

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591928

研究課題名(和文) 乳がんの診断・治療開発のための次世代標的「ホスファトーム」

研究課題名(英文) Phosphatome - targeted therapy for breast cancer

研究代表者

角川 陽一郎 (KAKUGAWA, YOICHIRO)

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：60221173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌の癌抑制遺伝子としてBRCA1がある。この機能は、リン酸化、脱リン酸化により制御される。この制御に関わる脱リン酸化酵素としてPP6の重要性が示唆された。PP6は、がん抑制作用があることが想像されていたが、その直接的な証拠はなかった。我々は、PP6の触媒サブユニット遺伝子を欠損させたマウスを作成し、PP6の機能の欠失が皮膚腫瘍のプロモーションに働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：BRCA1 gene is identified as one of anti-cancer gene against breast cancer. The function of BRCA1 is regulated by its status of phosphorylation, and PP6 is thought to be involved in this regulation. In this experiment, we firstly showed that PP6 functions as anti-oncogene in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳がん HER2 ホスファターゼ PP6 ノックアウトマウス BRCA1 SNPs

1. 研究開始当初の背景

乳癌や卵巣癌に関連する癌抑制遺伝子として最も有名なものは、BRCA1 遺伝子である。この遺伝子産物は、DNA 修復、チェックポイント応答、ゲノムの安定性に関与すると考えられる。BRCA1 は、リン酸化タンパクである。BRCA1 の機能を DNA 損傷により活性化されたキナーゼによるリン酸化によって制御されているとされているが、その脱リン酸化についてはほとんど解析が進んでいなかった。

我々は、BRCA1 の脱リン酸化酵素が、乳がんの発がんのメカニズムに深く関与する可能性を考え、様々な脱リン酸化酵素を用いて、その関係を調べてきた。その課程で、PP6 が効率よく BRCA1 と共沈することが明らかとなったのである。BRCA1 は、すでに多くの異なったタンパク質と結合することによって異なった機能を発揮することが知られている。その中で PP6 の脱リン酸化のもつ意義を明らかにしたいと考えた。

発がん実験等で用いられる、発がんプロモーターのオカダ酸は、minisatellite instability・ジフテリア毒素抵抗性変異体誘導等のゲノム不安定性を誘導することが知られている。PP6 は、オカダ酸高感受性という最近の報告から、オカダ酸によるゲノム不安定性の誘導機構において、PP6 の阻害 BRCA1 または γ H2AX の制御異常がその原因となる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

国外から重要な発見があった。悪性黒色腫の全 exon シークエンスのデータから、プロテインホスファターゼ 6 型(PP6)の触媒サブユニット(*Ppp6c*)の遺伝子変異が悪性黒色腫において高頻度に見出され、同ローカスに LOH を伴うことから、PP6 の loss of function が、ドライバー変異として働く可能性が示唆された。また最新の大規模ゲノム解析プロジェクトである TCGA(The Cancer Genome Atlas)によると、PP6 遺伝子変異は、悪性黒色腫に限らない。我々は、生体内でがん抑制遺伝子として働く可能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

当初は、*Ppp6c* ノックアウトマウスを作成し、それを用いて乳がんの発がん実験を行うことを考えたが、*Ppp6c* ノックアウトマウスは胎生致死であった。そこで、conditional に PP6 を欠損させて発がん実験を行うことにした。実験法は、最も頻用されている皮膚 2 段階発がん実験を採用した。特異的に *Ppp6c* を欠損させ、実験に供することを考えた。*Ppp6c*^{flox/flox} マウス (*Ppp6c* のホスファターゼ活性に必須なアミノ酸をコードする exon4 が loxP 部位に挟み込まれている) と K14-*CreER*^{tam} を掛け合わせて、K14-*CreER*^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox} マウスを作製した。ケラチン K14 は、表皮の基底細胞に発現するので、K14-*CreER*^{tam} システムでは、K14 プロモーターにより、*CreER*^{tam} は、表皮の基底細胞に発現する。また、4HT 投与により核へ移動し活性化され、loxP に挟み込まれた部位を欠損させることが可能となる

本システムにより、実際に *Ppp6c* の exon4 を欠損させることができるか確認するため、4HT を皮膚に塗布し、K14 発現ケラチノサイトにおける *Ppp6c* の exon4 欠損状況を調べた。K14-*CreER*^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox} マウスの背部に、4HT を 5 日間連続投与し、その皮膚からケラチノサイトを精製した。PCR により得られた flox アレルと欠損アレルの比により、5 日間の 4HT 投与により、ケラチノサイトにおいて、flox アレルの約 7 割が、exon4 を欠損する事がわかった。このシステムを用いて、TPA/DMBA または TPA/オカダ酸による 2 段階発がん実験で調べた。

