

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19081

研究課題名(和文)新規癌抑制遺伝子PP6機能不全による発癌機構、PP6を標的とする治療開発の可能性

研究課題名(英文)Function of Ppp6c as a tumor suppressor gene

研究代表者

林 克剛 (HAYASHI, Katuhisa)

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：30726302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PP6触媒サブユニット(Ppp6c)遺伝欠損アレルを作製し、Ppp6cヌルマウスが胎生致死であることを証明した。次に皮膚特異的にPpp6cを欠損させるシステムを作製し、Ppp6c欠損がマウスDMBA発がんにおいて強力な腫瘍プロモーション作用を持つことを証明した。組織学的な解析によりPpp6cの機能が欠損した皮膚では、DMBA投与48時間後、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、増殖と炎症の病変が認められた。その原因の1つとして、Ppp6c機能欠損ケラチノサイトにおいて、TNF- α やIL-1によるNF κ Bシグナルの活性化が著しく増強される分子機構の存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using a 2-stage skin carcinogenesis model, we found that a single DMBA application was sufficient to produce papillomas in Protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c)-deficient skin. The data suggests that Ppp6c-deficient skin is predisposed to carcinogenesis initiated by DMBA. Ppp6c-deficient skin tissues show an enhanced inflammatory response following DMBA treatment. Ppp6c-deficient tissue samples exhibited thicker epidermis associated with hyperkeratosis, cellular infiltration of the dermis, and disappearance of subcutaneous fat tissue, indicating inflammatory and proliferative responses. Expression of inflammation-related genes is upregulated by DMBA treatment and that this effect that is more significant in Ppp6c-deficient skin. Molecular mechanism underlying its pathogenesis is thought to be that TNF- α and IL-1-dependent NF- κ B signaling is enhanced in Ppp6c-deficient keratinocytes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍

1. 研究開始当初の背景

プロテインホスファターゼ 6 型 (PP6) の細胞内の機能を明らかにする目的で、PP6 と結合するタンパクのスクリーニングを行い、中心体のタンパク、CP110 を同定した。そこで PP6 の触媒サブユニット (Ppp6c) のノックダウンを行い、中心体の数や分離異常が起こることを確認したことから、PP6 は中心体の機能制御に必須であり、おそらく、がん抑制遺伝子として働く可能性を考えた。

がんゲノムから重要な報告があった。悪性黒色腫の全 exon シークエンスにより、PP6 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 (Krauthammer M et al., Cell 2012 landscape of driver mutations in melanoma)。さらに、PrognoScan(遺伝子発現と予後関連のデータベース)では、頭頸部がん (DATASET: GSE2837)、乳がん組織 (GSE9195)、脳腫瘍 (GSE4412)、肺がん (GSE12276)、卵巣がん (GSE31210) にて、PP6 遺伝子の発現低下と予後不良の強い相関関係が示されていた。

2. 研究の目的

Ppp6c が、新しい癌抑制遺伝子であるかどうかを証明したいと考えた。この証明のためには、もっとも研究の歴史が長く、信頼性があり、かつ実験の比較的容易な系を用いることを考えた。そこで、マウスの皮膚の 2 段階発がん実験を用いることにした。当初は、Ppp6c ヌルマウスを作成し、それを用いて皮膚 2 段階発がん実験を行うことを考えたが、Ppp6c ヌルマウスは胎生致死であった。そこで、皮膚特異的に Ppp6c を欠損させ、それを用いて、発がん実験を行い、がん抑制遺伝子か否かを明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

皮膚特異的な Ppp6c 欠損マウスの作製

Ppp6c^{flox/flox} マウス (ホスファターゼ活性に重要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、タモキシフェン投与により CreER^{tam} は活性化され、loxP に挟み込まれた部位を欠損させる。まずは、タモキシフェンを皮膚に塗布し、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} マウスに、タモキシフェンを投与した群と 4HT の溶媒 (アセトン) のみを投与した群に分けて、それぞれよりケラチノサイトを精製した。その結果、タモキシフェンを塗布して得られたケラチノサイトにおいては、約 70% の flox アレルが、exon4 を欠損している事がわかった。そこで、6~7 週齢の K14-CreER^{tam}; Ppp6c^{flox/flox} マウスを用いて皮膚の 2 段階発がん実験を行った。

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。

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。一方、Ppp6c 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、Ppp6c 欠損が 2 段階発がんを著しく促進させるということであったが、一方興味があるのは、プロモーターとして、TPA と作用機序の全く異なるオカダ酸を用いた時はどうなるか? であった。その実験を行ったところ、オカダ酸を用いてもやはり同様の著しい促進が認められた。この事は、Ppp6c 欠損自身が強力なプロモーターをして働くのではないか? ということが考えられた。

(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。

PP6 機能欠損皮膚においては、DMBA 処理のみで、5 週目から腫瘍発生が認められた。しかも、腫瘍の発生頻度は、DMBA/TPA や DMBA/オカダ酸 発がん実験と殆んど代わらないことがわかった。これらは、TPA やオカダ酸の腫瘍プロモーション作用は、Ppp6c 欠損の腫瘍プロモーション作用に比べると無視できるレベルであり、Ppp6c の機能欠損による腫瘍プロモーター活性は、TPA やオカダ酸のそれよりも遙かに強力であることを示している。さらには、本研究では、皮膚で Ppp6c を欠損しているマウスにおいて、DMBA 単独処理でパピローマが発生することを見出した。

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 欠損アレル由来の短小 Ppp6c-mRNA と H-ras のコドン 61 番の遺伝子変異が認められた。これらの結果は、このパピローマは、Ppp6c の機能が欠損しているケラチノサイトにおいて、DMBA による H-ras のコドン 61 番の遺伝子変異が起こり、この二つの条件により増殖優

