

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16043

研究課題名(和文)ケラチノサイト・メラノサイトの腫瘍化に働く新規皮膚がん抑制遺伝子Ppp6c

研究課題名(英文)Ppp6c functions as a tumor suppressor in skin carcinogenesis.

研究代表者

井上 維(Inoue, Yui)

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：30750442

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)：がん遺伝子変異データベースでは、皮膚基底細胞がんとメラノーマにおいて、脱リン酸化酵素PP6の触媒サブユニット(Ppp6c)変異がそれぞれ約20%と約10%の頻度で報告されている。本研究ではケラチノサイト特異的に2重変異(Ppp6c欠損+RAS変異)を導入すること、メラノサイト特異的に2重変異(Ppp6c欠損+変異型RAF変異)を導入することを試みた。Ppp6cが皮膚(非メラノーマおよびメラノーマ)がん抑制遺伝子として働くか否かの検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス皮膚2段階発がん実験で、貝毒オカダ酸が、皮膚がん腫瘍プロモーターとして働くことは、27年前に藤木博士により報告された。前後して、オカダ酸が脱リン酸化酵素の阻害剤であることが、高井博士により報告された。これらは、「皮膚がんにおいて、未同定の脱リン酸化酵素が、がん抑制作用を持つこと」を示唆していた。しかし、その脱リン酸化酵素は未同定のままだった。(174)

研究成果の概要(英文)：Recent DNA sequencing screens relevant to human cancer highlight the importance of PP6 in tumorigenesis. Somatic mutation of Ppp6c is reported in 20% of skin basal cell carcinoma, and 10% of malignant melanoma. Here, we examined the effect of Ppp6c loss on K-ras-induced proliferation in the context of keratinocyte tumorigenesis. We showed that Ppp6c deficiency enhances K-rasG12D-dependent tumor promotion. Next, in order to analyze Ppp6c function in melanomagenesis, melanocyte specific inducible mutant mice which have BRAF(V600E) and Ppp6c loss were developed. The data using these mice suggested that loss of function of Ppp6c enhanced BRAF(V600E) initiated melanomagenesis in mice.

研究分野：がん抑制遺伝子、発がん

キーワード：プロテインホスファターゼ Kras Braf メラノーマ 皮膚腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

マウス 2 段階皮膚発がん実験における謎:

マウス皮膚 2 段階発がん実験で、貝毒オカダ酸が、皮膚がん腫瘍プロモーターとして働くことは、27 年前に藤木博士により報告された。前後して、オカダ酸が脱リン酸化酵素の阻害剤であることが、高井博士により報告された。これらは、「皮膚がんにおいて、未同定の脱リン酸化酵素が、がん抑制作用を持つこと」を示唆していた。しかし、その脱リン酸化酵素は未同定のままだった。

新規皮膚がん抑制遺伝子の同定:

申請者らは、*Ppp6c* コンディショナル KO マウスを用い、皮膚ケラチノサイト特異的に *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。次に紫外線の影響を調べた。*Ppp6c* 欠損皮膚では、高頻度に扁平上皮がんが発生した。我々は世界で初めて、「*Ppp6c* が新規皮膚がん抑制遺伝子である」を証明した。

*Ppp6c* 遺伝子変異が、皮膚基底細胞がん、メラノーマで報告されている:

・皮膚基底細胞がん: *Ppp6c* に高頻度に欠損・変異が同定された。*Ppp6c* がヒトでもがん抑制遺伝子であることを示唆している。

・メラノーマ: 最新のメラノーマ遺伝子変異データベースでは、*Ppp6c* の変異 (LOH を伴う) は、*NRAS* または *BRAF* 変異と共存し、*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。

## 2. 研究の目的

### 課題 1: 仮説「*Ppp6c* 機能不全は、活性化型 RAS による腫瘍化を促進する」の検証

DMBA で *Ppp6c* 遺伝子欠損皮膚に発生したパピローマには全例に *HRAS* 変異が認められた。一方で、がんゲノムデータベースによると、10% のメラノーマで *Ppp6c* 遺伝子の変異があり、その半分の症例では *NRAS* 変異を持つ。そこで、我々は、この仮説を持った。上記の証明のため、申請者は、扁平上皮細胞で 2 重変異 (変異型 *KRAS* 発現と *Ppp6c* 欠損) を惹起するマウスを作製し、全身皮膚にこの 2 重変異導入する実験を開始することにした。

