
総 説

LIF シグナルによる多能性幹細胞の自己複製

大 塚 哲*

京都府立医科大学大学院医学研究科中央研究室実験動物センター

LIF Signaling Impact on Pluripotent Stem Cells Self-renewal

Satoshi Ohtsuka

*Laboratory for Experimental Animals, Kyoto Prefectural University of Medicine
Graduate School of Medical Science*

抄 録

人工多能性幹 (induced Pluripotent Stem; iPS) 細胞を用いて様々な難治疾患の治療への応用に大きな期待が集まっている。この iPS 細胞は、Oct3/4, Sox2, Myc と Klf4 の 4 個の転写因子を同時に分化細胞へ導入することで樹立できる。これを初期化と言い、この現象の発見の元となった細胞として知られるマウス胚性幹 (mouse Embryonic Stem; mES) 細胞は、1980 年代に樹立されて以来、多能性幹細胞の自己複製に関して数多くの重要な発見の基礎となった。従来の血清を含む培養条件において、IL-6 サイトカインファミリーの一つである白血病抑制因子 (LIF) は、多能性状態の維持に不可欠であることが報告された。その後、ES 細胞における多能性状態を維持するシグナル研究の進歩によって、MAP キナーゼと Gsk3 キナーゼを同時に阻害する無血清培養 (2i 培養, 2 個の阻害剤から 2i と記述される) が開発された。驚くことに、この 2i 無血清培養環境において、LIF は不要となる。一方で 2i によっても LIF 作用が完全に置換されないことも示唆されている。これらの知見は、LIF が培養条件依存的に多能性を維持するために機能することを示唆している。本稿では、LIF シグナル経路が、どのようにして多能性幹細胞の自己複製を維持するかについて、最近の知見も合わせて解説する。

キーワード：再生医療, 人工多能性幹細胞, マウス胚性幹細胞, LIF シグナル。

Abstract

Since the discovery of iPS cells, we have great expectations for the therapeutic potential of induced pluripotent stem (iPS) cells for intractable diseases. Mouse embryonic stem (mES) cells, known as the original cells of iPS cells, have been the basis for many important discoveries regarding self-renewal of pluripotent stem cells since the establishment in the 1980s. In serum containing conventional cultures, leukemia inhibitory factor (LIF), a member of the IL-6 cytokine family, has been reported to be essential for maintaining pluripotency. Later, advances in signaling studies to maintain pluripotency in ES cells led to the development of serum-free cultures (2i cultures, described as combination of two inhibitors) that simultaneously inhibit MAP kinase and Gsk3 kinase.

令和 3 年 1 月 21 日受付 令和 3 年 1 月 25 日受理

*連絡先 大塚 哲 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地

sohtsuka@koto.kpu-m.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.130.03.193

Surprisingly, LIF is not required in 2i serum-free culture context. LIF possesses distinct role from 2i on ES cells self-renewal. These findings suggest that LIF functions to maintain pluripotency in a culture context dependent manner. In this article, I would discuss how the LIF signaling pathway maintains self-renewal in pluripotent stem cells.

Key Words: induced Pluripotent Stem (iPS) cells, mouse embryonic stem (mES) cells, Regenerative medicine, LIF signaling.

はじめに (ES細胞の樹立と培養法の変遷)

マウス ES 細胞は、マウスの 3.5 日胚である胚盤胞の内部細胞塊 (Inner cell mass) に由来し、*in vitro* で無限に自己複製する¹⁾²⁾。ES 細胞は、樹立された当初、マウス胎児線維芽 (MEF) フィーダー細胞とウシ胎児血清を含む培地で維持されていたが、血清には様々な未知の因子が含まれているため製品間でのロット差が著しく、ES 細胞の多能性状態を安定して維持することは技術的に極めて困難であった。その後、バッファローラット肝臓 (BRL) 細胞の培養上清を用いると ES 細胞の自発的分化を抑制することが見出された。BRL 細胞に由来するこの未知の因子は、分化阻害活性 (Differentiation Inhibitory activity; DIA) と名付けられ、BRL 培養上清を用いて調整された血清培地は、MEF フィーダー細胞の非存在下で ES 細胞の多能性を維持できることが示された³⁾。この DIA は Smith A. により生化学的に精製され、現在では ES 細胞の自己複製にとって極めて重要な因子として認識されているサイトカイン白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory factor; LIF⁴⁾⁶⁾ であることが判明した⁷⁾⁸⁾。それ以来、LIF を添加した血清培地 (以下、血清+LIF 培養と記載) は、ES 細胞の培養の世界標準とされた。ES 細胞は、血清+LIF 培養から LIF を除去すると、多能性状態から逸脱し急速に分化する。多能性の維持のための外来性 LIF 依存性は、フィーダーフリーの培養条件下において顕著で LIF 除去により急速に分化を始めるが、MEF フィーダー細胞の存在下においては、MEF による LIF またはそれに類似する分泌因子が原因の可能性がある。

