

Ppp6c 欠損マウスは、UVB 照射により高頻度で皮膚 SCC を発症する。

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

がん医科学講座がん分子制御学分野

加藤 浩之

目次

略語	2
1. 要約	3
2. 研究背景	4
3. 研究目的	6
4. 研究方法	7
4-1. 実験動物	7
4-2. 試薬	7
4-3. <i>Ppp6c</i> 欠損の PCR 解析による確認	7
4-4. UVB 誘発皮膚がん実験	7
4-5. 組織学的検査	8
4-6. 免疫組織学的検査	8
4-7. ウェスタンブロッティング	8
5. 研究結果	10
5-1. CreER ^{tam} 活性化による <i>Ppp6c</i> 欠損誘導と欠損効率の確認	10
5-2. UVB 照射による皮膚がん実験	10
5-3. UVB は、 <i>Ppp6c</i> 欠損マウス皮膚において高率に腫瘍発生を起こす	10
5-4. UVB 誘発皮膚扁平上皮癌の病理学的解析	10
5-5. <i>Ppp6c</i> 欠損皮膚において、UVB 誘導 p53 および p 21 発現が増強する	11
5-6. <i>Ppp6c</i> 欠損皮膚では UVB 誘導アポトーシス関連タンパクの 発現上昇が増強する	11
5-7. UVB 誘発皮膚扁平上皮癌における p53 および γ H2AX の同定	12
6. 考察	13
7. 結論	15
8. 謝辞	16
9. 文献	17
図表説明	21
図表	25

略語

ARS:Ankyrin-repeat subunit

ATM: ataxia telangiectasia mutated

ATR:ATM- and RAD3-related

CHK2:checkpoint kinases 2

COSMIC:catalogue of somatic mutations in cancer

CPD:cyclobutane pyrimidine dimer

DMBA: 7,12-dimethylbenz[a]anthracene

DNA: deoxyribonucleic acid

DSB: DNA double-strand break

HDR:homology-directed repair

LOH: loss of heterozygosity

MAPK:mitogen-activated protein kinase

MDM2: mouse double minute 2 homolog

MEK:MAPK/ERK kinase

NER:nucleotide excision repair

OA:Okadaic acid

PCR:polymerase chain reaction

PP:serine/threonine phosphatase

PP6 : proteinphosphatase 6

Ppp6c : protein phosphatase 6 catalytic subunit

PVDF:polyvinylidene difluoride

RFLP:restriction fragment length polymorphism

SAPS:Sit4-associated protein subunit

SCC: squamous cell carcinoma

SDS – PAGE:sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis

TAK:transforming growth factor – β activated kinase

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

UVB:Ultraviolet B

4HT: 4-Hydroxytamoxifen

6-4pp:6-4photo product

1. 要約

最近、プロテインホスファターゼ 6 (PP6) の触媒サブユニット遺伝子 (*Ppp6c*) の体細胞突然変異が、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、見いだされることが報告された。一方、我々は、以前から発がんにおける PP6 の関与を想定し、マウスを用いて、PP6 と発がんとの関係を検証している。*Ppp6c* ノルマウスが、胎生致死であること (小河ら投稿中) から、コンディショナルに *Ppp6c* を欠損させ、そのマウスを用いて発がん実験をすることを考えた。そこで、皮膚特異的に *Ppp6c* 遺伝子を誘導欠損可能なマウス (K14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox}) を用いて DMBA/TPA を用いた 2 段階発がん実験を行ったところ、*Ppp6c* 欠損皮膚では、DMBA による乳頭腫の形成が起こりやすくなることが分かった。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原に対してはどうか、という疑問が残った。そこで、本実験においては、DNA 損傷により発がんを起こすことが知られている紫外線の影響を調べる事とした。本実験には、DMBA/TPA の 2 段階発がん実験と同様のシステムを用いた。UVB 照射 (2KJ/m²) により、*Ppp6c* 欠損ケラチノサイトを有するマウスは、対照マウスと比較し、皮膚扁平上皮癌の高い発生率 (マウス 14 匹のうち 11 匹) を示した。従って、PP6 機能欠損が UVB による発がんを促進することが、明らかとなり、*Ppp6c* 遺伝子が、UVB 誘発発癌におけるがん抑制遺伝子である可能性が示唆された。このメカニズムを解明するために、UVB 照射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 時間をピークに著しい亢進が認められたが、コントロール皮膚ではその上昇はわずかであった。次に、その皮膚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、コントロール皮膚に比べて PUMA、Bax および cleaved caspase3 タンパク量の著しい亢進が認められた。

