

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

Cytometry Research (1996.05) 6巻1号:9~17.

選択的PKC阻害剤カルフォスチンCの豚表皮細胞動態に与える影響

橋本喜夫、川岸尚子、田村俊哉、飯塚 一

選択的 PKC 阻害剤カルフォスチン C の 豚表皮細胞動態に与える影響

橋本 喜夫¹⁾ 川岸 尚子 田村 俊哉 飯塚 一

Effects of the selective protein kinase C inhibitor, calphostin C, on pig epidermal keratinocytes: thymidine incorporation and flow cytometric analyses.

Yoshio Hashimoto¹⁾, Naoko Kawagishi, Toshiya Tamura, Hajime Iizuka

1) Department of Dermatology, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan

We investigated the effects of calphostin C, a selective protein kinase C (PKC) inhibitor, on thymidine incorporation of pig epidermal keratinocytes. Calphostin C markedly suppressed thymidine incorporation of epidermis in *in vitro* organ culture system. The inhibition by calphostin C was observed at 50 μ M concentration, and was reversible, suggesting that the chemical is not cytotoxic at this concentration. DNA-flow cytometric analysis (DNA-FCM) revealed that calphostin C inhibited cell proliferation at G1 phase of cell cycle. Staurosporine is a less-specific protein kinase C inhibitor. Following treatment in *in vitro* organ culture, staurosporine had a marked inhibitory effect on thymidine incorporation at 10 μ M concentration. The effect of staurosporine was irreversible suggesting cytotoxicity at the concentration. DNA-FCM showed that the arrest induced by staurosporine was at S phase of the cell cycle.

TPA, a classical PKC activator, also inhibited the thymidine incorporation of pig epidermal keratinocytes. The effect of TPA was also reversible. DNA-FCM suggested that TPA inhibited the progression of cell cycle at G1 phase. The addition of calphostin C at concentration that by itself had no effect on thymidine incorporation (10 μ M), resulted in the inhibition of the TPA effect. The Present study suggests that PKC might be involved in the thymidine incorporation of pig keratinocytes.

Key words : calphostin C, selective PKC inhibitor, pig keratinocyte, staurosporine, G1 arrest, TPA

はじめに

Protein kinase C (PKC) が、表皮細胞の増殖と分化に重要な役割を演じている¹⁻³⁾ことはよく知られているが、その詳細な機構は不明である。また PKC activator である TPA が表皮増殖に与える影響も多くの報告があるが、増殖を阻害⁴⁾するか、促進^{2,3)}するかも実験条件により異なる。

TPA を使用することで、表皮ケラチノサイトの増殖や分化の調節に対する PKC の関与を推定することは可

能である。しかし、TPA 作用が PKC の活性化によるものなのか、あるいは PKC の一時的な活性化の後に生じる不活性化 (down-regulation) に付随するものなのか、という解釈上の問題点も生じてくる。今回、我々は組織学的構築が極めてヒトに類似する豚皮膚の器官培養系を用いて、PKC の選択的阻害剤であるカルフォスチン C⁵⁾と比較的特異性の低い阻害剤であるスタウロスポリン⁶⁾、及び PKC 活性化因子である TPA の豚表皮細胞増殖に与える影響を DNA-flow cytometry と ³H-thymidine 取込みで検討した。また *in vivo* の TPA の作用をみるために実験的表皮細胞増殖系である tape stripping 処置を豚背部皮膚に施し、直後に TPA を 1 回塗布して、継時的な変化もあわせて検討した。

旭川医科大学皮膚科学教室 (主任: 飯塚 一教授)

受付日: 1995 年 9 月 22 日 受理日: 1996 年 3 月 11 日

(方 法)

1) 組織と器官培養

体重 5 kg の豚背部を剃毛, 洗浄後, Castroviejo keratome で 0.3 mm の厚さの皮膚を採皮し, 5×5 mm に多数細切した。これらを RPMI1640 培養液に角層を上にして浮かべ, 37°C, 5% CO₂ in air の条件で, 器官培養した。薬剤処理は主に 6h 行った。

2) DNA-flow cytometry (FCM)

DNA-FCM は既報⁷⁾に従って 5×5 mm に細切した豚皮膚を dispase (1000 U/ml) を含んだ RPMI1640 で 37°C, 30 分間培養し, 純粹表皮にした後, 鋏で細切し, -20°C の 70% エタノールで 24~48h, 固定した。PBS で 2 度洗浄後, 0.05% ペプシンを 37°C, 15 分間処理し, RNase (1500 U/ml) 37°C, 15 分間処理などにより分散し, Propidium iodide (100 μg/ml) で 30 分間, 4°C で染色後, EPICS ELITE で 1×10⁴個の細胞核を測定した。外部標準は豚リンノ球を用い, CV 値は全てのサンプルで 5 以下であった。細胞周期の解析は附属のマルチサイクルで行った。

