

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2015

課題番号：15H05998

研究課題名(和文)皮膚悪性腫瘍におけるPCTAIRE1の発現解析と結合蛋白の同定

研究課題名(英文)Critical functions for PCTAIRE1 kinase in skin cancer

研究代表者

柳 輝希 (Yanagi, Teruki)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：50755973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：PCTAIRE1/CDK16/PCTK1は、精子形成に関与するサイクリン依存性酵素である。我々は悪性腫瘍の増殖における機能を解明してきたが、皮膚有棘細胞癌(SCC)における機能は不明であった。Tet誘導性shRNAにてSCC細胞のPCTAIRE1遺伝子をノックダウンしたところ、癌細胞の増殖抑制がみられた。FACS解析では、G2/M期での細胞周期の停止およびアポトーシスを引き起こすことが示された。臨床的には、皮膚SCCでは、周囲の正常皮膚組織に比べ、癌組織においてPCTAIRE1の発現が亢進していた。以上より、PCTAIRE1は腫瘍増殖において重要な役割を担うことが示された。

研究成果の概要(英文)：PCTAIRE1/CDK16/PCTK1 is a distant relative of the cyclin-dependent kinase family that has been implicated in spermatogenesis and neuron development. The function of PCTAIRE1 in tumorigenesis, however, has not been clarified. In prostate, breast, cervical cancer and melanoma cell lines, gene knockdown of PCTAIRE1 using siRNA or shRNA diminished cancer cell proliferation, causing aberrant mitosis with defects in centrosome dynamics. Yeast two-hybrid cDNA library screening identified tumor suppressor p27 as a PCTAIRE1 interactor, and in vitro kinase assays showed PCTAIRE1 phosphorylates p27 at Ser10. Moreover, knockdown of p27 rescued PCTAIRE1 knockdown cells from mitotic arrest. Clinically, in primary tumors from patients with breast or prostate cancers, PCTAIRE1 was highly expressed in malignant lesions compared to adjacent normal epithelial tissues. Our findings reveal an unexpected role for PCTAIRE1 in regulating p27 stability, mitosis and tumor growth.

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：皮膚腫瘍 RNA干渉 悪性黒色腫 有棘細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

PCTAIRE1 は、Cyclin-dependent kinase family に属し、ノックアウトマウスや RNA 干渉を用いた研究から、精子形成と神経細胞の伸長に働くことが示唆されてきた。しかしながら、癌細胞における研究はされておらず、研究代表者は世界で初めて悪性腫瘍における PCTAIRE1 の機能を明らかにした (**Yanagi et al. Cancer Res 2014, Oncoscience 2014, Cell cycle 2015**)。応募者は、RNA 干渉を用いて悪性腫瘍(前立腺癌・乳癌・黒色腫)における PCTAIRE1 の機能について検討し、PCTAIRE1 が悪性腫瘍の増殖(細胞周期の進行)において不可欠であること、PCTAIRE1 は腫瘍抑制分子 p27 の Ser10 をリン酸化し、p27 の分解を促進すること、PCTAIRE1 は正常組織に比べ癌細胞(前立腺癌・乳癌)でより発現が亢進していることを明らかにした。

皮膚悪性腫瘍には悪性黒色腫や血管肉腫等の予後の悪い腫瘍が含まれ、有効な治療法の開発が必要である。申請者らの研究結果から PCTAIRE1 が悪性腫瘍で高発現していくことが示唆され、皮膚悪性腫瘍においても同様の可能性が考えられるものの、現在まで皮膚悪性腫瘍における PCTAIRE1 の解析は報告されていない。また Public database においても、皮膚悪性腫瘍における PCTAIRE1 の詳細なデータは存在しない。

また、PCTAIRE1 の機能について、研究代表者らはすでに腫瘍抑制分子 p27 が基質の一つであることを報告したが、多くのリン酸化酵素は複数の基質に作用することが報告されており、また酵素活性以外の働きを持つことも多い。これまでの実験結果から、PCTAIRE1 の発現抑制による腫瘍増殖の抑制は部分的には p27 を介して行われているものの、p27 の過剰発現実験では同様の結果は認められず、p27 以外の経路も関与していると推測される。

