

令和元年6月25日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10774

研究課題名(和文) 脳腫瘍の進展・予後に密接に関連するプロテインホスファターゼの同定

研究課題名(英文) Identification of a protein phosphatase which involved in brain tumororigenesis.

研究代表者

山下 洋二 (Yamashita, Yoji)

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：30420045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマにおいて、PTPzetaの3つのアイソタイプのmRNAレベルが異状亢進していることを見出した。一方で、がん幹細胞のマーカーSox2のmRNA発現との相関も認められた。siRNAによるSox2ノックダウンによって、PTPzeta mRNA発現が抑制された。またPTPzetaのプロモーター領域へのSox2結合が確認された。以上、悪性グリオーマにおいてSox2がPTPzetaの発現を制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの発生原因として幾つかのプロテインキナーゼがその原因となっていることが明らかとなってきた。一方で、拮抗する機能をもつホスファターゼに関しては研究が遅れていた。本研究により我々は、悪性グリオーマの治療開発のための新たな分子標的を同定する目的で、プロテインホスファターゼ遺伝子の発現異常の有無をスクリーニングし、発現量が顕著に上昇している分子の一つとしてPTPzetaを同定した。悪性グリオーマの新しい診断・治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Ptpz/Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is preferentially in neuronal and glial cells in the central nervous system as a major chondroitin sulfate proteoglycan, but its role in gliomagenesis remains obscure. In this study, expression of Ptpz mRNA was up-regulated in glioma when compared to normal brain. We found that the levels of Ptpz mRNA in specimens are correlated with those of Sox-2, a transcription factor associating with glioma stemness. Knock-down of Sox-2 by siRNA decreased Ptpz mRNA of several glioma cell lines. ChIP analysis showed the physical association of Sox-2 to the putative promoter region of Ptpz gene, suggesting that Ptpz is a direct transcriptional target of Sox-2. Up-regulation of Ptpz expression may be a part of transcriptional program elicited by Sox-2, which may contribute to glioma stemness.

研究分野：がん幹細胞、脳腫瘍

キーワード：プロテインホスファターゼ 悪性グリオーマ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

がんの基礎研究において、EGFRをはじめとするプロテインキナーゼファミリーを中心に解析が進められ、拮抗するプロテインホスファターゼに関しては研究が遅れていたが、ヒトゲノムにおける100を越えるプロテインホスファターゼの分子生物学的解析により、それらの生理的な機能の解明が進んできた。最近では、いくつかのがんにおいて、その発生にプロテインホスファターゼが関与することを示す知見が報告されている。我々は、悪性グリオーマ治療の新たな分子標的を同定する目的で、悪性グリオーマの手術摘出検体(10件)におけるプロテインホスファターゼファミリー(80種類)に属する遺伝子の発現異常の有無をリアルタイムPCRの手法を用いてスクリーニングし、その中で発現量が顕著に上昇しているものの一つとしてPTPzetaを同定した。

#### 2. 研究の目的

PTPRZには、エクソン12のスプライシングの違いで、3つのスプライシングバリエント(PTPRZ-A PTPRZ-B、およびPTPRZ-S)がある。グリオーマの腫瘍原性に対するPTPRZ3種類のアイソタイプの関与を明らかにしたいと考えた。

#### 3. 研究の方法

(1)手術検体(90サンプル)を用いて、PTPRZ-A PTPRZ-B、およびPTPRZ-SのmRNAレベルを測定。患者の血清における3つのアイソタイプの測定。

(2)悪性グリオーマの細胞株において、PTPRZの発現の高い細胞株を選び、PTPRZのノックダウンの形質を調べる。

(3)PTPRZの発現を制御する因子を解析する。

#### 4. 研究成果

手術検体(90サンプル)に関して、PTPRZ-A PTPRZ-B、およびPTPRZ-Sをそれぞれ特異的に同定するプライマーを用いて各mRNAの発現を調べた。3種類のアイソタイプ共に高発現をしていることが分かった。PTPRZが診断のマーカーになる可能性を考えられたので、血清に存在するPTPRZ-Sに関して、正常人と患者において、血清中のPTPRZ-Sの量をウエスタンブロットで調べた。しかし、PTPRZ-Sが患者で優位に増加していることはなかった。

