

第9章

地域に開かれた障害者支援ビジョン

服部 英司

西宮すなご医療福祉センターの歴史を踏まえて、重症心身障害児・者の支援ビジョンを中心に述べたいと思います。障がいには様々なものがあり、また、障がいの捉え方も歴史的に変化しています。障がいの範囲をどのように定義するかは、障がい児・者支援を考えるにあたっては最も基本的な問題でもあります。当然、制度の狭間のないように制度設計しなければなりません。最近の制度改革で推進されている障がいの区別のない総合的な取り組みは、その考えに沿っており障がいをもつ多くの方々にとって好ましいことです。一方で、現場において直接支援に関わっている立場からすると、ひとくくりに「障がい児・者」として議論をすすめると、基本的な理念にとらわれすぎて、個々の障がい児・者の多様性が埋没してしまう危険性があります。理念を単純に当てはめて一律的な施策を構築すると誤解や思い込みからくる過ちを犯してしまうことになりかねません。重症心身障害児・者にはその特殊性に配慮した施策が必要です。「木を見て森を見ず」では困りますが、「森だけ眺めて木を見ない」のも困ります。森を形成しているのは1本1本の木であることを忘れないようにしたいものです。

1. 重症心身障害児・者支援の歴史と現状

(1) 重症心身障害児施設の理念と歴史

重症心身障害児施設は、我が国固有の文化を背景に生まれてきた我国独自のものとされています。この重症心身障害児施設の黎明期に大

きな功績を残した人物として、小林提樹、草野熊吉、糸賀一雄の3人がよく知られています(敬称略)。小林提樹が、十分な医療を受けることのできなかつた重症児を診るために、東京の日赤産院において重症児のための外来を開始したのが1946年でした。そして、日赤産院での活動をもとに1961年に島田療育園が開設されました。草野熊吉は、親が見ることのできない障がい児を安心してまかせることのできる施設として秋津療育園を開設しました。一方、滋賀の知的障がい児施設の近江学園の園長をしていた糸賀一雄が特に障がいの重いこどもたちの発達を保障するという思いからびわこ学園を創設しました。糸賀一雄は「この子等を世の光に」という有名な言葉で重症心身障害児施設の理念を表現しました。「この子等に世の光に」ではなく「この子等を世の光に」と述べたなかにも、障がい児と共に生きるという重症心身障害児施設の大切な活動理念がこめられていたといえるでしょう。

1964年には、「社会で最も弱いものの命と生活を守る」との理念のもと、「重症心身障害児(者)を守る会」が発足しました。このような民間の活動に突き動かされる格好で、国は1966年に国立療養所に重症心身障害児病棟を開設し、国策として重症児医療に取り組むことになり、重症心身障害児病床は飛躍的に増えることになりました。合わせて公立、民間立の重症心身障害児施設も次々と開設されました。1967年には児童福祉法の改正が行われて、児童福祉法第43条に「重症心身障害児施設とは、重度の知的障害及び重度の肢体不自由が重複している児童を入所させ、これを保護するとともに、治療及び日常生活の指導をすることを目的とする施設とする」と定められ、法的な裏づけをもつ施設となりました。ここで重要なことは、重症心身障害児施設は、児童福祉法に規定された福祉施設であるとともに病院であるという両面をもつ施設であるということです。生活の場としての施設であるとともに、重症児の生命を守るには、病院における医療の提供が不可欠であるからです。

2010年現在、国立病院機構重心病棟77施設(入所定員7576人)、公法人立の重症心身障害児施設122施設(入所定員11864人)となっています。重症児の生命を守るところから出発した重症心身障害児施

設ですが、その活動の結果、40年前には成人に達するまで生きることさえままならないと考えられていた重症児の多くが成人となっています。そして、彼ら彼女らは成人になってからも継続した発達を示すことが知られるようになりました。そのため、18歳未満の小児だけでなく、成人になってからも児童福祉法の下に一貫した療育が行われています（児者一貫療育）。中途障がいとは異なり、発達期に生じた原因による障がいは、小児期からの継続した支援が必要であるということは世界の常識となってきましたが、我国では重症児について早期からそのような考え方で療育が行われてきたといえます。

(2) 障がい児・者の福祉理念と制度の変遷

戦後の福祉制度のベースとなる考え方は大きく3段階に分けられています。第二次大戦後の占領下においてGHQにより福祉の推進が図られました。GHQ三原則（無差別平等、国家責任の平等化、必要経費非制限）に基づいて、措置制度に基づく施設における保護を中心とした施策がとられた時代でした。ただし、児童福祉法、身体障害者福祉法、知的障害者福祉法によって行われた福祉行政は、主として軽度もしくは中等度の障がい者を対象としたものであり、明日の命も危うい重症児・者については、前項に述べたように、児童福祉法の改正により重症心身障害児が規定されて、重症心身障害児施設が生まれるまでは制度から外れたものとなっていました。

1980年には世界保健機構（WHO）から国際障がい分類（International Classification of Impairment, Disabilities, and Handicaps, ICIDH）が発表されました。Impairmentにこだわって、それを克服するという観点で障がい者の努力を強要しがちであったのが、Handicapsという観点から、社会環境の改善を通じて障がい者の自立を助けるという面が取り入れられた画期的なものでした。1981年は国連障がい者年であり、ノーマライゼーションの考え方が広く導入され、障がい者本人の意思に基づいて地域で生活するための支援が行われるようになったときです。さらに、2001年には、ICIDHの問題点を改善した国際生活機能分類（International Classification of Functioning, Disabilities, and Health,

ICF) が発表されました。3つの障がいの相互関係の多様性が表明され、障がいの「医学モデル」と「社会モデル」の統合が行われました。「医学モデル」は、障がい者の問題の原因(病理)は、Impairmentにあり、その除去・軽減を目指すことで障がい者を支援するという考え方であり、「社会モデル」とは障がい者の問題の原因は社会のしくみにあるので、それを変えることが障がい者支援につながるという考え方です。そのような中、1997年から社会福祉基礎構造改革が進められ戦後の福祉体系の大きな変革が occurred。2003年に、「措置制度」から「支援費制度」に変更されて、福祉サービスの多くが障がい者自らが選択し、事業者と契約して利用する制度へと移行しました。さらに、2005年には「障害者自立支援法」が制定されました。応益負担を基本とした自立支援法には導入当初より多くの批判があり、政権交代に伴い、自立支援法を廃止して「障がい者総合福祉法」の制定を目指した議論が内閣府・障がい者制度改革推進会議において続いています。この議論の基調となるのは、国連の障がい者権利条約(2008年)を受けて障がい者差別を禁止して、障がい者の人権を守ることです。ノーマライゼーションの思想を進めて、インクルージョンとエンパワメントの時代へと移行することを掲げています。

2010年には、「障がい者制度改革推進本部等における検討を踏まえて障がい保険福祉施策を見直すまでの間において障がい者等の地域生活を支援するための関係法律の整備に関する法律」(いわゆる「つなぎ法案」)が成立し平成24年4月から施行されることになりました。この法案は障がい者総合福祉法の制定までの「つなぎ」ではありますが、重症心身障害児施設の「児者一貫」体制を支えていた児童福祉法による一貫した運用から、18歳を境に、児童福祉法に基づく医療型入所施設と自立支援法に基づく医療型療養介護施設に分けられることになり、今後、重症心身障害児・者の療育にとって大きな影響を与える可能性があります。

(3) 重症心身障害児・者の現状

2005年の推計では、全国に重症心身障害児が38000人存在し、その

うち施設入所者が13000人、在宅の重症児・者が25000人とされています。このうち、施設に入所を希望しながらも、ベッドに空きがなく待機となっている方が、3000～4000人いるといわれています。特に、大都市圏で待機者が多い傾向にあります。近年、重症児施設入所者において入所者の高齢化・重症化が進行しています。人工呼吸器管理などの濃厚な医療支援を必要とする重症児・者を超重症児、準超重症児と呼んでいます。日本小児科学会のアンケートから推計される20歳未満の超重症児は、発生率が人口1000人対0.3であり、2007年現在で入院中の超重症児が約2000人、在宅の超重症児が5000人を超えていると推定されています。在宅人工呼吸器管理を受ける児も約半数は在宅で生活しており、その数は1000人を超えています。また、在宅におけるケアの担い手は、圧倒的に家族特に母親であり、ヘルパーや訪問看護が担っているのは20%前後にとどまっています。時間的な割合を考慮するともっと家族に依存していると推定されます。重症児の母親の睡眠時間は平均5時間という調査もあります。しかも、施設に入所している超重症児と在宅の超重症児の間で医療的ケアの内容に差はなく、在宅生活をしている方が、施設入所の方より軽症ということではありません。これらは、この間の医療技術の進歩、例えば在宅で安定して使える人工呼吸器の開発や保険制度の改革により、状態が安定していれば在宅生活が可能になったことによるところが大きいです。一方で、最近までは在宅生活を支えるために不可欠な「医療的ケア」の担い手が限られていたために、学校教育や地域での活動が制限され、ケアの担い手が家族特に母親に集中する原因となっていました。また、重症児の地域生活を支えるための訪問看護や訪問介護についても、高齢者の看護・介護を中心にシステム化されてきたため重症児を担当できるステーションの数が限られています。

