

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 桑原 公一郎

本研究は、細胞の遊走と増殖という相異なった細胞機能において重要な働きをしていると考えられている proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) がその各々の機能を制御する機構を明らかにする目的で、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 (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、これらのアデノウイルスを感染させることによって野生型または変異型 Pyk2 を発現させた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) を用いて、内皮細胞の遊走及び増殖に対する Pyk2 の作用に関する検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Boyden チャンバー法による細胞遊走実験の結果、AxCA-Pyk2K457A 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能に有意差が認められなかったのに対し、AxCA-Pyk2Y402F を感染させた hUVEC では、対照の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 multiplicity of infection (MOI) の範囲で濃度依存的であり、AxCA-Pyk2Y402F (30 MOI) の遊走促進効果は AxCA-Pyk2 (3 MOI) と同程度であったことが示

- された (hUVEC 及び hMVEC-d に対し AxCA-Pyk2Y402F または AxCA-Pyk2K457A を 30 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ている). また, 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.
2. Pyk2 の有するリン酸化されうるチロシン残基 (Pyk2 Y⁴⁰², Pyk2 Y⁵⁷⁹, Pyk2 Y⁵⁸⁰ 及び Pyk2 Y⁸⁸¹) の各々に対するリン酸化チロシン部位特異的抗体を用いたウェスタン・ブロッティングにより, アデノウイルス非感染 hUVEC において強力な内皮細胞遊走増殖刺激因子である stromal-derived factor-1 α (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, さらに, 内皮細胞に対して遊走刺激作用を有する 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, 内皮細胞遊走刺激作用のない AxCA-Pyk2K457A を感染させた hMVEC-d では Pyk2 Y⁸⁸¹ のリン酸化の増強が認められなかったことから, Pyk2 Y⁸⁸¹ のリン酸化が内皮細胞の遊走促進に重要であることが示された.
 3. 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} に対する抗体で免疫沈降させたのち抗 Pyk2 抗体を用いてウェスタン・ブロッティングを行うことにより, AxCA-Pyk2Y402F または AxCA-Pyk2 を感染させた hMVEC-d における Pyk2 と p130^{Cas} との複合体形成の促進が示唆され, AxCA-Pyk2Y402F または AxCA-Pyk2 を感染させた内皮細胞において, 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.
 4. 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfohenyl)-2H

[別紙 2]

tetrazolium monosodium salt (WST-8) ホルマザン法による細胞増殖実験によって、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のに対し、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ず、Pyk2 の Y402F 及び K457A の変異は共に野生型 Pyk2 の増殖抑制作用を解除する可能性が示された。

以上、本論文は野生型 Pyk2 あるいは Y402F もしくは K457A の変異型 Pyk2 を発現するアデノウイルス・ベクターを作製し、それらを内皮細胞に感染させて細胞遊走と細胞増殖に対する Pyk2 の作用を検討することにより、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を明らかにした。本研究は、多様な細胞機能の制御に深く関与している Pyk2 が各々の機能を制御する機構の解明に重要な貢献を成すと期待され、学位の授与に値するものと考えられる。