

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861168

研究課題名(和文) 乳がん体質の解析 脱リン酸化酵素側からのアプローチ

研究課題名(英文) Phosphatome-constitution predisposed to breast cancer

研究代表者

深町 佳世子 (FUKAMACHI, KAYOKO)

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

研究者番号：00626137

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)：乳がんの原因となる経路に、がん遺伝子HER2のリン酸化や、がん抑制遺伝子BRCA1のリン酸化・脱リン酸化がある。これらの脱リン酸化に関わる酵素として、PP6の重要性が示唆された。PP6の異常が、がん体質に関係することが想像されたので、PP6が生体内で発がんにどのように働くかを解析した。その結果、マウスの2段階発がん実験において、PP6は、少なくとも皮膚発がんにおいて、がん抑制遺伝子として働く事を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Dysregulation of HER2 and BRCA1 phosphorylation are thought to be causes of mammary carcinogenesis. As PP6, one of protein phosphatase, was thought function in this process, we analyzed role of PP6 in carcinogenesis in mice. We found that abrogation of PP6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳がん HER2 ホスファターゼ BRCA1 PP6 SNPs ノックアウトマウス 発がん実験

1. 研究開始当初の背景

BRCA1 は、DNA 修復に必須なタンパク質で、乳がんや卵巣がんに関連するがん抑制遺伝子である。BRCA1 は、DNA 修復タンパク群を束ねて全体として DNA 修復に働くことが知られている。一方、BRCA1 の機能は、リン酸化(DNA 損傷により活性化されたキナーゼ (Chk2 や ATR)) によって制御されているとされているが、その脱リン酸化側からの解析は全く進んでいなかった。

申請者らは、BRCA1 の脱リン酸化機構を解明するために、リン酸化-脱リン酸化に関するデータベースの検索を行い、PP6 が BRCA1 の活性調節に働くことを示唆するデータを得た(未発表)。BRCA1 のリン酸化-脱リン酸化による制御を明らかにすることで、BRCA1 の DNA 修復機構の全体像が明らかとなり、さらには合成致死療法にも応用できるのではないかと考えて、PP6 に焦点を当てることにした。

化学物質を用いたマウス皮膚の 2 段階発がん実験は、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る。腫瘍の成長を視覚的に確認することができる点や、皮膚にイニシエーターとプロモーターを塗布する手技が容易であるため、多用されてきた。イニシエーターを単回投与した皮膚に、プロモーターを反復投与することによりパピローマが形成される。一方で、イニシエーター単回投与のみ、あるいはプロモーター反復投与のみでは腫瘍は形成されない。イニシエーターとして使われる化合物は遺伝的变化をもたらすものであり、代表的なものには DMBA(7,12-dimethylbenz [a] anthracene) がある。プロモーターは、イニシエートされた細胞を、クローナルに増殖させる化合物である。代表的な化合物として、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化させる働きを持つ

TPA

(12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) や、テロオシジン等がある。1988 年に、藤木博士らは、TPA と同等に強力な発がんプロモーション活性をもつ物質としてオカダ酸を同定した。オカダ酸がプロテインホスファターゼ(PP1 および PP2A)の強力な阻害剤であったことから、オカダ酸が 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す

ること。また、脱リン酸化の異常が癌化を密接に関連することを示していた。次に、藤木らは、オカダ酸による発がんプロモーター作用が、細胞内プロモーター-TNF- α を介することを明らかにした。しかしながら、オカダ酸に感受性を示すプロテインホスファターゼとして、現在のところ、PP1、PP2A、PP4、PP5、PP6 が知られているが、そのうちの分子種が、2 段階発がんのどのステップに、如何に関与しているのかについて、ほとんど証明されていない。今回、我々が注目した PP6 は、PP2A、PP4 および PP6 からなる、PP2A サブファミリーに分類される。触媒サブユニットの Ppp6c、調節サブユニットの ARS と SAPS の 3 つのサブユニットから成り立っている。PP6 の触媒サブユニットをコードしている *Ppp6c* 遺伝子は、酵母からヒトに至るまで広く保存されている。これまで酵母や線虫の機能解析により、*Ppp6c* は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る。また、ほ乳類培養細胞を用いた研究より、*Ppp6c* は DNA 修復、染色体分離、NF- κ B シグナル制御などががんの要因に関連することが示唆されているが、これらの報告は主に培養細胞レベルでの siRNA によるノックダウンの実験である。これまで *Ppp6c* 遺伝子を欠くマウス個体は作成さ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い。

