

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430130

研究課題名(和文) PP6 KOマウスにおける著しい腫瘍促進(ホスファターゼによるゲノム安定性制御)

研究課題名(英文) Tumor promotion associated with Ppp6c-deficiency.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PP6触媒サブユニット欠損マウスを用いて、マウス皮膚化学発がん実験を行った。本欠損マウスの皮膚で、DMBAの単回処理のみで早期にパピローマが発生したことから、PP6機能低下状態では、DMBAに対して易腫瘍形成状態になることが明らかとなった。次に、環境変異原であるUVBによる影響を調べた。その結果、野生型では腫瘍形成が起こらない時期に、本欠損マウスの皮膚では、高率に基底細胞がんが発生することを見いだした。したがって、PP6触媒サブユニットは、紫外線誘発基底細胞がんの抑制遺伝子の1つであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We showed that a single DMBA application was sufficient to produce papillomas in Ppp6c-deficient skin and tumor promotion associated with Ppp6c-deficiency is more significant than that seen after repeated applications of TPA. as such, ours was the first report that Ppp6c loss-of-function acts as a tumor promoter in mice. However, it remained unclear whether (1) tumor promotion is specific to DMBA as an initiator or (2) is limited to papilloma or carcinoma formation. To answer these questions, we performed UVB induced carcinogenesis experiment. Following UVB irradiation, mice with Ppp6c-deficient keratinocytes showed a higher incidence of skin basal cell carcinoma than did control mice. UVB-induced tumors in Ppp6c-deficient keratinocytes exhibited a high frequency of both p53- and H2AX-positive cells, suggestive of DNA damage. Epidemiological and molecular data strongly suggest that Ppp6c is one of the suppressor gene for UVB-induced human skin cancers.

研究分野：総合生物

キーワード：プロテインホスファターゼ 炎症 DNA修復 ゲノム不安定性 ドライバー変異

1. 研究開始当初の背景

TCGA(The Cancer Genome Atlas)では、がん組織における遺伝子変異がリストされているが、その遺伝子産物の機能によるカテゴリー分類が報告された (Nature 2013)。そのカテゴリーの1つにプロテインホスファターゼがある。そのうち、従来からがん組織における遺伝子変異が知られているのが、SHP2 と PP2A であった。最近、新たに PP6 の触媒サブユニット (アミノ酸配列で PP2A と高い相同性を持つ分子) の変異がリストアップされてきた。

悪性黒色腫の全 exon シークエンスのデータから、PP6 触媒サブユニットの遺伝子変異が悪性黒色腫のドライバー変異として働く可能性が示唆された (Cell 2012 landscape of driver mutations in melanoma)。最新の TCGA によると、PP6 触媒サブユニット遺伝子変異は、悪性黒色腫の約 20%、および、頻度は少ないものの大腸がん、肺がん、および子宮内膜がんでも見出されること、また高頻度で同ローカスに LOH を伴うことから、PP6 触媒サブユニットの loss of function が、複数のがん種でドライバー変異の一つとして働く可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

申請者の研究室では、以前より、PPase と発がんの関係を解析してきた。特に、次頁のデータより、「PP6 触媒サブユニットの異常はゲノムの不安定性を惹起し、腫瘍化の原因となる」と仮説を立てた。その証明のためには、発がん実験が必須と考え、PP6 触媒サブユニット ノックアウト(KO)マウスを作製した。しかし、PP6 触媒サブユニットの欠失は、E7.5 の時点で胎生致死を起こしたので、conditional な KO マウスを作製し、皮膚発がん実験にて、腫瘍発生との関連を解析した。

3. 研究の方法

実験 1 . 2 段階発がん実験

タモキシフェン依存性・皮膚特異的 PP6 触媒サブユニット欠損マウスを作製した。このマウスに TAM 投与し、PP6 触媒サブユニットを欠損させた後、イニシエーターとして DMBA(100mg)を単回投与し、プロモーターとして TPA (1 µg) を週 2 回ずつ投与して、こ

れを 20 週間にわたって行い、腫瘍発生を検討した。

実験 2 . UV 誘発発がん実験

タモキシフェン依存性・皮膚特異的 PP6 触媒サブユニット欠損マウスを用いる。TAM 投与で皮膚の PP6 を欠損させた後、紫外線照射 (312nm、0.3J/cm²、隔日、50 週) を行い、紫外線発がんの有無を調べた。