LIF は、近交系マウス系統において 129 系統などの極めて限定された遺伝的背景に由来する ES 細胞に対してのみ効果が明らかであった⁹⁾¹⁰⁾。これまでに様々な疾患モデルマウスに由来する ES 細胞の樹立が試され、例えば 1 型糖尿病モデルマウスである NOD (non-obese diabetic) マウス系統から病因究明の目的で ES 細胞の樹立が試された。従来の血清+LIF 培養では、NOD 系統を含む様々な遺伝的背景からの ES 細胞は樹立できなかった。これらの研究から、LIF 依存性の自己複製には許容のおよび非許容的な遺伝的背景があることが明らかとなった。言い換えれば、LIF の効果は、さまざまな遺伝的背景に由来するすべての系統由来の ES 細胞に遍在的に適用できない。

このような LIF 効果の制約と、血清に含まれる未知の因子のために、ロット差がない安定して自己複製を維持できる培養条件の開発が望まれていた。2008 年、Ying らは、MAPK と GSK3b をそれぞれ標的とする 2 つの小分子阻害剤の組み合わせ (2i) が、LIF を含まない無血清培養での ES 細胞の自己複製を強力に支持することを発見した¹¹⁾。すなわち、LIF 依存性は、遺伝的背景だけでなく、培養条件によっても影響を受けることを示唆している。しかし、この LIF に依存しない 2i 培養条件下においても、依然として LIF の添加は、ES 細胞の自己複製を促進し、2i と LIF との相乗効果が示されている。これらのことは、2i は LIF の単なる置き換えではなく、明確に区別された作用を示している。

LIF とその細胞表面受容体 (図 1)

LIF は、低親和性の細胞表面 LIF 受容体 (Lifr) と Gp130 で構成されるヘテロ二量体受容体複合体に結合する。これらの受容体はいずれも、

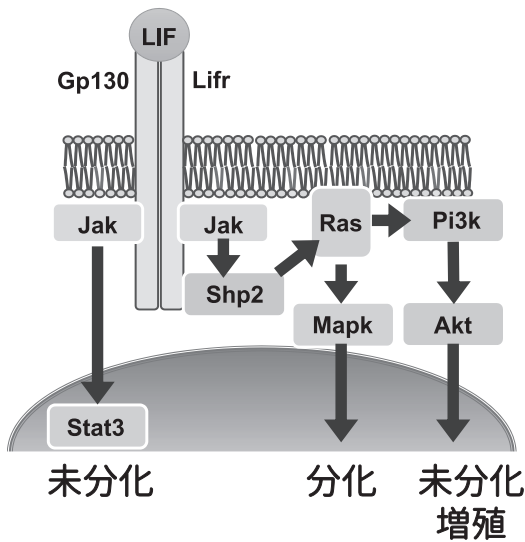


図1：ES細胞におけるLIFシグナル伝達経路

LIFの効果はES細胞に対して2面性があり、「未分化促進」および「分化誘導」である。LIFが細胞表面のGp130/Lifr受容体複合体へ結合すると、細胞内において主に3つのシグナル経路が活性化される。これらの中でStat3およびPi3kによるシグナル経路はES細胞の未分化維持に対して促進的に作用するが、Mapk経路は分化を誘導する。発生学的な環境においては分化シグナルに対して迅速に反応して適切な細胞系譜へ分化する必要があり、上記のLIFシグナルにおける2面性はこれを反映すると考えられている。

細胞質領域における酵素活性のための触媒ドメインを持っておらず、このシグナルの伝達因子として受容体の細胞質ドメインには、Jak1, Jak2, Jak3, およびTyk2で構成されるチロシンキナーゼのファミリーであるJakキナーゼ（以下、Jakと省略）が常に結合している。リガンドが受容体に結合すると、細胞質ドメインのJakは、抑制性ドメインの自己リン酸化によって活性化される。この活性化されたJakにより、Gp130およびLifr¹²⁾の細胞質ドメインに存在するY-x-x-Qモチーフのチロシン残基がリン酸化され、他のJakの基質である転写因子Stat3が受容体に結合できるようになる。受容体結合したStat3がJakによってリン酸化されると、Stat3は受容体を離れて二量体を形成し、次に核に入り、そこで転写因子として作用して標的遺伝子の発現を誘導する¹³⁾¹⁴⁾。

Jak-Stat3経路には負のフィードバックループがあり、シグナル活性は厳密に制御されている。活性化されたJakはStat3をリン酸化し、Socs3サプレッサーの発現を誘導し、その後短時間のうちにJakは不活性化される¹⁵⁻¹⁷⁾。Socs3は、Srcホモロジー2(SH2)ドメインを介してJakに結合し、キナーゼ阻害領域(KIR)によってJakのキナーゼドメインをブロックする¹⁸⁾。Socs3はJakの疑似基質として機能する¹⁹⁾。この負の調節因子により、LIFシグナル伝達経路の活性化は一過性となる。

