

令和元年6月25日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16876

研究課題名(和文) 卵巣がんの新規治療標的-BRCA1修復システムに属するがん抑制遺伝子

研究課題名(英文) A protein phosphatase, which is involved BRCA1 dependent DNA repair.

研究代表者

野村 美有樹 (Nomura, Miyuki)

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・研究技師

研究者番号：40390893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：プロテインホスファターゼ6型の触媒サブユニット(Ppp6c)が、BRCA1の複合体の中に含まれることを見出した。さらに脱リン酸活性を持たない変異型Ppp6cはより強く結合することを見いだした。Ppp6cのloss of functionが、卵巣がんの発生を亢進させるかどうかを明らかにするために、マウス卵巣表層上皮細胞において、2重変異(変異型KrasとPpp6cのホモ欠損)を導入した。しかし、用いた条件下では、2重変異による卵巣がんの発生は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BRCA1の異状またはBRCA1が含まれるDNA修復マシナリーの異状が卵巣がんの発生・悪性化の原因となっていることが示唆されている。この病態においては、ポリADPリボース合成酵素阻害剤(PARP1)の投与が奏功する。一方で、PARP1とは異なる機序での治療法の開発が求められている。PP6によるBRCA1のリン酸化による調節は、新たな治療標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The tumor suppressor BRCA1 is implicated in homologous recombination, however how BRCA1 is regulated by phosphorylation is not clarified. To get a clue which phosphatase is involved in ovarian carcinogenesis, we screened Prognoscan. The cohort experiment of ovarian cancer (Australia, DATASETGSE9891) suggested that patients with lower Ppp6c expression showed worse prognosis, suggesting that Ppp6c might possess suppressor activity to ovarian cancer. We then co-transfected performed BRCA1 with Ppp6c into cells, and found that BRCA1 is present in Ppp6c immunocomplex, and Ppp6c is present in BRCA1 immunocomplex. To testify whether Ppp6c function as tumor suppressor, we first used mouse skin carcinogenesis system. Doubly-mutant (K-rasG12D-expressing and Ppp6c-deficient) mice showed early onset tumor formation in the skin than K-rasG12D-expressing mice, suggesting that Ppp6c function as tumor suppressor in the mouse skin.

研究分野：発がん、卵巣腫瘍

キーワード：プロテインホスファターゼ BRCA1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は進行した状態で発見されることが多く、根治が難しい癌である。卵巣がんのうち、BRCA 変異陽性を含む、DNA 相同組換え修復機構に異常をもつがんにおいては、PARP 阻害剤(PARPI)が有効であるとされる。一方、PARPI に耐性をもつ卵巣癌の症例の場合は、全く新しい機序による治療法の開発が望まれる。BRCA はリン酸化タンパクであるが、現在のところそのリン酸化による機能制御は殆ど知られていない。

2. 研究の目的

我々は BRCA のリン酸化に関わるキナーゼまたはホスファターゼの異常が、卵巣癌の発生の原因となる可能性を想定した。ホスファターゼ側からの手がかりを得るため、プログノスキャンを用いて、卵巣がんの予後不良と関連するホスファターゼを調べたところ、プロテインホスファターゼ 6 型の触媒サブユニット(Ppp6c)発現低下が悪性化と相関するデータを見出した。我々は、以下の仮説をもった「PP6 の基質はリン酸化 BRCA であり、PP6 の loss of function が BRCA の過剰なリン酸化をおこし、DNA 相同組換え修復に異常をきたして、発がんの原因となる。」本研究は、この仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞に Ppp6c と BRCA1 を発現させ、その結合を調べる。

(2) マウス皮膚において 2 重変異(変異型 KRAS と Ppp6c 欠損)を誘導し、腫瘍の発生の有無を調べる。

(3) マウス卵巣において 2 重変異(変異型 KRAS と Ppp6c 欠損)を誘導し、腫瘍の発生の有無を調べる。

4. 研究成果

(1) BRCA1 は、卵巣がんや乳がんに関連するがん抑制遺伝子である。BRCA1 は、DNA 修復タンパクを束ねて DNA 修復に働く。PP6 と BRCA1 の関係を調べるため、Ppp6c(PP6 の触媒サブユニット)と BRCA1 を細胞に共発現させたところ、Ppp6c が BRCA1 に結合すること、さらに脱リン酸化活性を持たない変異型 Ppp6c はより強く結合することを見いだした。このデータは、PP6 が BRCA1 の脱リン酸化を制御すること。PP6 の失活は BRCA1 の過剰リン酸化を起こすことを示唆し、PP6 活性の低下が、BRCA1 の異常を起こし、卵巣がんや乳がんの発生の原因となるのではと考えた。

