

博士論文

プロテインホスファターゼ 6 型の皮膚特異的機能欠損による  
DMBA 誘発皮膚腫瘍形成への影響

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

医科学講座 がん分子制御学分野

林 克剛

## 目次

略語 .....	3
1. 要約 .....	5
2. 研究背景 .....	7
3. 研究目的 .....	12
4. 研究方法 .....	13
4-1. 実験動物 .....	13
4-2. 試薬 .....	14
4-3. PCR 法による <i>Ppp6c</i> 欠損の確認 .....	14
4-4. 皮膚発がん実験 .....	15
4-5. 病理組織学的解析 .....	16
4-6. RNA 抽出と定量的 RT-PCR .....	16
4-7. <i>H-ras</i> 変異の解析 .....	17
4-8. プライマリーケラチノサイトの精製と培養 .....	17
4-9. ウェスタンブロッティング .....	18
5. 研究結果 .....	20
5-1. 皮膚特異的な <i>Ppp6c</i> 欠損マウスの作製 .....	20
5-2. 二段階発がん実験による腫瘍形成 .....	21
5-3. DMBA 単剤による腫瘍形成 .....	22
5-4. パピローマの組織型 .....	22
5-5. 腫瘍中の遺伝子解析 .....	23
5-6. <i>Ppp6c</i> 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 .....	24
5-7. ケラチノサイト中における NF- $\kappa$ B 経路への影響 .....	25
6. 考察 .....	27

7. 結論.....	35
8. 謝辞.....	36
9. 文献.....	37
図表説明.....	41
図表.....	46

## 略語

CaMK: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase

COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer

DMBA: 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene

DNA-PK: DNA-dependent protein kinase

EDTA: Ethylene Diamine-tetraAcetic Acid

ERK: Extracellular Signal-regulated Kinase

FBS: Fetal bovine serum

GM-CSF: Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor

GRO  $\alpha$ : Growth regulated Oncogene  $\alpha$

I $\kappa$ B: Inhibitor  $\kappa$ B

IL: Interleukin

MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase

MAPKK: Mitogen-activated Protein Kinase Kinase

MAPKKK: Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase

MEK: MAPK/ERK kinase

MMP: Matrix metalloproteinase

NF- $\kappa$ B: Nuclear factor- $\kappa$ B

OA: Okadaic acid

PCR: Polymerase chain reaction

PP: Serine/threonine phosphatase

PVDF: Poly vinylidene difluoride

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

siRNA: Small interfering RNA

TAK: Transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase

TG: Transgenic

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

TPA: 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

## 1. 要約

セリン/スレオニンプロテインホスファターゼ 6 型 (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-κB シグナル制御などに重要な機能をもつことが報告されている。しかしながら、*Ppp6c* 遺伝子を欠くマウス個体は作成されておらず生理機能に関しては未解明な部分が多い。

近年、悪性黒色腫の全 exon シークエンスのデータより、*B-raf* または *N-ras* 変異を保有する悪性黒色腫患者の約 10%において、*Ppp6c* 遺伝子の突然変異が同定され、*Ppp6c* が、悪性黒色腫のがん抑制遺伝子である可能性が示唆された。

そこで、本研究では PP6 の機能と発がんとの関係を明らかにするため、皮膚特異的に誘導欠損可能なコンディショナルノックアウトマウス (*K14-CreER<sup>tam</sup>*; *Ppp6c<sup>flox/flox</sup>*) を作製し実験を行った。このシステムを用いて、DMBA/TPA による二段階発がん実験を行ったところ、コントロールマウスでは、DMBA 投与後 15 週程度からパピローマの出現が認められた。一方で、*Ppp6c* の欠損したマウスでは、5 週目からパピローマの出現が認められた。さらに、DMBA 単独投与のみでパピローマ早期出現が認められた。このメカニズムを解析するために、*Ppp6c* の欠損した

皮膚へ DMBA を塗布して 48 時間後の皮膚組織の観察を行った。その結果、表皮の増殖と表皮から真皮にかけての炎症が見られ、それを裏付ける遺伝子発現 (*c-jun*, *c-fos*, *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *GRO  $\alpha$* , *GM-CSF*, *MMP-3*)の亢進が認められた。また、*Ppp6c* の欠損したマウスに発生したパピローマにおいて、腫瘍の増殖を強力に促進する遺伝子発現 (*GRO  $\alpha$* , *cyclin D1*)の上昇が見られた。

2 段階発がんには TNF- $\alpha$ の働きが必須であることが知られているため、マウスより採取したケラチノサイトを用いて、TNF- $\alpha$ による Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)シグナルへの影響を調べた。その結果、*Ppp6c* の機能が欠損しているケラチノサイトにおいては、TAK1 のリン酸化が亢進していることが明らかとなった。また、NF- $\kappa$ B シグナル活性化のマーカである p65/relA のリン酸化が亢進していることが示された。

これらの結果より、PP6 の機能欠損は DMBA により皮膚発がんを引き起こすことが明らかとなった。また、PP6 が NF- $\kappa$ B シグナル制御を介して、細胞増殖や炎症を制御している可能性が示唆された。

## 2. 研究背景

タンパク質のリン酸化と脱リン酸化は、細胞増殖、環境応答といった細胞調節機構において重要な役割を果たしている(1, 2)。このタンパク質のリン酸化レベルは、リン酸化を触媒しているプロテインキナーゼと、脱リン酸化を触媒しているタンパク質ホスファターゼ(プロテインホスファターゼ)によって、厳密に調節されている。これまでリン酸化の研究は、キナーゼを中心にして進められてきた。一方ホスファターゼは、その基質の精製が困難であることもありキナーゼに比べて大幅に遅れていた。しかし、ポストゲノム時代に入り状況は一変した。ホスファターゼ分子の総数とその一次構造が明らかとなったことに始まり、各々のホスファターゼの制御機構が解明され、遺伝子改変マウスの作製により個体での機能が解明された。さらに次世代シーケンスを用いた統合的ゲノム解析や、網羅的遺伝子発現プロファイルなど新しい検索手段により、ホスファターゼの異常と疾患との関わりが次々と明らかにされ、ホスファターゼをターゲットとした診断や分子標的薬の可能性も現実的なものとなってきた(3)。

シグナル伝達を担うプロテインホスファターゼは、その基質特異性により、セリン/スレオニン残基特異的なセリン/スレオニンプロテインホスファターゼ(protein serine/threonine phosphatase; PP)、チロシン残基特異的なチロシンホスファターゼ(protein tyrosine phosphatase; PTP)、セリン/スレオニン/チロシン残基特異的な二重



特異性ホスファターゼ (dual specificity phosphatase; DSP) の3つに分類される (4)。

今回、注目したPP6は、PPファミリーの中のPP2Aサブファミリーに分類される (表1)。さらに、PP2A、PP4と高い相同性を持つことが知られており(5, 6)、触媒サブユニットの Ppp6c、調節サブユニットの ARS (ankyrin-repeat subunit)と SAPS (Sit4p-associated proteins subunit)の3つのサブユニットから成り立っている (7, 8)。

また、*Ppp6* は酵母からヒトを含む真核生物で保存されており、ホモログとの高い相同性を示すことが知られている。

酵母を用いた実験により、出芽酵母のホモログである *Sit4* は、細胞周期のチェックポイント機能を有していること (8, 9)、分裂酵母のホモログである *Ppe1* は正常な染色体分離に必須であること (10, 11)が示されている。また、線虫のホモログである *PPH-6* 遺伝子は、siRNAを用いたノックダウンの実験より、胚において適切な紡錘体の位置決めが必要であると示されている (12)。さらに、ヒト *Ppp6* 遺伝子は、出芽酵母や分裂酵母における PP6 ホモログ遺伝子の欠失による細胞増殖停止をレスキューすることができたとの報告があり (10)、ほ乳類においても、PP6は細胞周期チェックポイント機能を有していると考えられる。さらに、ヒトの細胞株を用いた実験では、PP6が Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) の一つとして知られている Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase (TAK) 1を不活化していること (13)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )刺激に応答した Inhibitor  $\kappa$ B $\epsilon$  (IkB $\epsilon$ )の分解を抑制していること (14)、DNA依存性タンパク質リン酸化酵素

(DNA-dependent protein kinase: DNA-PK)を活性化し DNA 修復を開始させる反応に関与していること (15-17)、Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII)とともに p27 の発現を調節してアポトーシスを制御していること (18)、E カドヘリン-カテニンとコンプレックスを形成し細胞接着に関わっていること (19)、が報告されている。このように PP6 が DNA 修復や炎症、アポトーシスといった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り、マウスを対象とした実験は報告されておらず、実際に個体レベルでも PP6 が同様の機能を示すのかは不明である。

化学物質を用いたマウス皮膚の二段階発がん実験は、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り、腫瘍の成長を視覚的に確認することができる点や、皮膚に化学物質を塗布する手技が容易であるため、多用されているモデルの一つである。このモデルでは、イニシエーターを単回投与した皮膚に、プロモーターが塗布されることで初めてパピローマが形成され、イニシエーターのみの投与では腫瘍は形成されないとしている。また、初めのうちはプロモーターの塗布を止めることでパピローマは縮退するため、プロモーターの継続した塗布がパピローマの出現に必須であるとされている。その一方で、プロモーターの塗布を長期間にわたって続けることで、プロモーター非依存的なパピローマが形成され、その中には、頻度は低いものの悪性の扁平上皮癌が出現するといわれている (20)。

二段階発がん実験の中でも、イニシエーターとして 7,12-ジメチルベンズアントラセン (7,12-dimethylbenz [a] anthracene; DMBA) を皮膚に単回塗布したのに続いて、プロテインキナーゼ C を活性化させる働きを持つ 12-O-テトラデカノイルホルボル 13-アセタート (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TPA) をプロモーターとして繰り返し塗布するモデルは、皮膚がんを誘発することでよく知られている (21)。

一方、PP が腫瘍の形成にどのように関連しているのかは不明であったが、藤木らは、二段階発がん実験を行うことで、PP の抗腫瘍活性を明らかにした (22-24)。彼らは、PP2A タイプのホスファターゼの阻害薬であるオカダ酸 (OA) を用いた二段階発がん実験を行い、OA が TPA と同様に腫瘍促進効果があることを明らかにした。さらに、TNF- $\alpha$  の阻害薬であるカンベントールを DMBA/OA の二段階発がん実験に追加することで腫瘍の発生が抑えられることを報告し (25)、DMBA/OA による発がんに関与していることを明らかにしている。しかしながら、OA に感受性を示す PP として、PP2A、PP4、PP6 が知られているが、そのうちどの分子種が、2 段階発がんのどのステップに、いかに関与しているのかの解明は全くなされていない。

近年、2 つの主要な研究により、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 (26, 27)。

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 (28)。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* ががん抑制遺伝子として働いている可能性を示唆している。一方、*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC)* データベース中により、さらに重要なことが示された。悪性黒色腫により見出された *Ppp6c* の変異がその他のがん種でも生じているということである。しかしながら、現在までのところトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いて、*PP6* が腫瘍抑制する機能を持つことを証明した報告はない。