4. 研究成果

(1) *Ppp6c* を欠損すると、2 段階発癌実験で皮膚腫瘍形成が早まる。

Ppp6c 欠損による発がんへの影響を、皮膚 2 段階発がん実験で調べた。実験には 6~7 週齢の K14-*CreER*^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox} マウスを用いた。あらかじめ 4HT を前処理し、ケラチノサイトから *Ppp6c* を欠損させたマウスと、4HT 無処理のコントロールマウスを用いた。コントロールマウスでは、15 週後にパピローマの形成が認められた。その一方で、欠損マウス

では、パピローマ形成が著しく早くなり、5週目から認められるようになった。この結果は、DMBA/TPA 2段階発がん実験において、*Ppp6c* 欠損が腫瘍発生を著しく促進させるということであった。次に、プロモーターとしてオカダ酸を用いて、実DMBA/オカダ酸2段階発がん実験を行った。この場合でも腫瘍発生の著しい促進が認められ、その程度はDMBA/TPA 2段階発がん実験でのそれと同程度であった。従って、2段階発がん実験において、TPAとオカダ酸という全く機構の異なるプロモーターを用いて、*Ppp6c* 欠損はパピローマの腫瘍発生の形成を早めることが分かった。

(2) *Ppp6c* 欠損マウスでは、イニシエーターのみで腫瘍形成が起こる。

次に、化合物発がんプロモーターを使用しないで、発がん実験を行った。驚いたことに、PP6機能欠損皮膚においては、DMBA単回投与のみでパピローマ発生が認められた。従って、PP6機能消失状態では、腫瘍形成のために、一般に腫瘍形成には必須と考えられている発がんプロモーターの反復投与が不要であったのである。興味のある事にコントロールマウスでは、DMBA/TPAによるパピローマ発生が15~16週であったのに対し、*Ppp6c*を欠損させたマウスでは、DMBAの投与のみでも5週後にパピローマが発生したことである。これらは、*Ppp6c*欠損の腫瘍プロモーション作用が、TPAやOAによる腫瘍プロモーション作用に比べて遙かに強力であることを示している。

DMBAの投与は、H-*ras*のコードン61番におけるCAA(グルタミン)からCTA(ロイシン)への遺伝子変異を起こすことが報告されている。そこで、*Ppp6c*の機能欠損マウスに発生したパピローマの遺伝子解析を行ったところ、exon4の欠損とH-*ras*のコードン61番の遺伝子変異が認められた。次に、各群の腫瘍における各種遺伝子発現を調べた、GRO α は、増殖作用とケラチノサイトのプログレッション作用を持ち、*ras*によって制御されていることが明らかとなっている重要なケモカインの一つである。これらの腫瘍中では、正

常な皮膚に比べてGRO α の発現が著しく高値となっていた。さらに、細胞増殖のマーカの一つである*cyclin D1*もまた、正常な皮膚に比べて高値となっていた。これらの結果は、*Ppp6c*の機能が欠損し、H-*ras*のコードン61番の遺伝子変異を持つケラチノサイトが、増殖優位性を得て腫瘍形成になっていることを示している。

Hodisらは、悪性黒色腫の全exonシーケンスの結果より、「*Ppp6c*のloss of functionが、変異B-*raf*または変異N-*ras*遺伝子による癌発生をさらにドライブさせる。」という仮説を提唱したが、我々の本研究結果は、これらの仮説を支持するものと考えられる。GRO α は好中球を遊走させることで炎症を引き起こし、血管新生を促進することで腫瘍の成長を加速させることが報告されている。*Ppp6c*機能欠損ケラチノサイト由来のパピローマにおいて、長期間にわたりGRO α や*cyclin D1*が顕著に上昇し続けることが、さらなる腫瘍の増大に働くと考えられる。

(3) *Ppp6c*欠損皮膚では、DMBA投与により強い炎症像を呈する。

DMBA塗布後の組織学的な観察を行った。DMBA投与48時間後、*Ppp6c*の機能が欠損した皮膚では、表皮の肥厚、真皮への細胞浸潤、皮下組織への細胞浸潤が見られ、増殖性所見と炎症性の所見が認められた。

*Ppp6c*機能欠損が、DMBAに起因する増殖や炎症とどのように関わっているのか検討するため、皮膚組織中の増殖および炎症と関連する遺伝子について検討を行った。まず、DMBA/TPAによる2段階発がんには必須とされているサイトカインTNF- α の遺伝子発現を調べた。DMBA処理により6時間および24時間で上昇が認められた。しかし、*Ppp6c*機能欠損皮膚とコントロール皮膚とでは著明な差は見られなかった。

