由来の細胞株では STAT3 の活性化は IL-6 による増殖に無関係であり, ERKs の活性化に依存している<sup>26)</sup>. 一方, 前立腺癌細胞株や骨髄腫細胞株 U266 では IL-6 による増殖は STAT3 の活性化に依存している<sup>21, 27)</sup>. 本研究では, gp130 の発現が認められない Caki-1 以外の細胞で IL-6 刺激による STAT3 と, わずかながら STAT1 のチロシンリン酸化と DNA 結合能の上昇が認められた. STAT1 が IL-6 による増殖に関与している可能性を否定しきれないが, 最近の知見では STAT1 は STAT3 と相反する作用があり, 腫瘍の増殖に抑制的であると考えられている<sup>28-30)</sup>. 今回の結果からは IL-6 刺激による STAT3 の活性が STAT1 の活性を上回った結果, 細胞増殖に傾いた可能

性が考えられる. 一方, STAT3 以外の主要な IL-6 のシグナル伝達経路である ERKs は, 検討した全ての細胞株で恒常的に活性化されていた. ERKs の活性化レベルは外因性の IL-6 刺激によっても, 抗 IL-6 Ab による内因性の IL-6 の中和によっても変化しなかった. また, Jak 阻害剤 AG490 による Jak レベルでの IL-6 のシグナル抑制によっても ERKs の活性は変化しなかった. また ERKs と STAT3 の間のクロストークも認められなかった. これらの結果から IL-6 に誘導される腎癌細胞の増殖は STAT3 を介しており, ERKs に非依存的であると結論した.

腎癌細胞における ERKs の恒常的活性化の原因は現在のところ明らかではない. 過去の報告では腎細胞癌の大部分で ERKs の恒常的活性化があり, 活性化のレベルは腫瘍の異型度と進展度に比例し上昇するとされている<sup>31)</sup>. ERKs は IL-6 以外の epidermal growth factor (EGF) や transforming growth factor (TGF) - $\alpha$  などの増殖因子によっても活性化することが知られており<sup>32)</sup>, それらは腎細胞癌の autocrine growth factor であると報告されている<sup>33)</sup>. したがって, それらの growth factor のシグナルが ERKs の恒常的活性化に関与している可能性が予想される.

本研究で使用した Jak 阻害剤 AG490 は恒常的な Jak2 の活性化を有する急性リンパ芽球性白血病由来の細胞に対する増殖抑制作用を有し, アポトーシスを誘導することが最初に報告された<sup>34)</sup>. 過去の報告に述べられているように AG490 は Jak family (Jak1, Jak2, Jak3) 以外のチロシンキナーゼを抑制しないということ<sup>34-36)</sup>, Jak を発現していない Jurkat 細胞などの増殖を抑制しないことなどから AG490 の Jak への特異性は高いと考えられる<sup>35, 37)</sup>. また, 最近の報告では AG490 が STAT5 や ERKs の活性を抑制することが知られているが<sup>35, 36)</sup>, 今回の結果では STAT5 は無刺激の状態でも, IL-6 刺激下でも活性化が認められなかった点, また ERKs の恒常的活性化は 100  $\mu$ M の AG490 でも抑制されなかった点から考えて, 少なくとも AG490 が STAT5 や ERKs の活性を抑制した可能性は除外できると考えられる. AG490 は無刺激の細胞に対しても有意な増殖抑制効果を示したが, IL-6 刺激下の細胞に比べ高い濃度を要した. 我々の結果と同様に, サイトカイン刺激下と非刺激下で AG490 に対する感受性が異なる例が過去の論文で報告されている<sup>38)</sup>. AG490 の Jak に対する特異性から考えて, IL-6 刺激下と非刺激下で増殖抑制に要する AG490 の濃度の差は IL-6 刺激下と非刺激下における Jak の活性の差が原因であると考えられる.