### 3. 研究目的

本研究では、誘導欠損可能な *Ppp6c* コンディショナルノックアウトマウスを用いて、皮膚の *Ppp6c* 機能消失と腫瘍形成との関係を解明することを目的とした。

## 4. 研究方法

### 4-1. 実験動物

*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 (図 1)。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*<sup>flox/flox</sup> 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*<sup>+/-</sup>) の作製は、*Ppp6c*<sup>flox/+</sup> 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*<sup>+/-</sup>) 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<sup>tam</sup> 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*<sup>flox/flox</sup> マウスと交配して K14-CreER<sup>tam</sup>; *Ppp6c*<sup>flox/+</sup> マウスを作製した。K14-CreER<sup>tam</sup>; *Ppp6c*<sup>flox/+</sup> 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<sup>tam</sup>; *Ppp6c*<sup>flox/flox</sup>) を作製した (図 1A)。本実験は、すべて宮城県立がんセンター研究所の動物実験委員会の承認を得て行っている。

## 4-2. 試薬

DMBA および TPA は Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) から購入した。OA は、菅沼雅美博士 (埼玉県立がんセンター) より供与されたものを使用した。マウス TNF- $\alpha$  は、Sigma Chemical より購入した。4-ヒドロキシタモキシフェン (4HT) は、Tront Research Chemicals (North York, Canada) より購入した。

## 4-3. PCR 法による *Ppp6c* 欠損の確認

K14-*CreER<sup>tam</sup>*; *Ppp6c<sup>flox/flox</sup>* マウスに、400  $\mu$ g の 4HT を溶解した 100  $\mu$ l のアセトン を 2.5cm $\times$ 3.5cm の範囲に対し 5 日間にわたり塗布した 4HT (+) 群の皮膚と、アセトン 100  $\mu$ l のみ 5 日間塗布した 4HT (-) 群 の皮膚をサンプルとして、皮膚組織中における *Ppp6c* の exon4 欠損の確認を行った。マウス皮膚より抽出したゲノム DNA を テンプレートとして、プライマー a; 5'- TATCACGAGGCCCTTTCG-3', プライマー b; 5'- TAGTGAACCTCTTCGAGG -3 を用いて PCR を行った (図 1A)。この時、*Ppp6c* の flox アレルと、exon4 欠損アレルから得られる PCR 産物の予想される長さは、それぞれ 796 bp と 275 bp である。

腫瘍組織中の exon4 欠損 *Ppp6c* の mRNA の同定は、精製した cDNA をテンプレートとして、プライマー c; 5'- TGGATCTGGACAAGTATGTG-3', プライマー d; 5'- CAAGTGTCACATCTTCAGG-3' を用いた PCR で行った。この時、予想される野生型 *Ppp6c*-mRNA と、exon4 欠損 *Ppp6c*-mRNA 由来の RT-PCR 産物の長さは 604 bp

と 462 bp である。

#### 4-4. 皮膚発がん実験

6~7 週齢の *K14-CreER<sup>tam</sup>; Ppp6c<sup>flox/flox</sup>* マウスの皮膚 (2.5cm×3.5cm) に 400 $\mu$ g の 4HT を溶解した 100 $\mu$ l のアセトン を、5 日間連続して塗布した群を 4HT (+) とした。一方、アセトン 100 $\mu$ l 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 100 $\mu$ g の DMBA を溶解したアセトン 100 $\mu$ l をマウスの皮膚 (2.5cm×3.5cm) に塗布した。(図 3A)。

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、1 $\mu$ g の TPA または 5 $\mu$ g の OA を溶解したアセトン 100 $\mu$ l 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 (図 2A)。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。



#### 4-5. 病理組織学的解析

実験に用いられた皮膚組織および皮膚の腫瘍はホルマリン固定後にパラフィン包埋し、ヘマトキシリン - エオジン (HE)染色を行った。観察にはオリンパス BX53 (Tokyo, Japan)の顕微鏡を用いた。

#### 4-6. RNA 抽出と定量的 RT-PCR

皮膚および腫瘍の total RNA は RNeasy mini kit (Qiagen)で抽出し、ランダムプライマーと SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて逆転写反応を行った。定量的 real-time PCR は、Universal library and probe master kit (Roche Diagnostics, , Basel, Switzerland)を用い、Light Cycler 480 Master Mix (Roche)で測定した。本研究では、皮膚内の *c-jun*、*c-fos*、*TNF- $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$* 、*IL-6*、*GM-CSF*、*GRO $\alpha$* 、*MMP-3* の mRNA 量を測定した。各サンプルにおいて、各遺伝子 mRNA の発現量は、 *$\beta$ -actin* mRNA 発現量に対する比として示した。DMBA を投与する前の各遺伝子 mRNA 発現量を、1 arbitrary unit として、6、24、48 時間後の mRNA 量の変化を検討した。

同様に、腫瘍内における *cyclin D1*、*GRO $\alpha$*  の mRNA 量の測定を行った。この時、腫瘍内の  *$\beta$ -actin* の mRNA 量が異常に亢進していたため、*18S ribosomal RNA* の RNA レベルを内部標準として用いた。4HT 処置を行っていない、20 週齢の *K14-CreER<sup>tam</sup> ; Ppp6c<sup>flox/flox</sup>* マウスの正常皮膚における各遺伝子 mRNA 量を 1 arbitrary

unit として、腫瘍中の mRNA 発現量を検討した。また、統計学的解析には、有意水準 5% で片側検定の t 検定を用いて行った。

使用したプローブ番号とプライマーの配列は表 2 に記載する。

#### 4-7. H-ras 変異の解析

H-ras のコドン 61 番の遺伝子変異 (CAA→CTA)解析は、鈴木ら (29)による PCR-RFLP の方法に基づき行った。腫瘍サンプルから精製した cDNA をテンプレートとし、プライマーは Forward; 5'- CCGGAAACAGGTGGTCATTG-3'、 Reverse; 5'- AGGAAGCCCTCCCCTGTGCG-3' を用いて PCR を行った。その後、増幅された変異部位を含む H-ras に対し、TCTAGA の配列を認識する制限酵素である Xba I を使用し、37°C で 1 時間インキュベートした。正常な exon2 のコドン 61 番は CAA の配列であるため切断されない (119 bp)が、CTA の配列をもつ遺伝子変異体のみ、Xba I によって特異的切断される (63/56 bp)。その後、3%アガロースゲル上で電気泳動し、DNA 断片の大きさの違いを利用して、H-ras の遺伝子変異を分析した。

#### 4-8. プライマリーケラチノサイトの精製と培養

K14-CreER<sup>tam</sup>; Ppp6c<sup>flox/flox</sup> マウスに対して、生後 0 日目、1 日目、2 日目に、400μg の 4HT を溶解したアセトン 100μl を皮膚全体に塗布した群 (HT+)、およびアセトン 100μl のみを塗布した群 (HT-)を準備し、それぞれより、生後 3 日目にケラチノ

サイトを Lichti ら (30)の方法に準拠し、単離精製した。具体的には、マウスをインジン、70% EtOH、rinse solution [ペニシリン G (明治製菓)入りの PBS (Final Conc: 100U/L) ]で洗い、マウスの皮膚を切り出し後、剥いだ皮膚を再び Rinse solution で洗った。続いて dispase 溶液に入れ、4°Cで一晩インキュベートした。翌日、表皮と真皮に分け、表皮をトリプシンに浸し、37°Cで 10 分間揺らした。10% FBS/PBS で懸濁し、セルストレーナー (70  $\mu$  m)を用いてろ過した。1000 rpm で 3 分間遠心し、沈殿しているケラチノサイトに CnT-07 Epidermal Keratinocyte Medium (CELLnTEC, Bern, Switzerland)10mL を加えて懸濁した。4 $\times$ 10<sup>5</sup> cell/mL になるように希釈し、コーゲンコートされたプレートに細胞をまき培養した。この時、目視にて、ケラチノサイト特有の敷石状の細胞形態を確認し培養を行っている。その後の全ての *in vitro* 実験は、最初の培養開始後 4 から 6 日の間に完了させた。

#### 4-9. ウェスタンブロッティング

細胞は PBS で洗浄し、氷冷した細胞溶解 buffer [RIPA buffer(50 mM Tris-Hcl, 150 mM Nacl, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % Triton-X100, 10 % Glycerol), 0.1 % DOC、PhosSTOP (Roche Diagnosis), 10  $\mu$ g / ml leupeptin、10  $\mu$ g / ml aprotinin]で回収し、氷冷した超音波破碎で溶解した。遠心分離 (13,000rpm、4°C、5 分間)後、その上清を細胞抽出液とした。Mini-Protein TGX™ Gel (BIO-RAD)を 用いた SDS-PAGE によりタンパク質を分離した後、PVDF フィルター (BIO-RAD)に転写した。抗 PPp6c 抗体

は、Lifespan biosciences 社より購入した N 末端残基を抗原としたウサギポリクローナル抗体 (LS-B624)と、我々の研究室で C 末端側 16 アミノ酸残基を抗原として作製したウサギポリクローナル抗体を使用した。抗 p65/relA 抗体 (cell Signaling、#8242)、抗リン酸化 p65/relA 抗体 (cell Signaling、#3033)、抗 I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体 (cell Signaling、#4814)、抗 I $\kappa$ B $\epsilon$ 抗体 (Santa Cruz、#sc-7156)、抗 $\beta$ -actin 抗体 (Sigma、#A5441)を使用した。シグナルの検出は、LAS4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan)を用いて取り込んだ。

## 5. 研究結果

### 5-1. 皮膚特異的な *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。すでに作製済みであった *Ppp6c*<sup>flox/flox</sup> 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*<sup>tam</sup> を掛け合わせて、K14-*CreER*<sup>tam</sup>; *Ppp6c*<sup>flox/flox</sup> マウスを作製した (図 1A)。この K14-*CreER*<sup>tam</sup> システム (31) では、K14 でその発現がドライブされている *CreER*<sup>tam</sup> 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 (図 1A)。

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*<sup>tam</sup>; *Ppp6c*<sup>flox/flox</sup> 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、プライマー a、b (図 1A) を用いて PCR 法により増幅した (図 1B)。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 (図 1B、レーン 1)。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 (図 1B、レーン 2)。続いて、欠損効率を確認するために、*Ppp6c*<sup>+/-</sup>マウスおよび *Ppp6c*<sup>fllox/+</sup>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 (図 1B、レーン 3-8)。その結果、4HT (+)のケラチノサイト(図 1B、レーン 2)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、ウェスタンブロッティングにて、*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 (図 1C)。

## 5-2. 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<sup>tam</sup>*; *Ppp6c*<sup>fllox/fllox</sup> マウスの皮膚に対して、図 2A に示すようなスケジュールで、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 (図 2B、上段)。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 ( $p=0.23$ )。また、最終的な腫瘍の数には大きな変化はなかった。(図 2B、下段)。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 (図 2C)。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 ( $p=0.030$ )。

### 5-3. 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 (図 3A)。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 (図 3B) ( $p=0.009$ )。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 (図 2B、C)。

