

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791251

研究課題名（和文）扁平上皮癌の分子病態：表皮イノシトールリン脂質代謝経路のシステム破綻とその制御

 研究課題名（英文）Molecular bases of squamous cell carcinogenesis:
regulation and failure of phosphatidyl inositol metabolism in epidermis

研究代表者

河村 七美（KAWAMURA NANAMI）

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：70323152

研究成果の概要（和文）：

我々は本研究課題において、扁平上皮癌の発生過程における phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) の p110 α 触媒サブユニット (p110 α) の動的役割を解明し、かつ新規分子標的治療法を模索することを試みた。その結果、*Pi3k*・*p110 α* ホモ欠失マウスは交配を繰り返したにもかかわらず、全く出生することはなく、胎生致死であることが判明した。また、*Pten* ヘテロ欠失マウスは、15ヶ月以内に62匹中8匹に腫瘍が自然発症し、また準備実験として実施した化学発癌処理により、早期より腫瘍が発生することが判明した。

研究成果の概要（英文）：

In this grant program, we attempted to elucidate the biological roles of p110 α isoform of phosphatidylinositol-3-kinase in squamous cell carcinogenesis. The transgenic mouse studies showed that the genetic defect of p110 α gene cause embryonic lethality, which suggested that p110 α may play important roles in the maintenance of keratinocyte stem cells. The further studies showed that the genetic defect of PTEN gene cause increased susceptibility to spontaneous and chemical carcinogenesis, which suggested that PTEN may play important roles in squamous cell carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：扁平上皮癌, PI3K, PTEN

1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルイノシトールは、細胞膜に普遍的に存在し、そのイノシトール環水酸基がリン酸化あるいは脱リン酸化を受けることで、イノシトールリン脂質（ホスホイノシチド：PIs）と総称される7種類の代謝産物が派生する。癌抑制遺伝子である *Pten* (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) は、脂質脱リン酸化酵素として機能し、ホスファチジルイノシトール

ル-3,4,5-3リン酸 PI(3,4,5)P₃ のイノシトール環水酸基を脱リン酸化し、ホスファチジルイノシトール-4,5-2リン酸 PI(4,5)P₂ へ変換する作用を持つ。

この PI(3,4,5)P₃ は固有の機能を有する生理活性メッセンジャーとして細胞内情報伝達において重要な役割を果たしている。例えば、これにリン酸化酵素である AKT が結合し活性化されると、その下流に位置するシグナル伝達分子が次々にリン酸化され、細胞増殖能の亢進やアポトーシス抵抗性の獲得など

が起きる。すなわち、細胞外情報分子による PI(3, 4, 5)P₃ の量的変動や細胞内局在の変化が、様々な生理応答を仲介することにより、細胞内情報伝達において重要な役割を果たしているのである。

これまで我々は、癌抑制遺伝子 *Pten* の欠失は、PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/Akt 経路の活性化を介して扁平上皮癌の発生段階における分子基盤の一端となることを報告した (Cancer Res 63: 674-681, 2003)。すなわち我々の作業仮説は、まず PTEN 発現が抑制された状態では、PI3K が PI(4, 5)P₂ をリン酸化して、PI(3, 4, 5)P₃ へと変換する。次いで PI(3, 4, 5)P₃ にリン酸化酵素である AKT が結合し活性化され、RAS-MAPK 経路を含む下流のシグナル伝達分子群を介して、細胞増殖能亢進やアポトーシス抵抗性の獲得などを生じさせる。よって、癌抑制遺伝子 *Pten* が欠失すると、PI3K-AKT シグナル経路と RAS-MAPK 経路が協調して活性化されるため、扁平上皮癌が発生する、と推察した。

2. 研究の目的

PI3K はその基質特異性からクラス I、II、III に分類される。中でもクラス I PI3K (IA, IB) は細胞内の PI(3, 4, 5)P₃ 産生の主要経路であり、触媒サブユニット (p100 α , p100 β , p100 γ , p100 δ) と調節サブユニット (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ , p50 α) からなる種々の組み合わせで構成されている。これらの各触媒サブユニットと調節サブユニット間の結合の優先的な組み合わせや、それに起因する酵素活性の相違に関しては未だ不明な点が多いが、各々の PI3K アイソフォームは下流分子の AKT を介して、アポトーシス・細胞増殖、細胞周期、血管新生などの多くの生物学的現象に関与している。

