

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17365

研究課題名(和文)皮膚UV誘発がんを高頻度で変異が見つかるがん抑制遺伝子Ppp6cの解析

研究課題名(英文) Analysis of the cancer suppressor gene Ppp6c, which is frequently mutated in skin UV-induced cancer.

研究代表者

加藤 浩之 (Kato, Hiroyuki)

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：90770347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メラノサイト特異的にBRAF(V600E)発現および、Ppp6c欠損を誘導できるマウスを作製した。このマウスを用いて、BRAF(V600E)発現および紫外線誘発Trp53変異下では、Ppp6cハプロ不全は腫瘍形成を促進することが示された。Ppp6cヘテロ欠損型の腫瘍は、Ppp6c野生型の腫瘍よりもシグネチャー1変異指数が高く、細胞分裂の増加を示唆していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日光に曝露されたメラノーマ症例の12%でプロテインホスファターゼ6(PP6)をコードするPpp6cの変異があり、BRAFまたはNRAS変異を有する組織にのみ同定された。今回の研究成果により、世界で初めて、Ppp6cが新規のメラノーマ抑制遺伝子であるという証明をすることができた。本研究の成果であるメラノーマモデルマウスを用いることで、新規のメラノーマ治療の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：According to the TCGA database, mutations in PPP6C are found in approximately 10% of tumors from melanoma patients, where they coexist with BRAF and NRAS mutations. To assess PP6 function in melanoma carcinogenesis, we generated mice in which we could specifically induce BRAF (V600E) expression and delete Ppp6c in melanocytes. In these mice, melanoma susceptibility following UVB irradiation exhibited the following pattern: Ppp6c semi-deficient > Ppp6c wild-type > Ppp6c-deficient tumor types. Next-generation sequencing of Ppp6c heterozygous and wild-type melanoma tumors revealed that all harbored Trp53 mutations. Analysis of cell lines derived from either Ppp6c heterozygous or wild-type melanoma tissues showed that both formed tumors in nude mice, but Ppp6c heterozygous tumors grew faster than those from the wild-type line. We conclude that in the presence of BRAF (V600E) expression and UV-induced Trp53 mutation, Ppp6c haploinsufficiency promotes tumorigenesis.

研究分野：がん抑制遺伝子、発がん実験、皮膚がん

キーワード：メラノーマ マウス発がん実験 PP6 BRAF 紫外線

1. 研究開始当初の背景

背景 1 . Ppp6c 遺伝子変異が、皮膚基底細胞がんやメラノーマで報告されている

- ・皮膚基底細胞がん：Ppp6c の欠損・変異が変異型 p53 と共存する。PP6 機能不全が、変異型 p53 と共に皮膚基底細胞がんの発症に関与することを示唆している。
- ・メラノーマ：Ppp6c の機能欠失型変異が、NRAS または BRAF 変異と共存する。PP6 機能不全が活性化型 NRAS または BRAF と共に、メラノーマ発症に関与することを示唆している。

背景 2 . PP6 と発がんに関する、我々の作業仮説

申請者らは、紫外線誘発発がん実験を行い、Ppp6c 欠損皮膚では、高頻度に扁平上皮がん(SCC)が発生することを報告した。全てがん組織では、P53 変異および H2AX(2 本鎖切断のマーカ)の蓄積があった。このことから、p53 の変異と Ppp6c の機能欠損により、ゲノム不安定性や抗アポトーシスの亢進が起こり、腫瘍化が進むと考えた。

2. 研究の目的

紫外線照射によるメラノーマ発生に関しても、(Ppp6c)が、がんの抑制遺伝子である可能性を考えた。そこで、がんゲノムデータベースを調べると、約 10% 程度の悪性黒色種で遺伝子変異が認められることが分かった。しかし、Ppp6c が、生体内においてメラノーマの抑制遺伝子として働くか否かの証明はされていない。

我々は、マウスメラノサイト特異的に 2 重変異(Ppp6c 欠損+変異型 BRAF)を導入し、メラノーマが発症するかどうかを明らかにすること、また、その発症への紫外線の影響明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1 . メラノサイト特異的誘導性 BRAF^{V600E} と Ppp6c 欠損マウスの作製

Tyr-CreER^{T2}: BRAF^{CA/CA}: Ppp6c^{lox/+} マウスは、以前に我々が作製した Ppp6c-floxed(Ppp6c^{lox/flox})マウスと Tyr-CreER^{T2}: BRAF^{CA}: Pten^{lox/p} (Jackson Laboratory 013590)とマウスを交配することにより作製した。発がん実験には、Tyr-CreER^{T2}: BRAF^{CA/+}: Ppp6c^{lox/flox}、Tyr-CreER^{T2}: BRAF^{CA/+}: Ppp6c^{lox/+}、および Tyr-CreER^{T2}: BRAF^{CA/+}: Ppp6c^{+/+} マウスを用いた。これらのマウスは、Tyr-CreER^{T2}: BRAF^{CA/CA}: Ppp6c^{lox/+} と Ppp6c^{lox/+} マウスを交配させて作製した。

