

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10081

研究課題名(和文) 皮膚2段階発がん実験で見出された、PP6欠損によるがん体質化の意義

研究課題名(英文) PP6 as a tumor suppressor in mouse two-stage chemical carcinogenesis

研究代表者

角川 陽一郎 (KAKUGAWA, Yoichiro)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん薬物療法研究部・特任研究員

研究者番号：60221173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、以前、PP6機能不全状態は、DMBAによりイニシエートされた細胞が腫瘍を形成しやすい状態にあることを明らかにした。本研究では、紫外線ではどうなのかを検討した。マウスの重層扁平上皮特異的に、Ppp6c遺伝子を欠損させたマウスを用いて、週3回UVB照射(2KJ/m)を40週行った。その結果、野生型では、腫瘍形成が認められなかったが、Ppp6c遺伝子欠損皮膚をもつマウスでは、その殆どで扁平上皮がんが発生した。このメカニズムとして、Ppp6c遺伝子欠損ケラチノサイトではDNA修復に異常があり、UVB照射によるDNA損傷の修復ができないことが腫瘍発生の原因の1つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recently, to determine whether PP6 deficiency functions in carcinogenesis in vivo, we employed a mouse skin 2-stage carcinogenesis model. We found that a single DMBA application was sufficient to produce papillomas in Ppp6c-deficient skin. As such, ours was the first report that Ppp6c loss-of-function acts as a tumor promoter in mice. Here, we investigated effect of UVB radiation on mouse keratinocytes in which Ppp6c had been deleted. Following UVB irradiation, mice with Ppp6c-deficient keratinocytes showed a higher incidence of skin squamous cell carcinoma than did control mice. We concluded that Ppp6c loss-of-function in mouse skin showed hypersensitivity to UVB-induced squamous cell carcinoma. Our histochemical analyses suggest that Ppp6c deficiency underlies molecular events that drive outgrowth of initiated keratinocytes harboring UVB-induced mutated p53.

研究分野：医歯薬学

キーワード：紫外線発がん プロテインホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

(1)PP6 と DNA 修復、ゲノム・染色体の安定性制御

申請者らは、PP6 の発がんへの関与を明らかにする目的で、PP6 と結合するタンパクのスクリーニングを行い、中心体のタンパク、CP110 を同定した (未発表)。そこで PP6 のノックダウンを行い、中心体の数や分離異常が起こることを確認したことから (未発表) PP6 は中心体の機能制御に必須と考えた。

数年前、海外の研究者により、PP6 ノックダウンで、2 重鎖切断 (DSB) の誘発が起こることが報告された。我々はその詳細を検討している。PP6 が、DNA-PK および BRCA1 を介して DSB の修復にも関与する結果を得ている (未発表)。

(2)PP6 とがんシグナル伝達との関係

我々は、で、DMBA により惹起された炎症反応が、PP6 欠損組織では著しく増強すること。また、その原因として、NFκB シグナルの増強が考えられることを明らかとしたが、基質などその詳細はまだ不明である。

Krauthammer M らは、malignant melanoma において、PP6 の変異は、ras または B-raf のがんシグナルを、さらにドライブするという仮説を提唱している (Cell 2012)。最近我々が作製した 2 重変異 (PP6 欠損と K-ras 変異) マウスの形質は、現時点で、本仮説を強くサポートしている。

2. 研究の目的

これまでの、申請者らの研究により、PP6 活性の破綻が発がん原因になり得る事を示した。本研究により、このメカニズムの解明を行い、PP6 を標的とした治療開発に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

PP6 KO マウスを用いて以下の発がん実験を行った。

(1)UV による皮膚がん

Ppp6c 遺伝子を欠損させた後、紫外線照射 (312nm, 0.3J/cm², 隔日, 50 週) を行い、紫外線発がんの有無を調べた。

(2)K-ras G12D による肺がん

重層扁平上皮特異的に、4HT 投与により、コンディショナルに *Ppp6c* 遺伝子が欠損しかつ K-rasG12D が発現するシステムを用いた。Ade-Cre を吸入させて、肺特異的に、同時に K-rasG12D 発現と *Ppp6c* 欠損を誘導し、肺が

ん発生への影響を調べた。

4. 研究成果

(1)紫外線による皮膚がん

UV 照射による短期での影響

重層扁平上皮特異的に、*Ppp6c* 遺伝子を欠損させて、UVB を一回、2KJ/m² の強さで照射した。その結果、野生型に較べて、72 時間以内の p53 および p21 の集積が、著しく高くなることを見出した。この事より、*Ppp6c* 遺伝子欠損皮膚においては、細胞死が促進されることが示唆された。

UV 照射による短期での影響

重層扁平上皮特異的に、*Ppp6c* 遺伝子を欠損させ、40 週にわたって、週に 3 回 UVB (2KJ/m²) 照射を行った。40 週において、野生型では腫瘍発生は見なかったが、*Ppp6c* 遺伝子欠損皮膚においては、高頻度に、扁平上皮がんの発生があった。