### 5-4. 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の代表的なものに関して肉眼写真と顕微鏡写真をそれぞれ 図 3C、D に示す。この腫瘍は、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（図4）。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（32）。

### 5-5. 腫瘍中の遺伝子解析

DMBA（図3B）、DMBA/TPA（図2B）、DMBA/OA（図2C）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（図5A）。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（図5B）。

次に、各群の腫瘍において、growth-regulated oncogene  $\alpha$  (*GRO*  $\alpha$ )の遺伝子発現を確認した。*GRO* $\alpha$ 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（33, 34）、*ras*によって制御されている（35）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*  $\alpha$  の発現が高値となっていた（DMBA:  $p=0.036$ ）。さらに、細胞増殖のマーカーの一つである *cyclin D1*（36）もまた、正常な皮膚に比べて高値となっていた（DMBA+TPA:  $p=0.018$ ,



DMBA+OA: p=0.029) (図 5C)。

#### 5-6. *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 (図 6)。DMBA 投与 48 時間後、*Ppp6c* の機能が欠損した皮膚では、①表皮の肥厚、②真皮への細胞浸潤、③皮下組織への細胞浸潤が見られ、増殖性所見と炎症性の所見が認められた。

*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を検討するため、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 DMBA 塗布 6、24 時間後の発現が有意に高値となっていた (それぞれ p=0.021, p=0.019)。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- $\alpha$*  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 $\beta$*  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 発現量が高値になっている傾

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 ( $p=0.045$ )。 *GM-CSF*、 *GRO  $\alpha$*  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 (それぞれ  $p=0.041$ ,  $p=0.015$ )。 また、炎症関連遺伝子である *MMP-3* は、48 時間後の時点では  $p=0.079$  と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 ( $p=0.006$ ) (図 7)。

#### 5-7. ケラチノサイト中における NF- $\kappa$ B 経路への影響

DMBA 刺激によって前炎症性サイトカインである TNF-  $\alpha$  が 6h 後という早期に発現上昇が認められた (図 7)。TNF-  $\alpha$  は皮膚二段階発がんに必要なサイトカインとされ (24, 25, 37)、サイトカインシグナルの上流に位置していることから、TNF-  $\alpha$  が *Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトへ何らかの影響を与えることが想像できた。そのため、*Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイト 4HT (+) とコントロールケラチノサイト 4HT (-)を用いて、TNF- $\alpha$  (250ng/ml)投与後のタイムコースについてウェスタンブロッティングを用いて検討した (図 8)。まず、TAK1 リン酸化レベルへの影響を解析したところ、コントロールの TAM (-)ケラチノサイトでは、15 分から 30 分にかけて若干のリン酸化レベルの上昇が認められたが、TAM (+)のケラチノサイトではその上昇が增強され、60 分後までリン酸化が認められた。

次に、その下流の  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  および  $\text{I}\kappa\text{B}\varepsilon$  への影響をそのタンパク量で解析した。 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  は、TAM (-) および TAM (+) ケラチノサイトにおいて、タンパク量に変化は認められなかった。一方で、 $\text{I}\kappa\text{B}\varepsilon$  は TAM (-) のケラチノサイトで、5分から30分にかけてタンパク量の増加が認められ、TAM (+) のケラチノサイトでは、その増加は減弱していた。

最後に、NF- $\kappa$ B の活性化を p65/relA のリン酸化を指標として解析した。コントロールの TAM (-) ケラチノサイトでは、5分から15分後にかけてリン酸化が増加していた。*Ppp6c* 機能が欠損している TAM (+) のケラチノサイトでは、その増加が著しく増進していた。

## 6. 考察

本研究では、*K14-CreER<sup>tam</sup>; Ppp6c<sup>flox/flox</sup>* マウスの皮膚に対して、4HT 処理をすることにより、DNA レベル、タンパク質レベルともに効率よく、*Ppp6c* のホスファターゼドメインである *exon4* を欠損させることが可能であることが明らかとなった。

本研究では、*K14-CreER<sup>tam</sup>; Ppp6c<sup>flox/flox</sup>* マウスの皮膚に対して、4HT による前処理、DMBA、TPA の投与を行ったところ、コントロールマウス 4HT (-)では、約 15 週後にパピローマの形成が認められ、過去に C57BL/6 マウスの二段階発がん実験で報告されている結果とほぼ同様であった (21)。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、早い段階から腫瘍が形成される傾向が認められた。しかし、腫瘍の数には大きな変化はなかった。(図 2B)。この事は、*Ppp6c* の機能消失は、DMBA/TPA 投与によるパピローマ発生の時期を早くさせる作用があることを示唆した。また、本研究では、皮膚で *Ppp6c* を欠損しているマウスにおいて、DMBA 単独処理でパピローマが発生することを見出した。DMBA の単独処理でパピローマが発生したとの報告は、文献的には、メタロチオネインのノックアウトマウスを用いた一報のみ (38)である。この報告によると、我々と同程度の頻度の腫瘍発生には、10 倍量の DMBA を必要としており、*Ppp6c* 欠損皮膚が、DMBA 誘発腫瘍に

非常に高感受性を持つことが示された。さらに、4HT (-)マウスでは、TPA や OA のプロモーション作用によるパピローマ発生が 15~16 週であったのに対し(図 2)、*Ppp6c* を欠損させたマウスでは、DMBA の投与のみで 5 週後にパピローマの形成が見られた (図 3)。これらは、TPA や OA の腫瘍プロモーション作用は、*Ppp6c* 欠損の腫瘍プロモーション作用に比べると無視できるレベルであることが考えられ、*Ppp6c* の機能欠損による腫瘍プロモーター活性が TPA や OA よりも遙かに強力であることを示している。

次に、*Ppp6c* の機能欠損マウスに発生したパピローマの遺伝子解析を行ったところ、exon4 欠損アレル由来と考えられる欠損 *Ppp6c*-mRNA (図 5A)と *H-ras* のコドン 61 番の遺伝子変異が認められた (図 5B)。これらの結果は、このパピローマは、*Ppp6c* の機能が欠損しているケラチノサイトにおいて、DMBA による *H-ras* のコドン 61 番の遺伝子変異が起こり、この二つの条件により増殖優位性を得て腫瘍形成になったと考えられる。Hodis ら (27)は、悪性黒色腫の全 exon シークエンスの結果より、「*Ppp6c* の loss of function が、変異 *B-raf* または変異 *N-ras* 遺伝子による癌発生をさらにドライブさせる。」という仮説を提唱したが、我々の本研究結果は、これらの仮説を支持するものと考えられる。また、現時点の COSMIC データにおいて、*Ppp6c* 遺伝子変異が肺癌、大腸癌、子宮体癌にも、悪性黒色腫で見出されたのと同様の変異がリストアップされている。そのため、*Ppp6c* の loss of function ががん遺

伝子により駆動された腫瘍中でドライバー遺伝子となるかを確認するために、各種組織において、がん遺伝子の変異を伴った *Ppp6c* ノックアウトマウスを作製し解析する必要がある。当研究室では、現在、*Ppp6c* コンディショナルノックアウトマウスと *K-ras* の変異を持つマウスを掛け合わせているところである。このマウスを解析することで、著明な細胞情報伝達系の1つである *ras* の経路に対して *Ppp6c* の機能欠損がどの様に関わり、様々な組織における腫瘍形成の原因となるのかを明らかとしたいと考えている。

さらに本研究では、パピローマサンプルにおける発現遺伝子の解析により、*GRO $\alpha$* 、*cyclinD1* の発現が著明に上昇していることが見出された。*GRO $\alpha$* は好中球を遊走させることで炎症を引き起こし、血管新生を促進することで腫瘍の成長を加速させることが報告されている (45, 46)。*Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイト由来のパピローマにおいて、長期間にわたり *GRO $\alpha$* 、*cyclinD1* が顕著に上昇し続けることが、さらなる腫瘍の増大に働くと考えられる。

これらの所見により、DMBA によって *H-ras* に変異をもったケラチノサイトが、PP6 の活性が消失している環境下で、周囲のケラチノサイト (*H-ras* 変異を持つが *Ppp6c* は正常な細胞、あるいは、*Ppp6c* の活性は消失しているが *H-ras* 変異を持たない細胞) より増殖優位性をもち、腫瘍形成または腫瘍の維持に、*GRO $\alpha$* や *cyclinD1* が働いていることが強く示唆された。

炎症は、腫瘍のプロモーション/プログレッション作用を促進させることが報告されている (39, 40)。本研究では DMBA 処理 48 時間後の *Ppp6c* の機能欠損皮膚において、炎症や細胞増殖の所見が見られ(図 6)、大きく 3 つのグループに分類される炎症・増殖関連遺伝子の発現が、*Ppp6c* 機能欠損組織において、コントロールより上昇する傾向にあることがわかった(図 7)。まず第 1 に、前炎症性サイトカインである *IL-1β* や *IL-6* であるが、これらの発現は、*Ppp6c* 機能欠損皮膚において著しく上昇していた。*IL-1β* は、急性期の炎症時に単球やマクロファージから放出され、*IL-6* の発現を上昇させることが知られている (41)。また、*IL-1β* と同じファミリーである *IL-1α* は、真皮への好中球浸潤を引き起こすことが報告されている (42)。従って、*Ppp6c* の機能が欠損している皮膚において、*IL-1β*、*IL-6* の発現が上昇し、著しい炎症が起きることでプロモーションを促進するということが、早期パピローマ発生の原因の一つと考えられる。2 番目は *GM-CSF*、*GROα*、*MMP-3* のような炎症関連遺伝子である。これらの発現も上昇していた (図 7)。白血球の成長と生存を促す *GM-CSF* と、細胞浸潤を活性化させる働きを持つ *MMP-3* による炎症性微小環境の構築も、早期のパピローマ形成に寄与したと考えられる。3 番目は、Immediate early gene として知られる *c-jun* と *c-fos* である。*Ppp6c* 機能欠損皮膚において、DMBA 処理後 6 時間後で、*c-jun* と *c-fos* の mRNA の発現が上昇した。*c-jun* と *c-fos* は、AP-1 の構成因子であり (43, 44)、AP-1 を介した増殖シグナルも早期パピローマ形成の原因の一つと考えられる。

TNF- $\alpha$ は、皮膚二段階発がんのサイトカインカスケードの上流に位置するサイトカインと考えられている。今回の研究でも、DMBA 処理により、*Ppp6c* の欠損の有無にかかわらず、皮膚において早期に発現上昇が認められた。そこで、ケラチノサイトに対する TNF- $\alpha$ の影響を確認した。正常および *Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトにおいて、TNF- $\alpha$ は NF- $\kappa$ B の活性化を引き起こし、特に *Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトにおいて強く亢進することがわかった。DMBA 処理時の、*Ppp6c* 欠損皮膚において認められる様々な異常の最初のステップは、ケラチノサイトの TNF- $\alpha$ に対する反応性の違いである可能性がある。NF- $\kappa$ B の標的遺伝子タンパクが、自然免疫、炎症、細胞の生存などを制御する(47)ので、この経路が亢進する生理的意義は大きいと考える。例えば、細胞の生存シグナルの一つとして、NF- $\kappa$ B は、*cyclin D1* の発現を上昇させることで細胞増殖を促進させることが報告されている (48, 49)。本研究では、パピローマ中の *cyclin D1* の発現が上昇していたことから (図 5C)、この遺伝子発現の上昇が、パピローマ形成促進の一因と考える。

