

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07436

研究課題名(和文) 変異型KRASによる腫瘍化を抑えるがん抑制遺伝子の同定(膵臓がんへの関与)

研究課題名(英文) Identification of cancer suppressor genes that suppress tumorigenesis by mutant KRAS- involvement in pancreatic cancer

研究代表者

佐藤 郁郎 (Sato, Ikuro)

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)・ティッシュバンクセンター・部長

研究者番号：50225918

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)：タモキシフェンにより、膵臓特異的にKP変異(K-rasG12D発現+Trp53欠損)を引き起こすマウス(cKPマウス)を作製し、PP6遺伝子(Ppp6c) floxedマウスと交配させ、Ppp6cホモ欠損型のcKPマウス(cKP(F/F))、およびPpp6c野生型のcKPマウス(cKP(+/+))を作製した。Ppp6cホモ欠損型は野生型と比較し、変異導入後著しいMAPK・NF- κ Bシグナル活性化、炎症性サイトカイン発現上昇、解糖系代謝亢進をおこし、早期(150日以内)に悪液質を伴う浸潤性膵管癌を発症し死亡することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸潤性膵管癌は、5年生存率がわずか10%という極めて致死率の高い癌であるが、いまだ十分な有効性を持った治療法は存在せず、新しい治療法の開発が求められている。今回我々が作成したマウス膵癌発生マウスでは、わずか150日で、体重減少、サルコペニア、血清中炎症性サイトカインの上昇、脂肪組織の消失が見られ、ヒトの膵がんで認められる悪液質に類似した症状を示した。本マウスは極めて早期にヒト膵癌発生を再現できるという特徴をもつ。このマウスを用いて、悪液質をもつ膵癌の発生機構の解明や、予防法や治療の開発に役立てることができると考える。

研究成果の概要(英文)：To examine effects of PP6 gene (Ppp6c) deficiency on pancreatic tumor development, we developed pancreas-specific, tamoxifen-inducible Cre-mediated KP (KRAS(G12D) plus Trp53-deficient) mice (cKP mice) and crossed them with Ppp6c flox/flox mice. cKP mice with homozygous Ppp6c deletion developed pancreatic tumors, became emaciated within 150 days of mutation induction. At 30 days, comparative analysis of genes commonly altered in homozygous versus WT Ppp6c cKP mice revealed enhanced activation of Erk and NF κ B pathways in homozygotes. By 80 days, the number and size of tumors significantly increased in pancreas of Ppp6c homozygous relative to heterozygous or WT cKP mice. Ppp6c \pm tumors were pathologically diagnosed as pancreatic ductal adenocarcinoma undergoing the epithelial-mesenchymal transition. Transcriptome and metabolome analyses indicated enhanced cancer-specific glycolytic metabolism in Ppp6c-deficient cKP mice and increased expression of inflammatory cytokines.

研究分野：実験病理学関連

キーワード：舌癌 マウス発がん実験 PP6 KRAS

1. 研究開発当初の背景

浸潤性膵管癌 (PDAC) は、5年生存率がわずか10%という極めて致死率の高い癌である。*K-Ras* や *TGF-* の活性化変異や、*p53*、*INK4A/ARF*、*BRCA2*、*Smad4* などの腫瘍抑制因子の不活性化などの遺伝子変化が、膵臓がんの最も一般的な発癌要因となっている。膵臓癌の分子機構に関する理解が進んでいるにもかかわらず、いまだ十分な有効性を持った治療法は存在せず、新しい治療法の開発が求められている。