*RAS* 変異は多くの悪性腫瘍で変異が認められる遺伝子であるが、治療法に関して、現在のところ、*RAS* の下流のエフェクター (*RAF* や *MEK*) を阻害する方法が用いられているが、必ずしも有効ではない。「*Ppp6c* による活性化型 *RAS* 抑制の分子機構」が明らかになれば、新たな治療標的が発見できる可能性がある。

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

市販のメラノーマ誘導マウス (変異型 *BRAF* と *PTEN* 欠損: *Tyrosinase-Cre<sup>ERT2</sup>*; *B-raf<sup>F-V600E/+</sup>*; *Pten<sup>fllox/fllox</sup>*) を利用して、検証用のマウス (変異型 *BRAF* と *Ppp6c* 欠損: *Tyrosinase-Cre<sup>ERT2</sup>*; *B-raf<sup>F-V600E/+</sup>*; *Ppp6c<sup>fllox/fllox</sup>*) を作製した。一年目は、タモキシフェンにより変異を誘導させ、2 重変異がメラノーマを発生させるか検討する。

これまでの生化学的な研究で、PP6 は DNA の 2 本鎖切断の修復に必須な酵素とされているので、PP6 活性に異常があると、放射線や抗がん剤に感受性が高いことが予想される。また、DNA 修復異常の結果生じるネオアンタイジェンの蓄積が考えられ、免疫チェックポイント療法の対象になることが期待できる。

## 3. 研究の方法

課題 1 は本研究費で採用予定の補助員 1 名とともに申請者と大学院生 1 名が行う。課題 2 は申請者と大学院生 1 名が行う。動物発がん実験は、当センターの SPF 動物飼育施設の常勤スタッフ 3 名が動物の管理をサポートする。病理組織学的実験は、当センターの病理医 2 名と複数の技師が組織切片の作製と免疫組織染色をサポートする。動物実験は、以下のマウスを作製しそれを用いて行う。

### 課題 1: 仮説「*Ppp6c* 機能不全は、活性化型 RAS による腫瘍化を促進する」の検証

重層扁平上皮特異的に、タモキシフェン投与により、2重変異 ( $K-ras^{G12D}$  発現と  $Ppp6c$  欠損) を誘導発現させるマウス  $K14-Cre^{TAM}$ ;  $Kras^{LSL-G12D/+}$ ;  $Ppp6c^{flox/flox}$  を作製して実験に用いた。

#### 課題2: 仮説「 $Ppp6c$ がメラノーマのがん抑制遺伝子である」の検証

以下の3種類のマウスを作製した。これらのマウスの局所に4-OH タモキシフェン (4OH-T) を塗布することで、その部分のメラノサイトに、変異型  $BRAF$  発現および  $Ppp6c$  欠損を誘導することができる。これらのマウスを用いて、メラノーマ発がん実験を行う。変異型 B-raf+ $Ppp6c$  ホモ欠損:  $Tyrosinase-Cre^{ERT2}$ ;  $BRAF^{F-V600E/+}$ ;  $Ppp6c^{F/F}$   
変異型 B-raf+ $Ppp6c$  ヘテロ欠損:  $Tyrosinase-Cre^{ERT2}$ ;  $BRAF^{F-V600E/+}$ ;  $Ppp6c^{F/+}$  変異型 B-raf+ $Ppp6c$  正常:  $Tyrosinase-Cre^{ERT2}$ ;  $BRAF^{F-V600E/+}$ ;  $Ppp6c^{+/+}$