重症児・者が自立して家族の支援を離れて生活することを考えると事態はもっと深刻です。例えば、人工呼吸器を装着して自立生活する場合には、基本的には24時間のサポートが必要ですし、医療的ケアの質を考慮すると、2人以上の支援者の必要な時間も多いことは明らかです。残念ながら、現在の制度では、実際に何らかのケアをしてい

る時間を積算するので、短時間の介護時間しか認められず実際的ではありません。このような環境の中、在宅の重症児の家族は自分が頑張れる間は、重症児とともに自宅や地域で生活できるが、自分自身が高齢化したときや病気になったときには、安心してまかせられる入所施設への入所を希望される方が多いようです。

II. 西宮すなご医療福祉センターの歩みと現状

(1) 西宮すなご医療福祉センターの歩み

当センターは、1959年に財団法人「赤い羽根療園」の付属施設として開設され、1967年に児童福祉法改正とともに兵庫県下初の重症心身障害児施設（70床）となりました。長い間、福祉に重きをおいた重症児の入所施設として、入所者の生命を守り、人権に配慮した取り組みを続けてきました。地域で生活する重症児の増加にともない、特に養護学校卒業後の重症児の活動の場を求める声に応えるかたちで1997年には重症児通園事業（B型）を開始しました。また、1991年にはリハビリテーション室を開設して、重症児・者のリハビリに積極的に取り組んできました。2003年に建物を全面的に建て替えて、同じ敷地内に鉄筋6階建ての新しい施設を建設しました。重症心身障害児施設は、都市部から離れた場所に位置することが多いのですが、ご家族の面会や地域での活動に便利な場所である旧施設と同じ場所での建替えを選択しました。これは、入所者家族をはじめとする関係者の絶大な協力があったからこそできた事業でした。建替え後に入所病棟180床を全面オープンし、重症児通園事業もA型に移行し、在宅人工呼吸療法の方の受け入れも始めました。2005年からは、社会問題化してきた発達障害児の外来療育を開始し、重症児だけでなく地域の障がい児全体に開かれた施設へ変革しつつあります。2006年には、訪問看護、訪問介護ステーション「つくし」を開設し、在宅で生活する重症児のケアに取り組み始めました。一方で、入所の重症児・者も高齢化と重症化という全国の重症児施設でみられる現象が当センターでも進んできました。ちょうど建替えの頃から、気管切開や喉頭分離術を行って人工呼吸器管理

の必要な状態となる方が急速に増えてきました。栄養面でも胃瘻を造設し経管栄養となる方が増加するなど、医療的に重度であるだけでなく、医療的な処置を多く必要とする方が増加してきました。いわゆる超重症児・準超重症児といわれる重症児・者です。そのため、病棟の医療設備を整え、看護師の増員を行うとともに、4つある病棟を順番に一般病棟化し、2010年4月には全ての病棟が一般病棟となりました。医療面の充実が急務となり、2007年には小児神経専門医の常勤医が加わるとともに、小児神経外来を開設しました。そして、2010年1月1日に、「砂子療育園」から「西宮すなご医療福祉センター」に改称し、地域に開かれた障がい児のための医療と福祉を融合した施設を目指したスタートを切りました。その流れの中で2010年7月には、在宅支援を進めるための核として1階に外来診察室を新設し障がい児・者の専門医療を開始しました。

(2) 西宮すなご医療福祉センターの現状

入所病棟180床を中心として、短期入所8床、A型通園15床、リハビリテーション、外来診察（重症児、てんかん、ダウン症、リハビリ）、外来療育（発達障害、ダウン症、音楽療法、重症児母子通園）、訪問看護・訪問介護ステーションの事業に加えて、兵庫県から圏域コーディネーター事業の委託を受け、地域の相談事業を行っています。また、地域の学校などへの施設支援や、種々の研修事業を各部門の連携の元に行っています。院内には芦屋特別支援学校のすなご訪問学級があり、対象年齢の児の教育に加えて、就学免除で教育を受ける機会のなかった方の教育も計画的になされています。入所者の高齢化と重症化は急激に進行しており、2010年の入所者の平均年齢は41歳、超重症児の割合が12%、準超重症児の割合が12%、合計24%、人工呼吸器管理をしている方が16人となっており毎年増加しています。さらに注目すべきなのは、図14に示すように、超重症児、準超重症児、人工呼吸管理、気管切開の割合を利用部門別に並べてみると、長期入所に比べて短期入所、通園、訪問看護の順に重症児・者、医療的ケアの必要度の高い方の割合が多くなることです。当センターのエリアにおいても、地域

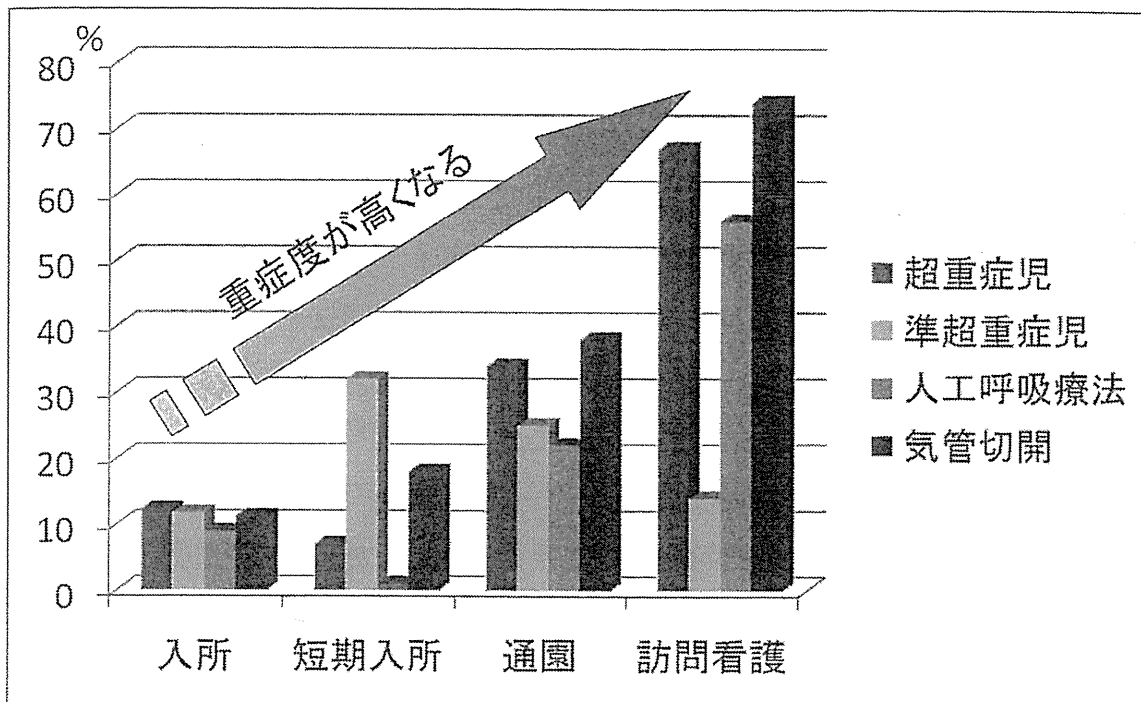


図14 利用部門別の医療的ケアの必要度 出典：西宮すなご医療福祉センター資料

で生活する重症児・者の方が多くなっていることと、当センターがすでに地域の重症児・者の支援に欠かせない施設となっていることを示しています。

Ⅲ. 地域に開かれた重症心身障害児・者の支援ビジョン

(1) 地域における重症心身障害児施設の役割

今まで述べましたように、重症心身障害児施設は、重度の身体的ならびに知的障害を合併する児・者を入所させて、生命を守り生活を支援することを目的としてきました。歴史的にはその目的は一定程度達成されたといえます。しかしながら、入所施設数の不足のため、やむなく在宅で生活する方々の増加や、在宅医療の進歩にともなって重度の障がいをもつ方々も家族と共に地域で生活できるようになったことから、施設外で生活する重症児・者の方が増えてきました。本来、インクルーシブな社会を作っていくならば、重症児・者も地域で生活することが基本であり歓迎すべきことです。一方で、地域で生活するための医療・福祉の基盤整備ができていない場合や重症児・者の状態か