ES細胞の培養では、LIFは、Lifrに結合するOSM, CT-1, CNTFなどの関連するIL-6ファミリーサイトカインで置換できる²⁰⁻²²⁾。また、可溶性のIL-6受容体(sIL-6R)とIL-6は、LIFの非存在下においてもES細胞の自己複製を支持することができる²³⁾²⁴⁾。これらの発見は、受容体複合体の構成要素の1つであるGp130によって媒介されるシグナル伝達が、ES細胞の自己複製に十分であることを示している。さらに、顆粒球コロニー刺激因子受容体(GCSFR)のリガンド結合ドメインとGp130の細胞質ドメインで作られたキメラ受容体を用いた実験において、キメラ受容体のリガンドであるGCSFによって刺激されたときにLIFの機能を置換できたことも上記の知見を支持する²⁵⁾。これとは対照的に、同じキメラ受容体システムを使用したLifrの細胞質ドメインを使用した結果においては、ES細胞の自己複製は5日間程度の短期的に維持されるものの、リガンド刺激によるStat3活性化は著しく減弱するとの報告がなされており議論の余地が残っている²⁶⁾。

これらの知見から、Gp130を介したシグナル伝達は、ES細胞の自己複製におけるLIFシグナル伝達の主要経路であると考えられる。

LIFの細胞内シグナル伝達経路(図1)

LIFを培地に添加すると、主に3つの細胞内シグナル伝達経路が活性化される。Jak-Stat3, ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(Pi3k)-Akt, Mapキナーゼ(Mapk)経路である。これら3つの経路はそれぞれ、LIFの下流でES

細胞の自己複製において重要な機能を持っていることが示されている²⁷⁾。Jak-Stat3 および Pi3k-Akt 経路は ES 細胞の自己複製を促進するが、Mapk 経路は ES 細胞の分化を促進する。LIF 下流における Jak キナーゼの活性化は、Jak-Stat3 経路の活性化だけでなく、Pi3k-Akt 経路の活性化や Shp2 を介して Mapk 経路を活性化する。

1. Jak-Stat3 経路

ES 細胞の自己複製には、Stat3 の活性を維持するだけで十分であることが示されている²⁸⁾。この報告で用いられた Stat3 は、人為的誘導活性化型で、これは Stat3 とエストロゲン受容体の変異リガンド結合ドメイン (Stat3ER) で作られた融合タンパク質となっている。これは、Stat3 はリン酸化なしに、そのリガンドであるタモキシフェン (Tx) 依存性に ER が活性化された時に核へと移行する。Stat3ER を発現する ES 細胞は、LIF を含まない血清培養条件下において Tx を添加することにより、自己複製を継続することができる。

また、Stat3 の重要性は、Gp130 の Shp2 結合部位 (Y118F) に変異を持つ GCSFR-Gp130 キメラ受容体を用いた実験によって示されている。これは、GCSF の結合時に Mapk 経路ではなく Jak-Stat3 経路を活性化する。この受容体では、GCSF の添加によって Gp130 がホモダイマー化し活性化され、LIF 非依存的な ES 細胞の自己複製を支持することが示されている。これらのデータは、LIF の下流の 3 つの経路の中で、Stat3 経路の活性化が ES 細胞の自己複製に十分であることを示している。また、GCSF-Gp130 キメラ受容体において Gp130 の細胞質ドメインから Stat3 結合部位を欠損させると、GCSF の添加によっても自己複製を支持する能力が喪失することも示された²⁵⁾。さらに、Jak を標的としたリン酸化部位 (Stat3Y705F) に変異があるドミナントネガティブ型の Stat3 の過剰発現は、血清 + LIF 培養で ES 細胞の分化を強く誘導する。また、Stat3 欠損 ES 細胞は、血清 + LIF 培養の Stat3-null 胚盤胞から樹立することができない¹¹⁾。したがって、Stat3 の活

性は ES 細胞の自己複製に必須であることが明らかとなっている。

Stat3 は Jak によってチロシン残基 (Y705) がリン酸化され、また Mapk/Jnk (c-Jun N 末端キナーゼ)/Pkc (プロテインキナーゼ C) によってセリン残基 (S727) がリン酸化される²⁹⁾。Stat3 のチロシン残基 (Y705) リン酸化は、前述のように ES 細胞の自己複製にとって必須であった。一方、S727 でのリン酸化は自己複製には必須ではないが、ES 細胞の増殖を促進する。神経分化の過程においては、この Stat3 のセリン残基 (S727) リン酸化は必須であり、Stat3 リン酸化の細胞系譜に特異的な役割が示唆されている。