3) ³H-thymidine incorporation

Taylor ら⁸⁾の方法に従って行った。各種薬剤で 6 時間培養後の皮膚片を, ³H-thymidine (1 μCi/ml; specific activity 20 Ci/mmol) を含んだ RPMI1640 培養液に 37°C, 5% CO₂ in air の条件で 2 時間培養した。その後, 生食で洗浄し, 2M NaBr で 2 時間処理し, 純粹表皮成分を得た。これに 200 μl の 0.5N NaOH を加え, 30 分間 95°C water bath で煮沸後, 溶解液の radioactivity を液体シンチレーションカウンターで測定した。

4) Tape stripping

体重 5 kg の豚をネンブータルで腹腔内麻酔後, 豚背部皮膚を剃毛, 洗浄して tape stripping を行った。stripping は Pinkus⁹⁾の方法に従って, セロファンテープを押し付け, 剥す処理を約 40~60 回繰り返した。これにより, 角層の完全除去が得られ, これは病理組織学的にも確認された⁷⁾。この処理を豚背部 10×10 cm² の範囲に行い, 半分に TPA (166 ng/ml) のアセトン溶液を塗布して, 残り半分にアセトンのみを塗布した。対側の背部は無処置部対照とした。0, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96h 後に再び麻酔し, 継時的に Castroviejo keratome で 0.3 mm の厚さに採皮して実験に供した。

5) cAMP assay

各薬剤を一定時間 (6h) 培養後の皮膚片を新しい RPMI 培養液に移し, 37°C で 10 分間, 50 μM の epinephrine で培養後, ドライアイスで反応を止めた。組織

中の cAMP の定量は Yoshikawa ら¹⁰⁾の方法により, cAMP を抽出, 除蛋白後, Yamasa cyclic AMP kit を用いて radioimmunoassay により定量した。なお, CAMP phosphodiesterase の影響を除くため, inhibitor である isobutylmethylxanthine (IBMX) 1mM を添加した。

結 果

1. カルフォスチン C とスタウロスポリンの作用

Fig. 1a は各種濃度のカルフォスチン C 6h 処理による thymidine 取込みに与える影響を対照との比較で示した。カルフォスチン C は 50 μM 以上の濃度で thymidine 取込みを著明に抑制した。Fig. 1b はカルフォスチン C 6h 処理後に洗浄して新しい RPMI 培養液に移した系とそのまま処理を続けた系を比較したものであるが, 6h 処理後, カルフォスチン C を洗浄した系は処理を続けた系に比べ thymidine 取込みの回復がみられ, この抑制効果が可逆的であることが示された。

Fig. 2a はスタウロスポリン各, 種濃度による効果を見たものであるが, 10 μM 以上の濃度で, 有意に thymidine 取り込みを抑制し, この作用は非可逆的であった (Fig. 2b)。DNA-FCM でみたそれぞれの cell cycle への影響であるが, カルフォスチン C は G₁ arrest, スタウロスポリンは S block がみられた (Table 1)。

これらの inhibitor の adenylylate Cyclase-cyclic AMP 系に与える影響を検討した。Table 2 は β-アドレナリン系の反応性をみたものであるが, カルフォスチン C は影響を与えなかったが, スタウロスポリンはアデニル酸シクラーゼの β-アドレナリン系の反応性の増強作用を示した。

2. 器官培養における TPA の作用

各種濃度の TPA で 6h 器官培養したところ 2ng/ml 以上の濃度で thymidine 取込みが著明に抑制された (Fig. 3a)。さらに 2ng/ml の濃度で時間経過をみたところ 6 時間から有意差をもって抑制がみられた (Fig. 4)。Fig. 3b はカルフォスチン C の場合と同様に, TPA の抑制効果が可逆的であることを示した。DNA-FCM による結果では, カルフォスチン C 処理と同じように 6h 処理, 18h 処理ともに G₁ arrest がみられた (Fig. 5a, b)。PKC 活性化作用を有しないホルボールエステルである 4-O-メチル PMA は, 20ng/ml 以上の濃度でもサイミジン取込み抑制作用を示さなかった (Fig. 6)。

3. TPA 作用に対するカルフォスチン C の与える影響

豚表皮器官培養系において TPA の示す thymidine 取込み抑制作用が PKC の活性化によるものかどうかを間接的に確かめるために, 単独では thymidine 取込み

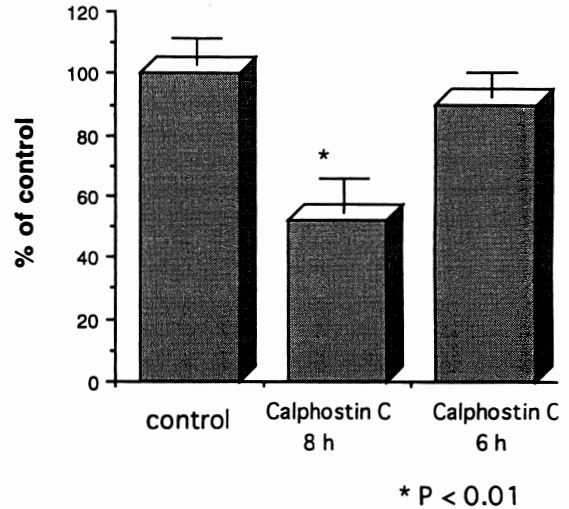
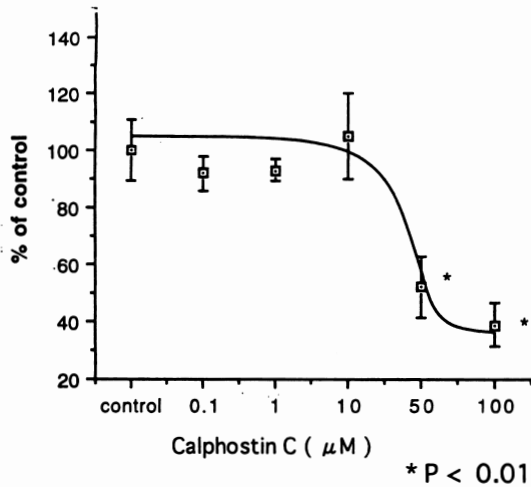


