

Title	Activation of JAK-STAT and MAP Kinases by Leukemia Inhibitory Factor Through gp130 in Cardiac Myocytes
Author(s)	国定, 慶太
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40903">https://hdl.handle.net/11094/40903</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	くに きた けい た 國 定 慶 太
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 3 3 4 7 号
学位授与年月日	平成 9 年 7 月 7 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	Activation of JAK-STAT and MAP Kinases by Leukemia Inhibitory Factor Through gp 130 in Cardiac Myocytes (白血病阻止因子の心筋細胞における gp130 を介する JAK-STAT 系と MAPK 系の活性化)
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三 (副査) 教授 堀 正二 教授 荻原 俊男

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

gp130 は、炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (IL-6) をはじめとする IL-6 サイトカインファミリー共通の受容体で、ほとんどすべての臓器に発現している。心臓においても gp130 は高い発現レベルを示すが、その役割については不明であった。近年、gp130 のノックアウトマウスにおいて胎生期心筋の菲薄化が観察され、また、gp130 の持続活性化モデルである IL-6、IL-6 受容体のダブルトランスジェニックマウスにおいて、心筋の肥厚が観察されることが報告され、gp130 の活性化が心筋の分化や肥大に関与している可能性が推測された。しかしながら、心筋細胞における gp130 を介する細胞内情報伝達系については未だ明らかにされていない。インターフェロンの下流に、Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) 系が新しいシグナル伝達系として存在することが報告され、さらには IL-6 に反応する STAT ファミリーとして肝細胞より STAT3/APRF がクローニングされた。

そこで本研究では、心筋細胞において STAT3 が gp130 の下流に存在し活性化を受けるか否か、ノルエピネフリン (NE)、アンジオテンシン II 等の種々の肥大因子により活性化されることが知られている mitogen activated protein kinase (MAPK) 系が、gp130 刺激により活性化されるか否かを明らかにすることを目的とした。

### 【方法ならびに結果】

#### 1) 方法

新生児ラットあるいはマウス培養心筋細胞を用い、IL-6 サイトカインファミリーの 1 つである leukemia inhibitory factor (LIF) により刺激した。in vivo における実験系として、マウスに尾静脈より LIF を注射した。

①ウエスタンブロッティング：LIF ( $1 \times 10^3$  U/ml) で刺激した培養心筋細胞を一定時間毎に溶解した後に超遠心を行い、その上清を抗 gp130, JAK1, JAK2, STAT3 抗体にて免疫沈降後、SDS-PAGE にて電気泳動を行った。次にナイロンメンブレンに転写し、抗チロシンリン酸化抗体にてブロッティングを行い、活性化の有無を検討した。

②MAPK 活性：LIF あるいは NE にて刺激した心筋細胞を溶解した後に超遠心を行った。その上清と、MAPK 基質

である合成ペプチドならびに $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ を反応させた後、セルロースペーパーに添加し、合成基質に取り込まれた $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ をシンチレーションカウンターにて測定した。

## 2) 結果

心筋細胞において gp130 は、LIF 刺激 2 分後よりリン酸化され、5 分をピークとし 15 分にはリン酸化は減弱した。JAK1 においても、同様に早期のリン酸化が観察された。STAT3 は 5-15 分をピークとしてリン酸化され、約 30 分間その活性は持続した。心筋細胞における STAT3 の活性化は、LIF の濃度に依存して増強した。培養心筋細胞中には約 10 % の非心筋細胞が存在するが、STAT3 のリン酸化が主に心筋細胞由来であることを確認するため、非心筋細胞も同様に刺激し、等量蛋白中における STAT3 のリン酸化を検討した。非心筋細胞においても LIF により STAT3 はリン酸化されるが、その程度は心筋細胞の約 1/3 であり、この系でみられる STAT3 の活性化は主に心筋細胞由来と考えられた。

次に、これらの蛋白が gp130 を介してリン酸化されていることを確認するために、gp130 阻害抗体で前処置を行い、その後に LIF 刺激を行った。JAK1, STAT3 の活性化は抗体の前処置により著明に抑制され、これらの結果より gp130 を介したものと考えられた。

MAPK の活性化も、心筋細胞への LIF 刺激により 5 分後をピークとし、30 分以内には減弱するという活性パターンを示した。これは、NE ( $1 \times 10^{-5}\text{M}$ ) 刺激 5 分後に観察される MAPK 活性のピークの約 1/2 で、活性の持続時間も NE と比べ短時間であった。この LIF 刺激による MAPK 活性の充進も、gp130 阻害抗体の前処置にてほぼ完全に抑制された。

これら培養心筋細胞において観察された、LIF 刺激による JAK-STAT 系の活性化および MAPK 活性の充進は、in vivo の系における、マウスへの LIF 尾静脈投与による心臓においても観察された。心臓で観察された STAT3 のリン酸化の時間経過およびその活性化の程度は、肝臓で観察されるものとほぼ同じであった。

### 【総括】

心筋細胞において LIF 刺激による gp130 の活性化の後に、分化、増殖などに関与することが知られている JAK-STAT 系と MAPK 系が活性化されることを明らかにした。しかしながら、現在のところ心筋細胞における JAK-STAT 系の機能の詳細は不明で、今後、心筋細胞及び vivo において心臓で観察された JAK-STAT 系の活性化の役割を検討したいと考えている。

## 論文審査の結果の要旨

インターロイキン-6 関連サイトカインは、心筋細胞において高い発現を示す情報伝達分子 gp130 を介し、細胞肥大を誘導する。しかし、gp130 活性化後の細胞内情報伝達系は不明であった。本研究は、未だ知られていなかった JAK-STAT 系の存在とその活性化を心筋細胞において初めて明らかにし、さらに既知の増殖因子等で活性化が認められる MAPK 系も、その下流に存在することを示した。今後、それぞれの情報伝達系の生理的意義と、心筋症等との関連性につき説明が期待される。

以上より、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。