## 2. 研究の目的

### (1) 皮膚腫瘍における PCTAIRE1 の発現の検討

癌細胞において PCTAIRE1 の発現が亢進していることを、mRNA および蛋白レベルで検討した。具体的には、皮膚悪性腫瘍病理検体を用いて免疫染色法を用いて検討するとともに、皮膚悪性腫瘍およびそれに関連したセルラインを用いて、定量的 PCR 法・免疫プロット法を行った。病理検体を用いた免疫染色においては、正常皮膚組織(患者検体腫瘍周囲)、良性腫瘍(色素性母斑など)、表皮内腫瘍(表皮内黒色腫など)を併せて検討した。

### (2) PCTAIRE1 結合蛋白の同定および、PCTAIRE1 の癌化における役割の検討

蛋白の未知の機能を解明するためには、その結合する分子を探索し、その分子との相互作用を明らかにする必要がある。リン酸化酵素においては、基質を同定することが第一歩になるが、リン酸化以外の作用がある可能性もある。したがって、各種スクリーニング法を用いて、PCTAIRE1 と結合する分子を同定し、その役割を検索した。具体的には、**酵母を用いたツーハイブリッド法**および**免疫沈降法を用いたプロテオミクス解析**を実施した。これらのスクリーニング法で得られた候補分子の cDNA をサブクローニングし、HEK293T 細胞に過剰発現させ、免疫沈降法で結合を確認した。それと同時に、PUBMED, Oncomine などの Public database を用いて候補分子の特徴を把握した。また、トランスフェクトした細胞を用いた**蛍光免疫染色**を行い、PCTAIRE1 による分布の変化を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 2000 年以降北海道大学病院皮膚科で経験した有棘細胞癌 50 例、乳房外パジェット病 35 例の組織切片の免疫染色を行う。染色

方法は応募者らが報告した方法にて行った (Cancer Res 2014)。コントロールとなる良性腫瘍として、色素性母斑 10 例についても併せて染色を行った。使用する抗体は Sigma 社の抗 PCTAIRE1 抗体を予定しており、すでに前立腺癌・乳癌の臨床検体において抗体の性能を確認済みである。腫瘍細胞における染色の強さ (Intensity) とその割合 (Proportion) を評価し、それらの和をスコア化する。併せて、PCTAIRE1 の基質の一つである p27 (抗体: BD610241) についても、免疫染色を実施した。実施した免疫染色スコアを臨床情報(ステージ、患者予後)と統合し、統計学的に解析を行った。統計学的解析には、「エクセル統計 (STATCEL3)」を使用した。

(2) PCTAIRE1 結合蛋白を同定するために、Yeast two hybrid screening を行った。具体的な方法は、応募者らが既に報告した方法で行う (Cancer Res 2014)。PCTAIRE1 を Bait として使用し、悪性黒色腫・前立腺癌・リンパ腫のセルラインから確立した cDNA ライブラリーを使用した。酵母は EGY48 を使用する予定である。スクリーニングで得られた DNA 配列を BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) にて解析し、得られた遺伝子を検索した。得られた遺伝子の中から非特異的な候補を除外し、候補遺伝子については X-gal assay と Leu reporter assay で特異的な結合を確認した。特異的な結合が認められた蛋白について、PUBMED, Oncomine などの Public database を用いた検討を行った。また、候補蛋白の cDNA を GE Dharmacon cDNA コレクションより購入し、発現ベクターを作成した。さらに、PCTAIRE1 結合蛋白のスクリーニングとして、免疫沈降を利用したプロテオミクス解析を行った。方法は、メラノーマ細胞株 A2058 細胞から、1%NP40 バッファーにて Cell lysate を得、その後 2 $\mu$ g の抗 PCTAIRE1 抗体 (SIGMA)