位性を得て腫瘍形成になったと考えられる。*GRO* 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。従って *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*、*cyclinD1* 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た。

(3) *Ppp6c* 欠損皮膚では、DMBA 投与により強い炎症像を呈する。

Ppp6c 機能欠損皮膚中における DMBA の影響を組織学的に解析した。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、増殖と炎症の病変が認められた。

Ppp6c 機能欠損と、DMBA に起因する増殖や炎症との関連を検討するため、増殖・炎症と関連する遺伝子について検討した。IAP-1 を構成する *c-jun* の発現は、*Ppp6c* 機能欠損皮膚中で、DMBA 塗布 6、24 時間後にコントロールの皮膚よりも有意に高値となっていた。DMBA/TPA による発がんに必要なサイトカインである *TNF-* 遺伝子発現は、DMBA 処理により、*Ppp6c* 機能欠損皮膚およびコントロールの皮膚の両方で、6 時間および 24 時間で上昇が認められた。しかし、両者の間で著明な差は見られなかった。一方で、*IL-1* 発現は、DMBA 塗布後 24 時間後から 48 時間後において、*Ppp6c* 機能欠損した皮膚で、mRNA 発現量が高値になる傾向が認められた。*IL-6* mRNA 発現は、48 時間後に、*Ppp6c* 機能欠損皮膚で高値となっていた。*GM-CSF*、*GRO* 等の炎症関連遺伝子 mRNA の発現も、塗布後 48 時間後の時点で *Ppp6c* 機能欠損皮膚において、上昇が認められた。炎症関連遺伝子である *MMP-3* 遺伝子 mRNA は、24 時間後の時点で、*Ppp6c* 機能欠損皮膚において、上昇していた。

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。本研究では DMBA 処理 48 時間後の *Ppp6c* の機能欠損皮膚において、炎症や細胞増殖の所見が見られ、炎症・増殖関連遺伝子の発現が、*Ppp6c* 機能欠損組織において、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-1* 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-1* 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。従って、*Ppp6c* の機能が欠損している皮膚において、*IL-1* や *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いうことが、早期パピローマ発生の原因の一つと考えられる。

GM-CSF、*GRO*、*MMP-3* 等の炎症関連遺伝子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寄与したと考えられる。Immediate early gene である *c-jun* と *c-fos* は、*Ppp6c* 機能欠損皮膚において、DMBA 処理後 6 時間後で、*c-jun* と *c-fos* の mRNA の発現が上昇した。*c-jun* と *c-fos* は、AP-1 の構成因子であり、AP-1 を介した増殖シグナルも早期パピローマ形成の原因の一つと考えられる。

(4) PP6 の主要な標的の 1 つは、NFκB 経路である。

DMBA 刺激によって前炎症性サイトカインである *TNF-* が 6h 後という早期に発現上昇が認められた。*TNF-* は皮膚二段階発がんに必要なサイトカインとされ、サイトカインシグナルの上流に位置していることから、*TNF-* が *Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトへ何らかの影響を与えることが想像できた。そのため、*Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトとコントロールケラチノサイトを用いて、*TNF-* (250ng/ml) 投与後のタイムコースについてウェスタンブロットングを用いて検討した。まず、TAK1 リン酸化レベルへの影響を解析したところ、コントロールケラチノサイトでは、15 分から 30 分にかけて若干のリン酸化レベルの上昇が認められたが、*Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトではその上昇が増強され、60 分後までリン酸化が認められた。

NFκB の活性化を p65/reIα のリン酸化を指標として解析した。コントロールケラチノサイトでは、5 分から 15 分後にかけてリン酸化が増加していた。*Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトでは、その増加が著しく増進していた。

TNF- は、皮膚二段階発がんのサイトカインカスケードの上流に位置するサイトカインと考えられている。今回の研究でも、DMBA 処理により、*Ppp6c* の欠損の有無にかかわらず、皮膚において早期に発現上昇が認められた。そこで、ケラチノサイト対する *TNF-* の影響を確認した。正常および *Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトにおいて、*TNF-* は NFκB の活性化を引き起こし、特に *Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトにおいて強く亢進することがわかった。DMBA 処理時の、*Ppp6c* 欠損皮膚において認められる様々な異常の最初のステ

ップは、ケラチノサイトの TNF- に対する反応性の違いである可能性がある。NFκB の標的遺伝子タンパクが、自然免疫、炎症、細胞の生存などを制御するので、この経路が亢進する生理的意義は大きいと考える。例えば、細胞の生存シグナルの一つとして、NFκB は、*cyclin D1* の発現を上昇させることで細胞増殖を促進させることが報告されている。本研究では、パピローマ中の *cyclin D1* の発現が上昇していたことから、この遺伝子発現の上昇が、パピローマ形成促進の一因と考える。

以上、まとめると、PP6 の機能が欠失している皮膚では、DMBA 誘導発がんに対する感受性が亢進している事を明らかとした。そのメカニズム解明を行い、PP6 活性を欠損している組織においては、NFκB シグナルが増強していることが明らかとなった。

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2件)

1. Kato H, Kurosawa K, Inoue Y, Tanuma N, Momoi Y, Hayashi K, Ogoh H, Nomura M, Sakayori M, Kakugawa Y, Yamashita Y, Miura K, Maedono 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 carcinogenesis. *Cancer Lett.* 365(2):223-8, 2015

2. 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, Shima H. Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA. *Oncogene*, 34(35): 4647-55, 2015

[学会発表](計2件)

1. 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)

2. 加藤浩之、田沼延公、黒沢是之、井上維、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

[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

林 克剛 (Hayashi, Katuhisa)

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：30726302

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()