



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Growth Inhibition of Human Keratinocytes by Antisense c-myc Oligomer Is Not Coupled to Induction of Differentiation                             |
| Author(s)    | 羽白, 誠   |
| Citation     | 大阪大学, 1991, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/37185">https://hdl.handle.net/11094/37185</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|         |   |      |
|---------|---|------|
| 氏名・(本籍) | 羽白  | 誠    |
| 学位の種類   | 医学  | 博士   |
| 学位記番号   | 第   | 9690 |
| 学位授与の日付 | 平成3年3月26日   |      |
| 学位授与の要件 | 医学研究科 内科系専攻   |      |
|         | 学位規則第5条第1項該当  |      |
| 学位論文題目  | Growth Inhibition of Human Keratinocytes by Antisense c-myc Oligomer Is Not Coupled to Induction of Differentiation<br>(アンチセンス c-myc オリゴヌクレオチドによる正常ヒトケラチノサイトの増殖抑制と分化との関連について) |      |
| 論文審査委員  | (主査) 教授 吉川 邦彦   |      |
|         | (副査) 教授 祖父江憲治 教授 高井新一郎  |      |

### 論文内容の要旨

#### (目的)

尋常性乾癬に活性型ビタミンDが有効であることが臨床的に明らかとなり、その作用機序の一つとしてビタミンDのケラチノサイトに対する増殖抑制効果が明らかとなった。この研究の過程において *in vitro* でケラチノサイトにビタミンDを与えるとその増殖は c-myc 遺伝子の一過性の発現抑制を介して抑えられ、分化は促進される事が分かった。また我々は、形質転換細胞成長因子ベータ (TGF- $\beta$ ) もケラチノサイトの増殖を c-myc 遺伝子の一過性の発現抑制を介して制御する事を示したが、この時の分化に関しては、培地のカルシウム濃度に依存して誘導されたり、抑制されたりすることが明らかとなった。そこで今回、増殖と分化の関連についてさらに詳細に解析するために、c-myc 遺伝子の mRNA に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて c-myc 遺伝子の発現を特異的に抑制し、正常ヒトケラチノサイトでの増殖抑制と分化との関連について検討した。

#### (方法)

ヒト c-myc mRNA の第2エクソンにおける1番目より15番目までの塩基に相補的な15塩基の長さのアンチセンスデオキシリボヌクレオチド、及びその対照として同領域のセンスデオキシリボヌクレオチドを用いて正常ヒト表皮細胞を培養し、その増殖抑制及び分化の誘導について解析した。まずオリゴヌクレオチドの本実験の培養系での安定性を検討した。培養上清中のオリゴヌクレオチドの分解を電気泳動で調べた。そしてウェスタンブロッティングにより、このアンチセンス c-myc が、c-myc タンパクの合成を抑えていることを確認した。増殖抑制については、培養ディッシュに増殖した細胞をクリスタルバイオレットで染色して画像解析装置で染色面積を計算する方法と、BrdU の取り込み、<sup>3</sup>H-チミジ

ンの取り込みを調べる方法を行った。分化の誘導については48時間培養後のインボルクリン陽性細胞の割合をフローサイトメーターで算出し、一方では cornified envelope を<sup>35</sup>S-メチオニンでラベルされた SDS-DTT 不溶性のタンパクとして測定した。

#### (結 果)

今回用いたアンチセンスおよびセンス c-myc オリゴヌクレオチドは、5 μM の濃度で我々の培養系で48時間安定であった。c-myc タンパクの合成は24時間において 5 μM のアンチセンス c-myc により 48.8% 減少していた。培養ディッシュで 8 日間表皮細胞を培養した結果の増殖面積は 1 μM, 5 μM, 20 μM のアンチセンスを用いた場合、それぞれ対照の 51.1%, 19.3%, 17.8% しか示さなかった。BrdU の取込については 5 μM のアンチセンス c-myc で 24 時間培養後に対照の 45% 減少していた。<sup>3</sup>H-チミジンの取込では同濃度で 24 時間培養後 43.4% 減少していた。一方分化に関しては、インボルクリン陽性細胞の割合も、cornified envelope 形成の割合も、アンチセンス c-myc 及びセンス c-myc でそれぞれ 5 μM, 20 μM の濃度で 48 時間培養しても差はみられなかった。なおセンス c-myc での結果はすべての実験においてバッファーのみの場合と全く差がみられなかった。

#### (考 察)

本実験は次のような結果を示している。

- 1) アンチセンス c-myc オリゴヌクレオチドは正常ヒトケラチノサイトにおいて、増殖を抑制するが、分化は誘導しない。
- 2) 正常ヒトケラチノサイトでは増殖と分化は必ずしも関連していない。

以前からなされている研究は増殖抑制と分化の誘導が同時に解析されることが多かった。このアンチセンス c-myc オリゴヌクレオチドを用いる実験は増殖を特異的に抑制するという意味で有用な実験系と考えられる。

ヒトケラチノサイトにおいて増殖抑制と分化の誘導が関連していないという現象は既に我々が TGF- $\beta$  存在下において観察している。TGF- $\beta$  存在下ではヒトケラチノサイトは、高カルシウム濃度 (1.8mM) でも、低カルシウム濃度 (0.1mM) でも増殖は抑制されるのに対し、分化に関しては高カルシウム濃度では促進し、低カルシウム濃度では抑制されている。この TGF- $\beta$  による増殖抑制も c-myc 遺伝子の発現の抑制を介しているものである。本実験はその現象をより明確にするために c-myc 遺伝子の発現を特異的に抑制してヒトケラチノサイトで解析したものである。以上より正常ヒトケラチノサイトでは増殖抑制と分化の誘導は密接な関係はあるけれども、そのそれぞれの制御については独立して行われていると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

表皮ケラチノサイトの増殖と分化の調節機序の解明は各種皮膚疾患の病態解明にとって大変重要な課題であり、従来ケラチノサイトの増殖抑制は分化を誘導すると考えられていた。本研究は培養ケラチノ

サイトにc-myc mRNAのアンチセンスを導入し、増殖の抑制を観察したが分化の誘導はみられなかった事から、増殖と分化とは必ずしも関連しているものではない事を証明したものであり、ケラチノサイトの今後の細胞生物学的研究において、その基盤となる知見と考えられる。またこの論文で用いている手法の一つであるアンチセンスオリゴマーを用いる手法は、従来独立して解析する事が不可能であった現象に関しても、遺伝子レベルで独立して解析できる可能性を示唆するものであり、今後のケラチノサイトの研究上価値あるもので、学位に値すると思われる。