Fig. 1a Effects of calphostin C on thymidine incorporation of pig keratinocytes.

Skin squares were incubated with various concentrations of calphostin C for 6h. Data are expressed as % of the control (means \pm SE) from a typical experimental series. * = P < 0.01 compared with the control.

1b Reversible nature of the effect of calphostin C on thymidine incorporation of pig keratinocytes.

Control: Skin squares were incubated without calphostin C for 8h. 3 [H] dThd was added to the culture medium for the last 2h.

calphostin C 8h: Skin squares were incubated with calphostin C (50 µM) for 8h. 3 [H] dThd was added to the culture medium for the last 2h.

calphostin C 6h: Skin squares were incubated with calphostin C (50 µM) for 6h. Following this, the skin squares were washed in a fresh RPMI1640 medium and incubated with 3 [H] dThd in RPMI1640 medium in the absence of calphostin C for 2h.

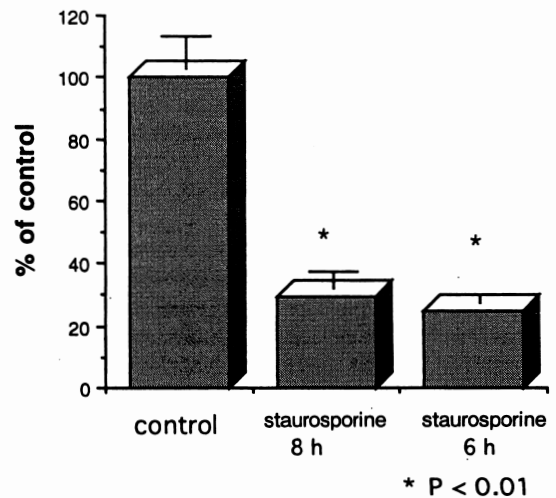
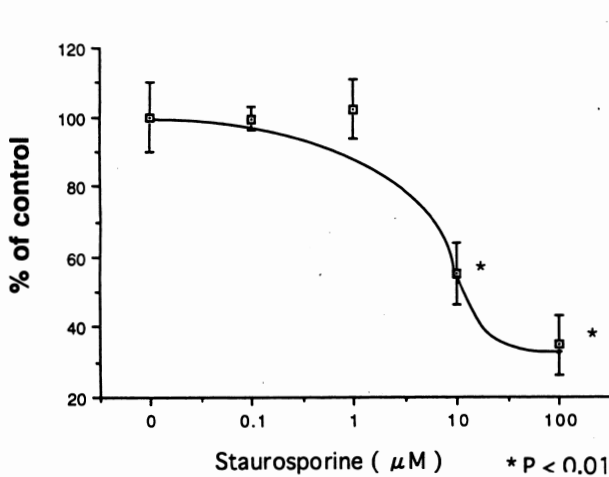


Fig. 2a Effects of staurosporine on thymidine incorporation of pig keratinocytes.

Skin squares were incubated with various concentrations of staurosporine for 6h. Data are expressed as % of the controls (means \pm SE) from a typical experimental series. * = P < 0.01 compared with the control.

2b Irreversible nature of the effects of staurosporine on thymidine incorporation of pig keratinocytes.

Table 1 Cell cycle distribution of pig keratinocytes after the incubation with PKC inhibitors.

	Control (n=4)	calphostin C (50 μ M)	staurosporine (10 μ M)
Go/1 (%)	73.4 \pm 1.0	80.9 \pm 0.8 *	72.7 \pm 1.5
S (%)	11.3 \pm 1.5	6.6 \pm 0.68 **	15.8 \pm 2.3
G2/M (%)	15.3 \pm 1.3	12.3 \pm 0.6	11.4 \pm 1.4

* = P < 0.01 compared with the control.

** = P < 0.05 compared with the control.

Table 2 Effects of PKC inhibitors on β -adrenergic adenylate cyclase responses.

	cAMP (pmoles/mgprotein)
Control (n=4)	39.9 \pm 1.79
Calphostin C treatment (n=4)	43.05 \pm 2.15
Staurosporine treatment (n=4)	54.61 \pm 3.95 **

Skin squares were incubated with 50 μ M calphostin C or 10 μ M staurosporine for 6h. Following the incubation, skin squares were incubated with 50 μ M epinephrine in the presence of 1mM IBMX for 10 min.

