

令和 5 年 4 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16852

研究課題名(和文) RTK/RAS/PI3K遺伝子異常による頭頸部腫瘍発生を抑制する一治療への展開

研究課題名(英文) Suppressing Head and Neck Tumorigenesis Caused by RTK/RAS/PI3K Gene Abnormalities - Therapeutic Application

研究代表者

黒沢 是之(kurosawa, koreyuki)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10770349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの舌で、K-rasG12D発現に加えてPP6ホスファターゼ遺伝子(Ppp6c)を欠損させると早期に上皮内癌が発症し約2週間で安楽死処置となった。一方でK-rasG12D発現のみでPpp6cが正常の場合ほとんど野生型の舌と区別がつかなかった。K-rasG12D + Ppp6c欠損の腫瘍組織においては、ERK-ELK-FOS axis、AKT-4EBP1 axis、AKT-FOXO-CyclinD1の活性化が認められた。また、H2AXの蓄積とNFκB経路の活性化が認められた。マウス舌において、PP6の機能不全は、KRAS(G12D)依存的腫瘍化を強く増強させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のところ、がん原性RASによって発生したがんの治療法として、数多くの抗RAS試薬が提案されているが、決定的な治療法はまだ確立されていない。今回、我々は、PP6ホスファターゼが変異型RASによりドライブされるERK、AKT、NFκBの異常な活性化を抑制することで、腫瘍抑制因子として機能していることを発見した。現在、世界中でホスファターゼの活性化物質のスクリーニングが行われている。将来的には、PP6活性化因子が、変異型RASによる発がんを抑える新しい治療戦略となりうるのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of PP6 gene (Ppp6c) deficiency on tongue tumor development in K (K-rasG12D)- and KP (K-rasG12D + Trp53-deficient)-inducible mice. Mice of K and KP genotypes developed squamous cell carcinoma in situ in the tongue approximately 2 weeks after induction of gene recombination, and was euthanized due to 20% loss of body weight. Transcriptome analysis revealed significantly different gene expression between tissues of Ppp6c-deficient tongues and those of Ppp6c wild type, while Trp53 deficiency had a relatively smaller effect. We then evaluated signals downstream of RAS as well as those regulated by PP6 and found that Ppp6c deletion in the presence of K-rasG12D enhanced activation of the ERK-ELK1-FOS, AKT-4EBP1 and AKT-FOXO-CyclinD1 axes. Ppp6c deletion combined with K-rasG12D also enhanced DSB accumulation and activated NF kappa B signaling. Overall, we conclude that Ppp6c deficiency serves as a driver of KRAS(G12D)-initiated tumorigenesis in mouse tongue.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：舌癌 マウス発がん実験 PP6 KRAS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

背景 1. 我々が新規がん抑制遺伝子 (*Ppp6c*) を同定した

申請者は、*Ppp6c* 遺伝子改変マウスを用い紫外線誘発がん実験を行った。*Ppp6c* 欠損皮膚では、高頻度に扁平上皮がん (SCC) が発生し、興味のあることに全てのがん組織で P53 変異が同定された。

次に DMBA/TPA 皮膚発がん実験を行った。*Ppp6c* 欠損皮膚ではパピローマが早期に発症した、興味あることに全てのパピローマ組織に HRAS 変異が同定された。

背景 2. *Ppp6c* 遺伝子変異が、皮膚基底細胞がん、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・変異が高頻度に同定された。*Ppp6c* がヒトでもがん抑制遺伝子であることを示唆している。

・メラノーマ：メラノーマ遺伝子変異データベースによると、*Ppp6c* の機能欠失型変異 (LOH も伴う) が、*NRAS* または *BRAF* 変異と共存する。このことは、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 3. 頭頸部がんにおいて *Ppp6c* 遺伝子発現低下と予後不良に強い相関関係がある

頭頸部がんを含む複数のがんでは *Ppp6c* 遺伝子の発現低下と強い相関関係がある (頭頸部がん: GSE2837)。

2. 研究の目的

課題 1: 仮説「*Ppp6c* 機能不全は、p53 変異と相乗的に腫瘍化を促進する」の検証

我々が行った紫外線発がん実験、およびヒト基底細胞がんのデータから我々は上記の仮説を持った。

上記の証明のため、全身の扁平上皮細胞で 2 重変異 (変異型 *p53* 発現と *Ppp6c* 欠損) を惹起するマウスの作製を行い、本マウスの全身および口腔内の扁平上皮細胞において、2 重変異 (変異型 *p53* と *Ppp6c* 欠損) を惹起させ、*Ppp6c* 欠損が、変異型 *p53* による腫瘍形成をさらにドライブするかを検証する。

