



Title	Reciprocal Inhibition between MyoD and STAT3 in the Regulation of Growth and Differentiation of Myoblasts
Author(s)	片岡, 良久
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45249
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 かた 片 おか 岡 よし 良 ひさ 久

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 8 4 8 6 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 16 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 Reciprocal Inhibition between MyoD and STAT3 in the Regulation of Growth and Differentiation of Myoblasts
(筋肉芽細胞の増殖・分化における MyoD と STAT3 の拮抗作用とその分子機構)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 金 倉 護

(副査)

教 授 祖父江憲治 教 授 金田 安史

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

一般に、細胞が分化する際には細胞周期の停止が必要である。筋肉芽細胞では、insulin-like growth factor I (IGF-I)、leukemia inhibitory factor (LIF)、hepatocyte growth factor (HGF) などが増殖因子として作用し、これらの増殖因子存在下では MEK1 や CDK4 が筋特異的転写因子 MyoD に結合し、その機能を抑制している。そして、これらの増殖因子が存在しなくなると、MyoD は解放され p21^{WAF1} の発現を誘導し、細胞周期を停止させ、細胞分化を誘導する。ところで、これらの増殖因子の多くは STAT3 を活性化することが知られており、本研究では、STAT3 が MyoD による筋肉芽細胞の分化に及ぼす影響について解析を行った。

[方法ならびに成績]

マウス筋肉芽細胞株 C2C12 及び繊維芽細胞株 C3H10T1/2 に G-CSF 受容体の細胞外領域と gp130 の細胞内領域から構成されるキメラレセプター G-CSF/gp130 と estradiol (ED) 処理により MyoD の活性が誘導される MyoD と estrogen receptor (ER) のキメラ分子 MyoD/ER を導入した。

C2C12 のクローンでは、血清除去あるいは ED 処理により、分化マーカーである myogenin、myosin light chain 3 の発現が誘導されたが、gp130 ligand (p130L) (本研究では、G-CSF は gp130 シグナルを活性化するので gp130L と呼ぶ) を添加した場合、これらの分子の発現誘導は抑制された。C3H10T1/2 のクローンでも、gp130L は ED 処理によるこれらの分子の発現誘導を抑制した。

STAT3 が gp130L による分化阻害に関与しているか否かを検討するため、C2C12 のクローンに更に、4-hydroxytamoxifen (4-HT) によって STAT3 の活性が誘導される STAT3/ERT を導入した。このクローンを 4-HT 処理すると、STAT3 の標的分子である *c-myc* の発現が持続し、血清除去や ED 処理による細胞分化が抑制されたことから、gp130L による分化阻害には STAT3 の活性化のみで十分であると考えられた。次に、STAT3/ERT の代わりに Myc/ERT を導入したところ、4-HT 処理により、血清除去による分化誘導は抑制されたが、ED 処理による分化誘導は抑制されなかった。この結果から、STAT3 が血清除去 (細胞周期停止) による分化誘導を阻害する際には *c-myc*

の発現誘導で十分であるが、MyoD による分化誘導を阻害する際には、更に別の機構が関与すると考えられた。そこで、STAT3 が MyoD の機能に及ぼす影響を luciferase assay で検討したところ、恒常的活性型 STAT3-C は、MyoD の活性を抑制した。実際、先ほどのクローンでは 4-HT により STAT3 を活性化した場合、MyoD による p21^{WAF1} の発現誘導が阻害されていた。

逆に、MyoD が STAT3 の機能に及ぼす影響を luciferase assay で検討したところ、MyoD は STAT3 の活性を抑制した。また、マウスの IL-3 依存性 proB 細胞株 Ba/F3 に G-CSFR/gp130 を発現させたクローンは gp130L 存在下で STAT3 依存性に増殖することが証明されているが、このクローンに MyoD/ER を導入し ED で処理すると、gp130L 刺激による STAT3 の標的分子 *c-myc*、JunB の発現が低下し、細胞増殖が抑制された。

MyoD と STAT3 の相互抑制機構を検討するため、293T 細胞を用いて共沈実験を行ったところ、MyoD と STAT3 の *in vivo* での結合が確認された。また、GST pull-down assay を行ったところ、³⁵S で標識した MyoD は STAT3 の アミノ酸 320-590 の fragment と結合した。

MyoD の変異体を用いた解析から MyoD が STAT3 と結合する際には DNA 結合領域である BR、HLH resion を利用することが明らかとなったので、STAT3 が MyoD の DNA 結合能に及ぼす影響をゲルシフトアッセイで検討した。293T 細胞に STAT3-C の存在下、非存在下で MyoD と 2 量体形成パートナーである E47 を発現させたところ、MyoD/E47 の DNA 結合能は、STAT3-C により阻害された。さらに、GAL-4 transactivation assay の結果から、STAT3 が MyoD の DNA 結合能のみでなく転写活性も抑制することが明らかになった。

一方、MyoD は STAT3 の DNA 結合能を抑制した。

[総括]

- ・ STAT3 は、*c-myc* の発現誘導による細胞周期の制御、及び MyoD に直接時に結合し DNA 結合能及び転写活性を阻害することにより、筋肉芽細胞の分化を阻害した。
- ・ 逆に、MyoD も STAT3 の DNA 結合能を阻害し、STAT3 依存性の増殖を抑制した。
- ・ 以上の結果から、筋肉細胞・組織の正常な発生には、STAT3 と MyoD の相互拮抗作用による機能のバランスが重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

[総評]

従来から筋肉芽細胞においては転写因子 MyoD が恒常的に発現しているにも関わらず、その機能が増殖因子存在下では抑制されていることが知られてきた。その分子機構としては Ras の下流に存在する MEK1 や細胞周期推進分子である CDK4 が MyoD に直接結合しその機能を抑制することが報告されてきたが、その全容は明かではなかった。

本研究の結果、筋肉芽細胞において IGF-I、LIF などの増殖因子によって活性化された STAT3 が *c-myc* の発現誘導を介して細胞増殖を推進するのみでなく、MyoD と直接的に結合し、MyoD による細胞周期の停止と細胞分化の誘導を阻害することが明らかとなった。つまり、STAT3 は本来の転写因子としての機能と蛋白質間の相互作用により相反する機能をもった MyoD の機能を抑制するという 2 つの機能によって、筋肉芽細胞の増殖 vs. 分化の運命決定に重要な機能を果たすことが明かとなった。また、逆に、MyoD も STAT3 の機能を抑制することが見出された。これらの結果から、筋肉芽細胞の増殖・分化は増殖因子によって活性化される細胞内シグナル伝達分子と内因性の分化プログラムを遂行する転写因子との相互作用により、複雑、且つ、巧妙に制御されていることが明らかにされた。

本研究は、筋肉芽細胞の増殖 vs. 分化の運命決定の分子機構を明らかにしたという点で、高い学術的価値を有している。同時に、筋肉細胞の再生をめざした再生医療の研究にも極めて有用な知見を供するものであり、臨床的な意義においても学位に値する研究と考えられる。