膵臓癌の95%を含む、ヒトの全がん種の30%以上は、RASファミリー遺伝子の変異によって引き起こされる。変異型RASは最も強力ながん化促進因子の1つであり、現在まで研究が進められてきたにもかかわらず、その働きを抑える薬剤はいまだ作り出されていない。最近、興味深いことに、変異原メタンスルホン酸エチル (EMS) を用いたショウジョウバエでの遺伝学的スクリーニングにより、PP6 遺伝子 *Ppp6c* の欠損が癌性RASと協力して腫瘍細胞の増殖と浸潤を誘導することが確認され、*Ppp6c* がRAS関連がんの腫瘍抑制因子として機能していることが示唆された。また、*K-ras* 変異上皮内がんモデルマウスでは、*Ppp6c* 欠損の誘導後2週間で舌の腫瘍発生率が上昇することが示されており、PP6の腫瘍化抑制機能が支持されている。しかし、この研究では、大きな舌腫瘍による摂食障害が、マウスの栄養失調と死亡に関わっている可能性があったため、腫瘍の悪性化への *Ppp6c* の関与は不明確である。

PP6は、制御サブユニット (PP6R1, PP6R2, PP6R3) とスカフォールドサブユニット (ANKRD28, ANKRD44, ANKRD52) と結合してヘテロ三量体を形成している。これらのサブユニットの多様性により、PP6は、細胞周期の進行、DNA損傷反応、miRNAのプロセッシング、細胞・組織の体積の調節など、幅広い生物学的プロセスを制御することができる。また、PP6は、TNF- に応答してI κ Bの分解を阻害したり、IL-1シグナル伝達経路におけるTAK1の不活性化を阻害したりすることで、NF κ Bシグナル伝達を制御していることが報告されている。最近のshRNAによるスクリーニングでは、PP6はMEKを脱リン酸化するホスファターゼとして同定されている¹²。病理学的には、がん患者の組織を分析することで、*Ppp6c* が腫瘍抑制因子として機能していることが示唆されている。*Ppp6c* は、ヒトのメラノーマ標本の9%、ヒト皮膚基底細胞がん組織の15%で変異していることが報告されており、皮膚腫瘍における腫瘍抑制機能が示唆されている。我々はマウスを用いた発癌実験を行い、*Ppp6c* の欠損が、紫外線によるBRAF (V600E) 誘発メラノーマの発生や、紫外線による皮膚扁平上皮癌の発癌を促進することを明らかにした。

2. 研究の目的

TCGAデータベースによると、PDACにおいて*K-ras*に変異がある症例の70%では、*p53*にも欠損型変異またはミスセンス変異があることがわかっている。そこで、KRAS (G12D) 変異と *Trp53* 欠損のある膵臓がんにおいて、*Ppp6c* ががん抑制遺伝子として機能するかどうかを明らかにしたいと考えた。そのために、CREリコンビナーゼにより、膵臓特異的にKP変異 (KRAS (G12D) 発現 + *Trp53* 欠損) を引き起こすマウス (cKPマウス) を作製し、*Ppp6c*^{flox/flox} マウスと交配させ、cKPマウスモデルにおいて、*Ppp6c* 欠損が膵臓癌の発生を促進するかどうかを調べた。