PP6 は、DNA2 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癌において、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 の蓄積をマーカーにして調べたところ、 γ H2AX 強陽性の 10 例中 9 例が p53 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癌においては、UVB による DSB の蓄積と p53 の遺伝子変異とが、高い確率で共存することが示唆された。これらの事より、*Ppp6c* 欠損皮膚における UVB による扁平上皮癌の発生の原因としては、1) *Ppp6c* 欠損ケラチノサイトが、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 つが考えられた。

2. 研究背景

セリン、スレオニン、チロシン残基をリン酸化する酵素がプロテインキナーゼである。その反対に、リン酸化セリン、スレオニン、チロシン残基を脱リン酸化する酵素はプロテインホスファターゼである。この2つの酵素は、オン/オフを切り替えるスイッチのような役目を果たしている。そして、生存、増殖、分化、運動、接着、死など多様な細胞機能を制御している（図1）。PP6は、PP2A、PP4、PP6よりなるPP2Aサブファミリーに属し、セリン・スレオニンホスファターゼ（PPP）ファミリーに分類される（図2）。PP6は、ホロ酵素で、触媒サブユニット（*Ppp6c*）と調節サブユニット（SAPS:Sit4-associated protein subunit）、そしてARS（Ankyrin-repeat subunit）の3つのサブユニットからなるヘテロ3量体（図3）（1、2）で構成されている。*Ppp6c*は、酵母からヒトにいたるまで、全ての真核生物間で保存されている。これまでモデル系として、下等真核生物を用いて、PP6機能を分析してきた。分裂酵母ホモログ、Sit4は、G1からS期への進行（3、4、5）に必要である。出芽酵母ホモログ、Ppe1は、適切な染色体分離（6）のために重要である。また、PP6線虫ホモログ、PPH-6は、皮質収縮とスピンドルポジショニング（7）を調節する。これらの研究は、PP6が、細胞周期チェックポイント制御することを示唆している（8）。哺乳動物細胞株を用いた実験では、PP6は、有糸分裂紡錘体の形成や、電離放射線によって生じるDNA2本鎖切断の相同性修復（9）を制御する。また、オーロラキナーゼA（10、11）、DNA依存性プロテインキナーゼ（12、13、14）、I κ B ϵ （15）、およびMAPKキナーゼキナーゼ（TAK1としても知られる）（16）の重要な調節因子であることが報告されている。これらのデータは、PP6が、DNA修復（17）、染色体分離（3、6）、NF κ Bシグナル制御（1、2）など重要な機能を持つ。全体として、これらのデータは、PP6が、複数経路のシグナルの制御に働くことが示唆される。

最近では、癌との関係について、2つの重要な研究（Hodisら、Krauthammerら）が報告された。B-rafまたはN-ras変異を有する悪性黒色腫患者の約10%に、*Ppp6c*遺伝子に変異があることが報告（18、19）された。さらに悪性黒色腫組織における*Ppp6c*突然変異が、高い頻度で、LOHを伴っていたことから、B-rafまたはN-ras変異の存在下で、PP6の機能喪失が、腫瘍形成をドライブすることが示唆された（18）。

マウス皮膚2段階発がん実験は、発がんに関連する重要な分子の同定または機能解析に使用されている実験である（20、21）。本研究室の林らが行った先行研究において、皮膚特異的に*Ppp6c*遺伝子を誘導欠損可能なマウス（K14-CreER^{tam}；*Ppp6c*^{flox/flox}）を用いて、イニシエーターとしてDMBA（7,12-ジメチルベンズアントラセン）、プロモーターとして、TPA（12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate）を用いて2段階発がん実験を行ったところ、*Ppp6c*が欠損したマウス皮膚では、乳頭腫の形成が起りやすくなることが分かった。プロモーターをTPAからOAに変えても同様であった（図4）。次に、DMBA（プロモーターを使用しないで）のみ塗布したDMBA単独発がん実験を行った。驚いたことに、正常皮膚においては、従来から知られているように、腫瘍形成が全く認められないものの、*Ppp6c*を欠損した皮膚においては、腫瘍が発生し、その時期もDMBA/TPA2段階発がん実験で認められた発生時期と殆ど変わらないことが分かった（図5）。この事は、DMBA単独での発がん実験では、