課題 2: 仮説「*Ppp6c* 機能不全は、活性化型 RAS による腫瘍化を促進する」の検証

我々が行った DMBA/TPA 発がん実験およびメラノーマのデータから我々は上記の仮説を持った

上記の証明のため、全身の扁平上皮細胞で 2 重変異 (変異型 *KRAS* 発現と *Ppp6c* 欠損) を惹起するマウスの作製を行い、本マウスの全身および口腔内の扁平上皮細胞において、2 重変異 (変異型 *p53* と *Ppp6c* 欠損) を惹起させ、*Ppp6c* 欠損が、活性化型 RAS による腫瘍形成をさらにドライブするかを検証する。

課題 3: 仮説「舌がんにおいて、*Ppp6c* はがん抑制遺伝子として働く」

舌特異的に、2 重変異 (*p53* 変異と活性化型 *KRAS*) を導入し、それに対する *Ppp6c* の機能不全の影響を調べる。

3. 研究の方法

マウスの作成と変異の導入方法:

[課題 1]: 重層扁平上皮特異的に 2 重変異 (*p53* 欠損と *Ppp6c* 欠損) を惹起させるマウス
K14-Cre^{TAM}; *p53^{loxp/loxp}*; *Ppp6c^{flox/flox}* 変異導入は、腹腔内投与でおこなった。

[課題 2]: 重層扁平上皮特異的に 2 重変異 (活性化型 *KRAS* 発現と *Ppp6c* 欠損) を惹起させるマウス

$K14-Cre^{TAM}; Kras^{LSL-G12D/+}; Ppp6c^{flox/flox}$

[課題3]: K マウス(変異型 KRAS 発現)および KP マウス(変異型 KRAS 発現+Trp53 欠損)の作製と、そのマウスの舌発がんにおける、Ppp6c 欠損の影響の解析。

$Ppp6c^{flox/flox}$ マウスは以前当教室で作製した。 $ROSA26-CreERT^2$ マウスは、Taconic Bioscience から購入した。 $K-ras^{LSL-G12D/+}$ マウスおよび $Trp53^{flox/flox}$ マウスは、Jackson Laboratory から購入した。それぞれと掛け合わせて作成した。変異の導入は、舌にタモキシフェンを塗布することで行った。

4. 研究成果

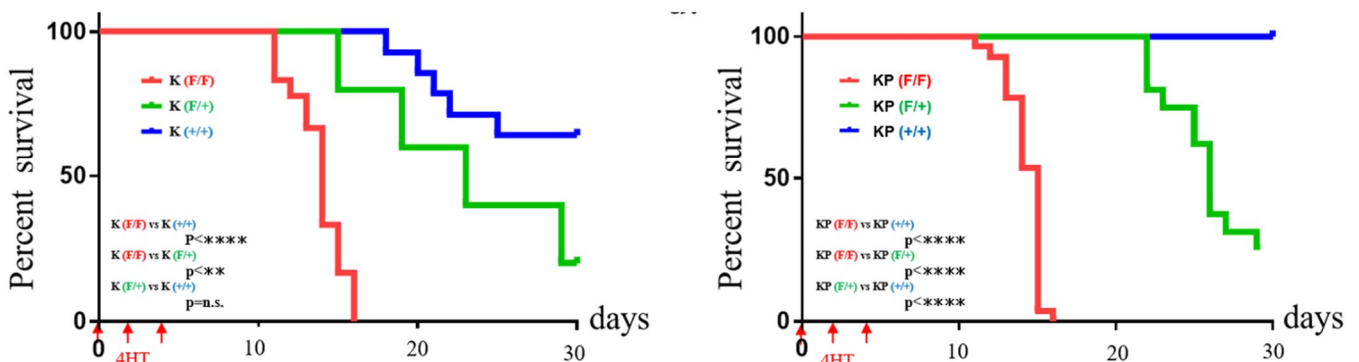
課題1と課題2に関しては、Ppp6c 欠損による腫瘍形成への影響については、明快な結果が出なかった。一方で、課題3に関して、再現性のあるデータを得た。課題3について報告する。