3. 研究の方法

1. 膵臓特異的な *Kras*^{G12D} 変異、*Trp53* 欠損、*Ppp6c* 欠損を有するマウスの作製

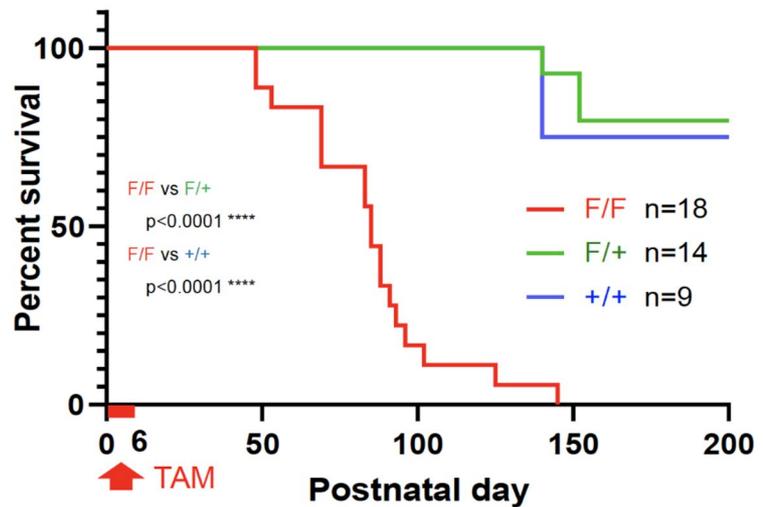
Pdx1-CreER^{T2}、*K-ras*^{LSL-G12D/+}、*Trp53*^{flox/flox} の各マウスは Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から入手した。*Ppp6c*^{flox/flox} マウスは以前当分野で作製したものをを用いた。*Pdx1-CreER^{T2}* マウスを *Trp53*^{flox/flox} マウスと交配して *Pdx1-CreER^{T2}/Trp53*^{flox/+} マウスを作製し、これを *Ppp6c*^{flox/flox} マウスと交配して *Pdx1-CreER^{T2}/Trp53*^{flox/+}/*Ppp6c*^{flox/+} マウスを作製した。これらを交配して *Pdx1-CreER^{T2}/Trp53*^{flox/flox}/*Ppp6c*^{flox/+} マウスを作製した。また、*K-ras*^{LSL-G12D/+} マウスを *Ppp6c*^{flox/flox} マウスと交配して *K-ras*^{LSL-G12D/+}/*Ppp6c*^{flox/+} マウスを作製し、これを *Trp53*^{flox/flox} マウスと交配して *K-ras*^{LSL-G12D/+}/*Trp53*^{flox/+}/*Ppp6c*^{flox/+} マウスを作製した。これらを交配して *K-ras*^{LSL-G12D/+}/*Trp53*^{flox/flox}/*Ppp6c*^{flox/+} マウスを作製した。雄の *Pdx1-CreER^{T2}/Trp53*^{flox/flox}/*Ppp6c*^{flox/+} マウスと雌の *K-ras*^{LSL-G12D/+}/*Trp53*^{flox/flox}/*Ppp6c*^{flox/+} マウスを交配し、3つの遺伝子型を作製した。*Pdx1-CreER^{T2}/K-ras*^{LSL-G12D/+}/*Trp53*^{flox/flox}/*Ppp6c*^{+/+} (cKP(+/+)) マウスと命名し、*Pdx1-CreER^{T2}/K-ras*^{LSL-G12D/+}/*Trp53*^{flox/flox}/*Ppp6c*^{flox/+} (cKP(F/+)) マウスと命名し、*Pdx1-CreER^{T2}/K-ras*^{LSL-G12D/+}/*Trp53*^{flox/flox}/*Ppp6c*^{flox/flox} (cKP(F/F)) マウスと命名) の3種類がある。すべての動物実験は、宮城県立がんセンター研究所動物実験委員会 (MCCAE -2020-1, AE.21.10) の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) 膵臓での KRAS(G12D)発現と Trp53 欠損を起こすマウスにおいて、Ppp6c を欠損すると癌による早期死亡が生じる

