

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田中 英之

細胞は外部からの刺激に応答して、運動する。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。ニューロン前駆細胞の細胞運動の異常が起きると、脳構造の乱れが生じることが明らかにされており、ニューロン前駆細胞の細胞運動が脳神経系構築時に重要な役割を果たしていると考えられている。従って分子レベルにおける神経細胞運動の制御機構の解明は生物学的に重要であるが、未だ不明な点が多く残されており、全容解明には程遠いのが現状である。本論文はヒトグリオーマ細胞株 SF268 の培養上清に神経系のモデル細胞であるラット PC12 細胞の細胞塊分散を誘導する活性を見出し、この活性因子の同定および活性因子の誘導するシグナル伝達機構の解明を通して、神経細胞の運動制御機構の解明に繋がる新たな知見を得ることを試みたもので、研究の背景を述べる第 1 章と材料と方法を説明する第 2 章、それに続く第 3, 4 章、および研究結果を討論する第 5 章からなる。

第 3 章では SF268 培養上清中の細胞塊分散活性因子を同定し、これらの因子により PC12 細胞の運動性が上昇することを明らかにしている。細胞塊分散活性因子を陽イオン交換樹脂 S-Sepharose を用いて素通り画分と結合画分に分離し、細胞塊分散活性は複数の因子によって誘導されることを示した。細胞塊分散活性が常に突起伸長活性を伴って観察されたことから、突起伸長活性因子である神経成長因子 (以下 NGF) の関与を検討し、抗 NGF 中和抗体による細胞塊分散の阻害、NGF 標品と S-Sepharose 素通り画分刺激による細胞塊分散の誘導を見出し、S-Sepharose 結合画分中の細胞塊分散活性因子は NGF であることを明らかにした。次に S-Sepharose 素通り画分中の細胞塊分散活性因子の精製を試み、部分精製物を得た。部分精製物の性状解析を行い、明らかにした性質にインターロイキン 6 (以下 IL6) の性質との類似点があることを見出し、S-Sepharose 素通り画分中の細胞塊分散活性因子は IL6 である可能性を示唆した。抗 IL6 中和抗体による細胞塊分散の阻害、IL6 標品と NGF 刺激による細胞塊分散の誘導を見出し、S-Sepharose 素通り画分中の細胞塊分散活性因子は IL6 であることを明らかにした。次に金コロイド法を用いて NGF, IL6 による PC12 細胞の運動性の変化を解析し、NGF, IL6 刺激により PC12 細胞の運動性が上昇することを明らかにした。また IL6 は NGF によって誘導された細胞運動を促進する機能を持つ

ことを示した。

第4章では IL6 受容体 gp130 の変異体を用いて、細胞塊分散に関わる IL6 シグナル伝達経路の解析を行っている。gp130 のチロシン残基変異体の解析により、IL6 によって誘導される細胞塊分散には gp130 のチロシンリン酸化は必要でないことを明らかにした。次に gp130 の欠損変異体を用いて細胞塊分散に必要な領域の検討を行い、細胞塊分散には Janus Kinase (以下 JAK) の結合領域を含む領域が必要であることを示した。また JAK が結合できないことが報告されている gp130 点変異体を作製して、細胞塊分散に対する効果の検討を行い、IL6 による細胞塊分散には JAK の gp130 への結合、活性化が必要であることを明らかにした。gp130 のチロシンリン酸化非依存的に JAK によって活性化される分子が転写因子 STAT5 である可能性を検討し、gp130 欠損変異体における STAT5 の活性化と細胞塊分散活性に相関があることを示した。各種阻害剤を用いて NGF, IL6 による細胞塊分散に必要な経路を検討し、PI3K 経路、MAPK 経路、Src 経路の必要性を示した。gp130 変異体を用いた解析と阻害剤を用いた解析により、細胞塊分散に必要な NGF 側の経路として PI3K 経路、MAPK 経路の存在を示唆した。

以上本論文は、ヒトグリオーマ細胞株 SF268 培養上清から PC12 細胞塊分散活性因子として NGF, IL6 を同定し、IL6 が NGF によって誘導された PC12 細胞の細胞運動を促進することを示し、さらに細胞塊分散に関わる IL6 シグナル伝達経路の一部を明らかにしたものである。神経系のモデル細胞である PC12 細胞の細胞運動を促進する因子を同定し、そのシグナル伝達経路の一部を明らかにしたことは、神経細胞運動の制御機構の解明に繋がらうるものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。