2. 研究の目的

近年、2 つの主要な研究 (Hodis ら、Krauthammer ら)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 10 % 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、Hammond らは、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を報告している。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おり、*Ppp6c* が、悪性黒色腫のがん抑制遺伝子である可能性を示唆されている。

我々は、「PP6 は、乳がんのがん抑制遺伝子で、がん体質に関係する」という仮説のもとに研究を行っている。マウス乳がんの発がん実験を行う前段階として、もっとも頻用され

かつ再現性の良い実験である、皮膚の2段階発がん実験を用いて、PP6の機能と発がんとの関係を明らかにすることを考えた。

3. 研究の方法

*Ppp6c*の活性中心である領域を含む exon4 を挟み込むように loxp を配置したターゲティングベクターを作製した。次いで定法に従い、ES細胞における相同組換え体の作製、キメラマウスの作製を経て、*Ppp6c*の flox アレルを持つ *Ppp6c^{flox/flox}* マウス (Acc. No. CDB0850K, C57BL/6 と CBA の雑種) を作製した。*Ppp6c* 遺伝子欠損アレルをヘテロにもつマウス (*Ppp6c^{+/-}*) の作製は、*Ppp6c^{flox/+}* マウスと CAG-Cre Tg マウス (理研) の掛け合わせにより行った。*Ppp6c* 遺伝子欠損マウスのフェノタイプを調べるために、ヘテロマウス (*Ppp6c^{+/-}*) 同士の掛け合わせを行った。生まれたマウスは、野生型 : ヘテロ : ホモが 1 : 2 : 0 であり、*Ppp6c* 欠損マウスは胎生致死であった (投稿準備中)。そのため、K14-*CreER^{tam}* トランスジェニックマウス (CD1 種) を Jackson Laboratory から購入し、C57BL/6 マウスと4世代交配を行った後に、*Ppp6c^{flox/flox}* マウスと交配して K14-*CreER^{tam}*; *Ppp6c^{flox/+}* マウスを作製した。K14-*CreER^{tam}*; *Ppp6c^{flox/+}* マウス同士を掛け合わせることで、皮膚特異的かつ時間依存的に *Ppp6c* の機能を欠損させることが可能であるマウス (K14-*CreER^{tam}*; *Ppp6c^{flox/flox}*) を作製した。

6~7週齢の K14-*CreER^{tam}*; *Ppp6c^{flox/flox}* マウスの皮膚 (2.5cm × 3.5cm) に 0.4mg の 4HT を溶解した 100ul のアセトン、5日間連続して塗布した群を 4HT (+) とした。一方、アセトン 100ul のみを5日間塗布した群を 4HT (-) とした。その2日後に、イニシエーターとして 100ug の DMBA を溶解したアセトン 100ul をマウスの皮膚 (2.5cm × 3.5cm) に塗布した。

二段階発がん実験 (DMBA/TPA, DMBA/OA) では、DMBA によるイニシエーションより1週間経過したのちに、1ug の TPA または 5ug の OA を溶解したアセトン 100ul を、マウスの皮膚 (2.5cm × 3.5cm) に週2回ずつ塗布し、これを20週にわたり行った。週に1回ずつ皮膚の観察を行い、直径1mm以上の腫瘍をカウントした。この時、腫瘍発生率は Kaplan-Meyer 法を用い、実験の初期の段階で腫瘍の発現の度

合が異なるか判断するために、有意差検定には Gehan-Breslow-Wilcoxon test を用いて統計的に比較検討した。実験終了時に、直径2mm以上の腫瘍 (n=28) に関しては、病理組織学的解析を行い、組織を直径5mm以上となった腫瘍に関しては、RNA を抽出し解析を行った (DMBA, DMBA/TPA, DMBA/OA それぞれ n=3)。なお、剃毛による物理的侵襲の影響を除外するために、剃毛はサンプル回収の48時間前までに行った。

4. 研究成果

4-1. 皮膚特異 *Ppp6c* 欠損マウスの作製

Ppp6c ノルマウスは胎生致死を示したので、*Ppp6c* の機能と発がんとの関連を調べるためには、コンディショナルノックアウトマウスを作製する必要があった。そこで、皮膚特異的に *Ppp6c* の機能を誘導欠損させることが可能なマウス作製を試みた。*Ppp6c^{flox/flox}* マウス (*Ppp6c* のホスファターゼ活性に必須なアミノ酸をコードする exon4 が loxP 部位に挟み込まれている) と K14-*CreER^{tam}* を掛け合わせて、K14-*CreER^{tam}*; *Ppp6c^{flox/flox}* マウスを作製した。この K14-*CreER^{tam}* システムでは、K14 でその発現がドライブされている *CreER^{tam}* は、4HT 投与により核へ移動し活性化され、loxP に挟み込まれた部位を欠損させることが可能となっている。