表は、*Ppp6c* 遺伝子を欠損させた 14 匹のマウスに生じた腫瘍を示す。11 匹のマウスにおいて、腫瘍が生じてその全てが扁平上皮がんであった。腫瘍において、H2AX 陽性と p53 陽性 (変異型 p53 陽性) が共局在していた。この事は、*Ppp6c* 欠損皮膚における UV 発癌では、DNA の修復異常を伴うことが示唆された。

mouse ID	tumor	tumor No.	Histology	γH2AX	p53
1	2	1-1	SCC	+	+
		1-2	SCC	+	+
2	1	2	SCC	-	+
3	0				
4	1	4	SCC	++	+
5	1	5	SCC	-	-
6	1	6	SCC	-	-
7	0				
8	1	8	SCC	+	++
9	2	9-1	SCC	++	++
		9-2	SCC	++	+
10	2	10-1	SCC	-	-
		10-2	SCC	+	-
11	2	11-1	SCC	-	-
		11-2	SCC	++	++
12	0				
13	1	13	SCC	-	-
		14-1	SCC	++	+
14	3	14-2	SCC	++	++
		14-3	SCC	-	-

(2)K-ras G12D による肺がん

PPP6c^{flox/flox};LSL K-ras^{G12D} のマウスの作製に成功した。このマウスの皮膚を切開し、気管を露出させ、Ade-Cre ウイルス液 (1 × 10⁹ PFU/5 μl) を実態顕微鏡下にマイクロシリンジで、気管内に注入した。注入後 11 週で、腫瘍の発生を調べた。LSL *K-ras^{G12D}* のマウスと、*PPP6c^{flox/flox};LSL K-ras^{G12D}* のマウスの肺の最大断面での腫瘍発生を検討した。

両者の間で、腫瘍発生の頻度と腫瘍の大きさに大きな差が認められなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13件)

1. Kurosawa K, Inoue Y, Kakugawa Y, Yamashita Y, Kanazawa K, Kishimoto K, Nomura M, Momoi Y, Sato I, Chiba N, Suzuki M, Ogoh H, Yamada H, Miura K, Watanabe T, Tanuma N, Tachi M, and Shima H.

Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-ras^{G12D}-driven tumor promotion.

Cancer Science in press 査読有

2. Minami Y, Kanemura S, Oikawa T, Suzuki S, Hasegawa Y, Miura K, Nishino Y, Kakugawa Y, Fujiya T.

Associations of cigarette smoking and alcohol drinking with stomach cancer survival: A prospective patient cohort study in Japan.

Int J Cancer. 2018. 査読有

doi: 10.1002/ijc.31408.

3. Yamaguchi S, Takahashi S, Mogushi K, Izumi Y, Nozaki Y, Nomizu T, Kakugawa Y, Ishida T, Ohuchi N, Ishioka C, Kato S.

Molecular and clinical features of the TP53 signature gene expression profile in early-stage breast cancer.

Oncotarget. 9(18):14193-14206, 2018.

査読有

doi:10.18632/oncotarget.24447.

4. Takizawa Y, Kawai M, Kakugawa Y, Nishino Y, Ohuchi N, Minami Y.

Alcohol Consumption and Breast Cancer Risk According to Hormone Receptor Status in Japanese Women: A Case-Control Study.

Tohoku J Exp Med. 244(1):63-73, 2018.

査読有

doi: 10.1620/tjem.244.63.

5. Gonda K, Watanabe M, Tada H, Miyashita M, Takahashi-Aoyama Y, Kamei T, Ishida T, Usami S, Hirakawa H, Kakugawa Y, Hamanaka Y, Yoshida R, Furuta A, Okada H, Goda H, Negishi H, Takanashi K, Takahashi M, Ozaki Y, Yoshihara Y, Nakano Y, Ohuchi N.

Quantitative diagnostic imaging of cancer tissues by using phosphor-integrated dots with ultra-high brightness.

Sci Rep.7(1):7509, 2017. 査読有

doi: 10.1038/s41598-017-06534-z.

6. Miyashita M, Tada H, Suzuki A, Watanabe G, Hirakawa H, Amari M, Kakugawa Y, Kawai M, Furuta A, Sato K, Yoshida R, Ebata A, Sasano H, Jingu K, Ohuchi N, Ishida T.

Minimal impact of postmastectomy radiation therapy on locoregional recurrence for breast cancer patients with 1 to 3 positive lymph nodes in the modern treatment era.

Surg Oncol. 26(2):163-170, 2017. 査読有

doi: 10.1016/j.suronc.2017.03.003.

7. Miura K, Shima H, Takebe N, Rhie J, Satoh K, Kakugawa Y, Satoh M, Kinouchi M, Yamamoto K, Hasegawa Y, Kawai M, Kanazawa K, Fujiya T, Unno M, Katakura R.

