博士（歯学）　鄭　　漢　忠

学 位 論 文 題 名

DMBA 誘発ハムスター歯肉・口底癌の発癌過程における PKC 活性の経時的変動に関する研究

学位論文内容の要旨

緒　言

Protein kinase C（PKC）は1977年西塚により，cAMP，cGMP に依存しないセリン，スレオニンに特異的な新しいタンパクリン酸化酵素としてはじめて同定された。その後の研究により現在では PKC はイノシトール1，4，5－三リン酸－カルシュウム動員系とならんで，さまざまな細胞応答のシグナル伝達系において中心的な役割をはたしていると考えられている。また発癌プロモーターである12－o－tetradecanoyl－phorbol－13－acetate（TPA）が PKC を直接活性化することが明らかになり，発癌における PKC の役割が注目されている。ただし PKC の活性化と発癌とを強く結びつける明らかな実験的事実は少なく，長期にわたる発癌過程において，PKC 活性の変動を検討した報告もない。一方，大野らにより PKC には今までのカルシウム依存性の conventional（c）PKC とカルシウムに存在しない novel（n）PKC があることが明らかにされ，その subtype として cPKC にはα，β I，β II，γ，nPKC にはδ，ε，ζ，η，θの存在が確認されている。これらの subtype がさまざまな細胞において固有の分布ならびに発現様式をとり，そのことが細胞ならびに組織の独自の応答に関連していると考えられている。臓器におけるこれらの分布状態については，脳を中心としていくつかの報告がみられるが，上皮におけるその分布状態についての報告は少なく，また発癌過程における PKC subtype の発現様式について検討した報告はみられない。

本研究においては，発癌過程における PKC シグナル伝達系の関与の一端ならびに上皮および扁平上皮癌における PKC subtype の発現様式を明らかにする目的で，DMBA 誘発ハムスター実験歯肉・口底癌を用いて，発癌途上にある上皮ならびに癌組織の PKC 活性の変動を検討し，併せて PKC のモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的染色により，上皮における PKC subtype の発現について検討した。

材料と方法

実験動物としては生後4～5週齢の雄のゴールデンハムスター185匹を用いた。発癌物質としては0.5％9，10，dimethyl－1，2－benzanthracene（DMBA）アセトン溶液を用い，週3回左下顎第二臼歯部舌側歯肉歯槽粘膜を歯科用クレンザーで擦過後，同部に塗布した。PKC活性の測定は実験群においては，週3回塗布後1，2，4，6，8，10，12，14，16，20，24，28，32，36，40，52週の各週に，またDMBA一回塗布後，直後，2，4，24，72時間後に，さらにDMBA塗布中止後2，4，6週の各週に行った。無処置の対照群では，飼育開始後1，2，4，6，8，10，12，14，16，20，24，28週の各週に測定した。また病理組織学的にはPKC活性の経時的な測定に対応する各週に得られた試料を，ヘマトキシリン・エオジン染色，抗BrdU抗体ならびにPKC α，β，γのモノクローナル抗体を用いた免疫染色を行った。これらにより得られた病理組織学的所見ならびにPKC活性値を比較検討した。なおPKC活性の測定にはAmersham社製protein kinase C enzyme assay system（R. P. N. 77A.〔$\gamma-^{32}$P〕ATP使用）を用いた。

結　果

1．発癌実験

1）肉眼的所見

塗布後8週において最も早い個体では口底粘膜に白色の小隆起性病変がみられ，塗布後16週において白色の小隆起性病変や白板症様の初期変化が約60％にみられた。塗布後32週では実験群全例に腫瘍性変化がみられた。腫瘍の大部分は外向性の増殖を示した。

2）病理組織学的所見

病理組織学的には，塗布後16週で発癌が確認された。腫瘍の大部分は高分化型扁平上皮癌であった。

2．PKC活性の測定

1）対照群

対照群のPKC活性は，1週に比較して2週から8週においては低下し，その後再び上昇していた。しかし12週以後では著明な低下傾向はみられなかった。

2）実験群

DMBA一回塗布後のPKC活性は72時間後まで経時的に低下していた。DMBA塗布後10週でその後の塗布を中止した群においてPKC活性は少なくとも6週間は低下していた。

