

# 原 著 ヒト三次元培養皮膚への遺伝子導入法の確立と 表皮分化へのCキナーゼの関与

昭和大学医学部第二生理学教室  
上岡 なぎさ 本間 生夫

昭和大学医学部産婦人科  
赤羽 智子

昭和大学歯学部口腔病理教室  
河野 葉子

昭和大学医学部皮膚科学講座  
飯島 正文

昭和大学腫瘍分子生物学研究所  
大 場 基

要約：ジーンターゲティング法等、遺伝子導入・欠失技術は、生体内における特定遺伝子の機能に関して多くの情報を与えてくれる。しかしながら、ヒト組織や個体を対象とした遺伝子改変は、倫理・安全性の面から極めて多くの問題を伴うため、ヒト生体内における遺伝子の役割を明確に証明することは困難である。そこで本研究では、ヒト皮膚三次元培養系に対するアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を確立し、皮膚における特定遺伝子の機能を検討した。特に表皮分化への関与が知られるプロテインキナーゼC (protein kinase C, PKC) 遺伝子群のドミナントネガティブ変異体 (dominant negative mutant, D/N) を導入、その機能を抑制し、複数の分化マーカーの発現を指標として表皮分化に与える影響を検討した。さらに、D/N PKC を過剰発現させた培養ヒトケラチノサイトを浮遊培養することで分化誘導し、三次元培養との異同を比較検討した。表皮に発現するPKC $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  各分子種に対するD/N アデノウイルスベクターを角層形成直前の三次元培養皮膚に加えることで、高効率且つ持続性の高い遺伝子導入が可能となった。9日間培養を続け、角質層を含む多層化した皮膚構造が構築された後、表皮分化マーカーの免疫組織染色を行った。有棘層・顆粒層に発現するケラチン1は、D/N PKC によって顆粒層での発現が増加した。一方で、顆粒層マーカーロリクリンはD/N PKC $\alpha$ およびPKC $\delta$ で発現上昇し、D/N PKC $\epsilon$  およびPKC $\eta$  では抑制された。これらの現象は、浮遊培養によるケラチノサイトの分化過程でも確認された。以上のことから、表皮の分化過程においてPKCは、分子種によって共通の、或いは異なる作用を示すことが明らかとなった。今後、皮膚三次元培養にウイルスベクターを適用するこの実験系を利用することで、様々な遺伝子のヒト皮膚における機能解析が可能になるものと考えられる。

キーワード：三次元培養, ケラチノサイト, プロテインキナーゼC, アデノウイルスベクター, 遺伝子導入

近年の生物工学の発展は、トランスジェニック法、ジーンターゲティング法等の遺伝子導入・欠失技術を生んだ。これらの方法によってわれわれは、動物個体における特定遺伝子の機能に関して、様々な情報を得る事が可能となった。しかし、同一

の遺伝子であっても、ヒトと他の動物ではその遺伝子の機能が異なる場合があることが、培養細胞を用いた細胞生物学・分子疫学研究から明らかとなっている。従って、癌、遺伝性疾患、乾癬等の難治性皮膚疾患の原因を遺伝子レベルで明らかとし、臨床応

用するためには、ヒト個体における遺伝子の機能を知ることが重要である。しかしながら、ヒト組織や個体を対象とした遺伝子改変は、倫理・安全性の面から極めて多くの問題を伴う。そのため、ヒト生体内における遺伝子の役割を明確に証明することは困難であった。そこで本研究では、ヒト皮膚三次元培養系（三次元培養，3D culture）に対するアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を確立し、皮膚における特定遺伝子の機能を解析した。対象遺伝子として、ケラチノサイト基底細胞の増殖停止、分化誘導に関与することが示されているプロテインキナーゼC（PKC）を用いた。

## 研究方法

### 1. 細胞培養

正常ヒト表皮ケラチノサイト（normal human epidermal keratinocyte: NHK）は、新生児包皮由来の初代培養細胞を Lonza Inc. (Walkersville, MD, USA) より購入し、使用した。NHKの培養にはEGF、インシュリンを含む無血清ケラチノサイト専用培地（keratinocyte growth medium, KGM）を用い、5継代以下の形態的に未分化な細胞を使用した。継代は、0.025%トリプシン、0.02% EDTAにより37℃、5分間処理を行った。浮遊培養によるケラチノサイトの分化誘導は、NHKをトリプシン処理により回収後、1.45%メチルセルロース含有KGM中に懸濁し、polyhydroxyethylmethacrylate (poly-HEMA) 処理培養ディッシュを用いて行った。

### 2. 三次元培養

皮膚三次元培養は、Ikutaらの方法<sup>1)</sup>に準じて以下のように行った。真皮様コラーゲンゲルは、ブタコラーゲンタイプI-A（新田ゼラチン，大阪）に、ゲルあたり  $2.5 \times 10^5$  個のヒト真皮由来繊維芽細胞を懸濁し、セルカルチャーインサート（1.0 mm pore size, PET track-etched membrane, Becton Dickinson Lab ware, Franklin lakes, NJ, USA）内で重合させた。この際、培地はFAD培地（Ham's F12とDMEM（10%牛胎児血清含有）を容量比1:3で混合したものにインシュリン（10  $\mu$ g/ml）、ハイドロコルチゾン（5  $\mu$ g/ml）、アスコルビン酸（50 mg/ml）、EGF（10  $\mu$ g/ml）を添加した培地）を使用した。1週間後、ゲル上に内径1 cmのガラスリングを乗せ、その中にヒト初代培養ケラ