らみて地域での生活は難しく「病院」内での管理の必要な場合にも、いたずらに地域での生活を推進することは、重症児・者の生きる権利を奪うことにつながりかねません。東京都の東部医療センター設立時に、入所された方と入所待機のため地域で生活された方でその後の死亡率に大きな差が生じたということがいわれています。在宅で生活する重症児・者にも入所の方と同様の支援を行いつつ、在宅で生活できない状況となれば入所して生命と生活を守ることが必要です。そのため、多くの重症心身障害児施設は、入所者の支援だけでなく、入所者の支援で培った重症児・者の医療・療育のノウハウやリソースを使って在宅の重症児のための通園事業やレスパイトのための短期入所事業、外来診療や外来リハビリも行っていきます。

地域で暮らすということはどういうことでしょうか？大事なことは、「どこで」暮らすかではなくて「どんな」暮らしかということです。地域の方や支援者とともに、障がい者本人が生きる力を高めることができれば、暮らす場所だけで善し悪しを決めることはできません。また、十分に自らの意思表示をできない重症児を支援する場合には、直接の理解者となる家族の支援は欠かせないものです。障がい児・者だけでなく家族をも含めたエンパワメントが必要であり、重症児の支援には必ず家族支援という視点も含める必要があります。それゆえ、家族支援のために超重症児も含めたレスパイトの体制整備は急務です。ただし、現状の短期入所が家族支援の面だけが強いことは問題です。障がい児・者本人にとっても家族と離れた生活を楽しめるような取り組みが必要です。これには、英国の「こどものホスピス」などが参考となるでしょう。さらに、両親にとって、親亡きあとの児の生活を心配する気持ちは非常に大きいものです。入所も含めて安心できる支援体制を構築しなければなりません。このような家族の支援により、介護する家族の心の余裕を生み出し、重症児・者の生活の質の向上がもたらされると考えられます。

一方で、一旦入所すれば二度と退院しないというのは、重症児・者の意思に基づいたものであるとはいえないかもしれません。入所したあとも、地域で生活できるような支援体制を整える努力をし、重症児・

者の状態が地域生活できる状態となれば、退院して地域での自立した生活を目指すシステムを構築すべきだと考えます。

地域における重症児・者支援という点において、重症心身障害児施設は以下のような役割を果たしていく必要があると考えます。

- ① 重症児・者の医療と福祉の専門施設として、「高度な」重症児支援を行える施設となる。
- ② 地域に存在する施設として、顔の見える関係を構築して重症児支援を行う。
- ③ 重症児・者のライフステージのそれぞれの段階に応じて継続的な支援を行う。
- ④ 地域のインフォーマルなパワーによる重症児・者支援を引き出す。
- ⑤ 重症児・者ならびにその家族と共に生きてエンパワメントを高める。

病気を治療するという点においては、大学病院や拠点病院のような急性期病院が多くの特設医療部門を擁していて優れていることは当然です。しかし、生命を支えながら生活を豊かにする医療・福祉は重症児施設の得意とするところです。医療と福祉を融合させた重症児・者支援の専門性を確立していく必要があります。そして、児者一貫の理念にあるように、重症児・者の全てのライフステージにわたって発達を共感できる支援を行わなければなりません。施設の職員と利用者がお互いに地域の一員として顔のみえる関係を築いていくことが、お互いのエンパワメントに結びつくと考えられます。さらに、地域における支援者（インフォーマルなパワー）と連携し、専門家としての関わりをもつことにより、本当の意味で安心して、重症児・者が地域でインクルーシブな生活をするようになると思います。

(2) 「重症心身障害児施設」から「重症児心身障害児・者支援センター」へ

重症心身障害児施設は、重症児・者の状態と環境に応じて様々な支援をできる能力を蓄えてきており、今後も重症児・者支援の核となりうると考えています。今までは、重症心身障害児施設自体が入所を中心とした運営であったので、入所と在宅の重症児・者が分離しており、

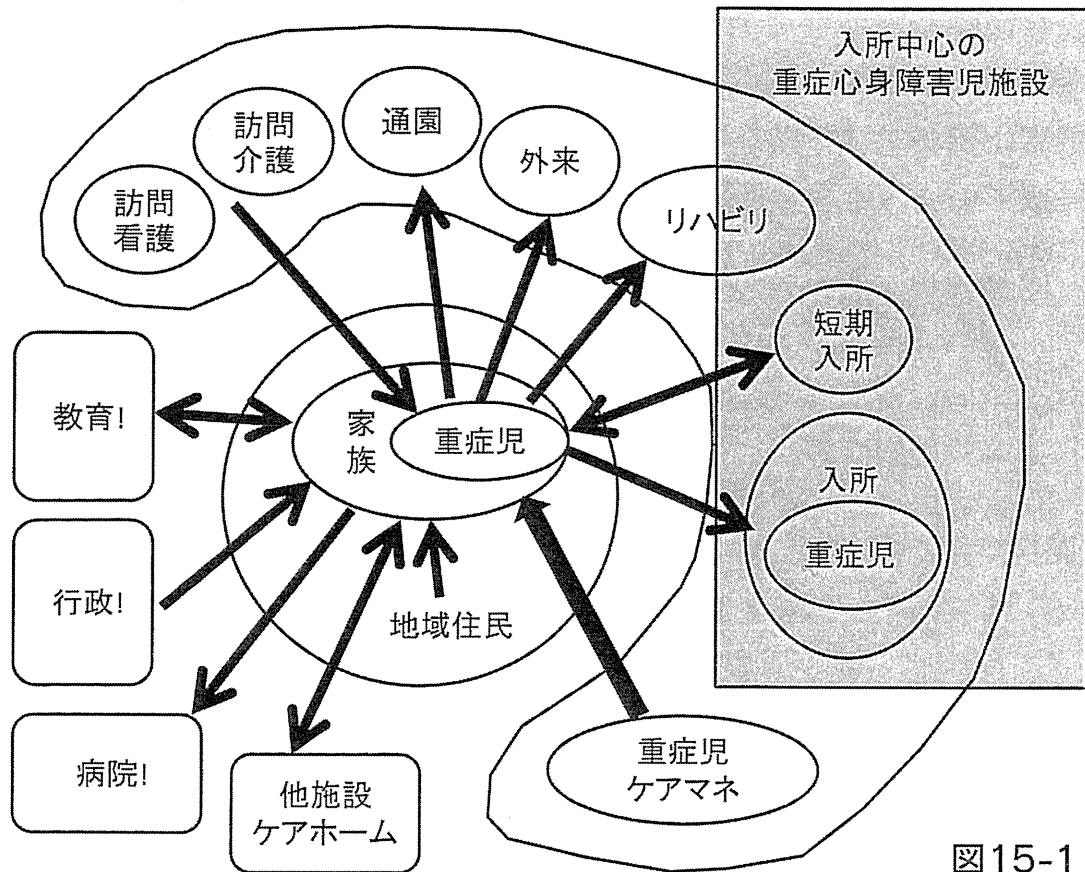


図15-1

入所者が地域から隔離された存在という印象をもたれたと思います。たとえ施設が地域支援をしても入所部門と地域支援部門間の交流が乏しかったことが原因だと思います（図15-1）。今後、支援する立場の施設職員自体が、入所部門と在宅部門の区別なく交流を進めることと、入所されている方も常に在宅へ移行することを考えた取り組みをすることにより、在宅と入所の間での流動化が進み、施設そのものが地域の中に存在したものであるとして入所か在宅かの区別はなくなる方向へ進むと思います。地域住民のインフォーマルなパワーを引き出すような支援やケアホームやグループホームへの専門的な支援によっても重症児・者支援の総合的な力を高めることとなります（図15-2）。

