

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15714

研究課題名(和文)新規がん抑制遺伝子の機能不全による卵巣がんの発生機序 治療への応用

研究課題名(英文)Insufficiency of a novel anti-oncogene and mouse ovarian tumorigenesis

研究代表者

山田 秀和 (YAMADA, Hidekazu)

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：10254012

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文): BRCA1は、卵巣がんや乳がんに関連するがん抑制遺伝子である。その機能はリン酸化によって制御されているが、その詳細は不明である。我々は、これまでの研究より、PP6の機能不全が、BRCA1の異常過剰リン酸化をおこし、卵巣がんの発症原因になるとの仮説を持っていた。その証明のために、マウスの卵巣腫瘍に変異型KRASとPpp6c欠損という2重変異を導入する系を用いて実験を行った。卵巣表層上皮細胞に、変異型KRAS発現を誘導させたマウスと、2重変異(変異型KRASとPpp6c欠損)を誘導させたマウスにおいて、腫瘍形成を比較した。しかし、誘導後7か月後では、両者共に腫瘍発生は認めなかった。

研究成果の概要(英文): In order to address the function of protein phosphatase 6 (PP6) loss on K-ras-initiated tumorigenesis in ovary. To do so, we developed tamoxifen-inducible K-rasG12D-expressing mice and double mutant (K-rasG12D-expressing and Ppp6c-deficient) mice in which K-rasG12D expression is driven by the cytokeratin 14 (K14) promoter. Using 8week old and 12 weeks old female mice, intrabursal injection of an adenovirus-Cre construct was conducted. Eight month after the induction, mice were dissected and ovary was examined. Both K-rasG12D-expressing mice and doubly-mutant mice showed no tumors in the ovary. The results showed that K-rasG12D expression using this system is not sufficient to develop ovarian tumors in mice.

研究分野：医歯薬学

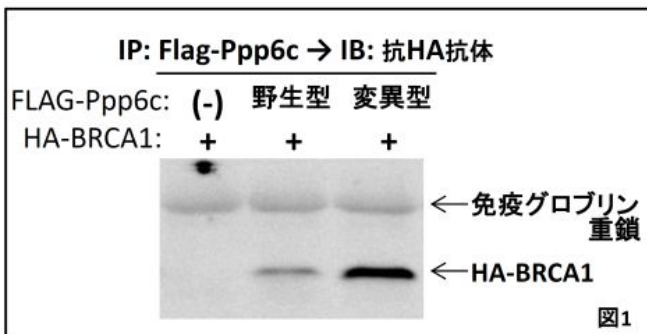
キーワード：卵巣がん プロテインホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

(1)BRCA1 と結合する脱リン酸化酵素(PP6)の同定

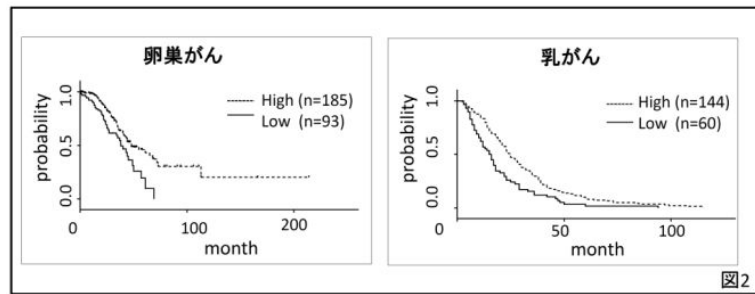
BRCA1 は、卵巣がんや乳がんに関連するがん抑制遺伝子である。BRCA1 は、DNA 修復タンパク群を束ねて DNA 2 重鎖切断の修復に働くと考えられる。その機能はリン酸化によって制御されているが、その詳細は不明である。

申請者らは、BRCA1 のリン酸化による制御を明らかにすることを目的として、結合タンパクの同定を開始した。その結果、Ppp6c の免疫複合体の中に、BRCA1 が存在することを見出した(図1)。さらに脱リン酸化活性を持たない変異型 Ppp6c はより強く結合することを見いだした。これは、PP6 が BRCA1 の脱リン酸化を制御しているため、PP6 の異常により BRCA1 が異常過剰リン酸化状態になる可能性をしめしている。そこで、PP6 は卵巣がんや乳がんの発症に重要な酵素である可能性を考え、PP6 による BRCA1 の制御の破綻が腫瘍発症の原因になるとの仮説を持った。



(2) Ppp6c 発現低下と卵巣がんの予後不良 (Prognoscan より)

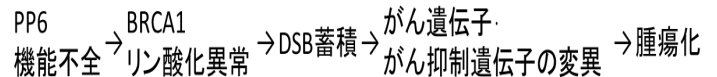
遺伝子発現と卵巣がんおよび乳がん患者の予後の関係を、Prognoscan で調べた。卵巣がん患者コホート研究(オーストラリア、DATASETGSE9891)から、Ppp6c の遺伝子発現が低い症例において、生存率が低い(p=0.042)ことが示された(図2左)。これにより、PP6 には卵巣がんの発症・悪性を抑える働きがあることが示唆された。乳がん(オランダ、DATASET12276)においては、卵巣がんほど顕著ではない(図2右)。