PP6 の機能不全が、腫瘍の強力なプロモーションとなり乳頭腫を形成することが明らかとなった(22)。以上、上記の我々の報告は、*Ppp6c* の機能喪失が、マウスにおける腫瘍プロモーターとして、作用することを示した最初のものであった。

皮膚がんは、ヒトがんのなかで、現在最も高頻度に発生するものの 1 つである。疫学的な検討から、紫外線 (UV)、特に太陽光に含まれる UVB (280-320nm) が、皮膚発がんにおける主要な環境変異原であることが、明らかとなっている(23、24)。本研究では、*Ppp6c* 欠損皮膚が、環境変異源である UVB 誘発扁平上皮癌形成に影響を与えるか否かを検討するために企画されたものである。

3. 研究目的

今まで、PP6 の機能不全マウスを用いた 2 段階発がん実験（DMBA/TPA）を行い、*Ppp6c* が DMBA により、イニシエートされた皮膚細胞の腫瘍化を抑える遺伝子であるということを明らかにした。しかし、以下の疑問が残った。

- (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のか？
- (2) ヒトの発がんの原因となる環境変異原に対してはどうか？

そこで、DNA 損傷により、発がんを起こすことが知られている紫外線と、PP6 の関係を明らかにすることを目的として本実験を実施した。

4. 研究方法

4-1. 実験動物

ホモマウスの作製を目的に、ヘテロマウス (*Ppp6c*^{+/-}) 同士の掛け合わせを行い、*Ppp6c* 遺伝子欠損マウスのフェノタイプを調べた。生まれたマウスは、野生型：ヘテロ：ホモが 1：2：0 と、*Ppp6c* 欠損マウスは、胎生致死であった。

そのためコンディショナルノックアウトマウス (*Ppp6c* 欠損マウス) 作製を以下のように実施した。ターゲティングベクターでは、*Ppp6c* の触媒活性中心である領域 exon4 を包み込むように loxp を配置した。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 欠損確認のために用いたプライマーは a と b である。Floxed *Ppp6c* allele は ES 細胞に Targetting vector をトランスフェクションし、相同組み換えをおこして得られた (図 6)。次に定法に従い、ES 細胞での相同組み換え体作製後、*Ppp6c*^{flox/+} マウス同士を掛け合わせて、*Ppp6c*^{flox/flox} マウス

(<http://www.cdb.riken.jp/arg/mutant%20mice%20list.html> 受託番号 CDB0850K C57BL/6 と CBA の雑種) を作製した。*Ppp6c* 遺伝子欠損アレルの作成は、上記マウスと CAG-CreTg マウス (理研) の交配により行った。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 世代戻し交配したマウスと、*Ppp6c*^{flox/flox} マウスと交配して、K14-CreER^{tam} ; *Ppp6c*^{flox/flox} マウスを作製し、実験に供した (図 7)。マウスの取扱いは、宮城県立がんセンター研究所動物実験委員会の承認を受け、指針に従って実験を行った。

4-2. 試薬

4HT は 4-Hydroxytamoxifen (Tront reseach chemical, Northyork, Canada) を使用した。

4-3. *Ppp6c* 欠損の PCR 解析による確認

Ppp6c 遺伝子の exon4 欠損の有無は、プライマー a、b を用いて PCR により調べた (図 1A)。プライマー a は、5' TATCACGAGGCCCTTTCG-3'、プライマー b は、5' TAGTGAACCTCTTCGAGG-3'。*Ppp6c*^{flox} アレルを持つ PCR 産物と、exon4 欠損アレルを持つ PCR 産物は、それぞれ 796 bp および 275 bp であった。

4-4. UVB 誘発皮膚発がん実験

K14-CreER^{tam} ; *Ppp6c*^{flox/flox} マウス (8 週齢) 背部皮膚 2.5cm×3.5cm を剃毛し、2 日後同部に対し、4HT (0.4mg/マウス) を含む 100μl アセトン (4HT+)、また、コントロールとして 100μl アセトン (4HT-) で 5 日間連続塗布した。その 2 日後より、両方のグループのマウスに対して、イソフルランで麻酔し、UVB 照射 (2KJ/m²、週 3 回、40 週) (25、26、27、28) を行った。UVB 照射装置として、バイオリンク BLX (Vilber Lourmat, French) を用いた。光源としては、UVB312nm をスペクトルピークとするものを用いた。マウスは毎週、腫瘍の発生の有無を調べ、直径 1 mm を超える腫瘍の数を記載した。