このように重症児・者と支援者の関係の流動化が進む中で重要なことは、個々の重症児・者について全体的な視点から、支援のリソースを整理する人（あるいは組織）の存在です。しかも、ある時点での関わりだけでなく、ライフステージにわたって時間的に長期間の関わりをもつ必要があります。重症児・者のライフステージにわたる支援と

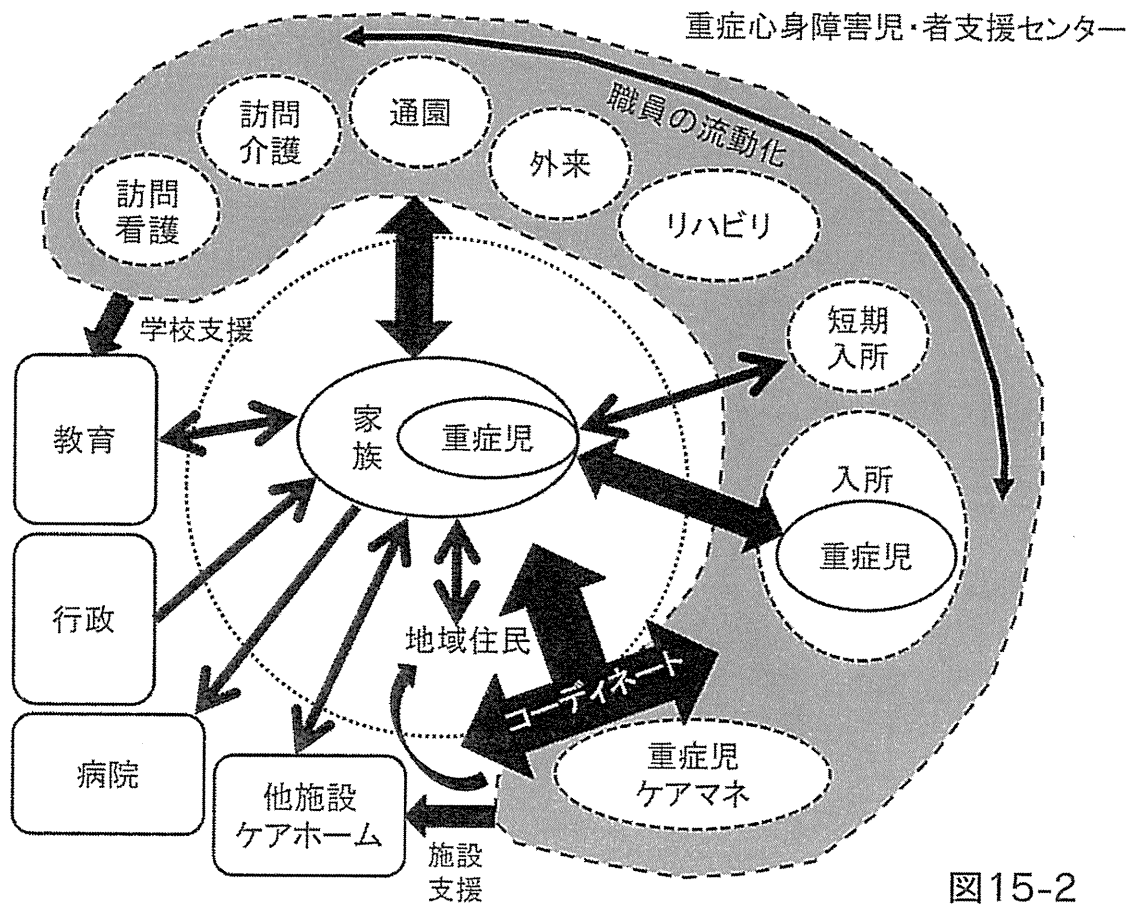


図15-2

なると、多くの関係者や組織との関わりが必要であり、しかも複雑です。そのためには、重症児ケアマネージメントを担う人材育成が急がれます。

重症児・者支援の分野においても、「人がすべて」といっても過言ではありません。歴史的な役割やそれを支えてきた人材の能力や志を殺ぐことなく、新しいシステムに変えていくことが必要です。

(西宮すなご医療福祉センター 院長)

参考文献

- (1) 有馬正高「私たちが成し遂げたこと これからの課題—超重症児療育の挑戦— 両親の集い」『全国重症心身障害児(者)を守る会会報』第647号 2011年3月
- (2) 岡田喜篤「重症心身障害児・者の社会的対応を巡って」『西日本重症児施設協議会広報』第9号 2011年3月
- (3) 日本小児科学会倫理委員会「超重症心身障害児の医療的ケアの現状と問題点」『日本小児科学会雑誌』112; 94-101, 2008年

COMMENTARY

Commentary on the mutation spectrum of and founder effects affecting the *PTS* gene in East-Asian populations

Haruo Shintaku

Journal of Human Genetics advance online publication, 16 February 2012; doi:10.1038/jhg.2011.153

Tetrahydrobiopterin (BH4) deficiency is a rare disorder affecting phenylalanine metabolism in the liver and neurotransmitters biosynthesis in the brain. In 1975, Smith *et al.*¹ first reported these patients as 'atypical phenylketonuria (PKU)'. Patients with BH4 deficiency appear normal at birth, but experience symptoms such as intellectual disability, progressive problems with development, movement disorders, difficulty swallowing, seizures and behavioral problems. Bartholomé *et al.*² reported that the neurological signs in these patients were treatable by the oral administration of the neurotransmitter precursors 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and 5-hydroxytryptophan (5-HTP), both of which cross the blood–brain barrier. Shintaku *et al.*³ recommended that this treatment be started within 2 months of birth to help prevent neurological damage. Therefore, the expression 'BH4 deficiency' should be used rather than the terms 'atypical PKU' or 'malignant hyperphenylalaninemia (HPA)'.⁴

BH4 is an essential cofactor in the enzymatic hydroxylation of three aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophan). BH4 is synthesized from guanosine triphosphate (GTP) catalyzed by GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase (PTPS) and sepiapterin reductase. In aromatic amino acids hydroxylating system, BH4 is regenerated by pterin-4a-carbinolamine dehydratase and dihydropteridine reductase. (DHPR).⁵ They all follow an autosomal-recessive mode of inheritance and the

gene mutations of all five enzymes have been reported.³ The incidence of BH4 deficiency is at 1 in 1 000 000, except that in Taiwanese (much higher than that in Japanese and in Caucasians).^{5,6} Liu *et al.*⁷ reported that the BH4-deficient HPA was estimated to make up around 30% of the Chinese population in Taiwan suffering from HPA, which is much higher than in Caucasian populations (1.5–2% of HPA). In Taiwan approximately 86% of BH4-deficient HPA in the Chinese population was found to be caused by PTPS deficiency, although it is the most common form of BH4 deficiency in the world.

BH4 deficiency has been diagnosed in patients with HPA by neonatal mass screening based on BH4 oral loading tests, analysis of urinary or serum pteridines and measurement of DHPR activity in the blood from a Guthrie card. BH4 deficiency without treatment causes combined symptoms of HPA and neurotransmitter (dopamine, norepinephrine, epinephrine and serotonin) deficiency, such as red hair, psychomotor retardation and progressive neurological deterioration, as mentioned before. Treatment of BH4 deficiencies consists of BH4 supplementation (2–20 mg kg⁻¹ per day) or diet to control the blood phenylalanine concentration and replacement therapy with neurotransmitters precursors (L-DOPA/CarbiDOPA and 5-HTP), and supplements of folinic acid in DHPR deficiency.⁵

In this issue of the *Journal*, Chiu *et al.*⁸ investigated mutations in the patients with PTPS (gene symbol: *PTS*) deficiency in East-Asian populations and increased our understanding of the mutation spectrum and founder effects affecting the *PTS* gene in East-Asian populations.⁶ The patients were from 176 families (Han Chinese populations:

156 families, Japanese: 6 families, South Korean: 7 families, Thai: 3 families and Filipinos: 4 families) and total of 352 mutations were analyzed. Mutations found in these patients were strongly linked to a microsatellite marker, D11S1347. Among these, five mutations were the most common in East Asia. These mutations were not located in CpG hot spots. These results indicate that each of the common mutations came from a single ancestor. The authors suggested that the founders were ancient Chinese of Mainland China. In contrast, Okinawan people in Japan and Filipinos each showed a unique mutation in *PTS*.⁹ This result suggests that these two separated regions had their own founders.