Drug delivery of oral anti-cancer fluoropyrimidine agents.

Expert Opin Drug Deliv.

14(12):1355-1366,2017. 査読有

doi: 10.1080/17425247.2017.1316260.

8. Kakugawa Y, Tada H, Kawai M, Suzuki T, Nishino Y, Kanemura S, Ishida T, Ohuchi N, Minami Y.

Associations of obesity and physical activity with serum and intratumoral sex steroid hormone levels among postmenopausal women with breast cancer: analysis of paired serum and tumor tissue samples.

Breast Cancer Res Treat.

162(1):115-125,2017. 査読有

doi: 10.1007/s10549-016-4094-3.

9. Kato H, Kurosawa K, Inoue Y, Tanuma N, Momoi Y, Hayashi K, Ogoh H, Nomura M, Sakayori M, Kakugawa Y, Yamashita Y, Miura K, Maemondo M, Katakura R, Ito S, Sato M, Sato I, Chiba N, Watanabe T, Shima H.

Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis.

Cancer Lett. 365(2):223-8,2015. 査読有

doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.022.

10. Kakugawa Y, Kawai M, Nishino Y, Fukamachi K, Ishida T, Ohuchi N, Minami Y.

Smoking and survival after breast cancer diagnosis in Japanese women: A prospective cohort study.

Cancer Sci.106(8):1066-74,2015. 査読有

doi: 10.1111/cas.12716.

11. Takagi K, Miki Y, Nakamura Y, Hirakawa H, Kakugawa Y, Amano G, Watanabe M, Ishida T, Sasano H, Suzuki T.

Immunolocalization of thymidylate

synthase as a favorable prognostic marker

in estrogen receptor-positive breast carcinoma.
Histol Histopathol.30(10):1223-32,2015.
査読有 doi: 10.14670/HH-11-619.

12. Minami Y, Hosokawa T, Nakaya N, Sugawara Y, Nishino Y, Kakugawa Y, Fukao A, Tsuji I.
Personality and breast cancer risk and survival: the Miyagi cohort study.
Breast Cancer Res Treat. 2015. 査読有
doi: 10.1007/s10549-015-3364-9.

13. Miura K, Satoh M, Kinouchi M, Yamamoto K, Hasegawa Y, Kakugawa Y, Kawai M, Uchimi K, Aizawa H, Ohnuma S, Kajiwara T, Sakurai H, Fujiya T.
The use of natural products in colorectal cancer drug discovery.
Expert Opin Drug Discov.
10(4):411-26,2015. 査読有
doi: 10.1517/17460441.2015.1018174.

〔学会発表〕(計 6件)

1. 角川陽一郎、西野善一、吉田薫、辻一郎、南優子
パーソナリティと乳がん罹患・死亡リスクとの関連
第24回日本乳癌学会総会
2016.6.17(東京都)

2. 河合賢朗、角川陽一郎、五安城菜由子、安田有理、佐藤馨、古田昭彦
自己記入式質問紙調査による遺伝性乳がん卵巣がん症候群の拾い上げの現状と課題
第24回日本乳癌学会総会
2016.6.17(東京都)

3. 黒沢是之、田沼延公、角川陽一郎、山下洋二、三浦康、山田秀和、佐藤郁郎、野村美有樹、渡邊利雄、島礼
新規皮膚がん抑制遺伝子 Ppp6c 変異は、変異型 K-RAS による腫瘍発生を強く促進する
第75回日本癌学会学術総会
2016.10.6-8(神奈川県・横浜市)

4. 加藤浩之、田沼延公、三浦康、角川陽一郎、椎葉健一、山下洋二、林克剛、野村美有樹、佐藤郁郎、伊藤しげみ、渡邊利雄、島礼
皮膚 Ppp6c 欠損マウスは、UVB 誘導皮膚扁平上皮発がんを高感受性となる
第74回日本癌学会学術総会
2015.10.8-10(名古屋)

5. 三浦康、島礼、佐藤賢一、山口壹範、田沼延公、角川陽一郎、佐藤正幸、木内誠、山本久仁治、長谷川康弘、河合賢朗、大沼忍、藤谷恒明
大腸癌における天然物を用いた抗がん剤開発の現況

第74回日本癌学会学術総会
2015.10.8-10(名古屋)

6. 角川陽一郎、河合賢朗、西野善一、南優子
乳癌組織中ホルモン濃度と肥満度、運動習慣、飲酒との関連
第23回日本乳癌学会総会
2015.7.2-4(東京都千代田区)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
角川 陽一郎(KAKUGAWA, Yoichiro)
地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん薬物療法研究部・特任研究員
研究者番号：60221173

(2)研究分担者
島 礼(SHIMA, Hiroshi)
地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん薬物療法研究部・部長
研究者番号：10196462

佐藤 郁郎(SATO, Ikuro)
地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・ティッシュバンクセンター・センター長
研究者番号：50225918