

新規癌関連プロテインホスファターゼによる発癌機構の解明

[1] 組織

代表者：島 礼

(宮城県立がんセンター研究所)

対応者：千葉 奈津子

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 40 万円，旅費 0 円

[2] 研究経過

国外から重要な発見があった。悪性黒色腫の全 exon シークエンスのデータから、プロテインホスファターゼ 6 型 (PP6) の触媒サブユニット (*Ppp6c*) の遺伝子変異が悪性黒色腫において高頻度に見出され、同ローカスに LOH を伴うことから、PP6 の loss of function が、ドライバー変異として働く可能性が示唆された (Cell 2012 Landscape of driver mutations in melanoma)。また最新の大規模ゲノム解析プロジェクトである TCGA (The Cancer Genome Atlas) によると、PP6 遺伝子変異は、悪性黒色腫のみならず、大腸がん、肺がん、子宮内膜がんなどに広く存在する。複数のがん種で PP6 が、がん抑制遺伝子として働く可能性があることが示唆される。

島は、発がんプロモーターのオカダ酸が PP6 の阻害剤であることから、PP6 が、がん抑制遺伝子であるという仮説持っていた。その証明のため、*Ppp6c* 遺伝子改変マウスの作製をおこなっていた。まず、*Ppp6c* ノックアウトマウスは胎生致死であった (未発表)。そこで conditional KO マウスを作製し、皮膚 2 段階発がん実験を行った。その結果、皮膚で *Ppp6c* を欠損したマウスは、腫瘍の形成時期が大幅に早まること。さらには、DMBA 処理のみで皮膚腫瘍が生じることを明らかにした。この結果は PP6 機能不全が、腫瘍発生のプロモーション作用をもつことを意味した (参考文献 1)。

島は、PP6 の発癌への関与を明らかにする目的で、イースト two-hybrid スクリーニングを行い、PP6 と結合するタンパク質として、中心体

の複製を制御するタンパク質である、CP110 を同定した。さらに、PP6 のノックダウンにより、BRCA1 や OLA1 のノックダウンと同様に中心体複製・分離異常が起こることを明らかにした。この事は、PP6 が染色体の安定性に関与することを示唆した。一方で、国外研究者より、PP6 が DNA 二本鎖切断の修復に重要な働きをすることを示す報告がなされた。島は、PP6 による DNA 修復機構に BRCA1 が関わる可能性を考え実験を行い、BRCA1 の免疫複合体に PP6 が存在することを明らかとした。

BRCA1 のがん抑制能に関しては、これまで、DNA 修復経路における機能が重要と考えられてきた。しかし、千葉の最近の研究により、BRCA1/BARD1 が、OLA1 とともに中心体に局在し、中心体や染色体分配の制御に重要な働きをしていることが明らかとなり、DNA 修復と染色体分配の両方で重要な働きをしていることが示された。

上記のように、PP6 も、DNA 修復と染色体分配の両方の制御に関与していることが示唆されている。本研究は、島と千葉との共同研究により、RCA1/PP6 複合体の機能を解明し、新しいがん治療法開発を目指すために計画した。我々は、主に加齢医学研究所にて、これまでの実験データをもとに、議論を重ね、電話、メールでも連絡をとり、共同研究を遂行している。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

動物発がん実験

前述の、DMBA/TPA 2 段階発がん実験では PP6 の機能不全が腫瘍のプロモーションの原因になることを明らかにした。しかし、その原因は、主にケラチノサイトにおける NFκB 経路の過剰な活性化による炎症反応の増強のためであり、我々が明らかにしようと試みた DNA 修復や染色体の安定性の異常に起因するものとは考えられなかった (参考文献 1)。さらには、PP6 の機能不全が (1) 良性腫瘍だけでなく悪性腫瘍 (扁平上皮癌など) の発生を促進させるか (2) ヒトの発がんの原因となる環境変異源にたいしてはどうか、という疑問が残った。そこで、紫外線