(1) K および KP マウスにおける腫瘍の発生

$Kras^{LSL-G12D/+}$ マウス(K マウス)に対して、それぞれ、 $Ppp6c^{flox}$ アレルをホモにもつマウス、ヘテロにもつマウス、両アレル共に野生型のマウス、それぞれ K(F/F)、K(F/+), K(+/+) マウスを作製した。また、 $K-ras^{LSL-G12D/+}; Trp53^{flox/flox}$ マウス(KP マウス)に対して、それぞれ、 $Ppp6c^{flox}$ アレルをホモにもつマウス、ヘテロにもつマウス、両アレル共に野生型のマウス、それぞれ KP(F/F)、KP(F/+), KP(+/+) マウスを作製した。

K および KP マウスを用いて、舌への4HT 塗布後、マウスの体重変化を30日間にわたって調べた(図1)。K(F/F)マウスでは、誘導後13日に、統計的に明らかな約20%の体重減少をきたし安楽死処分とした。一方、K(+/+)マウスでは、K(F/F)マウスに比べて体重減少は緩和に起こり統計学的に有意な差

図1



があった。K(F/+)マウスでは、K(F/F)マウスとK(+/+)マウスの中間の体重減少率であった(図1左)。

4HT 誘導後13日目のK(+/+)およびK(F/+)マウスの舌の全体の肉眼所見により、舌の腹側と背側の全体にわたって肥厚していることが分かった。またHE所見により、 $K-ras^{G12D}$ 発現のみでは、野生型の舌と区別がつかないが、 $K-ras^{G12D}$ に $Ppp6c$ 欠損が加わることで、上皮全体が肥厚していることが分かった。

一方で、KP マウスにおいても、F/F型、F/+型、+/+型で、同様の経時変化で体重減少をおこし、F/F型は誘導後13日に、明らかな体重減少をきたして安楽死処分とした(図1右)。また、舌の肉眼所見、HE染色所見ともに、KP(F/F)、KP(F/+), KP(+/+)は、それぞれK(F/F)、K(F/+), K(+/+)のものと同様な差は認められなかった。

次に、腫瘍内の病理学的解析を行った。4HT 処理したK(F/F)およびKP(F/F)舌の上皮全体に細胞極性の喪失を伴う細胞異形が観察された。連続切片の免疫染色では、増殖マーカーであるKi-67とMCM2、扁平上皮マーカーであるサイトケラチン5(CK5)がすべての層に渡って観察され、病理組織学的にin situの扁平上皮癌(SCC in situ)と鑑別された。

(2) K および KP マウスにおける ERK および AKT の活性化

ERK と AKT は主要な RAS エフェクターであり、細胞の増殖・成長を司るセリン・スレオニンキナーゼである。我々は、リン酸化タンパク質抗体アレイを用いて、4HT 投与後 13 日目に K(F/F)マウスの舌上皮において K(+ / +)マウスと比較してリン酸化の増加を示すタンパク質をスクリーニングした。その結果、RAS/MAPK 経路タンパク質である MEK1 (T286,T291,S298) ERK (T202) ELK1 (S389) および p90RSK(T359/S363,T573) のリン酸化が上昇していた。その確認のため、組織における ERK 経路の活性化の有無を調べた。4HT 処理した K(F/F)舌では上皮全体にリン酸化された ERK1/2(T202/Y204)が強く染色され、核を中心にリン酸化された ELK-1(S389)が強く染色されていた。一方で K(+ / +)マウスの舌組織では両方の染色が弱かった。このことは、ERK/ELK の活性化により標的となる遺伝子の転写が亢進していることが考えられた。図 2 は、4HT 処理した K(F/F)における MAPK signal pathway 経路の遺伝子の発現を、4HT 処理した K(+ / +)のものとは比較したものである。

注目すべきは、ERK 活性化の際に上昇する負の feed back 因子 MKP 群 (*DUSP6*, *DUSP4*, *DUSP9*, *DUSP7*, *DUSP5*)の発現上昇である。このことは ERK/ELK-1 の活性化が起こっていることを裏付けている。この状況で、ELK-1 の標的である *Fos* の発現上昇が確認できた。さらに興味のあることに EGFR のリガンドである *Areg* も上昇している。