Data are expressed as cyclic AMP pmoles/mg protein \pm SE.

n=4 from a typical experimental series.

** = P < 0.05 compared with me control.

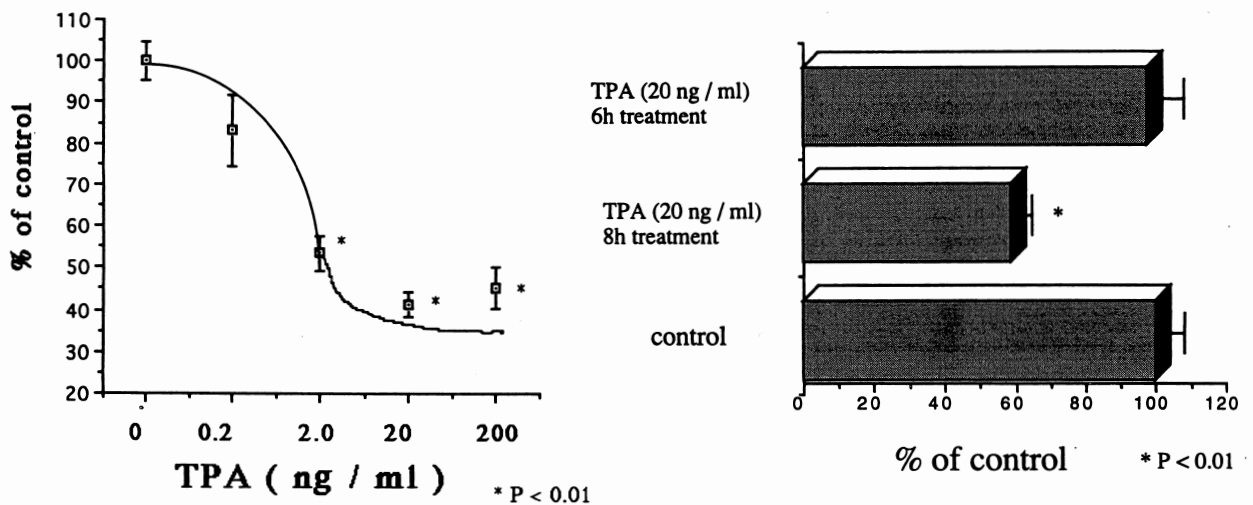


Fig. 3a Effects of TPA on thymidine incorporation of pig keratinocytes.

Skin squares were incubated with various concentrations of TPA for 6h.

Data are expressed as % of the controls (means \pm SE) from a typical experimental series.

* = P < 0.01 compared with the control.

3b Reversible nature of the effects of TPA on thymidine incorporation of pig keratinocytes.

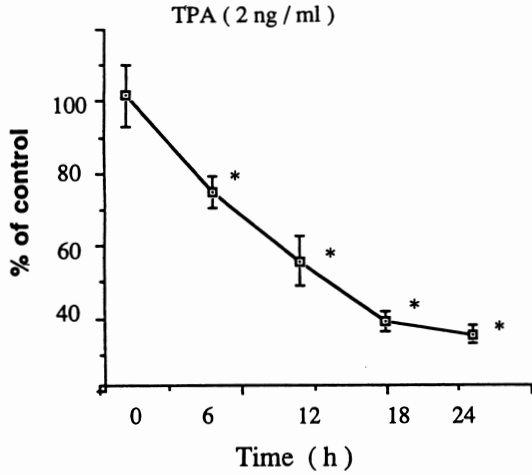


Fig. 4 Time course of the effect of TPA (2ng/ml) on thymidine incorporation of pig keratinocytes. Data are expressed as % of the controls (means \pm SE) from a typical experimental series. * = P < 0.01 compared with the control.

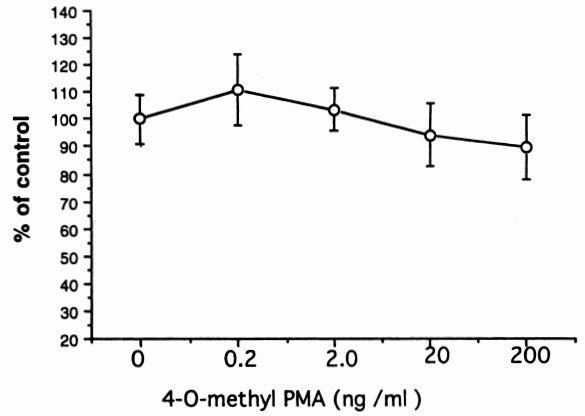


Fig. 6 Effects of 4-O-methyl-PMA on thymidine incorporation of pig keratinocytes. Skin squares were incubated with various concentrations of 4-O-methyl-PMA for 6h. Data are expressed as % of the controls (means \pm SE) from a typical experimental series.