最近の研究でAG490は種々の癌細胞におけるSTAT3の活性を抑制し、アポトーシスを誘導することで増殖を抑えることが報告されている<sup>21, 27, 36)</sup>。そのため本研究ではAG490がIL-6によるSTAT3の活性を抑制することがアポトーシス関連タンパク bcl-2, bcl-xL, mcl-1, bax の発現を制御し、アポトーシスを誘導するか検討した。過去の研究結果と同様にAG490はACHNと769PにおいてIL-6によるSTAT3の活性化を抑制し、bcl-2のdown regulationとbaxのupregulationを伴うアポトーシスを誘導した。アポトーシス関連タンパクの中でbcl-2は腎細胞癌で高頻度に発現していると報告されており、腎細胞癌におけるbcl-2の過剰発現は腎細胞癌が通常の化学療法や放射線療法に耐性を示す一因と考えられている<sup>39, 40)</sup>。AG490がbcl-2のdown regulationを起こしたことは、腎細胞癌におけるbcl-2の発現にSTAT3が関与している可能性を示唆する。

最近の研究では、IL-6によるautocrine growthが指摘されている悪性腫瘍において、しばしばSTAT3の恒常的活性化が報告されている。泌尿器科領域の悪性疾患では前立腺癌組織中に高頻度のSTAT3の活性化が認められており、IL-6によるautocrine growthが原因と考えられている<sup>23)</sup>。本研究で我々は腎細胞癌組織中のSTAT3の活性化をp-STAT3の免疫組織学的に評価したところ、高頻度(50%)に活性化が認められた。さらに、STAT3の活性化は手術時の遠隔転移の存在と有意に関連し、多変量解析において有意な予後予測因子であった。この結果はSTAT3の活性化が腎細胞癌の増殖進展に深く関わっていることを示唆している。STAT3の活性化の原因としてtotal STAT3の過剰発現とSTAT3への慢性的な刺激の存在が考えられる<sup>41)</sup>。しかし第10図に示す通り、total STAT3の発現はSTAT3の活性化のレベルとは無関係であり、正常腎組織においても腫瘍と同レベルの発現が認められることから前者の可能性は否定的であり、後者の可能性が強いと考える。STAT3に対し慢性的な刺激を与える可能性があるcytokine, growth factorはIL-6以外にもEGFやTGF- $\alpha$ などが考えられる。これらは全て腎細胞癌のautocrine growth factorであることから、腎細胞癌組織におけるSTAT3の活性化はIL-6シグナルのみに由来するものではない可能性も考えられる。しかし、本研究におけるIL-6とSTAT3の関係や血清IL-6濃度が高値の例に進行例が多く、予後不良である点<sup>17)</sup>などSTAT3の高活性化例と臨床的、病理学的側面との関係に共通した関連も認められるため、少なくとも部分的にはIL-

6は腎細胞癌組織中のSTAT3の活性化に関与しているものと予想される。この点については今後検討すべき問題と考える。

臓器限局性の腎細胞癌の主たる治療法はいまだに外科的治療であり、転移性腎細胞癌は通常の化学療法や放射線療法に耐性を示し予後不良である<sup>42)</sup>。転移性腎細胞癌に対して現在、インターフェロン $\alpha$ やIL-2などを中心とした免疫療法が行われているが、その有効率は約15%前後と決して満足できるものではなく、新たな有効な治療法の開発が待たれるところである<sup>42)</sup>。本研究は腎細胞癌におけるIL-6によるSTAT3の活性化を抑制する治療が腫瘍の増殖を抑制する効果があるのみならず、bcl-2などのアポトーシス関連タンパクの発現を抑制し通常の化学療法や放射線療法に対する感受性を亢進することで、進行性腎細胞癌の新たな治療戦略への応用の可能性を示唆すると考える。

