

学 位 論 文 題 名

Gelsolin Suppresses Tumorigenicity through Inhibiting PKC Activation in a Human Lung Cancer Cell Line, PC10.

(ゲルソリンは PKC シグナル伝達経路を介して
肺癌細胞株 PC10 の造腫瘍性を抑制する。)

学位論文内容の要旨

目的

ゲルソリンはアクチンの重合及び脱重合を調節する蛋白質として知られており、アクチン細胞骨格のダイナミックな変化を制御することで細胞運動において重要な役割を担っていると捉えられてきた。近年、肺癌、大腸癌、乳癌、膀胱癌など各種癌でゲルソリンの発現低下が見いだされている。さらに、ゲルソリンを高発現させた大腸癌や膀胱癌で造腫瘍性が抑制されることが報告されている。ゲルソリンはアクチンフィラメントに対し切断活性 (severing) を示すほか、フィラメントの反矢尻末端に結合し、モノマーアクチンの付加を阻害したり切断後の短いアクチンフィラメントの再重合を防ぐ capping 活性を持つ。一方でアクチン重合の律速段階である重合核形成を通じて、アクチンの重合に促進的に作用する nucleating 活性を持つ。これらはカルシウムイオン或いはプロトンによって活性化され、また細胞内情報伝達系において重要な役割を担っているホスファチジルイノシトールリン脂質により不活化される。Protein kinase C (PKC) は細胞膜リン脂質の代謝産物である diacylglycerol (DAG) や発癌プロモーター、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) の細胞内標的蛋白であり、細胞増殖や分化など様々な細胞応答反応に関わっていることが知られている。本研究では、ヒト肺癌細胞株 PC10 の造腫瘍性に対するゲルソリン高発現の効果を調べるため、レトロウイルスベクターを用いて野生型ヒトゲルソリンが高発現している株を樹立し、*in vitro*、*in vivo* での造腫瘍性を検討した。また PIP2 などのホスファチジルイノシトールリン脂質に対して高い親和性を持つゲルソリンと細胞内情報伝達を担う PKC の関わりについて検討し、ゲルソリンによる造腫瘍性抑制の分子機構について解析した。

材料と方法

ゲルソリン高発現クローンの樹立：扁平上皮癌である肺癌細胞株 PC10 ではゲルソリン発現の低下が確認されている。レトロウイルスベクター pLNCX の Hind III-Hpa I site に human cytoplasmic gelsolin cDNA の Hind III-Stu I fragment を挿入し、ゲルソリン・レトロウイルスベクター pLNChGsn 作成した。pLNChGsn および pLNCX をパッケージング細胞である CAK8 にトランスフェクションしてゲルソリンレトロウイルスおよびコントロールウイルスを作成した。PC10 細胞にこれらのウイルスを感染させ、ゲルソリン高発現株ならびにコントロール株を作成した。抗ヒトゲルソリンモノクローナル抗体 (2C4) を用いて Western-blotting を行い、各株におけるゲルソリン蛋白質の産生量を検討した。さらに、検出した band をデンシトメーターを用いて定量化した。細胞増殖能とアポトーシス：各株をそれぞれ 10%、1% FBS 添加培養液で培養し、2 日毎に細胞計算盤にて細胞数を測定した。MTT assay は細胞培養後 48 時間で判定した。次に各株をアポトーシスを誘導するスタウロスポリンで処理し、一定時間後に Hoechst で染色して、蛍光顕微鏡による観察を行った。細胞 100 個中における核の凝集が認められる細胞の割合を測定した。軟寒天培地におけるコロニー形成能の測定：各クローンを 3 plate ずつ軟寒天培地に捲いた後、37°C、CO₂ 5% で 3 週間培養した。

判定は1 plateにつき20視野でコロニー形成率を測定しPost-hoc testにて検定を行った。*In vivo*における造腫瘍性の検討：各株をヌードマウス皮下に 5×10^6 個ずつ注射し10日毎に腫瘍を計測した。ブラジキニン刺激による phospholipase C (PLC)の活性化：細胞をあらかじめmyo- [^3H] inositolで標識しPLCを活性化するブラジキニンを種々の濃度で作用させinositol triphosphate (IP3)の産生量を測定した。PKCの細胞内局在の変化：PC10からtotal cell proteinを抽出し、各isoformに特異的な抗PKCモノクローナル抗体を用いてWestern blottingを行い、PKC各isoformを検出した。続いて、48時間血清飢餓状態においた。各株をPKCを直接活性化する発癌プロモーターTPAあるいはブラジキニンで処理後、細胞を回収して、ホモジェナイザーで細胞を破碎した。低速遠心により核成分を分離・除去した後、超遠心にて細胞質成分と細胞膜成分に分離した。Bradford assayで各画分の蛋白質濃度を定量し、細胞質画分と細胞膜画分の各PKC isoformをWestern blottingにより検出し比較して、細胞内の局在の変化、すなわち活性化の指標となる細胞膜への移行の有無を検討した。