What key concepts and lessons can be derived from this study?

First, the author investigated PTPS-deficiency patients of the Han people in Taiwan, Mainland China and Malaysia in this study. Patients of other countries such as Japan, South Korea and Philippine were also analyzed. The results indicate that mutations of the *PTS* gene in East Asia were within the area of D11S1347, which is important and useful in diagnosing patients with PTPS-deficiency in East Asia.

Second, five common mutations were found in patients of Mainland China on the coast and those of the Han people in other countries. Some of those mutations were found only in East Asia. It is better to collect the information of patients in inland Mainland China, the Mongolian people and other countries to investigate the origin of those mutations.

Third, the author reports that the prevalence rate of HPA in each East-Asian country was lower than that of the Caucasian population. However, the incidence of BH4

H Shintaku is at the Department of Pediatrics, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan.
E-mail: shintaku@med.osaka-cu.ac.jp

deficiency among HPA in East-Asian countries was higher than that of the rest of the world. It is possible that several founder events occurred in the Han people (or other neighboring peoples) and those mutations spread over other areas along with the immigration of the Han people. It would be of interest to compare mutations of the *PTS* gene in East Asia and in other parts of the world, for it may reveal early human migrations in ancient times. The patients of the two isolated regions (Okinawa islands in Japan and the Philippines) showed other types of mutations in the *PTS* gene.⁹ It was suggested that other founder events have occurred in those areas.

In conclusion, this study represents the usefulness of microsatellite marker, D11S1347

to screen of PTPS deficiency in East Asia. These mutations were mainly observed in patients of the Han people. The high prevalence rate of PTPS deficiency in the Han people would explain the high incident rate of this disorder in East Asia.

- 1 Smith, I., Clayton, B. E. & Wolff, O. H. New variant of phenylketonuria with progressive neurological illness unresponsive to phenylalanine restriction. *Lancet* **1**, 1108–1111 (1975).
- 2 Bartholomé, K., Byrd, D. J., Kaufman, S. & Milstien, S. Atypical phenylketonuria with normal phenylalanine hydroxylase and dihydropteridine reductase activity *in vitro*. *Pediatrics* **59**, 757–761 (1977).
- 3 Shintaku, H., Asada, M. & Sawada, Y. Diagnosis and treatment of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Brain Dev.* **22**, S118–S121 (2000).

- 4 Blau, N., Thöny, B., Cotton, R. G. H. & Hyland, K. In *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (Scriver, ed). 1725–1776 (McGraw Hill, London, 2000).
- 5 Shintaku, H. Disorders of tetrahydrobiopterin metabolism and their treatment. *Curr. Drug Metab.* **3**, 123–131 (2002).
- 6 Thöny, B. & Blau, N. Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. *Hum. Mutat.* **27**, 870–878 (2006).
- 7 Liu, T. T., Chiang, S. H., Wu, S. J. & Hsiao, K. J. Tetrahydrobiopterin-deficient hyperphenylalaninemia in the Chinese. *Clin. Chim. Acta.* **313**, 157–169 (2001).
- 8 Chiu, Y. H., Chang, Y.-C., Chang, Y.-H., Niu, D.-M., Yang, Y.-L., Ye, J. *et al.* Mutation spectrum of and founder effects affecting the *PTS* gene in East-Asian populations. *J. Hum. Genet.* (e-pub ahead of print 5 January 2012; doi:10.1038/jhg.2011.146).
- 9 Imamura, T., Okano, Y., Shintaku, H., Hase, Y. & Isshiki, G. Molecular characterization of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency in Japanese patients. *J. Hum. Genet.* **44**, 163–168 (1999).

Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45

Ryohei Wakahara^{1,2}, Hiroyuki Kunimoto¹, Kanae Tanino¹, Hirotada Kojima¹, Akira Inoue¹, Haruo Shintaku² and Koichi Nakajima^{1*}

¹Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka 545-8585, Japan

²Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka 545-8585, Japan

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is a latent cytoplasmic transcription factor. It is activated by cytokines, including interleukin-6 (IL-6) through phosphorylation at Tyr705 (pY705), which is required for its dimerization and nuclear translocation. However, the role of Ser727 phosphorylation, occurring during activation, remains poorly understood. Using a combination of HepG2-stat3-knockdown cells reconstituted with various STAT3 mutants and protein kinase inhibitors, we showed that phospho-S727 has an intrinsic mechanism for shortening the duration of STAT3 activity, in turn shortening the duration of *socs3* mRNA expression. Both STAT3WT and STAT3Ser727Asp (S727D) but not STAT3Ser727Ala (S727A) showed rapid dephosphorylation of pY705 after the inhibition of tyrosine kinases. We found that the nuclear TC45 phosphatase is most likely responsible for the phospho-S727-dependent pY705 dephosphorylation because TC45 knockdown caused prolonged pY705 with sustained *socs3* mRNA expression in STAT3WT but not in STAT3S727A, and overexpressed TC45 caused rapid dephosphorylation of pY705 in STAT3WT but not in STAT3S727A. We further showed that phospho-S727 did not affect the interaction of TC45 with STAT3, and that a reported methylation at K140 of STAT3 occurring after phospho-S727 was not involved in the pY705 regulation. These findings indicate that phospho-Ser727 determines the duration of STAT3 activity largely through TC45.

Introduction

Cells have multiple receptors and complex signal transduction mechanisms for receiving and integrating extracellular information to respond properly by initiating the processes for survival, cell proliferation, cell death, differentiation, senescence, and even tumorigenesis. The signal transducer and activator of transcription (STAT) family of proteins are latent transcription factors that are activated in the cytoplasm in response to cytokines and growth factors and participate in various critical cellular processes (Levy & Darnell 2002). Once activated through tyrosine phosphorylation of its critical tyrosine residue in the carboxy-terminal region, STAT protein homo- or

heterodimerizes, translocates to the nucleus, and binds to the specific DNA sequences to regulate mRNA expression from by its target genes (Darnell *et al.* 1994; Darnell 1997). Most STAT family members are phosphorylated at one or two serine residues in the carboxyl-terminal transactivation domain in addition to the critical tyrosine phosphorylation (Decker & Kovarik 2000). Although the roles of tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) proteins are well characterized, the roles of serine phosphorylation of STATs have been controversial (Decker & Kovarik 2000).

STAT3 is activated through tyrosine phosphorylation of Tyr705 in response to factors such as the interleukin-6 (IL-6) family cytokines, platelet-derived growth factor, and epidermal growth factor (Hirano *et al.* 1999). It has been shown that Ser727 of STAT3 is phosphorylated by various kinases, including

Communicated by: Shigeo Koyasu

*Correspondence: knakajima@med.osaka-cu.ac.jp

DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01575.x

© 2012 The Authors

Journal compilation © 2012 by the Molecular Biology Society of Japan/Blackwell Publishing Ltd.

Genes to Cells (2012) 1

mitogen-activated kinases (MAPK), H7-sensitive kinase, protein kinase C δ , cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), the mammalian target of rapamycin kinase (mTOR), nemo-like kinase (NLK), death-associated protein kinase 3 (DAPK3), and mitogen- and stress-activated kinase 1 (MSK1), depending on the stimulus and cell type used (Boulton *et al.* 1995; Chung *et al.* 1997; Jain *et al.* 1999; Yokogami *et al.* 2000; Abe *et al.* 2001; Wierenga *et al.* 2003; Fu *et al.* 2004; Ohkawara *et al.* 2004; Kojima *et al.* 2005; Sato *et al.* 2005). Although phosphorylation of Ser727 has been suggested to exert positive effects on STAT3-dependent gene activation (Wen *et al.* 1995; Abe *et al.* 2001; Shen *et al.* 2004), most likely through recruiting coactivator proteins (Schuringa *et al.* 2001; Lufei *et al.* 2007; Lee *et al.* 2009), some reports have suggested that phosphorylation of Ser727 represses STAT3 activity (Chung *et al.* 1997). This controversy may reflect the dual roles of phospho-Ser727 or may result from the lack of a proper method for evaluating the role of phospho-Ser727 of STAT3: most works relied on the use of the STAT3Ser727Ala (S727A) mutant to study the role of phosphoSer727 (Wen *et al.* 1995; Abe *et al.* 2001; Shen *et al.* 2004). However, a recent report by Sun *et al.* (2006) showed that the LPMSF motif itself around the Ser727 of STAT3, rather than phospho-Ser727, was important to recruit p300 to STAT3 and the STAT3-bound DNA region, indicating the problem of relying on the use of one mutant of STAT3. Similarly, there are difficulties with the use of protein kinase inhibitors to evaluate the role of Ser727 phosphorylation because of their specificity problems.