そこで今回申請する研究課題では、上記の PI3K サブユニットの中で、皮膚を含む種々の組織に広く分布し、また多くの悪性腫瘍の発生において重要な役割を果たしていると予想されている p110 α 触媒サブユニット (p110 α) に着目して、イノシトールリン脂質代謝経路のシステム破綻により生じる扁平上皮癌の分子病態を解明し、その制御を基盤とした治療法を模索する。具体的には、まず角化細胞特異的 *Pten* ホモ欠失マウスと p100 α ホモ欠失マウスを交配することにより、角化細胞特異的 *Pten* ホモ欠失マウス、PI00 α ホモ欠失マウス、*Pten* ホモ欠失かつ PI00 α ホモ欠失マウスを作成する。次いで、これらの新規に確立された遺伝子改変マウスを用いて、細胞増殖能、アポトーシス抵抗性、シグナル伝達分子の相互作用、腫瘍の発生頻度や選択的阻害の効果などを比較する。すなわち、本研究課題

では研究期間中に、

(1) *Pten* ホモ欠失による表現型や細胞特性は、PI00 α のホモ欠失により回復するか？

(2) *Pten* ホモ欠失による自然発癌や化学発癌処理に対する高感受性は、PI00 α ホモ欠失により回復するか？

(3) p110 α の選択的阻害により腫瘍転移の発生率が抑制されるか？などを検討することにより、扁平上皮癌の発生と転移における p110 α の動的役割を解明することを目指す。

扁平上皮癌の分子病態において、PI3K の果たす役割が重要であることは論を待たない。しかし、全ての PI3K サブユニットを阻害する薬剤は、毒性が強く臨床的に使用することが不可能である。この難問を打破するため、我々は表皮特異的に *Pten* と PI00 α をホモ欠失するマウスを用いて、扁平上皮癌の発生と転移における p110 α の動的役割を解明し、その特異的阻害剤を用いた分子標的治療法を創生することに挑戦する。

現在、PI3K を非特異的に阻害する薬剤を用いた分子標的治療の臨床試験が米国において進行中であるが、強い副作用や限定的な効果が報告され、その実用化には未だ改善すべき問題点が多く存在する。本研究課題において p110 α の動的役割が解明されることにより、近い将来には p110 α を治療標的分子とした画期的ながん治療が臨床展開されるものと確信している。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウスの作成

K5 プロモーター下に Cre を発現させた K5-Cre トランスジェニックマウスと PTEN 遺伝子に loxP 配列を導入した *Pten* flox/flox マウス、あるいは佐々木雄彦先生 (秋田大学) より供与された p110 α 遺伝子に loxP 配列を導入した PI00 α flox/flox マウスを交配し、角化細胞特異的 *Pten* ホモ欠失マウス、PI00 α ホモ欠失マウス、*Pten* ホモ欠失かつ PI00 α ホモ欠失マウスを作成する。

Pten および p100 α の欠失を確認するため、個々の遺伝子改変マウス皮膚よりゲノム DNA と全タンパク質を抽出した後、PCR と免疫ブロットを施行する。

Pten ホモ欠失マウスの表現型変化

Pten ホモ欠失マウスは、生後 3 日以降から角化細胞や角質層の過形成によって外見上、皺が多くなる。また体毛の表面が粗で光沢に

乏しく、捻転を不規則な間隔で繰り返している。

そこで、*Pten* ホモ欠失のため起こる皮膚と附属器の異常が、*P100α* のホモ欠失により回復するかを検討するため、野生型マウス、角化細胞特異的 *Pten* ホモ欠失マウス、*P100α* ホモ欠失マウス、*Pten* ホモ欠失かつ *P100α* ホモ欠失マウスの表現系に関して、肉眼的および顕微鏡的性状を比較する。

さらに、*Pten* のホモ欠失のため起こる毛周期の異常が、*P100α* のホモ欠失により回復するかを検討するため、加齢や抜毛などの負荷を加えた後に、体毛の変化を経時的に長期解析する。