炎症は、腫瘍のプロモーション/プログレッション作用を促進させることが報告されている。大きく3つのグループに分類される炎症・増殖関連遺伝子の発現が、*Ppp6c*欠損組織において、コントロールより上昇する傾向にあることがわかった。

前炎症性サイトカインである *IL-1β* や *IL-6* の発現は、*Ppp6c* 機能欠損皮膚において著しく上昇していた。*IL-1β* は、急性期の炎症時に単球やマクロファージから放出され、*IL-6* の発現を上昇させることが知られている¹⁵⁾。また、*IL-1β* と同じファミリーである *IL-1α* は、真皮への好中球浸潤を引き起こすことが報告されている。従って、*Ppp6c* の機能が欠損している皮膚において、*IL-1β*、*IL-6* の発現が上昇し、著しい炎症が起きることでプロモーションを促進すると思われる。炎症関連遺伝子である *GM-CSF*、*GROα*、*MMP-3* の発現も上昇していた。白血球の成長と生存を促す *GM-CSF* と、細胞浸潤を活性化させる働きを持つ *MMP-3* による炎症性微小環境の構築も、早期のパピローマ形成に与したと考えられる。

Ppp6c 機能欠損皮膚において、DMBA 処理後 6 時間後で、Immediate early gene として知られる *c-jun* と *c-fos* の遺伝子発現が上昇した。この 2 つは AP-1 の構成因子であり、AP-1 を介した増殖シグナルが入っていると考えられる。

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 16 件)

(1) Hayashi K, Momoi Y, Tanuma N, Kishimoto A, Ogoh H, Kato H, Suzuki M, Sakamoto Y, Inoue Y, Nomura M, Kiyonari H, Sakayori M, Fukamachi K, Kakugawa Y, Yamashita Y, Ito S, Sato I, Suzuki A, Nishio M, Suganuma M, Watanabe T, and Shima H. : Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA. *Oncogene* (in press)
doi:10.1038/onc.2014.398.

(2) 濱中洋平、角川陽一郎 : 癌性心タンポナーデを良好にコントロールし得た再発乳癌の 2 例. *癌と化学療法* : 2014 年 1 月 41 : 91-93

(3) Yuko Minami, Toru Hosokawa, Naoki Nakaya, Yumi Sugawara, Yoshikazu Nishino,

Yoichiro Kakugawa, Akira Fukao, Ichiro Tsuji : Personality and breast cancer risk and survival: the Miyagi Cohort Study : *Breast Cancer Res Treat* (2015) 150:675-684

(4) Koh Miura, Masayuki Satoh, Makoto Kinouchi, Kuniharu Yamamoto, Yasuhiro Hasegawa, Yoichiro Kakugawa, Masaaki Kawai, Kiyoshi Uchimi, Hiroki Aizawa, Shinobu Ohnuma, Taiki Kajiwara, Hiroto Sakurai, Tsuneaki Fujiya : The use of natural products in colorectal cancer drug discovery : *Expert Opin. Drug Discov.* (2015) 10(4)

(5) Nishino Y, Minami Y, Kawai M, Fukamachi K, Sato I, Ohuchi N and Kakugawa Y : Cigarette smoking and breast cancer risk in relation to joint estrogen and progesterone receptor status: a case-control study in Japan: *SpringerPlus* 2014,3:65

(6) Koh Miura, Masayuki Satoh, Makoto Kinouchi, Kuniharu Yamamoto, Yasuhiro Hasegawa, Alex Philchenkov, Yoichiro Kakugawa & Tsuneaki Fujiya : The preclinical development of regorafenib for the treatment of colorectal cancer : *Expert Opin. Drug Discov.* (2014) 9(9)

(7) Kakugawa Y, Kawai M, Nishino Y, Fukamachi K, Ishida T, Ohuchi N, Minami Y. Smoking and survival after breast cancer diagnosis in Japanese women: A prospective cohort study. *Cancer Sci.* 2015 Jun 6. doi: 10.1111/cas.12716.

(8) Takagi K, Miki Y, Nakamura Y, Hirakawa H, Kakugawa Y, Amano G, Watanabe M, Ishida T, Sasano H, Suzuki T. : Immunolocalization of thymidylate synthase as a favorable prognostic marker in estrogen receptor-positive breast carcinoma. *Histol Histopathol.* 2015 Apr 15:11619.

