

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18757

研究課題名(和文) 頭頸部癌の発生を抑制する遺伝子(脱リン酸化酵素)の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of a phosphatase that suppresses the development of head and neck cancer

研究代表者

黒沢 是之(Kurosawa, Koreyuki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10770349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、扁平上皮特異的に、2重(Ppp6c欠損+変異型K-ras、あるいはPpp6c欠損+変異型p53)、あるいは3重変異マウス(Ppp6c欠損+変異型K-ras+変異型p53)を作製して、頭頸部腫瘍における、PP6の機能不全の“相乗的”作用による発がん機構を検証した。その結果、PP6の機能不全が、p53やRAS遺伝子の腫瘍形成能に“相乗的”に働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部扁平上皮がんの遺伝子変異の特徴として、TK-PI3K-AKT経路やp53変異の遺伝子変異が高いことがあげられる。RTK-PI3K-AKT経路を標的とした、あるいはTK-PI3K-AKT経路に加えてp53変異を標的とした新しい治療の開発が求められている。ホスファターゼ活性の調節を制御した治療開発というのは全く新しい概念であり、本研究の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated squamous epithelium-specific double (Ppp6c deficient + mutant K-ras or Ppp6c deficient + mutant p53) or triple mutant mice (Ppp6c deficient + mutant K-ras + mutant p53) to examine the carcinogenic mechanism of the "synergistic" effect of PP6 dysfunction in head and neck tumors. In this study, we examined the mechanism of carcinogenesis by the "synergistic" effects of PP6 dysfunction in head and neck tumors. The results suggest that PP6 dysfunction acts "synergistically" on the tumorigenic potential of p53 and RAS genes.

研究分野：発がん、頭頸部腫瘍、新規がん抑制遺伝子

キーワード：プロテインホスファターゼ マウス発がん実験

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プロテインホスファターゼ 6 (PP6) は、Ser/Thr プロテインホスファターゼの PPP ファミリーに属している。PP6 は、哺乳類の組織でユビキタスに発現し、3 種類の調節タンパク質 PP6R1、PP6R2、PP6R3 の何れか 1 つと特異的に結合し、局在性や基質特異性が調節されている。PP6 の細胞内の機能としては、オーロラキナーゼ A の脱リン酸化による有糸分裂制御、DNA-PK 活性化による DNA 損傷修復促進、や非相同末端結合を介した DNA 二本鎖切断 (DSBs) の DNA 修復、NFkB シグナルの抑制による抗炎症機能等の役割が報告されている。がんゲノムデータベースでは、様々な腫瘍組織において *Ppp6c* の機能喪失型変異と、p53 や RAS の遺伝子変異の共存が認められる。我々の発見と合わせると、PP6 の機能不全が、p53 や RAS 遺伝子の腫瘍形成能に“相乗的”に働くことが示唆された。

申請者は、遺伝子改変マウスを用いて、脱リン酸化酵素 PP6 の触媒サブユニット (*Ppp6c*) が、がんの抑制遺伝子である事を世界で初めて証明した。ケラチノサイト特異的に *Ppp6c* を欠損させたマウスでは、紫外線照射で皮膚扁平上皮がんが発生し、その組織では *Ppp6c* 欠損と変異型 *p53* が共存した。\*Kato H, \*Kurosawa K et al. (\*加藤,\*黒沢、共筆頭著者) *Cancer Lett.* 2015

次に、ケラチノサイト特異的に 2 重変異 (*Ppp6c* 欠損と変異型 *K-ras*) をもつマウスは、変異型 *K-ras* のみをもつマウスに較べて、著しく腫瘍化が促進されることを見出した。論文 2 Kurosawa K, et al. *Cancer Sci.* 2018

### 2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮がん (HNSCC) は、世界で年間 6 万例の発生率で、死亡率は 40 ~ 50% である。2015 年に発表された The Cancer Genome Atlas によると、HPV(-) サンプルでは、受容体チロシンキナーゼ (RTK) のうち EGFR/ERBB2 または EGFR1/3 の変異が最も多く、その下流には受容体チロシンキナーゼ HRAS、PI3CA、PTEN の変異が存在し、RTK/RAS/PI3K 経路が HNSCC の発がんに関与していることが示唆された。また、腫瘍抑制因子である Trp53 は 84% で最も多く変化していることがわかっている。一方で、Prognoscan データベースによると、頭頸部がんがんで *Ppp6c* 遺伝子の発現低下と強い相関関係がある (頭頸部がん: GSE2837) ことが示されていた。そこで、本研究では、頭頸部扁平上皮においては、PP6 が変異型 *KRAS* による腫瘍形成を抑える機能をもつか、またその機能をもつ場合、p53 の変異の存在がどう影響するかを明らかにしたいと考えた。そこで、マウス発がん実験において、RTK/RAS/PI3K 経路の 1 つとしては *KRAS* (G12D)、*Trp53* 変異としては *Trp53* ホモ欠損を選び、それらの存在下における、*Ppp6c* 欠損の影響を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

変異型 RAS や欠損型 p53 によるマウス舌がん発生への *Ppp6c* 遺伝子欠損の影響を解析するために、下記の 3 種類のマウスの作製を行う。用いるマウスは、舌で 2 重変異 (変異型 *Kras* と *Ppp6c* 欠損) をおこすマウス *K14-Cre(TAM); Kras(LoxP-G12D/+); Ppp6c(flox/flox)*、舌で 3 重変異 (変異型 *Kras* と p53 欠損と *Ppp6c* 欠損) をおこすマウス *K14-Cre<sup>TAM</sup>; Kras(LoxP-G12D/+); p53(flox/flox); Ppp6c(flox/flox)* である。これらマウスの舌にタモキシフェンを投与することにより、*KRAS* (G12D) アレル、p53 アレル、*Ppp6c* アレルのリコンビネーションを起こさせ、それによる腫瘍発生を比較する。