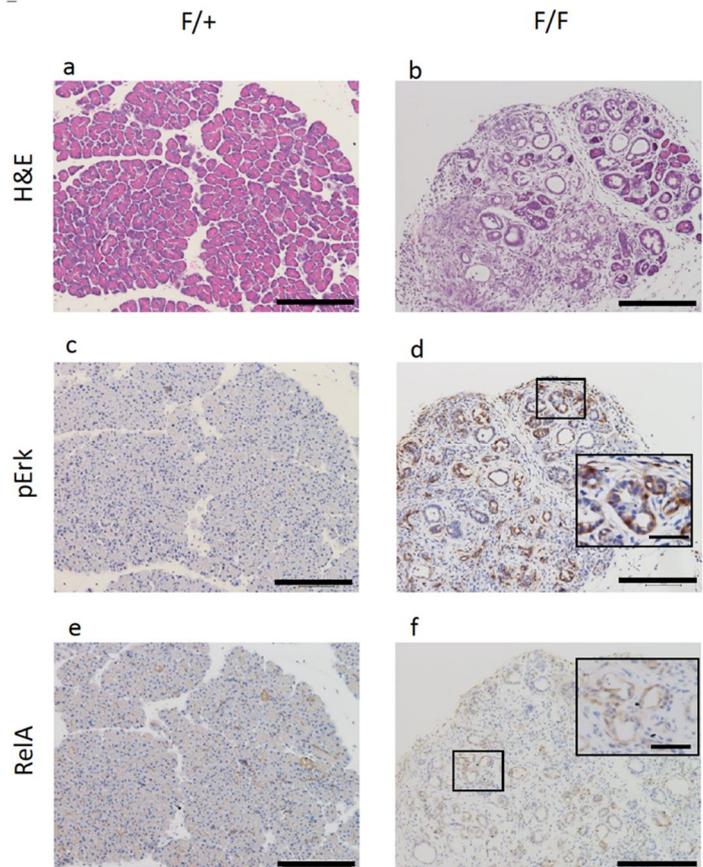
TAM で CreER^{T2} を誘導し、膵臓特異的に KRAS(G12D)変異と Trp53 欠損を引き起こすマウス (cKP マウス: *Pdx1-CreER^{T2}/K-ras^{LSL-G12D/+}/Trp53^{fllox/fllox}*) を作製した。これをもとに *Ppp6c* floxed allele をホモ接合で持つマウス (*Ppp6c^{fllox/fllox}*)、ヘテロ接合で持つマウス (*Ppp6c^{fllox/+}*)、*Ppp6c* 野生型 (*Ppp6c^{+/+}*) の3系統を作製した。これらの系統をそれぞれ cKP(F/F)、cKP(F/+), cKP(+/+)と命名した。マウスには、生後7日間にわたって、経母乳的に TAM を投与した。20日齢のマウスを解剖して、尾及び膵臓組織のゲノム組み換えを評価し、*K-ras^{LSL-G12D}*、および *Trp53^{fllox}*、*Ppp6c^{fllox}* の各 allele の組み換えが確認された。

cKP (+/+) (n=9)、cKP (F/+) (n=14)、cKP (F/F) (n=18) の各マウスに同様の方法で TAM を投与し、腫瘍の発生と死亡率を観察した(右図)。cKP(F/F) マウスは50日目から死亡し始め、100日目には90%、150日目には全頭が衰弱し安楽死処分となったが、このときすべての cKP(F/F) マウスで膵臓腫瘍の発生を認めた。一方、cKP(F/+) および cKP (+/+) マウスは、ほとんどが150日まで生存したが、約25%が200日までに衰弱して安楽死処分となった。これらのマウスはすべて膵臓腫瘍を認めた。これらの結果は、*Ppp6c* の欠損が cKP マウスの死亡率を増加させることを示している。



(2) cKP マウスの膵臓において、Ppp6c の欠損は Erk および NF B シグナルを活性化させる

cKP(F/F)における早期の発癌発生の要因を調べるために、cKP マウスは、生後0日から6日まで経母乳的に TAM を投与し、30日齢の膵臓組織において、cK(F/F)において特異的に活性化したシグナル伝達経路の同定を行なった。どの遺伝子型が Erk と RelA の活性化を示すかを組織学的に解析した(右図)。ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色では、cKP(F/F)の膵臓において、cKP(F/+)または cKP (+/+) マウス (data not shown) に比べて、より多くの acinar-to-ductal metaplasia (ADM) 病変が見られた。免疫組織化学 (IHC) 染色では、cKP (F/F) の膵臓の、主に ADM 病変の細胞でリン酸化 Erk1/2 が強く染色された(d)が、cKP(F/+)や cKP (+/+) のマウスの細胞では明瞭な染色像は認められなかった。RelA 抗体を用いた IHC では、cKP(F/F) の膵臓の主に ADM 病変部の細胞に強い RelA の染色が認められ、その一部は、核が染色された(f)が、cKP(F/+) (e)では弱い染色像しか得られなかった。これらの結果は、cKP(F/F)マウスの主に ADM 病変の細胞において、Erk と RelA の活性化が亢進していることを示している。以上より、cKP マウスの膵臓では、*Ppp6c* が欠損する