LIF の培地への添加により、ES 細胞内では、Stat3 および Mapk の Erk1/2 は急速にリン酸化され、その後短時間 (~30 分程度) の間に脱リン酸化される³⁰⁾。Jak の負の調節因子である Socs3 を欠損させると、LIF の下流にある Stat3 と Mapk の両方の活性化が長時間維持される³⁰⁾³¹⁾。この延長された Mapk の活性化によって、Socs3 欠損 ES 細胞は胚体外内胚葉への分化を促進され、Mek 阻害剤の添加によって部分的に抑制される³⁰⁾。この結果は、Jak-Stat3-Socs3 軸は、LIF シグナル強度を一定範囲内に収束させるためのチューナーとして機能することを示している。

LIF シグナル伝達は、Gp130, Lifr, および Stat3 の転写が LIF の下流で増強され、LIF シグナル自体をさらに活性化する正のフィードバックループを形成している³²⁾。このシステムは神経発生後のグリア細胞への分化過程においてみられ、LIF シグナル伝達の正のフィードバックループにより LIF シグナルが自己増幅され高い活性を維持することで分化が誘導される³³⁾。同様に、LIF シグナルにおける負および正のフィードバックシステムが、ES 細胞の自己複製シグナル活性の適正な範囲への収束と維持に重要な役割を担っていると考えられる。

2. Mapk 経路

LIF は、Shp2 を介した Grb/Sos 経路を介して Mapk 経路を活性化する (図 1)。Shp2 は、

N 末端に SH2 ドメインを持つ非受容体タンパク質チロシンホスファターゼ (PTP) として知られている³⁴⁾。Shp2 の活性が Jak 阻害剤によってブロックされている場合、Mapk は活性化されず、この場合 Shp2 は、Jak キナーゼによるリン酸化を受けた後、Gp130 上のチロシン残基 (Y118) へ結合する。この Shp2 ドッキングサイトに変異があるキメラ受容体 GCSF-Gp130 (Y118F) は、Mapk 経路ではなく Jak-Stat3 経路だけを活性化し、LIF 非存在下の血清培養における ES 細胞の自己複製を支持する。このことは同時に Mapk 経路の活性化は ES 細胞の自己複製に必須ではないことも示している。

ES 細胞における Mapk 経路の役割は、一連の機能喪失実験によって示唆されている。Mek 阻害剤である PD098059 の添加は、血清+LIF 培養における ESC の自己複製を促進し³⁵⁾、無血清培養における神経分化を阻害し、分化における Mapk 経路の関与を示唆している。Mapk カスケードの上流にある Grb/Sos 経路の構成要素である Grb2 を欠損した ES 細胞においては、血清培養から LIF を除去した場合に誘導される分化に耐性となる。同様に Mapk カスケードの因子である Erk2 の欠損 ES 細胞は、無血清培地で LIF 非存在下で継代できる³⁶⁾。この ES 細胞では多能性マーカー遺伝子群である Oct3/4、Nanog および Rex1 が持続的に発現しており、例えば神経系または中胚葉への分化に defect が認められた。

これらの結果から、LIF による Mapk 経路の活性化は、ES 細胞の分化に関与すると考えられている。

3. Pi3k-Akt 経路

LIF による Pi3k の活性化は、これまでのシグナルカスケードと同様に Jak キナーゼを介して活性化される。その後、下流の Akt および mTOR 経路を活性化する。Pi3k に対する強力な阻害剤である LY294002 によって ES 細胞の増殖速度が抑制されるが、これは細胞周期の G1 期の延長によることが示されている³⁷⁾。mTOR (哺乳類のラパマイシン標的) 欠損 ES 細胞も増殖の欠陥を示し、同様の結果がラパマイシン

による mTOR の化学的阻害から得られている³⁸⁾。ES 細胞において特異的に発現する低分子量 GTPase である Eras の遺伝子欠損により、ES 細胞の増殖性が低下し、多能性に影響を与えることなく Pi3k 活性が低下することが示された³⁹⁾。この増殖低下は Pi3k の触媒サブユニットである p110 の恒常活性化型を過剰発現することで ES 細胞の増殖低下を回復する。これらの結果は、Pi3k-Akt 経路が ES 細胞の増殖に大きく寄与していることを示している。

Pi3k はそのアイソフォームによって役割が異なることが知られている。クラス IA-Pi3k は、110kDa の触媒サブユニットと p85 調節サブユニットで構成されており、110kDa の触媒サブユニットが異なる 3 つのアイソフォームが同定されている。その中で、p110alpha 活性の阻害は多能性に影響を与えることなく増殖だけを抑制するが、p110beta の阻害により Nanog の発現が抑制され、その結果、分化を誘導する。このことから、Pi3k はアイソフォームによってそれらの異なる役割を持つことが示されている⁴⁰⁾。