(2) 申請者らは、Ppp6c 欠失マウスの作製を試み、胎生致死であることが分かった。そこで、Ppp6c を conditional に欠失できるマウス(Ppp6c flox/flox)を作製した。一般に、がん抑制遺伝子の同定には、簡便かつ信頼性のある皮膚発がん実験の系が使われている。まずこの系を使って検証を行うことにした。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 K14CREtam:KrasLSL-G12V/+ ; Ppp6c flox/flox を作成した。マウスの皮膚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腫瘍が発生することがわかった。このことは、少なくとも皮膚がんでは、Ppp6c が、がん抑制遺伝子として働くことを示した。

(3) (2) の実験結果をうけて、Ppp6c が、卵巣がんの抑制遺伝子として働くか否かを調べた。卵巣に 2 重変異(変異型 KRAS と Ppp6c 欠損)または KRAS 変異のみを導入させるために、Ppp6c flox/flox; KrasLSL-G12D/+ マウスまたは KrasLSL-G12D/+ マウスを用いた。それぞれ、開腹手術により卵管漏斗を介して、Ade-CRE を感染させることで、卵巣表層上皮細胞に 2 重変異または KRAS 変異を導入させことにした。Ade-CRE は、8 週齢時と 12 週齢時に投与し、2 重変異、KRAS 変異、Ppp6c 欠損、野生型とそれぞれ 10 匹づつ検討した。その結果、4 つのゲノタイプをもつマウスにおいて、全く腫瘍形成が認められなかった。卵巣の腫瘍形成においては、Ppp6c 欠損の意義を明らかにすることはできなかった。今後は、卵巣特異的なプロモーターを上流に CRE を発現させる系や、KRAS 以外のがん遺伝子を用いて再検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Kurosawa K, Inoue Y, Kakugawa Y, Yamashita Y, Kanazawa K, Kishimoto K, Nomura M, Momi Y, Sato I, Chiba N, Suzuki M, Ogoh H, Yamada H, Miura K, Watanabe T, Tanuma N, Tachi M, Shima H. : Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-ras^{G12D}-driven tumor promotion. *Cancer Sci.*109(7):2178-2187.2018.doi: 10.1111/cas.13638.

査読有

Taku Sato, Mami Morita, Miyuki Nomura & Nobuhiro Tanuma: Revisiting glucose metabolism in cancer: lessons from a PKM knock-in model. *Mol Cell Oncol*.5(4):e1472054,2018. doi: 10.1080/23723556.2018.1472054. 査読有

Miyuki Nomura, Mami Morita and Nobuhiro Tanuma: A metabolic vulnerability of small-cell lung cancer. *Oncotarget*.9(64):32278-32279,2018. doi:10.18632/oncotarget.25964. 査読有

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 and Tanuma N: PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth. *Cancer cell*, 33(3):355-367,2018. 査読有

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. *Oncology Letters*.*Oncol Lett*.14(6):6863-6868,2017. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

田沼延公、野村美有樹、福原達郎、坂本良美、島礼、本橋ほづみ、紙健次郎、13C グルコースを使ったマウス個体での in vivo トレーサー解析、生化学会東北支部会、2018.5.19(岩手)

野村美有樹、盛田麻美、坂本良美、島礼、田沼延公、活性型 P km1 - P km2 ヘテロ複合体の形成、第 77 回日本癌学会学術総会、2018.9.27-29(大阪)

黒沢是之、野村美有樹、角川陽一郎、山下洋二、三浦康、山田秀和、松浦一登、佐藤郁郎、田沼延公、渡邊利雄、島礼、Ppp6c は、マウス皮膚のがん抑制遺伝子として働く、第 76 回日本癌学会学術総会、2017.9.28-30(横浜)

盛田麻美、野村美有樹、坂本良美、佐藤卓、田中遼太、福原達朗、佐藤郁郎、中山敬一、前門戸任、島礼、田沼延公、肺神経内分泌腫瘍(NET)における治療標的候補としての Pkm1、第 76 回日本癌学会学術総会、2017.9.28-30(横浜)

野村美有樹、佐藤卓、盛田麻美、坂本良美、田中遼太、三浦康、河合賢朗、佐藤郁郎、島礼、田沼延公、Pkm1 と Pkm2 の機能解析-非小細胞肺がん(NSCLC)での検討、第 76 回日本癌学会学術総会、2017.9.28-30(横浜)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。