4. 研究成果

実験 1 . 2 段階発がん実験

コントロールマウスでは、15 週後にパピローマの発生が認められたが、PP6 触媒サブユニット欠損マウスは、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。さらに驚くべきことには、本欠損マウスでは、DMBA 単独投与のみで、DMBA/TPA 処理とほぼ同等の腫瘍発生頻度が得られた。したがって、PP6 触媒サブユニット欠損では、DMBA に対して易腫瘍形成状態になっていることが明らかとなった。

実験 2 . UV 誘発発がん実験

皮膚特異的 PP6 触媒サブユニット欠損マウスに対して、UVB 照射を行った。その結果、野生型では腫瘍形成が起こらない時期に、基底細胞がんが発生することを見いだした。一般に、ヒトで紫外線によって発生する腫瘍においては、発生した腫瘍で高い頻度で p53 の変異が起こっていることが知られている。そこで、得られた腫瘍において p53 抗体を用いて免疫組織染色をおこなったところ、高い頻度で p53 陽性細胞が認められた。一方で、PP6 の活性が、DNA の 2 重鎖切断の修復に必須であるという報告があることから、DNA の 2 重鎖切断の局在を、そのマーカーである H2AX を用いて調べた。その結果、p53 陽性細胞と H2AX の陽性細胞が高い頻度で共存した。このことから、PP6 触媒サブユニット欠損による DNA 修復異常が、紫外線発癌の原因の 1 つになると考えられた。

最近、皮膚基底細胞癌の患者の約 20%程度に PP6 触媒サブユニット遺伝子変異が報告された (Nature Genetics 2016)。このことから、PP6 触媒サブユニット遺伝子が、新たな皮膚がん抑制遺伝子であると考えられた。

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 15 件)

1. Yoshimaru T, Shima H, et al.
A-kinase anchoring protein BIG3 coordinates oestrogen signaling in breast cancer cells.
Nat. Commun. in press
2. Shiroki T, Shima H, Sato I, et al.
The enhanced expression of PKM2 is involved in the gastric cancer development via regulating cancer specific metabolism.
Cancer Science in press
3. Miura K, Shima H, et al.
Drug delivery of oral anti-cancer fluoropyrimidine agents.
Expert Opinion on Drug Delivery in press
4. Matsuda Y, Shima H, et al.
SERPIN11 regulates the epithelial-mesenchymal transition in an orthotopic implantation model of colorectal cancer.
Cancer Sci. 107(5):619-28, 2016
5. Ogoh H, Shima H, et al.
The protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis.
Mech Dev. 139:1-9, 2016
6. Matsuda S, Shima H, et al.
Nuclear pyruvate kinase M2 complex serves as a transcriptional coactivator of arylhydrocarbon receptor.
Nucleic Acids Res. 44(2):636-47, 2016
7. Kato H, Yamashita Y, Sato I, Shima H, et al.
Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis.
Cancer Lett. 365(2):223-8, 2015
8. Sumiyoshi M, Shima H, et al.
Mice doubly-deficient in the Arf GAPs SMAP1 and SMAP2 exhibit embryonic lethality.
FEBS Lett. 589(19 Pt B):2754-62, 2015
9. Konno M, Shima H, et al.
Embryonic microRNA-369 controls metabolic splicing factors and urges cellular reprogramming.
PLoS One. Jul 15;10(7):e0132789, 2015
10. Hayashi K, Yamashita Y, Sato I, Shima H, et al.
Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA.
Oncogene, 34(35): 4647-55, 2015
11. Yamamoto K, Shima H, et al.
Potentiation of Epidermal Growth Factor-Mediated Oncogenic Transformation

by Sialidase NEU3 Leading to Src Activation.
PLOS ONE, 10(3): e0120578, 2015

12. Takahashi K, Sato I, Shima H, et al.
Sialidase NEU3 contributes neoplastic potential on colon cancer cells as a key modulator of gangliosides by regulating Wnt signaling.
Int J Cancer, Oct 1;137(7):1560-73, 2015
13. Konno M, Shima H, et al.
Pyruvate kinase M2, but not M1, allele maintains immature metabolic states of murine embryonic stem cells.
Regenerative Therapy 1, 63-71, 2015
14. Nakahata S, Shima H, et al.
Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers.
Nat Commun. 5:3393, 2014
15. Hamabe A, Shima H, et al.
Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition.
Proc Natl Acad Sci U S A. 111(43):15526-31, 2014

[学会発表](計 39 件)

