



Crucial role of phospholipase C ϵ in chemical carcinogen-induced skin tumor development

白, 云峰

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3222

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003222>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 7 6 】

氏 名・（本 籍） 白 云 峰 （ 中国 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1629号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

Crucial role of phospholipase C ϵ in chemical
carcinogen-induced skin tumor development
(化学発癌剤により誘起された皮膚腫瘍形成における
ホスホリパーゼC ϵ の重要な機能)

審 査 委 員

主 査 教 授 中村 俊一
教 授 饗場 篤
教 授 山村 博平

ras 癌遺伝子は、ヒトに発生する悪性腫瘍において突然変異により高率に活性化されている。その産物である Ras 蛋白質は、低分子量 GTP 結合蛋白質であり、高等生物においてセリン/トレオニン・キナーゼ Raf (Raf-1, B-Raf) と直接結合して活性化する事が明らかになっている。また、Raf 以外にもホスホイノシチド-3 キナーゼ (PI-3 キナーゼ)、Ral-GDS などの複数の Ras エフェクター (標的蛋白質) の存在が知られている。Raf-1 は、マウス線維芽細胞株 NIH 3T3 の形質転換実験から、B-Raf は、その変異がヒト悪性黒色腫で高頻度に認められることから、細胞癌化への関与が示唆されている。しかし、上皮細胞由来の悪性腫瘍発生に関与する Ras のエフェクター分子については未だに不明な点が多い。ホスホリパーゼ C ϵ (PLC ϵ) は、新しい Ras エフェクターとして当研究室で発見されたホスホイノシチド特異的ホスホリパーゼ C (PLC) であり、他の PLC 分子種 β, γ, δ , くらと共通な PLC 触媒ドメイン X, Y に加えて、C 末端には GTP 結合型の Ras 並びに Rap1, Rap2 と結合する Ras/Rap 結合ドメイン、N 末端には、Rap1 に対してグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として働く CDC25 類似ドメインを有している。PLC ϵ の活性調節機構は解析が進んでいるが、その生理的機能は全く解明されていない。本研究では、PLC ϵ 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、*ras* 癌遺伝子依存性の個体レベルでの発癌における PLC ϵ の機能解析を行った。

実験方法と結果

1. PLC ϵ 遺伝子ノックアウトマウスの作製と PLC ϵ の皮膚での発現解析

PLC ϵ 遺伝子ターゲティングベクターとして、PLC ϵ の PLC 触媒領域に対応するゲノム DNA 断片をクローン化し、X ドメインをコードする 4 つのエキソンの中の一つをネオマイシン耐性遺伝子・カセットに置換したものをを用い、マウス胚性幹細胞における相同組換えを利用した遺伝子ターゲティング法に

より PLC ϵ 遺伝子ターゲティング・マウスを作製した。得られたマウスを交配し、ターゲティング遺伝子座のホモ接合体マウス (PLC ϵ^0 マウス) を作製した。得られたマウスの皮膚で発現している PLC ϵ mRNA を逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法で解析したところ、ターゲティング遺伝子座からは、破壊されたエキソンに加えて上流のもう一つのエキソンを失った mRNA が発現していることがわかった。この mRNA は、X ドメインの一部を in-frame で欠失した変異体 PLC ϵ をコードしていた。同じ欠失を有する PLC ϵ を大腸菌にて組換え体蛋白質として発現し、PLC 活性を測定したところ、PLC 活性を完全に喪失していた。

皮膚における PLC ϵ の発現を、抗 PLC ϵ 抗体を用いた免疫組織化学で検討した。その結果、PLC ϵ は表皮で発現していたが、真皮では毛嚢の細胞を除いて発現が認められなかった。PLC ϵ の発現は、皮膚腫瘍発生と関係する増殖性細胞が存在する基底層のマーカーであるケラチン 14 を発現する細胞と有棘層のマーカーであるケラチン 1 を発現する細胞に認められた。

2. マウス皮膚化学発癌における PLC ϵ の役割の解析

皮膚化学発癌には、二段階発癌プロトコルを用いた。突然変異誘発物質である 7,12-ジメチルベンズアントラセン (DMBA) 処理によるイニシエーションにより Ha-Ras の 61 番目のコドンに変異が導入され、Ras が恒常的に活性化される。その後、20 週間にわたって、ホルボールエステル 12-O-テトラデカノイル-ホルボール-13-アセテート (TPA) 処理によるプロモーションを行った。この処理により、良性腫瘍であるパピローマが発生するが、TPA 処理終了後さらに 10 週間放置すると、パピローマの一部は悪性進展を起こし扁平上皮癌が発生する。この期間中、継続的に皮膚腫瘍の数とサイズを計測した。腫瘍の発生時期については、野生型 (PLC $\epsilon^{+/+}$) マウスでは 10.14 ± 0.47 週 (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=14$) に対して、PLC ϵ^0 マウスでは 12.63 ± 0.42 週 (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=21$) と著明に遅延していた ($P<0.001$)。発生した腫瘍の数は TPA 処理 15 週で最大になり、その時点でのマウス 1 匹当たりの腫瘍の数は、PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスでは 14.36 ± 1.25 個に対して、PLC ϵ^0 マウスでは 4.14 ± 0.40 個であり、