#### 4. 研究成果

##### 課題1: 仮説「 $Ppp6c$ 機能不全は、活性化型 RAS による腫瘍化を促進する」の検証

本研究は  $K-ras^{G12D}$  発現による腫瘍形成において  $Ppp6c$  の機能欠損がどのように影響するのかを検討した。表皮特異的に誘導可能な2重変異マウス ( $K14-Cre^{ER^{tam}}$  /  $LSL-K-ras^{G12D}$  /  $Ppp6c^{flox/flox}$  マウス) を作成し、 $K-ras^{G12D}$  発現マウス ( $K14-Cre^{ER^{tam}}$  /  $LSL-K-ras^{G12D}$  マウス) と比較した。4-HT による誘導から12日以内に2重変異マウスの口唇組織は表皮過形成 (acanthosis) を認め、安楽死をさせる直前の段階 (16~20日目) には papilloma になり、部分的に SCC に進行した領域を認めた。一方、 $K-ras^{G12D}$  のみを持つ1重変異マウスでも、誘導後100日後では papilloma ではあるものの、1年後には SCC が認められた。したがって、 $Ppp6c$  欠損が変異型  $K-ras$  誘導の腫瘍形成を著しく促進させたと考えられる。

2重変異マウスの口唇表皮組織の厚みは、 $K-ras^{G12D}$  マウスと比較して誘導後12日目にはおよそ40倍になった。これらの組織には細胞周期進行の促進と細胞サイズの増大が認められており、両者とも、活性化 AKT により引き起こされた可能性が考えられた。4EBP1 と S6 のリン酸化レベルはいずれも増強しており、タンパク質の合成が促進されたことを示した。細胞の生存シグナルを示すことで知られている GSK3 のリン酸化もまた増強していた。これらのことから、 $K-ras^{G12D}$  発現/ $Ppp6c$  欠損下では選択的に複数のリン酸化タンパクの過剰なリン酸化 (活性化) が生じ、細胞増殖と生存シグナルのいずれもが促進され、表皮の過形成が生じる可能性が考えられた。

##### 課題2: 仮説「 $Ppp6c$ がメラノーマのがん抑制遺伝子である」の検証

前記のマウス ( ) の背中 of 皮膚に2重変異を誘導させた後、UV 照射無しで飼育している。現在1年経過しているがまったく腫瘍発生がない。この結果より、UV 照射を加えて検討することにした。週1回の照射を行うことで、により、マウス ( ) に腫瘍発生が認められた。得られた腫瘍は、メラノーマのマーカー (S100, SOX10, HMB45) の何れかが陽性であり、メラノーマと診断された。組織型は、現在までのところ、neurotropic、epithelioid、desmoplastic、spindle cell の4つのタイプがあった。紫外線照射により、 $Ppp6c$  正常マウス ( ) に比べて、 $Ppp6c$  ヘテロ欠損マウス ( ) が、腫瘍の発症亢進を示した (図4)。この差は統計的に有意であった。さらに長期観察を続ける。また、 $Ppp6c$  ホモ欠損マウス ( ) の腫瘍発生は著しく遅延することが分かった。このことから、 $Ppp6c$  はハプロ不全性を示すことが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurosawa Koreyuki, Inoue Yui, Kakugawa Yoichiro, Yamashita Yoji, Kanazawa Kosuke, Kishimoto Kazuhiro, Nomura Miyuki, Momoi Yuki, Sato Ikuro, Chiba Natsuko, Suzuki Mai, Ogoh Honami, Yamada Hidekazu, Miura Koh, Watanabe Toshio, Tanuma Nobuhiro, Tachi Masahiro, Shima Hiroshi	4. 巻 109
2. 論文標題 Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-ras G12D-driven tumor promotion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2178 ~ 2187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Mami, Sato Taku, Nomura Miyuki, Sakamoto Yoshimi, Inoue Yui, Tanaka Ryota, Ito Shigemi, Kurosawa Koreyuki, Yamaguchi Kazunori, Sugiura Yuki, Takizaki Hiroshi, Yamashita Yoji, Katakura Ryuichi, Sato Ikuro, Shima Hiroshi, Maemondo Makoto, Tanuma Nobuhiro	4. 巻 33
2. 論文標題 PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 355 ~ 367.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccell.2018.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岸本和太、金澤孝祐、井上維、田沼延公、島礼
2. 発表標題 プロテインホスファターゼPP6の機能不全は、ケラチノサイトにおいて、変異型K-rasで誘導される腫瘍化を著しく亢進させる
3. 学会等名 生化学会東北支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kosuke Kanazawa, Kazuhiro Kishimoto, Yui Inoue, Koh Miura, Nobuhiro Tanuma, and Hiroshi Shima
2. 発表標題 Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-rasG12D-driven tumor promotion.
3. 学会等名 Mechanisms & Models of Cancer (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----