手術検体(90サンプル)において、PTPRZ-A PTPRZ-B、およびPTPRZ-SのmRNAレベルの発現と、幹細胞マーカーNestin、CD133、Sox2発現との相関を調べた。特に、Sox2とPTPRZの発現が顕著に高い相関を示すことがわかった。悪性グリオーマの細胞株におけるPTPRZの発現を解析し、特にU251MGとU373MGにおいて3種類のPTPRZアイソタイプおよびSox2が高発現していることがわかった。U251MGとU373MGにSox2のsiRNAをトランスフェクトした。Sox2のノックダウンが確認され、PTPRZの3つのアイソタイプのmRNAが著しく減少した。

Sox2が、PTPRZの発現を直接制御している可能性を検討するために、ChIP解析を行った。ホルマリンで固定したU251MGとU373MGから抽出した細胞液に抗Sox2抗体を免疫沈降させ、その複合体にPTPRZプロモーターが存在するかどうかを検討した。その結果、Sox2が直接PTPRZプロモーターに結合することが分かった。

悪性グリオーマ患者由来のがん幹細胞、および細胞株(U251MGとU373MG)に対して、レンチウイルスにてSox2をノックダウンし、腫瘍原性に影響を与えるかどうかを試みた。Sigma-Aldrichから購入したレンチウイルスで、PTPRZ-A PTPRZ-B、およびPTPRZ-Sをノックダウン可能なもの2種類を用いて行ったが、ピューロマイシン選択にて生存クローンを得ることができなかった。

以上、悪性グリオーマにおいて、Sox2の標的としてPTPRZがあることがわかった。PTPRZのホスファターゼ活性が、悪性化あるいはstemnessの制御に関与することが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

Koreyuki Kurosawa, Yui Inoue, Yoichiro Kakugawa, Yoji Yamashita, Kosuke Kanazawa, Kazuhiro Kishimoto, Miyuki Nomura, Yuki Momoi, Ikuro Sato, Natsuko Chiba, Mai Suzuki, Honami Ogoh, Hidekazu Yamada, Koh Miura, Toshio Watanabe, Nobuhiro Tanuma, Masahiro Tachi, and Hiroshi Shima: Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-rasG12D-driven tumor promotion. *Cancer Science*,109(7):2178-2187.2018. doi: 10.1111/cas.13638. 査読有

Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama KI, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M and Tanuma N: PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth. *Cancer cell*, 33(3):355-367.2018. 査読有

Takahashi K, Proshin S Yamaguchi K, Yamashita Y, Katakura R, Yamamoto K, Shima H, Hosono M, Miyagi T : Sialidase NEU3 defines invasive potential of human glioblastoma cells by regulating calpain-mediated proteolysis of focal adhesion proteins. Biochim Biophys Acta Gen Subj.1861:2778-2788.2017. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.07.023. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

黒沢是之、野村美有樹、角川陽一郎、山下洋二、三浦康、山田秀和、松浦一登、佐藤郁郎、田沼延公、渡邊利雄、島礼、Ppp6c は、マウス皮膚のがん抑制遺伝子として働く、第 76 回日本癌学会学術総会、2017.9.28-30(横浜)

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 (横浜)

田中遼太、渡邊利雄、山下洋二、三浦康、佐藤郁郎、島礼、田沼延公、PKM ノックアウトマウスは胎生致死となる、第 75 回日本癌学会学術総会、2016.10.6-8 (横浜)

田中遼太、小河穂波、井上維、山下洋二、三浦康、河合賢郎、佐藤郁郎、渡邊利雄、島礼、田沼延公、Pyruvate kinase M の両 isoform を欠損するマウスの解析、第 89 回日本生化学会大会、2016.9.25-27 (仙台)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：島 礼

ローマ字氏名：SHIMA , Hiroshi

所属研究機関名：宮城県立がんセンター(研究所)

部局名：がん薬物療法研究部

職名：部長

研究者番号(8桁): 10196462

研究分担者氏名：佐藤 郁郎

ローマ字氏名：SATO , Ikuro

所属研究機関名：宮城県立がんセンター(研究所)

部局名：ティッシュバンクセンター

職名：部長

研究者番号(8桁): 50225918

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。