

令和元年6月25日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16358

研究課題名(和文)メラノーマ発症の新たな原因遺伝子-発症メカニズムから治療への展開

研究課題名(英文)Function of a novel suppressor gene for melanoma development.

研究代表者

桃井 勇貴 (Momoi, Yuki)

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・共同研究員

研究者番号：10750440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Ppp6c機能不全が、活性化型(変異型)RASによる腫瘍化を促進させて、腫瘍のより悪性化に働くのではとの仮説を証明する研究を行った。プロテインホスファターゼ6型の機能不全がK-rasG12D誘発皮膚腫瘍形成を増悪させることが明らかとなった。そのメカニズムはPpp6cが欠損すると変異型K-rasのシグナル伝達経路の中でも特にAKTパスウェイが選択的に活性化し、細胞増殖と細胞サイズ増大が促進され、腫瘍の発生を増強させると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RAS変異は、ヒトのがんで最も高い頻度で同定される遺伝子変異である。RAS変異をもつ細胞が、他の遺伝子変異を蓄積することでより悪性度の高い腫瘍になると考えられる。一方で変異型RASに対する有効な治療法はまだまだ開発されていない。考えられる治療法の1つは、変異型RASの悪性化を制御する因子を標的とした治療法である。本研究成果がそのような治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To address the function of protein phosphatase 6 (PP6) loss on K-ras-initiated tumorigenesis in keratinocytes, we developed tamoxifen-inducible double mutant (K-rasG12D-expressing and Ppp6c-deficient) mice in which K-rasG12D expression is driven by the cytokeratin 14 (K14) promoter. Doubly-mutant mice showed early onset tumor formation in lip and had to be sacrificed by three weeks after induction by tamoxifen, while comparably-treated K-rasG12D-expressing mice did not. HE-staining of lip tumors before euthanasia revealed that all were papillomas, some containing focal squamous cell carcinoma. Immunohistochemical analysis of lip of doubly-mutant versus K-rasG12D mice revealed that cell proliferation and cell size increased approximately two-fold relative to K-rasG12D-expressing mutants, and epidermal thickness of lip tissue greatly increased relative to that seen in K-rasG12D only mice. Ppp6c deficiency enhances K-rasG12D-dependent tumor promotion.

研究分野：発がん

キーワード：carcinogenesis

1. 研究開始当初の背景

我々の生化学的な検討および他の研究所の遺伝学的または分子生物学的検討から、プロテインホスファターゼ6型 (PP6) が、細胞周期のチェックポイント、DNA 修復、NHKB シグナルなどの調節に働いていることが分かってきた。しかし、遺伝子変異マウスを用いて発がんとの関係を明らかにしたいと考えていた。そこで、PP6 触媒サブユニット (*Ppp6c*) 欠損マウスの作製に着手した。*Ppp6c* コンディショナル KO マウスを用い、皮膚特異的に *Ppp6c* を欠損させ、DMBA 皮膚発がん実験を行った。*Ppp6c* を欠損した皮膚ではパピローマを早期に発症することが分かった。*Ppp6c* が新規皮膚がん抑制遺伝子であることを示したと考えていた。それを裏付ける重要な報告があった。基底細胞がんでは *Ppp6c* に高頻度に欠損・変異が同定された (Nature Genetics 2016)。この事実は、我々の証明を裏付けた。

2. 研究の目的

米国の2つのグループより、メラノーマ組織の約 10 % に *Ppp6c* 遺伝子変異があり、かつその変異は *NRAS* または *BRAF* 変異と共存することが発表された。(Cell 2012, Nature Genetics 2012)。上記米国の報告では、*Ppp6c* がメラノーマのがん抑制遺伝子であることを示唆する。しかし、その証明はない。申請者のもつ *Ppp6c* コンディショナル KO マウスを用いて、「*Ppp6c* がメラノーマのがん抑制遺伝子であるか否か」を、証明したいと考えた。

3. 研究の方法

課題1：仮説「*Ppp6c* 機能不全は、活性化型(変異型)RASによる腫瘍化を促進する」の証明

メラノーマでは、*Ppp6c* 遺伝子変異と *NRAS* が共存した。以前の実験で、*Ppp6c* 遺伝子欠損皮膚に発生した DMBA 投与によつてパピローマには全例 *HRAS* 変異が認められた。このことは、***Ppp6c* 機能不全が、変異型 RAS の腫瘍原性を促進させることを示唆した。**この証明のために、マウス扁平上皮において、変異型 *KRAS* に加え、*Ppp6c* 欠損を誘導するかを検討した。

