Osaka University Knowledge Archive

Title	Characterization of the Focal Adhesion Kinase/p130Cas pathway in Ocular Cell Adhesions
Author(s)	井本, 昌子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43923
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【10】

氏　　名	井　本　昌　子（いもと　よしこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　17307　号
学位授与年月日	平成14年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学　位　論　文　名	Characterization of the Focal Adhesion Kinase/p130^{Cas} pathway in Ocular Cell Adhesions （眼組織の細胞接着におけるFocal Adhesion Kinase/p130^{Cas} pathwayの役割）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　田野　保雄 （副査） 教　授　不二門　尚　　教　授　遠山　正彌

論　文　内　容　の　要　旨

［目的］眼組織の上皮細胞の再接着、再増殖により様々な疾患が発症するといわれている。眼科領域において種々の疾患を引き起こす眼の上皮細胞の再接着、再増殖に、関係する分子レベルにおけるメカニズムを検討することは、疾患の治療において非常に重要である。一方、細胞外基質（以下 ECM）への細胞接着は主にインテグリンレセプターによって調節されているといわれている。ECM などのリガンド結合によるインテグリン刺激により活性化されるチロシンキナーゼ依存径路の一つに Focal adhesion kinase（FAK）を介するものがありその下流のシグナル伝達において p130^{Cas}（Cas）への経路がおもなものといわれている。今回私は、FAK/Cas を介するシグナル伝達経路が眼組織の上皮細胞の細胞接着に関与しているか否かを検討した。検討に先立ち研究開始当初ラット、マウスの塩基配列は既に解明されていたがヒトの配列は不明だったので先ずヒトの Cas のクローニングを行った。

［方法ならびに成績］

1．使用した細胞：SV40-transformed human corneal epithelial cells (sCE), SV40-transformed human lens epithelial cells (sLE), human retinal pigment epithelial cells stably expressing human telomerase reverse transcriptase (tRPE)を使用した

2．ヒト Cas の発現:上記3種類の細胞を血清下で24時間培養後 lysis buffer に懸濁した。細胞懸濁液を遠心(12,000×g、15分）し、上清をタンパク定量したのち各細胞サンプル 10 μg づつ SDS/PAGE を行い、続いて、既に市販されていたポリクローナル抗ラット C 末端 Cas 抗体（Cas C-20）と抗ラット N 末端 Cas 抗体（Cas N-20）を一次抗体として、ウエスタンブロットを施行した。すべての細胞に Cas C-20 に交差反応を示す約 130 kDa の単一のタンパク質が発現しているのが確認された。一方、Cas N-20 では複数のタンパク質が交差反応を示していた。以上より Cas C-20 を用いてヒト Cas の単離が可能であろうと判断した。

3．ヒト Cas の単離・同定：Cas C-20 を使用して ZAP-cDNA Synthesis Kit protocol に従い、ヒト角膜 cDNA ライブラリーのスクリーニングを施行した。Blast や Fasta を用いてホモロジー検索を行った。Cas C-20 を用いて、ヒト角膜 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、長いオープンリーディングフレーム（870 アミノ酸）を持つ

3228 塩基配列のクローン H-2 を単離した。H-2 はラット、マウス Cas と DNA レベルで 85%、タンパク質レベルで 90%マッチングしていた。以上の結果、単離された H-2 をヒトの Cas と断定した。先のウエスタンブロットの結果と併せて Cas C-20 を用いてヒト Cas の評価が行えると考え、以後の実験においてこの抗体を使用した。

4．ノーザンブロット:各細胞から poly (A)$^+$RNA を抽出し、2 μg の mRNA をアガロースゲルに電気泳動後、Hybond N$^+$membrane に転写したものと、市販のヒト正常臓器の mRNA（各サンプル 2 μg）が転写されているノザンブロットメンブレンを使用し単離したヒト Cas 遺伝子の発現を確認した。プローブとしては単離したヒト Cas 遺伝子を鋳型として作成した約 1.0-kbp の PCR 断片を用いた(primer：sense 5'-CTGGGAACCGCCTCAAGATC-3'；308-320, anti-sense 5'-GGTCGACAGTGGTGTGTATG-3'；1353-1372, GenBank Accession No. AB040024)。眼組織の細胞、正常ヒト臓器の細胞すべてに約 3.3 kb のシングルバンドが確認された。

5．RGDS による接着細胞の剥離：インテグリンから FAK、Cas を介する経路が眼組織の上皮細胞の細胞接着にどのように働いているのかを調べるために、細胞死を誘導することなく、細胞を培養皿から、剥離させる系として、Arg-Gly-Asp（RGD）ペプチドを用いた実験系を使用した。各細胞をそれぞれ、プラスチック 6-well culuture プレートに血清下（10%胎児ウシ血清：FCS）で 2×10^5 cells/well 播種した。そして、24 時間後に無血清下にして可溶性人工 RGD 含有テトラペプチド Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS : 1 mM) あるいはコントロールペプチド Arg-Gly・Glu-Ser（RGES : 1 mM）を添加し、顕微鏡下で経時的に形態を観察した。添加後 30 分で sLE と tRPE が細胞剥離を生じ、2 時間後には完全に剥離していた。一方 sCE では顕著な細胞剥離を認めなかった。24 時間後にはこれらの細胞は再接着していた。RGES による細胞剥離は全ての細胞で認めなかった。