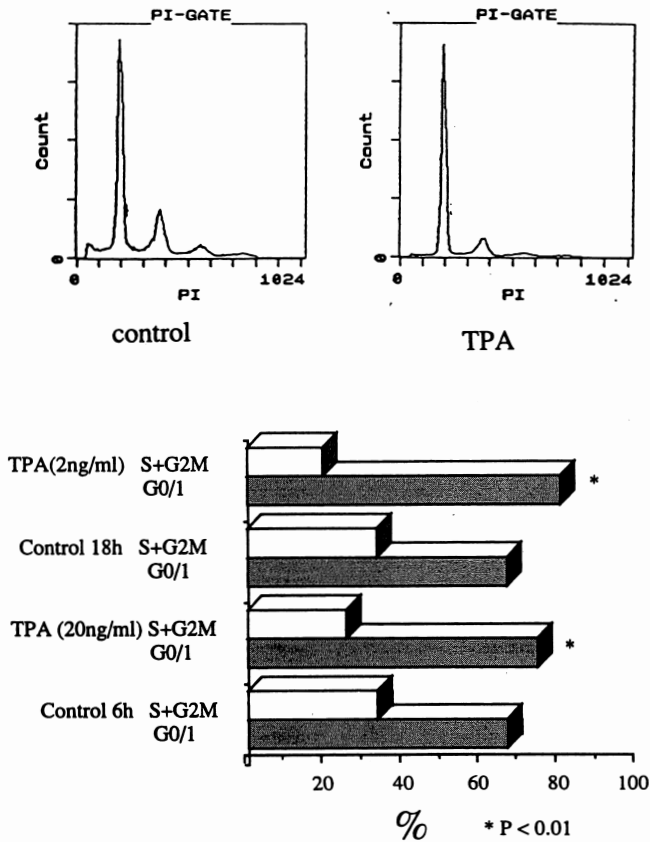


Fig. 5a DNA histograms after the incubation with TPA (20 ng/ml) for 6h.
5b Changes in the proportion of cells in G0/1 phase and S+G2/M phase following the incubation with TPA. * = P < 0.01 compared with the control.

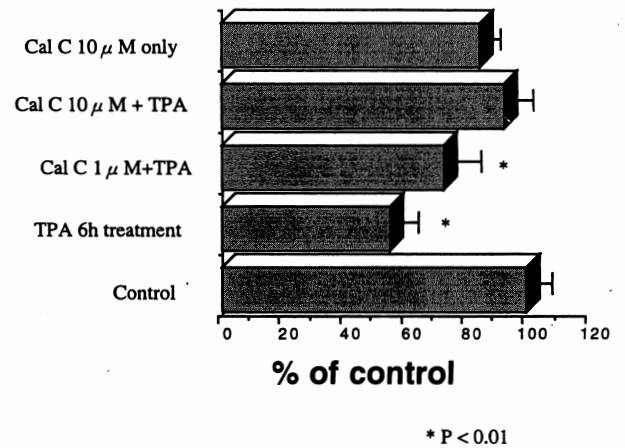


Fig. 7 Inhibition of the TPA effects by calphostin C. Pig skin squares were incubated with 1 or 10 μ M calphostin C and 20 ng/ml TPA for 6h. Data are expressed as % of the controls (mean \pm SE) from a typical experimental series. * = P < 0.01 compared with the control.

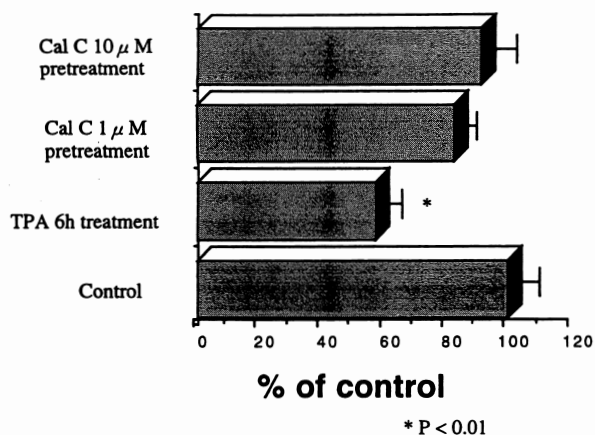


Fig. 8 Inhibition of the TPA effects by calphostin C. Following the preincubation with calphostin C (1 or 10 μ M) for 1h, skin squares were washed in a fresh RPMI1640 medium and incubated with TPA (20ng/ml) for 6h.

Data are expressed as % of the controls (means \pm SE) from a typical experimental series.

* = P < 0.01 compared with the control.

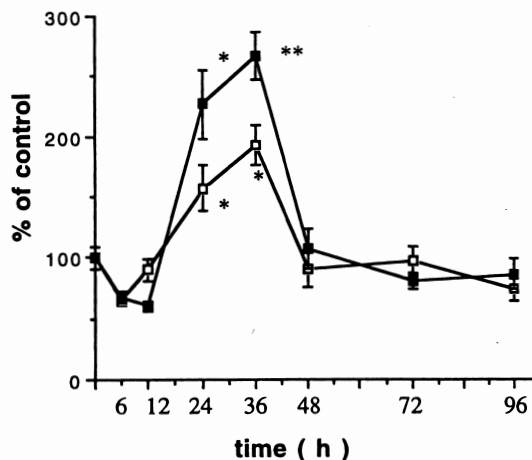


Fig. 9 Thymidine uptake of pig epidermis following a single application of TPA solution immediately after tape stripping. Data are expressed as % of control (non-stripped) value at each time point following the treatment (mean \pm SE of 5 independent experiments).