Pten (Phosphatase and Tensin homolog) は Pi3k 活性に対して拮抗する作用を持っている。この Pten を欠損した ES 細胞においては、p27kip1 の発現低下に起因する G1/S 期移行の亢進が認められ、その結果、Pten 欠損 ES 細胞は高い増殖率を示す⁴¹⁾。この表現型は、上記の Pi3k による増殖促進を支持する。また、Pi3k の下流エフェクターの 1 つである恒常活性化型 Akt の発現は、血清+LIF 培養における ES 細胞が自己複製するための LIF 要求性をキャンセルする⁴²⁾。これらのデータは、Pi3k-Akt シグナル伝達経路が LIF 下流において、ES 細胞における増殖と多能性の維持の両方に関与していることを示唆している。

LIF シグナルの転写因子 ネットワークシステムへの統合

前項までに述べてきた LIF シグナルを伝達する 3 つの経路が、強力な並列経路を形成する多能性に関連した転写因子ネットワークに統合

されることが示されている²⁷⁾。

LIF シグナルの遺伝的背景の影響

これまでに解説した知見は、129 系統というマウスに由来する ES 細胞を実験系として得られたものである。その理由は、129 系統に由来する ES 細胞は従来の血清+LIF 培養において極めて安定して培養できたためである。他の遺伝的背景から ES 細胞を樹立する試みがなされたことで、ES 細胞樹立の観点からマウス系統を 2 つのカテゴリーに分類することができる。従来の FCS/LIF 培養で ES 細胞の確立を可能にする許容系統と、それを許可しない非許容系統である。129 系統は、自己複製能の安定性、生殖細胞系列のキメラ寄与能および遺伝子操作だけでなく *in vitro* 長期培養に対する耐久性を備えた ES 細胞株が樹立できる極めて例外的なマウス系統である。これとは対照的に、例えば 1 型糖尿病のモデルである非肥満糖尿病 (non-obese diabetic; NOD) マウス系統は、従来の血清+LIF 培養条件下において ES 細胞の樹立ができなかった。LIF は用量依存的に ES 細胞の分化抑制効果が報告されていることから、大量の組換え LIF を添加した場合においても、この問題を解決できなかった。そのため LIF シグナル下流のどこかに違いがあるように考えられたが、具体的に LIF シグナル応答性が、どのようなレベルにおいて遺伝的背景間で異なるかについては全く不明のままであった。

無血清 2i 培養の開発¹¹⁾により状況は一変し、この培養法を用いることで全てのマウス系統からの ES 細胞樹立が可能となった⁴³⁾⁴⁴⁾(図 2)。さらに、その他の齧歯類であるラットからも ES 細胞が樹立された⁴⁵⁾⁴⁶⁾。

2i 培養を使用した許容系統と非許容系統の両方からの ES 細胞樹立により、それらの LIF 応答性を比較することが可能となった。2i 培養法で樹立された ES 細胞は、血清+LIF 培養条件下へ移した際に、由来する系統によって異なる特徴を示した。129 系統のような ES 樹立を許容する系統に由来する ES 細胞のみが自己複製を維持でき、血清+LIF 培養で多能性を維持す

る遺伝的能力を示している。LIF シグナルの伝達経路や標的遺伝子の転写誘導効率などを含む応答性を総合的に評価したところ、LIF の下流の細胞内シグナル経路の活性化に量的な違いが示された(図 3)。129 などの許容系統では、**Jak-Stat3** 経路が強く活性化され、**Mapk** 経路の活性化は中程度を示した。一方で、NOD などの非許容系統由来 ES 細胞においては、**Mapk** 経路が高度に活性化されたのに対し、**Jak-Stat3** 経路の活性化の程度は許容系統に由来する ES 細胞よりも減弱していた。前述のように、**Jak-Stat3** 経路は多能性の維持に必須であるが、**Mapk** 経路は分化を誘導する。これらの経路の定量的な活性化のバランスと、ES 細胞樹立の

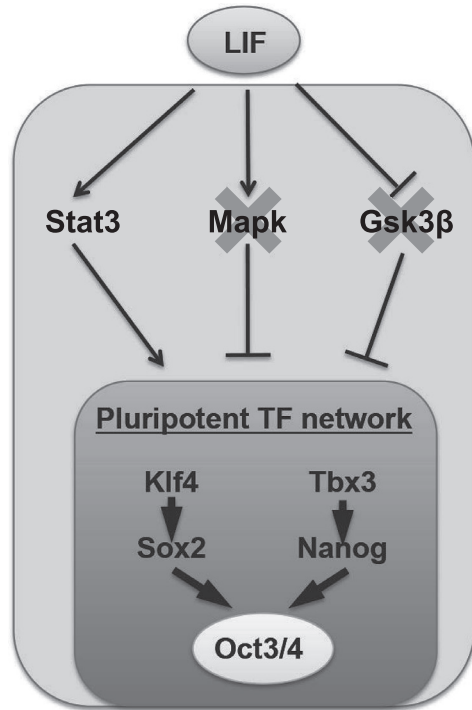


図 2 : 2i 培養法の原理

ES 細胞における自発分化を誘導する 2 つのシグナル経路 (**Gsk3b** および **Mapk**) をそれぞれの阻害剤で同時に処理すると、未分化維持に促進的に作用する **Stat3** 経路のみが活性を保持された状態になる。この時 ES 細胞の自発分化は強力に抑制される。ES 細胞の形態は特徴的なドーム型を示し、MEF 存在下での培養と同じように均一な状態となる。