1. 盛田麻美、野村美有樹、坂本良美、伊藤しげみ、井上維、佐藤郁郎、田中遼太、松本祥子、岸本綾子、渡邊利雄、島礼、田沼延公
起源細胞での PKM スイッチが、腫瘍細胞のブドウ糖代謝様式を規定する
第 10 回オートファジー研究会
2016.11.13-15(新潟県・越後湯沢)
2. 盛田麻美、野村美有樹、坂本良美、伊藤しげみ、井上維、佐藤郁郎、田中遼太、松本祥子、岸本綾子、渡邊利雄、島礼、田沼延公
A PKM switch in precursors dictates mode of tumor cell glucose metabolism
起源細胞での PKM スイッチが、腫瘍細胞のブドウ糖代謝様式を規定する
第 39 回日本分子生物学会年会
2016.11.30-12.2(神奈川県・横浜市)
3. 野村美有樹、盛田麻美、坂本良美、伊藤しげみ、佐藤郁郎、島礼、前門戸任、田沼延公
Targeting metabolism of small cell lung cancer (SCLC)
小細胞肺がんの代謝特性と、その標的化戦略
第 39 回日本分子生物学会年会
2016.11.30-12.2(神奈川県・横浜市)
4. 黒沢是之、田沼延公、角川陽一郎、山下洋二、三浦康、山田秀和、佐藤郁郎、野村美有樹、渡利雄、島礼
新規皮膚がん抑制遺伝子 Ppp6c 変異は、変異型 K-RAS による腫瘍発生を強く促進する。
第 75 回日本癌学会学術総会
2016.10.6-8(神奈川県・横浜市)

5. 田中遼太、渡邊利雄、山下洋二、三浦康、佐藤郁郎、島礼、田沼延公、PKM ノックアウトマウスは胎生致死となる
第 75 回日本癌学会学術総会
2016.10.6-8 (神奈川県・横浜市)

6. 佐藤卓、坂本良美、野村美有樹、井上維、盛田麻美、田中遼太、渡邊利雄、佐藤郁郎、島礼、岡田克典、田沼延公
Functional analysis of the pyruvate kinase M(Pkm) isoforms by transformation experiments of mouse lungs epithelia cells
第 75 回日本癌学会学術総会
2016.10.6-8 (神奈川県・横浜市)

7. 盛田麻美、野村美有樹、坂本良美、佐藤郁郎、島礼、前門戸任、田沼延公
小細胞肺がんにおける Pkm1 の役割
第 75 回日本癌学会学術総会
2016.10.6-8 (神奈川県・横浜市)

8. 佐藤卓、坂本良美、野村美有樹、井上維、盛田麻美、田中遼太、渡邊利雄、佐藤郁郎、島礼、岡田克典、田沼延公
遺伝子改変肺上皮細胞を用いた形質転換実験による、代謝酵素 Pkm の機能解析
第 89 回日本生化学会大会
2016.9.25-27 (宮城県・仙台市)

9. 盛田麻美、野村美有樹、坂本良美、伊藤しげみ、佐藤郁郎、島礼、前門戸任、田沼延公
小細胞肺がんにおける Pyruvate kinase M の発現と機能解析
第 89 回日本生化学会大会
2016.9.25-27 (宮城県・仙台市)

10. 田中遼太、小河穂波、井上維、山下洋二、三浦康、河合賢郎、佐藤郁郎、渡邊利雄、島礼、田沼延公
Pyruvate kinase M の両 isoform を欠損するマウスの解析
第 89 回日本生化学会大会
2016.9.25-27 (宮城県・仙台市)

11. 山本晃司、高橋耕太、塩崎一弘、山口壹範、島礼、宮城妙子
形質膜シグナルリグドによる EGFR シグナリングの活性化機構
第 89 回日本生化学会大会
2016.9.25-27 (宮城県・仙台市)

12. 渡邊利雄、園部なな子、生田優希、小河穂波、宮本可南子、丹賀直美、鈴木麻衣、西川紗織、新谷隆史、島礼
遺伝子改変マウスを用いた Arf1 の胚発生での機能と神経系での機能の解析の試み
第 89 回日本生化学会大会
2016.9.25-27 (宮城県・仙台市)

13. 島礼、黒沢是之、小河穂波、桃井勇貴、井上維、田沼延公、渡邊利雄
発がんプロモーターオカダ酸の標的、PP6 の皮膚がん抑制遺伝子としての意義
第 89 回日本生化学会大会
2016.9.25-27 (宮城県・仙台市)

14. 黒沢是之、後藤孝浩、島礼、館正弘
新規皮膚がん抑制遺伝子 Ppp6c 変異は、変異型 K-RAS による腫瘍発生を強く促進する。
第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会
2016.9.15-16 (大阪府・大阪市)

15. 盛田麻美、野村美有樹、坂本良美、佐藤郁郎、島礼、前門戸任、田沼延公
小細胞肺がんにおける新規分子標的の開拓
第 8 2 回日本生化学会東北支部例会
2016.05.21-22, 弘前大学 (青森県・弘前市)

