

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 13 年度博士課程進学
氏名 原 武史
指導教官 千田和広

論文題目 表皮過形成および腫瘍形成における PKC α の役割

癌は脳卒中、心不全と並び我が国の三大死亡原因の一つである。癌の治癒向上には癌化に関与する分子を標的とした薬剤開発が挙げられる。しかし未だ発癌の分子機構については不明な点が多く、より詳細な解析が重要である。癌の多くは上皮組織由来である。上皮細胞の増殖や分化の制御機構および上皮組織と間葉との相互作用の分子機構を個体レベルで明らかにすることは、発癌のメカニズムを解明する上で重要である。とくに上皮細胞の過増殖による肥厚、過形成は、創傷治癒や炎症、発癌プロモーターなどの化学物質の暴露等や一般的な癌の好発部位で認められることから、発癌の一機構と考えられる。上皮過形成の機構の解明は発癌のメカニズムを理解する一端になると考えられる。そのためには上皮過形成を誘導する物質の標的分子の機能解析が必要である。本研究では、強力な過形成誘導能を有するホルボールエステル、発癌プロモーターの主要標的分子であるプロテインキナーゼ C (PKC) に注目した。

PKC は脂質によって活性化されるセリン・スレオニンキナーゼで細胞増殖、分化や運動など、細胞の様々な機能に関与することが知られている。PKC は 10 種の分子種からなり、その分子構造と活性化機構から、 Ca^{2+} とジアシルグリセロール (DG) によって活性化される cPKC (α , β I, β II, γ)、 Ca^{2+} に依存し

ない nPKC ($\delta, \epsilon, \eta, \theta$)、 Ca^{2+} にも DG にも依存しない aPKC ($\zeta, \lambda/\iota$) の 3 グループに大別される。中でも PKC α は上皮基底層で高発現し、上皮細胞の増殖、分化や癌化に関与する可能性がこれまでの培養細胞を用いた研究から示されてきた。しかし確定的な証拠はなく、詳細は不明である。本研究は、上皮過形成の誘導および発癌実験が比較的容易な皮膚に着目し、まず PKC α のノックアウトマウスを作製した。このマウスを用いて過形成および腫瘍形成における PKC α の役割を主に個体レベルで解析することを目的とした。

1、マウス PKC α 遺伝子 (*Prkca*) のゲノム構造と遺伝子座の解析

マウス PKC α の cDNA をプローブとして、129SvJ ゲノムライブラリーからスクリーニングを行い、9 クローンを得た。制限酵素地図を作製し、部分的な塩基配列を決定した。*Prkca* は 17 のエクソンから成り、少なくとも 116 kb の遺伝子であった。次に *Prkca* の遺伝子座を Radiation Hybrid Mapping 法を用いて解析したところ、第 11 番染色体のセントロメアから 65.0 cM 近傍にマップされ、偽遺伝子は認められなかった。11 番染色体には他の PKC 遺伝子が存在せず、PKC のダブルノックアウトマウスの作製が容易と考えられる。

2、PKC α のノックアウトマウスの作製

PKC α は発生初期にも発現するため、ノックアウトマウスの作製は Cre-loxP 系を用いたコンディショナル法が適切と考えられた。ジーンターゲティングは、PKC α の酵素活性に不可欠な ATP 結合部位をコードするエクソン 10 を標的として行った。両脇に loxP 配列をもつ *neo'* をイントロン 9 に挿入し、イントロン 10 に loxP 配列を挿入したターゲティングベクターを構築した。このベクターを ES 細胞に導入し、G418 耐性細胞 120 クローンをスクリーニングした。サザンブロットによって相同組み換え体をスクリーニングしたところ、30 クローンが相同組み換え体であった。その ES 細胞からキメラマウスを作製後、C57BL/6J マウスとの交配により *Prkca*^{flax} マウスを得た。全身で Cre が発現する CAG-Cre マウスと交配し、*Prkca*^{+/+} マウスを得た。さらに *Prkca*^{+/+} マウス同士を交配し、PCR およびウエスタンブロットによって *Prkca*^{-/-} マウス (KO) の作製は確認した。

予想に反して KO は見かけ上正常に発生し、外見、行動や繁殖能に異常は認められなかった。主な組織構造も正常であった。KO はメンデルの法則による期待値とほぼ同数誕生し、PKC α は発生に必須の分子ではないことが分かった。皮膚で発現する他の PKC の発現を調べたところ、野生型マウス (WT) と KO での差は認められなかった。この結果は、PKC α が上皮組織構築には必須ではなく、また他の PKC 分子種によって、少なくとも発現レベルでの代償は生じないことを示している。