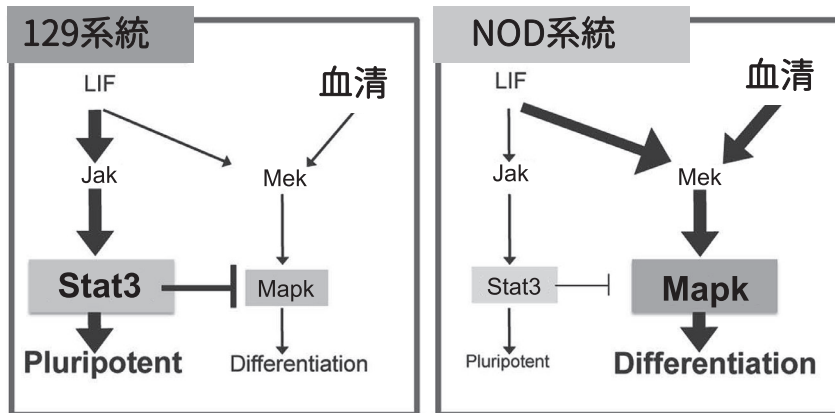


図3：LIFシグナル伝達経路における遺伝的背景の影響

LIFによって活性化される3つの細胞内シグナル伝達経路において、それらの活性化の度合いが遺伝的背景によって影響される。129系統マウスに由来するES細胞においては未分化を促進するStat3経路が強く活性化され、分化誘導活性を持つMapk経路の活性化度は弱い。一方、NOD系統マウスに由来するES細胞においては、Stat3経路の活性化は中程度で、Mapk経路は極めて強く活性化される。このシグナル伝達経路の活性化における潜在的なバランスが、従来の血清培養条件下におけるES細胞樹立の許容性を決める一因である。

許容性との間に強い相関関係が示唆された。Stat3を人為的に活性化することで、Stat3とMapk経路のバランスを129系統ES細胞型へ人為的に変換することができる。この条件においては非許容系統に由来するES細胞の自己複製を部分的に回復する。この時、Mapkの活性化が減弱する現象が認められた。これらのことから、Jak-Stat3とMapkの間のバランスがES細胞の自己複製の許容性を決める要因と考えられた。

血清+LIF培養では、マウス以外の哺乳類からES細胞樹立ができなかった。ヒトES細胞は、LIF非存在下で、マウスES細胞とは異なる培養条件で樹立および維持される。2i培養法を適用しても、齧歯類を除いて問題は解決できなかった。興味深いことに、ラットES細胞のJak-Stat3経路とMapk経路の定量的バランスは、非許容系統に由来するES細胞のそれと類似した⁴⁴⁾。この結果は、遺伝的背景の違いが、LIFシグナル伝達経路を構成する因子を制御しており、LIFシグナル応答性の動物種の違いに密接に関与していることを示唆している。

終わりに

本稿では、LIFシグナルが、どのようにしてES細胞の多能性を維持しているのかについて解説してきた。これまでのES細胞における自己複製機構に関する知見のほとんどは129系統に由来するES細胞から得られたため、これらの知見の全てが一般化できない可能性もある。しかし、ナイーブ型多能性幹細胞の樹立に関する最近の報告は、LIFシグナルによるナイーブ型多能性幹細胞維持機構はヒトを含めた動物種間で共有される可能性を示していることから大変興味深い。