これらマウスを用いて、現在、変異型 *Kras* と p53 欠損存在下での、*Ppp6c* 欠損の影響を調べている。それぞれ、コントロールの *Ppp6c* (+/+ ) より、*Ppp6c* 欠損において、腫瘍の発生が変化するか、もし変化した場合は、病理学的解析を行うこと。また、病理組織をもちいてシグナル伝達物質のリン酸化の状態を解析することで *Kras* の下流に対する PP6 の機能喪失の影響を調べた。

### 4. 研究成果

( 1 ) KRAS(G12D)、p53、Ppp6c アレルの遺伝子組換えの有無。

・活性化 CreER<sup>T2</sup> による Ppp6c<sup>flox</sup> アレルからの exon4 の欠失：タモキシフェン処理ずみの舌においては、4 エクソン 4 の欠損した Ppp6c<sup>flox</sup> アレルが同定された。

・活性化 CreER<sup>T2</sup> による *Kras*<sup>G12D</sup> の発現：タモキシフェン処理ずみの舌においては、K-ras<sup>LSL-G12D</sup> アレルから転写終結配が欠損したアレルが同定された。

・活性化 CreER<sup>T2</sup> を介した *Trp53* の欠損：タモキシフェン処理ずみの舌においては、exon2-10 の欠失された *Trp53*<sup>flox</sup> アレルが同定された。

( 2 ) 舌腫瘍発生について

タモキシフェン投与により、扁平上皮特異的に 2 重変異 ( 変異型 KRAS + Ppp6c 欠損 ) を発生させるマウス K14CRE<sup>tam</sup>:Kras<sup>LSL-G12V/+</sup> ; Ppp6c<sup>flox/flox</sup> を作成した。マウスの舌にタモキシフェンを塗布することにより、この 2 重変異 ( 変異型 KRAS + Ppp6c 欠損 ) マウスは、KRAS 変異マウスより著しく早期に舌の肥大が発生した。病理組織学的解析により、その肥大部分は、dysplasia として診断された。2 重変異 ( 変異型 KRAS + Ppp6c 欠損 ) マウスは、10 日ほどで死亡することがわかった。

( 3 ) 舌以外の場所における腫瘍発生について

舌にタモキシフェンを塗布後 10 日ほどで死亡した、2 重変異 ( 変異型 KRAS + Ppp6c 欠損 ) マウスにおいては、口唇の腫瘍、肺腫瘍、胸腺腫瘍が見出された。このうち、特に口唇の肥大化が著しかった。この口唇においても papilloma から dysplasia が認められた。

( 4 ) 判明した問題点

K14CRE<sup>tam</sup>:Kras<sup>LSL-G12V/+</sup> をベースとしたシステムで舌にタモキシフェンを塗布することで舌腫瘍を作製した場合、口唇腫瘍の発生が避けられないこと。そして食事を取れないために死亡することがわかった。

( 5 ) 課題を克服するために新たに設計した研究システムの作製とその成果

他の臓器に影響を与えず、舌腫瘍のみを作製させる方法として、ROSA14 プロモーターの下で CRE を発現させるシステムが知られている。そこで、ROSA14-CRE<sup>tam</sup>:Kras<sup>LSL-G12V/+</sup> をベースとした実験系に組み替えることにした。

現在、下記の 3 種類のマウスの作製に成功した。局所的に 2 重変異 ( 変異型 *Kras* と *Ppp6c* 欠損 ) をおこすマウス ROSA26-Cre(TAM);Kras(LSL-G12D/+);Ppp6c(flox/flox) 、舌で 3 重変異 ( 変異型 *Kras* と p53 欠損と *Ppp6c* 欠損 ) をおこすマウス ROSA26-Cre(TAM);Kras(LSL-G12D/+);p53(flox/flox);Ppp6c(flox/flox) である。これらマウスの舌にタモキシフェンを投与することにより、KRAS(G12D)アレル、p53 アレル、Ppp6c アレルのリコンビネーションを起こさせ、それによる腫瘍発生を比較している。このシステムを用いることで、口唇に影響を与えず、舌特異的に腫瘍発生を起こすことに成功した。このシステムを用いることで、carcinoma in situ の腫瘍の発生を同定している現在この組織における、リン酸化タンパクの経時的変化、トランスクリプトーム解析を開始した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imai T, Kurosawa K, Asada Y, Momma Y, Takahashi M, Satake N, Matsura K	4. 巻 34
2. 論文標題 Enhanced recovery after surgery program involving preoperative dexamethasone administration for head and neck surgery with free tissue transfer reconstruction: Single-center prospective observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 197-205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.suronc.2020.04.025.	査読の有無 無
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 Kanazawa K, Kishimoto K, Nomura M, Kurosawa K, Kato H, Inoue Y, Miura K, Fukui K, Yamashita Y, Sato I, Tsuji H, Watanabe T, Tanaka T, Yasuda J, Tanuma N, Shima H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Ppp6c haploinsufficiency accelerates UV-induced BRAF(V600E)-initiated melanomagenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14895. Online ahead of print.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 0件）

1. 発表者名 黒沢是之
2. 発表標題 悪性腫瘍切除後の顎顔面再建における歯科・形成外科連携
3. 学会等名 第36回日本顎顔面補綴学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒沢是之
2. 発表標題 脈管としてのリンパ管の再考-リンパ学の基礎と臨床- 四肢のリンパ浮腫に対するリンパ外科の実際
3. 学会等名 第61回日本脈管学会学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------