

Title	STAT3 activation is a critical step in gp130 mediated-terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line
Author(s)	南, 真志
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43023
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	南 真 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 0 7 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 2 年 2 月 1 5 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	STAT3 activation is a critical step in gp130 mediated-terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line (STAT3 の活性化は、gp130を介した myeloid 細胞株の分化誘導や増殖抑制に必須である)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 菊 谷 仁 (副査) 教 授 審 良 静 男 教 授 平 野 俊 夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

サイトカインや増殖因子の細胞内シグナル伝達経路の一つに、JAK-STAT 経路が知られている。JAK-STAT 経路の活性化機構として、サイトカイン等の液性因子が標的細胞表面上に存在する受容体に結合すると、JAK キナーゼ群により STAT 分子がチロシンリン酸化され、二量体を形成する。活性化された STAT は核へ移行し、標的遺伝子の転写を調節する。本研究では、STAT3 の生物学的機能を解明する目的で、不活性型 STAT3 遺伝子を構築し、その過剰発現が、IL-6 による M1 細胞株の増殖阻止・マクロファージ様分化に与える影響を検討した。

【方法ならびに成績】

1. 不活性型 STAT3 遺伝子の構築

STAT3 は、IL-6 等のサイトカイン刺激により、JAK キナーゼ群にてチロシンリン酸化される蛋白である。不活性型 STAT3 として、部位特異的変異導入法により、STAT3 内 SH2 領域に位置する 609 番目の Arg 残基を Gln 残基に置換した変異分子 (R609Q)、あるいはリン酸化を受ける 705 番目の Tyr 残基を Phe 残基に置換した変異分子 (Y705F) をコードする cDNA を、それぞれ構築した。各々の変異 STAT3 には、N 末端に FLAG epitope-tag を挿入し、内因性の STAT3 との区別を容易にした。これらの cDNA を、COS 細胞を宿主に一過性に発現させ、IL-6 刺激による変異 STAT3 の活性化を検討した結果、両変異分子とも、チロシンリン酸化は認められなかった。IL-6 の機能的受容体である gp130 との会合実験の結果から、Y705F では、変異分子は gp130 に結合するものの、リン酸化されるべき Tyr 残基が置換されているために活性化されないのに対し、R609Q では gp130 に結合できないため、JAK キナーゼによるリン酸化を受けることができないものと推測された。

2. STAT3 ドミナントネガティブ M1 細胞株の樹立と解析

上記の実験結果より、Y705F を過剰発現した細胞内では、gp130 上の STAT3 の結合部位が変異分子で占有されるため、内因性の STAT3 は活性化されず、結果として細胞は STAT3 ドミナントネガティブ体になることが予測された。そこで、マウスミエロイド系 M1 細胞株に、Y705F 遺伝子を導入し、安定発現株を樹立した。同時に、STAT3 の C 末

側転写活性化領域を欠損した変異 STAT3 蛋白 ($\Delta 715$) や、転写活性化領域に加え SH2 領域までも欠損した変異 STAT3 蛋白 ($\Delta 579$)、あるいは野生型 STAT3 (wtSTAT3) 蛋白を、それぞれ過剰発現する安定発現株を樹立した。各クローンでの内因性 STAT3 の活性化を検討したところ、M1-Y705株では、内因性 STAT3 のチロシンリン酸化が完全に抑制された。一方、M1- $\Delta 715$ では、わずかに内因性 STAT3 のリン酸化が認められ、M1- $\Delta 579$ では、野生型 M1 細胞株と同程度に活性化されていた。

野生型 M1 細胞株は、IL-6 の刺激により *c-myb*、*c-myc* 等の発現低下が起こり、細胞増殖が抑制される。続いて Fc γ 受容体、ferritin、lysozyme などのマーカー蛋白を発現し、マクロファージ様細胞に分化する。STAT3 ドミナントネガティブクローンである M1-Y705では、IL-6 添加による増殖阻止が完全に阻害され、*c-myb*、*c-myc* の downregulation も認められなかった。さらに各種マクロファージ分化マーカーの発現も抑制された。他の変異分子を発現したクローンでは、内因性 STAT3 のチロシンリン酸化の抑制程度に応じた、増殖阻止の解除ならびに分化抑制が認められた。これら一連の現象は、IL-6 と同じく gp130 を機能的受容体とする LIF (Leukemia Inhibitory Factor) の刺激でも、同様な結果であった。

【総括】

以上の実験結果より、STAT3 の活性化は、gp130 を介した M1 細胞株の分化誘導での初期イベントであり、M1 細胞株の増殖阻止ならびに終末分化には、STAT3 の活性化が必須であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、マウス白血病細胞株 M1 細胞におけるサイトカイン情報伝達因子 STAT3 の生物学的役割を検討したものである。IL-6/LIF 刺激による M1 細胞のマクロファージ分化において STAT3 の活性化が必須であることは、IL-6 の生物活性を分子レベルで解明したものであり、サイトカインの特徴である重複性・多様性についての解釈に大きく貢献するものである。同時に、生物学的に多彩な機能を有するサイトカインに対して、分子レベルでの抑制の可能性をも示唆する内容であり、種々疾患の発症・進展という観点からも基礎的な知見を与えるものである。よって本論文は博士 (医学) の学位授与に値する。