## 総 括

IL-6に誘導される腎細胞癌の増殖の機序を、細胞内シグナルを中心に解析し、細胞内シグナルの抑制による増殖抑制効果を検討した。さらに、腎細胞癌組織におけるSTAT3の活性化を免疫組織学的に解析し、病理組織学的所見および臨床経過との関連を検討し、以下の結果を得た。

1. 腎癌細胞株におけるIL-6の細胞内シグナルは主にJak-STAT3経路を介していることが示された。ERKsはIL-6の刺激と無関係に恒常的活性化を示した。
2. MEK1阻害剤PD98059によるERKs活性の抑制がSTAT3の活性に変化を与えなかったことから、腎細胞癌のIL-6刺激下ではERKsによるSTAT3の活性制御は存在しないと考えられた。
3. Jak阻害剤AG490はIL-6刺激によるSTAT3の活性化を抑制し、IL-6の誘導する細胞増殖を抑制した。細胞増殖の抑制はbcl-2のdownregulation, baxのupregulationを伴うアポトーシスの誘導によるものであった。
4. 腎細胞癌組織において高頻度のSTAT3の活性化が認められた。STAT3の活性化は手術時に遠隔転移を有する例に有意に多く認められ、多変量解析で有意な予後予測因子であった。

これらの結果から腎細胞癌においてIL-6誘導性のSTAT3の活性化を抑制する治療が進行性腎細胞癌の新たな治療戦略に応用できる可能性が考えられた。

本稿を終えるにあたり、終始懇切な御指導、御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室村井勝教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に対して直接御指導いただきました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室丸茂健助教授、大家基嗣講師に深謝いたします。また、適切なるご助言、ご協力下さいました泌尿器科学教室諸兄に感謝いたします。

なお、本研究の一部は、第97回米国泌尿器科学会(2002年, Orland), 第61回日本癌学会総会(2002年, 東京), 第91回日本泌尿器科学会総会(2003年, 徳島), 第98回米国泌尿器科学会(2003年, Chicago)において発表した。

#### 文 献

- 1) Kishimoto T : The biology of interleukin-6. *Blood* 74 : 1-10, 1989
- 2) Hirano T : Interleukin 6 and its receptor : ten years later. *Int Rev Immunol* 16 : 249-284, 1998
- 3) Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T : Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63 : 1149-1157, 1990
- 4) Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T : Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58 : 573-581, 1989
- 5) Schindler C, Darnell JE : Transcriptional responses to polypeptide ligands : the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64 : 621-651, 1995
- 6) Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, Nakajima K, Hirano T : Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130 : involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5 : 449-460, 1996
- 7) Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T : Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77 : 63-71, 1994
- 8) Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. : Stat3 as an oncogene. *Cell* 98 : 295-303, 1999
- 9) Zushi S, Shinomura Y, Kiyohara T, Miyazaki Y, Kondo S, Sugimachi M, Higashimoto Y, Kanayama S, Matsuzawa Y : STAT3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells. *Int J Cancer* 78 : 326-330, 1998
- 10) Wen Z, Zhong Z, Darnell JE : Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82 : 241-250, 1995
- 11) Ng J, Cantrell D : STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727. *J Biol Chem* 272 : 24542-24549, 1997
- 12) Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J : STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17 : 6508-6516, 1997
- 13) Fujitani Y, Hibi M, Fukada T, Takahashi-Tezuka M, Yoshida H, Yamaguchi T, Sugiyama K, Yamanaka Y, Nakajima K, Hirano T : An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 14 : 751-761, 1997
- 14) Zauberman A, Zipori D, Krupsky M, Ben-Levy R : Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* 18 : 3886-3893, 1999
- 15) David M, Petricoin E, Benjamin C, Pine R, Weber MJ, Lerner AC : Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* 269 : 1721-1723, 1995
- 16) Sengupta TK, Talbot ES, Scherle PA, Ivashkiv LB : Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 11107-11112, 1998
- 17) Blay JY, Rossi JF, Wijdenes J, Menetrier-Caux C, Schemann S, Negrier S, Philip T, Favrot M : Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 72 : 424-430, 1997
- 18) Okamoto M, Lee C, Oyasu R : Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Res* 57 : 141-146, 1997
- 19) Miki S, Iwano M, Miki Y, Yamamoto M, Tang B, Yokokawa K, Sonoda T, Hirano T, Kishimoto T : Interleukin-6 (IL-6) functions as an *in vitro* autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett* 250 : 607-610, 1989
- 20) Horiguchi A, Oya M, Marumo K, Murai M : STAT3, but not ERKs, mediates the IL-6-induced proliferation of renal cancer cells, ACHN and 769P. *Kidney Int* 61 : 926-938, 2002
- 21) Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R : Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10 : 105-115, 1999
- 22) Gogusev J, Augusti M, Chretien Y, Droz D : Interleukin-6 and TNF alpha production in human renal cell