STAT3 activity is primarily dependent on the level of phosphorylation at Y705, which is regulated by the activities of tyrosine kinases and tyrosine phosphatases specific to STAT3 (Mertens & Darnell 2007). Several protein tyrosine phosphatases (PTPs), including Src-homology-2 protein phosphatase-1 and 2 (SHP1, SHP2), T-cell PTP (TC-PTP/TC-45), and PTP receptor T (PTPRT), have been shown to regulate the level of pY705 of STAT3 (ten Hoeve *et al.* 2002; Yamamoto *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2007; Kim *et al.* 2010). Naturally, cessation of further tyrosine phosphorylation of STAT3 by inhibiting the activities of tyrosine kinases toward STAT3 is another mechanism of regulating the level of STAT3 activity. In the IL-6 receptor system, IL-6 signaling has such negative regulatory systems, one is an inhibitory loop through SHP2 (Schmitz *et al.* 2000) and another through suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) (Nicholson *et al.* 1999; Yoshimura *et al.* 2007). SHP2, a tyrosine

phosphatase with two SH2 domains, has been shown to be recruited to the tyrosine-phosphorylated YSTV motif of gp130 and phosphorylated on its tyrosine residues (Stahl *et al.* 1995). SHP2 not only activates the Ras-MAPK pathway by interacting with Grb2-SOS (Li *et al.* 1994; Fukada *et al.* 1996) but also inactivates both JAK tyrosine kinases, which are associated with the signal transducing subunit gp130 in the IL-6 receptor complex, and STAT3 by dephosphorylating them (Schmitz *et al.* 2000; Lehmann *et al.* 2003). SOCS3 is rapidly induced mainly by STAT3 together with ERK1/2 activity and other transcription factors, and binds to the phosphorylated YSTV-motif of gp130 to inhibit JAK kinase activity, resulting in the cessation of further activation of STAT3 (Schmitz *et al.* 2000; Terstegen *et al.* 2000; Lehmann *et al.* 2003).

Here, we report that phosphorylation of Ser727 of STAT3 intrinsically, not via the negative regulatory loop through SOCS3, regulates the duration of STAT3 activity by promoting dephosphorylation of STAT3 pY705, which shortens the duration of transcriptional activity. We show that the nuclear TC45 phosphatase is most likely responsible for the phosphoSer727-dependent dephosphorylation of pY705.

Results

Duration of STAT3-dependent mRNA expression partly determined by state of Ser727

The role of phosphorylation of Ser727 in STAT3 still remains elusive. To assess the roles of phosphorylation of Ser727, we used HepG2-stat3-knockdown (Stat3KD) cells reconstituted with various STAT3 mutants as described previously (Zhao *et al.* 2004). For this study, we introduced siRNA-resistant STAT3 natural proteins without a tag into HepG2-stat3KD cells by a lentiviral expression system. The expression levels of introduced genes were evaluated either by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) for the mRNA levels or immunoblot analysis for the protein levels. The STAT3 protein levels were comparable in STAT3-reconstituted HepG2-STAT3WT cells and STAT3Ser727Ala-reconstituted HepG2-STAT3S727A cells (Fig. 1A). Then we examined the effect of mutation on the levels of STAT3-dependent gene expression. The *socs3* gene was chosen as a STAT3 target gene because the IL-6 induction of *socs3* mRNA expression is mostly dependent on the STAT3 activity in HepG2 cells (data not shown). In HepG2-STAT3WT cells, the *socs3* mRNA level increased rapidly after stimulation with

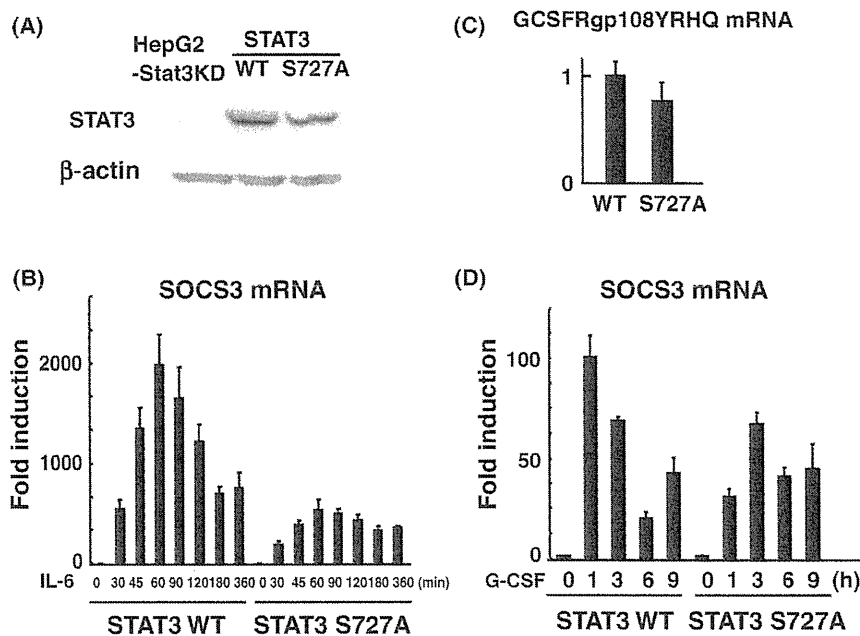


Figure 1 STAT3S727A mutant activates the *socs3* gene, one of STAT3 target genes, at a lower level but for longer period than STAT3 wild type. (A) Whole-cell extracts from HepG2-*stat3KD*, HepG2-STAT3 wild type (WT) and HepG2-STAT3Ser727Ala (S727A) were examined for expression of STAT3 by immunoblotting using an anti-STAT3 Ab. The level of β -actin ensured equal loading. (B) HepG2-STAT3WT cells and HepG2-STAT3S727A cells were stimulated with IL-6 at 20 ng/mL for the indicated times, and total RNAs were extracted. The *socs3* mRNA expression levels in total RNA were measured by qRT-PCR. The level of GAPDH mRNA was used for normalization. The data are averages of three independent experiments; error bars are the standard deviations. (C) HepG2-STAT3WT cells and HepG2-STAT3S727A cells were infected with a lentivirus for the chimeric receptor G-CSFR-gp130 containing the intracytoplasmic gp130 truncated at 108 AA linked with the YRHQ motif (G108YRHQ). The mRNA levels for the chimeric receptor were measured by qRT-PCR. Samples were assayed in triplicate. The average level of G108YRHQ mRNA from HepG2-STAT3WT-G108YRHQ is approximately 15% higher than that from HepG2-STAT3S727A-G108YRHQ. (D) HepG2-STAT3WT-G108YRHQ cells and HepG2-STAT3S727A-G108YRHQ cells were stimulated with G-CSF at 50 ng/mL for the indicated times. The *socs3* mRNA levels were measured as in (B). The data are averages of three independent experiments. Error bars are the standard deviations.

IL-6, with a peak at 60 min, and it had declined sharply by 180 min. In contrast, the *socs3* mRNA expression in IL-6-stimulated HepG2-STAT3S727A cells was two- to threefold lower than that in HepG2-STAT3WT cells at 30, 60, and 90 min after IL-6 stimulation, but interestingly the *socs3* mRNA level was sustained up to 360 min, suggesting that the intact Ser727 is required not only for the maximal transcription but also for the restricted duration of its transcription. We first focused on the increased duration of STAT3-dependent mRNA expression observed in HepG2-STAT3S727A cells. It has been known that SOCS3 protein, which is rapidly induced in a STAT3-dependent manner with the help of other factors, effectively inhibits further activation of STAT3 by suppressing JAK kinases through binding to the phosphorylated YSTV motif of gp130 (Schmitz *et al.* 2000). To test whether this is the only mechanism responsible for the difference in the

duration of STAT3-dependent mRNA expression, we proceeded to test the duration of STAT3 activity under conditions in which the inhibitory effect of SOCS3 was neglected. For this purpose, we introduced a G-CSFR-gp130 chimeric receptor, named G108YRHQ, which contains a short cytoplasmic domain up to 108 amino acid residues linked with a YRHQ motif, one of the YXXQ motifs in gp130, for activation of STAT3 (Abe *et al.* 2001; Kojima *et al.* 2005) into both STAT3 reconstituted cells. The levels of G108YRHQ mRNA in both types of reconstituted cells were roughly comparable (Fig. 1C). The durations of STAT3-dependent mRNA expression were evaluated in these cells. Upon stimulation of HepG2-STAT3S727A-G108YRHQ cells with G-CSF, the level of *socs3* mRNA reached a peak at 3 h which was sustained up to 9 h, showing a kinetic pattern different from that observed in HepG2-STAT3-GYRHQ cells

(Fig. 1D). These findings indicate that some mechanisms intrinsic to the state of Ser727 contribute to the difference in the duration of STAT3-dependent mRNA expression.