チノサイト（ $1.2 \times 10^6$  個）を播種した。1日後に培地をKGM/FAD = 1:1に置換し、さらに翌日ケラチノサイトの表面を空気に曝露した。9日間培養後、この三次元培養標本をOTC-compound（Sakura Fine-Tek, Torrance, CA, USA）を用いて凍結し、免疫組織染色等の実験に供した（Fig. 1）。

### 3. 抗体および組織染色

三次元培養標本の凍結切片は、薄切後、エタノール／アセトン（1:1, v/v）により、-20℃、10分間固定した。これらの切片は、ヘマトキシリン-エオジン（hematoxylin-eosin, HE）染色および免疫組織染色に供した。免疫染色は、一次抗体として、抗ヒトケラチン1、インボルクリン、ロリクリン抗体（Covance, Richmond, California, USA）、抗PKC $\alpha$ 、PKC $\delta$ およびPKC $\epsilon$ 抗体（Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA）、抗PKC $\eta$ 抗体（GeneTex, Irvine, CA, USA）、抗Ki67抗体（Novocastra, Newcastle, UK）を用いた。蛋白質はヒストファインMaxPo（ニチレイ，東京）を用い、アミノエチルカルバゾール（aminoethylcarbazole, AEC）発色により検出した。また alexa488- および alexa548- 標識抗ウサギおよびマウス IgG 抗体（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を用いて、蛍光免疫染色を行った。核はDAPI染色法により検出した。

### 4. アデノウイルスベクター

非増殖性アデノウイルスベクターは、Ohbaらの方法に準じて以下のように構築した<sup>2)</sup>。発現プロモーターにはCAG promoterを利用し、挿入遺伝子にはドミナントネガティブ型変異ウサギPKC $\alpha$ 、マウスPKC $\delta$ 、PKC $\epsilon$ およびPKC $\eta$ を用いた。ドミナントネガティブ変異は、PKCのキナーゼ領域に存在するATP結合部位のリジンをアラニン或いはアルギニンに置換したものである<sup>3)</sup>。アデノウイルスの精製と力値は、Adeno-X purification kit および Adeno-X rapid titer（クロンテック，東京）により行った。

### 5. ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは、常法に従って行った。以下に簡略に説明をする。細胞を遠心により回収後、蛋白溶解液（10 mM Tris, pH (8.0), 9.5 M urea, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA）で溶解した後、SDS サンプルバッファを加え、95℃で5分間処理した。一定量の蛋白

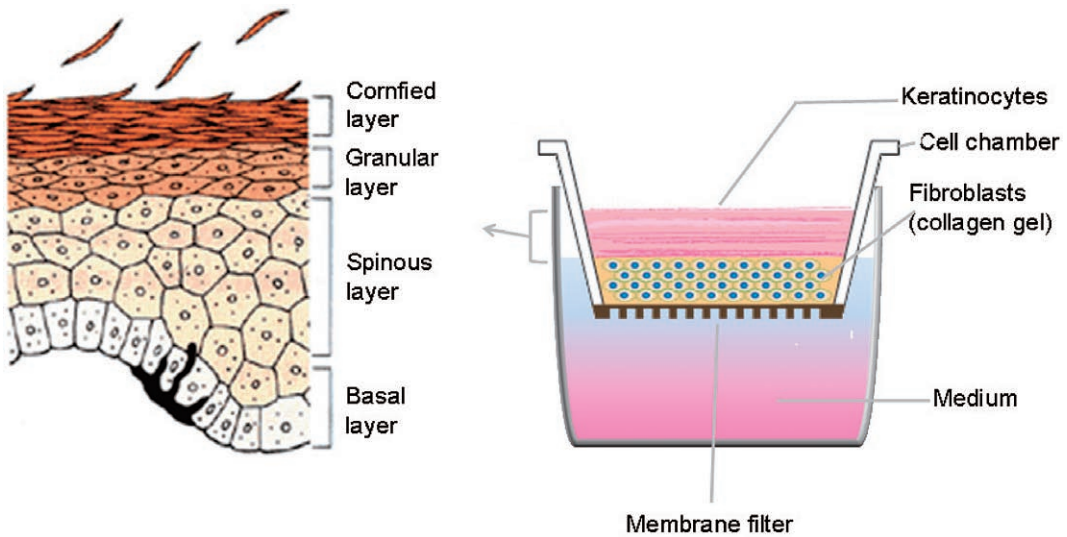


Fig. 1 Diagram of 3D culture

質を SDS-PAGE に供し、ポリビニルデン ジフルロライド (polyvinylidene difluoride: PDVF) 膜に転写した。PDVF 膜はブロッキング液 (5% スキンミルク / リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline: PBS) 中に室温で 1 時間浸した後、1 次抗体と室温 1 時間反応させた。ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体と反応させた後、化学発光を用いた検出系 (ECL) により蛋白質を検出した。

#### 6. リアルタイム RT-PCR

RNA 発現量は SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen) を用いて、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Bio Systems, Carlsbad, CA, USA) を使用し、定量した。全 RNA 1  $\mu$ g を鋳型として、ランダム・ヘキサマー・プライマーを用いて、Superscript III (Invitrogen) により、50°C、30 分間逆転写反応を行った。

リアルタイムサイクラーの条件は、PCR 初期化ステップを 95°C で 10 分間の後、95°C で 10 秒間、60°C で 30 秒を 40 サイクルに設定した。

使用したプライマーは以下の通りである。ケラチン 1, 5'-GGGCTTCAGCTCTGGCT-3', 5'-TGGTGGTCTGCGCTGGTAGT-3', インボルクリン, 5'-TCCACTGCCTCCCCATGCC-3', 5'-GCAGCTCCTGCTCCTGTGGC-3', ロリクリン, 5'-GGAGTTGGAGGTGTTTCCA-3',

5'-CAAACCTCGGGTAGCATCAT-3'.