本システムにより、実際に *Ppp6c* の exon4 を欠損させることができるか確認するため、4HT を皮膚に塗布し、K14 発現ケラチノサイトにおける *Ppp6c* の exon4 欠損状況を調べた。K14-*CreER^{tam}*; *Ppp6c^{flox/flox}* マウスに、4HT を投与した群 4HT (+) と投与しない群 4HT (-) に分けて、それぞれよりケラチノサイトを精製した。各ケラチノサイトより抽出したゲノム DNA をテンプレートとして、PCR 法により増幅した。4HT (-) のケラチノサイトでは、flox アレルを示す 796bp の PCR 産物のバンドが見られた。その一方で、4HT (+) のケラチノサイトでは、796bp のバンドと exon4 が欠損していることを示す 275bp のバンドが得られた。続いて、欠損効率を確認するために、*Ppp6c^{+/-}* マウスおよび *Ppp6c^{flox/+}* マウスの尾より抽出したゲノム DNA を各割合で混合したものと比較した。その結果、4HT (+) のケラチノサイトは、Cre による部位特異的な組み換えがみられ、DNA レベルで、約 70% の exon4

の欠損が見られた。

続いて、ウェスタンブロットングにて、Ppp6c タンパク発現の確認を行った。Ppp6c の N 末端、C 末端を抗原としたそれぞれの抗体において、4HT を処理したケラチノサイトは、未処理のケラチノサイトに比べて、バンドの強度が減弱していることが確認された。

4-2. 二段階発がん実験による腫瘍形成

Ppp6c 機能不全による発がんへの影響を、皮膚二段階発がん実験で調べた。6 週から 7 週齢の K14-CreER^{tam}; Ppp6c^{flox/flox} マウスの皮膚に対して、4HT による前処置、DMBA、TPA の投与を行った。コントロールマウス 4HT (-) では、15 週後にパピローマの形成が認められた。その一方で、4HT の塗布により、Ppp6c の exon4 が欠損しているマウス 4HT (+) においては、5 週目からパピローマの形成が認められた。4HT を塗布したマウスでは、腫瘍が早期に現れてくる傾向が認められたものの、2 群間に有意差は認められなかった。また、最終的な腫瘍の数には大きな変化はなかった。次に、この早期のパピローマ形成が、TPA 特異的に起こったのかどうかを検討するために、プロモーターとして OA を用いて同様の実験を行った。その結果、Ppp6c の機能が欠損しているマウス 4HT (+) では、コントロールマウス 4HT (-) に比べ、有意に早期のパピローマ形成が認められた。

4-3. DMBA 単剤による腫瘍形成

そこで、化学的な腫瘍プロモーターを使用しない場合の、PP6 機能欠損皮膚における、DMBA の影響を検討した。4HT 処理をしたマウス 4HT (+) と、コントロールマウス 4HT (-) の背中に DMBA を塗布し、20 週にわたり観察を行った。コントロールマウス 4HT (-) では、20 週の間には腫瘍の形成は認められなかった。しかしながら、Ppp6c 機能欠損マウス 4HT (+) では 5 週目から腫瘍発生が認められた。また、腫瘍の発生頻度は、DMBA/TPA や DMBA/OA 発がん実験と同様であった。

4-4. パピローマの組織型

発がん実験に用いたマウスを DMBA 塗布 20 週後で安楽死させ、腫瘍を組織学的に解析した。DMBA 単独投与により発生した腫瘍は、hyperkeratotic papilloma の組織型であった。

今回、組織型を検討した腫瘍は、5 つの組織型 (early follicular papilloma、mixed papilloma、fibropapilloma、exophytic papilloma、hyperkeratotic papilloma) に分類された。これらの組織型は、文献的に DMBA/TPA 後に報告されている典型的な組織型に分類できた。

4-5. 腫瘍中の遺伝子解析

DMBA、DMBA/TPA、DMBA/OA より得られた腫瘍に関して遺伝子解析を行った。腫瘍で発現している Ppp6c の mRNA に exon4 の欠失型の存在が確認された。これは、ゲノムの欠損しているケラチノサイトが腫瘍化したためと考えられる。次に、DMBA 投与により誘導される H-ras のコドン 61 番における CAA (グルタミン) から CTA (ロイシン) への遺伝子変異を確認した。この H-ras の変異は、DMBA 群、DMBA/TPA 群、DMBA/OA 群の腫瘍サンプルから確認することができた。