Pten ホモ欠失角化細胞の特性回復

Pten ホモ欠失マウスから採取した培養角化細胞では、AKT や MAPK (ERK) が活性化しており、増殖能やアポトーシス抵抗性が亢進している。

そこで、*Pten* のホモ欠失による細胞増殖能やアポトーシス抵抗性の変化を検討するため、培養角化細胞におけるトリチウムチミンの取り込みや放射線照射後に生存している細胞数を比較する。また、*Pten* のホモ欠失が創傷治癒に及ぼす影響を検討するため、*in vivo* において潰瘍形成などの負荷を加えた後の上皮修復能や BrdU の取り込みなどを比較する。さらに、*Pten* のホモ欠失のため起こる PI3K/AKT 経路の下流に想定される分子の発現と活性化が、*P100α* のホモ欠失により回復するかを検討するため、これらのシグナル伝達分子の動態を免疫プロットにより解析する。

扁平上皮癌の自然発生抑制

これまで我々は、9ヶ月の観察期間中に *Pten* ヘテロ欠失マウスの23%、*Pten* ホモ欠失マウスの100%に腫瘍が自然発生することを報告している。

そこで、*Pten* のホモ欠失による腫瘍の自然発生が、*P100α* のホモ欠失により回復するかを検討するため、野生型、角化細胞特異的 *Pten* ホモ欠失マウス、*P100α* ホモ欠失マウス、*Pten* ホモ欠失かつ *P100α* ホモ欠失マウスにおける腫瘍の自然発生率を経時的に長期解析する。

扁平上皮癌の化学発癌抑制

これまで我々は、*Pten* ホモ欠失マウスの皮膚に、DMBA の初回塗布につづき、TPA を週2回継続して塗布すると、TPA 塗布開始後6週以内に全例において扁平上皮癌が発生することを報告している。

そこで、*Pten* のホモ欠失による腫瘍発生の促進が、*P100α* のホモ欠失により回復するかを検討するため、野生型マウス、角化細胞特

異的 *Pten* ホモ欠失マウス、*P100α* ホモ欠失マウス、*Pten* ホモ欠失かつ *P100α* ホモ欠失マウスにおける腫瘍の化学発癌率を経時的に解析する。

扁平上皮癌の特性回復

Pten ホモ欠失扁平上皮癌細胞の細胞学的特性は、*p110α* の発現を阻害することにより回復する可能性がある。

そこで、化学発癌処理を加えた *Pten* ホモ欠失マウスより扁平上皮癌を採取・培養し、*p110α* の発現を RNA 干渉法により選択的に阻害した後、コロニー形成能、スフェロイド形成能、低血清培地増殖能などを軟寒天培地法、非接着培養プレート法やMTTアッセイにより比較する。さらに抗体磁気ビーズを用いてCD34陽性細胞を採取し、幹細胞を定量する。

扁平上皮癌の肺転移抑制

Pten ホモ欠失扁平上皮癌細胞の転移能は、*p110α* の発現を阻害することにより抑制される可能性がある。

そこで、化学発癌処理を加えた *Pten* ホモ欠失マウスより扁平上皮癌を採取・培養し、*p110α* の発現を RNA 干渉法により選択的に阻害した後、尾静脈より注入し、2週間後における肺転移の発生率を解析する。

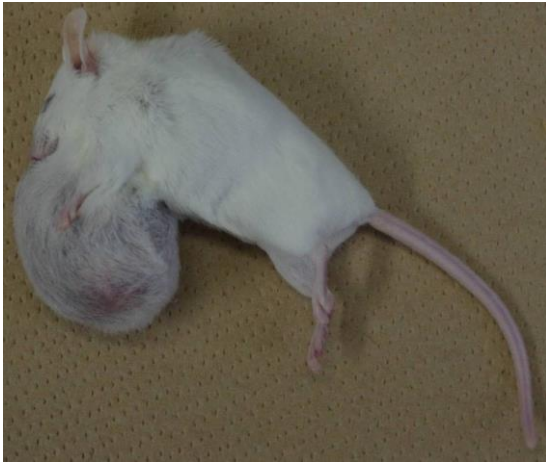
4. 研究成果

角化細胞特異的 *Pten* ホモ欠失マウスは出生率が低く、生存しても成体にいたるまでに死亡した。マウスが生存を維持できない機序として、*K5* が食道粘膜上皮でも発現することと関連があるものと思われる。すなわち、角化細胞特異的 *Pten* ホモ欠失マウスでは、食道粘膜上皮でも *Pten* が欠失しており、そのため食道粘膜上皮の肥厚と食道狭窄による栄養障害が発症しているものと推察される。また、角化細胞特異的 *Pten* ホモ欠失マウスは出生することがなく、胎生致死であることが判明した。マウスが胎生致死に到る機序は、詳細な解析を実施していないため現時点では不明であるが、恐らく *p110α* の完全欠失により皮膚・粘膜の形態形成に重篤な障害を来したためと推察される。