## 結 果

### 1. アデノウイルスベクターによる遺伝子導入法の検討

#### 1) ケラチノサイト上部へのウイルス添加による方法

表皮ケラチノサイトは重層化し、角質化を遂げることで表皮バリアを形成する。アデノウイルスベクターは角質層を通過しないため、三次元再構成表皮に遺伝子導入するためには、角層形成前にウイルス感染させる必要がある。そこで、表皮が重層化し且つ角層への分化をきたす前、即ちケラチノサイト播種 24 時間後に、表皮上部にのみ  $1.0 \times 10^8$  pfu の PKC $\eta$  ウイルスベクターを加え、感染させた (Fig. 2)。

空気暴露後 3, 6 日目で三次元培養を固定、PKC $\eta$  を免疫染色し遺伝子発現の確認を行ったが、いずれも角層表面にのみ発現が認められるに過ぎなかった。従って、この方法では、遺伝子が表皮全体に十分に発現せず、PKC が分化にどのような影響を及ぼしているか評価する事は出来なかった。

#### 2) ケラチノサイトへの前感染法

次に、あらかじめ培養ケラチノサイトにウイルスを感染多重度 (Multiplicity of infection: MOI = 10) の条件で感染させた後、コラーゲンゲル上に播種、

重層化させる方法を検討した。

この方法では、表皮全層にわたって PKC $\eta$  の発現が確認されたものの、HE 染色では D/N PKC $\eta$  を導入したケラチノサイトは、全体が Ballooning cell 様であり、一部で個細胞壊死も認め、正常な角層への分化傾向が認められなかった (Fig. 3)。従って、この方法では遺伝子の発現は見られるものの、ウイルスの影響で極性を失い、正常な角化が行われなかった。

3) ゲル表面および培地内へのウイルス添加による感染法

上記 1) の結果から推定すると、ケラチノサイト上部のみへのウイルス感染では角化の進行と共に、ウイルスが希釈されてしまうと考えられたため、空気曝露の前日に、ケラチノサイト上部およびゲル周囲の培地に 24 時間、PKC アデノウィルスベクターをゲルあたり  $1.0 \times 10^8$  pfu となるように添加し、感染させた。空気曝露後 9 日目にこの三次元培養を凍結、固定し、各 PKC に対する特異抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った。

その結果、表皮全層にわたって PKC の高い発現を確認した。また感染後 9 日でも十分に発現が維持されていることが確認された (Fig. 4)。

## 2. 三次元培養皮膚に対する PKC の及ぼす影響の検討

上記、項目 1 アデノウィルスベクターによる遺伝子導入法の検討から、ヒト皮膚三次元培養系への高効率での遺伝子導入法が確立された。そこで表皮分化への関与が示されている<sup>4)</sup> PKC 分子種の作用を検討することにした。表皮では主に、PKC $\alpha$ 、PKC $\delta$ 、PKC $\epsilon$ 、PKC $\eta$  の 4 種類の PKC 分子が発現している<sup>5)</sup>。そこで、それら 4 種類の PKC 分子種のキナーゼ活性を失わせた D/N PKC アデノウィルスベクター (D/N PKC $\alpha$ 、D/N PKC $\delta$ 、D/N PKC $\epsilon$  および D/N PKC $\eta$ ) を構築、導入し、三次元皮膚の増殖と分化に与える影響を検討した。

導入した D/N PKC 遺伝子が細胞増殖にどのような影響を及ぼすか検討するため、細胞増殖マーカーである Ki67 染色を行った。D/N PKC $\alpha$  では Ki67 陽性細胞数の顕著な増加が認められ、PKC $\alpha$  は基底細胞における細胞増殖を抑制的に働いていると考えられた (Fig. 5)。他の分子種は、基底層における細胞増殖には大きな影響を与えなかった。しかしなが

ら、D/N PKC $\delta$  と D/N PKC $\epsilon$  導入三次元培養では、基底細胞より上層、すなわち本来増殖の停止している有棘層でも Ki67 陽性細胞が認められた。従って、有棘層における増殖停止あるいは増殖停止の維持に PKC $\delta$  と PKC $\epsilon$  が関与している可能性が示唆された。

次に、各 PKC 分子種の分化に及ぼす影響を同様に検討した。顆粒層の分化マーカーであるロリクリン、有棘層／顆粒層の分化マーカーであるインボルクリン、ケラチン 1 (K1) の蛍光免疫染色を行った。