今後、例えば遺伝的背景がどのようにしてシグナル応答性の差異を決めているのについて、その原因が明らかになれば、将来的にヒトナイーブ型多能性幹細胞が安定して供給できるようになり、近い将来にはiPS細胞を用いた再生医療は身近な治療方法の一つになると期待している。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156, 1981.
- 2) Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 7634-7638, 1981.
- 3) Smith, A. G. & Hooper, M. L. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol*, 121: 1-9, 1987.
- 4) Moreau, J. F., Donaldson, D. D., Bennett, F., Witek-Giannotti, J., Clark, S. C. & Wong, G. G. Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature*, 336: 690-692, 1988.
- 5) Hilton, D. J., Nicola, N. A., Gough, N. M. & Metcalf, D. Resolution and purification of three distinct factors produced by Krebs ascites cells which have differentiation-inducing activity on murine myeloid leukemic cell lines. *J Biol Chem*, 263: 9238-9243, 1988.
- 6) Godard, A., Gascan, H., Nault, J., Peyrat, M. A., Jacques, Y., Soullou, J. P. & Moreau, J. F. Biochemical characterization and purification of HILDA, a human lymphokine active on eosinophils and bone marrow cells. *Blood*, 71: 1618-1623, 1988.
- 7) Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A. & Gough, N. M. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336: 684-687, 1988.
- 8) Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M. & Rogers, D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336: 688-690, 1988.
- 9) Battle-Morera, L., Smith, A. & Nichols, J. Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. *Genesis*, 46: 758-767, 2008.
- 10) Brook, F. A., Evans, E. P., Lord, C. J., Lyons, P. A., Rainbow, D. B., Howlett, S. K., Wicker, L. S., Todd, J. A. & Gardner, R. L. The derivation of highly germline-competent embryonic stem cells containing NOD-derived genome. *Diabetes*, 52: 205-208, 2003.
- 11) Ying, Q. L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P. & Smith, A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453: 519-523, 2008.
- 12) Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr. & Yancopoulos, G. D. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*, 267: 1349-1353, 1995.
- 13) Wegenka, U. M., Buschmann, J., Luttkien, C., Heinrich, P. C. & Horn, F. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol*, 13: 276-288, 1993.
- 14) Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K. & Hirano, T. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity*, 5: 449-460, 1996.
- 15) Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiyama, S. & Yoshimura, A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387: 921-924, 1997.
- 16) Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A. & Hilton, D. J. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387: 917-921, 1997.
- 17) Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S. & Kishimoto, T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387: 924-929, 1997.
- 18) Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N. & Yoshimura, A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo j*, 18: 1309-1320, 1999.
- 19) Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S.,

- Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J. A. & Yoshimura, A. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells*, 4: 339-351, 1999.
- 20) Conover, J. C., Ip, N. Y., Poueymirou, W. T., Bates, B., Goldfarb, M. P., DeChiara, T. M. & Yancopoulos, G. D. Ciliary neurotrophic factor maintains the pluripotentiality of embryonic stem cells. *Development*, 119: 559-565, 1993.
- 21) Pennica, D., Shaw, K. J., Swanson, T. A., Moore, M. W., Shelton, D. L., Zioncheck, K. A., Rosenthal, A., Taga, T., Paoni, N. F. & Wood, W. I. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem*, 270: 10915-10922, 1995.
- 22) Rose, T. M., Weiford, D. M., Gunderson, N. L. & Bruce, A. G. Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro. *Cytokine*, 6: 48-54, 1994.
- 23) Yoshida, K., Chambers, I., Nichols, J., Smith, A., Saito, M., Yasukawa, K., Shoyab, M., Taga, T. & Kishimoto, T. Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech Dev*, 45: 163-171, 1994.
- 24) Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. Derivation of germline competent embryonic stem cells with a combination of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor. *Exp Cell Res*, 215: 237-239, 1994.
- 25) Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. & Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 12, 2048-2060, 1998.
- 26) Starr, R., Novak, U., Willson, T. A., Inglese, M., Murphy, V., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., Hilton, D. J. & Ernst, M. Distinct Roles for Leukemia Inhibitory Factor Receptor α -Chain and gp130 in Cell Type-specific Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 19982-19986, 1997.
- 27) Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. & Adachi, K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460: 118-122, 2009.
- 28) Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T. & Yokota, T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*, 18: 4261-4269, 1999.
- 29) Decker, T. & Kovarik, P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*, 19: 2628-2637, 2000.
- 30) Forrai, A., Boyle, K., Hart, A. H., Hartley, L., Rakar, S., Willson, T. A., Simpson, K. M., Roberts, A. W., Alexander, W. S., Voss, A. K. & Robb, L. Absence of suppressor of cytokine signalling 3 reduces self-renewal and promotes differentiation in murine embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24: 604-614, 2006.
- 31) Boyle, K., Zhang, J. G., Nicholson, S. E., Trounson, E., Babon, J. J., McManus, E. J., Nicola, N. A. & Robb, L. Deletion of the SOCS box of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in embryonic stem cells reveals SOCS box-dependent regulation of JAK but not STAT phosphorylation. *Cell Signal*, 21: 394-404, 2009.
- 32) Davey, R. E., Onishi, K., Mahdavi, A. & Zandstra, P. W. LIF-mediated control of embryonic stem cell self-renewal emerges due to an autoregulatory loop. *FASEB J*, 21: 2020-2032, 2007.
- 33) He, F., Ge, W., Martinowich, K., Becker-Catania, S., Coskun, V., Zhu, W., Wu, H., Castro, D., Guillemot, F., Fan, G., de Vellis, J. & Sun, Y. E. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci*, 8: 616-625, 2005.
- 34) Hirai, H., Karian, P. & Kikyo, N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem J*, 438: 11-23, 2011.
- 35) Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J. & Smith, A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, 210: 30-43, 1999.
- 36) Kunath, T., Saba-El-Leil, M. K., Almousaillekh, M., Wray, J., Meloche, S. & Smith, A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, 134: 2895-2902, 2007.
- 37) Welham, M. J., Storm, M. P., Kingham, E. & Bone, H. K. Phosphoinositide 3-kinases and regulation of embryonic stem cell fate. *Biochem Soc Trans*, 35: 225-228, 2007.
- 38) Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K. &