次に、各群の腫瘍において、growth-regulated oncogene α (GRO α) の遺伝子発現を確認した。GRO α は、増殖作用とケラチノサイトのプログレッション作用を持ち、ras によって制御されていることが明らかとなっている重要なケモカインの一つである。これらの腫瘍中では、正常な皮膚に比べて GRO の発現が高値となっていた。さらに、細胞増殖のマーカーの一つである cyclin D1 もまた、正常な皮膚に比べて高値となっていた。

4-6. Ppp6c 機能欠損皮膚における増殖性変化および炎症性変化の検討

Ppp6c 機能欠損皮膚中における DMBA の影響をより詳細に検討するために、DMBA 塗布後の組織学的な観察を行った。DMBA 投与 48 時間後、Ppp6c の機能が欠損した皮膚では、表皮の肥厚、真皮への細胞浸潤、皮下組織への細胞浸潤が見られた。従って、増殖性所見と炎症性の所見と考えられた。

Ppp6c 機能欠損が、DMBA に起因する増殖や炎症とどのように関わっているのか検討するため、皮膚組織中の増殖および炎症と関連する遺伝子について検討を行った。Immediate early gene であり、AP-1 を構成する c-jun は、Ppp6c 機能欠損皮膚 4HT (+) 中でコントロールの皮膚 4HT (-) よりも BMBA

塗布 6、24 時間後の発現が有意に高値となっていた。同様に AP-1 を構成している *c-fos* では、4HT (+)の皮膚の方が 4HT (-)の皮膚に比べて、発現が上昇している傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。DMBA/TPA による発がんに必要なサイトカインである *TNF* 遺伝子発現量は、DMBA 処理により、*Ppp6c* 機能欠損皮膚 4HT (+)およびコントロールの皮膚 4HT (-)の両方で、6 時間および 24 時間で上昇が認められた。しかし、両者の間で著明な差は見られなかった。一方で、*IL-1* は、DMBA 塗布後 24 時間後から 48 時間後において、有意差は認められなかったものの *Ppp6c* 機能欠損した皮膚 4HT (+)で、mRNA 発現量が高値なっている傾向が認められた。*IL-6*では、48 時間後の mRNA の発現レベルは、TAM (+)の皮膚の方が有意に高値となっていた。*GM-CSF*、*GRO* といった炎症に関連する遺伝子も、塗布後 48 時間後の時点で *Ppp6c* 機能欠損した皮膚 4HT (+)において、有意な mRNA の発現上昇が認められた。また、炎症関連遺伝子である *MMP-3*は、有意な発現レベルの上昇は認められなかったものの、24 時間後の時点では、4HT (+)の皮膚において、mRNA の発現レベルが有意に上昇していた。

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) 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, and Shima H. : Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA. *Oncogene* (in press)
doi:10.1038/onc.2014.398

(2) Kakugawa Y, Kawai M, Nishino Y, Fukamachi K, Ishida T, Ohuchi N, Minami Y. Smoking and survival after breast cancer diagnosis in Japanese women: A prospective cohort study.

Cancer Sci. 2015 Jun 6. doi: 10.1111/cas.12716.

(3) Nishino Y, Minami Y, Kawai M, Fukamachi K, Sato I, Ohuchi N, Kakugawa Y. Cigarette smoking and breast cancer risk in relation to joint estrogen and progesterone receptor status: a case-control study in Japan. *Springerplus.* 2014 Feb 3;3:65. doi: 10.1186/2193-1801-3-65. eCollection 2014.

PMID: 24516791

(4) Kawai M, Minami Y, Nishino Y, Fukamachi K, Ohuchi N, Kakugawa Y. Body mass index and survival after breast cancer diagnosis in Japanese women. *BMC Cancer.* 2012 Apr 17;12:149. doi: 10.1186/1471-2407-12-149.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 角川陽一郎、西野善一、深町佳世子、河合賢朗、南 優子：婚姻状況、妊娠出産歴と乳がんの予後との関連。第 22 回日本乳癌学会総会、大阪、2014.7

(2) 深町佳世子、角川陽一郎：乳腺基質産生癌 (Matrix-producing carcinoma) の 1 例。第 22 回日本乳癌学会総会、大阪、2014

〔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：
出願年月日：
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

深町 佳世子 (FUKAMACHI KAYOKO)
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
研究者番号：00626137

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：