□—□, acetone after stripping.

■—■, TPA (166 ng/ml) solution after stripping.

* = P < 0.01 compared with the control (non-stripped).

** = P < 0.01 compared with tape stripping plus acetone-treated epidermis.

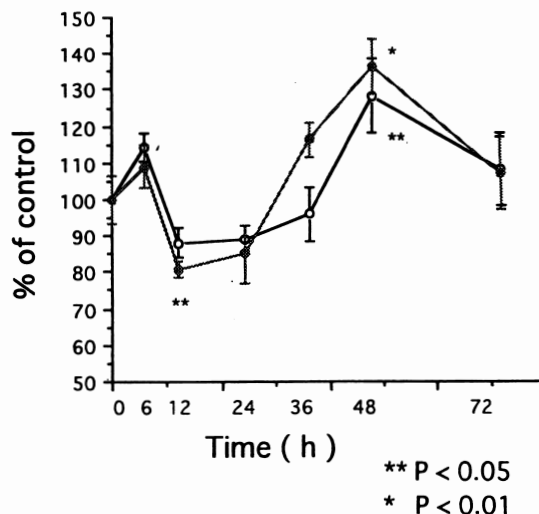
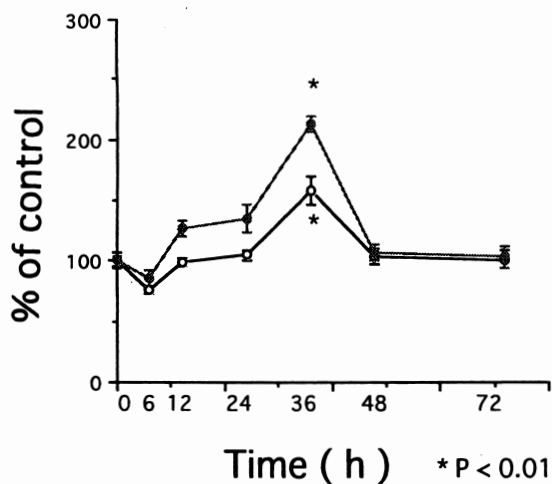


Fig. 10a Changes in the proportion of cells in S phase following a single application of TPA immediately after stripping.

10b Changes in the proportion of cells in G2/M phase following a single application of TPA immediately after stripping.

Data are expressed as % of control (non-stripped) value at each time point following the treatment (mean \pm SE of 5 independent experiments).

○—○, acetone after stripping.

●—●, TPA (166 ng/ml) solution after stripping.

* = P < 0.01 compared with the control.

** = P < 0.05 compared with the control.

に影響を示さない濃度 ($1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$) のカルフォスチン C の TPA の thymidine 取り込み抑制作用におよぼす影響を検討した。カルフォスチン C は $10\mu\text{M}$ の濃度で TPA (20ng/ml) による thymidine 取り込みの抑制を阻害した (Fig. 7)。Fig. 8 はカルフォスチン C を 1h 前処理後、TPA 20ng/ml で 6h 処理した時の thymidine 取り込みであるが、同様に TPA による抑制作用がほぼ完全に阻害された。

4. Tape stripping+TPA 1 回塗布後の細胞動態

in vivo において tape-stripping+TPA 1 回塗布した表皮は tape-stripping+アセトン塗布に比べ 36h で thymidine 取り込みの有意な亢進がみられた (Fig. 9)。DNA-FCM の継時的な変化では処理後 6h で tape-stripping により軽度の S 期低下がみられ、その後 12h からは stripping+TPA の方が S 期分画が増加し、36h では S 期分画のピークがみられた。72h 後ではアセトン、TPA 塗布部ともに対照より幾分高いのみで差はみられなかった (Fig. 10a)。G₂/M 期分画では tape-stripping+TPA 処理により 6h で軽度 G₂ block がみられ、その後上昇傾向に転じ、48h 後にピークがみられた (Fig. 10b)。

考 案

カルフォスチン C⁵⁾ は糸状菌から単離された多環キノン構造をもつ PKC 阻害剤である。特異性において従来の阻害剤より優れており、PKC に対する IC₅₀ 値は $0.05\mu\text{M}$ である一方、cAMP 依存性プロテインキナーゼや P60^{v-src}チロシンキナーゼを $50\mu\text{M}$ の濃度でも阻害しない。また従来の PKC inhibitor であるスタウロsporin や H-7 が他のプロテインキナーゼと相同な catalytic domain に作用するのに対して、カルフォスチン C は regulatory domain に作用するといわれている。今回の結果からカルフォスチン C は、 $50\mu\text{M}$ 以上の濃度で豚表皮細胞のサイミジン取り込みを抑制し、その作用は可逆的であり、単純な細胞毒性などによる非可逆的な変化を引き起こしたものではないと想定された。また FCM により、カルフォスチン C は $50\mu\text{M}$ 、6 時間処理で G₁ arrest をきたしており、作用点が G₁/S 移行期である可能性も示唆された。

