

氏名	み　　うら　　やす　　お 三　　浦　　康　　生
学位(専攻分野)	博　士(医　学)
学位記番号	医　博　第 2338 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Pyk2 and Syk participate in functional activation of granulocytic HL-60 cells in a different manner (チロシンキナーゼ Pyk2 及び Syk は異なった様式で顆粒球様細胞の機能的活性化に関与する)
論文調査委員	(主査) 教授 中畑龍俊　教授 月田承一郎　教授 内山　卓

論 文 内 容 の 要 旨

チロシンキナーゼ Pyk2 (別名 RAFTK, CAK β) 及び Syk のヒト骨髓球系細胞の分化・機能的活性化における役割を検討した。HL-60 細胞はヒト急性骨髄性白血病由来の細胞株で、dimethyl sulfoxide (DMSO) 刺激により顆粒球様細胞へと分化する。この分化過程において Pyk2 の発現が誘導されたが、Syk の発現は分化前より認められ、その発現量の分化に伴う変化は認めなかった。顆粒球のマーカーである接着分子 $\beta 2$ インテグリン及び G タンパク共役型膜蛋白である N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLP) レセプターの発現も誘導された。

続いて分化した HL-60 細胞を fMLP で刺激・活性化した。この刺激によって Pyk2 はチロシンリン酸化を受け、 $\beta 2$ インテグリンと会合した。一方 Syk のチロシンリン酸化は認められなかったが、 $\beta 2$ インテグリンとの会合は刺激前より持続的に認められた。fMLP 刺激は分化 HL-60 細胞を活性化し、刺激後はじめて細胞外基質フィブリノーゲンをコートしたデイスシュへの接着を誘導した。この接着は細胞の抗 $\beta 2$ インテグリン抗体前処理で阻害された。つまり分化 HL-60 細胞において fMLP 刺激は $\beta 2$ インテグリンの活性化型への転換をもたらし、活性化型 $\beta 2$ インテグリンを介したリガンド (フィブリノーゲン) への接着をひき起こすと考えられた。Pyk2 は分化 HL-60 細胞の活性化に際し、 $\beta 2$ インテグリン活性化シグナルである “inside-out” シグナルに関与していると想像された。

細胞接着は Pyk2 のさらに強いチロシンリン酸化、Syk のチロシンリン酸化をもたらし、これらチロシンリン酸化は共に細胞の抗 $\beta 2$ インテグリン抗体前処理で抑制された。つまり Pyk2 及び Syk は $\beta 2$ インテグリンからの刺激によりチロシンリン酸化をうけると考えられた。従って Pyk2 及び Syk は共に $\beta 2$ インテグリンからの “outside-in” シグナルに関与していると考えられた。接着した分化 HL-60 細胞において Pyk2, Syk, $\beta 2$ インテグリンをそれぞれ特異抗体で免疫沈降し、インビトロ・キナーゼアッセイを行った。その結果 Pyk2 及び Syk はキナーゼ活性を有し、 $\beta 2$ インテグリンに機能的に会合し、 $\beta 2$ インテグリンに会合するいくつかの蛋白をチロシンリン酸化した。

これらの結果よりヒト骨髓球系細胞の分化・機能的活性化に Pyk2, Syk は異なる様式で関与する事が明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

血液細胞の分化・機能発現においては様々なチロシンキナーゼが関与するが、本研究はヒト骨髓球系細胞の分化・機能的活性化過程において細胞接着に着目し、チロシンキナーゼ Pyk2 及び Syk の関与を検討したものである。

ヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 は DMSO 処理にて顆粒球様に分化するが、Pyk2 は分化に伴って発現が誘導され、一方 Syk は分化前より発現していた。顆粒球様に分化した HL-60 は fMLP 刺激によって $\beta 2$ インテグリンの活性化をきたし、フィブリノーゲンでコートしたプレートへ接着した。fMLP 刺激により Pyk2 は速やかにチロシンリン酸化を受け、続いて $\beta 2$ インテグリンとの会合が示されたが、同細胞がフィブリノーゲンへ接着する事によって Pyk2 は新たなチロシンリン酸化を示し、 $\beta 2$ インテグリンに会合する蛋白質をチロシンリン酸化した。従って Pyk2 は $\beta 2$ インテグリンの “inside-out” 及び

“outside-in” シグナルに関与していると考えられた。Syk は fMLP 刺激前より $\beta 2$ インテグリンと会合し、 $\beta 2$ インテグリンを介した接着に伴って活性化された。従って Syk は $\beta 2$ インテグリンの “outside-in” シグナルに関与していると考えられた。

本研究はヒト骨髄球系細胞の分化・機能的活性化・接着過程における細胞内シグナル伝達の一端を解明し、血液細胞の機能発現メカニズムの究明に寄与するところが多い。

従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位申請者は平成13年1月29日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。