

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 14 年度博士課程進学
氏名 田中英之
指導教員名 舘川宏之

論文題目

IL6 による PC12 細胞の運動促進に関する研究

はじめに

細胞は外部からの刺激に応答して、方向性を持って運動する場合がある。細胞運動は免疫細胞の病原菌への攻撃、炎症性細胞の炎症部位への移動、癌細胞の浸潤、転移のみならず、個体発生や器官の形成に関わる重要な生命現象である。その異常が様々な病態を引き起こすことからこれまで様々な研究がなされてきた。細胞運動に関わる分子として細胞外部のリガンド、基質、そのレセプター、細胞内部での二次メッセンジャー、アクチン骨格の再編成に関わる物質等々その分子種は多岐に渡っている。リガンドに注目すると、免疫系の細胞の遊走に関わるケモカイン類、血管新生や管腔形成に関わる血管内皮増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) といったタンパク性のものから、リゾフォスファチジン酸 (LPA)、環状 AMP (cAMP) といった化合物に至るまで幅広い種類が知られている。それらは細胞種によって同じ分子でも関わり方が異なることも明らかになっており、その分子機構の解明には多くの注目が集まっている。

ラット副腎髄質褐色細胞腫 (PC12 細胞) は神経成長因子 (NGF) により神経様突起を伸ばすことが知られており、神経細胞のモデル細胞として広く用いられている。PC12 細胞は、そのシグナル伝達の解析で得られた結果を実際の神経細胞に適用することで、神経系のシグナル伝達の研究の発展に大きく寄与した細胞である。主に神経突起の伸長機構の研究においての貢献が著しいが、細胞運動に関しての知見はあまり多いと言えないのが現状である。

我々の研究室では神経突起の伸長を促す新規物質の単離を目的として、様々な組織に由来する癌細胞の培養上清で PC12 細胞に対して、突起伸長活性があるもののスクリーニングが行われた。その結果グリオーマ細胞 SF268 の培養上清に突起伸長活性を検出した。興味深いことにこの培養上清刺激により誘導される突起は NGF による突起と長さ、形が異なった。さらにこの培養上清には NGF 添加の際には見られなかった PC12 細胞の塊がバラバラに離れ、一つ一つの細胞間が広がるという分散活性が検出された。PC12 細胞においてこのような活性を示す分子はこれまでに報告がなく、また前述のように PC12 細胞が神経のモデ

ル細胞として多く用いられており、この活性を詳細に解析することにより神経細胞の運動に関する新たな知見を得ることが期待された。そこで本研究ではこの活性因子の単離および活性因子の誘導するシグナル伝達機構の解明を試みた。

IL6はPC12細胞の運動を促進し、細胞塊分散を引き起こす

先行研究により培養上清中の突起伸長活性は陽イオン交換樹脂 S-Sepharose に結合することが分かっていた。しかし S-Sepharose 結合画分には突起伸長活性のみ検出され、分散活性は検出されなかった。また S-Sepharose 素通り画分単独でも細胞塊の分散は見られなかった。そこで S-Sepharose 結合画分と素通り画分を共存させたところ、細胞塊は分散した。よって分散活性は突起伸長活性が共存して初めて効果を発揮することが分かり、一般的な細胞運動を誘導するリガンドとは一線を画すユニークな物質であることが示唆された。よって S-Sepharose 素通り画分中に含まれる分散活性因子の精製を意図して、結合する樹脂の検討を行った。

その後、突起伸長活性を担う因子が NGF であることが判明したことから、NGF に対して精製画分を共存させ、細胞塊の分散を観察する系を確立した。この系を用いて様々な樹脂を検討した結果、逆相樹脂が分散活性因子の精製に有効であることが分かった。同時にこの活性因子の性質検討を行い、プロテアーゼ感受性であること、熱、酸に安定であること、ゲルろ過によるサイズ分画から分子量が 16kD~40kD であることも分かった。以上の性質が以前当研究室で精製されたインターロイキン 6 (IL6) に似ていること、さらに NGF と活性画分による細胞の突起の形態が IL6 によって誘導された突起に似ていることから、分散活性を担う因子は IL6 である事が推察された。そこで抗 IL6 中和抗体を予め添加した SF268 培養上清の PC12 細胞塊に対する効果を見たところ、分散活性は見られなかった。また IL6 の精製標品を NGF と共存させたところ、精製画分と同様に細胞塊の広がりが見られた。このことから SF268 培養上清中の PC12 細胞塊の分散活性を担う物質は IL6 であることが明らかになった。

次にこの IL6 による細胞塊分散が、細胞運動の促進によって引き起こされるかどうか確認するために金コロイド法による運動能の測定を実施した。その結果 NGF 単独刺激時と比べ NGF 共存下で IL6 刺激時に PC12 細胞の運動性が増すことが明らかとなった。細胞塊の分散活性は細胞運動の促進の結果であることを確認した。

IL6 は多くの機能を持つサイトカインであるが細胞運動に関する報告は数例しかなく、その多くが表現型の報告にとどまり、内部のシグナル伝達を詳細に解析した例はほとんどない。このアッセイ系を使って IL6 の細胞運動への関わりという新しい機能を提言できると考えられる。以下 IL6 下流のシグナル伝達の解析を行った。