4-5. 組織学的検査

皮膚腫瘍および皮膚組織は、10%中性緩衝ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、HE 染色（ヘマトキシリン・エオジン染色）を実施し、宮城県立がんセンター内の2人の病理医により、顕微鏡的に検査した。観察には、BX53（Olympus, Tokyo, Japan）の顕微鏡を用いた。

4-6. 免疫組織化学的検査

免疫組織化学的検査は、DAKO ENVISION system (cat. no. K5355, DAKO, Glostrup, Denmark) を用いて行った。5 μ m切片を脱パラフィン後、賦活剤としてtarget retrieval solution (cat. no. S2369, DAKO, Glostrup, Denmark)を用いてMicrowave ovenによる抗原賦活化処理20分間実施、PBSで3回洗浄した。次に、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックするために30分間、H2O2/メタノール/PBS溶液(1:50:50)中でインキュベートした。続いて、PBSで3回洗浄後、1次抗体希釈溶液を用いて、4℃で1晩、1次抗体と共にインキュベートした。PBS3回洗浄後、2次抗体を用いて染色した。ジアミノベンチジン染色後、対比染色としてマイヤーのヘマトキシリンを用いた。以下に使用した1次抗体を示す。

1 次抗体

- (i) マウスモノクローナル抗 Ki67 抗体 (cat.no. #9449, Cell Signaling Technology, Danvers, USA) 希釈倍率 400 倍
- (ii) ウサギモノクローナル抗 p53 抗体 (cat.no. #2524, Cell Signaling Technology, Danvers, USA) 希釈倍率 1000 倍
- (iii) マウスモノクローナル抗 γ H2AX 抗体 (cat. no. 05-636, Millipore, Darmstadt, Germany) 希釈倍率 200 倍
- (iv) マウスモノクローナル抗 p21 (F5) 抗体 (cat.no. SC6246, santa cruz biotechnology, Texas, USA) 希釈倍率 50 倍

4-7. ウェスタンブロッティング

細胞は、PBS で洗浄後、氷冷した RIPA buffer [(50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0. 1%SDS, 1%Triton-X100, 10%Glycerol), 0. 1%DOC, PhosSTOP (RocheDiagnosis, Basel, Schweiz), 10ug/ml leupeptin, 10ug/ml aprotinin] を用いて回収し、氷冷した超音波破碎で融解した。遠心分離 (13, 000rpm, 4℃, 5 分間) 後、その上清を細胞抽出液とした。SDS-PAGE は、Mini-Protein TGX™Gel (BIO-RAD, California, USA) を用いて電気泳動後、PVDF フィルター (BIO-RAD) に転写した。タンパクは、ECL 法で発光させ、LAS4000mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) にて検出した。

以下に使用した 1 次抗体を示す。

1 次抗体

- (i) ウサギモノクローナル抗 p53 抗体 (cat.no. #2524, cell signaling Technology, Danvers, USA) 希釈倍率 1000 倍
- (ii) マウスモノクローナル抗 PUMA 抗体 (cat.no SC377015, santa cruz biotechnology, Texas, USA) 希釈倍率 50 倍

(iii) ラビットまたはヤギポリクローナル抗 Bax 抗体 (cat.no. SC 526, santa cruz biotechnology, Texas, USA) 希釈倍率 50 倍

(iv) ラビットモノクローナル抗 Cleaved caspase3 抗体 (cat.no. #9664, cell signaling Technology, Danvers, USA) 希釈倍率 2,000 倍。

(v) マウスモノクローナル抗 γ H2AX 抗体 (cat.no. 05-636, Millipore, Darmstadt, Germany) 希釈倍率 1,000 倍

(vi) ラビットポリクローナル抗 α -tubulin 抗体-HRP (cat. no. PM054-7, MBL, Nagoya, Japan) 希釈倍率 4,000 倍

