The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Generation of knock-in mice expressing mutant gp130
Author(s)	大谷, 卓也
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41698
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

【51】

氏　　名	大谷卓也（おおたに たくや）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　14480　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Generation of knock-in mice expressing mutant gp130 （gp130からのシグナル伝達経路を選択的に欠損させたノックインマウスの作成とその解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　平野　俊夫 （副査） 教　授　宮坂　昌之　　教　授　菊谷　仁

論文内容の要旨

【目的】

gp130はIL－6ファミリーサイトカインのレセプターの構成要素であり，そのシグナル伝達に必須である。リガンド刺激によりgp130に恒常的に結合しているJAKキナーゼ（JAK1，JAK2，及びTYK2）が活性化され，gp130のチロシンリン酸化が誘導される。ヒトgp130 N末より759番目のチロシン残基（Y759）はチロシン脱リン酸化酵素であるSHP－2のチロシンリン酸化に必須であり，YxxQモチーフを有する4つのチロシン残基（Y767，Y814，Y905，Y915）はSTAT3のチロシンリン酸化に必須である。Y759からはMAPキナーゼ経路が活性化されることが示されており，SHP－2はこの活性化に関与すると考えられている。一方，リン酸化されたSTAT3は二量体を形成して核に移行し，遺伝子発現を制御している。

当教室では既にM1細胞株を用いてYxxQモチーフを介するSTAT3経路がマクロファージへの分化誘導に必須であること，またBAF－B03細胞株ではSTAT3経路とY759を介するMAPキナーゼ経路が協調して増殖を引き起こすことを示した。今回，チロシン残基に変異を導入することで以降のシグナル伝達経路を選択的に阻害したgp130変異体をマウス個体に導入し，gp130の活性化により誘導される，血球系細胞の増殖・分化，肝細胞における急性期応答，肝再生，運動神経に対する成長因子としての働きといった様々な生体反応における，両経路の個体レベルでの役割の解明を試みた。

【方法ならびに成績】

ES細胞内での相同組み換えを利用し，細胞膜貫通領域と細胞内領域に相当するgp130ゲノムDNAを目的の遺伝子とES細胞中で置換，すなわちノックインしたES細胞株を樹立した。導入する遺伝子にはヒトgp130野生型cDNAを用いたWh，Y759をフェニルアラニン残基に変異させたヒトgp130 cDNAを用いたF2，同様にYxxQモチーフを持つチロシン残基に全て変異を導入したF3－6，同部位に終止コドンを導入したTermの四種を用いた。これらのES細胞株を用い，定法に従いホモ接合体のノックインマウスを作成した。F2ではY759を介するシグナル伝達が，F3－6ではSTAT3を介するシグナル伝達が，Termではこれらすべてのシグナル伝達を欠損することが期待できる。以上の四系統のノックインマウスを用いて，以下の実験と観察を行った。

WhとF2のホモ接合体は正常な比率で生まれ，外見上も異常は見受けられなかった。またその後の成長も正常で

あり，成体を得ることができた。これらの成体は雌雄ともに子孫をつくることが可能であった。Ｆ３－６のホモ接合体は正常な比率で出生したが，これらの個体はすべて24時間以内に死亡した。Term のホモ接合体の出現比率はメンデル則から期待される値よりは若干低い値を示した。出生した Term のホモ接合体もすべて24時間以内に死亡した。Ｆ３－６のホモ接合体や Term のホモ接合体では胎仔期の成長遅延が観察された。またこれらのホモ接合体では，新生仔の胃の中に母乳の蓄積が観察されなかった。

Ｆ２のホモ接合体を解剖したところ，脾臓とリンパ節の腫大が観察された。脾臓の重量の比較では，５カ月齢のホモ接合体では野生型に対して約2.9倍に増加していた。またリンパ節の細胞数も約3.0倍に増加していた。フローサイトメーターの解析では，脾臓及びリンパ節を構成するＴ細胞・Ｂ細胞・マクロファージの割合に顕著な差異は認められなかった。

gp130からのシグナル伝達経路の抗体産生における役割を明らかにするために，Ｆ２のホモ接合体とその対照同腹仔を胸腺依存性抗原である DNP－KLH で免疫し，一週間後の抗原特異的な血中抗体量を比較した。Ｆ２のホモ接合体では抗原特異的な IgG２ａと IgG２ｂの産生が亢進していた。その他のアイソタイプ（IgM，IgG1，IgG3，IgA）では顕著な差異は認められなかった。胸腺非依存性抗原で刺激したときにはこのような差は認められなかった。

成体の得られないＦ３－６及び Term の変異では血液系細胞の発生や免疫系への効果が明らかにできないので，血液系細胞の再構成実験を行った。あらかじめＸ線照射した SCID マウスに，Term のホモ接合体胎仔肝細胞を静注し，血液系細胞を再構成させた。Ｔ細胞・Ｂ細胞・マクロファージのいずれもが対照と同程度に再構成されたことから，血液系細胞の発生に gp130のシグナルは必須でないことが示された。しかし再構成から４週間後に血中免疫グロブリン濃度を測定したところ，IgG２ａと IgG２ｂが特異的に減少していた。

【総括】

今回作成したノックインマウスは gp130からの STAT3を介したシグナル伝達経路が正常な個体発生に必須であることを示した。また gp130のＹ759を介したシグナル伝達経路が末梢リンパ組織における血液細胞の増殖あるいは生存を抑制制御していることが示された。さらに免疫応答においては，胸腺依存性抗原刺激による IgG２ａと IgG２ｂクラスの抗体産生に gp130による STAT3活性化が中心的な役割を果たしており，Ｙ759にこれを負に制御する機能が存在することを示した。今後このマウスを用いて，gp130によるシグナル伝達経路の生体における意義をより明らかにできるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

サイトカインや各種の成長因子の研究では，培養細胞を用いた研究で得られた結果が生体レベルでの現象に反映されるかどうかが主要な興味となりつつある。gp130では SHP－２を介する経路と STAT3を介する経路の活性化に関与するチロシン残基が同定されており，部位特異的変異を導入することでシグナル伝達経路の一方を特異的に阻害したときの効果を観ることが出来る。本研究では，ノックインという手法を用いることにより，変異 gp130遺伝子を内在性 gp130と同じ時期，同じ領域に変異 gp130を発現させている。これは gp130を欠失させた場合や，STAT3，SHP－２，MAP キナーゼなどを欠失させたりドミナントネガティブ型に置換する方法に比べ，より gp130特異的なシグナルを阻害した効果がわかり，生体内でのシグナル伝達に及ぼす変異 gp130の影響を詳細に解析することが出来るものである。gp130は血球系細胞の増殖・分化，肝細胞における急性期応答，肝再生，運動神経に対する成長効果などの様々な生体反応に中心的な役割を果たす分子であるが，そのシグナル伝達経路に生体内での働きや機能，優位性に違いがあるかどうかを明らかにすることは，シグナル伝達研究の生物学的な理解に役立つものであり，その成果は広く病態の解明や治療法の開発にフィードバックされうるものである。また本研究では，４系統のノックインマウスを作成し，かつ免疫学的，分子生物学的，生化学的な解析を行っており技術的にも優れている。以上より本研究は学位の授与に値する優れたものであると考えられる。