約 70% の著明な抑制が見られた ($P < 0.0001$)。PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスは、両者の中間的な表現型を示し、 10.22 ± 0.65 個 ($P < 0.0001$) であった。また、発生した腫瘍のサイズを TPA 処理 20 週目に測定したところ、PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスでは、PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスに比較して腫瘍のサイズが著明に低下しており、直径 6 mm を超える腫瘍は見られなかった。

次に、DMBA 処理後 30 週の時点で、直径 2 mm を越えるサイズの全腫瘍について組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色後病理学的に解析した。その結果、PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスでは約 20% が扁平上皮癌であったのに比較して、PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスでは扁平上皮癌が全く認められなかった。PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスは約 3% が扁平上皮癌であり、中間的な表現型を示した。発生した腫瘍のゲノムの Ha-ras 遺伝子の構造を解析したところ、PLC ϵ の遺伝子型に関わらず全ての腫瘍において 61 番目のコドンに活性型変異が認められた。変異の大部分はグルタミンからロイシンへの変異であり、ごく少数はグルタミンからアルギニンへの変異であった。

3. TPA によって誘発される皮膚過形成における PLC ϵ の役割の解析

次に、TPA 処理によって誘導される表皮細胞の増殖における PLC ϵ の役割を調べた。マウスの皮膚を TPA で処理し、24 時間、48 時間後に解析した。TPA 未処理の皮膚では、PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスと PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスの間で構造上の差は認められなかった。PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスを TPA 処理後 24 時間で解析すると、表皮基底層で細胞増殖マーカーである増殖細胞核抗原 (PCNA)・陽性細胞の数が著しく増加しており、TPA 処理後 48 時間では表皮の著明な肥厚が見られた。一方、PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスでは、TPA 処理に伴う PCNA・陽性細胞数の増加ならびに表皮の肥厚が著しく抑制されていた。

考 察

本研究により、ras 癌遺伝子の活性化によって誘発される皮膚腫瘍形成とその悪性進展において、Ras エフェクターである PLC ϵ が重要な機能を有してい

ることが示された。さらに、PLC ϵ が TPA によって誘発される皮膚基底層細胞の過剰増殖と皮膚の過形成において、TPA の下流で機能している事が示された。TPA と PLC ϵ 活性化を結ぶメカニズムとしては、以下の二つが考えられる。一つは、TPA が Ras 活性化を通して PLC ϵ を活性化する経路である。これは TPA が Ras の GEF である RasGRP1 に直接結合し活性化することにより引き起こされる。また、同じく TPA 応答性の Rap1-GEF である CalDAG-GEF1 や RasGRP2 を介した Rap1 の活性化も、PLC ϵ 活性化を引き起こす可能性がある。もう一つは、TPA がケラチノサイトからの腫瘍壊死因子- α (TNF- α) の分泌を誘発し、この TNF- α がその受容体を介して Ras を活性化することにより、PLC ϵ の活性化を引き起こす機構である。二段階皮膚発癌によるハビローマ形成と TPA 誘発性の皮膚過形成に TNF- α が関与していることが報告されている。

また、PLC $\epsilon^{+/+}$ マウスでは、パピローマの扁平上皮癌への悪性進展も著しく抑制される事が分かった。大腸癌の発生については、プロスタグランジン受容体 EP2 の遺伝子ノックアウトマウスで腸ポリポーシスの形成が抑制されることがわかっている。また皮膚発癌においてもプロスタグランジン (PG) の関与が示唆されている。PG の先駆物質であるアラキドン酸が PLC ϵ の産物のジアシルグリセロールから作り出されることを考えれば、扁平上皮癌への悪性進展における PLC ϵ の機能が PG シグナルを介している可能性も考えられる。

本研究の結果は、PLC ϵ が ras 癌遺伝子によって誘発された皮膚上皮細胞の *de novo* の発癌において重要な役割を担っている事を示している。また、発癌における PLC シグナルの重要性を具体的に証明した初めての知見でもある。この結果から、PLC ϵ の特異的阻害剤がある種の癌の治療あるいは予防に役立つ可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1630号	氏 名	白 雲 峰
論文題目	Crucial role of phospholipase C ϵ in chemical carcinogen-induced skin tumor development 化学発癌剤により誘起された皮膚腫瘍形成におけるホスホリパーゼC ϵ の重要な機能		
審査委員	主 査 中 村 俊 一 副 査 纘 場 篤 副 査 山 村 隆 平		
審査終了日	平成 16 年 12 月 15 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