STAT3S727A mutant causes prolonged binding of STAT3 and Pol II to the *socs3* gene promoter

The strength and duration of STAT3 transcriptional activity is likely to be determined by multiple factors, including the amount of STAT3 bound to the regulatory regions of the target genes and the constituents of proteins modifying or interacting with STAT3. We then examined the recruitment of STAT3 proteins and RNA polymerase II to the *socs3* gene using a chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. The tested regions corresponded to the promoter region and distal part of the open reading frame (ORF) (Fig. 2A). The *socs3* gene promoter region has two STAT3 binding sites and an activation protein-1 (AP-1) binding site. After IL-6 stimulation, STAT3WT was rapidly recruited to the *socs3* gene promoter with peaks around 15 and 30 min, and the level had declined rapidly by 90 min, and gradually increased again up to 3 h. In contrast, the recruitment of STAT3S727A reached almost a plateau at 30 min, the level was sustained with a small peak at 90 min, and

gradually declined until 180 min. It is noted that the amount of recruited STAT3S727A surpassed that of STAT3WT after 90 min of stimulation (Fig. 2B). After the stimulation of HepG2-STAT3WT cells with IL-6, the levels of RNA Pol II bound to the *socs3* promoter and to the distal ORF region showed biphasic patterns similar to that of STAT3, whereas in HepG2-STAT3S727A, the levels of RNA Pol II bound to the *socs3* gene promoter and to the distal ORF region gradually increased and were sustained up to 180 min after stimulation (Fig. 2C). Thus, the kinetic changes in STAT3 recruitment to the *socs3* gene promoter correlated well with the STAT3-dependent *socs3* gene activation, as judged by both the Pol II binding to the *socs3* gene body and the *socs3* mRNA levels shown in Fig. 1B.

Sustained nature of pY705 in STAT3S727A and unphosphorylated STAT3

We thought it possible that prolonged binding of STAT3 may reflect the sustained level of phosphotyrosine of STAT3 at Y705. As expected, STAT3S727A showed phosphorylation at Y705 for a longer period than STAT3WT (Fig. 3A). We next examined the rate of dephosphorylation at Y705 in STAT3WT and STAT3S727A. For this study, we also used HepG2

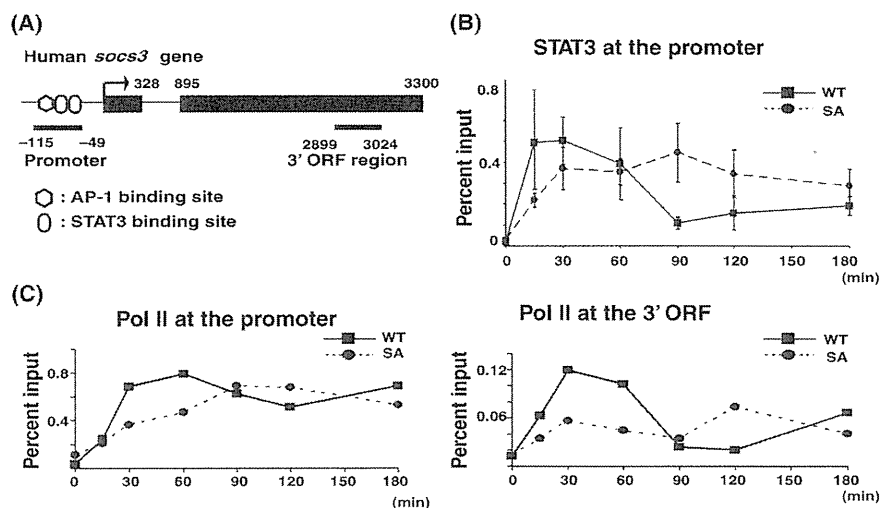


Figure 2 Prolonged binding of STAT3S727A to the *socs3* gene promoter correlates well with prolonged Pol II action. (A) Schematic view of the human *socs3* gene. The two tested regions, corresponding to the *socs3* promoter region (−115 to −49) and the distal part of 3' ORF (2899–3024), are underlined, and the two exons are depicted as black boxes. (B) HepG2-STAT3WT (WT) and HepG2-STAT3S727A (SA) cells were stimulated with IL6 at 20 ng/mL for the indicated times. ChIP assay was carried out with anti-STAT3. The immunoprecipitated DNAs were quantified by real-time PCR in duplicates with primers specific to the *socs3* promoter region (−115 to −49). ChIP results are shown as a percentage of input. The averages of three independent experiments are shown. Error bars are standard deviations. (C) ChIP assays were carried out as in (A), using anti-Pol II and primer pairs specific to the *socs3* promoter (−115 to −49; left panel) and the 3' end of the *socs3* gene (2899–3024; right panel). ChIP results are shown as a percentage of input. A representative result from two independent experiments is shown.

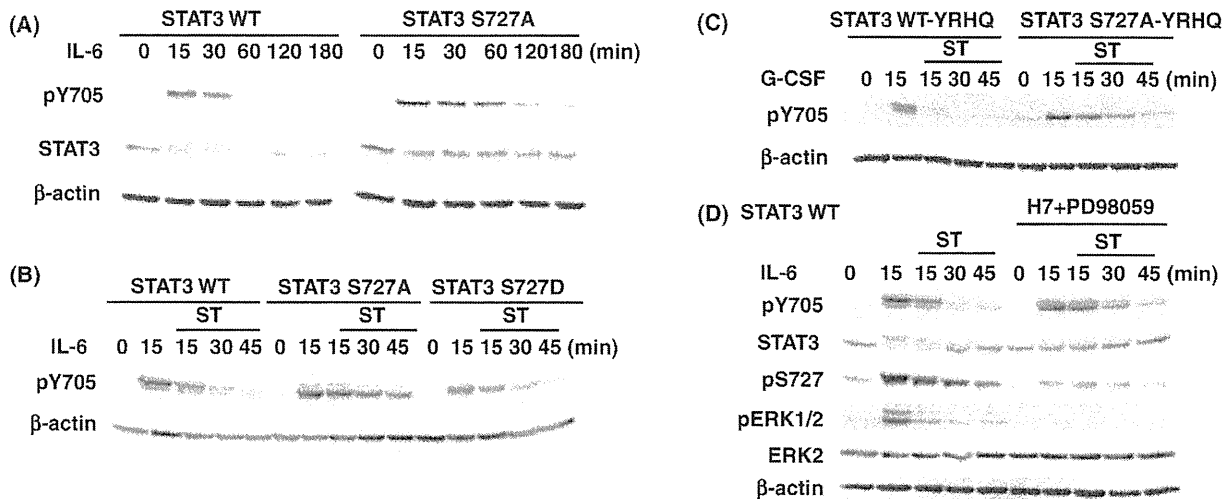


Figure 3 STAT3S727A showed sustained phosphorylation when tyrosine kinase activity was inhibited after stimulation. (A) HepG2-STAT3WT (left panel) and HepG2-STAT3S727A (right panel) cells were stimulated with IL-6 at 20 ng/mL for the indicated times. Immunoblot analysis was carried out on whole-cell extracts (30 μ g per lane) using anti-phospho-STAT3^{Tyr705} (pY705), anti-STAT3 and anti-beta-actin antibody. (B) HepG2-STAT3WT, HepG2-STAT3S727A, and HepG2-STAT3Ser727-Asp (STAT3S727D) cells were stimulated with IL-6 at 20 ng/mL for 15 min, treated with a potent kinase inhibitor, staurosporine (abbreviated as ST: 0.5 μ M) for inhibition of tyrosine kinases, and then left for a further 15, 30 and 45 min. pY705 levels of WCEs were examined by immunoblotting. (C) HepG2-STAT3WT-G108YRHQ (left) and HepG2-STAT3S727A-G108-YRHQ (right) cells were stimulated with G-CSF at 50 ng/mL for 15 min, treated with ST (0.5 μ M), and then left for a further 15, 30, and 45 min. pY705 levels were monitored periodically as in (B) by immunoblotting. (D) HepG2-STAT3WT cells were pretreated without (left) or with (right) H7 (100 μ M) and PD98059 (50 μ M) for 30 min, then stimulated with IL-6 at 20 ng/mL for 15 min, followed by ST (0.5 μ M) treatment, and then pY705 levels were monitored periodically as indicated by immunoblotting using anti-pY705, anti-STAT3, anti-pS727, anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK, and anti- β -actin. The data representative from two or three independent experiments with similar results are shown for this figure.

