The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signaling pathways
Author(s)	吉田, 寛二
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38892
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、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

【21】

氏　　名	吉田寛二（よしだかんじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11259　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signaling pathways （gp130の単独活性化による胚性幹細胞の多分化能の維持）
論文審査委員	（主査） 教　授　田中亀代次 （副査） 教　授　岸本　忠三　　教　授　平野　俊夫

論文内容の要旨

【目　的】

マウス胚性幹細胞（ES細胞）は着床前の胚盤胞の内部細胞塊より樹立された発生研究に有用なcell lineであり，その多分化能の維持は唯一leukemia inhibitory factor（LIF）により担われていることが知られていた。gp130はIL-6レセプター（IL-6R）に会合する信号伝達鎖として同定され，IL-6が同レセプターに結合するとgp130同志のホモダイマーを形成することが明らかとなった。近年，LIF, ciliary neurotrophic factor（CNTF）およびoncostatin M（OM）刺激により，細胞表面上のLIFレセプター（LIFR）とgp130がヘテロダイマーを形成することが発見された。これらgp130を含むホモおよびヘテロダイマー化が各々のサイトカインの信号伝達の引き金になると考えられている。また，このgp130共有の概念は，サイトカインに特徴的な機能の重複性を説明するよいモデルとなっている。本研究において，IL-6＋可溶性IL-6R（sIL-6R）刺激により形成されるgp130のホモダイマーが，ES細胞（通常IL-6R⁻でIL-6非応答性）に対して多分化能の維持という点において，LIF刺激によって形成されるgp130-LIFRヘテロダイマーと同等に作用するか否かを検討した。さらに，後者のヘテロダイマー化を誘導する別のサイトカインであるOM, CNTFについてもES細胞への効果を調べた。

【方法ならびに結果】

1．IL-6＋sIL-6R存在下で培養したES細胞は未分化状態に維持されている。

IL-6＋sIL-6R存在下でES細胞を培養し，幹細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を調べたところ，LIF存在下と同様にALP活性陽性のコロニーを形成した。もうひとつの幹細胞マーカーであるstage-specific embryonic antigen-1（SSEA-1）の発現をIL-6＋sIL-6R存在下で，免疫化学的に解析したところ，LIF存在下と同様にその発現は保持されていた。また，形態学的にもそのコロニーは未分化状態に特徴的なコンパクトな細胞を呈しており，LIF存在下でのES細胞の形態と同様であった。また，ES細胞の増殖に対する効果をみるためLIF，およびIL-6＋sIL-6R存在下で同細胞の^{3}H－チミジンの取り込みを調べたところ両者間に差はなく同等の増殖を示した。他のgp130共有サイトカインであるOM, CNTF刺激によっても同様の結果を得た。

2．IL-6＋sIL-6R存在下で継代培養したES細胞は多分化能を有しキメラマウスの形成に至る。

クローン化したES細胞をIL-6＋sIL-6R存在下で培養し，20-30継代後C57BL／6の胚盤胞に注入しMF-1の偽妊娠マウスの子宮に戻したところ正常に発生したキメラマウスが生まれた。そのキメラマウスにおいて，ES細胞由来

の glucose phosphate isomerase（GPI）isozyme の割合を調べたところ，注入された ES 細胞はキメラマウスの各器官において正常な発生を示した。

3．IL-6＋sIL-6R 刺激により ES 細胞は LIF の転写産物を誘導しない。

IL-6＋sIL-6R 刺激による ES 細胞の分化抑制能が LIF を介していないことを証明するため，ES 細胞を LIF および IL-6＋sIL-6R 存在下で培養し，LIF 転写産物の発現を RNase プロテクションアッセイで調べたところ，共に低レベルの発現のみを示し差はなかった。これにより ES 細胞の多分化能の維持における IL-6＋sIL-6R の効果は LIF の発現を介した二次的なものではなく直接作用であることがわかった。

4．ES 細胞における IL-6＋sIL-6R の作用は gp130 分子単独との会合およびチロシンリン酸化を介しており，LIFR は関与していない。

IL-6＋sIL-6R 複合体が実際に ES 細胞において gp130 と会合しているかどうかを調べるため，^{35}S-メチオニンでラベルした ES 細胞を IL-6＋sIL-6R で刺激後 NP40 で可溶化し抗 IL-6R 抗体で免疫沈降したところ，gp130 のバンドのみを検出した。また，ES 細胞を，IL-6＋sIL-6R あるいは LIF にて刺激し，NP40 で可溶化後，抗 gp130 抗体で免疫沈降し，抗フォスフォチロシン抗体でウェスタンブロットしたところ，IL-6＋sIL-6R 刺激では gp130 のみのチロシンリン酸化が認められたのに対し，LIF 刺激では gp130 以外に約 190kD のタンパク（おそらくは LIFR）もチロシンリン酸化されていた。

【結論ならびに考察】

LIF は ES 細胞の多分化能を維持するのに重要で唯一の分子であると考えられてきた。本研究において，IL-6＋sIL-6R 刺激のような gp130 ホモダイマーを誘導する刺激によっても（LIFR が関与しないにも関わらず）LIF 刺激と同様に ES 細胞において多分化能を維持することが明らかとなった。*in vitro* の LIF の ES 細胞への効果から，かつて LIF が初期胚の発生において重要な役割を果たしていると推定されていたが，最近 LIF ノックアウトマウスが報告され，その発生が正常であったために，*in vivo* では幹細胞の維持が別のメカニズムで行われているか，あるいは生体内では LIF にかかわる因子が存在するかのいずれかが示唆され，後者については本研究の成果により gp130 を共有するサイトカインすなわち IL-6＋sIL-6R, OM および CNTF の関与が推測された。

論文審査の結果の要旨

マウス胚性幹細胞（ES 細胞）はマウス胚発生を *in vitro* で解析するシステムに大変好都合であり，この細胞の多分化能の維持は唯一 leukemia inhibitory factor（LIF）によってのみ担われていることがこれまでの知見であった。本研究は *in vitro* および *in vivo* の実験系をもちい，interleukin-6（IL-6）＋可溶性 IL-6 受容体の刺激によって形成される gp130 のホモダイマーが，LIF 刺激によって形成される gp130 と LIF 受容体のヘテロダイマーと同様に ES 細胞における多分化能の維持に導きうること，さらには，後者のヘテロダイマー化を誘導する別のサイトカインである oncostatin M（OM）や ciliary neurotrophic factor（CNTF）でも同様の効果があることを明らかにしたものである。かつて，初期胚発生において重要な役割を果たしていると考えられていた LIF のノックアウトマウスが報告されたが，正常に発生したためその役割に疑問が投げかけられていたが，本研究の成果により LIF 以外にも gp130 を信号伝達蛋白として共有するサイトカインである IL-6＋可溶性 IL-6 受容体，OM および CNTF が胚性幹細胞の維持という機能を果たしうるという知見が得られた。さらには，これらの遺伝子の異常が生殖細胞や胚発生の異常に関与していることも予想され，不妊等の原因の解明にもつながる発展性をもつものと期待される。よって，本研究は学位論文に値するものと認められる。