課題2：仮説「*Ppp6c* がメラノーマのがん抑制遺伝子である」の証明

COSMIC (がん組織の遺伝子変異) データベースによると、*Ppp6c* の変異は、*NRAS* または *BRAF* 変異と共存し、興味深いことに *PTEN* 変異とは共存しない。従って、PP6 機能喪失が *PTEN* 経路とは独立に、活性化型(変異型) *NRAS* または *BRAF* と共に、メラノーマ発症に関与することを示唆している。メラノサイト特異的に *Ppp6c* 欠損と *BRAF* 変異を誘導して、メラノーマを発生するかどうかを検討した。

4. 研究成果

課題1：仮説「*Ppp6c* 機能不全は、活性化型(変異型)RASによる腫瘍化を促進する」の証明

扁平上皮特異的にタモキシフェンの腹腔内投与により、*K-ras*^{G12D} 発現を発現するマウスと、2重変異 (*K-ras*^{G12D} 発現 + *Ppp6c* 欠損) を生じるマウスの作成に成功した。2重変異マウスは誘導開始後さきわめて早期に口唇、乳頭、外生殖器、肛門、手足に腫瘍形成を認めた。これらの腫瘍は急速に増大し、マウスの著明な体重減少を認めたため誘導開始より3週間以内に安楽死させた。病理解剖の結果、体重減少の原因は口唇腫瘍の増大による経口摂取困難が考えられた。口唇の組織学的検討では、全個体において papilloma 発生を認めるとともに、その一部には squamous cell carcinoma の局在を認めた。免疫組織化学的検査を加えた検討では *K-ras*^{G12D} 誘導発現マウスと比べて2重変異マウスでは細胞周期の亢進と細胞サイズの増大、口唇表皮組織の増大を認めた。さらにシグナル伝達経路の解明を目指した免疫組織化学的検査では、2重変異マウスでは *K-ras* の細胞増殖と成長に関する主要なエフェクターである ERK の活性化は極めて弱かったのに対し、別のエフェクターある *AKT* の活性化は強まっており、その下流の 4EBP1、S6、GSK3 の活性化も増強していた。つまり、口唇組織で *AKT* 活性化によるタンパク合成とアポトーシスの回避が増強していることが示唆された。また、本来は表皮基底層に存在するサイトケラチン 14 陽性細胞が2重変異マウスでは角質層直下まで広く進展・増殖しており、ケラチンサイトの分化異常が示唆された。加えて、活性化型 *K-ras* は活性酸素による DNA 損傷を引き起こすこと、PP6 は相同組み換え修復の中心的役割を担うことが報告されていることから、DNA 二重鎖切断のマーカーである H2AX の発現を調べた。その結果、H2AX は2重変異マウスで著しく増加しており、DNA 修復の障害も示唆された。

以上、プロテインホスファターゼ6型の機能不全は *K-ras*^{G12D} 誘発皮膚腫瘍形成を増悪させる

ことが明らかとなった。そのメカニズムは *Ppp6c* が欠損すると変異型 K-ras のシグナル伝達経路の中でも特に AKT パスウェイが選択的に活性化し、細胞増殖と細胞サイズ増大が促進され、腫瘍の発生を増強させると考えられた。

課題 2 : 仮説「*Ppp6c* がメラノーマのがん抑制遺伝子である」の証明

タモキシフェン投与により、メラノサイト特有的に変異型 BRAF と Pten 欠損を発生させ腫瘍 (メラノーマ) を発生させることのできるマウス (*Tyrosinase-Cre^{ERT2}; B-raf^{F-V600E/+}; Pten^{loxp/+}*) と、*Ppp6c^{fllox/fllox}* マウスとを掛け合わせて、タモキシフェン投与により、メラノサイト特異的に、変異型 BRAF と Pten 欠損を発生させることが可能なマウス (*Tyrosinase-Cre^{ERT2}; B-raf^{F-V600E/+}; Pten^{loxp/loxp}*) の作成に成功した。8 週齢の本マウスの背部を剃毛し、連続 4 日間 1mg の 40H-TAM を塗布し、経時的に観察した。

(*Tyrosinase-Cre^{ERT2}; B-raf^{F-V600E/+}; Pten^{loxp/loxp}*) マウスと (*Tyrosinase-Cre^{ERT2}; B-raf^{F-V600E/+}; Pten^{+/+}*) マウスマウスの比較で、活性化型 BRAF による悪性黒色種発生に対する、*Ppp6c* 欠損の影響を調べているが、現在までのところ、両者において腫瘍形成の差が認められない。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

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, Shima H. : Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-ras^{G12D}-driven tumor promotion. *Cancer Sci.* 2018 Jul;109(7):2178-2187. doi: 10.1111/cas.13638. 査読有

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(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。