



Hyaluronate activates tyrosine phosphorylation of cellular proteins including focal adhesion kinase via CD44 in human glioma cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 太田, 誠志 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1532

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 255号	学位授与年月日	平成 9年11月 7日
氏名	太田誠志		
論文題目	<p>Hyaluronate activates tyrosine phosphorylation of cellular proteins including focal adhesion kinase via CD44 in human glioma cells (ヒト神経膠腫におけるヒアルロン酸による focal adhesion kinase 等の CD44 を介したチロシンリン酸化の活性化)</p>		

博士(医学) 太田 誠志

論文題目

Hyaluronate activates tyrosine phosphorylation of cellular proteins including focal adhesion kinase via CD44 in human glioma cells

(ヒト神経膠腫におけるヒアルロン酸による focal adhesion kinase等のCD44を介したチロシンリン酸化の活性化)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

グリオーマは最も予後不良な悪性腫瘍の一つであり、種々の治療法の進歩によっても平均生存期間は未だ2年を越えていない。グリオーマは脳皮質または、皮質と白質の境界部に発生することが多く、悪性度が増すときには、脳白質へと向かうことが多い。一方、グリオーマ表面には種々の表面抗原を発現しているが、なかでもCD44は近年グリオーマのみならず、多くの悪性腫瘍においてその発現と悪性度との関係が注目されている。グリオーマが浸潤していく脳白質にCD44のligandのひとつであるヒアルロン酸が多量に存在していることに着目し、ヒアルロン酸とCD44の相互作用によるグリオーマの浸潤増殖シグナルの活性化をチロシンリン酸化の観点から検討した。今回、とくに CD44発現細胞における浸潤シグナルとしての focal adhesion kinase (FAK)、増殖シグナルとしての mitogen activated protein kinase (MAPK)の、ヒアルロン酸によるチロシンリン酸化の活性化に関する研究を行った。

〔方法〕

4種類の培養ヒトグリオーマ細胞株 (U-251SP, U-251MG, U-251nu/nu, SK-MG-1) およびヒト神経芽細胞腫細胞株SK-NS-Hを用いた。Western blottingにてCD44の発現を確認した。constitutive (構成的な) チロシンのリン酸化を抑制するため、24時間低血清 (0.5%血清) 培地にて培養した後、4時間無血清培地にて培養、さらに growth factorの影響を取り除くため、10分間 pH3.7の酸性培養液にて培養した。種々の濃度、作用時間でヒアルロン酸を培養液に加え、リン酸化の程度を抗リン酸化チロシン抗体にてWestern blottingを施行して検討した。抗CD44抗体による前処置にてヒアルロン酸との結合を阻害し、リン酸化が抑制されるかを検討した。抗FAK抗体を用いた免疫沈降法にてヒアルロン酸によるFAKのリン酸化の活性化を検討した。MAPKのリン酸化は低濃度ビスアクリルアミドを用いて、低分子量蛋白を分離し、リン酸化バンドを非リン酸化バンドと分離して検出した。

〔結果〕

検索したグリオーマ細胞の全てがCD44を強く発現しており、一方神経芽細胞腫細胞はCD44の発現を認めなかった。グリオーマ細胞U-251SPは100 μ gのヒアルロン酸により、1分後に110-130kDa、70kDa程度の蛋白が強くリン酸化の活性化を受け、時間とともに次第に減衰した。一方、CD44を発現していないSK-NS-Hでは、ヒアルロン酸により細胞蛋白はリン酸化の活性化を受けなかった。抗CD44抗体による前処置により、このリン酸化は濃度依存性に抑制を受けた。110-130kDaのリン酸化を受ける蛋白中、FAKについてリン酸化を検討するため、抗FAK抗体にて免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体にてimmunoblottingを施行したところ、一過性のリン酸化を認め、5分後で強く、20分後にはもとのレベルに戻った。FAKの下流にあるとされるMAPKはヒアルロン酸により濃度依存性にリン酸化の活性化を受け、活性型であるリン酸化型MAPKの発現が増加した。

〔考察と結論〕

ヒアルロン酸とCD44の相互作用は、MAPKにリン酸化をおこし活性型とするFAKを含む細胞蛋白のチロシンリン酸化の活性化をきたし、これらがグリオーマにおける強い増殖浸潤に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

現在でも悪性グリオーマは治療のきわめて困難な腫瘍である。しかも、本腫瘍発生の分子的背景はよくわかっていない。今回本腫瘍の悪性度に関与する因子として本申請者はCD44を取り上げた。CD44は従来から腫瘍組織において発現が増強していることが知られる。また、同因子はヒアルロン酸(以下HA)の結合タンパクであることがわかっている。本申請者はグリオーマ細胞株を用いてHA刺激と細胞内信号系の変化をチロシンのリン酸化を指標として検索した。

4種のグリオーマ細胞にCD44が発現していることを確かめたのち、HAを添加すると(電気泳動上)複数のタンパクがチロシンのリン酸化を受けることがわかった。主なものは約120-130kDaと約70kDaのバンドであった。この二つのバンドにはCD44刺激を介してチロシンのリン酸化を受けるものがあることが刺激時に抗CD44抗体を共存させることによって確かめられた。約120-130kDaのものの中にはfocal adhesion kinase(以下FAK)とよばれる細胞接着に関係するプロテインキナーゼのあることが抗FAK抗体をもちいて確かめられた。また、細胞外因子の刺激による細胞増殖の活性化に関与すると言われるERK2(extracellular signal-regulated protein kinase 2)がグリオーマ細胞でもHAの刺激によって活性化されることが観察された。

これまでHA、CD44、チロシンリン酸化のいずれかとグリオーマの関係については少数の報告があったが、本論文が初めて三者を結び付けさらにFAKの関与を明らかにした点、及び本研究が遺伝子治療への努力の一環として行われた点が評価された。

本論文に関して以下の試問を行った。

- 1) 細胞の酸処理の方法の詳細について
- 2) CD44の発現調節について
- 3) CD44の分子構造(膜貫通領域)について
- 4) CD44の関与する細胞機能にはどのようなものがあるか
- 5) HA刺激でチロシンにリン酸化を受けるタンパクの数と種類について
- 6) CD44が転移を促進することが知られているその他の腫瘍(細胞)にはどんなものがあるか
- 7) CD44-HA複合体が直接相互作用する相手はなにか
- 8) CD44のisoformについて
- 9) FAKのリン酸化を誘発する細胞外因子としてHA以外に何があるか
- 10) FAKの物理的性状について
- 11) FAKの細胞骨格との相互作用について

これらの試問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解していたので、本論文は博士(医学)の学位論文としてふさわしいものであると論文審査担当者全員が一致して評価した。

論文審査担当者 主査 教授 藤田 道也

副査 教授 馬場 正三 副査 講師 田港 朝彦