6．RGDS による FAK、Cas のチロシンリン酸化に対する効果の検討：10%FCS 血清下にて 24 時間培養した眼組織上皮細胞に、無血清下にして RGDS（1 mM）あるいは RGES（1 mM）にて処理した後、lysis buffer に可溶化した。可溶分画を遠心（12,000×g、15 分）し、上清をタンパク定量したのち、抗ヒト FAK 抗体あるいは Cas C-20 とプロテイン A Agarose にて免疫沈降した。免疫沈降物を SDS/PAGE したのち抗ホスホチロシン抗体（PY20）を一次抗体としてウエスタンブロットを施行し、RGDS による FAK あるいは Cas のチロシンリン酸化に対する影響を検討した。sLE、t RPE は RGDS 添加により細胞剥離が生じた。この 2 つの細胞で無治療あるいは RGES 添加ではチロシンリン酸化の減少を認めなかったが、RGDS を添加した場合には FAK および Cas のチロシンリン酸化の減少を認めた。細胞剥離の生じなかった sCE では RGDS 添加によるチロシンリン酸化の減少を認めなかった。

［総括］

今回の研究でヒト Cas を同定し、ヒト眼上皮細胞においても Cas が発現している事を確認した。今回の研究では RGDS を用いた系においては細胞の接着/剥離と FAK/Cas のチロシンリン酸化の程度とが明らかに相関しており、このシグナル伝達経路が眼の上皮細胞の細胞接着に極めて重要な役割を果たしていることが推測できた。さらに FAK/Cas を介するシグナル伝達経路を遮断することが、眼の上皮細胞の再接着、再増殖に関連した疾患における臨床応用に結びつく可能性を示唆していると思われた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、先ずヒト p130^{Cas}（Cas）を同定し、Focal adhesion kinase（FAX）と Cas を介するシグナル伝達経路が眼組織の上皮細胞の細胞接着に関与しているか否かを検討している。使用している細胞は SV40-transformed human corneal epithelial cells（sCE）、SV40-transformed human lens epithelial cells（sLE）、human retinal pigment epithelial cells stably expressing human telomerase reverse transcriptase（tRPE）であった。ポリクローナル抗ラット C 末端 Cas 抗体（Cas C-20）を用いヒト眼組織の上皮細胞で Western blotting 法にてヒト Cas が発現しているかを確認後、ヒト角膜 cDNA ライブラリースクリーニングを用いて Cas C-20 にてヒト Cas を同定している。次に、細胞死を誘導することなく、細胞を培養皿から、剥離させる系として、Arg-Gly-Asp（RGD）ペプチドを用いた実験系を使用し、インテグリンから FAX、Cas を介する経路が眼組織の上皮細胞の細胞接着にどのように働い

ているのかを検討している。可溶性人工テトラ RGD ペプチドである RGDS（Arg-Gly-Asp Ser）ペプチド（RGDS）を添加し、顕微鏡下で経時的に形態を観察された。添加後 2 時間後には sLE と tRPE に完全に剥離していた。一方 sCE では顕著な細胞剥離を認めていない。コントロールペプチドによる細胞剥離は全ての細胞で認めていない。さらに RGDS による FAX、Cas のチロシンリン酸化に対する効果の検討を行っている。細胞から抽出した蛋白を抗ヒト FAX 抗体あるいは Cas C-20 と免疫沈降し、抗ホスホチロシン抗体にてウエスタンブロット法を施行したところ、顕微鏡下では細胞剥離が生じた sLE、tRPE は RGDS 添加により FAX および Cas のチロシンリン酸化の減少を認めている。細胞剥離の生じなかった sCE では RGDS 添加によるチロシンリン酸化の減少を認めていない。以上より RGDS を用いた系においては細胞の接着/剥離と FAX/Cas のチロシンリン酸化の程度とが明らかに相関していることを見出している。

今回の研究でヒト Cas を同定し、ヒト眼上皮細胞においても Cas が発現している事を確認している。また FAK/Cas を介するシグナル伝達経路が眼の上皮細胞の細胞接着に極めて重要な役割を果たしている可能性を見出している。

眼組織の上皮細胞の再接着、再増殖により様々な疾患が発症するといわれているが、眼科領域において種々の疾患を引き起こす眼の上皮細胞の再接着、再増殖に、関係する分子レベルにおけるメカニズムを検討することは、疾患の治療において非常に重要であり、今回の結果より FAX/Cas を介するシグナル伝達経路が眼の上皮細胞の細胞接着に極めて重要な役割を果たしている可能性が示しており、後発白内障、増殖性網膜硝子体症など眼の上皮細胞の再接着、再増殖に、関係する疾患の原因解明に新たな道筋をつけたものとして、本論文は学位に値するものと考える。