また、図 7 のウェスタンブロッティングの結果では、TAK1 のリン酸化は、4HT (-) のケラチノサイトに比べ、4HT (+) のケラチノサイトの方がよりバンドの強度が強かった。これまで、ヒトの細胞株を用いた実験により、PP6 は TAK1 を不活化しているという報告 (13)があるが、*Ppp6c* 機能欠損することで TAK1 のリン酸化が亢進するという本研究の結果は、先行研究の結果を支持する結果となった。さらに、IkB $\epsilon$  について検討したところ、5分から30分の各時間において、*Ppp6c* 機能欠損してい



る4HT (+)のケラチノサイトに比べ、4HT (-)のケラチノサイトのタンパク量の増加が認められ、PP6がI $\kappa$ B $\epsilon$ を制御しているとの報告(14)を支持する結果となった。また、通常では、I $\kappa$ Bが分解されることでNF- $\kappa$ Bシグナルが活性化される(47)とされるが、本研究では、I $\kappa$ Bタンパクレベルの減少は認められなかった。この理由に関しては不明であり詳細な検討が必要であると思われる。また、本研究では、Ppp6c機能欠損している4HT (+)のケラチノサイトにおいて、著明なp65/relAのリン酸化が確認され、NF- $\kappa$ Bシグナルが活性化していることが明らかとなった。I $\kappa$ B $\alpha$ 並びにI $\kappa$ B $\epsilon$ タンパクのタンパクレベルの減少が認められなかったにも関わらず、p65/relAのリン酸化が亢進していたこと、さらにはそのリン酸化レベルが、4HT (-)のケラチノサイトより4HT (+)のケラチノサイトで増強していたことから、PP6はTAK1やI $\kappa$ B $\epsilon$ の制御だけでなくp65/relAに対しても直接制御している可能性が示唆された。

本研究では、DMBA刺激による腫瘍形成に関して検討を行ったが、DMBA非刺激時における皮膚の維持に関するPpp6c欠損の影響に関しては明らかとなっていない。今回、DMBA非刺激時でも、20週にわたる長期間観察を行った場合でも、目視では皮膚の変化を見つけることはできず、皮膚病理学的検討を今後行っていく必要がある。

本研究では、NF- $\kappa$ B シグナルに関して検討を行ったが、I $\kappa$ B $\epsilon$ とI $\kappa$ B $\alpha$ の反応性の違いやリン酸化 NF- $\kappa$ B の細胞内局在化など、いまだ不明な点が多く今後さらなる検討が必要である。また、少なくとも、Ppp6c が MAPKKK の一つである TAK1 を制御する結果が得られたが、他の MAPKKK に対してどのように影響するのか未解決のままである。本研究では、Ppp6c 欠損し H-*ras* の変異が出現している皮膚での腫瘍形成が認められたが、*ras* の下流の MAPKKK である Raf、MAPKK である MEK、MAPK である ERK にどのように働いているのかは不明である。現在、掛け合わせている Ppp6c のコンディショナルノックアウトマウスと K-*ras* の解析により、Ras における Ppp6c の欠損の意義がより明らかになることが期待される。一方、これまで細胞を用いた実験により、Ppp6c と Aurora A (28)や DNA-PK (15-17)といった DNA の修復に関わる分子に関する報告されており、今後コンディショナルノックアウトマウスを用いた更なる解析が望まれる。

これらの結果より、Ppp6c の機能が欠損しているマウスの皮膚では、DMBA イニシエーションによる、発がん感受性が高いことが示唆された。本研究は、Ppp6c の機能欠損が、マウスにおいて腫瘍プロモーターとして働くことを初めて明らかにした研究である。この発見は、B-*raf* や N-*ras* の遺伝子変異により生じる悪性黒色腫において、Ppp6c の機能欠損がドライバーとして働くという仮説 (27, 28)を強く支持するものである。今後、PP6 の標的分子をターゲットにした薬剤を開発し、PP6

の活性が低下している者に対し投与することで、がんの予防へと寄与できる可能性が考えられる。そのためにも、*Ppp6c* 欠損により腫瘍促進のメカニズムをより詳細に検討することが今後の課題である。

## 7. 結論

*Ppp6c* の機能欠損が、強力な腫瘍プロモーター作用を持つことが明らかとなった。

*Ppp6c* の機能欠損により **NF-κB** シグナルの活性化の亢進が見られ、**PP6** は **NF-κB** シグナル制御を介して、細胞増殖や炎症を制御している可能性が示唆された。

## 8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東北大学大学院医学系研究科がん分子制御学分野 島礼教授、並びに 西野善一准教授、田沼延公准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、有益なるご助言、ご協力を頂きました、宮城県立がんセンター研究所がん薬物療法部のスタッフの皆様、並びに宮城県立がんセンター研究所のスタッフの皆様、並びに宮城県立がんセンターの菅沼雅美主席主幹に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に多大なご協力を頂きました、奈良女子大学大学院人間文化研究科渡邊利雄教授、並びに研究室の皆様、埼玉県立がんセンターの菅沼雅美主席主幹に厚く御礼申し上げます。

社会人大学院生として、研究する時間を与えてくださった、宮城県立がんセンター薬剤部 鈴木幹子部長、高村千津子科長を始め、スタッフの皆様、並びに宮城県立がんセンターの菅沼雅美主席主幹に厚く御礼申し上げます。

最後に、今日に至るまでの学生生活を様々な面から支えて頂いた、妻や両親を始めとする親族の皆に心から感謝いたします

## 9. 文献

1. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995; **80**: 225-236.
2. Cohen PT. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 245-251.
3. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 2005; **7**:591-600.
4. Moorhead GB Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemée A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 234-244.
5. Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 2009; **139**: 468-484.
6. Brautigan DL. Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J* 2013; **280**: 324-345.
7. Stefansson B, Ohama T, Daugherty AE, Brautigan DL. Protein phosphatase 6 regulatory subunits composed of ankyrin repeat domains. *Biochemistry*. 2008; **47**: 1442-1451.
8. Luke MM, Della Seta F, Di Como CJ, Sugimoto H, Kobayashi R, Arndt KT. The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 2744-2755.
9. Sutton A, Immanuel D, Arndt KT. The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 2133-2148.
10. Bastians H, Ponstingl H. The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1. *J Cell Sci* 1996; **109**: 2865-2874.
11. Goshima G, Iwasaki O, Obuse C, Yanagida M. The role of Ppe1/PP6 phosphatase for equal chromosome segregation in fission yeast kinetochore. *EMBO J* 2003; **22**: 2752-2763.
12. Afshar K, Werner ME, Tse YC, Glotzer M, Gönczy P. Regulation of cortical contractility and spindle positioning by the protein phosphatase 6 PPH-6 in one-cell stage *C. elegans* embryos. *Development* 2010; **137**: 237-247.
13. Kajino T, Ren H, Iemura S, Natsume T, Stefansson B, Brautigan DL, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem* 2006; **281**: 39891-39896.
14. Stefansson B, Brautigan DL. Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets I $\kappa$ B $\epsilon$ . *J Biol Chem* 2006; **281**: 22624-22634.
15. Mi J, Dziegielewska J, Bolesta E, Brautigan DL, Larner JM. Activation of DNA-PK by

- ionizing radiation is mediated by protein phosphatase 6. *PLoS One* 2009; Epub ahead of print Feb 9 2009; doi: 10.1371/journal.pone.0004395.
16. Zhong J, Liao J, Liu X, Wang P, Liu J, Hou W, Zhu B, Yao L, Wang J, Li J, Stark JM, Xie Y, Xu X. Protein phosphatase PP6 is required for homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 2011; **10**: 1411-1419.
  17. Douglas P, Zhong J, Ye R, Moorhead GB, Xu X, Lees-Miller SP. Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol Cell Biol* 2010; **30**: 1368-1381.
  18. Kajihara R, Fukushige S, Shioda N, Tanabe K, Fukunaga K, Inui S. CaMKII phosphorylates serine 10 of p27 and confers apoptosis resistance to HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **401**: 350-355.
  19. Ohama T, Wang L, Griner EM, Brautigan DL. Protein Ser/Thr phosphatase-6 is required for maintenance of E-cadherin at adherens junctions. *BMC Cell Biol* 2013; **14**: 42. doi: 10.1186/1471-2121-14-42.
  20. Weinberg RA; the biology of CANCER. 1<sup>st</sup>ed, Garland Science, New York, 2007, 435-436.
  21. Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat Protoc* 2009; **4**: 1350-1362.
  22. Suganuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, Ojika M, Wakamatsu K, Yamada K, Sugimura T. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1768–1771.
  23. Fujiki H, Suganuma M. Tumor promoters - microcystin-LR, nodularin and TNF- $\alpha$  and human cancer development. *Anticancer Agents Med Chem* 2011; **11**: 4-18.
  24. Suganuma M, Okabe S, Marino MW, Sakai A, Sueoka E, Fujiki H. Essential role of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. *Cancer Res* 1999; **59**: 4516-4518.
  25. Suganuma M, Okabe S, Zou X, Tius MA, Fujiki H. Canventol inhibits tumor promotion in CD-1 mouse skin through inhibition of tumor necrosis factor alpha release and of protein isoprenylation. *Cancer Res* 1993; **53**: 3462-3464.
  26. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stemke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; **150**: 251-263.
  27. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, Cheng E,

- Davis MJ, Goh G, Choi M, Ariyan S, Narayan D, Dutton-Regester K, Capatana A, Holman EC, Bosenberg M, Sznol M, Kluger HM, Brash DE, Stern DF, Materin MA, Lo RS, Mane S, Ma S, Kidd KK, Hayward NK, Lifton RP, Schlessinger J, Boggon TJ, Halaban R. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; **44**: 1006-1014.
28. Hammond D, Zeng K, Espert A, Bastos RN, Baron RD, Gruneberg U *et al.* Melanoma-associated mutations in protein phosphatase 6 cause chromosome instability and DNA damage owing to dysregulated Aurora-A. *J Cell Sci* 2013; **126**: 3429-3440.
  29. Suzuki JS, Nishimura N, Zhang B, Nakatsuru Y, Kobayashi S, Satoh M, Tohyama C. Metallothionein deficiency enhances skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in metallothionein-null mice. *Carcinogenesis* 2003; **24**: 1123-1132.
  30. Lichti U, Anders J, Yuspa SH. Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nat Protoc* 2008; **3**: 799-810.
  31. Omori E, Morioka S, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. TAK1 regulates reactive oxygen species and cell death in keratinocytes, which is essential for skin integrity. *J Biol Chem* 2008; **283**: 26161-26168.
  32. Sundberg JP, Sundberg BA, Beamer WG. Comparison of chemical carcinogen skin tumor induction efficacy in inbred, mutant, and hybrid strains of mice: morphologic variations of induced tumors and absence of a papillomavirus cocarcinogen. *Mol Carcinog* 1997; **20**: 19-32.
  33. Kolář M, Szabo P, Dvořánková B, Lacina L, Gabius HJ, Strnad H, Sáčhová J, Vlček C, Plzák J, Chovanec M, Cada Z, Betka J, Fík Z, Pačes J, Kovářová H, Motlík J, Jarkovská K, Smetana K Jr. Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol Cell* 2012; **104**: 738-751.
  34. Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2010; **29**: 273-283.
  35. Ancrile BB, O'Hayer KM, Counter CM. Oncogenic ras-induced expression of cytokines: a new target of anti-cancer therapeutics. *Mol Interv* 2008; **8**: 22-27.
  36. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993; **7**: 812-821.
  37. Schioppa T, Moore R, Thompson RG, Rosser EC, Kulbe H, Nedospasov S, Mauri C, Coussens LM, Balkwill FR. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of