結果

ゲルソリン高発現クローンの樹立：親株よりそれぞれ5倍、7.5倍のゲルソリンを産生する株 (PG3、PG2) が得られた。これらをベクターのみを導入したコントロール株 (PN3、PN4)、親株PC10とともに本研究に使用した。軟寒天培地におけるコロニー形成能の測定：ゲルソリン高発現株ではコントロールに比べ、軟寒天培地中でのコロニー形成能が減少していた。*In vivo*における造腫瘍性の検討：ゲルソリン高発現株ではヌードマウス皮下での造腫瘍性も低下していた。細胞増殖能とアポトーシス：ゲルソリン高発現株での造腫瘍性低下の要因が細胞増殖能の低下によるのかアポトーシスの昂進が原因であるのかを検討した。各株間で10%FCS添加medium下での細胞増殖能には差は認められなかったが、1%FCS添加培養液下ではゲルソリン高発現株で細胞増殖は抑制されていた。MTT assayでも同様の結果が得られた。一方、スタウロスポリンを使用したアポトーシス誘導実験では各クローン間に差は認められなかった。ブラジキニン刺激による PLCの活性化：PIP2はPLC β の活性化によってDAGとIP3に加水分解される。PLC β を活性化するブラジキニンで各株を刺激し、各株間でIP3産生量を比較した。PN3ではブラジキニンの濃度依存性にIP3産生量が増加し高いレベルで維持されるのに対しPG2ではIP3産生が著明に抑制された。PKCの細胞内局在の変化：PKCは大きく3種類 (cPKC、nPKC、aPKC)のタイプに分けられその中で12種類のisoformsが知られている。cPKC、nPKCはDAGやTPAと直接結合することにより活性化される。PC10細胞ではPKC isoformのうちcPKC (PKC α 、PKC γ)、aPKC (PKC λ 、PKC ι) が発現していた。いずれの株においてもTPA処理によってPKC α 、PKC γ は細胞質から細胞膜へ局在が変化することが確認された。一方でaPKCの局在変化は認められなかった。次に、ブラジキニン刺激によるPKC局在の変化を比較検討した。PC10、PN3、PN4のコントロール群ではcPKCの細胞質から細胞膜への局在の変化が確認されたが、ゲルソリン高発現株 (PG2、PG3) においては局在の変化は確認されなかった。

考察

我々は本研究で、アクチン調節タンパク質であるゲルソリンが肺癌細胞PC10の造腫瘍性を抑制することを示し、さらに、その機構がPKCの細胞内情報伝達系路に深く関わっていることを初めて証明した。ゲルソリンは腫瘍抑制遺伝子としての役割を持ち、その効果は発現量にも依存することが示された。PKCは細胞内情報伝達における重要な蛋白として知られ、細胞増殖、分化、ホルモン応答といった様々な生物現象に関与している。ゲルソリン高発現線維芽細胞においてPLC活性が阻害されていたことから、癌細胞でもこの経路がゲルソリンの造腫瘍性抑制に関係していると予想された。ホルモンや細胞増殖因子などの細胞外刺激により、PLCが活性化され、PIP2はDAGとIP3という二つのセカンドメッセンジャーに加水分解される。ブラジキニンは、細胞膜の受容体に結合し、三量体G蛋白質を介してPLC β を活性化させる。その結果、PIP2が加水分解されDAGが産生されてPKCと結合するとPKCが活性化され腫瘍増殖へと導かれる。このことから、ゲルソリン高発現株において腫瘍増殖が抑制された機序として次のことが言える。すなわちPC10細胞においてゲルソリンがPIP2と結合しPLC β の活性が抑えられる。そのためPIP2の加水分解が抑えられPKCの標的蛋白であるDAGの産生量が低下する。この結果、PKCが標的とする腫瘍遺伝子が活性化されず造腫瘍性が抑えられるということである。

結語

肺扁平上皮癌 PC10 細胞において、野生型ヒトゲルソリン遺伝子を導入し、高発現させることで造腫瘍性を強く抑制させることを示した。これは、ゲルソリンが PLC β の活性化を抑制し、イノシトールリン脂質代謝による細胞内情報伝達経路を介する腫瘍増殖を抑制させるためであることを証明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Gelsolin Suppresses Tumorigenicity through Inhibiting PKC Activation in a Human Lung Cancer Cell Line, PC10.

