

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19745

研究課題名(和文)新規皮膚がん抑制遺伝子Ppp6c変異は、変異型RASによる腫瘍発生を強く促進する

研究課題名(英文)Ppp6c deletion promotes mutated RAS-initiated tumor formation in keratinocytes.

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：TAM(タモキシフェン)により、扁平上皮特異的に変異誘導可能マウス(2重変異(変異型KRAS+Ppp6欠損)と変異型KRAS)を作製し発がん実験を行った。2重変異マウスでは、TAM投与後7日以内で全例口唇にパピローマを形成し、16-18日後にはパピローマの一部にcarcinoma in situが認められた。変異型KRASマウスでは、腫瘍の発生は50日以降であった。腫瘍発生までの表皮の厚さを経時的に解析した。2重変異マウスでは、変異型KRASマウスに対して、TAM投与後12日目で42倍に増加した。ケラチノサイトにおいて、PP6機能不全は、活性化KRASの腫瘍形成能を強くドライブした。

研究成果の概要(英文)：To assess effects of PP6 loss on activated K-ras-induced tumorigenesis in keratinocytes, we established K14-CreERTam/LSL-K-rasG12D/Ppp6cflox/flox mice (exhibiting epidermal-specific tamoxifen-inducible K-rasG12D expression plus Ppp6c deficiency) and K14-CreERTam/LSL-K-rasG12D mice (which showed only epidermal-specific tamoxifen-inducible K-rasG12D expression). Ten independent 4HT-treated K14-CreERTam/LSL-K-rasG12D/Ppp6cflox/flox mice developed lip tumors. Microscopic analysis of lip tumor tissue from the mouse indicated hyperkeratotic papillomatous proliferative lesions. It is noteworthy that a region of squamous cell carcinoma in situ (CIS) sacrificed between days 16 to 20. To examine lip epidermis growth, we measured tissue thickness at 4, 8 and 12 days after 4HT injection. The ratio of lip thickness of K14-CreERTam/LSL-K-rasG12D/Ppp6cflox/flox to that of K14-CreERTam/LSL-K-rasG12D mice was 2.3, 24 and 42, at days 4, 8 and 12, respectively.

研究分野：医歯薬学

キーワード：プロテインホスファターゼ Kras

1. 研究開始当初の背景

(1) マウス 2 段階皮膚がん実験において、セリン-スレオニン脱リン酸化酵素の阻害が、発がんをプロモーションすることが報告された：

下痢を起こす貝毒として同定されたオカダ酸が、DMBA によるマウス皮膚 2 段階発癌実験で、腫瘍プロモーターとして働くことが、1989 年に国立がんセンターの藤木部長らにより報告された。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明らかとなった。このことは、「未同定の脱リン酸化酵素」が、マウス皮膚がんの系で、がん抑制作用を持つことを示唆した。しかし、それが何かは謎であった。

(2) 新規皮膚がん抑制遺伝子の同定：

応募者らは、(1) の謎を解くことから、皮膚腫瘍発生の新しい分子機構を解明しようと考えた。これまでの生化学的解析から、オカダ酸に高い感受性をもつ脱リン酸化酵素の中の一つである PP6 に注目した。PP6 は、細胞内で触媒サブユニット (*Ppp6c*) と制御サブユニットからなる複合体として存在する酵素である。応募者らは、*Ppp6c* を欠損するマウスを作製した。その皮膚特異的に *Ppp6c* を欠損させたマウスを用いて、皮膚 2 段階皮膚がん実験を行った結果、*Ppp6c* を欠損すると早期にパピローマを発生することが分かった。したがって、*Ppp6c* が、DMBA による皮膚化学発がんの抑制遺伝子であることが示唆された。

(3) 新規皮膚がん抑制遺伝子の同定：

次に、応募者らは、ヒト皮膚腫瘍の主な原因は紫外線であることから、(2) で作成した *Ppp6c* を欠損するマウスを用いて紫外線の影響を調べた。UVB (週 3 回照射) 30 週の投与を行った結果、正常皮膚では腫瘍は出来なかったが、*Ppp6c* 欠損皮膚では扁平上皮癌が多発することを見いだした。したがって、*Ppp6c* が、皮膚 UV 発がんの抑制遺伝子であることが示唆された。

(4) *Ppp6c* が、新規メラノーマがん抑制遺伝子である可能性がある：

2012 年に、米国の 2 つのグループが、メラノーマ組織の約 10 % に *Ppp6c* 遺伝子変異 (LOH を伴う) があり、かつその変異は *N-ras* または *B-raf* 変異と共存することを発表した。この事は、PP6 の機能喪失が、*N-ras* または *B-raf* 変異と共に、悪性黒色腫発生に働いている可能性を示唆するものだった。

2. 研究の目的

仮説「*Ppp6c* は変異型 RAS による腫瘍化を制御する因子」の検証

応募者らの行った上記 (2) の研究において、DMBA 投与によって得られた腫瘍には、全例 H-ras 変異が認められた。また、上記 (4) の報

告でヒト悪性黒色種では、*Ppp6c* 欠損と N-ras が共存していることが示されている。従って、PP6 には、活性化 RAS による腫瘍化を抑える働きがあるのではという仮説をたてた。この検証が、本研究の目的である。