- TNF- $\alpha$  during squamous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 10662-10667.
38. Zhang B, Satoh M, Nishimura N, Suzuki JS, Sone H, Aoki Y, Tohyama C. Metallothionein deficiency promotes mouse skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Res* 1998; **58**: 4044-4046.
  39. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; **420**: 860-867.
  40. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; **454**: 436-444.
  41. Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev* 2006; **25**: 387-408.
  42. Groves RW, Mizutani H, Kieffer JD, Kupper TS. Inflammatory skin disease in transgenic mice that express high levels of interleukin 1 alpha in basal epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; **92**: 11874-11878.
  43. Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*. 1988; **55**: 875-885.
  44. Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell*. 1988; **54**: 541-552
  45. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 2008; **267**: 226-244.
  46. Fimmel S, Devermann L, Herrmann A, Zouboulis C. GRO-alpha: a potential marker for cancer and aging silenced by RNA interference. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1119**: 176-189.
  47. Karin M, Lin A. NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; **3**: 221-227.
  48. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2690-2698.
  49. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; **441**: 431-436.

## 図表説明

図 1. **K14-CreER<sup>tam</sup>, Ppp6c<sup>flox/flox</sup>** マウスへの 4HT 投与は、**CreER<sup>tam</sup>** タンパクの活性化を経て、ケラチノサイトにおける **Ppp6c exon4** の欠損を誘導する

(A) *Ppp6c* ゲノムの構造

WT allele: マウス *Ppp6c* ゲノム

- ・ Targeting vector: exon4 を囲むように loxp 配列を挿入した。ポジティブセレクション用に Neo 遺伝子を挿入した。ゲノム DNA PCR で exon4 欠損の確認に用いたプライマーは、a と b である。
- ・ floxed *Ppp6c* allele: ES 細胞に Targeting vector をトランスフェクションし、相同組換えをおこして得られたアレル。RT-PCR に用いて exon4 欠損の有無を解析するために用いたプライマーは、c と d である。
- ・ Exon4<sup>Δ</sup> allele: *CreER<sup>tam</sup>* の発現ケラチノサイトにおいて、4HT 投与により活性化された *CreER<sup>tam</sup>* は、loxp サイトでリコンビネーションをおこし、exon4 を欠失させる。

(B) ゲノム DNA PCR 法による、*Exon4<sup>flox</sup>* allele の exon4 欠損の確認

プライマー a および b を用い、ケラチノサイトまたはマウスの尾由来のゲノム DNA を用いて PCR を行った。lane 1: 4HT 無処理のマウス (**K14-CreER<sup>tam</sup>, Ppp6c<sup>flox/flox</sup>**) から得られたケラチノサイト 4HT (-)。 lane 2: 4HT 投与のマウス (**K14-CreER<sup>tam</sup>, Ppp6c<sup>flox/flox</sup>**) から得られたケラチノサイト 4HT (+)。 Lane 3-8: *Ppp6c<sup>+/-</sup>* の尾由来のゲノム DNA と *Ppp6c<sup>flox/-</sup>* 尾由来のゲノム DNA を混ぜたもの (表示%は、*Ppp6c<sup>+/-</sup>* の尾由来のゲノム DNA の割合)。flox アレル由来、欠損アレル由来の PCR フラグメントの長さは、それぞれ 796bp、275bp である。Lane3-8 との比較で、4HT (+)におけるリコンビネーション効率を約 70%とした (lane2)。

(C) 4HT 投与ケラチノサイトにおける野生型 Ppp6c タンパクの減少

4HT (-)、4HT(+)のケラチノサイト (K14-CreER<sup>tam</sup>, Ppp6c<sup>lox/lox</sup>) 由来のタンパクを用いてウェスタンブロッティングを行った。抗体は、抗 Ppp6c 抗体 (上)、抗β-actin 抗体 (下) を用いた。各々のバンドの強さを計測し、各サンプルの Ppp6c/β-actin を比較した。4HT(-)ケラチノサイトにおける Ppp6c タンパク量は、4HT(+)の 24% と計算された。

## 図 2. マウス皮膚二段階発がん実験において、Ppp6c の機能欠損は腫瘍発生の促進に働く

(A) 二段階発がん実験スケジュール

4HT の前処置を行った群 4HT (+)と行わなかった群 4HT (-)の K14-CreER<sup>tam</sup>; Ppp6c<sup>lox/lox</sup> マウスに対して、DMBA (100μg/100μl アセトン)をイニシエーターとして用い、TPA (1μg/100μl アセトン)または OA (5μg/100μl アセトン)をプロモーターとして使用したときの二段階発がん実験のスケジュールを示す。

(B) DMBA/TPA 二段階発がん実験による腫瘍形成

4HT (+)マウス (n=8)、4HT (-)マウス (n=6)に対して、DMBA と TPA を用いて、二段階発がん実験を行った。上段はパピローマの発生したマウスの割合 (%)を示し、下段は 1 匹あたりの平均パピローマ数を示す。

(C)DMBA/OA 二段階発がん実験による腫瘍形成

4HT (+)マウス (n=11)、4HT (-)マウス (n=7)に対して、DMBA と OA を用いて、二段階発がん実験を行った。上段はパピローマの発生したマウスの割合 (%)を示し、下段は 1 匹あたりの平均パピローマ数を示す。

## 図 3. Ppp6c の機能欠損は DMBA 皮膚発がんを高感受性となる

(A) DMBA 単剤による発がん実験スケジュール

4HT の前処置をした群 4HT (+) としない群 4HT (-) の *K14-CreER<sup>tam</sup>; Ppp6c<sup>lox/lox</sup>* マウスに対して、DMBA (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l アセトン) 単剤による発がん実験を行ったスケジュールを示す。

(B) DMBA による腫瘍形成

4HT (+) マウス (n=15)、4HT (-) マウス (n=7) に対して、DMBA による発がん実験を行った。上段はパピローマの発生したマウスの割合(%)を示し、下段は 1 匹あたりの平均パピローマ数を示している。

(C) DMBA 誘発パピローマの肉眼的観察

DMBA 投与から 20 週経過した時点での代表的なパピローマを示している。

(D) DMBA 誘発パピローマの HE 染色

上記(C)の腫瘍に対し HE 染色を行った結果を示している。対物レンズは 4 倍で観察し、スケールバーは 500 $\mu$ m を示している。

**図 4. *Ppp6c* 機能欠損マウスに発生した DMBA 誘発パピローマの組織型**

4HT を塗布した *K14-CreER<sup>tam</sup>; Ppp6c<sup>lox/lox</sup>* マウスより生じたパピローマを示している。それぞれ、(A) early follicular papilloma、(B) mixed papilloma、(C) fibropapilloma、(D) exophytic papilloma、(E) hyperkeratotic papilloma の組織型に分類される代表的なものを示している。(A) に関しては 10 倍の対物レンズを使用し、スケールバーは 200 $\mu$ m を示す。(B) から (E) に関しては、4 倍の対物レンズで観察し、スケールバーは 500 $\mu$ m を示す。

(F) DMBA 誘発パピローマの組織型の割合

今回得られた各組織型の比率を示している。

## 図 5. *Ppp6c* 機能欠損マウスに発生した DMBA 誘発パピローマにおけるがん関連遺伝子の発現

### (A) 4HT (+)腫瘍における *Ppp6c* 組換え

DMBA (図 2B)、DMBA/TPA (図 2B)、DMBA/OA (図 3B)の腫瘍 (*K14-CreER<sup>tam</sup>, Ppp6c<sup>flox/flox</sup>*)由来の cDNA を用いて、プライマーc と d を用いて PCR を行った。野生型 *PP6*mRNA 由来、*exon4* 欠損 *PP6*mRNA 由来の PCR フラグメントの長さは、それぞれ 604bp、462bp である。

### (B) PCR-RFLP による *H-ras* コドン 61 遺伝子変異の同定

A に用いたのと同じ cDNA サンプルを用いて、*H-ras exon2* を PCR で増幅し、ついで *Xba* I 処理を行った。野生型 CAA をもつ *exon2* からは、119 bp フラグメントが得られ、変異型 CTA をもつ *exon2* からは、63/46 bp フラグメントが得られる。

### (C) 腫瘍中のがん関連遺伝子発現

5 匹の *K14-CreER<sup>tam</sup>; Ppp6c<sup>flox/flox</sup>* マウスより得られた正常な皮膚をコントロールとした。結果は 18S リボソーム RNA で、mRNA 量の標準化を行い、正常な皮膚を 1 とした時の遺伝子発現量の比を示している。腫瘍の値は、3 個の平均値 ± SE を示している (\**p*<0.05)。

## 図 6. *Ppp6c* の機能欠損は、DMBA による皮膚の炎症を促進させる

### DMBA 塗布後 48 時間後の皮膚変化

6 週齢の 4HT (+)、4HT (-)マウスへ DMBA を塗布し、DMBA 塗布前の皮膚と塗布後 48 時間後の皮膚の HE 染色を行った。対物レンズは 10 倍で観察し、スケールバーは 200µm を示す。