インボルクリンは、全ての D/N PKC によって発現低下が認められた (Fig. 6)。また K1 は、全ての D/N PKC によって顆粒層での発現増加が認められる一方、有棘層での発現低下が見られた。従って、PKC はインボルクリンの発現を増加させる一方で、K1 の発現を低下させると考えられた。さらに、ロリクリンの発現は D/N PKC $\alpha$ 、D/N PKC $\delta$  によって著明な増加が認められる一方で、D/N PKC $\epsilon$ 、D/N PKC $\eta$  によっては、その発現が抑制された。これらのことから、表皮内では PKC $\alpha$ 、PKC $\delta$  はロリクリンの発現を抑制し、逆に PKC $\epsilon$ 、PKC $\eta$  はその発現を促進すると考えられ、PKC 分子種は、表皮分化において、ロリクリンに対しては相反する作用を及ぼすことが示された。

## 3. 浮遊培養誘導性ケラチノサイト分化に対する PKC の影響

次にキナーゼ欠損型 D/N PKC の作用を、培養ケラチノサイトを用いた浮遊培養による分化誘導モデルで検討し、三次元培養モデルとの比較を行った。培養ケラチノサイトに各 D/N PKC アデノウィルスベクターを導入し、浮遊培養により分化誘導を行った。浮遊培養は poly-HEMA コートディッシュ上で、1.45% メチルセルロース含 KGM にケラチノサイトを懸濁培養することで行った。60 時間浮遊培養した後に蛋白を回収し、ウェスタンブロット法を用いて、ロリクリン、K1 の蛋白発現量を確認した。ケラチン 14 (K14) は、培養ケラチノサイトにおいて、増殖・分化刺激の有無にかかわらず、発現量が一定である事が知られている。そこで、ウェスタンブロットのローディングコントロールとして、K14 を用いた。

その結果、K1 は、D/N $\epsilon$  および D/N $\eta$  によって特に発現増加が認められた (Fig. 7)。またロリクリ



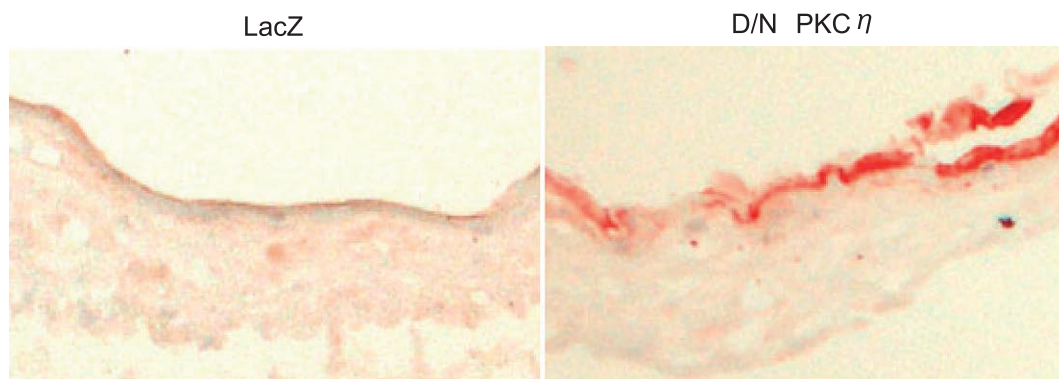


Fig. 2 Expression of PKC $\eta$  in 3D culture. LacZ- or D/N PKC $\eta$  - expressing adenovirus vector was introduced to keratinocytes by addition of the virus onto the keratinocytes on collagen gel. PKC $\eta$  proteins were detected with the specific antibody and visualized with AEC dye.

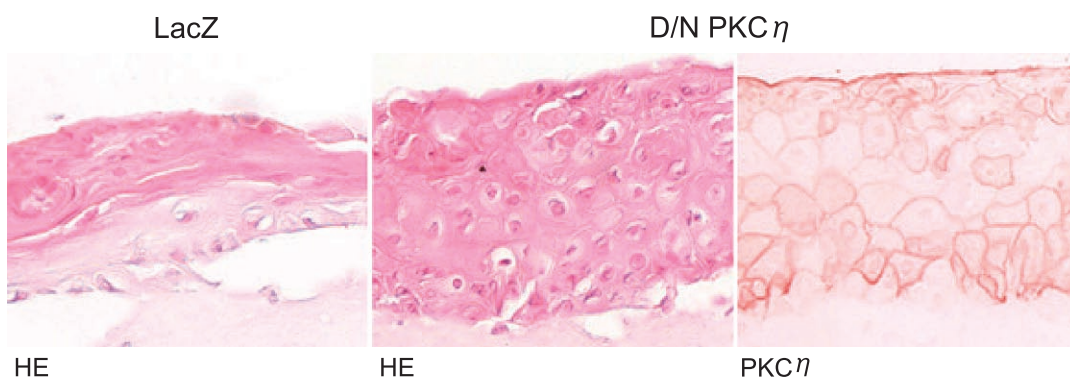


Fig. 3 Expression of PKC $\eta$  in 3D culture. Adenovirus vector was introduced by addition to keratinocytes before seeding the collagen gel.