なお、KP マウスでも、ERK および ELK-1 のリン酸化に対する *Ppp6c* 欠失の効果は、K マウスで見られた効果とほぼ同じであった。

次に PI3K-AKT 経路に関連するタンパクのリン酸化を検討した。K(F/F)マウスの舌上皮では、K(+ / +)マウスと比較して、PDK1(S241)、AKT1(T72, S124, S473, Y326)、TSC(S939)、mTOR(S2481)、4EBP(S65)のリン酸化が亢進していた。

その確認のため、組織における AKT 経路の活性化の有無を調べた。そこで、4HT 処理した K(F/F)マウス舌においては、AKT1(T308)および 4EBP1(S65)のリン酸化レベルが、K(+ / +)舌と比較して著しく亢進していることがわかった。4EBP1(S65)のリン酸化が上昇していることにより、K(F/F)舌でのタンパク質合成が亢進していることが示唆された。PI3K-AKT 経路関連遺伝子の発現を示す (図 3) 。

Eif4bp1(4EBP1) の発現が K(F/F)で上昇していることが示された。4EBP1 はリン酸化されているだけでなくその量も増大していると考えられた。

その他、4HT 処理した K(F/F)舌では、*Ccnd1*(*Cyclin D1*)の発現が増加し、*Ccnd 2* (*p27Kip1*)の発現が減少していることが示された。また、

CDK/Cyclin は AKT による p21/p27 の不活性化により活性化されるが、この構成因子である *Ccne 1* (*Cyclin E1*)と *cdk 6*の発現が亢進していることも示された。これらのデータは、4HT 処理した K(F/F)舌組織では、K(+ / +)のそれと比較して、AKT シグナルがアップレギュレーションされ、細胞周期が加速されていることを示唆している。ここでも、KP マウスの *Ppp6c* 欠失後に見られる AKT および 4EBP1 のリン酸化に対する効果は、K マウスで見られるものと同程度であった。

図 2 【MAPK Signaling Pathway : K (F/F) vs K (+/+)]

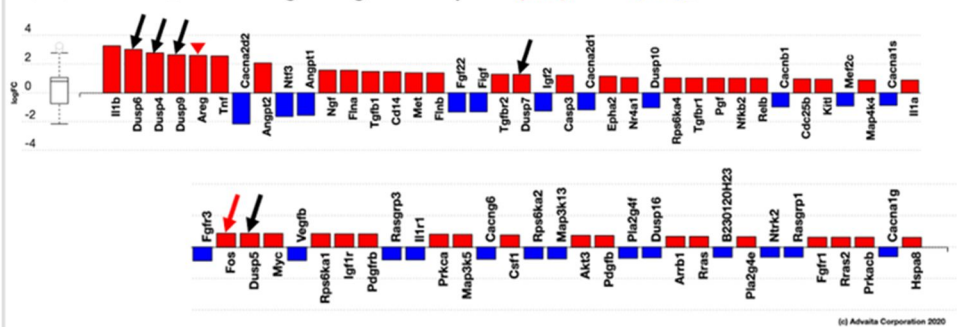
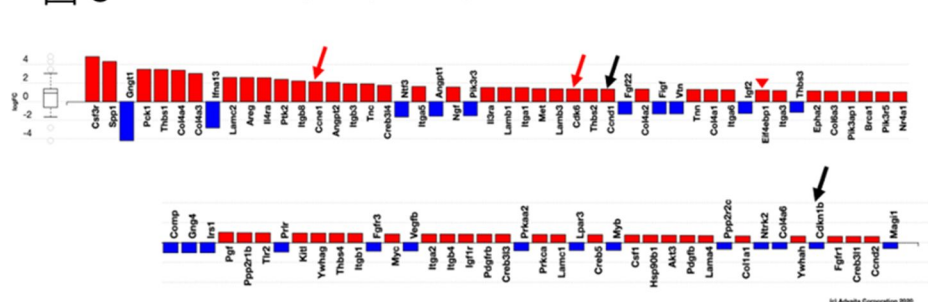


図 3 【PI3K-AKT Signaling Pathway : K (F/F) vs K (+/+)]