DMBA 塗布側の PKC　活性は経時的に低下する傾向を認めた。一方，DMBA 塗布側と DMBA 非塗布側の PKC 活性比では発癌以前の初期の段階においては PKC 活性比は高く，その後腫瘍の増大にともない PKC 活性比は低下する傾向を認めた。

3．上皮における PKC 分子種の発現

上皮細胞においては PKC β ならびに PKC γ の発現はみられなかった。一方，PKC α は発癌の全過程において弱いながらも発現していた。またこの発現は 8 週以前において比較的強くみられた。

考察ならびに結論

DMBA 1 回塗布後ならびに塗布中止後の PKC 活性の測定結果から，DMBA 一回塗布による PKC 活性の down regulation は少なくとも 3 日間は回復せず，さらに DMBA の繰り返し塗布では少なくとも 6 週間は PKC 活性の回復がみられないことを示唆すると考えられた。

初期の PKC の高活性は DMBA 塗布による c－Ha－ras の活性化にともなうジアシルグリセロール（DG）の増加が一因と思われた。この初期における PKC 活性の一時的な増大は発癌過程の初期変化と何らかの関連性のあることが推測された。一方，その後に続く低活性は DMBA の繰り返し塗布による down regulation ならびに遺伝子レベルでの PKC 産生の減少などが原因と考えられた。この PKC の低活性は，PKC が低活性を保つことにより細胞外のある種のシグナルに対する不応期を形成すること，あるいは細胞内シグナル伝達系の攪乱を通じて発癌へと向かわせるものと考えられた。

PKC のモノクローナル抗体を用いた免疫染色の結果は発癌以前の時期において，PKC α が細胞の初期変化と何らかの関連性を有する可能性を示唆するものと考えられた。なお今回組織学的には確認することは出来なかったものの，これらの染色の結果ならびに PKC 活性の測定結果から，上皮においては nPKC の発現している可能性が示唆された。

DMBA 誘発ハムスター実験歯肉・口底癌の発癌過程においては PKC は初期には高活性を示し，その後腫瘍の進展にともない低活性を示すことが明らかになった。またそれらの上皮細胞において主として発現する PKC 分子種は PKC α ならびに nPKC であることが示唆された。このような発癌過程における PKC 活性の経時的変動ならびにその上皮に発現する PKC 分子種の同定に関する詳細な検討は，発癌のメカニズムの解明ならびに腫瘍マーカーとしての PKC の臨床応用を可能にするものとして期待される。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　福　田　　博
副　査　　教　授　　松　本　　章
副　査　　教　授　　雨　宮　　璋

主査・副査全員が一堂に会し，口頭にて論文審査を行った。まず，本論文提出者に研究内容の概要を説明を求めた。提出者は以下の内容を明快に説明した。

発癌過程における Protein Kinase C(PKC) 情報伝達系の関与ならびに口腔粘膜上皮および口腔扁平上皮癌における PKC subtype の発現様式を明らかにする目的で，9－10－dimethyl－1，2－benzanthracene（DMBA）によりハムスターの歯肉および口底に誘発した癌を用いて，発癌途上における上皮ならびに癌組織の PKC 活性の変動および PKC subtype の発現について検討した。

〈実験方法〉

実験動物として，生後4－5週齢のゴールデンハムスターを用い，週3回左下顎第二臼歯部舌側歯肉歯槽粘膜を歯科用クレンザーで擦過後，0.5%DMBA アセトン溶液を同部に塗布した。週3回塗布開始後1，2，4，6，8，10，12，14，16，20，24，28，32，36，40，52週の各週に，また DMBA 一回塗布後，直後，2，4，24，72時間後に，さらに DMBA を10週間塗布後，塗布を中止し，2，4，6週後に PKC 活性を測定した。また，同時に，PKC 活性に対応する各週に得られた試料を HE 染色，抗 BrdU 抗体ならびに PKC α，β，γ のモノクローナル抗体を用いて組織学的に観察した。