5. 研究結果

5-1. CreER^{tam}活性化による *Ppp6c* 欠損誘導と欠損効率の確認

*Ppp6c*ヌルマウスは、胎生致死だったため、タモキシフェン投与により皮膚特異的に*Ppp6c*欠損をおこすマウス (K14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox}) を用いて、UVB照射により、皮膚腫瘍形成促進が認められるか否かを目的として研究を行った(29)。K14-CreER^{tam}システムでは、K14ケラチンが発現する細胞（主に上皮細胞基底層の細胞）において、CreER^{tam}が細胞質に発現する。このCreER^{tam}が、4HT投与により核へ移動し、loxPに挟み込まれたexon4にある*Ppp6c*部位を欠損させることが可能となる(図8A)。このシステムによりどのくらいの欠損効率(組み換え率)になっているかを検証するために、マウス背中の皮膚に、4HTを連続5日間塗布し、その2日後に該当部の皮膚抽出液から精製したゲノムを用いて、exon4欠損(図8A)の有無を調べた。未処置14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox}マウスの皮膚からのゲノムDNAを鋳型として、プライマーaおよびbを用いたPCR(方法を参照)では、floxedアレル由来796 bpの長さのバンド(図8B)が得られた。一方、4HTを処理した14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox}マウス皮膚由来のゲノムDNAを鋳型とした場合は、floxedアレル由来のエクソン4が欠損した際に得られる275 bpの長さのバンド(図8B)が認められた。次に、欠損効率を調べることを試みた。*Ppp6c*^{+/-}マウスおよび*Ppp6c*^{flox/+}マウスの尾より抽出したゲノムDNAを各比率で混合させPCRを行った。4HT処理14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox}マウスの皮膚DNAを用いたPCRで得られた796bpと275bpの濃度比は、*Ppp6c*^{flox/+}と *Ppp6c*^{+/-}由来のゲノムを6:4に混合したDNAを用いて得られたそれと同じであったことから、組換えは、約60%以上の効率であると考えた。(データ未掲載)

5-2. UVB照射による皮膚発がん実験

8週齢の14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox}マウス皮膚に対して、図9Aに示すスケジュールで、連続5日間4HT塗布による前処理後(コントロールはアセトンのみ)、3日後にUVB(2KJ/m²)を週3回、40週まで実施した。

5-3. UVBは、*Ppp6c*欠損マウス皮膚において高率に腫瘍発生を起こす

*Ppp6c*欠損マウス皮膚では、腫瘍は、約30週(図9B)で出現し、40週で14マウス中11マウスが腫瘍を形成(80%)した。総腫瘍数は17であった(表1)。以上より、UVB照射発がん実験において、*Ppp6c*機能欠損は、腫瘍発生促進的に働く。欠損型では、約80%(11/14)のマウスに扁平上皮癌が発生した。

5-4. UVB誘発皮膚扁平上皮癌の病理学的解析

発がん実験に用いたマウスをUVB照射後40週で安楽死させ、腫瘍をヘマトキシリンエオジン染色(HE染色)、免疫組織学的染色(Ki-67)にて解析した。*Ppp6c*欠損担癌マウス11匹から、総腫瘍数17腫瘍のうち、組織学的検査で、17腫瘍すべてを扁平上皮癌(SCC)(表1)と評価した。代表的なSCCサンプル(表1のtumor No.14)の肉眼画像、顕微鏡画像は、図10に示した。肉眼的には、この腫瘍は、瘢痕様を呈し、浸潤癌のクライテリア(①

直径 3mm 以上、②腫瘍からの出血、③潰瘍、クレーター、またはびらん) (30) のうち①と③に合致していた (図 10)。顕微鏡的には、この腫瘍の核は大小不同を示し、一部、拡大した、胞巣状構造を呈し、一部角化を示す腫瘍ということで、扁平上皮癌と診断した (図 10)。真皮内浸潤がみられたので、浸潤癌とし、Actinic Keratosis は否定した。また、角化を確認しているので、Bowen 病も否定した。また、メラノーマの発生はなかった。Ki67 免疫組織学的解析では、扁平上皮癌と同様に増殖を示す陽性像が見られた。

5-5. *Ppp6c* 欠損皮膚において、UVB 誘導 p53 および p21 発現が増強する

マウス皮膚において、UVB 照射により、p53 依存性に細胞周期停止、あるいはアポトーシス誘導に関わるタンパク質の発現が、誘導されることが知られている (28、31)。そこで、我々は、*PP6* 欠損で、これら p53 経路の活性化に差異が認められるか否かを、調べることにした。我々は、*Ppp6c* 欠損 (4HT+) およびコントロール (4HT-) (各々 4 匹のマウス) を使用して、UVB 照射後の皮膚における p53 誘導の時間経過を調べた。陽性細胞のカウントは、各時間 (0、3、6、12、24、48、72 時間) 毎のサンプル 5 視野平均を、さらに 4 匹の平均でプロットした。*Ppp6c* 欠損皮膚では、UVB 照射 3 時間後からケラチノサイト核内に、p53 の蓄積が認められ、その蓄積は 24 時間をピークとして、72 時間まで続いた (図 11 左)。24 時間後においては、約 40% の細胞が p53 陽性となった。