16. Hiroshi Shima, Koreyuki Kurosawa, Honami Ogoh, Yui Inoue, Takahiro Goto, Nobuhiro Tanuma, Toshio Watanabe
Ppp6c deficiency predisposes mouse skin tissue to carcinogenesis initiated by DMBA and UV.
The 13th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, Jeju, Korea
2016. 02.25-27

17. 黒沢是之、桃井勇貴、井上維、小河穂波、後藤孝浩、田沼延公、渡邊利雄、島礼
脱リン酸化酵素 PP6 は、皮膚がん抑制遺伝子である
第 7 回 日本プロテインホスファターゼ研究会 学術集会
2016 年 1 月 29 日 (金) - 30 日 (土) 岡崎

18. 小河穂波、田沼延公、早川夏姫、住吉麻実、鈴木麻衣、井上維、野村美有樹、島礼、渡邊利雄
脱リン酸化酵素 PP6 の触媒サブユニットの Ppp6c は着床後の胚の正常な発生に不可欠である
第 7 回 日本プロテインホスファターゼ研究会 学術集会
2016 年 1 月 29-30 日 (岡崎)

19. 大塚瑞希、住吉麻実、増田成美、早川夏姫、小河穂波、田沼延公、島礼、渡邊利雄
Arf GTPase 活性化因子 SMAP2 の欠損は EGF の取り込み後の輸送の異常を引き起こすのか
BMB2015 (第 3 8 回日本分子生物学会年会 第 8 8 回日本生化学会大会合同大会) 神戸
2015.12.1-4

20. 稲垣綾華、早川夏姫、住吉麻実、生田優希、鈴木麻衣、小河穂波、田沼延公、島礼、渡邊利雄
Arf1 欠損 MEF 細胞の作製と引き起こされる異

常の解析

BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会
第88回日本生化学会大会合同大会) 神戸
2015.12.1-4

21. 渡邊利雄、小河穂波、田沼延公、早川夏
姫、住吉麻実、岸本綾子、松居泰久、鈴木麻
衣、佐々木希、大内司、野村美有樹、照屋由
里子、安田恵子、島礼

The protein phosphatase 6 catalytic
subunit (Ppp6c) is indispensable for
proper post-implantation embryogenesis.

BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会
第88回日本生化学会大会合同大会) 神戸
2015.12.1-4

22. 島礼、黒沢是之、井上唯、小河穂波、加藤浩
之、田沼延公、渡邊利雄

皮膚 Ppp6c 欠損マウスは、化学発がんおよび
UVB 誘導発がんを高感受性となる

BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会
第88回日本生化学会大会合同大会) 神戸
2015.12.1-4

23. 黒沢是之、後藤孝浩、田沼延公、加藤浩
之、佐藤郁郎、伊藤しげみ、島礼、館正弘
紫外線誘導皮膚がんにおいて、PP6 はがん抑
制遺伝子として働く

第24回日本形成外科学会基礎学術集会 盛
岡

開催期間 2015/10/8-9 発表日 10/8

24. 白木健悠、横山美沙、田沼延公、玉井恵
一、山口壹範、佐藤郁郎、田中伸幸、菅村和
夫、佐藤賢一

ピルビン酸キナーゼ M2(PKM2)は正常胃粘膜
で有意に発現しており、その発現増強が胃癌
の進展に関与している

第74回 日本癌学会学術総会

2015.10.8-10 (名古屋)

25. 浜部敦史、今野雅允、山本浩文、水島恒
和、竹政伊知朗、田沼延公、島礼、西田尚弘、
川本弘一、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始
上皮間葉移行におけるピルビン酸キナーゼ
M2 の遺伝子発現制御機能

第74回 日本癌学会学術総会

2015.10.8-10 (名古屋)

26. 野村美有樹、坂本良美、佐藤郁郎、三浦
康、椎葉健一、山下洋二、島礼、田沼延公
発生や細胞分化・細胞老化に伴う、ピルビン
酸キナーゼ M アイソフォームの発現制御

第74回 日本癌学会学術総会

2015.10.8-10 (名古屋)

27. 今野雅允、田沼延公、西田尚弘、川本弘
一、小関準、後藤典子、島礼、土岐祐一郎、
森正樹、石井秀始

マイクロ RNA369 はピルビン酸キナーゼのス
プライシングを制御する

第74回 日本癌学会学術総会

2015.10.8-10 (名古屋)

