

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

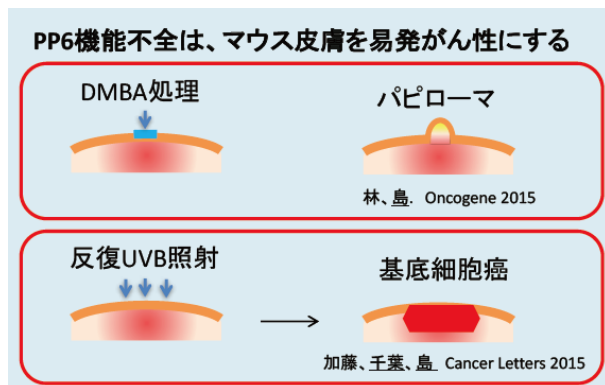
(宮城県立がんセンター研究所)

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



我々は、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*) 遺伝子が新たながん抑制遺伝子であるとの仮説の証明のため、*Ppp6c* 遺伝子改変マウスの作製を行った。*Ppp6c* conditional KO マウスを用いて、皮膚 2 段階 (DMBA/TPA) 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 (Oncogene 2015)。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。

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。その原因の 1 つは、主にケラチノサイトにおける NF κ B 経路の過剰な活性化による炎症反応の増強であることが分かった。

次に、PP6 機能不全が、環境変異源で起こる皮膚発がんの原因になりうるのか？また、良性腫瘍 (パピローマ) だけではなく、扁平上皮の発がんにも関与するのか？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、反復 UVB 照

射により基底細胞がんの発生が著しく増加することが明らかとなった (Cancer Letters 2015)。

PP6 機能不全が、紫外線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。*Ppp6c* 欠損皮膚に発生した扁平上皮がんにおいて、DSB の有無を γ H2AX の発現で、また p53 遺伝子変異を p53 発現上昇で調べた。殆どの組織において γ H2AX 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基底細胞がんにおいては、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亢進していることがわかった。

以上 UVB 照射による腫瘍発生のメカニズムとして (1) PP6 機能不全皮膚において、強いアポトーシスが起これ、その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た。

[3] 成果

[3-1] 研究成果

① *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 1)。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。

以上、PP6 活性は、胎生時の発生に不可欠であることが明らかとなった。

② 活性化 *KRAS* に対する *Ppp6c* 欠損の影響

タモキシフェン投与により、皮膚特異的に、活性化 *KRAS* の発現と、*Ppp6c* 欠損が同時に誘導されるマウスを作製した (学会発表 2 & 3)。活性化 *KRAS* を持つマウスと比較して、活性化 *KRAS* と *Ppp6c* 欠損を同時に有するマウスでは、皮膚の著しい肥厚

とそれに伴う死亡が認められた。その2重変異を持つ組織を免疫組織学的に解析したところ、リン酸化 AKT およびその下流のシグナルの増強と γ H2AX 強陽性が認められた。

[3-2] 波及効果と発展性など

マウス皮膚におけるPP6機能不全が、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を著しく亢進させることがわかった。ヒトにおいても、紫外線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（リン酸化タンパク質）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。

臨床サンプルのデータによると、*Ppp6c*遺伝子変異が、約10%の悪性黒色腫で認められ、興味深いことに、その変異をもつ全ての組織において、*BRAF*変異または*NRAS*変異が存在する。このことは、PP6機能不全が、ERK経路を活性化するがん遺伝子と協調して悪性化に働く可能性を示している。我々の直近のデータ「*Ppp6c*変異は、変異型*KRAS*による腫瘍発生を強く促進する。」は、この事を強くサポートしている。このメカニズムを明らかにすることで、*RAF*または*RAS*等のがん遺伝子による腫瘍形成を制御する治療開発に繋がる事が期待できる。

[4] 成果資料

学会発表

1. 島礼、黒沢是之、小河穂波、桃井勇貴、井上維、田沼延公、渡邊利雄
発がんプロモーターオクタ酸の標的、PP6 の皮膚がん抑制遺伝子としての意義
第89回日本生化学会大会（2015年、仙台）
2. 黒沢是之、後藤孝浩、島礼、館正弘
新規皮膚がん抑制遺伝子 *Ppp6c* 変異は、変異型 *K-RAS* による腫瘍発生を強く促進する。
第25回日本形成外科学会基礎学術集会（2016年、大阪）
3. 黒沢是之、田沼延公、角川陽一郎、山下洋二、三浦康、山田秀和、佐藤郁郎、野村美有樹、渡邊利雄、島礼
新規皮膚がん抑制遺伝子 *Ppp6c* 変異は、変異型 *K-RAS* による腫瘍発生を強く促進する。
第75回日本癌学会学術総会（2016年、横浜）

4. Shima H, Kurosawa K, Ogoh H, Inoue Y, Goto T, Tanuma N, Watanabe T

Ppp6c deficiency predisposes mouse skin tissue to carcinogenesis initiated by DMBA and UV.

The 13th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Ageing Research (2016, Jeju)

5. Shima H

Ppp6c deficiency predisposes mouse skin tissue to carcinogenesis.

The 23th International Conference on Protein Phosphatase, (2016, Osaka)

参考文献

1. 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 139:1-9.