表皮の PKC は現在 5 種類 (α , δ , ϵ , ζ , η) 存在する¹¹⁾ことが知られるが、その機能は同定されていない。表皮に比較的特異的に発現する PKC η ¹²⁾は顆粒層にみられ、分化と関連しているといわれる。表皮の細胞増殖を担う PKC の分子種に関しては、PKC α が従来から推定されているが¹³⁾、免疫組織学的な結果は必ずしもそ

れを支持するものではない¹⁴⁾。Hegemann ら¹⁵⁾は表皮細胞において古典的 PKC (α , β , γ) は Ca²⁺により誘導される分化 (角化) よりもむしろ増殖に関与している可能性を述べている。カルフォスチン C は $50\mu\text{M}$ の濃度で PKC α , β , γ を等しく阻害するという報告¹⁶⁾もあり、興味深い。

スタウロsporin は $10\mu\text{M}$ 以上で、豚表皮細胞のサイミジン取り込みを著明に抑制するが、その作用は非可逆的であった。スタウロsporin⁶⁾は正常線維芽細胞に対し、低濃度 ($0.01\mu\text{g/ml}$) では G₁ block、高濃度 ($0.1\mu\text{g/ml}$) では G₂ block を引き起こすことが知られているが、今回の我々の系の濃度では PKC 阻害作用も考えられるが、他の理由も考えられる。スタウロsporin による β アドレナリン反応性の増強に関しては、我々は過去に H-7 においても同様の結果¹⁷⁾²²⁾を得ている。スタウロsporin は実験系によっては逆に PKC agonist としての作用¹⁸⁾を示すことがあり、その作用の解釈には注意を要する。

TPA は我々の器官培養系では用量依存性にサイミジン取り込みを抑制し、その作用は可逆的であった。TPA の表皮細胞増殖に与える影響は実験条件により異なるが、我々の系のように血清非添加の培養系では、増殖抑制作用を示す報告⁴⁾が多い。FCM による結果では、TPA は豚表皮細胞に対し G₁ arrest をきたし、PKC の選択的阻害剤であるカルフォスチン C の作用と同様の挙動を示した。一方カルフォスチン C の前処理または同時添加によって、TPA による増殖抑制作用がほぼ完全に阻害された。カルフォスチン C は $1\mu\text{M}$ の濃度で、³H-ホルボールエステル 50nM と PKC の結合を完全に阻害するという報告⁵⁾も認められる。また我々の結果では PKC の活性化作用をもたないホルボールエステルである 4-O-メチル PMA が 20ng/ml 以上の濃度でも豚表皮細胞のサイミジン取り込みを抑制しなかった。これらの結果から、TPA の豚表皮細胞に対する増殖抑制作用は PKC が関与し、その作用点は G₁ または G₁/S 移行部である可能性が示唆された。PKC は活性化をうけた後、過剰反応を防ぐ生理機構として、down-regulation をうける。この反応のメカニズムとしては、表皮 PKC の場合はカルシウム依存性のカルパインによる分解であることが知られている。

しかし、カルフォスチン C をはじめとした PKC 阻害剤が PKC の down-regulation をも阻害するかどうかは不明である。

Bollag ら⁴⁾は血清非添加のマウス表皮細胞高増殖培養系において、TPA が用量依存性に、増殖を抑制し、

その作用が PKC 阻害剤である Ro31-7549 によって阻害されることを報告しており, 表皮細胞の分化(角化)に際し増殖能の低下には PKC が関与していると推定している。また最近, マウス表皮細胞培養系で, カルシウム依存性の分化(角化)には, PKC δ , ϵ , ζ , η に比較して, PKC α の specific な down-regulation が最も重要であることが報告¹⁹⁾されている。

Tape stripping⁷⁾という in vivo における一種の創傷治癒の系では TPA 塗布群は基剤のアセトン塗布群に比べて, 一過性の増殖亢進(サイミジン取込み, FCM の S 期分画増加)を示した。in vivo の TPA 処理では, Langerhans cell, 線維芽細胞, 好中球などがサイトカインをはじめとした炎症産物を生成することが知られ, これらが表皮ケラチノサイトの増殖をもたらしていると考えられる。我々の系では TPA は 1 回のみ処置であり, PKC の直接的関与は不明である。しかし, TPA を繰り返し処理することにより PKC の down-regulation が引き起こされることが知られており²⁰⁾, 表皮細胞増殖亢進を特徴とする尋常性乾癬においても PKC 活性の低下が報告されている^{21,22)}。我々は豚表皮細胞において TPA シグナルと乾癬の病態の類似性を報告^{23,24)}しており, 臨床的に抗乾癬効果のある cyclosporine A²⁵⁾, anthralin²⁶⁾, PUVA 療法²⁷⁾などは PKC 活性を阻害することが知られている。今後カルフォスチン C をはじめとした選択性の高い PKC 阻害剤は, 乾癬をはじめとした表皮増殖性疾患の病態における PKC の役割解明や治療薬として役立つ可能性があると考えた。