3. 表皮過形成における PKC α の機能解析

表皮における PKC α の増殖や分化への影響を、8 週齢および生後 2 日目のマウスを用いて検討した。細胞増殖の指標には抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体、分化の指標には抗 keratin 5、抗 keratin 1 および抗 loricrin 抗体を用いて免疫染色を行った。KO の表皮における PCNA 陽性細胞率や分化マーカーの発現に WT との差は認められなかった。また増殖との関連性が高い Erk の活性化も差はなかった。通常状態において、PKC α は表皮細胞の増殖や分化に必須でないことが明らかとなった。

次に、表皮過形成における PKC α の役割を検討した。強力な発癌プロモーターである 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 10 μ g をマウス背部皮膚に投与し、組織標本を作製して表皮過形成誘導を調べた。正常な表皮層は 2 細胞層であるが、TPA 投与後 48 時間で 4 から 6 層になる。しかし KO では 2 から 3 層で、顕著に過形成が低下した。TPA 投与後 7 日では、KO および WT 共に 2 細胞層に戻った。KO における表皮過形成の低下は肥厚の促進や遅延でなかった。さらに、パンチを用いた皮膚全層切除によって創傷治癒を起し、表皮過形成を誘導した。創の治癒日数に差は認められないが、切除 72 時間後の KO では顕著に表皮過形成が低下していた。以上の結果から、PKC α は表皮過形成誘導に対して促進的に働くことが明らかとなった。

KO では増殖能の低下によって表皮過形成が低下したと考えられた。そこで増殖している細胞を抗 PCNA 抗体、DNA 合成を BrdU 取り込みによって調べた。TPA 投与後 48 時間では基底層における PCNA 陽性細胞率に差は認められなかった。TPA 投与後 16、20、24 時間での DNA 合成の差も認められなかった。しかし 36 時間後の KO では DNA 合成が低下していた。TUNEL 法により DNA の断片化を調べたが有意な差は認められなかった。KO での表皮過形成の低下は 24 時間以降の増殖能が低下したためであることが分った。このことは、一度増殖した細胞が上層に移動しにくいいため基底層での細胞が密となり接触阻害によって増殖が抑制された可能性や、分化誘導因子も増殖能に影響を及ぼすため、その因子の増加し角化の亢進が誘起された可能性もある。

4. 腫瘍形成における PKC α の機能解析

KO の表皮過形成が顕著に低下していたので、PKC α は腫瘍形成において促進的に働くことが予想された。その可能性を皮膚二段階発癌実験を行って検討した。イニシエーションとして 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 100 μ g を背部皮膚に一度投与した後、プロモーションとして TPA (10 μ g) を週に 2 回、20 週間投与した。腫瘍を発生した WT は 50% で、マウスあたりの腫瘍は 1.3 個

であった。しかし、KO では 78%、マウスあたりの腫瘍は 6.7 個であり、高頻度に腫瘍を発生した。イニシエーターやプロモーターのみの投与では WT、KO 共に腫瘍は発生しなかった。この結果は、PKC α が腫瘍形成に抑制的に働くことを示している。

次に、DMBA を連続投与する発癌実験を行った。100 μ g の DMBA を週に 1 度、20 週間投与した。WT ではマウスあたりの腫瘍は 6.6 個に対して、KO では 18 個と高頻度で腫瘍が発生した。この結果は、KO では突然変異が高頻度に生じることを示唆している。

胎児由来の繊維芽細胞 (MEF) を用いて突然変異率を調べた。MEF を methyl methanesulfonate で処理した後、ウアバインを含む培地で培養した。KO の MEF では WT に比べて高頻度にウアバイン耐性細胞が出現した。KO の MEF の増殖速度と細胞周期パターンは WT と同じであることから、細胞周期チェックポイントにおける異常は考えにくい。以上の結果は PKC α が DNA 修復系に関与することを示唆している。

5. 本研究のまとめ

PKC α は表皮過形成に促進的に働き、腫瘍形成には抑制的に働くことを明らかにした。DMBA を連続投与する発癌実験や MEF を用いた実験から PKC α は DNA 修復系に関与する可能性もあるため、KO では DNA 修復系の異常によって高頻度に腫瘍発生したと考えられる。一方、KO では増殖した細胞が上層に移動しにくいため突然変異を生じた細胞が基底層に留まり、高頻度に腫瘍形成した可能性もある。

PKC が癌化に関与する報告は数多い。特に PKC α は、腫瘍形成に関与し、悪性度を促進させると考えられてきた。実際、非肺小細胞癌を標的とした治療薬が開発されつつある。しかし、本研究の成果は PKC α を治療の標的にすることは癌化の促進につながる可能性を示しており、ヒトへの応用に副作用が危惧される。そのため、十分な実験と注意が必要と考えられる。さらに詳細な分子機構を解析することによって、新しい PKC α の機能が解明され、発癌のメカニズムの理解と安全な薬剤開発への応用を期待したい。