2 . UVB によるメラノーマの誘導

上記で作製した 8 週齢のマウスの背側を剃毛し、皮膚に 4HT (25 mg/ml) を含む 100 μ l のアセトンを 3 日間連続塗布した。最初の 4HT 塗布の 2 週間後に、マウスをイソフルランで麻酔し、Bio-LINK BLX システム (Vilber Lourmat, France) を用いて、2 KJ/m² の UVB 照射を週 1 回、1 分間、6 ヶ月間行った。光源は UVB312nm をスペクトルピークとするものを用いた。直径 1mm を超える腫瘍の数、大きさを毎週評価した。

3 . メラノーマ細胞の分離と培養

メラノーマ細胞を単離し、Soo の方法で培養した。腫瘍の体積が 2000mm³ に達したとき、マウスを安楽死させ、腫瘍を採取した。腫瘍をミンスし PBS で洗浄した後、1.5ml の PBS と 1.5ml の Trypsin-EDTA 溶液 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を加え、37°C、15 分間インキュベートした。その後、5%FCS を含む 10 ml の RPMI 増殖培地を加えた。この細胞懸濁液をセルストレーナー (100 μ m : FALCON REF 354360) に通し、マイトマイシン処理した XB2 ケラチノサイト上に撒き、200 nM TPA を加えた 5% FCS を含む RPMI 増殖培地で培養した。

4 . 腫瘍原性試験

同種移植実験では、UVB 照射によって形成した腫瘍から単離したメラノーマ細胞をヌードマウスの背側に、1 か所あたり 1x10⁶ 個皮下注射した。腫瘍の大きさをノギスで測定し、腫瘍体積は標準式(長径 x 短径²)/2 にて算出した。

5 . ターゲットの選択とシーケンス

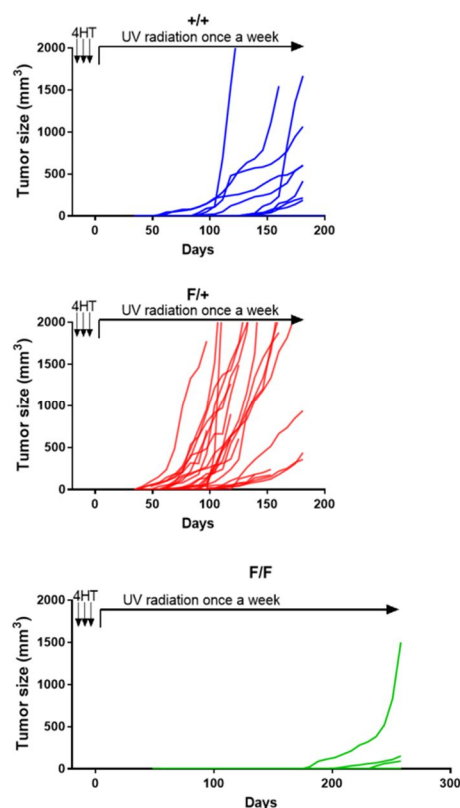
今回、全ゲノムのうちエクソン配列のみを網羅的に解析する、全エクソンシーケンスを、理研ジェネシス社 (Kawasaki, Japan) に委託した。ゲノム DNA を、GeneRead DNA FFPE キット (Qiagen, Venlo, Netherland) を用いてホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から抽出して、約 200bp に断片化した。その後 SureSelectXT 試薬キット (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いてマルチプレックスペアエンドシーケンス (多反応同時に DNA 断片の両端の塩基配列を決定する) 用のライブラリーを調製した。調製したライブラリーを、SureSelectXT Mouse All Exon Kit (cat number. 5180-4641, Agilent Technologies) を用いて、マウス全エクソン領域をカバーするビオチン化 cRNA オリゴヌクレオチドにハイブリダイゼーションを行い、アビジン-ビオチン結合を利用して標的配列 (エクソン) を濃縮した。目的とする配列を磁気ビーズで精製、増幅し、Illumina NovaSeq 6000 プラットフォームを用い 151bp ペアエンドの配列を決定した。

4. 研究成果

本研究の目的は、マウスの生体内で *Ppp6c* ががん抑制因子として働くかどうかを証明することであった。この目的のために、メラノサイト特異的に *Braf* (V600E) と *Ppp6c* のヘテロ接合性またはホモ接合性の変異を持つ二重変異マウスを作製した。紫外線照射後、最初に *Ppp6c* ヘテロ接合体、次に *Ppp6c* WT マウス、そして最後に *Ppp6c* ホモ接合体に腫瘍が出現した (図 1)。

すべての腫瘍で *Braf*^{CA} アレルと *Ppp6c*^{fllox} アレルの組み換えが確認された。病理学的所見とメラノーママーカー S100、SOX10、HMB45 の陽性率から、マウスに発生した腫瘍はメラノーマであると判断した。*Ppp6c* ヘテロ接合体の 11 個のメラノーマ組織と *Ppp6c* WT の 4 個のメラノーマ組織を対象に、次世代シーケンスによるエクソン解析を行った。その結果、すべての組織に *Trp53* 変異が認められた。また、変異シグネチャー解析の結果、両タイプの腫瘍において紫外線照射の影響を示すシグネチャー 7 の変異が優位に検出された (表 1)。このことから、メラノサイトは *BRAF* の突然変異と紫外線照射による *Trp53* の突然変異の複合的な影響で腫瘍化し、*Ppp6c* のヘテロ欠損がこの過程を促進している可能性が高いと結論づけた。