次に、p53 の標的遺伝子の 1 つである p21 について検討した (図 11 右)。UVB 照射後、*Ppp6c* 欠損皮膚においては、3 時間後から、ケラチノサイトの核内に、p21 が認められるようになった。この p21 陽性細胞は、p53 陽性細胞とほぼ同様なタイムコースで出現し、24 時間後においては、約 50% の細胞が p21 陽性となった。一方で、コントロール皮膚においては、24 時間後でピークを示したが、その陽性率は欠損皮膚に比べて非常に低かった。これらをまとめると、UVB 照射 *Ppp6c* 機能欠損型において、p53 および p21 タンパクの核内の発現上昇が、*Ppp6c* 機能欠損ケラチノサイトにおいて、著しく増強されることが明らかとなった。

5-6. *Ppp6c* 欠損皮膚では UVB 誘導アポトーシス関連タンパクの発現上昇が増強する

Ppp6c 欠損皮膚において、UVB 照射後の p53 タンパクの増加が著しく増加したことから、その皮膚において、アポトーシスが誘導される可能性が考えられた。そこで、UVB 照射後のアポトーシス関連タンパク (p53, PUMA, Bax, Cleaved caspase3) の発現誘導の有無を、時間を追って解析した (図 12)。まず、p53 の標的タンパクである PUMA, Bax の発現を調べた。*Ppp6c* 欠損 (4HT+) 皮膚において、PUMA, Bax のタンパク発現は、UVB 照射後、PUMA は 6 時間より、Bax は 3 時間より上昇を始め、24 時間まで亢進が認められた。一方、コントロール (4HT-) 皮膚においては、その上昇はわずかであった。次に、その下流で様々な基質を分解し、アポトーシスを執行する caspase3 の活性化 (切断) を、Cleaved caspase3 の発現で調べた。Cleaved caspase3 は、UVB 照射 6 時間後から認められ、24 時間後までその上昇は続いた、一方、コントロール (4HT-) 皮膚においては、その発現上昇はわずかであった。p53 タンパクレベルの上昇も、*Ppp6c* 欠損 (4HT+) 皮膚において、著しく増強されていた。UVB 照射後、*Ppp6c* 欠損皮膚において、p53、PUMA、Bax、Cleaved caspase3 の発現上昇が増強されたこと

により、PP6 機能が欠損しているケラチノサイトにおいて、UVB 刺激によるアポトーシスが活性化されていることが示唆された。

5-7. UVB 誘発皮膚扁平上皮癌における p53 および γ H2AX の同定

DNA の 2 重鎖切断損傷 (DSB:DNA double strand break) の修復に働くのが、HDR(Homology-Directed Repair)であるが、PP6 は、この HDR に必須であることが報告されている (11)。そこで、UVB によって誘発された皮膚扁平上皮癌組織 (SCC) において、DSB のマーカーである γ H2AX (25、26) の発現を調べた。今回得られた腫瘍の中で典型的なものの 1 つ (表 1 の 14) のマクロ画像および顕微鏡画像を、図 13 に示す。肉眼的所見では、この SCC は潰瘍を伴う瘢痕様の腫瘍を呈している (図 13 上)。このサンプルを用いて、抗 γ H2AX 抗体で、免疫組織染色を行った (図 13 中央)。この陽性率は、54%で陽性率を+とした。他の SCC サンプルに関しても、同様に、抗 γ H2AX 抗体で、免疫組織染色を行った (表 1) 陽性率は、++(>60%)、+(5-60%)、-<5%で分類した。表 1 に示すように、調べた 17 腫瘍のうち、10 腫瘍は γ H2AX 陽性であった。これらの腫瘍においては、DSB が未修復のまま残されていることが示唆された。次に、腫瘍における p53 陽性の有無を解析した。UVB は、CPD(cyclobutane pyrimidine dimer)を形成させ、C から T、CC から TT 変異を誘導するが (18、20)、この変異が p53 遺伝子に起こった場合、p53 タンパク質の立体構造変化が起こり、ユビキチンリガー MDM2 によるユビキチン依存性の分解に対して抵抗性になり、結果として変異 p53 が蓄積する事が知られているからである (32)。典型的 SCC サンプル (表 1 の No. 8) を用いて、抗 p53 抗体で免疫組織染色を行った (図 13 下) 陽性率は、60%であり、陽性率を++とした。他の SCC サンプルに関しても、同様に陽性率を調べた (表 1)。p53 陽性サンプルは、10/17 であった。また、 γ H2AX が陽性となっている組織 10 個のうち 9 個が、p53 陽性であることが分かった。以上より、*Ppp6c* 機能欠損マウスに発生した UVB 照射誘発腫瘍において、p53(+)、 γ H2AX(+)は、90% (9/10) 陽性であった。この事は、*Ppp6c* 欠損皮膚において、UVB により誘発された SCC においては、高い頻度で、DSB の修復不全と、p53 変異がカップルして存在していることが示唆された。