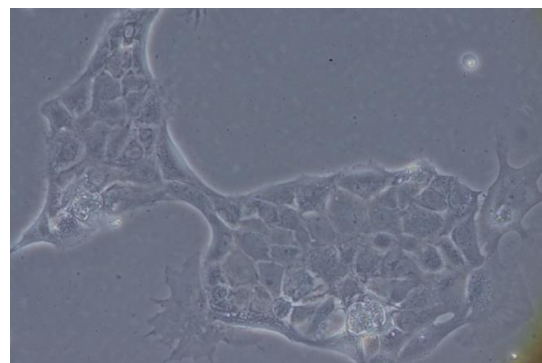
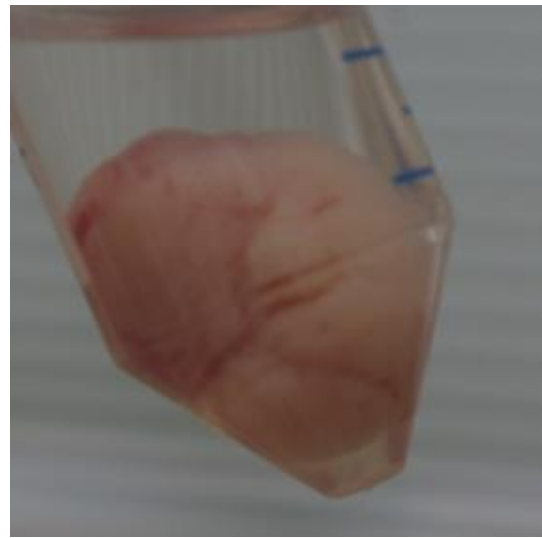
そこで、C57BL/6 マウスを用いることを断念し、より大型のFVB/Nマウスに遺伝子背景を変換することにした。まず、C57BL/6 遺伝子背景の *K5-Cre* マウス、*Pten*-flox/flox マウス、*P100α* flox/flox マウスをFVB/Nマウスと交配を5世代にわたり繰り返し、遺伝子背景をFVB/Nへ変換した。さらに、これらのマウスを交配して、FVB/N 遺伝子背景を有する角化細胞特異的 *Pten* ホモ欠失マウスと

*P100α*ホモ欠失マウスを作成することを試みた。しかし残念ながら、FVB/N マウスにおいても *Pten* ホモ欠失マウスは C57BL/6 マウスと同様に出生率が低く、生存しても成体にいたるまでに死亡した。また、*P100α*ホモ欠失マウスは出生することがなく、胎生致死であることが判明した。多くの時間をかけて交配を繰り返してみたが、残念ながらこの問題点を克服することができなかった。

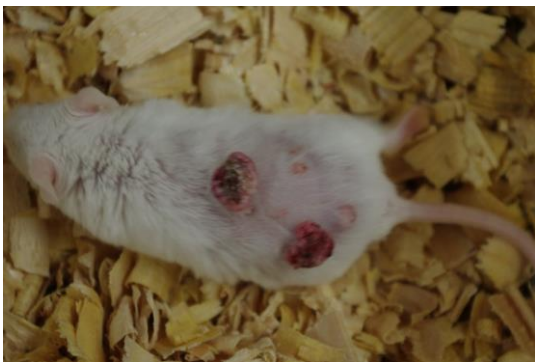
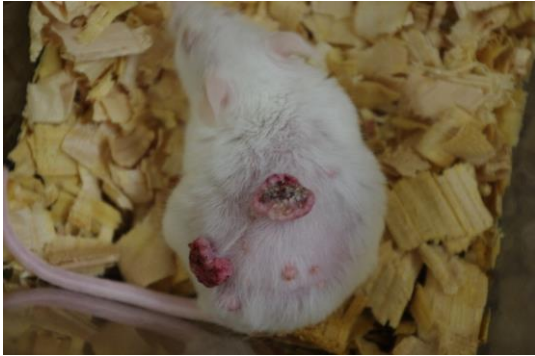
そのため、FVB/N 遺伝子背景を有するマウスは発癌効率の良いことに着目し、生存が可能な *Pten* ヘテロ欠失マウスと *P100α*ヘテロ欠失マウスを用いて、引き続き研究を遂行することとした。長期間にわたる観察の結果、*Pten* ヘテロ欠失マウスは15ヶ月以内に62匹中8匹に腫瘍が発生し、自然発癌が高率に起こることが判明した。