[Epub ahead of print]

PMID: 25873048

(9) Miura K, Satoh M, Kinouchi M, Yamamoto K, Hasegawa Y, Kakugawa Y, Kawai M, Uchimi K, Aizawa H, Ohnuma S, Kajiwara T, Sakurai H, Fujiya T. : The use of natural products in colorectal cancer drug discovery. Expert Opin Drug Discov. 2015 Apr;10(4):411-26. doi: 10.1517/17460441.2015.1018174. Epub 2015 Feb 27.

(10) Fujii R, Hanamura T, Suzuki T, Gohno T, Shibahara Y, Niwa T, Yamaguchi Y, Ohnuki K, Kakugawa Y, Hirakawa H, Ishida T, Sasano H, Ohuchi N, Hayashi S. : Increased androgen receptor activity and cell proliferation in aromatase inhibitor-resistant breast carcinoma. J Steroid Biochem Mol Biol. 2014 Oct;144 Pt B:513-22. doi: 10.1016/j.jsmb.2014.08.019. Epub 2014 Aug 29.

(11) Minami Y, Kawai M, Fujiya T, Suzuki M, Noguchi T, Yamanami H, Kakugawa Y, Nishino Y. : Family history, body mass index and survival in Japanese patients with stomach cancer: a prospective study. Int J Cancer. 2015 Jan 15;136(2):411-24. doi: 10.1002/ijc.29001. Epub 2014 Jun 17.

(12) Kawai M, Kakugawa Y, Nishino Y, Hamanaka Y, Ohuchi N, Minami Y. Anthropometric factors, physical activity, and breast cancer risk in relation to hormone receptor and menopausal status in Japanese women: a case-control study. Cancer Causes Control. 2013 May;24(5):1033-44. doi: 10.1007/s10552-013-0181-5. Epub 2013 Mar 14.

(13) Kawai M, Kakugawa Y, Nishino Y, Hamanaka Y, Ohuchi N, Minami Y.

Reproductive factors and breast cancer risk in relation to hormone receptor and menopausal status in Japanese women. Cancer Sci. 2012 Oct;103(10):1861-70. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02379.x. Epub 2012 Aug 8.

(14) Nomura M, Shiiba K, Katagiri C, Kasugai I, Masuda K, Sato I, Sato M, Kakugawa Y, Nomura E, Hayashi K, Nakamura Y, Nagata T, Otsuka T, Katakura R, Yamashita Y, Sato M, Tanuma N, Shima H. Novel function of MKP-5/DUSP10, a phosphatase of stress-activated kinases, on ERK-dependent gene expression, and upregulation of its gene expression in colon carcinomas. Oncol Rep. 2012 Sep;28(3):931-6. doi: 10.3892/or.2012.1862.

(15) Kawai M, Minami Y, Nishino Y, Fukamachi K, Ohuchi N, Kakugawa Y. : Body mass index and survival after breast cancer diagnosis in Japanese women. BMC Cancer. 2012 Apr 17;12:149. doi: 10.1186/1471-2407-12-149.

(16) Minami Y, Nishino Y, Kawai M, Kakugawa Y. : Being breastfed in infancy and adult breast cancer risk among Japanese women. Cancer Causes Control. 2012 Feb;23(2):389-98. doi:10.1007/s10552-011-9888-3. Epub 2011 Dec 29.

[学会発表](計 4 件)

(1) 加藤 浩之、田沼 延公、林 克剛、野村 美有樹、角川 陽一郎、山下 洋二、三浦 康、佐藤 郁郎、佐藤 雅美、渡邊 利雄、島 礼: Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis. 第 74 回日本癌学会学術総会,

(2) 角川陽一郎、西野善一、深町佳世子、河合賢朗、南 優子：婚姻状況、妊娠出産歴と乳がんの予後との関連。第22回日本乳癌学会総会、大阪、2014.7

(3) 河合賢朗、南 優子、西野善一、角川陽一郎、大内憲明：日本人女性における乳がん罹患リスク。第22回日本乳癌学会総会、大阪、2014.7

(4) 深町佳世子、角川陽一郎：乳腺基質産生癌(Matrix-producing carcinoma)の1例。第22回日本乳癌学会総会、大阪、2014.7

〔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：

出願年月日：

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

角川 陽一郎 (KAKUGAWA YOICHIRO)

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：60221173

(2) 研究分担者

深町 佳世子 (FUKAMACHI KAYOKO)

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：00626137

(3) 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

(4) 研究分担者

西野 善一 (NISHINO YOSHIKAZU)

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)・がん疫学・予防研究部・部長

研究者番号：70302099