LacZ : 3D culture introduced the LacZ-expressing adenovirus. D/N PKC $\eta$ : 3D culture introduced the dominant negative PKC $\eta$ -expressing adenovirus. HE: hematoxylin-eosin staining, PKC $\eta$ : immunostaining of PKC $\eta$  proteins

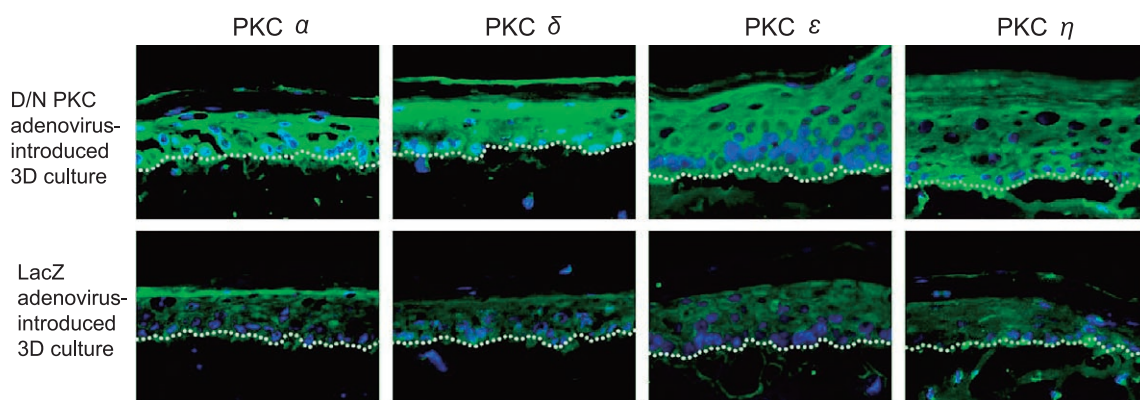


Fig. 4 Expression of each PKC isoforms in 3D culture. Adenoviruses were introduced by addition both into the medium and onto keratinocytes. Upper panel shows the expression of indicated PKC isoform in the indicated D/N PKC adenovirus-introduced 3D culture. Lower panel shows the expression of indicated PKC isoform in the LacZ adenovirusintroduced 3D culture. The white dots represent the boundary of the epidermis. Green: PKC, Blue: nuclei

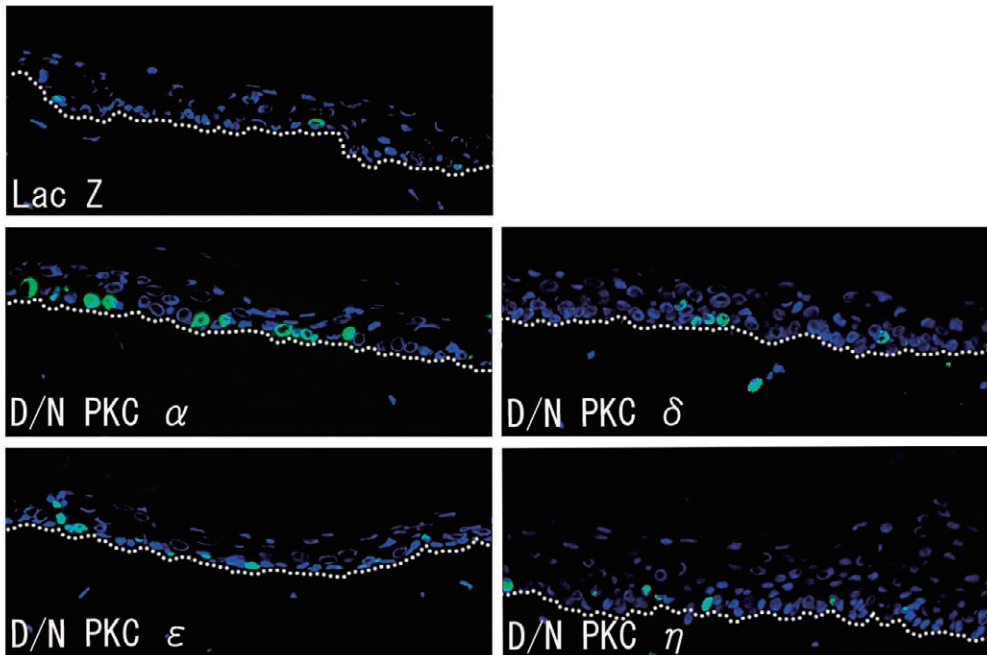


Fig. 5 Immunostaining of Ki67 in the dominant negative PKC adenovirus- introduced 3D culture.  
Green: Ki67, Blue: nuclei The white dots represent the boundary of the epidermis.

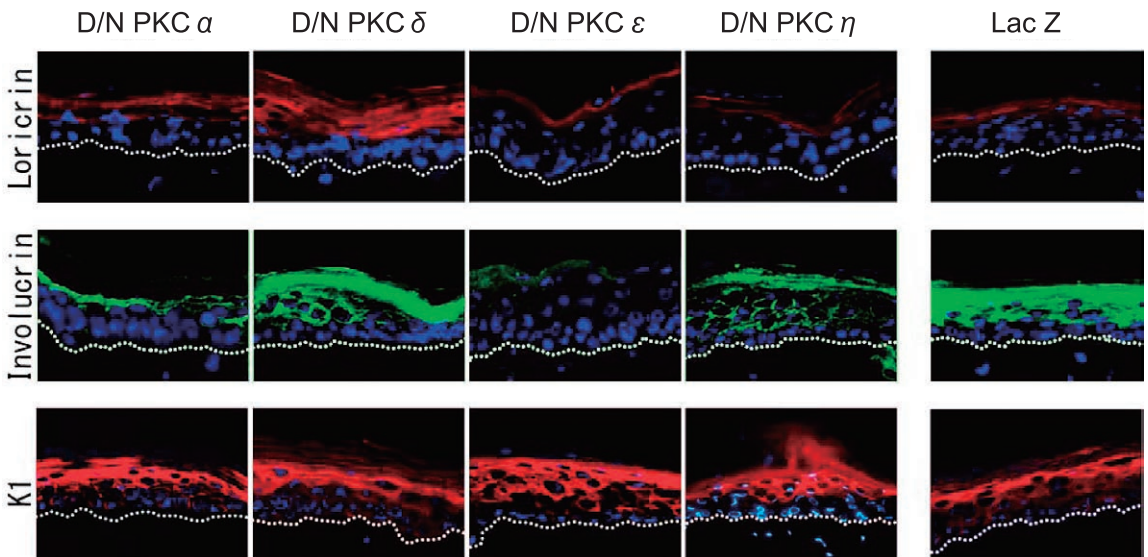


Fig. 6 Expression of differentiation-associated genes in the 3D culture introduced the dominant negative PKC adenovirus.  
Top panel; loricrin, Middle; involucrin, Bottom; keratin 1

