

論文の内容の要旨

論文題目

表皮の分化を誘導する転写因子(hSkn-1a)による角化細胞由来癌細胞の増殖抑制

指導教官 北村 唯一 教授

東京大学医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 榎本 裕

癌細胞は悪性形質を獲得する過程において、正常な分化過程から逸脱しているが、多くの癌は発生したもとの組織に特有な分化の特徴を残している。癌の悪性度と分化の程度とは逆相関することが広く認められており、低分化ないし未分化の癌は悪性度が高く、高分化の癌は悪性度が低いことが多い。癌細胞は、分化誘導因子に対する反応性が部分的ではあっても維持されていることが多く、一部の癌では分化誘導療法が行われ、成果を上げている。今後様々な組織の分化を制御する分子機構が明らかになり、それぞれの癌細胞に適した安全で有効な分化誘導因子が利用可能になれば、分化誘導療法はさらに実践的な治療法に発展すると期待できる。特に表皮角化細胞は分化によって増殖が停止する細胞であり、角化細胞由来の癌に特異的な分化誘導因子が明らかになれば臨床応用が可能と考えられる。

表皮は造血組織とならんで細胞分化のメカニズムがよく研究されている組織である。表皮の主要な構成細胞である角化細胞は常に増殖、分化して表皮組織を再生している。基底層の角化細胞(基底細胞)は増殖能を持つ未分化の細胞で、表皮における幹細胞としての役割を持っており、自己を複製するとともに上層の分化した細胞を作り出している。基底膜を離れた角化細胞は増殖を停止して分化を開始する。基底層の上層には有棘層、顆粒層があり、最上層の角層では死んだ扁平な細胞が重層している。角化細胞の分化に伴って発現が増減する遺伝子群が多数調べられており、これらの遺伝子は角化細

胞の分化マーカーとして利用されている。基底層に特徴的な分化マーカーにはケラチン 5、ケラチン 14 などがある。分化した角化細胞のマーカーとしてはケラチン 1、ケラチン 10(K10)、インボルクリン、ロリクリン、フィラグリン、トランスグルタミナーゼ 1、small proline rich proteins(SPRR)などがある。

これらの分化マーカーの発現制御が厳密に行われていることは表皮のホメオスタシスを維持する上で非常に重要である。しかし、分化マーカーの発現が表皮分化のどの段階で起こるかについては詳細に調べられているが、その発現が時間的、空間的に制御されている機構はよくわかっていない。AP-1、AP-2 などの転写因子が多くの角化細胞分化マーカーの転写制御に関わっていることがわかっているが、これらの因子は表皮特異的ではなく、表皮の分化制御の中心となっているとは考えにくい。最近、表皮特異的に発現している POU ドメインファミリータンパク質として Skn-1a 遺伝子がクローニングされた。POU ドメインファミリータンパク質の中には、組織特異的に発現して発生、分化を誘導しているものが多い。Skn-1a は表皮の分化に伴って発現が増加し、代表的な分化マーカーである K10、SPRR-2A の転写を促進し、インボルクリンの転写を抑制する。Skn-1a のノックアウトマウスの解析から、Skn-1a は皮膚の分化と創傷治癒反応に重要な役割を示していることが示された。さらに、ヒト Skn-1a(hSkn-1a)が基底細胞の増殖を促すとともにその後の分化過程を促進していることがわかり、Skn-1a は皮膚の分化を誘導する中心的な転写因子と考えられるようになった。しかし、無限増殖能を獲得した角化細胞由来癌細胞における hSkn-1a 発現の有無も不明であり、hSkn-1a が癌細胞でどのような役割を持ちうるのかはまったくわかっていない。hSkn-1a が、正常な分化過程から逸脱した癌細胞株の分化を誘導できるかどうかを検証することにより、癌細胞における分化調節機構の解明、hSkn-1a を用いた癌の分化誘導療法開発の基礎情報となりうる。

本研究では角化細胞の分化における hSkn-1a の重要性に着目し、hSkn-1a が角化細胞由来の癌に対する分化誘導療法の機能分子となりうるかを確かめるために、角化細胞由来の癌細胞に対する hSkn-1a の作用を解析することを目的とした。角化細胞由来の癌細胞株で hSkn-1a を強制発現させたときの分化マーカーの発現と細胞増殖の変化について解析し、これらの癌細胞株が hSkn-1a に対する分化応答能をどの程度保持しているかを調べた。