## 図 7. *Ppp6c* の機能欠損は、DMBA 投与による増殖および炎症関連遺伝子の発現を上昇させる

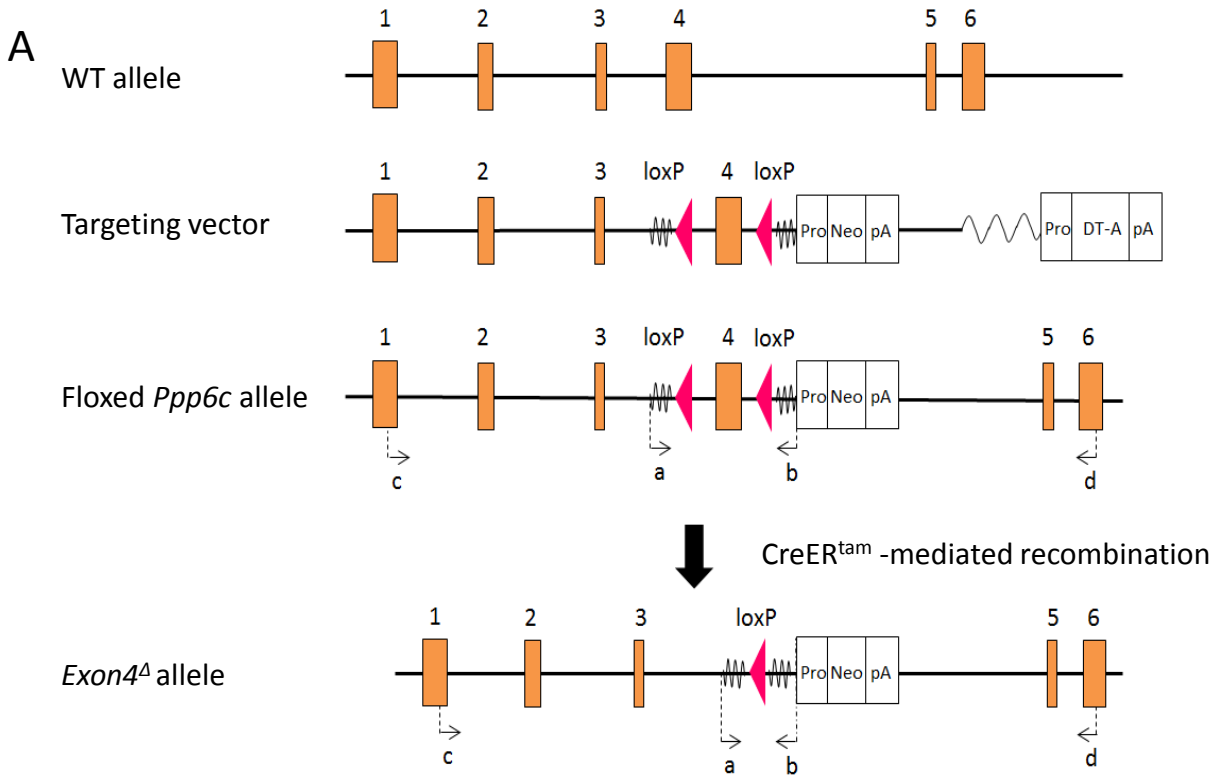
6 週齢の *K14-CreER<sup>tam</sup>; Ppp6c<sup>flox/flox</sup>* マウスに対して、Fig.3A に示すように、4HT

の前処置をした群 4HT (+)としない群 4HT (-)を準備し、それらに DMBA 塗布を行った。DMBA 塗布前の遺伝子発現量を 1 とし、DMBA 塗布後、6、24、48 時間後の時点で皮膚を回収し、各時点における表示した遺伝子 mRNA の発現を定量的 PCR で測定した。各遺伝子の発現量は、 $\beta$ -actin の mRNA 量で補正し、DMBA 処理前の発現量を 1 として示す。データは、4 匹のマウスを用いた実験の平均値  $\pm$ SE で示す (\* $p < 0.05$ )。

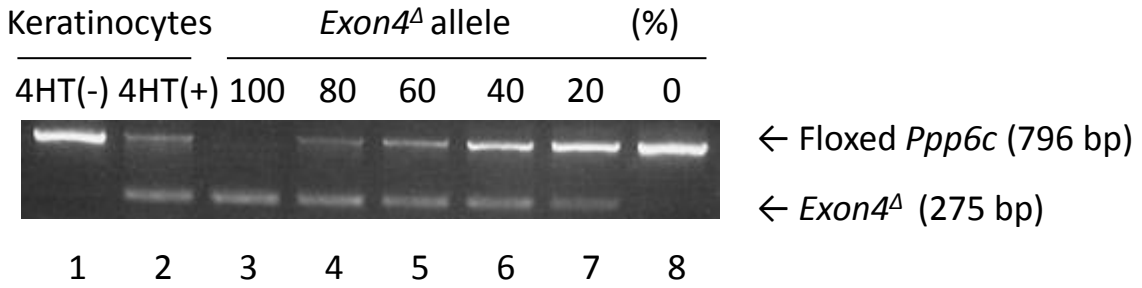
**図 8. *Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトにおいて、TNF- $\alpha$ 誘導による NF- $\kappa$ B 活性化が亢進する。**

4HT (-)または 4HT (+)のケラチノサイトに対して、250ng/ml の TNF- $\alpha$ 刺激を表示した時間行った。用いた抗体は、抗リン酸化 TAK1 抗体、抗 I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体、抗 I $\kappa$ B $\epsilon$ 抗体、抗リン酸化 p65/relA 抗体、抗 p65/relA 抗体である。

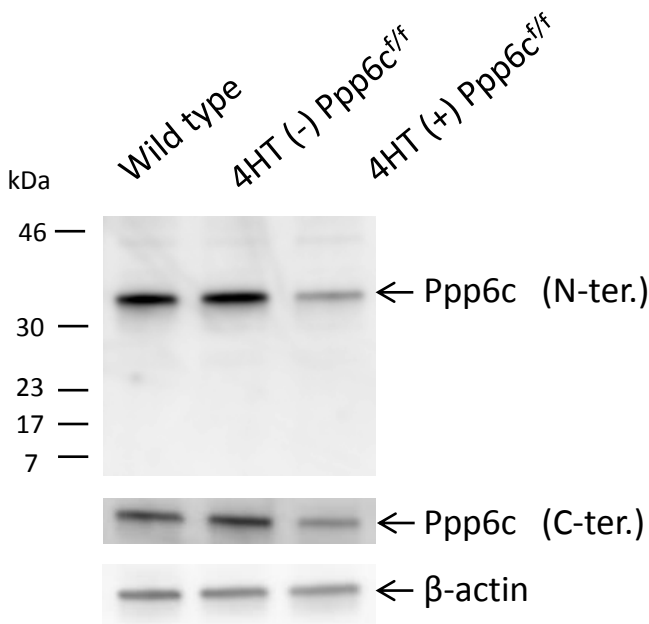
図表



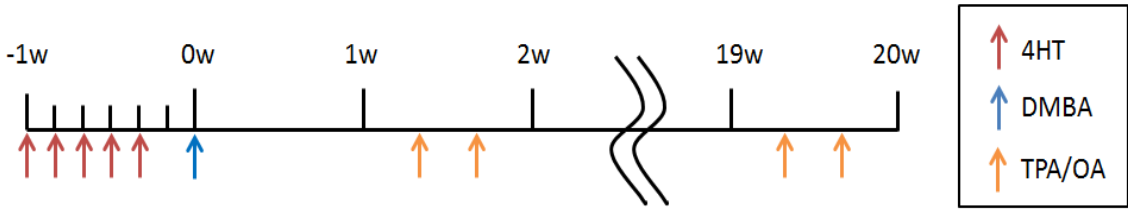
**B**



**C**

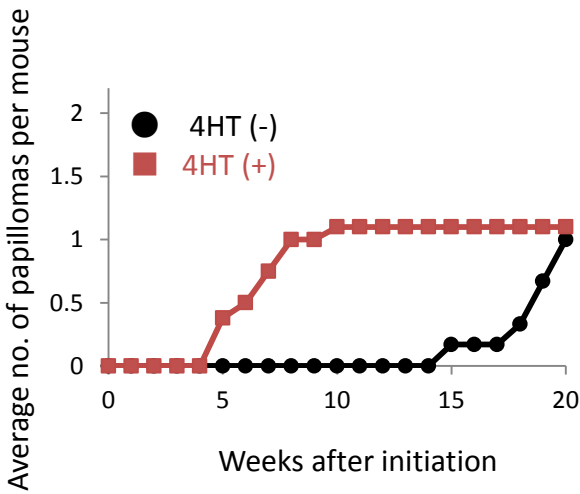
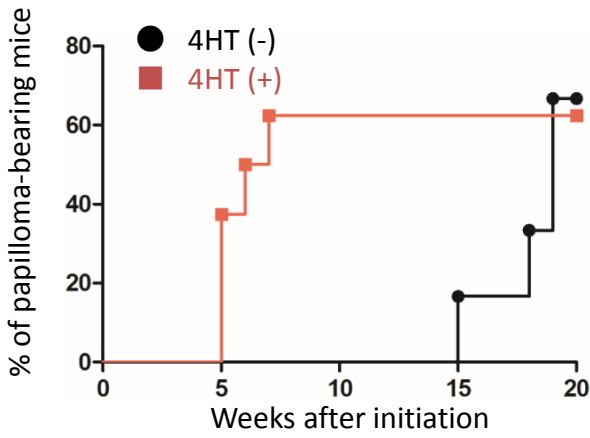


A



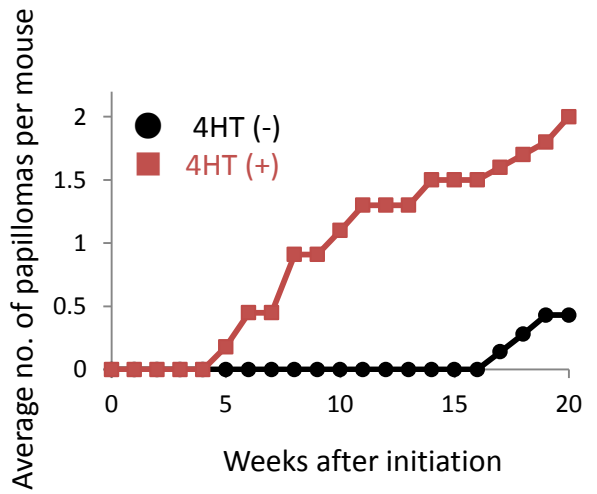
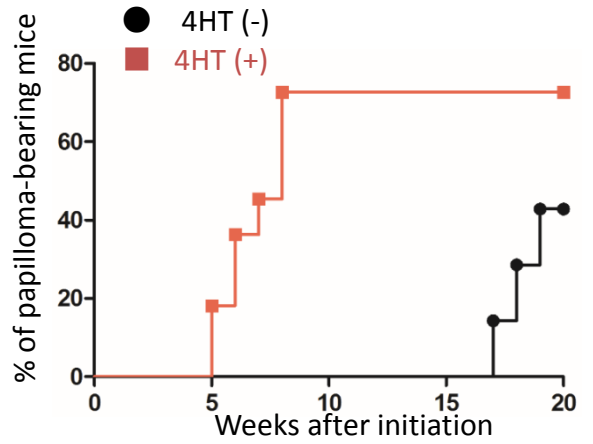
B