また、これらの腫瘍からは培養細胞が分離された。



さらに、準備実験として *Pten* ヘテロ欠失マウスに化学発癌処理を加えたところ、8週後から腫瘍発生が得られ、高い発癌感受性を示唆するものと推察された。



今後はマウスの生物学的特性を解析する段階に移行するので、研究の予定を大幅に回復できると思われる。具体的には以下の方策で研究を推進していく。

まず、発癌効率の良い FVB/N の遺伝子背景を有する角化細胞特異的 *Pten* ヘテロ欠失マウス、*p110α*ヘテロ欠失マウス、*Pten*ヘテロ欠失かつ *p110α*ヘテロ欠失マウスを作成する予定である。

次いで、*Pten*ヘテロ欠失のため起こる皮膚の増殖亢進が、*p110α*のヘテロ欠失により回復するかを検討するため、野生型マウス、角化細胞特異的 *Pten* ヘテロ欠失マウス、*p110α*ヘテロ欠失マウス、*Pten* ヘテロ欠失かつ *p110α*ヘテロ欠失マウスに TPA を塗布した後に、顕微鏡的性状を比較する。さらに、それぞれのマウスより採取した培養角化細胞の3日後と7日後の細胞増殖能を定量する。また、アポトーシス抵抗性の変化を検討するため、放射線照射後に生存している細胞数を定量する。さらに、毛包における幹細胞の維持能を検討するため、抜毛後に放射線を照射することを繰り返し、単位面積当たりの毛髪数を定量する。

さらに、*Pten*ヘテロ欠失のため起こる発癌頻度の亢進が、*p110α*のヘテロ欠失により回復するかを検討するため、それぞれのマウスに化学発癌処理を加え、発癌頻度を比較する。

さらに *Pten* ヘテロ欠失マウスに発生した扁平上皮癌より培養角化細胞を採取し、RNA 干渉法により *p110α*の発現を抑制し、細胞増殖能、self-renewal 能、colony formation 能を比較する。さらに、*Pten*のヘテロ欠失のため起こる PI3K/AKT 経路の下流に想定される分子の発現と活性化が、*p110α*の抑制により回復するかを検討するため、これらのシグナル伝達分子の動態を免疫プロットにより解析する。

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 4 件)

- (1) Kawamura K, Kawamura N, Kawagoe Y, Kumagai J, Fujimoto T, Terada Y, Suppression of hydatidiform molar growth by inhibiting endogenous brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling, *Endocrinology*, 査読有、Vol.153, No.3、2012、3972-3981
DOI : 10.1210/en.2012-1167
- (2) Makino K, Kawamura K, Sato W, Kawamura N, Fujimoto T, Terada Y, Inhibition of uterine sarcoma cell growth through Suppression of endogenous tyrosine kinase B signaling, *PLoS One*, 査読有、Vol.7, No.7, 2012, e41049
DOI : 10.1371/journal.pone.0041049
- (3) Kawamura K, Kawamura N, Kumazawa Y, Kumagai J, Fujimoto T, Tanaka T, Brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinaseB signaling regulates human trophoblast growth in an in vivo animal model of ectopic pregnancy, *Endocrinology*, 査読有、Vol.152, No.3、2011、1090-1100
DOI : 10.1210/en.2010-1124
- (4) Kawamura K, Cheng Y, Kawamura N, Takae S, Okada A, Kawagoe Y, Mulders S, Terada Y, Hsueh AJ, Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes, *HumReprod*, 査読有、Vol.26, No.11, 2011, 3094-3101
DOI : 10.1093/humrep/der282

6. 研究組織

(1) 研究代表者
河村 七美 (KAWAMURA NANAMI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：70323152

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし