

## 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)

研究費：物件費 20 万円，旅費 0 円

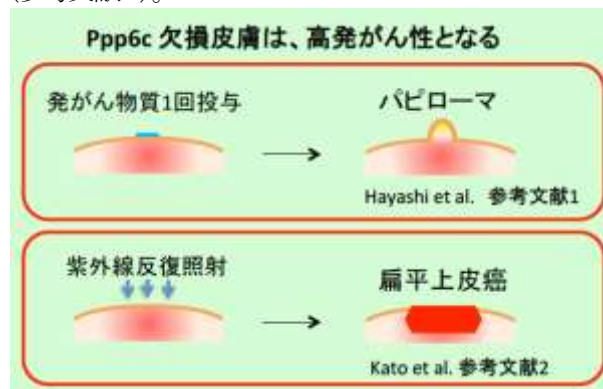
### [2] 研究経過

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で高率に認められるとの報告があった。この変異が、*Ppp6c* タンパクの分解を引き起こすタイプであり、同ローカスに LOH を伴うことから、PP6 機能不全が、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)。さらに、最新の The Cancer Genome Atlas によると、*Ppp6c* 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。一方で、Prognoscan データベースによると、*Ppp6c* 遺伝子の発現低下が、複数の固形がん、予後不良と相関することが示されている。これらの臨床データは、*Ppp6c* が、様々なヒトがん、がん抑制遺伝子として働くことを示唆している。

島は、*Ppp6c* と結合するタンパク質として、新たに中心体の複製を制御するタンパク質 CP110 を同定し、*Ppp6c* ノックダウン実験により、PP6 が染色体の安定性に関与可能性を示した。一方で、興味ある事に *Ppp6c* が BRCA1 と共通の複合体に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、DNA 修復経路における機能に加え、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っている。そこで、PP6 も、DNA 修復と染色体分配の両方の制御に関与して、発がんを抑制する可能性を考えた。

上記のように、臨床のデータとこれまで我々が行った生化学的実験により、*Ppp6c* 遺伝子は、がん抑制遺伝子として働くことが示唆される。しかし、これまで、マウス個体レベルで検討した報告はなかった。我々は、「*Ppp6c* 遺伝子は、がん抑制遺伝子として働くか否か」の証明のため、*Ppp6c*

遺伝子改変マウスの作製を行った。まず、*Ppp6c* ノックアウトマウスは胎生致死であった (参考文献 3)。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、パピローマの形成時期が大幅に早まること、さらには、DMBA 処理のみでパピローマ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)。次に、環境変異源ではどうか？また、扁平上皮がん (パピローマではなく) に関してはどうなのか？という疑問が起こった。そこで、前述の conditional KO マウスを用いて、紫外線に対する影響を調べた。その結果、*Ppp6c* が UVB による皮膚扁平上皮がんの抑制遺伝子として働くことが明らかとなった (参考文献 2)。



### [3] 成果

#### [3-1] 研究成果

##### ① DMBA/TPA 2 段階発がん実験

PP6 機能不全が、DMBA による発がん形成への感受性を著しく亢進させるメカニズムを解析した。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ることが分かった (参考文献 1)。

##### ② 紫外線 UVB による皮膚発がん実験

皮膚特異的に *Ppp6c* 欠損したマウスにおいては、長期の UVB 照射により扁平上皮がんの発生が著しく増加することが明らかとなり、そのメカニズムの解析を行った (参考文献 2)。

PP6 欠損皮膚に発生した扁平上皮がんにおいて、DSB の有無を γH2AX の発現にて、p53 遺伝子変異を p53 発現上昇にて調べた。殆どの組織において γH2AX 強陽かつ p53 強陽性であった。この事は、PP6

機能欠損皮膚において UVB 照射により発生した扁平上皮がんにおいては、p53 遺伝子変異と DSB の蓄積が共存していることが示された。一方で、UVB 照射後の経時的実験にて、p53/PUMA/カスパーゼ 3 /アポトーシス経路が、PP6 機能欠損皮膚において著しく更新していることがわかった。

以上 UVB 照射による腫瘍発生メカニズムとして (1)、*Ppp6c* 機能不全皮膚において、強いアポトーシスが起これる結果代償性の細胞増殖が起こる。(2) UVB 照射により産生されたシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) または、6-4 photo-product (6-4PP) が修復されずに p53 の変異または DSB になる。以上の(1)と(2)のメカニズムにより、最終的に p53 変異と DSB を持つ細胞が腫瘍化したものと考えられる。