にて免疫沈降を行った。免疫沈降複合体を SDS サンプルバッファーにて変性後、プロテオミクス解析 (LC-MS/MS) にて、結合蛋白を網羅的に解析した。

#### 4 . 研究成果

PCTAIRE1/CDK16/PCTK は、精子形成に関するサイクリン依存性酵素である。我々は悪性黒色腫などの悪性腫瘍の増殖における PCTAIRE1 の機能を解明してきたが、皮膚有棘細胞癌 (SCC) における機能は明らかでなかった。テトラサイクリン誘導性 shRNA にて SCC A431 細胞の PCTAIRE1 遺伝子をノックダウンしたところ、癌細胞の増殖抑制がみられた。FACS 解析では、PCTAIRE1 のノックダウンは、G2/M 期での細胞周期の停止およびアポトーシスを引き起こすことが示された。また PCTAIRE1 のノックダウンは、A431 細胞において腫瘍抑制分子 p27 の蓄積を誘導した。A431 細胞をマウス皮下に異種移植したところ、PCTAIRE1 ノックダウン細胞では腫瘍形成の抑制を認めた。臨床的には、皮膚 SCC では、周囲の正常皮膚組織に比べ、癌組織において PCTAIRE1 の発現が亢進していた。以上より、PCTAIRE1 は p27 の発現調節と腫瘍増殖において重要な役割を担うことが示された。このことは、PCTAIRE1 が皮膚癌の治療において新規標的分子になりうるということを示唆している。

また、PCTAIRE1 の結合分子については、p27Kip1 以外には、アポトーシスや細胞周期に関与すると考えられる分子は認められず、これまで発表のあった、p27 分子や Myc 分子との関与を中心に、今後も解析を継続する予定である。

#### 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9件)

1. Kitamura S, Hata H, Inamura Y, Imafuku K, Muramatsu K, Yanagi T, Shimizu H. Lessons from 20 cases of digit malignant melanoma  
**J Eur Acad Dermatol Venerol**, in press (査読有)

2. Kitamura S, Hata H, Yamaguchi Y, Imafuku K, Yanagi T, Shimizu H. The Unique Dermoscopic Structure “Large Black Web” in basal cell carcinoma on the areola.  
**J Eur Acad Dermatol Venerol**, in press (査読有)

3. Yamaguchi Y, Hata H, Kitamura S, Yanagi T, Shimizu H. A case of chondroma cutis showing callus-like appearance  
**J Eur Acad Dermatol Venerol**, in press (査読有)

4. Saito S, Hata H, Inamura Y, Kitamura S, Yanagi T, Shimizu H. Vulvarbasal cell carcinoma showing adhesion of the labia majora and minora.  
**Clin Exp Dermatol**, in press. (査読有)

5. Milutinovic S, Kashyap AK, Yanagi T, Wimer C, Zhou S, O'Neil R, Kurtzman AL, Faynboym A, Xu L, Hannum CH, Diaz PW, Matsuzawa SI, Horowitz M, Horowitz L, Bhatt RR, Reed JC. Dual agonist Surrobody™ simultaneously activates death receptors DR4 and DR5 to induce cancer cell death.  
**Mol Cancer Ther**, 15: 114-124, 2016. (査読有)

6. Kitamura S, Hata H, Inamura Y, Imafuku K, Yanagi T, Oishi Y, Maruyama S, Shimizu H. Chronic papillomatous dermatitis around an ileostoma.  
**J Dermatol**, 43: 220-221, 2016 (査読

有)

7. Yanagi T, Matsuzawa S. PCTAIRE1/PCTK1/CDK16: A new Oncotarget.  
**Cell Cycle**, 14: 463-464, 2015. (査読有)

8. Yanagi T, Shi R, Aza-Blanc P, Reed JC, Matsuzawa S. PCTAIRE1-knockdown sensitizes cancer cells to TNF family cytokines.  
**PLoS One**, 10 (3): e0119404, 2015. (査読有)

9. Yang Z, Wilkie-Grantham RP, Yanagi T, Shu CW, Matsuzawa S, Reed JC. ATG4B (Autophagin-1) phosphorylation modulates autophagy.  
**J Biol Chem**, 290: 26549-26561, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

柳輝希:

PCTAIRE1は腫瘍抑制分子p27をリン酸化し、癌細胞の分裂を制御する。  
第403回日本皮膚科学会北海道地方会。北海道大学(札幌), 2015/10/3

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0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0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〕  
北海道大学皮膚科ホームページ  
<http://www.derm-hokudai.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳 輝希(YANAGI TERUKI)  
北海道大学・北海道大学病院・医員  
研究者番号：50755973

(2) 研究分担者

( )  
なし  
研究者番号：

(3) 連携研究者

( )  
なし  
研究者番号：