28. 三浦康、島礼、佐藤賢一、山口壹範、田
沼延公、角川陽一郎、佐藤正幸、木内誠、山
本久仁治、長谷川康弘、河合賢朗、大沼忍、
藤谷恒明、

大腸癌における天然物を用いた抗がん剤開
発の現況

第74回 日本癌学会学術総会

2015.10.8-10 (名古屋)

29. 加藤浩之、田沼延公、三浦康、角川陽一
郎、椎葉健一、山下洋二、林克剛、野村美有
樹、佐藤郁郎、伊藤しげみ、渡邊利雄、島礼
皮膚 Ppp6c 欠損マウスは、UVB 誘導皮膚扁平
上皮発がんを高感受性となる

第74回 日本癌学会学術総会

2015.10.8-10 (名古屋)

30. Yui Inoue, Hiroyuki Kato, Koreyuki
Kurosawa, Nobuhiro Tanuma, Honami Ogoh,
Toshio Watanabe, and Hiroshi Shima

PP6 deficiency potentiates

ultraviolet-B-induced skin

carcinogenesis

10th Mechanisms and Models of Cancer 2015
San Diego 2015, 08, 07

31. 加藤浩之、田沼延公、黒沢是之、井上唯、
林克剛、小河穂波、野村美有樹、渡邊利雄、
島礼

UVB 照射により、Ppp6c 欠損では、高頻度に
皮膚扁平上皮癌が発生する

第81回日本化学会東北支部例会

2015.5.9 (仙台) ポスター発表

32. Nomura M, Sakamoto Y, Ito S, Katakura
R, Shiiba K, Matsumoto S,
Watanabe T, Shima H, Tanuma N

細胞分化や老化に伴う、ピルビン酸キナーゼ
M アイソフォームの発現

第37回 日本分子生物学会年会

2014.11.25-27 (横浜) 発表日 2014.11.26
口頭、ポスター

33. Ogoh,H., Tanuma,N., Hsyashi,K.,
Momoi,Y., Sumiyoshi,M., Hayakawa,N.,
Kishimoto,A., Matsui,Y., Suzuki,M.,
Kato,H., Sakamoto,Y., Inoue,Y., Nomura,M.,
Kakugawa,Y., Yamashita,Y., Sasaki,N.,
Ito,I., Suzuki,A., Nishino,M.,
Suganuma,M., Kiyonari,H., Watanabe,T and
Shima,H.

Ppp6c deficiency leads to embryonic

lethality and promotes skin

carcinogenesis induced by DMBA.

11th ICPP,sendai,2014.11

34. Takeharu Shi roki I , Misa Yokoyama , Nobuhi

roTanuma, Keiichi Tamai, Kazunori Yamaguchi, Ikuro Sato, Hiroshi Shima, Nobuyuki Tanaka, Kazuo Sugamura, Kennichi Satoh
PKM2 is dominantly expressed in normal gastric mucosa and its overexpression is involved in gastric cancer development.
11th ICPP November 12-14, 2014

35. Yoshimi Sakamoto, Miyuki Nomura, Shoko Matumoto, Yui Inoue, Toshio Watanabe, Hiroshi Shima, Nobuhiro Tanuma
Novel mouse models to dissect isoform-specific functions of pyruvate kinase M.
11th ICPP November 12-14, 2014

36. Miyuki Nomura, Yoshimi Sakamoto, Ryota Tanaka, Mami Morita, Taku Sato, Toshiro Watanabe, Hiroshi Shima, Nobuhiro Tanuma
Roles for pyruvate kinase M in metabolic rewiring during cellular senescence
11th ICPP November 12-14, 2014

37. 坂本良美、野村美有樹、佐藤郁郎、三浦康、椎葉健一、山下洋二、渡邊利雄、島礼、田沼延公
Characterization of mice expressing a single isoform of pyruvate kinase M
第73回 日本癌学会学術総会
2014.9.25-27(横浜) 発表日 2014.9.26 プログラム集 p206

38. 林克剛、田沼延公、渡邊利雄、佐藤郁郎、野村美有樹、山下洋二、角川陽一郎、島礼
PP6 皮膚特異的欠損マウスは、DMBA 誘発皮膚発がんを高感受性をしめす
第73回 日本癌学会学術総会
2014.9.25-27(横浜) 発表日 2014.9.25

39. 林克剛、小河穂波、岸本綾子、加藤浩之、田沼延公、渡邊利雄、島礼
Ppp6c 遺伝子欠損は、マウス皮膚腫瘍形成を促進する。
第80回日本化学会東北支部会
2014.5.10(秋田) 口頭発表

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

山下 洋二 (YAMASHITA, Youzi)
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：30420045

佐藤 郁郎 (SATO, Ikuro)
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)・ティッシュバンクセンター・センター長
研究者番号：50225918