

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：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20237

研究課題名(和文) マウス頭頸部発癌実験で示唆された、PP6活性異常による、がん体質化のメカニズム

研究課題名(英文) Ppp6c-deficiency and cancer predisposition

研究代表者

桃井 勇貴 (MOMOI, Yuki)

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：10750440

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)：我々は、タモキシフェン処理により、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に成功した。2重変異では、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。非腫瘍細胞では、仮にRASの活性型変異が起こっても簡単には過剰な細胞増殖が起きないような安全装置があり、そこにPP6が働いていると考えられる。一方で、RASの活性化に加えて、Ppp6cの機能喪失が起こると、異常増殖のスイッチが入ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Several experiment using biochemical experiments have suggested that protein phosphatase 6 (PP6) functions at cell cycle check point, suppresses NFkB signaling, and also functions in DNA repair. However, whether PP6 is involved in carcinogenesis has not been examined. We previously reported that deficiency in the gene encoding the catalytic subunit of protein phosphatase 6 (Ppp6c) predisposes mouse skin tissue to papilloma formation initiated by DMBA. Then, we demonstrated that Ppp6c loss acts as a tumor promoter in UVB-induced basal cell carcinogenesis. Importantly, somatic mutations in Ppp6c gene have been identified in approximately 10% of malignant melanoma patients harboring Braf or Nras mutations. In this experiment, we found that induction of double mutation (Ppp6c deficiency and KrasG12D expression) in the cytokeratin 14 positive cells drives cell proliferation, and led to hyperplasia of squamous epithelium tissue.

研究分野：医歯薬学

キーワード：口腔咽頭科学

1. 研究開始当初の背景

発がん過程を調べる方法として、マウスの皮膚を用いた二段階発がん実験がある。これは、イニシエーションとプロモーションにより腫瘍を形成するモデルであり、容易かつ再現良く腫瘍の発生を確認することができるため、多用されている。このシステムでは、イニシエーターを単回投与した皮膚同所に、プロモーターを反復投与することで初めてパピローマが形成される。イニシエーターはゲノムに変異を導入する化学物質で、代表的な化合物には DMBA がある。プロモーターは増殖を促進するものであり、代表的な化合物として、PKC を活性化させる働きを持つ TPA がある。一方で、1988 年に、藤木らは、TPA と同等に強力な発がんプロモーションを誘導する物質としてオカダ酸を同定した。しかし、興味のあることに、オカダ酸はプロテインホスファターゼの強力な阻害剤であった。したがって、TPA とは全く異なるメカニズムで腫瘍のプロモーションをしていることが示唆された。しかし、オカダ酸によって阻害されるホスファターゼは、PP1、PP2A、PP4、PP5、PP6 が知られていた。そこで、そのうちどれかの分子種が、発がんに関わるかが予想された。しかし、その解析は全く行われてこなかった。我々は、このうち PP6 に注目した。

これまで酵母や線虫の機能解析により、PP6 の触媒サブユニット (PPP6c) 細胞周期のチェックポイントに働いていることが報告されていた。また、培養細胞を用いた生化学的・分子生物学的研究より、PPP6c が DNA 修復、染色体分離、NF- κ B シグナル制御などがんの原因に関連することが示唆されていたからである。しかし、これまで遺伝子改変マウスなどを用いた解析は行われておらず、個体レベルでも PP6 の機能に関してはほとんど分かっていなかった。

そこで、我々は、PP6 の機能と発がんとの関係を明らかにするため、皮膚特異的に誘導欠損可能なコンディショナルノックアウトマウス ($K14-Cre^{ER^{tam}}$; $PPP6c^{flox/flox}$) を作製し、DMBA/TPA による二段階発がん実験を行うことで、PP6 が、がん抑制遺伝子である否かを検討することとした。驚いたことに、イニシエーター (DMBA) 一回投与のみで、非常に短期間 (約 5 週間) で腫瘍が発生した。一方、コントロールマウスでは、DMBA 一回投与のみでは腫瘍は発生せず、DMBA 投与後、プロモーター (TPA) 反復投与 15 週にて、はじめて、腫瘍形成が見られた。したがって、マウスの皮膚において、PP6 欠損組織では、DMBA に対し

て強い腫瘍促進状態にある事が示唆された。

がんゲノムプロジェクトの成果により、*B-raf* または *N-ras* 変異を保有する悪性黒色腫患者の約 15% に PPP6c をコードする遺伝子に変異があることが報告された。さらに、悪性黒色腫に見出される PPP6c 変異は Ppp6c タンパク質の分解を引き起こすこと、PP6 のノックダウンにより染色体不安定性や Aurora-A キナーゼを活性化することが報告された。これらは、つまり *B-raf* または *N-ras* 変異の条件下で、*Ppp6c* 変異による機能消失が腫瘍形成に関わっていることが示唆された。