ンの発現には、分子種により差異が認められた。  
D/N PKC $\alpha$ , D/N PKC $\delta$ , とりわけ D/N PKC $\delta$  の  
導入によりロリクリン蛋白質の著明な増加を認める

一方で、D/N PKC $\eta$ によっては完全に抑制された。

次に上記のウエスタンブロッティングで行った  
方法と同様に、ウイルス導入、分化誘導を行い、リ

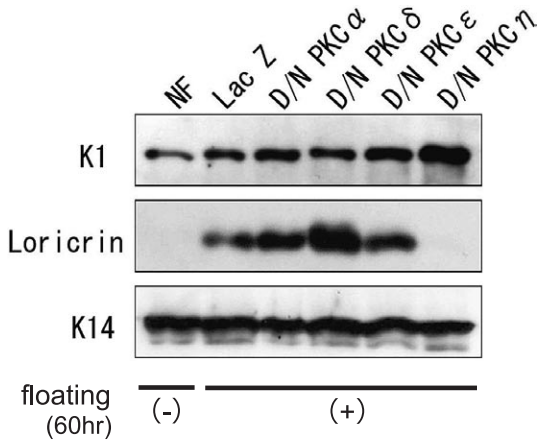
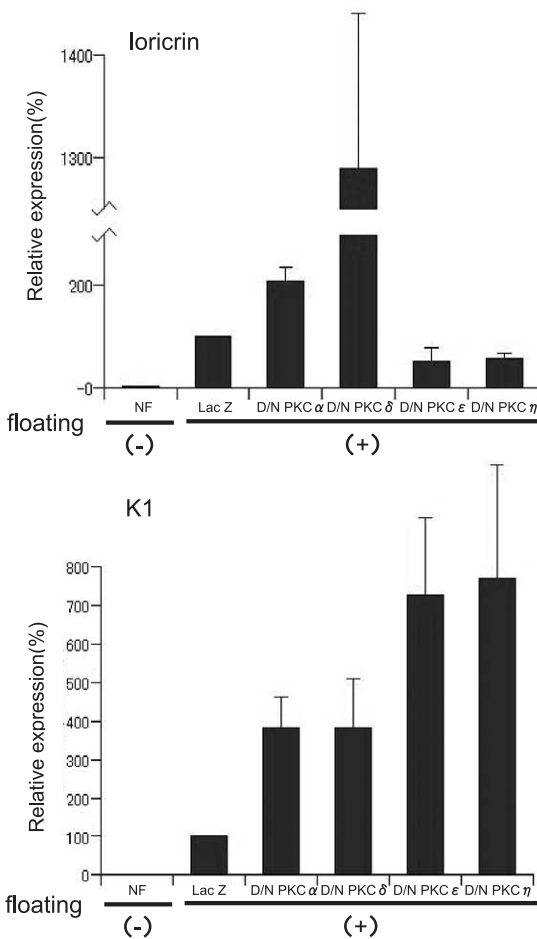


Fig. 7 Expression of differentiation marker genes of keratinocytes. Keratinocytes were infected with the indicated virus for 12 hr. The cells were detached, and cultured in methylcellulose-containing KGM for 60 hr. NF; No floating culture.



アルタイム RT-PCR 法により各分化マーカーの mRNA 発現量の変化を測定した。その結果ロリクリンは、三次元培養系と同様に D/N PKC $\alpha$ , D/N PKC $\delta$ によって増加し, D/N PKC $\epsilon$ , D/N PKC $\eta$ によって抑制された (Fig. 8)。また K1 は, 全ての D/N PKC によって発現増加が認められる一方で, インボルクリンは, D/N PKC $\delta$ を除く, 全ての D/N PKC によって発現抑制されることが示された。

これらのことから, 三次元培養モデルから得られたドミナントネガティブ PKC の作用との高い相関関係が示される一方, 浮遊培養系と三次元培養系で分化マーカーの発現変化に差異も認められた。

## 考 察

今回われわれは, アデノウイルスベクターを用いてヒト皮膚三次元培養に, 高効率に遺伝子導入する

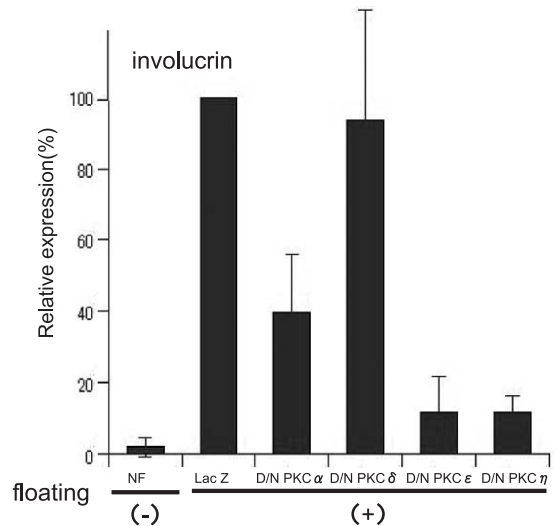


Fig. 8 mRNA expression of differentiation marker genes. Keratinocytes were infected with the indicated virus for 12 hr. The cells were detached, and cultured in methylcellulose-containing KGM for 48 hr. Value represent the relative expression compared to LacZ-introduced keratinocytes. Error bars represent standard deviation (N = 4). NF; No floating culture.