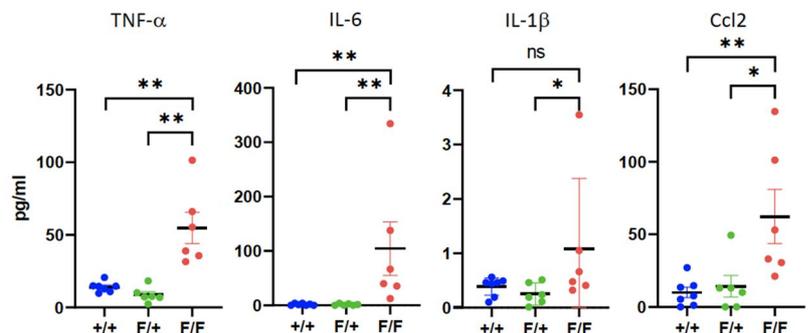
と 30 日以内に Erk と RelA が活性化されることがわかった。また、細胞の生存、増殖、炎症に関わる遺伝子の発現が増加していることも確認済みである。Erk と RelA の活性化は前がん病変部で生じており、これらのデータにより、Erk と RelA の活性化が発がんに密接に関連していることが示唆された。

(3) cKP マウスにおける *Ppp6c* の欠損は、膵臓腫瘍の発生と悪性を促進する

80 日齢のマウスの膵臓の病理学的特徴を分析した。cKP (F/F) マウスは、cKP (+/+) マウスや cKP (F/+) マウスに比べて、80 日時点で著しい体重減少 (~20%) が認められた。次に、H&E 染色した切片で ADM と低悪性度および高悪性度の上皮内新生物 (LG-PanIN および HG-PanIN) の病巣を病理学的に解析したところ、cKP (F/F) では、cKP (+/+) や cKP (F/+) と比べて ADM, LG-PanIN, HG-PanIN の数が有意に増加し、6 匹の cKP (F/F) マウスすべてに膵臓腫瘍が発生した。一方、cKP (+/+) では 7 匹中 1 匹、cKP (F/+) では 6 匹中 2 匹に腫瘍が認められた。cKP (+/+) と cKP (F/+) のマウスに認められた腫瘍は病理医によって病理学的に高分化型 PDAC と診断された。一方で、cKP (F/F) の腫瘍は、中~低分化型の PDAC と診断された。腫瘍の直径は、cKP (+/+) と cKP (F/+) の遺伝子型に比べて cKP (F/F) の方が大きかった。cKP (F/F) に見られた 6 つの腫瘍のうち、2 つは十二指腸に浸潤し、1 つはリンパ節に浸潤していた。

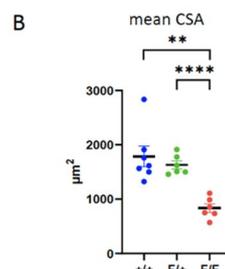
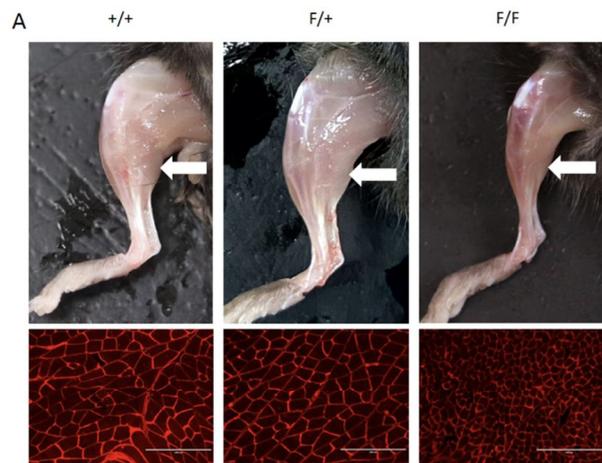
(4) 80 日齢 cKP (F/F) の膵臓腫瘍では、サイトカイン産生の上昇を認めた

