

論文の内容の要旨

論文題目 Differential Regulation of Cell Migration and Proliferation
 through Pyk2 in Endothelial Cells

和訳 内皮細胞における Pyk2 を介した遊走と増殖の相異なる制御機
 構

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 8 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 桑原 公一郎

血管発生 (vasculogenesis) 及び血管新生 (angiogenesis) において、内皮細胞の遊走と増殖は重要な役割を担っており、焦点接着キナーゼ (focal adhesion kinase, FAK) ファミリーの非受容体型タンパク質チロシキナーゼである proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2 ; CAK β , RAFTK, CADTK, FAK2) は、遊走と増殖という相異なった細胞機能の各々において重要な働きをしていると考えられている。そこで、野生型ならびに変異型の Pyk2 蛋白をアデノウイルス・ベクターによってヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, hUVEC) 及びヒト皮膚微小血管内皮細胞 (human dermal microvascular endothelial cell, hMVEC-d) に過剰発現させ、Pyk2 が細胞遊走と細胞増殖を制御する機構について検討した。野生型 Pyk2 を発現するアデノウイルス・ベクターである AxCA-Pyk2 のほか、その自己リン酸化チロシン残基を置換した Pyk2 変異体

[別紙 1]

(Pyk2Y402F) を発現するアデノウイルス・ベクターである AxCA-Pyk2Y402F, 及びそのチロシンリン酸化酵素活性を不活化させた Pyk2 変異体 (Pyk2K457A) を発現するアデノウイルス・ベクターである AxCA-Pyk2K457A を作製し, 実験に用いた. 対照として, アデノウイルス非感染細胞及び AxCA または Ad5dlx を感染させた細胞を用いた.

hUVEC 及び hMVEC-d に対し AxCA-Pyk2Y402F または AxCA-Pyk2K457A を 30 multiplicity of infection (MOI) で感染させると, AxCA-Pyk2 を 3 MOI で感染させた場合と同程度の細胞内 Pyk2 発現が得られることが, 抗 Pyk2 抗体を用いたウェスタン・ブロットによって確かめられた. また, AxCA-Pyk2 を感染させた内皮細胞や非感染細胞を stromal-derived factor-1 α (SDF-1 α) で刺激すると, extracellularly regulated kinase 1/2 (ERK1/2) の活性化が促進されたが, AxCA-Pyk2Y402F または AxCA-Pyk2K457A を感染させた細胞では, SDF-1 α 刺激による ERK1/2 の活性化が認められなかった.

細胞遊走の実験は, Boyden チャンバー法を用いて行った. AxCA-Pyk2Y402F を感染させた hUVEC では, 非感染細胞または AxCA を感染させた細胞と比較して遊走が促進され, その遊走促進効果は 3 から 30 MOI の範囲で濃度依存性を示した. AxCA-Pyk2Y402F を 30 MOI で感染させた hUVEC の遊走促進効果は, AxCA-Pyk2 を 3 MOI で感染させた場合と同程度であった. これに対し, AxCA-Pyk2K457A を感染させた hUVEC では, 対照の細胞と比較して遊走能に有意差が認められなかった. これらの結果と同様の効果が hMVEC-d を用いた実験においても確認された.

細胞内情報伝達については, ウェスタン・ブロット法及び免疫沈降法を用いて調べた. Pyk2 はその分子内にリン酸化されうるチロシン残基を 4 つ有している (Pyk2 Y402, Pyk2 Y579, Pyk2 Y580 及び Pyk2 Y881). 各々のリン酸化チロシン部位に対する特異的抗体を用いてウェスタン・ブロッティングを行ったところ, アデノウイルス非感染 hUVEC において SDF-1 α または vascular endothelial growth factor (VEGF) による刺激で Pyk2 Y402 及び Pyk2 Y881 のリン酸化が明瞭に増強されたが, Pyk2 Y579 及び Pyk2 Y580 のリン酸化は

明瞭に検出されなかった。このことは、SDF-1 α または VEGF によって刺激される経路に対して、Pyk2 Y⁴⁰² 及び Pyk2 Y⁸⁸¹ が主に関与している可能性を示唆している。また、AxCA-Pyk2Y⁴⁰²F または AxCA-Pyk2 を感染させた hMVEC-d において Pyk2 Y⁸⁸¹ のリン酸化の増強が認められたのに対し、AxCA-Pyk2K⁴⁵⁷A を感染させた hMVEC-d では Pyk2 Y⁸⁸¹ のリン酸化の増強は認められなかった。なお、Pyk2 Y⁵⁷⁹ 及び Pyk2 Y⁵⁸⁰ のリン酸化の増強は、いずれの Pyk2 変異体を過剰発現させた内皮細胞においても認められなかった。インテグリンの下流にあるシグナル伝達系を仲介するアダプター蛋白である p130^{Cas} は、その分子内に Src homology 3 (SH3) 領域を有し、FAK や Pyk2 のプロリン繰り返し配列と特異的に結合し、FAK を介する細胞遊走において重要な役割を担っていることが知られている。そこで、AxCA-Pyk2Y⁴⁰²F または AxCA-Pyk2 を感染させた hMVEC-d の溶解物を、p130^{Cas} に対する抗体で免疫沈降させた後、抗 Pyk2 抗体を用いてウェスタン・ブロッティングを行ったところ、対照と比較して反応の増強が認められ、AxCA-Pyk2Y⁴⁰²F または AxCA-Pyk2 を感染させた内皮細胞における Pyk2 と p130^{Cas} との複合体形成の促進が示唆された。AxCA-Pyk2K⁴⁵⁷A を感染させた hMVEC-d では、そのような増強効果は認められなかった。これらの結果を細胞遊走の実験結果と照合することにより、AxCA-Pyk2Y⁴⁰²F または AxCA-Pyk2 を感染させた内皮細胞において、Pyk2 Y⁸⁸¹ のリン酸化及び Pyk2 と p130^{Cas} の複合体形成を介する情報伝達が、内皮細胞の遊走促進に重要であることが示唆された。

細胞増殖については、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) ホルマザン法の変法である 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium monosodium salt (WST-8) ホルマザン法を用いて検討した。AxCA-Pyk2 を 3 MOI で感染させた hMVEC-d の増殖は、AxCA を 30 MOI で感染させた細胞と比較して有意に抑制された。AxCA-Pyk2 を 10 MOI 以上で hMVEC-d に感染させたところ、明らかに細胞障

[別紙 1]

害が誘導された。しかし、AxCA-Pyk2Y402F または AxCA-Pyk2K457A を 30 MOI で感染させた hMVEC-d の増殖は、AxCA を感染させた細胞と比較して有意差が認められなかった。これらの結果から、Y402F 及び K457A の変異は共に野生型 Pyk2 の増殖抑制作用を解除したと考えられた。

以上の実験結果によって、Pyk2 の介在する情報伝達は内皮細胞の遊走及び増殖の両者に関与しているが、これら 2 つの細胞機能を相異なった機構で制御していることが示された。