The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis : contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration
Author(s)	上田, 周二
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44395
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　上田周二（うえだ しゅうじ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　17997　号

学位授与年月日　平成15年3月28日

学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当

学位論文名　Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis : contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration
（c-Kit受容体を介した細胞遊走シグナルにおけるTyr567、Tyr719の重要性：src family kinase経路とPI3-kinase経路によるCa^{2+}動員と細胞遊走の誘導）

論文審査委員　（主査）
教授　金倉　譲

（副査）
教授　北村　幸彦　　教授　平野　俊夫

論文内容の要旨

［目的］

c-Kit受容体（KIT）は造血幹細胞、マスト細胞、色素細胞や消化管Cajal介在細胞に発現し、そのリガンドであるSCFはこれらの細胞の増殖・生存・分化に重要な働きを果たしている。さらにSCF/KIT系は、細胞遊走を引き起こすというユニークな作用を有しているが、細胞遊走のシグナル伝達機序は十分に解析されていない。そこでKITおよびその変異体を発現させたBaF3細胞（マウスproB細胞株）を用いてSCFのKITを介する細胞遊走機序について解析した。

［方法ならびに成績］

(1)SCFによる細胞遊走と細胞内Ca^{2+}濃度の関連

Wild type KIT発現BaF3細胞（BaF3/WT）を用いてSCFによる細胞遊走と細胞内Ca^{2+}濃度を検討した。細胞遊走はtranswell chamberにて測定し、細胞内Ca^{2+}濃度上昇（Ca^{2+} influx）はIndo-1を用いて測定した。BaF3/WTはSCFの正の濃度勾配に従って細胞遊走をおこしSCF刺激により一過性のCa^{2+} influxを示した。Ca^{2+}キレート剤BAPTM-AMでCa^{2+} influxを抑制すると細胞遊走も阻害された。

(2)細胞遊走シグナルに重要なKIT細胞内領域チロシン残基の検討

KIT細胞内領域のtyrosine（Y）をphenylalanine（F）に置換した22種のY→F変異体をBaF3細胞に発現させ、SCFによるCa^{2+} influxならびに細胞遊走について検討した。Ca^{2+} influxは特にY567Fで73%低下を認め、またY569F、Y719Fでもそれぞれ60%、54%の低下を認めた。細胞遊走はY567Fで85%の低下を認め、Y569F、Y719Fでそれぞれ70%、58%の低下を認めた。

(3)SCFによる細胞遊走とCa^{2+} influxにおけるSrc family kinaseシグナルの関与

293T細胞にKITおよびLynを一過性に導入し、SCFによるLynの活性化を活性化Lyn特異的抗体を用いたwestern blotにて検討した。Y567FではWTに比べLynの活性化が低下していた。BaF3/WTにSrc family kinase（SFK）の抑制分子であるwild Type Csk（wt CSK）を過剰発現させるとCa^{2+} influxは約50%に減少し、恒常的活性化Csk（mCsk）の発現でCa^{2+} influxはほぼ完全に抑制された。またKinase活性を欠くCskを発現させても

Ca^{2+} influxには殆ど影響が認められなかった。さらにwtCskあるいはmCskを発現したBaF3/KIT(BaF3/WT/wtCsk、BaF3/WT/mCsk) では有意に細胞遊走の低下が認められた。

(4)SFKを介した細胞遊走とCa^{2+} influxにおけるErk、p38MAPキナーゼの関与

BAF3/WT/wtCskおよびBAF3/Y567Fにおいて Erkの上流分子MEK1/2およびp38 MAPキナーゼ活性を各々の活性化特異的抗体を用いたwestern blotにて検討すると、MEK1/2およびp38MAPキナーゼの活性低下が認められた。さらにBAF3/WTをMEK1/2阻害剤U0126およびp38MAPキナーゼ阻害剤SB203580で処理すると細胞遊走が抑制された。Ca^{2+} influxはSB203580で抑制されたがU0126では抑制されなかったのに対し、BAPTM-AMはMEK1/2の活性化を顕著に抑制したが、p38MAPキナーゼの活性化は抑制を認めなかった。以上よりp38MAPキナーゼの活性化がCa^{2+} イオンの動員を引き起こし、その後MEK1/2-Erkの活性化が惹起されることが示唆された。

(5)PI3キナーゼによるSCF誘導細胞遊走およびCa^{2+} influxの制御

Y719Fは、WTと異なりSCF刺激にてPI3キナーゼ（PI3K）とKITの会合は示さず、PI3K経路の活性化が低下していた。PI3K阻害剤wortmanninおよびLY294002は濃度依存性に細胞遊走を抑制し、dominant negative PI3K発現もCa^{2+} influxの抑制および細胞遊走の抑制を示した。

(6)細胞遊走におけるSFKとPI3Kの協調的作用

BA3/WT/mCskはBAF3/WT/mockに比し50%の細胞遊走を示したが、PI3K阻害剤LY294002の添加にて15%までさらに低下し、SFKとPI3KがSCFによる細胞遊走に協調的に作用していることが示された。

［総括］

KIT細胞内領域の22種のsingle Y→F mutantを作製することにより、Y567とY719がCa^{2+} influx、細胞遊走に重要なシグナル伝達に関与していることが明らかとなった。つまりSCF/KITシグナルによる細胞遊走においてはY567－Src family Kinase→P38MAPK→Ca^{2+} influx→Erk1/2及びY719－PI3K→Ca^{2+} influxの２つのシグナル伝達系が重要であり、更にこれらは協調して作用している事が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

KIT受容体は受容体型チロシンキナーゼであり造血幹細胞やマスト細胞に発現し、そのリガンドであるSCF（stem cell factor）は骨髄ストローマ細胞に発現している。SCFとKITを介するシグナルは造血細胞にたいして分化、増殖作用を及ぼすほか、細胞遊走を引き起こす事が知られている。しかし細胞遊走のシグナル伝達については十分解析されていなかった。本研究では、マウスproB細胞株であるBaF3細胞にKIT受容体を発現させ、SCFの細胞遊走シグナルについて検討した。KIT受容体について細胞内領域のチロシンをフェニルアラニンに置換した22種の変異体を作成しSCFによる細胞遊走を詳細に検討した。

その結果、まず細胞遊走の程度と細胞内Caイオンの動員は強く相関を示しており、細胞内Caイオンの動員がSCFによる細胞遊走に重要な役割を果たしていることが分かった。

さらにKITの細胞内ドメインの22個のチロシン残基のうち、juxtamembrane domainのTyr567、Tyr569およびkinase insertのTyr719が細胞内Caイオンの動員、細胞遊走に関与している事が明らかとなった。Tyr567の下流ではSrc family kinase、P38 MAPKの活性化が細胞内Caイオンの動員を生じ、さらにその下流でErkが活性化されていた。またTyr719の下流ではPI3-Kinaseの活性化が細胞内Caイオンの動員を引き起こしていた。これら２つの径路が協調して細胞遊走を誘導する事が明らかとなった。

本研究はKIT受容体の細胞内領域の22個のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体を用いる事によって、細胞遊走を誘導する細胞内シグナルを明確に解析した点で高い学術的価値を有している。また造血細胞の分化・増殖のためには骨髄へのホーミングは必須であり、KIT受容体を介する細胞遊走機序の解析は造血不全の病態解明にも極めて有用な知見を供することが考えられ、臨床的な意義においても学位に値する研究と考えられる。