### ③ *Ppp6c* 欠損マウスの解析

*Ppp6c* 欠損は、胎生致死であることが分かった。(参考文献3)。胎生 7 日では、胚は異常な形態を示した。一方胎生 3.5 日では、全てのプラストシストに異常な形態を示すものは見いだされなかったことから、胎生 3.5 日から 7 日の間で何らかの異常が起こり致死に至ることが分かった。胚発生異常の原因を明らかにするため *Ppp6c* 欠損 MEF を作製して解析した所、正常 MEF と比べて著しい増殖抑制と細胞死が認められた。

### [3-2] 波及効果と発展性など

マウスにおいて、PP6が機能不全な皮膚において、発がん物質のDMBAや環境変異源のUVBに対する腫瘍発生の感受性が著しく亢進することがわかった。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。

これまでに得られたノックアウトマウスの結果により、PP6には、過剰な炎症を抑える機能を持ち、DNA修復に必須の機能も持つことが示唆される。おそらく直接の基質 (リン酸化タンパク) は複数あることが考えられる。それぞれの基質について、その機能とそれをリン酸化するキナーゼについてその詳細を明らかにすることが、治療や予防の開発に重要と考える。

臨床のデータからは、PP6の機能障害や、皮膚がん以外のがんでも抑制遺伝子として働く可能性がある。本実験に用いたマウスを用いて、他の臓器についても発がん実験を行う必要がある。

### [4] 成果資料

#### 学会発表

1. 加藤浩之, 田沼延公, 黒沢是之, 井上唯, 林克剛, 小河穂波, 野村美有樹, 渡邊利雄, 島礼  
UVB 照射により、*Ppp6c* 欠損では、高頻度に皮膚扁平上皮癌が発生する  
第 81 回日本化学会東北支部例会(2015 年、仙台)

2. 加藤浩之, 田沼延公, 三浦康, 角川陽一郎, 椎葉健一, 山下洋二, 林克剛, 野村美有樹, 佐藤郁郎, 伊藤しげみ, 渡邊利雄, 島礼  
皮膚 *Ppp6c* 欠損マウスは、UVB 誘導皮膚扁平上皮癌がんに高感受性となる

第 74 回 日本癌学会学術総会(2015 年)

3. 島礼, 黒沢是之, 井上唯, 小河穂波, 加藤浩之, 田沼延公, 渡邊利雄  
皮膚 *Ppp6c* 欠損マウスは、化学発がんおよび UVB 誘導発がんを高感受性となる。

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会(2015 年 12 月, 神戸))

4. 小河穂波, 田沼延公, 早川夏姫, 住吉麻実, 鈴木麻衣, 井上唯, 野村美有樹, 島礼, 渡邊利雄  
脱リン酸化酵素 PP6 の触媒サブユニットの *Ppp6c* は着床後の胚の正常な発生に不可欠である。

第 7 回 日本プロテインホスファターゼ研究会 学術集会(2016 年 1 月、岡崎)

5. 黒沢是之, 桃井勇貴, 井上唯, 小河穂波, 後藤孝浩, 田沼延公, 渡邊利雄, 島礼

脱リン酸化酵素 PP6 は、皮膚がん抑制遺伝子である。  
第 7 回 日本プロテインホスファターゼ研究会 学術集会(2016 年 1 月、岡崎)

6. Inoue Y, Kato H, Kurosawa K, Tanuma N, Ogoh H, Watanabe T, and Shima H

PP6 deficiency potentiates ultraviolet-B- induced skin carcinogenesis  
10th Mechanisms and Models of Cancer 2015 (August 2015, San Diego)

#### 参考文献

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. 2015 Aug 27;34(35):4647-55.

2. 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. Cancer Lett. 2015 Sep 1;365(2):223-8.

3. Ogoh H, Tanuma N, Matsui Y, Hayakawa N, Inagaki A, Sumiyoshi M, Momoi Y, Kishimoto A, Suzuki M, Sasaki N, Ohuchi T, Nomura M, Teruya Y, Yasuda K, Watanabe T, Shima H

The protein phosphatase 6 catalytic subunit (*Ppp6c*) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis.  
Mech Dev. 2016 Feb;139:1-9.