

氏 名	やま さき まさ ひで 山 崎 雅 秀
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2387 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	Monocyte chemoattractant protein-1 causes differential proline-rich tyrosine kinase 2-mediated signaling in THP-1 cells (THP-1 細胞において Monocyte chemoattractant protein-1 は proline-rich tyrosine kinase 2 を介した異なるシグナル伝達を引き起こす)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 野 裕 教 授 成 宮 周 教 授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

【研究の背景と目的】

粥状動脈硬化の初期過程において重要な役割を果たしている単球の遊走・接着は、ケモカインの一種である MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) によって制御されていると考えられている。しかし、単球における MCP-1 受容体を介した情報伝達機構はほとんど解明されていない。

本研究では FAK (focal adhesion kinase) 類似のチロシンキナーゼ蛋白で、血球系細胞に豊富に発現の見られる Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) に着目し、MCP-1 受容体を介した情報伝達経路における Pyk2 の果たす役割を検討した。

【方法】

ヒト単球由来 THP-1 細胞を MCP-1 で刺激し、免疫沈降・Western blotting 法により、Pyk2 のチロシンリン酸化および Pyk2 と結合するチロシンリン酸化蛋白の同定・解析を行った。また COS-7 細胞に CCR2 (MCP-1 受容体) および Pyk2 (wild type または kinase negative mutant (KNM)) 遺伝子を導入し、Pyk2 を介する情報伝達経路の解析を行った。

【結果】

THP-1 細胞を MCP-1 で刺激すると Pyk2 は 30 秒から 2 分をピークにリン酸化される。また、Pyk2 と結合するチロシンリン酸化蛋白として paxillin, Src family の一つである Lyn, Shc, Grb2 を同定した。paxillin, Lyn, Shc は MCP-1 刺激によりリン酸化されるが、Lyn のみが Pyk2 との結合が MCP-1 依存性に増強し、paxillin, Shc, Grb2 は MCP-1 刺激によっても Pyk2 との結合は不変であった。CCR2 及び Pyk2 の wild type の遺伝子を導入した COS-7 細胞においても、MCP-1 刺激により Pyk2 と Lyn の結合の増強を認めたが、Pyk2 の KNM 遺伝子を導入した場合は、MCP-1 刺激によってもその結合の変化は認めなかった。

次に COS-7 細胞に CCR2, Pyk2 および MAP キナーゼ (ERK または p38) 遺伝子を導入した。p38 は、Pyk2 の wild type を導入した場合 MCP-1 刺激によりリン酸化されるが、KNM を導入した場合は MCP-1 刺激によってもリン酸化されなかった。一方、ERK は Pyk2 の wild type, KNM いずれを導入しても、MCP-1 刺激によりリン酸化された。この結果は、Shc や Grb2 が MCP-1 刺激によっても Pyk2 との結合が不変であった結果と合致する。また、Pyk2 のリン酸化部位のうち Grb2 の結合部位である、881 番目のチロシン残基が MCP-1 刺激によってもリン酸化されなかったこともこれらの結果を支持する。

【結論】

THP-1 細胞において、Pyk2 は paxillin, Lyn, Shc, Grb2 と複合体を形成するが、MCP-1 受容体からの情報伝達において、Lyn や p38 のリン酸化は Pyk2 のリン酸化に依存しているが、paxillin や Shc-Grb2 系を介する ERK のリン酸化は Pyk2 のリン酸化に依存していないと考えられ、Pyk2 はこれらの情報伝達分子とコンプレックスを作りながら、MCP-1 依存性、非依存性のシグナルを下流へ振り分けているように見える。MCP-1 による重要な生物学的反応として細胞遊走能の

亢進や細胞接着性の亢進があるが、Pyk2 は MCP-1 による単球の遊走や接着において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

粥状動脈硬化の初期過程で重要な役割を担う単球の遊走・接着は、ケモカインの一種である MCP-1 が制御していると考えられる。本研究では血球細胞に豊富に発現しているチロシンキナーゼ Pyk2 が、MCP-1 受容体を介した情報伝達経路において果たす役割を免疫沈降・Western blotting 法により検討した。ヒト単球由来 THP-1 細胞を MCP-1 で刺激すると Pyk2 はリン酸化された。また Pyk2 は paxillin, Lyn, Shc, Grb2 と結合したが、Lyn のみが Pyk2 との結合が MCP-1 により増強し、その他の結合は不変であった。次に COS-7 細胞に MCP-1 受容体, pyk2 (wildtype または kinase negative mutant (PKM)), MAP キナーゼ (ERK または p38) 遺伝子を導入した。MCP-1 による p38 のリン酸化は、PKM を導入すると阻害されたが、ERK のリン酸化は PKM を導入しても影響されなかった。THP-1 細胞において Pyk2 は様々な情報伝達分子と複合体を形成し、Pyk2 依存性 (Lyn や p38) の情報を下流へ伝達することにより、MCP-1 による生物学的機能の発現を担うと考えられる。

以上の研究は、MCP-1 受容体を介した情報伝達機構において Pyk2 が重要な役割を果たしているという事実を解明し、粥状動脈硬化の予防・治療に寄与するところが多い。したがって、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、本学位授与申請者は、平成13年2月26日実施の論文内容とそれに関する諮問を受け、合格と認められた者である。