

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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	うえ だ しゅう じ 上 田 周 二
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 讓 (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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 濃度を検討した。細胞遊走は transwell chamber にて測定し、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇 (Ca²⁺ 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 Ca²⁺ influx を示した。Ca²⁺ キレート剤 BAPTM-AM で Ca²⁺ 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 Ca²⁺ influx ならびに細胞遊走について検討した。Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ influx は約 50%に減少し、恒常的活性化 Csk (mCsk) の発現で Ca²⁺ 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

Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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。Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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→Ca²⁺ influx→Erk1/2 及び Y719-PI3K→Ca²⁺ 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 つの経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。