文 献

- 1) Argyris TS: Epidermal growth following a single application of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in mice. *Am J Pathol* **98**: 637-648, 1980
- 2) Yuspa SH, Ben T, Hennings H et al: Phorbol ester tumor promoters induce epidermal transglutaminase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **97**: 700-708, 1980
- 3) Reiners JJ, Jr., Slaga TJ: Effects of tumor promoters on the rate and commitment to terminal differentiation of subpopulations of murine keratinocytes. *Cell* **32**: 247-255, 1983
- 4) Bollag WB, Ducote J, Harman CS: Effects of the selective protein kinase C inhibitor, Ro31-7549, on the proliferation of cultured mouse epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **100**: 240-246, 1993
- 5) Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M et al: Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, in a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **159**: 548-553,

- 1989
- 6) Abe K, Yoshida M, Usui T et al: Highly synchronous culture of fibroblasts from G2 block caused by staurosporine, a potent inhibitor of protein kinases. *Exp Cell Res* **192**: 122-127, 1991
- 7) Hashimoto Y, Tsutsui M, Iizuka H: Flow cytometric analysis of pig epidermal keratinocytes: effects of tape stripping. *J Dermatol Sci* **4**: 193-201, 1992
- 8) Taylor JR, Halprin KM, Levine V: Inhibitors of epidermal cell DNA synthesis in surviving pig skin in vitro. *J Invest Dermatol* **74**: 125-130, 1980
- 9) Pinkus H: Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. I. Observation on the thickness of the horny layer and mitotic activity after stripping. *J Invest Dermatol* **16**: 383-386, 1951
- 10) Yoshikawa K, Adachi K, Halprin KM et al: The effects of catecholamine and related compounds on the adenylate cyclase system in the epidermis. *Br J Dermatol* **93**: 29-36, 1975
- 11) Dlugosz AA, Mischak H, Mushinski JF et al: Transcripts encoding protein kinase C alpha, delta, epsilon, zeta and eta are expressed in basal and differentiating mouse keratinocytes in vitro and exhibit quantitative changes in neoplastic cells. *Mol Carcinog* **5**: 286-292, 1992
- 12) Koizumi H, Ohkawara A, Kuroki T: Immunohistochemical demonstration of novel protein kinase C η in normal human skin and skin diseases. *J Dermatol Sci* **4**: 123, 1992
- 13) Eldar H, Zisman Y, Ullrich A et al: Overexpression of protein kinase C α -subtype in Swiss/3T3 fibroblasts cause loss of both high and low affinity receptor number for epidermal growth factor. *J Biol Chem* **265**: 13290-13296, 1990
- 14) Inohara S, Tatsumi Y, Tanaka H et al: Immunohistochemical identification of protein kinase C isoenzymes in normal and psoriatic epidermis. *Arch Dermatol Res* **280**: 454-455, 1988
- 15) Hegemann L, Kempenaar J, Ponc M: The involvement of protein kinase C in proliferation and differentiation of human keratinocytes: an investigation using inhibitors of protein kinase C. *Arch Dermatol Res* **286**: 278-284, 1994
- 16) Tamaoki T, Nakano H: Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Biotechnology* **8**: 732-735, 1990
- 17) Iizuka H, Sakai H, Kinouchi M: Epidermal adenylate cyclase system is regulated by diacylglycerol-protein kinase C signal, but not by calcium signal. *Br J Dermatol* **122**: 459-467, 1990
- 18) Dlugosz AJ, Yuspa H: Staurosporine induces protein kinase C agonist effects and maturation of normal and neoplastic mouse keratinocytes in vitro. *Cancer Res* **51**: 4677-4684, 1991

- 19) Denning MF, Dlugosz AA, Williams EK et al : Specific protein kinase C isoenzymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth & Differentiation* **6** : 149-157, 1995
- 20) Hansen LA, Monterio-Riviere NA, Smart RC : Differential down-regulation of epidermal protein kinase C by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and diacylglycerol: association with epidermal hyperplasia and tumor promotion. *Cancer Res* **50** : 5740-5745, 1990
- 21) Horn F, Marks F, Fisher GJ et al : Decreased protein kinase C activity in psoriatic versus normal epidermis. *J Invest Dermatol* **88** : 220-222, 1987
- 22) Fisher GJ, Harris VA, Voorhees JJ : Purification and characterization of calcium/phospholipid-dependent kinase from adult human epidermis. *J Invest Dermatol* **89** : 484-488, 1990
- 23) Iizuka H, Sakai H, Tamura T : Effects of the tumor promoter, phorbol 12-myristate, 13-acetate, on the epidermal adenylate cyclase system: evidence for adenylate cyclase-regulation by protein kinase C. *J Invest Dermatol* **93** : 387-391, 1989
- 24) Iizuka H, Takahashi H : Psoriasis, involucrin, and protein kinase C. *Int J Dermatol* **32** : 333-338, 1993
- 25) Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin GG et al : Cyclosporine A inhibits protein kinase C: a contributing mechanism in the development of nephrotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **160** : 409-415, 1989
- 26) Hegemann L, Bonnekoh B, Fruchtmann R et al : Evidence that the antipsoriatic drug anthralin acts by inhibition of protein kinase C. *Skin Pharmacol* **3** : 196, 1990
- 27) Ma W, Laskin JD : Inhibition of protein kinase C activity by photoactivated psoralens. *J Invest Dermatol* **94** : 552, 1990