(ゲルソリンは PKC シグナル伝達経路を介して
肺癌細胞株 PC10 の造腫瘍性を抑制する。)

ゲルソリンはアクチンの重合及び脱重合を調節する蛋白質として知られており、アクチン細胞骨格のダイナミックな変化を制御することで細胞運動において重要な役割を担っていると捉えられてきた。近年、肺癌、大腸癌、乳癌、膀胱癌など各種癌でゲルソリンの発現低下が見いだされている。さらに、ゲルソリンを高発現させた大腸癌や膀胱癌で造腫瘍性が抑制されることが報告されている。ゲルソリンはアクチンフィラメントに対し切断活性 (severing) を示すほか、フィラメントの反矢尻末端に結合し、モノマーアクチンの付加を阻害したり切断後の短いアクチンフィラメントの再重合を防ぐ capping 活性を持つ。一方でアクチン重合の律速段階である重合核形成を通じて、アクチンの重合に促進的に作用する nucleating 活性を持つ。これらはカルシウムイオン或いはプロトンによって活性化され、また細胞内情報伝達系において重要な役割を担っているホスファチジルイノシトールリン脂質により不活化される。Protein kinase C (PKC) は細胞膜リン脂質の代謝産物である diacylglycerol (DAG) や発癌プロモーター、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) の細胞内標的蛋白であり、細胞増殖や分化など様々な細胞応答反応に関わっていることが知られている。本研究では、ヒト肺癌細胞株 PC10 の造腫瘍性に対するゲルソリン高発現の効果を調べるため、レトロウイルスベクターを用いて野生型ヒトゲルソリンが高発現している株を樹立し、*in vitro*、*in vivo* での造腫瘍性を検討した。また PIP2 などのホスファチジルイノシトールリン脂質に対して高い親和性を持つゲルソリンと細胞内情報伝達を担う PKC の関わりについて検討し、ゲルソリンによる造腫瘍性抑制の分子機構について解析した。

ゲルソリン高発現クローンの樹立：扁平上皮癌である肺癌細胞株 PC10 ではゲルソリン発現の低下が確認されている。レトロウイルスベクター pLNCX の Hind III-Hpa I site に human cytoplasmic gelsolin cDNA の Hind III-Stu I fragment を挿入し、ゲルソリン・レトロウイルスベクター pLNChGsn を作成した。pLNChGsn および pLNCX をパッケージング細胞である CAK8 にトランスフェクションしてゲルソリンレトロウイルスおよびコントロールウイルスを作成した。PC10 細胞にこれらのウイルスを感染させ、ゲルソリン高発現株ならびにコントロール株を作成した。抗ヒトゲルソリンモノクローナル抗体 (2C4) を用いて Western-blotting を行い、各株におけるゲルソリン蛋白質の産生量を検討した。さらに、検出した band をデンシトメーターを用いて定量化した。細胞増殖能とアポトーシス：各株をそれぞれ 10%、1% FBS 添加培養液で培養し、2 日毎に細胞計算盤にて細胞数を測定した。MTT assay は細胞培養後 48 時間で判定した。次に各株をアポトーシスを誘導するスタウロsporin で処理し、一定時間後に Hoechst で染色して、蛍光顕微鏡による観察を行った。細胞 100 個中における核の凝集が認められる細胞の割合を測定した。軟寒天培地におけるコロニー形成能の測定：各クローンを 3plate ずつ軟寒天培地に捲いた後、37°C、CO₂ 5% で 3 週間培養した。判定は 1plate につき 20 視野でコロニー形成率を測定し Post-hoc test にて検定を行った。*In vivo* における造腫瘍性の検討：各株をヌードマウス皮下に 5×10⁶ 個ずつ注射し 10 日毎に腫瘍を計測した。プラジキニン刺激に

よる phospholipase C (PLC)の活性化：細胞をあらかじめ myo- [³H] inositol で標識し PLC を活性化するブラジキニンを種々の濃度で作用させ inositol triphosphate (IP3)の産生量を測定した。PKC の細胞内局在の変化：PC 10 から total cell protein を抽出し、各 isoform に特異的な抗 PKC モノクローナル抗体を用いて Western blotting を行い、PKC 各 isoform を検出した。続いて、48 時間血清飢餓状態においた。各株を PKC を直接活性化する発癌プロモーター TPA あるいはブラジキニンで処理後、細胞を回収して、ホモジェナイザーで細胞を破碎した。低速遠心により核成分を分離・除去した後、超遠心にて細胞質成分と細胞膜成分に分離した。Bradford assay で各画分の蛋白質濃度を定量し、細胞質画分と細胞膜画分の各 PKC isoform を Western blotting により検出し比較して、細胞内の局在の変化、すなわち活性化の指標となる細胞膜への移行の有無を検討した。