DMBA + TPA



C

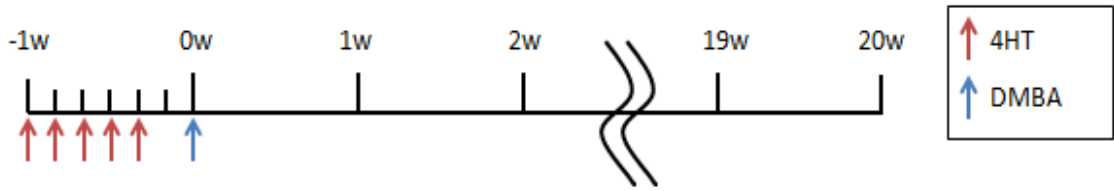
DMBA + OA



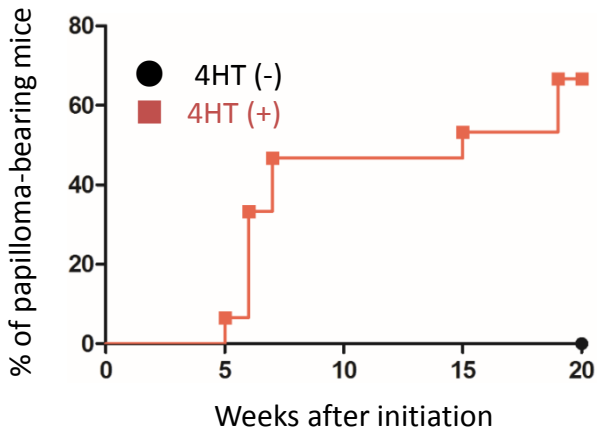
☒ 2



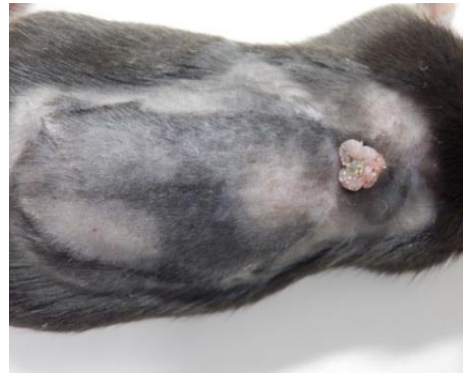
A



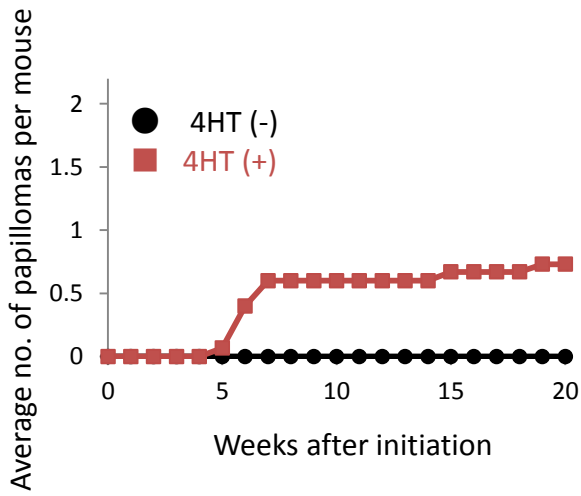
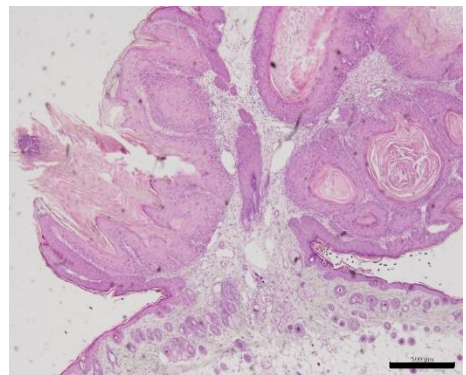
B



C

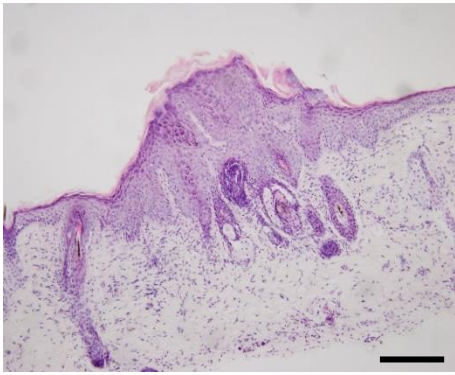


D



☒ 3

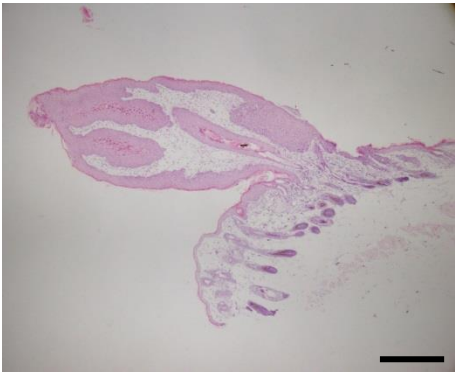
A



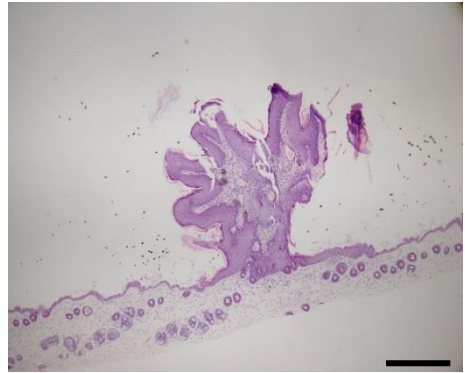
B



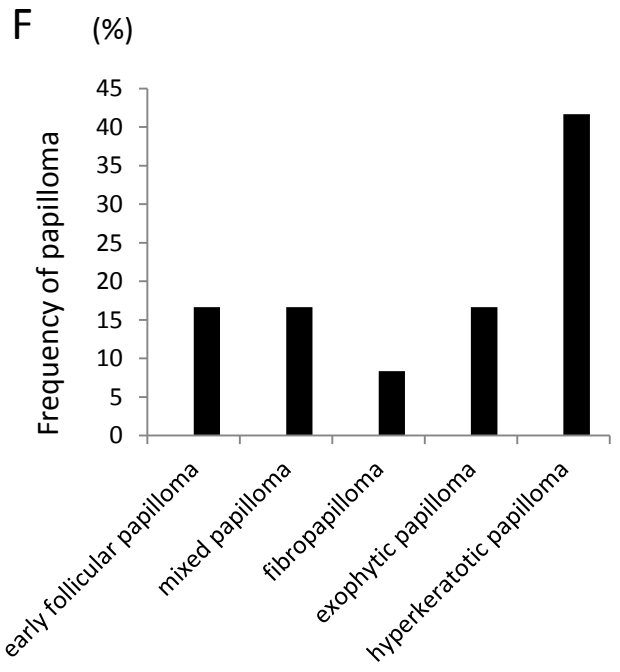
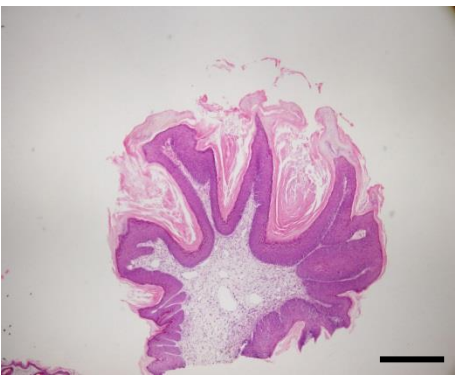
C



D

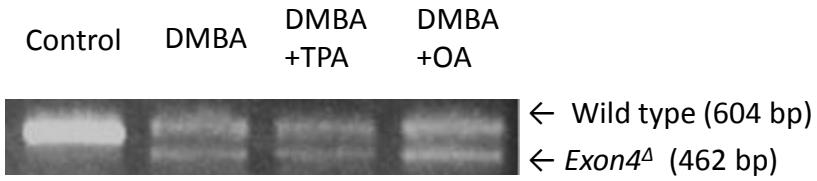


E

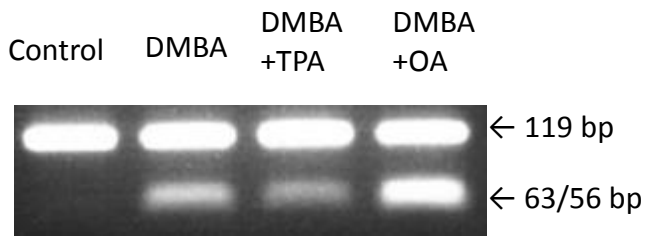


☒ 4

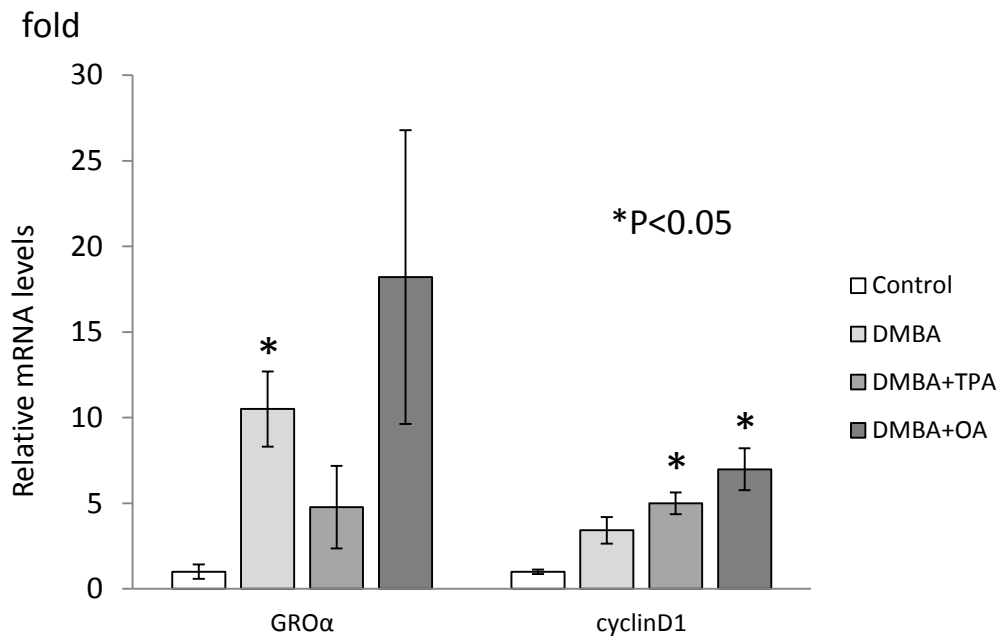
A



B



C

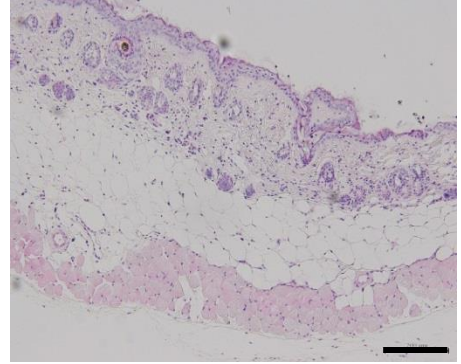
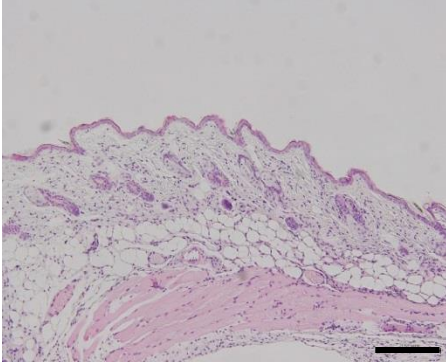


☒ 5

0 h

48 h

4HT (-)