cells expressing another STAT3 mutant STAT3-Ser727Asp (S727D) that mimics the phosphorylation state at Ser727. To examine the dephosphorylation process, HepG2 cells were stimulated with IL-6 for 15 min, and then treated with a potent kinase inhibitor, staurosporine (ST), to inhibit further phosphorylation (Haspel & Darnell 1999). The pY705 levels were monitored periodically by immunoblot analysis. As shown in Fig. 3B, with inhibition of the responsible tyrosine kinases for STAT3 phosphorylation, both STAT3WT and STAT3S727D showed a rapid decrease in the level of pY705, whereas STAT3S727A showed only minor decreases in the level of pY705 even at 45 min after treatment with ST. The level of pY705 in STAT3S727A slowly decreased thereafter with being apparent after 120 min (please see Fig. 4D). Although it was difficult to estimate the levels of STAT3 proteins especially at early times after stimulation because of the broad shifts of STAT3 proteins, the total STAT3 proteins during the examined period seemed not to change significantly (please see also Fig. 3D). We also tested the

possible role of ubiquitin-dependent degradation of STAT3 in the rapid decrease of pY705 in wild-type STAT3. Pretreatment of HepG2 cells with MG132, an inhibitor of proteasome, did not affect either the levels of STAT3 proteins or the levels of pY705 examined under the same conditions as used in the Fig. 3B (Fig. S1 in Supporting Information). Together, these findings indicate that the rapid decrease in the level of pY705 observed in STAT3WT is not because of the changes in the STAT3 protein levels but reflects the level of phosphorylation itself. These data also suggest that the S727A mutant is resistant to the action of some tyrosine phosphatase(s). The efficient dephosphorylation of pY705 in STAT3WT and STAT3S727D suggests that Ser727 phosphorylation may provide a platform for the action of some tyrosine phosphatase(s). The difference in the dephosphorylation of pY705 between STAT3WT and STAT3S727A could be observed in HepG2 cells stimulated with the chimeric receptor activating only the YXXQ-derived pathway (Fig. 3C), which has been shown to cause Ser727 phosphorylation mostly

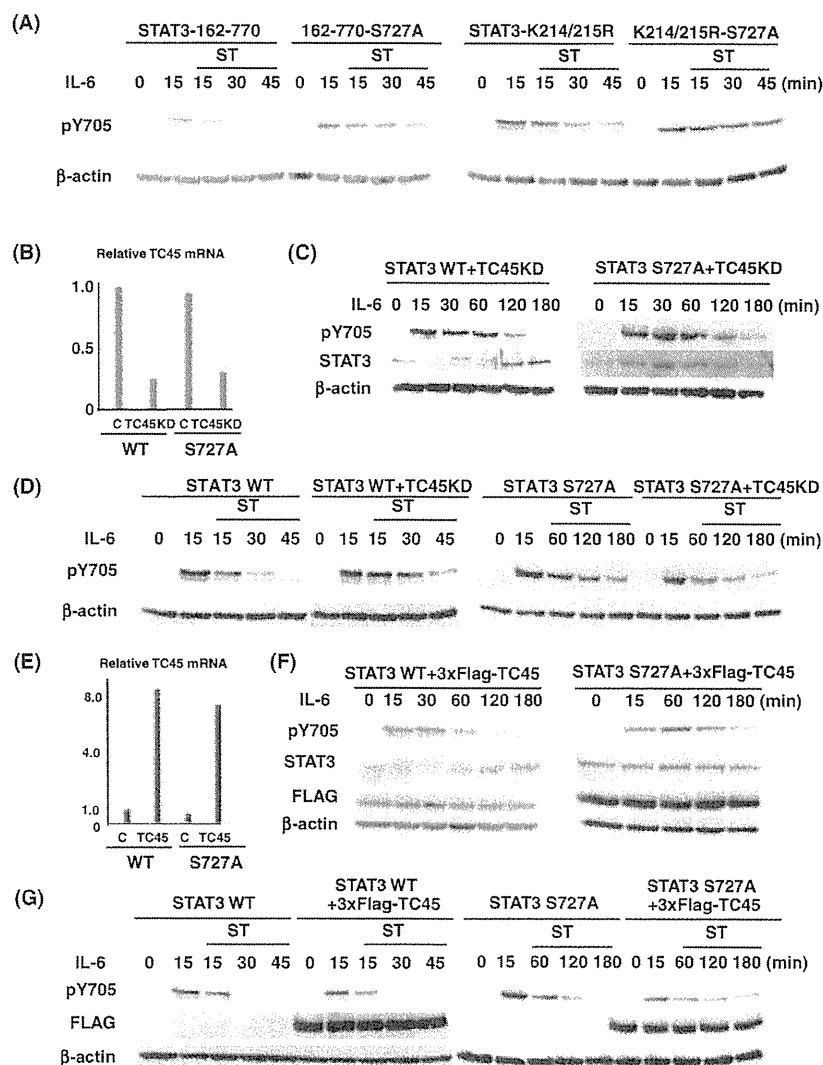


Figure 4 Phospho-Ser727-dependent decrease in pY705 is largely mediated by TC45. (A) HepG2-STAT3-162-770 and HepG2-STAT3-K214/215R cells, both of which are defective for nuclear translocation, were stimulated as in Fig. 3B. Immunoblot analysis was carried out on whole-cell extracts (30 μ g per lane) using pY705 and beta-actin antibody as a control. (B) TC45 was knocked down (KD) in HepG2-STAT3WT and HepG2-STAT3S727A cells using a lentivirus for TC45 shRNA. The TC45 mRNA expression levels were measured by qRT-PCR. The level of GAPDH mRNA was used for normalization. The remaining TC45 mRNA levels in TC45-knockdown cells were approximately 25% of controls. (C) HepG2-STAT3WT+TC45KD (STAT3WT+TC45KD: left panel) and HepG2-STAT3S727A+TC45KD (STAT3S727A+TC45KD: right panel) cells were stimulated with IL-6 for the indicated times. Immunoblotting was carried out on whole-cell extracts (30 μ g per lane) using anti-pY705, anti-STAT3, and anti- β -actin. (D) HepG2-STAT3WT and STAT3WT+TC45KD (left panel), HepG2-STAT3S727A and STAT3S727A+TC45KD (right panel) cells were stimulated with IL-6 at 20 ng/mL for 15 min, treated with staurosporine (0.5 μ M), and then left for the indicated times. pY705 levels were monitored by immunoblotting. It should be noted that incubation times of STAT3S727A mutant cells were longer than those of STAT3WT cells. (E) HepG2-STAT3WT and STAT3S727A cells were infected with lentivirus for TC45 expression. The TC45 mRNA expression levels in total RNA from each sample were measured by qRT-PCR. The level of GAPDH mRNA was used for normalization. (F) TC45-overexpressed HepG2-STAT3WT (STAT3WT+3xFlag-TC45: left panel) and TC45-overexpressed HepG2-STAT3S727A (STAT3S727A+3xFlag-TC45: right panel) cells were stimulated with IL-6 for the indicated times. Western blotting was carried out on whole-cell extracts (30 μ g per lane) using anti-pY705, anti-STAT3, anti-FLAG, and anti- β -actin Abs. (G) HepG2-STAT3WT and HepG2-STAT3WT+3xFlag-TC45 (STAT3WT+3xFlag-TC45) (left panel) and HepG2-STAT3S727A and HepG2-STAT3S727A+3xFlag-TC45 (STAT3S727A+3xFlag-TC45) (right panel) cells were treated as in (D). Western blotting was carried out on whole-cell extracts (30 μ g per lane) using anti-pY705, anti-FLAG, and anti- β -actin Abs. The data representative from two or three independent experiments with similar results are shown for this figure.