- carcinoma. *Kidney Int* 44 : 585-592, 1993
- 23) Campbell CL, Jiang Z, Savarese DM, Savarese TM : Increased expression of the interleukin-11 receptor and evidence of STAT3 activation in prostate carcinoma. *Am J Pathol* 158 : 25-32, 2001
- 24) Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z : Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53 : 1945-1951, 1993
- 25) Peterson WM, Wang Q, Tzekova R, Wiegand SJ : Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia. *J Neurosci* 20 : 4081-4090, 2000
- 26) Ogata A, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL, Anderson KC : IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 159 : 2212-2221, 1997
- 27) Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC : Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 60 : 1225-1228, 2000
- 28) Bromberg J, Darnell JE, Jr. : The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19 : 2468-2473, 2000
- 29) Bromberg JF, Fan Z, Brown C, Mendelsohn J, Darnell JE, Jr. : Epidermal growth factor-induced growth inhibition requires Stat1 activation. *Cell Growth Differ* 9 : 505-512, 1998
- 30) Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ : Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest* 102 : 1385-1392, 1998
- 31) Oka H, Chatani Y, Hoshino R, Ogawa O, Kakehi Y, Terachi T, Okada Y, Kawaichi M, Kohno M, Yoshida O : Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 55 : 4182-4187, 1995
- 32) Robinson MJ, Cobb MH : Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9 : 180-186, 1997
- 33) Atlas I, Mendelsohn J, Baselga J, Fair WR, Masui H, Kumar R : Growth regulation of human renal carcinoma cells : role of transforming growth factor alpha. *Cancer Res* 52 : 3335-3339, 1992
- 34) Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM : Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 379 : 645-648, 1996
- 35) De Vos J, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, Klein B : JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br J Haematol* 109 : 823-828, 2000
- 36) Wang LH, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR, Farrar WL : JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J Immunol* 162 : 3897-3904, 1999
- 37) Kirken RA, Erwin RA, Taub D, Murphy WJ, Behbod F, Wang L, Pericle F, Farrar WL : Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells. *J Leukoc Biol* 65 : 891-899, 1999
- 38) Nielsen M, Kalsoft K, Nordahl M, Ropke C, Geisler C, Mustelin T, Dobson P, Svejgaard A, Odum N : Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides : tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 6764-6769, 1997
- 39) Huang A, Fone PD, Gandour-Edwards R, White RW, Low RK : Immunohistochemical analysis of BCL-2 protein expression in renal cell carcinoma. *J Urol* 162 : 610-613, 1999
- 40) Tomita Y, Bilim V, Kawasaki T, Takahashi K, Okan I, Magnusson KP, Wiman KG : Frequent expression of Bcl-2 in renal-cell carcinomas carrying wild-type p53. *Int J Cancer* 66 : 322-325, 1996
- 41) Horiguchi A, Oya M, Shimada T, Uchida A, Marumo K, Murai M : Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma : a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome. *J Urol* 168 : 762-765, 2002
- 42) Motzer RJ, Russo P : Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 163 : 408-417, 2000