3. 研究の方法

2 重変異 (変異型 KRAS と *Ppp6c* 欠損) 導入に

よる発がん実験：

TAM (タモキシフェン) により、扁平上皮特異的に、以下の変異を誘導できる 3 種類のマウス (2 重変異 (変異型 KRAS + *Ppp6c* 欠損) マウス：*K14-Cre^{TAM}; Kras^{LSL-G12D/+}; Ppp6c^{fllox/fllox}* 変異型 KRAS マウス：*K14-Cre^{TAM}; Kras^{LSL-G12D/+}; Ppp6c^{+/+}* *Ppp6c* 欠損マウス：*K14-Cre^{TAM}; Kras^{+/+}; Ppp6c^{fllox/fllox}*) を作製し、発がん実験を行った。それぞれ、8 週齢のマウスを、統計的に有意な匹数 (各々 10 匹、雄雌 5 匹ずつ) にて TAM 投与による変異の導入を行い、体重が 20% 減になったところで安楽死させ、発生した腫瘍の数、大きさ、組織像を解析した。

組織の肥厚・腫瘍化の経時的解析による、過形成能亢進のメカニズムの解明：

のマウスを用いて、腫瘍発生までの組織変化を経時的に解析した。予備の実験により、マウスの腫瘍形成は誘導開始より 1 週間以内に始まることが確認されたので、誘導開始前 (0 日目)、開始後 4, 8, 12 日目の口唇および指の組織を採取した。採取した口唇組織を用いて、活性化がん遺伝子によって生じる「細胞増殖・細胞老化・シグナル経路活性化の変化」に対する *Ppp6c* 欠損の影響を検討した。特に「ERK 経路、AKT 経路経路の活性化状態」についての分析・解析を行った。

4. 研究成果

応募者らは、TAM 処理により扁平上皮に変異型 KRAS、または 2 重変異 (変異型 KRAS と *Ppp6c* 欠損の両方) を有するマウスを作製した。その結果、2 重変異マウスでは、変異型 KRAS のみの変異をもつマウスに比べて、著しく早期から腫瘍ができることを見いだした。TAM 投与後 7 日以内で、2 重変異マウスでは全例、口唇、乳頭、手足、外生殖器、肛門にパピローマを形成し、14 から 18 日後にはパピローマの一部に carcinoma in situ (CIS) の局在が認められ、CIS 組織では多数の核分裂異常を認めた。20 日目以内には急激な体重減少による安楽死処置となった。一方で、変異型 KRAS のみを有するマウスでは、腫瘍の発生は 50 日以降に認められ、100 日後に体重減少を起こす個体はなかった。

次に、上記に用いたマウスを用いて、腫瘍発

生までの組織変化を経時的に解析した。口唇表皮の TAM 処理後 0 日、4 日、8 日、12 日の厚さを調べた。変異型 KRAS のみを有するマウスでは 12 日間ほとんど野生型のそれと同様に変化が認められなかったが、2 重変異マウスでは、4 日目で 2.3 倍、8 日目で 24 倍、12 日目で 42 倍と急激に増加した。12 日目において、3 つのゲノタイプにおける基底細胞の断面積を比較したところ、野生型と変異型 KRAS のみを有するマウスでは同じサイズであったが、2 重変異マウスでは 2.3 倍であり、細胞のサイズ増大があることが分かった。また、免疫組織染色を行うことで、各々の腫瘍の AKT のリン酸化状態を調べた。その結果、2 重変異マウスでは、変異型 KRAS のみの変異をもつマウスに比べて AKT のリン酸化レベルが著しく亢進していた。一方、ERK のリン酸化は大きな差がなかった。

以上の事から、ケラチノサイトにおいて、PP6 の機能不全は、活性化 KRAS の腫瘍形成能を強くドライブすることが示された。加えて、そのメカニズムとして、AKT 経路の活性化亢進が示唆された。

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 4 件)

1. 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, and Shima H. Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-ras^{G120}-driven tumor promotion. Cancer Science in press 査読有

2. Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama KI, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M, Tanuma N. PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth. 査読有 Cancer Cell. 33(3): 355-367.e7, 2018

3. Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe J, Takahashi S, Kawai M, Sato M, Hippo Y, Shima H, Okada Y, Tanuma N. Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. Oncol Lett. 14(6):6863-6868, 2017 査読有

4. Kato H, Kurosawa K, Inoue Y, Tanuma N, Momoi Y, Hayashi K, Ogoh H, Nomura M, Sakayori M, Kakugawa Y, Yamashita Y, Miura K, Maemondo M, Katakura R, Ito S, Sato M, Sato I, Chiba N, Watanabe T, Shima H. Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced arcinogenesis. Cancer Lett. 365(2):223-8, 2015 査読有 doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.022.

[学会発表](計 4 件)

1. 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)

2. 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)

3. 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)

4. 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)

[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：
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

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