一方で、頭頸部がんとの関係で、興味深いデータが発表された。PrognScan (遺伝子発現と予後関連のデータベース) により、頭頸部がん組織における PPP6c 遺伝子の発現低下と予後不良の強い相関関係が示された (DATASET: GSE2837)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、2 つある。1 つは、*Ppp6c* 機能消失マウスを用いて、*ras* のがんシグナルを、PP6 機能欠失が強くドライブするか否かの検証である。もう一つは、*Ppp6c* 機能消失マウスを用いて、頭頸部発がん実験を行い、PP6 機能欠失が、頭頸部の腫瘍発生を早めるか否かの検証である。

3. 研究の方法

実験 1. PP6 機能欠損マウスにおける、4NQO 頭頸部がん実験

$PPP6c^{flox/flox}$; $K14-Cre^{TAM}$ マウスにおいて、タモキシフェンの腹腔内投与により、舌、口腔、食道で PP6 の欠損が起こることは確認済みである。タモキシフェン投与後に、4NQO を飲料水にて (0, 20, 50ppm) 摂取させ、24 週における口腔内および食道の腫瘍発生を調べる。

実験 2. 変異 *K-ras* 遺伝子と、PP6 機能欠損の相乗効果の解析

$PPP6c^{flox/flox}$; $K14-Cre^{TAM}$; LSL *K-rasG12D* マウスを用いる。タモキシフェン投与で、*K14* ケラチン発現細胞 (皮膚表皮や口腔・食道上皮の基底層の細胞) 特異的に、2重変異 (*K-rasG12D* と PP6 欠損) を誘導することができる。コントロールとしては、*K-rasG12D* 発現のみ、PP6 欠損のみのマウスを用いる。腫瘍形成に関する詳細な比較を行う。

4. 研究成果

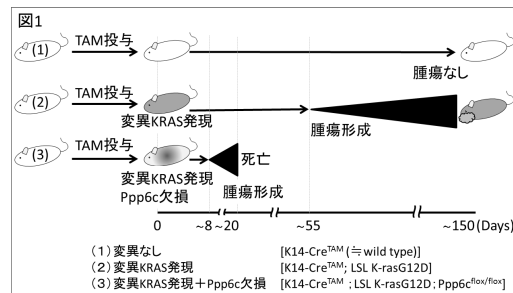
実験 1. PP6 機能欠損マウスにおける、4NQO 頭頸部がん実験

PPP6c^{flox/flox}; K14-Cre^{TAM} マウスにタモキシフェンを腹腔内投与したものを、PP6 機能欠失マウスとした。K14-Cre^{TAM} マウスにタモキシフェンを腹腔内投与したものをコントロールマウスとした。タモキシフェン投与マウスにおいては、処理後 20 週では体重減少が無いことを確認した。このシステムを用いて、タモキシフェン投与後に、4NQO を飲料水に 20ppm および 50ppm を 12 週間摂取させ、その後 12 週通常の水で飼育した後、口腔内および食道の腫瘍発生を調べた。コントロールおよび PP6 機能欠失マウスにおいて、炎症の所見や腫瘍の形成は認められなかった。少なくとも今回の条件においては、PP6 機能欠損による 4NQO 誘導発癌は認められなかった。さらなる検討のためには、より濃度の高い濃度を用いた 4NQO 発がん実験を行う必要があることが分かった。

実験 2. 変異 K-ras 遺伝子と、PP6 機能欠損の相乗効果の解析

我々は、タモキシフェン処理により、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に成功した。まだプレリミナリーな段階であるが、2 重変異では、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 (図 1)。

例えば、TAM 投与後 2 週間で 2 重変異マウスでは、口唇、指で、腫瘍化が認められる。一方この時点では、変異型 KRAS のみでは、口唇、指には殆ど正常と同じである。このことから、PP6 の機能不全は、活性化がん遺伝子の腫瘍形成能をさらに強くドライブすることが分かった。この実験結果より、非腫瘍細胞では、仮に RAS の活性化型変異が起こっても簡単には過剰な細胞増殖が起きないような安全装置があり、そこに PP6 が働いていると考えている。しかし、RAS の活性化に加えて、Ppp6c の機能喪失が起こると、異常増殖のスイッチが入ると考える。現在、この現象のメカニズムを解析中である。



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3件)

1. Ogoh H, Tanuma N, Matsui Y, Hayakawa N, Inagaki A, Sumiyoshi M, Momoi Y, Kishimoto A, Suzuki M, Sasaki N, Ohuchi T, Nomura M, Teruya Y, Yasuda K, Watanabe T, Shima H. The protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis. Mech Dev. 139:1-9, 2016

2. 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

3. 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. 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)

2. 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

〔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

桃井 勇貴 (Momoi, Yuki)
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：10750440

(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

()