4HT (+)

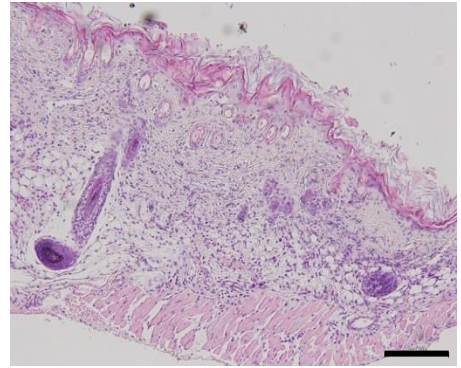
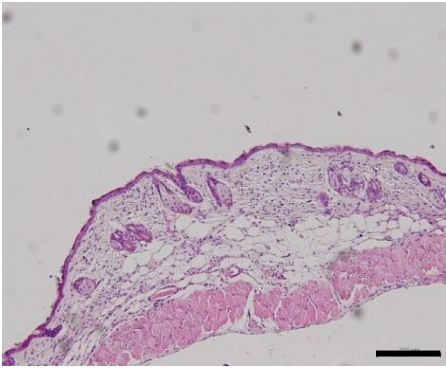
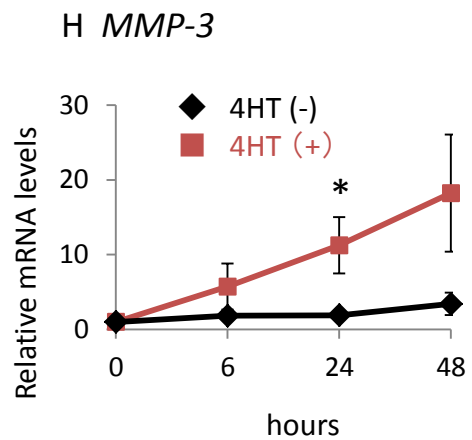
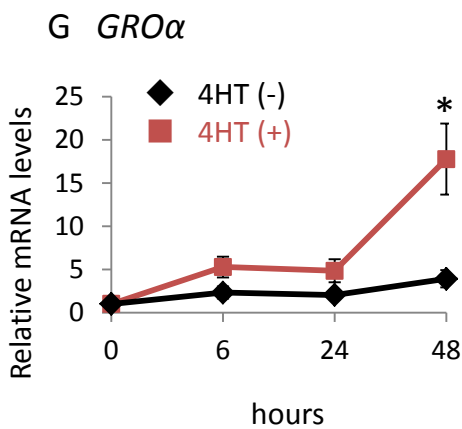
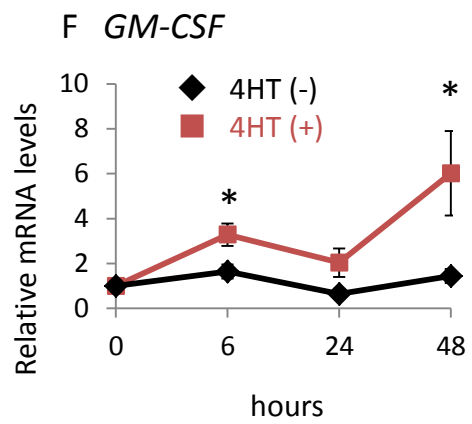
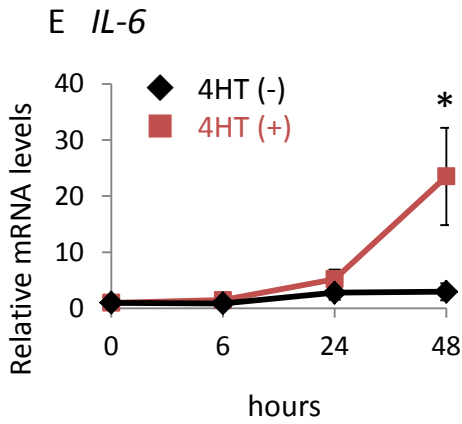
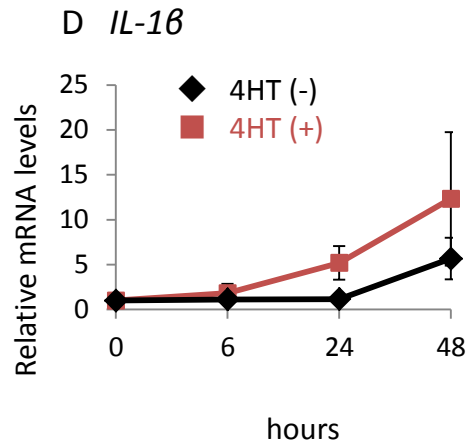
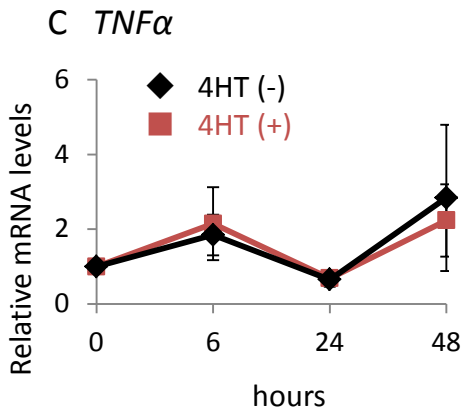
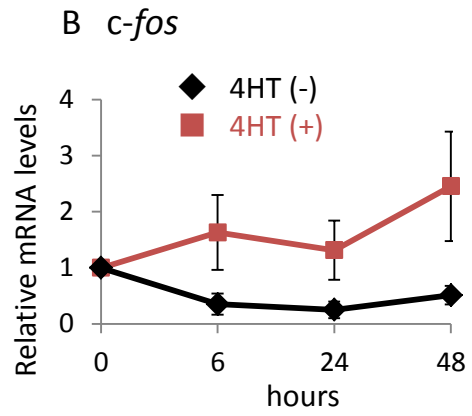
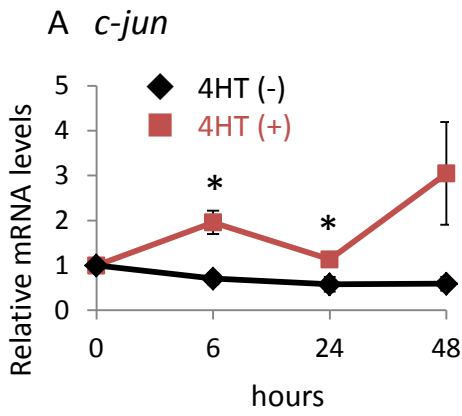


图 6



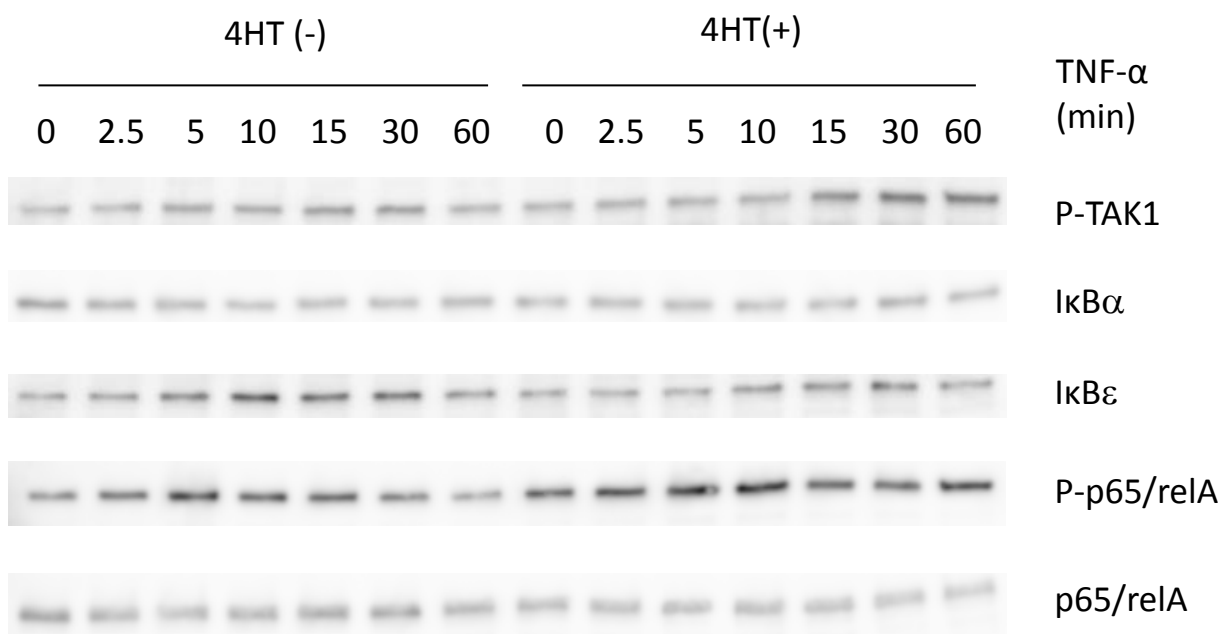


表1. セリン/スレオニンホスファターゼ (PP)の分類

サブファミリー	分子種
PP1	PP1a, PP1g, PP1d
PP2A	PP2Aa, PP2Ab, PP4, PP6
PP2B	PP2B (Calcineurin)
PP2C	PP2Ca, PP2Cb, PP2Cg, PP2Cd (Wip1)
PP5	PP5
PP7	PP7

表2. RT-PCRに用いたプローブ番号とプライマー配列

Primer	Probe No	Sequence	
		Forward	Reverse
c-jun	#7	5'-TATTTTGGGGAGCATTTGGA-3'	5'-GAGATTTGCAAAAGTTCGCTCT-3'
c-fos	#76	5'-GGGGCAAAGTAGAGCAGCTA-3'	5'-AGCTCCCTCCTCCGATTC-3'
TNF $\alpha$	#49	5'-TCTTCTCATTCTGCTTGTGG-3'	5'-GGTCTGGGCCATAGAACTGA-3'
IL-1 $\beta$	#26	5'-TTGACGGACCCCAAAGAT-3'	5'-TTTGAAGCTGGATGCTCTCAT-3'
IL-6	#6	5'-GATGGATGCTACCAAAGTGA-3'	5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'
GM-CSF	#79	5'-GCATGTAGAGGCCATCAAAGA-3'	5'-CGGGTCTGCACACATGTTA-3'
GRO $\alpha$	#83	5'-ACACTCCAACACAGCACCAT-3'	5'-TGACAGCGCAGCTCATTG-3'
MMP-3	#7	5'-TTGTTCTTTGATGCAGTCAGC-3'	5'-GATTTGCGCCAAAAGTGC-3'
cyclin D1	#72	5'-TTTCTTTCCAGAGTCATCAAGTGT-3'	5'-TGACTCCAGAAGGGCTTCAA-3'
$\beta$ -actin	#64	5'-CTAAGGCAACCGTGAAAAG-3'	5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'
*18S	#48	5'-GCAATTATCCCATGAACG-3'	5'-GGGACTTAATCAACGCAAGC-3'

\*18S; 18S ribosomal RNA