まず、角化細胞由来の培養細胞株(HeLa S3、SiHa、CaSki、HaCaT、C-33A)、およ

び角化細胞以外の細胞に由来する培養細胞株(COS-1、HEK293、Alexander、HepG2)で hSkn-1a が発現しているかどうかをウエスタンブロットで解析した。その結果、すべての培養細胞株で hSkn-1a の発現は検出感度以下であった。角化細胞由来の癌は、癌化の過程で hSkn-1a の発現が停止するか、強く抑制されているものと考えられた。

子宮頸癌由来細胞株 HeLa を用いて、ドキシサイクリンで hSkn-1a の発現を誘導できる細胞株 HeLa/Tet-On/hSkn-1a を作成した。この細胞は、培地中に低濃度(2 μ g/ml)のドキシサイクリンを添加することによって、速やかに hSkn-1a の発現が起こった。hSkn-1a の発現に伴って代表的分化マーカーである K10 の発現がウエスタンブロット法により確認された。hSkn-1a を誘導すると、この細胞は劇的な形態変化を起こし、約 1 週間で大きく扁平化した細胞が多数出現した。また、増殖曲線と BrdU の取り込みで細胞増殖を評価したところ、hSkn-1a の発現に伴って細胞増殖速度が遅くなり、DNA 合成能も低下していた。細胞周期の解析から、この細胞は細胞周期の回転が緩徐になり一部の細胞集団が G₂/M 期に停止することが示唆された。また、DNA ラダー法により DNA の断片化が検出された。HeLa 細胞は hSkn-1a に反応して分化過程を進行させることができ、細胞形態の変化、分化マーカーの発現誘導、増殖抑制、アポトーシスの誘導がおこることが確認された。

HeLa 以外の細胞株でも hSkn-1a による増殖抑制が起こるかどうかを検証するため、薬剤耐性マーカーと hSkn-1a(ないし対照として DsRed 遺伝子)を同時に発現するプラスミドをそれぞれの細胞にトランスフェクションし、薬剤耐性コロニーの出現数を計測した。HEK293、HepG2 では対照と差がなかったが、それ以外の細胞は hSkn-1a を発現させたときにできる耐性コロニーの数が対照より少なかった。これらの細胞株では hSkn-1a の発現によってできるコロニーの大きさも対照より小さい傾向があり、hSkn-1a による増殖抑制がおこっていることが示された。また、トランスフェクションないしアデノウイルスベクターを用いて、hSkn-1a を各細胞に導入し、K10 の発現変動を調べた。角化細胞由来の癌細胞株ではすべて K10 の発現が誘導されていた。角化細胞以外の由来をもつ細胞株では増殖抑制と K10 の発現とは必ずしも並行していなかった。特に、Alexander では hSkn-1a によって強い増殖抑制が見られたものの K10 の発現誘導は検出できなかった。K10 を HaCaT に導入すると細胞増殖の抑制とアポトーシスがおこることが報告されており、hSkn-1a による増殖抑制は K10 の発現を介して起こっている可能性もある。しかし、K10 が増殖抑制効果を示すためには細胞の網膜芽

細胞腫蛋白質が機能していることが必要であること、増殖抑制効果と K10 の発現誘導が並行しない細胞株があることから、hSkn-1a の増殖抑制効果は K10 以外の機構を通じて起こっていることが示唆された。また、HeLa S3、SiHa、Alexander、HepG2 にアデノウイルスベクターを用いて hSkn-1a を導入することによってアポトーシスが起こることが TUNEL 法、DNA ラダー法により示された。

今回調べた角化細胞由来の癌細胞は全て、hSkn-1a による分化誘導に応答し、K10 の発現誘導、増殖の抑制がおこった。これらの癌細胞は、hSkn-1a に反応して分化過程を進行させる能力を保有していることを示している。角化細胞以外の由来をもつ癌細胞株の中にも hSkn-1a に応答して増殖抑制をおこすものがあったが、K10 の発現誘導とは並行していなかった。hSkn-1a による増殖抑制は K10 の発現とは異なった経路で引き起こされているものと考えられた。また、hSkn-1a の発現によって G2 停止とアポトーシスがおこることがわかり、hSkn-1a は角化細胞由来の悪性腫瘍(有棘細胞癌、基底細胞癌、子宮頸癌など)の遺伝子治療における機能分子となる可能性が示された。癌細胞にアポトーシスを誘導する能力の強化や正常細胞に対する安全性の確保等、今後の課題は多いものの、新たな分化誘導療法の開発につながる可能性がある。