<i>ras</i> 癌遺伝子は、ヒトの悪性腫瘍において突然変異により高率に活性化されている。その産物 Ras 蛋白質は、低分子量 GTP 結合蛋白質であり、高等生物においてセリン/トレオニン・キナーゼ Raf (Raf-1, B-Raf) と直接結合して活性化する。また、Raf 以外にもホスホイノシチド-3 キナーゼ、Ral-GDS などの複数の Ras エフェクター (標的蛋白質) が存在する。Raf-1 は、マウス線維芽細胞株 NIH 3T3 の形質転換実験から、B-Raf は、その変異がヒト悪性黒色腫で高頻度に認められることから、細胞癌化への関与が示唆されている。しかし、上皮細胞由来の悪性腫瘍発生に関与する Ras のエフェクター分子は未だに不明である。ホスホリパーゼ Cϵ (PLCϵ) は、新規 Ras エフェクターとして発見されたホスホイノシチド特異的ホスホリパーゼ C (PLC) であり、他の PLC 分子種 β, γ, δ, ζ と共通な PLC 触媒ドメイン X, Y に加えて、C 末端には GTP 結合型の Ras, Rap1, Rap2 と結合する Ras/Rap 結合ドメイン、N 末端には、Rap1 に対してグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として働く GEF ドメインを有している。PLCϵ の活性調節機構は解析が進んでいるが、その生理的機能は全く解明されていない。本研究では、PLCϵ 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、<i>ras</i> 癌遺伝子依存性の個体レベルでの発癌における PLCϵ の機能解析を行った。 本研究者は、マウス胚性幹細胞における相同組換えを利用した遺伝子ターゲティング法により PLCϵ 遺伝子ターゲティング・マウスを作製し、さらに得られたマウスの交配によりターゲティング遺伝子座のホモ接合体マウス (PLCϵ-/-マウス) を得た。得られたマウスの皮膚での発現解析から、破壊されたエキソンに加えて上流のもう一つのエキソンを失った PLCϵ mRNA が発現していることがわかった。この mRNA は、X ドメインの一部を in-frame で欠失し、PLC 活性を完全に喪失した変異体 PLCϵ をコードしていた。皮膚での発現を抗 PLCϵ 抗体を用いた免疫組織化学で検討したところ、PLCϵ は表皮の基底層と有棘層にて発現していたが、真皮では毛嚢細胞を除いて発現が認められなかった。 皮膚化学発癌には、突然変異誘発物質 7,12-ジメチルベンズアントラセン (DMBA) 1 回投与によるイニシエーションと、ホルボールエステル 12-O-テトラデカノイル-ホルボー
--

ル-13-アセテート (TPA) 20 週間反復処理によるプロモーションからなる二段階発癌プロトコールを用いた。DMBA 処理により Ha-Ras の 61 番目のコドンに変異が導入され、Ras が恒常的に活性化される。TPA 処理により、良性腫瘍パピローマが発生するが、その後さらに 10 週間放置すると、パピローマの一部は悪性進展を起こし扁平上皮癌が発生する。この期間中、継時的に皮膚腫瘍の数とサイズを計測したところ、*PLCε*^{-/-}マウスでは、野生型 (*PLCε*^{+/+}) マウスに比較して、腫瘍の発生時期が著明に遅延しており ($P < 0.001$)、発生した腫瘍の数も約 70%減少していた ($P < 0.0001$)。 *PLCε*^{+/+}マウスは、両者の中間的な表現型を示した。また、TPA 処理 20 週の時点で、*PLCε*^{-/-}マウスでは、*PLCε*^{+/+}マウスに比較して腫瘍のサイズが著明に低下していた。また、DMBA 処理後 30 週の時点で、直径 2 mm 以上の全腫瘍について組織切片を作成して病理学的に解析したところ、*PLCε*^{+/+}マウスでは約 20%が扁平上皮癌であったのに対して、*PLCε*^{-/-}マウスでは扁平上皮癌が全く認められなかった。発生した腫瘍の Ha-ras ゲノム遺伝子を解析したところ、*PLCε* の遺伝子型に関わらず全ての腫瘍において 61 番目のコドンに活性型変異が認められた。

次に、TPA 処理によって誘導される表皮細胞の増殖における *PLCε* の役割を調べた。TPA 未処理の皮膚では、*PLCε*^{+/+}マウスと *PLCε*^{-/-}マウスの間で構造上の差は認められなかったが、TPA 処理後 24 時間では、*PLCε*^{+/+}マウスで起こる表皮基底層の増殖細胞核抗原陽性細胞数の著明な増加と表皮の著明な肥厚が *PLCε*^{-/-}マウスでは殆ど起こらなかった。

本研究は、Ras の標的蛋白質 *PLCε* について、その生体内機能を研究したものであるが、*PLCε* の *ras* 癌遺伝子依存性の *de novo* 皮膚発癌、並びに、TPA 誘発性の皮膚基底層細胞過剰増殖と皮膚の過形成における役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。