図 1



しかしながら、ホモ接合体ではなくヘテロ接合体における *Ppp6c* 欠損が *Ppp6c* WT よりも早期に腫瘍が発生するという事実は、非常に予想外のことであった。非黒色腫皮膚癌の発癌に関する我々の以前の研究 および口腔癌に関する我々の最

| COSMIC | association | W/W average | Flox/W average | p-value |
|--------------|-------------------------|-------------|----------------|---------|
| Signature 1 | Mitotic clock | 0.193 | 0.303 | 0.0378 |
| Signature 2 | APOBEC | 0.064 | 0.062 | 0.937 |
| Signature 7 | UV exposure/skin cancer | 0.500 | 0.496 | 0.950 |
| Signature 10 | PolE hyper-mutation | 0.202 | 0.028 | 0.237 |
| Signature 17 | Similar to Signature 2 | 0.000 | 0.014 | 0.167 |
| Signature 20 | PolD1 MSI high | 0.000 | 0.012 | 0.167 |
| Signature 25 | Chemotherapy treatment | 0.020 | 0.038 | 0.517 |

近の研究では、*Ppp6c* ヘテロ接合体ではなく *Ppp6c* ホモ接合体の方が優位に腫瘍形成を促進することが示されている。 *Ppp6c* ヘテロ接合体では、*Ppp6c* WT 腫瘍よりも優位にシグネチャー1 変異 (有糸分裂時計 / DNA 複製エラーの蓄積) が高かった。これは、*Ppp6c* ヘテロ接合体腫瘍細胞は、

*Ppp6c*WT 腫瘍由来の細胞よりも分裂数が多いことを表している。したがって、*Ppp6c* ヘテロ接合体腫瘍は、細胞周期が短いために、より早く発生している可能性がある。さらに、*Ppp6c* ヘテロ接合体腫瘍の特異的変異は、*Ppp6c* WT 腫瘍よりも高い Ts/Tv 比を示した (表 2)。これは、おそらく細胞分裂中に発生する C-G 変換の複製エラーが高いためであると考えられる。

| | W/W total | (std) | Flox/WT total | (std) | p-value |
|------------------|-----------|----------|---------------|----------|---------|
| Average VF | 0.157 | (0.0876) | 0.181 | (0.0666) | 0.676 |
| Total Unique | 573 | (765) | 620 | (576) | 0.926 |
| INDEL | 1.00 | (1.22) | 1.18 | (1.75) | 0.845 |
| SNV | 572 | (764) | 618 | (575) | 0.927 |
| Splicing related | 26.8 | (40.6) | 31.5 | (28.7) | 0.861 |
| Missense | 517 | (684) | 553 | (520) | 0.935 |
| Nonsense | 27.3 | (38.60) | 32.2 | (26.1) | 0.846 |
| Ts | 470 | (620) | 474 | (439) | 0.991 |
| Tv | 101 | (142) | 143 | (136) | 0.671 |
| Ts/Tv | 5.329 | (0.928) | 3.60 | (0.828) | 0.0383 |

これらのメラノーマ組織を用いて、なぜ *Ppp6c* ホモ接合体の腫瘍がヘテロ接合体の腫瘍よりも腫瘍形成能が低下しているのかを調べた。まず、*Ppp6c* ホモ接合体およびヘテロ接合体のメラノーマ細胞株を樹立した。樹立した細胞をヌードマウスに移植したところ、*Ppp6c* ヘテロ接合体細胞は *Ppp6c* ホモ接合体細胞よりも早く腫瘍を形成した。また、*Ppp6c* siRNA を導入したヘテロ接合型メラノーマ細胞は、コントロール siRNA を導入した細胞に比べて、 γ H2AX と活性化カスパーゼ-3 の蓄積量が多かった。これは BRAF(V600E) と Trp53 の変異が DNA 損傷の頻度を増加させ、非相同末端結合を介した DNA 二本鎖切断 (DSBs) の DNA 修復の頻度を増加させる可能性を示唆している。PP6 が DNA-PK 依存性のメカニズムを介してホモロジー誘導修復に関与しているとの報告があることから、PP6 欠損状態では DSBs が完全に修復されず、蓄積されることで細胞がアポトーシスを起こした可能性がある。

本研究では、*Ppp6c* がメラノーマの腫瘍抑制因子として作用することが明らかになった一方で、臨床応用を視野に入れた薬剤感受性を調べるまでには至らなかった。今後薬剤による縮小効果が認められるか検討する必要があると考えられる。今回樹立したメラノーマ細胞株を再度マウスに移植して腫瘍を発生させ、免疫チェックポイント阻害薬や分子標的薬の効果を調べる追加実験を行うことも検討している。

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|