方法を確立した。このシステムを用いて、表皮ケラチノサイトの増殖と分化誘導に様々な関与が報告されている PKC 分子の作用を検討した。また三次元培養で得られた結果が、平面培養されたケラチノサイトの分化に対する PKC の影響とどのような異同があるのかを、浮遊培養を用いた分化誘導系を用いて検討した。

皮膚三次元培養系は、生体内とりわけヒト組織での作用を反映する優れた系であり、現在のところ、実験に自在に利用できる唯一のヒト組織モデルといえる。この系はコラーゲンゲル内に繊維芽細胞を懸濁させ、重合・収縮後、ケラチノサイトをこのゲル上に播種、重層化させた後に空気に曝露し、角化を誘導するシステムである<sup>1)</sup>。これまでに増殖因子やサイトカインの生物学的刺激、創傷等の物理的刺激をこの三次元培養系に加えることで、ヒト皮膚における様々な因子の及ぼす影響が検討されてきた<sup>6)</sup>。

しかしながら、遺伝子の機能解析における最も明確な方法は、特定の遺伝子を過剰発現させる、或いは発現抑制・機能抑制することである。これまでに特定遺伝子を導入した安定形質転換表皮ケラチノサイトを三次元培養に適応した例や short herpinRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた報告が少数認められる<sup>7,8)</sup>。これらの方法に比べて、アデノウイルスを用いた本方法は以下の点で優れた特質を持つ。1) 培地内に加えるだけで、遺伝子導入が完了する。また、安定形質転換細胞の確立のような煩雑で時間も要する行程をへる必要がない。2) 複数の遺伝子を同時に導入することが可能である。3) ウイルスの濃度を変化させるだけで、導入遺伝子の発現を制御できる。従って、濃度依存性の確認に非常に有用である。4) レンチウイルスベクターやレトロウイルスベクターは、染色体への組換え能を有するため、安全性の上で劣る。一方、アデノウイルスベクターは染色体への組換えが生じないため、安全性が高い。5) 他のウイルスベクターと異なり、ベクターの作製・保存が容易であり、ウイルスの状態での長期保存が可能である<sup>9)</sup>。従って、アデノウイルスベクターを用いた本方法を様々な遺伝子に応用することで、ヒト皮膚での遺伝子機能の解析に大きな貢献をするものと考えられる。

われわれはこの方法を用いて、様々な細胞種で多彩な作用を発揮するシグナル伝達分子である PKC

の作用を検討した。PKC は現在 10 種類の分子種が知られ、その構造と活性化様式から、conventional PKC (PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), novel PKC (PKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), atypical PKC (PKC $\zeta$ ,  $\lambda/\iota$ ) に分類される<sup>10)</sup>。表皮においては PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$ が発現する。そこで、本研究ではこれら 4 種類の PKC 分子種に対するキナーゼ欠損型ドミナントネガティブ変異体を構築、それらをアデノウイルスベクターに挿入し、三次元培養系に適用した。

その結果、PKC の分子種によって、増殖・分化に対して異なる影響が生じることが明らかとなった。D/N PKC $\alpha$ は、基底細胞の増殖抑制に関わり、D/N PKC $\delta$ は本来細胞増殖を生じない有棘細胞の細胞増殖を促した (Fig. 5)。これはこれまでに得られた培養ケラチノサイトやトランスジェニックマウスでの結果と一致する。活性化型 PKC $\alpha$ は、ヒト培養ケラチノサイトの増殖を p21WAF1 の発現低下を伴って停止させる<sup>8)</sup>。PKC $\delta$ トランスジェニックマウスは、二段階発癌法による皮膚扁平上皮癌の発生を著しく抑制する<sup>11)</sup>。

また、三次元培養系において、全ての D/N PKC 分子種は有棘層のマーカーである K1 の発現を上昇させた。その一方で、有棘層上層・顆粒層マーカーであるインボルクリンの発現は、全ての D/N PKC によって減少された。これらのことから、PKC は有棘層から顆粒層への分化過程に関与することが示唆された。しかしながら、顆粒層特異的なマーカーであるロリクリンは、三次元培養系において PKC $\alpha$ ,  $\delta$ によって発現抑制され、PKC $\epsilon$ ,  $\eta$ によって促進されることが示唆された。このことは浮遊培養を用いたケラチノサイトの分化誘導系における結果と一致する。これまで、PKC $\delta$ は表皮の最終分化を促進する分子として認識されてきた。例えば、その過剰発現によってケラチノサイトの増殖は G1 停止し、角質層におけるコニファイドエンベロープ (cornified envelope) の形成に必須なトランスグルタミナーゼ-1 (transglutaminase-1) の発現上昇と活性化を誘導することが報告されている<sup>2)</sup>。また PKC $\delta$ の発現と活性は表皮上層に向かうにつれ、上昇することも示されている。従って、このロリクリンの発現変化は、これまで認識されていた PKC $\delta$  分子種の表皮における役割を覆すものといえる。