UVBによる皮膚発がん実験を企画した。

まず、皮膚特異的に *Ppp6c* 欠損したマウスを準備し、剃毛した皮膚に対して、週 3 回の UVB 照射 (2kJ/m²) を、40 週間連続して行った (参考文献 2)。*Ppp6c* 皮膚欠損マウスでは、80% のマウスにおいて扁平上皮がんが発生した。一方、コントロールマウスにおいては、扁平上皮がんの発生はなかった。従って、マウスにおいて、PP6 機能不全により、UVB による皮膚扁平上皮がんの発生頻度が顕著に増加することが明らかとなった。このメカニズムを明らかにするため、UVB 照射 (2kJ/m²) による皮膚への影響を解析した。タイムコース実験にて、p53/p21 経路への影響を、免疫組織学的に解析した。*Ppp6c* 欠損皮膚においては、p53 および p21 タンパクの核内への蓄積は、UVB 照射後、24 時間をピークして著しい亢進が認められたが、コントロール組織ではその上昇はわずかであった。

次にその組織におけるアポトーシスの有無を、ウエスタンブロットで解析した。*Ppp6c* 欠損皮膚においては、コントロールの皮膚に比べて BAX および活性化カスパーゼ 3 タンパク量の著しい亢進が認められた。

PP6 は、DNA 二本鎖切断 (DSB) の修復に重要な機能をもつことが報告されている。そこで、PP6 欠損皮膚に発生した扁平上皮がんにおいて、DSB のマーカーである、 γ H2AX の発現を調べたところ、17 例中 10 例で強陽性であった。また、p53 遺伝子変異を p53 の発現をマーカーにして調べたところ、 γ H2AX の強陽性の 10 例中 9 例が p53 強陽性であった。したがって、PP6 機能不全により発生した扁平上皮がんにおいては、UVB による p53 の遺伝子変異と DSB の蓄積が共存すること示唆された。

以上、*Ppp6c* 欠損皮膚において、UVB 照射により、高い扁平上皮がんの発生が認められた。その発生の原因としては (1) *Ppp6c* 欠損ケラチノサイトにおいて、UVB に対して高い感受性を持ち高頻度にアポトーシスを起こすこと (2) PP6 の機能異常により、DSB の修復が不完全なままに、代償性細胞増殖が起こること、の 2 つが考えられる。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、PP6機能不全な皮膚においては、少なくともマウスにおいてはUVによる扁平上皮癌発生が促進されることがわかった。ヒトにおいても、UVが原因となる皮膚がん発症の予防や治療に重要な情報となると考える。

UVB照射により、cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) ができる。それが除去されない場合、C→Tある

いはCC→TT変異が起こる。このようにして生じたp53変異は、皮膚がん発生の主要なメカニズムと考えられている。本研究で、PP6機能不全により発生した腫瘍により、p53の遺伝子変異と、DSB修復不全が共存していることを示したことは、PP6がCPDsの除去システムであるNER (nucleotide excision repair) の制御にも関わる可能性が示された。今後は、BRCA1を中心とした修復機構の詳細な解析への手がかりとなると期待できる。

[4] 成果資料

学会発表

1. 林克剛、小河穂波、岸本綾子、加藤浩之、田沼延公、渡邊利雄、島礼

Ppp6c 遺伝子欠損は、マウス皮膚腫瘍形成を促進する

日本生化学会東北支部会 (2014 年 5 月 10 日、秋田)

2. 林克剛、田沼延公、渡邊利雄、佐藤郁郎、野村美有樹、山下洋二、角川陽一郎、島礼

PP6 皮膚特異的欠損マウスは、DMBA 誘発皮膚発がんの高感受性を示す。

日本癌学会学術総会 (2014 年 9 月 25 日、横浜)

3. Ogoh H, Tanuma N, Hayashi K, Momoi Y, Sumiyoshi M, Hayakawa N, Kishimoto A, Matsui Y, Suzuki M, Kato H, Sakamoto Y, Inoue Y, Nomura M, Kakugawa Y, Yamashita Y, Sasaki N, Ito S, Sato I, Suzuki A, Nishio M, Suganuma M, Kiyonari H, Watanabe T, and Shima H. *Ppp6c* deficiency leads to embryonic lethality and promotes skin carcinogenesis induced by DMBA.

11th International Conference on Protein Phosphatases (Nov 13, 2014, Sendai)

参考文献

1. (発表済) 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. (投稿中) Kato H, Tanuma N, Kurosawa K, Momoi Y, Hayashi K, Ogoh H, Nomura M, Inoue Y, Sakayori M, Kakugawa Y, Yamashita Y, Miura K, Maemondo M, Katakura R, Ito S, Sato M, Sato I, Chiba N, Watanabe T, and Shima H.

PP6 deficiency potentiates UV-induced skin squamous carcinoma (submitted)