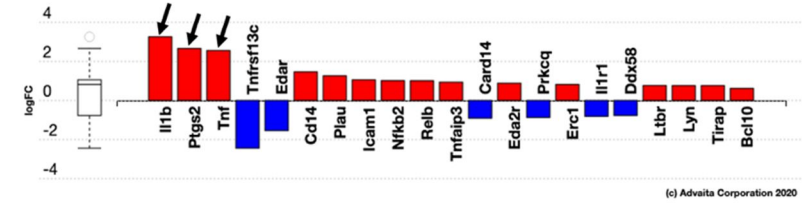
(3) K および KP マウスにおける DSB の蓄積、および NFκB 経路の活性化

PP6 は、DNA 二重鎖切断(DSB)の DNA 修復において、DNA-PK を介して非相同性末端接合(NHEJ)に必要であることが報告されている。そこで、*Ppp6c* 欠損が DNA 修復に及ぼす影響を調べた。DNA 修復経路に関連するリン酸化タンパク質に関連する抗体アレイデータを解析した。リン酸化された DNA-PK(T2638)、ヒストン H2AX(S139)、BRCA1(S1457,S1524)、ATRIP(S68/72)、Chk1(S286,S286)および Chk2(T68,T383)のレベルは、4HT 処理した K(F/F)舌において、K(+/+)のそれより増加し、DNA 損傷および DNA 修復経路の活性化が増強されていることが示唆された。

このことを組織レベルで検討した。免疫染色組織像では、4HT 処理した K(F/F)舌において、K(+/+)のそれに比べて γ H2AX の有意な蓄積が見られた。KRAS(G12D)は活性酸素種(ROS)を誘導して DNA 切断を促進することが報告されているが、4HT 処理した K(+/+)舌の γ H2AX 陽性数に対する KRAS(G12D)の影響は野生型と比較してわずかであった。*Ppp6c* 欠損は KRAS(G12D)によって発生した DNA 損傷を増強させたと考えられる。KP マウスも同様の結果を示した。

NF κ B シグナル伝達に関連して、これまでの研究では、PP6 が I κ B ϵ を特異的に脱リン酸化することが示されている。我々のリン酸化タンパク質解析は、K(+/+)舌組織と比較して、4HT 処理した K(F/F)舌の組織で、特に I κ B ϵ (Ser22)のリン酸化が上昇していることを示した。I κ B ϵ のリン酸化はその分解を促進し、RelA が核内に入ることを可能にする。そこで、我々は、RelA の存在について舌組織の免疫組織学的分析を行った。RelA は、4HT 処理した K(+/+)組織よりも K(F/F)組織にはるかに多く存在し、その局在は主に核内であり、主に上皮の上層の細胞に見られた。図 4 は、4HT 処理した K(F/F)舌組織における NF κ B 経路関連遺伝子発現を、K(+/+)のそれと比較したものである。注目すべきは、RelA の標的である *IL-1 β* 、*Ptgs2*(*COX2*) および *TNF* の発現が、K(F/F)舌において、K(+/+)と比較して顕著に増加している点である。KP マウスも同様の結果を示した。

図 4 【NF-kappa B signaling pathway : K (F/F) vs K (+/+)】



(4) まとめ

本研究では、K マウスの系を用いてがん原性 RAS によるマウスの舌発がんへの *Ppp6c* 欠損の影響を調べた。加えて、KP マウスの系を用いて、*Trp53* が欠損した状態におけるがん原性 RAS によるマウスの舌発がんへの *Ppp6c* 欠損の影響を調べた。K マウス、KP マウスともに変異誘導の約 2 週間後に舌上皮内癌を発症し、20%の体重減少により安楽死処分となった。この結果、舌がんにおいても、*Ppp6c* はがん抑制遺伝子として働くことが示された。病理組織学およびトランスクリプトームの解析から、2 週間の KRAS(G12D)依存性腫瘍形成において、*Ppp6c* 欠損は *Trp53* 欠損よりも、腫瘍形成への影響が大きいことが示された。本研究の結果は、RAS の活性化が原因となる舌がん発生において、PP6 のダウンレギュレーションが発がん促進に働くことを強く示唆している。本研究は、RAS 依存性腫瘍発生において、PP6 の発現は重要な鍵になることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒沢是之
2. 発表標題 顎骨再建における術前コンピューターシミュレーションの活用
3. 学会等名 第64回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------