最後に、浮遊培養系を用いた分化誘導と三次元培



養系で得られた結果との比較を行った。浮遊培養系における PKC によるロリクリンの発現変化は三次元培養系と全く同様であったが、インボルクリン、K1 の発現に及ぼす影響には若干の相違が生じた。これらのことから、*in vitro* 平面培養で得られる遺伝子機能の情報は、生体内での遺伝子の本来の機能と異なる可能性があることを示している。疾患に関わる様々な遺伝子の生物個体での機能を明らかにすることは、遺伝子治療や分子標的薬の開発に必須である。従って、基礎研究と臨床との距離がより近づきつつある今日においては、より生体に近い状態で遺伝子の機能解析を行うことの重要性が益々高まると思われる。本研究における結果は、今後の基礎・臨床研究に多くの貢献をするものと考えている。

#### 文 献

- 1) Ikuta S, Sekino N, Hara T, *et al*: Mouse epidermal keratinocytes in three-dimensional organotypic coculture with dermal fibroblasts form a stratified sheet resembling skin. *Biosci Biotechnol Biochem* **70** : 2669-2675, 2006.
- 2) Ohba M, Ishino K, Kashiwagi M, *et al*: Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C. *Mol Cell Biol* **18** : 5199-5207, 1998.
- 3) Matsumura M, Tanaka N, Kuroki T, *et al*: The eta isoform of protein kinase C inhibits UV-induced activation of caspase-3 in normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **303** : 350-356, 2003.
- 4) Papp H, Czifra G, Lazar J, *et al*: Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocyte. *Exp Dermatol* **12** : 811-824, 2003.
- 5) Kashiwagi M, Ohba M, Chida K, *et al*: Protein kinase C eta (PKC eta): its involvement in keratinocyte differentiation. *J Biochem* **132** : 853-857, 2002.
- 6) Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, *et al*: c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* **103** : 745-755, 2000.
- 7) Ikebe D, Wang B, Suzuki H, *et al*: Suppression of keratinocyte stratification by a dominant negative JunB mutant without blocking cell proliferation. *Genes Cells* **12** : 197-207, 2007.
- 8) Jerome-Morais A, Rahn HR, Tibudan SS, *et al*: Role for protein kinase C-alpha in keratinocyte growth arrest. *J Invest Dermatol* **129** : 2365-2375, 2009.
- 9) Kuroki T, Kashiwagi M, Ishino K, *et al*: Adenovirus-mediated gene transfer to keratinocytes-a review. *J Investig Dermatol Symp Proc* **4** : 153-157, 1999.
- 10) Osada S, Hashimoto Y, Nomura S, *et al* : Predominant expression of nPKC eta, a Ca (2+)-independent isoform of protein kinase C in epithelial tissues, in association with epithelial differentiation. *Cell Growth Differ* **4** : 167-175, 1993.
- 11) Wheeler DL, Reddig PJ, Dreckschmidt NE, *et al*: Protein kinase C delta-mediated signal to ornithine decarboxylase induction is independent of skin tumor suppression. *Oncogene* **21** : 3620-3630, 2002.

## ESTABLISHMENT OF EFFECTIVE GENE TRANSFER METHOD TO THREE-DIMENSIONAL SKIN CULTURE

Nagisa KAMIOKA and Ikuo HONMA

Department of Physiology, Showa University School of Medicine

Tomoko AKAHANE

Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of Medicine

Yoko KOHNO

Department of Oralpathology, Showa University School of Dentistry

Masafumi IJIMA

Department of Dermatology, Showa University School of Medicine

Motoi OHBA

Institute of Molecular Oncology, Showa University

**Abstract** — Gene engineering techniques such as transgenic and gene knock-out animals are powerful tools to clarify gene function in the organism. It is known that a conserved gene between animals and humans plays a physiologically distinct role in the growth and differentiation of cells. Elucidation of the gene function in the human body is valuable for the development of novel medicines such as molecular target drugs. However, it is extremely difficult to engineer certain genes in humans. We present here an effective gene transfer method to three-dimensional skin culture (3D culture) with replicative-deficient adenovirus vector. The 3D culture is a human skin equivalent consisting of stratified keratinocytes and a dermal equivalent. We added the adenovirus vector onto the keratinocytes and into the cultured medium before starting the stratification. The expression level of the introduced gene continued at least 10 days after infection. Furthermore, we investigated the role of protein kinase C (PKC) in the 3D culture with this method. We introduced the adenovirus expressing the dominant negative mutants (D/N) of PKC $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  and  $\eta$  to the 3D culture and examined their effects on growth and differentiation. D/N PKC $\alpha$  increased proliferation of the basal cells of keratinocytes, and D/N PKC $\delta$  caused irregular growth of some cells in the spinous layer. D/N PKC $\delta$  increased loricrin expression, a late marker of keratinocyte differentiation, whereas D/N PKC $\eta$  decreased the loricrin expression. These findings indicate that a combination of 3D culture with the adenovirus vector is a useful tool for elucidating the gene function.

**Key words:** 3D culture, keratinocyte, protein kinase C, adenovirus vector, gene transfer

〔受付：2月12日，受理：2月19日，2010〕