80 日齢の cKP (F/F) と cKP (F/+) の膵臓組織における transcriptome を比較したところ、遺伝子発現パターンが大きく異なることがわかった。cKP (F/F) では、30 日目に見られた Erk シグナル経路に関係する遺伝子発現上昇が 80 日目まで持続していた。また、30 日目に見られた NF- κ B および TNF シグナル経路に関連する遺伝子の発現上昇が、80 日目まで持続していた。そこで、転写レベルで上昇していた 4 種類の炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、Ccl2) が、血清のレベルでも上昇しているのかを調べた (右図)。それらの 4 種類の炎症性サイトカイン、特に IL-6 のレベルが、cKP (F/F) の血清では cKP (+/+) および cKP (F/+) と比較して著しく上昇していることがわかった。



(5) cKP マウスにおける *Ppp6c* 欠損は、骨格筋の萎縮と脂肪組織の減少を促進する

最近の解析では、ヒト PDAC 細胞由来の IL-6 がマウスの筋肉の萎縮と脂肪分解を誘導することが明らかになった。cKP (F/F) の血中 IL-6 濃度は cKP (F/+) に比べて有意に高いことから、各遺伝子型の筋肉と脂肪を比較した。右図 A は、3 種類の遺伝子型のマウスの代表的な腓腹筋を示している (右図 A 上段)。筋肉組織の横断面図では、cKP (F/F) では筋肉が細く、筋原線維の横断面積が小さいことがわかる (右図 A 下段、右図 B)。次に、3 つの遺伝子型の各雄マウス 4 匹を用いて、脂肪組織への影響を調べた。cKP (F/F) マウスの精巣上体脂肪組織の重量は、cKP (F/+) および cKP (+/+) に比べて著しく減少していた。また、cKP (F/F) の血清中には、脂肪組織の分解に由来する遊離脂肪酸とグリセロールが減少していることが観察され、80 日齢までに脂肪組織が著しく枯渇していることが示唆された。



(6) まとめ

cKP マウスの膵臓で *Ppp6c* を欠損すると、変異誘発後 150 日以内がんにによる死亡が促進された。また、*Ppp6c* ホモ欠損 cKP マウスを *Ppp6c* ヘテロまたは野生型 cKP マウスと 80 日齢で比較したところ、*Ppp6c* ホモ欠損マウスでは、腫瘍化の割合、大きさ、悪性度のいずれにおいても亢進していた。以上のことから、*Ppp6c* は新規の膵臓腫瘍がん遺伝子であると結論づけた。調べうる限りでは、セリン・スレオニンホスファターゼがマウスの膵臓発癌においてがん抑制遺伝子として機能していることを示したのは、今回のものが初めてである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanazawa K, Kishimoto K, Nomura M, Kurosawa K, Kato H, Inoue Y, Miura K, Fukui K, Yamashita Y, Sato I, Tsuji H, Watanabe T, Tanaka T, Yasuda J, Tanuma N, Shima H	4. 巻 112(6)
2. 論文標題 Ppp6c haploinsufficiency accelerates UV-induced BRAF(V600E)-initiated melanomagenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2233-2244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14895.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kishimoto K, Kanazawa K, Nomura M, Tanaka T, Shigemoto-Kuroda T, Fukui K, Miura K, Kurosawa K, Kawai M, Kato H, Terasaki K, Sakamoto Y, Yamashita Y, Sato I, Tanuma N, Tamai K, Kitabayashi I, Matsuura K, Watanabe T, Yasuda J, Tsuji H, Shima H	4. 巻 10(13)
2. 論文標題 Ppp6c deficiency accelerates K-ras(G12D)-induced tongue carcinogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 4451-4464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.3962.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	島 礼 (Shima Hiroshi) (10196462)	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・部長 (81303)	
研究分担者	山下 洋二 (Yamashita Youzi) (30420045)	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 (81303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	加藤 浩之 (Kato Hiroyuki) (90770347)	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 (81303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関