ゲルソリン高発現クローンの樹立：親株よりそれぞれ5倍、7.5倍のゲルソリンを産生する株 (PG3、PG2) が得られた。これらをベクターのみを導入したコントロール株 (PN3、PN4)、親株 PC10 とともに本研究に使用した。軟寒天培地におけるコロニー形成能の測定：ゲルソリン高発現株ではコントロールに比べ、軟寒天培地中でのコロニー形成能が減少していた。In vivo における造腫瘍性の検討：ゲルソリン高発現株ではヌードマウス皮下での造腫瘍性も低下していた。細胞増殖能とアポトーシス：ゲルソリン高発現株での造腫瘍性低下の要因が細胞増殖能の低下によるのかアポトーシスの昂進が原因であるのかを検討した。各株間で 10%FCS 添加 medium 下での細胞増殖能には差は認められなかったが、1%FCS 添加培養液下ではゲルソリン高発現株で細胞増殖は抑制されていた。MTT assay でも同様の結果が得られた。一方、スタウロスポリンを使用したアポトーシス誘導実験では各クローン間に差は認められなかった。ブラジキニン刺激による PLC の活性化：PIP2 は PLCβの活性化によって DAG と IP3 に加水分解される。PLCβを活性化するブラジキニンで各株を刺激し、各株間で IP3 産生量を比較した。PN3 ではブラジキニンの濃度依存性に IP3 産生量が増加し高いレベルで維持されるのに対し PG2 では IP3 産生が著明に抑制された。PKC の細胞内局在の変化：PKC は大きく 3 種類 (cPKC、nPKC、aPKC)のタイプに分けられその中で 12 種類の isoforms が知られている。cPKC、nPKC は DAG や TPA と直接結合することにより活性化される。PC10 細胞では PKC isoform のうち cPKC (PKC α、PKC γ)、aPKC (PKC λ、PKC ι) が発現していた。いずれの株においても TPA 処理によって PKC α、PKC γは細胞質から細胞膜へ局在が変化することが確認された。一方で aPKC の局在変化は認められなかった。次に、ブラジキニン 刺激による PKC 局在の変化を比較検討した。PC10、PN3、PN4 のコントロール群では cPKC の細胞質から細胞膜への局在の変化が確認されたが、ゲルソリン高発現株 (PG2、PG3) においては局在の変化は確認されなかった。

我々は本研究で、アクチン調節タンパク質であるゲルソリンが肺癌細胞 PC10 の造腫瘍性を抑制することを示し、さらに、その機構が PKC の細胞内情報伝達系路に深く関わっていることを初めて証明した。ゲルソリンは腫瘍抑制遺伝子としての役割を持ち、その効果は発現量にも依存することが示された。PKC は細胞内情報伝達における重要な蛋白として知られ、細胞増殖、分化、ホルモン応答といった様々な生物現象に関与している。ゲルソリン高発現線維芽細胞において PLC 活性が阻害されていたことから、癌細胞でもこの経路がゲルソリンの造腫瘍性抑制に関係していると予想された。ホルモンや細胞増殖因子などの細胞外刺激により、PLC が活性化され、PIP2 は DAG と IP3 という二つのセカンドメッセンジャーに加水分解される。ブラジキニンは、細胞膜の受容体に結合し、三量体 G 蛋白質を介して PLC βを活性化させる。その結果、PIP2 が加水分解され DAG が産生されて PKC と結合すると PKC が活性化され腫瘍増殖へと導かれる。このことから、ゲルソリン高発現株において腫瘍増殖が抑制された機序として次のことが言える。すなわち PC10 細胞においてゲルソリンが PIP2 と結合し PLCβの活性が抑えられる。そのため PIP2 の加水分解が抑えられ PKC の標的蛋白である DAG の産生量が低下する。この結果、PKC が標的とする腫瘍遺伝子は活性化されず造腫瘍性が抑えられることが証明された。

本研究により肺扁平上皮癌 PC10 細胞において、野生型ヒトゲルソリン遺伝子を導入し、高発現させることで造腫瘍性を強く抑制させること、これは、ゲルソリンが PLCβの活性化を抑制し、イノシトールリン脂質代謝による細胞内情報伝達経路を介する腫瘍増殖を抑制させるためであることが証明された。

口頭発表において副査葛巻 暹教授より、肺癌以外の癌細胞ではどうか、ブラジキニンによる刺激を行ったのは何故か、他の増殖因子ではどうであったか、治療遺伝子として臨床応用は可能か、などの質問があった。つづいて副査加藤弘之教授よりゲルソリンを主役とした治療は可能か、現在、臨床応用可能なベクターの情報をもっているか、また主査秋田弘俊より細胞骨格、遊走能などへの影響、腺癌など他の肺癌ではいかかであるかの質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は誠意ある妥当な回答をした。本研究は肺扁平上皮癌におけるゲルソリン遺伝子の腫瘍抑制効果を検討し、さらにその分子機構も明らかにした点で今後の癌遺伝子治療に大きく貢献する可能性を有しており、その意義は大きく、審査員一同協

議の結果、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。