細胞運動に関わる IL6 受容体 gp130 の機能部位

IL6 受容体はリガンド高親和性の α サブユニット、低親和性の β サブユニット通称 gp130

からなる。IL6 は細胞膜上に存在する α サブユニットと結合する。リガンドと結合した α サブユニットは gp130 と会合し、gp130 に結合しているチロシンキナーゼ JAK (Janus kinase)が活性化される。活性化された JAK は、gp130 細胞内領域に存在するチロシン残基および、転写因子 STAT(signal transducer and activator of transcription)5 やチロシンキナーゼ Btk といったシグナル伝達分子をリン酸化することが知られている。

gp130 細胞内領域は 277 アミノ酸からなり、6 つのチロシン残基が存在する。このうち細胞膜領域から数えて、第 2 から第 6 のチロシン残基が JAK からリン酸化を受ける。リン酸化された第 2 チロシン残基にはチロシンフォスファターゼ SHP-2 が結合し、MAP キナーゼ経路を活性化する。また 3 番目から 6 番目のチロシン残基はリン酸化を受けることにより転写因子 STAT3 をリクルートし、JAK による活性化を誘導する。活性化された STAT3 は核内へ移行し、多くの遺伝子の転写を制御していると考えられている。

gp130 のどの部位のリン酸化が細胞塊の分散に関するシグナルを担っているか検討するため、gp130 細胞内領域の各チロシン残基をフェニルアラニンに改変した点変異体を用いた解析を行った。その際内在性 gp130 の影響を排除するために gp130 の細胞外領域を顆粒球コロニー刺激因子 G-CSF 受容体の細胞外領域に改変したキメラ受容体を使用した。

マイクロインジェクション法により PC12 細胞塊全体にキメラ受容体を発現させ、NGF 存在下で G-CSF を添加し細胞塊の観察を行った。その結果 MAP キナーゼ経路が抑制される変異体、STAT3 へのリン酸化が抑えられる変異体において野生型と同様の活性が見られた。また全てのチロシン残基をフェニルアラニンに変えた変異体においても同様に分散活性が見られた。これらのことから IL6 による細胞塊の分散には gp130 のチロシンリン酸化は必要でないことが示唆された。

次に gp130 の欠失変異体を用いて細胞塊の分散に必要な領域の検討を行った。点変異体の結果と同様に MAP キナーゼや STAT3 を活性化する領域を欠失させた細胞膜から 68 アミノ酸をコードする変異体 (G68) を用いても細胞塊の分散に影響はなかった。さらに細胞内領域を削り、細胞膜から 25 アミノ酸をコードする変異体 (G25) を用いると細胞塊の分散が抑制された。G68 と G25 の間の 43 アミノ酸に相当する領域には JAK と結合する領域が存在する。このことから細胞塊の分散には JAK 結合領域を含む領域が必要であることが示唆された。

以上の結果から IL6 刺激による細胞塊分散には JAK 下流の gp130 のリン酸化チロシンを介さない経路が重要である可能性が示された。前述のようにこの経路の下流因子には STAT5 や Btk が存在するが、Btk は免疫系に特異的なチロシンキナーゼである。そこで JAK 下流の具体的候補として STAT5 が関わる可能性を考えた。STAT5 は先述の STAT3 と同様、そのチロシンリン酸化が活性化の指標とされている。そこで分散活性を誘導することのできる変異体においても STAT5 のリン酸化が見られるかどうかについて検討を試みた。293T 細胞に gp130 の欠失変異体と STAT5 を共発現させ、G-CSF で 15 分間刺激した後、抗リン酸化チロシン STAT5 抗体でイムノプロットを行った。その結果、G68 を発現させた 293T 細胞では

刺激に応じて STAT5 のリン酸化が見られたのに対し、G25 を発現させた細胞では STAT5 のリン酸化は見られなかった。この結果は欠失変異体における STAT5 の活性化と細胞塊分散活性に相関が見られたことを意味する。このことから細胞塊分散に関わる IL6 シグナル伝達経路の下流分子として STAT5 が候補であることが示唆された。STAT5 は様々な細胞種で増殖と分化に関わる転写因子であるが、細胞運動に関する知見は少ない。神経系においても一部の神経細胞の増殖に関わる報告があるのみである。さらなる解析によって STAT5 の新たな機能の解明に繋がることが期待される。

まとめ

本研究において SF268 培養上清から PC12 細胞塊を分散させる因子として IL6 を同定し、細胞塊の分散が各細胞の細胞運動によることを示した。NGF と共存しないと効果を発揮しないことから直接の走化性因子というよりは運動能を促進するというユニークな因子であると考えられる。また IL6 下流のシグナル因子に関しては、当初の予想と異なり MAPK や STAT3 を経るものではなく、JAK から直接リン酸化される分子に関わることが分かった。具体的候補として STAT5 を考えているが、詳細な解析が必要である。

PC12 細胞は神経系のモデル細胞であることを考えると、本研究の結果を実際の神経細胞に適用し、神経系の細胞の新たな運動機構を解明する端緒になることが期待される。