- Yamanaka, S. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 24: 6710-6718, 2004.
- 39) Takahashi, K., Mitsui, K. & Yamanaka, S. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 423: 541-545, 2003.
- 40) Kingham, E. & Welham, M. Distinct roles for isoforms of the catalytic subunit of class-IA PI3K in the regulation of behaviour of murine embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 122: 2311-2321, 2009.
- 41) Sun, H., Lesche, R., Li, D. M., Liliental, J., Zhang, H., Gao, J., Gavrilova, N., Mueller, B., Liu, X. & Wu, H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 6199-6204, 1999.
- 42) Watanabe, S., Umehara, H., Murayama, K., Okabe, M., Kimura, T. & Nakano, T. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene*, 25: 2697-2707, 2006.
- 43) Nichols, J., Jones, K., Phillips, J. M., Newland, S. A., Roode, M., Mansfield, W., Smith, A. & Cooke, A. Validated germline-competent embryonic stem cell lines from nonobese diabetic mice. *Nat Med*, 15: 814-818, 2009.
- 44) Ohtsuka, S. & Niwa, H. The differential activation of intracellular signaling pathways confers the permissiveness of embryonic stem cell derivation from different mouse strains. *Development*, 142: 431-437, 2015.
- 45) Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q. L. & Smith, A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 135: 1287-1298, 2008.
- 46) Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R. E., Schulze, E. N., Song, H., Hsieh, C. L., Pera, M. F. & Ying, Q. L. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, 135: 1299-1310, 2008.

著者プロフィール



大塚 哲 Satoshi Ohtsuka

所属・職：京都府立医科大学 実験動物センター・准教授

資格：獣医師，博士（医学）

略歴：1998年3月 麻布大学獣医学獣医学科 卒業

1998年4月～2002年3月 久留米大学大学院医学研究科遺伝情報部門

2001年4月～2002年3月 日本学術振興会特別研究員（DC2）

2002年4月～2005年5月 理化学研究所多能性幹細胞研究チーム 研究員

2005年6月～2007年10月 University of Georgia 生化学部 Assistant Research Scientist

2007年11月～2009年10月 富山大学 動物資源開発分野（動物実験施設）助教

2009年11月～2016年3月 理化学研究所多能性幹細胞研究チーム 専門職研究員

2016年4月～2020年3月 金沢医科大学 共同利用センター准教授 動物管理室室長

2020年4月～現在 京都府立医科大学実験動物センター准教授

- 主な業績：1. 大塚 哲，動物実験施設の新築に際して決めておく基本事項：クリーンな空調環境をどのように維持するか. *Clean Technology*, **30**: 61-65（日本工業出版）2020.
2. Kime C, Kiyonari H, Ohtsuka S, Kohbayashi E, Asahi M, Yamanaka S, Takahashi M, Tomoda K. Induced 2C Expression and Implantation-Competent Blastocyst-like Cysts from Primed Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, **13**: 485-498, 2019.
3. 大塚 哲，動物実験施設新設に際して（金沢医科大学のケース）. *実験動物と環境*, **27**: 31-38, 2019.
4. Yamane M, Ohtsuka S, Matsuura K, Nakamura A, Niwa H. Overlapping functions of Krüppel-like factor family members: targeting multiple transcription factors to maintain the naïve pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Development*, **145**: 2018（Equal contribution）.
5. Ohtsuka S, Futatsugi-Nakai Y, and Niwa H. LIF signaling in mouse embryonic stem cells. *JAK-STAT*, **4**: 1-9, 2015.
6. Fujii S, Nishikawa-Torikai S, Futatsugi Y, Toyooka Y, Yamane M, Ohtsuka S and Niwa H, Nr0b1 is a negative regulator of Zscan4c in mouse embryonic stem cells. *Scientific Reports*, **5**: 1-11, 2015.
7. Ohtsuka S. and Niwa H. Differential activation of intracellular signaling pathways confer the permissiveness of embryonic stem cell derivation from different mouse strains. *Development*, **142**: 1-7, 2015.
8. 大塚 哲，丹羽仁史，2i 培養法を用いた ES 細胞樹立法. *ES・iPS 細胞実験スタンダード. 実験医学別冊*（羊土社），139-148, 2014.
9. Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, Joshi A, Hannah R, Ohtsuka S, Göttgens B, Niwa H, Smith A. Esrrb is a pivotal target of the gsk3/tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, **11**: 491-504, 2012.
10. Ohtsuka S, Nishikawa-Torikai S, Niwa H. E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PLoS One*, **7**: e45220, 2012.
11. Singh AM, Reynolds D, Cliff T, Ohtsuka S, Mattheyses AL, Sun Y, Menendez L, Kulik M, Dalton S. Signaling Network Crosstalk in Human Pluripotent Cells: A Smad2/3-Regulated Switch that Controls the Balance between Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*, **10**: 312-326, 2012.