〈結果および結論〉

1．肉眼的には，早いものでは DMBA 塗布後8週で口底粘膜に白色の小隆起性病変がみられ，塗布後16週で約60%の個体に白色の小隆起性病変や白板症様変化がみられた。32週で全例に腫瘍性変化がみられた。病理組織学的には16週で発癌が確認され，それらの大部分は高分化型扁平上皮癌であった。

2．DMBA 一回塗布後の PKC 活性は72時間後まで経時的に低下した。10週塗布後，塗布を中止した群では，少なくとも6週間は，PKC 活性は低下していた。DMBA 塗布側と非塗布側の PKC 活性比では，発癌以前の初期段階においては PKC 活性比は高く，腫瘍の増大とともに，活性比は低下する傾向を認めた。

初期のPKCの高活性はc－Ha－rasの活性化にともなうジアシルグリセロールの増加が一因と思われ，発癌過程と何らかの関連性のあることが推測される。その後に続く低活性は，DMBAの繰り返し塗布によるdown regulationならびに遺伝子レベルでのPKC産生の減少などが原因と考えられ，PKCの低活性は細胞外のある種の情報に対する不応期を形成すること，あるいは細胞内情報伝達系の攪乱を通じて，発癌へと向かわせるものと考えられる。

3．上皮細胞においてはPKC βならびにPKC γの発現はみられなかった。一方，PKC αは発癌の全過程において弱いながらも発現し，8週以前において比較的強くみられた。このことは，PKC αの発現が，癌化への初期変化と何らかの関連のあることを示唆した。

4．以上のことは，口腔扁平上皮における発癌のメカニズムの一端の解明ならびに腫瘍マーカーとしてのPKCの臨床応用を可能にするものと思われる。

以上の説明をうけた後，主査・副査より，実験方法とその結果を中心に発癌，細胞内情報伝達系などに関する幅の広い種々の質問がされた。論文提出者はこれらの質問に対して，それぞれ適切に解答した。また，多数の外国文献についても十分理解し説明した。

PKCはイノシトール1，4，5－三リン酸－カルシウム動員系とならんで，様々な細胞応答の情報伝達系において中心的な役割をはたしていると考えられている。また，近年，発癌におけるPKCの役割も注目され始めている。しかし，PKCの活性化と発癌とを強く結びつける実験的事実は少なく，また長期にわたる発癌過程において，PKC活性の変動を検討した報告もない。一方，カルシウム依存性のconventional PKCに4種類，カルシウムに依存しないnovel PKCには5種類のsubtypeのあることが知られており，これらのsubtypeが様々な細胞において固有の分布ならびに発現様式をとり，そのことが細胞ならびに組織の特徴的な応答と関連していると考えられている。しかしながら，上皮における分布状態についての報告はほとんどなく，また発癌過程における発現様式に関する報告はみられない。

本論文提出者は，多数のハムスターを用い，正常口腔粘膜および口腔扁平上皮癌の発癌過程において長期間にわたるPKC活性の変動を詳細に検討し，あわせて，PKC subtypeの発現様式を明らかにした。本研究は口腔扁平上皮癌の発癌過程におけるPKC情報伝達系の関与を実験的に証明し，PKC活性およびPKC subtypeの発現様式を詳細に検討することが，発癌のメカニズムの一端を解明する一つの手がかりになり得ることを示唆した。さらに，PKCが腫瘍マーカーとして口腔癌および口腔前癌病変の診断および予後の判定など，臨床応用の可能性を有することを明らかにした。

以上のことから，本論文提出者は専門分野に関する広い知識ならびに十分な語学力を有するこ

とが認められ，さらに本研究内容が高く評価された。よって，博士の学位授与に値するものと認められた。