2. 研究の目的

(1)卵巣がんの分子機構解明は、家族性卵巣がんと家族性乳がんの連鎖解析からはじまった。そこで同定されたのが、BRCA1 と BRCA2 である。それらのリン酸化-脱リン酸化制御因子も DNA 修復に関わり、その機能不全は癌化を起こすという新たなアイデアである。申請者らは、これまでの経緯より、以下の作業仮説をもった。本研究は、この仮説の検証を目的としている。

作業仮説:



(2)卵巣腫瘍の特徴として、時に直径 20cm 程にもなることが知られている。申請者らは、これまでの未発表のデータから、RAS の上流または下流のがん遺伝子変異をもつ腫瘍において、PP6 の活性低下が起こり、組織の肥大が起こると考えていた。PP6 の活性低下には、Ppp6c 遺伝子変異がまず考えられるが、それ以外に環境変異原中に存在する PP6 活性阻害物質や、Ppp6c 遺伝子の発現を負に制御する未同定のマイクロ RNA 等が考えられる。腫瘍化の予防や治療としては、PP6 活性化剤が有望と考えた。本研究では、卵巣がんにおいて、2 重変異(変異型 RAS 発現と Ppp6c 欠損)を導入して、腫瘍の肥大化に影響をもつか否かを解析したいと考えた。

3. 研究の方法

PP6 の機能不全による卵巣の肥大化を調べるために、マウスの卵巣腫瘍に変異型 KRAS と Ppp6c 欠損という 2 重変異を導入する系を用いて実験を行った。

それぞれ、開腹手術により卵管漏斗を介して Ade-Cre ウイルス液 (1 × 10<sup>6</sup>PFU/5 μl) を感染させることで、卵巣表層上皮細胞に、2 重変異(変異型 KRAS と Ppp6c 欠損)または変異型 KRAS を導入させた。その後、腫瘍形成が期待される 7 か月後に、2 重変異により得られた卵巣腫瘍と、変異型 KRAS のみで発

生する卵巣腫瘍を採取し、その数、大きさ、病理学的所見を比較した。

#### 4. 研究成果

8 週齢と 13 週齢の雌のマウス (*Ppp6c*<sup>flox/flox</sup>; *Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup> マウス, *Ppp6c*<sup>+/+</sup>; *Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup> マウス, そして *Ppp6c*<sup>flox/flox</sup> マウス) を下記のように準備した。

13週齢	♀ <i>Ppp6c</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Kras</i> <sup>LSL-G12D/+</sup> マウス	5匹
	♀ <i>Ppp6c</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Kras</i> <sup>LSL-G12D/+</sup> マウス	11匹
	♀ <i>Ppp6c</i> <sup>flox/flox</sup> マウス	5匹
8週齢	♀ <i>Ppp6c</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Kras</i> <sup>LSL-G12D/+</sup> マウス	11匹
	♀ <i>Ppp6c</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Kras</i> <sup>LSL-G12D/+</sup> マウス	8匹
	♀ <i>Ppp6c</i> <sup>flox/flox</sup> マウス	4匹

開腹手術により左側の卵巣にのみ Ade-Cre ウイルス液投与により変異を導入した。注入後 7 ヶ月で、解剖し、変異の導入された左とされていない右の卵巣を採取した。変異導入後 7 か月の段階では、目立った体重の減少や腹部の肥大も認められなかった。

採取した組織のヘマトキシリン-エオジン染色を行い、詳細に観察を行った。その結果、いずれの遺伝子タイプにおいても、顕著な腫瘍発生は認められなかった。

#### 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 3 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<sup>G12D</sup>-driven tumor promotion.

Cancer Science in press 査読有

2. Tokunaga H, Takahashi F, Yamamoto H, Honda T, Watanabe T, Shoji T, Sugiyama T, Yamada H, Tando T, Yoshinaga K, Kagabu S, Otsuki T, Kin S, Yokoyama Y, Wagatsuma S, Sato K, Sato H, Oishi T, Yoshida Y, Hayasaka T, Matsui T, Imai N, Nishigori H, Shimokawa H, Yaegashi N, Watanabe Y.

Current Status of Uterine Leiomyosarcoma in the Tohoku Region: Results of the Tohoku Translational Center Development Network Survey.

Int J Clin Oncol. 22(3):541-547, 2017. doi: 10.1007/s10147-017-1097-y. 査読有

3. Kagabu M, Shoji T, Murakami K, Omi H, Honda T, Miura F, Yokoyama Y, Tokunaga H,

Takano T, Ohta T, Shimizu D, Sato N, Soeda S, Watanabe T, Yamada H, Mizunuma H, Yaegashi N, Nagase S, Tase T, Sugiyama T. Clinical efficacy of nedaplatin-based concurrent chemoradiotherapy for uterine cervical cancer: a Tohoku Gynecologic Cancer Unit Study.

Int J Clin Oncol. 21(4):735-740, 2016 doi: 10.1007/s10147-016-0946-4. 査読有

[学会発表](計 1 件)

1. 山田秀和、藤田信弘、大友圭子、田勢亨  
放射線治療後に局所に病巣が残存した子宮頸癌に対する子宮全摘は有効か？  
第 39 回日本産婦人科手術学会  
2016.11.12-13(宮城県仙台市)

[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

山田 秀和 (YAMADA, Hidekazu)  
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：10254012

##### (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

伊藤 しげみ (ITO, Shigemi)  
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：80600006