6. 考察

我々は、以前、*Ppp6c* 欠損が、マウスの皮膚において、DMBA による乳頭腫の発生を強く促進することを見出した。しかし、この腫瘍促進作用が、良性腫瘍においてのみ認められるのか、また、DMBA に特異的であるのかどうかは不明であった。我々は、この実験で、PP6 の機能不全が、UVB 誘導発がんにおいても促進的に働くことを明らかにした。この事は、PP6 が紫外線発がんにおけるがん抑制遺伝子であることを示唆するものであった。

UVB 照射は、ヒトおよびマウス皮膚において、DNA 損傷、細胞周期停止、およびアポトーシスを引き起こす事が知られている (28, 31)。我々は、*Ppp6c* 欠損皮膚において、アポトーシスのマーカーである cleaved caspase3 のタンパクレベルが、UVB 照射後 6 から 24 時間にわたってコントロールに比べて、著しく上昇している事を見出した。この事は、UVB 照射によって生じた DNA 傷害の修復が不完全で、そのためにアポトーシスの経路が強く活性化された事が考えられる。*Ppp6c* 欠損ケラチノサイトにおける、UVB による強いアポトーシスの活性化は、おそらく p53 を介して Bax によると考えられた。なぜなら、Bax のタンパクレベルでの上昇が、p53 の核での蓄積とほぼ同じタイムコースを示したからである。

我々の見出した重要な知見は、UVB により誘導される p53 の蓄積が、*Ppp6c* 欠損ケラチノサイトで、著しく増進するということである (図 14,15)。その分子機構を特定できていないが、いくつかの可能性がある。仮説 1) *Ppp6c* 欠損細胞では、損傷 DNA 修復異常があり、それが ATM、ATR と CHK2 の活性化の引き金となる可能性 (図 16)。仮説 2) ATM, ATR または CHK2 が PP6 の基質である可能性: PP6 の機能不全により、それらの過剰なリン酸化(活性化)が起こることになる (図 17)。仮説 3) p53 が PP6 の基質である可能性: PP6 の機能不全で、p53 の N 末端の過剰なリン酸化が起こり、そのため、ユビキチンリガーゼ MDM2 が結合できず、p53 が安定化する可能性がある (図 18)。仮説 4) MDM2 が PP6 の基質である可能性: 特定の MDM2 サイト (ATM リン酸化部位) のリン酸化は、MDM2 のユビキチンリガーゼとしての機能を損なう (図 19)。以上、4 つの仮説は、いずれも、結果として p53 の安定化に働く (図 19)。

特に強調したいことは、*Ppp6c* 欠損ケラチノサイトにおいて、UVB 誘発皮膚扁平上皮癌の半分以上が、p53 陽性かつ γ H2AX 陽性だったことである。ここで認められる p53 陽性は、p53 遺伝子変異により蓄積 (分解から回避された結果) したものと考えられた。これら p53 陽性細胞は p21 陽性を示さなかったからである。シークエンスで確認はしなかったが、この変異は p53 の転写活性を失活させるタイプと考えられた。一方で、UVB 照射により CPDs ができることが知られている。CPDs は、DNA の複製を阻害するばかりでなく、複製が阻害された場所において DSB を生じさせる。CPDs は、NER(nucleotide excision repair)で修復されることから、PP6 が NER に働くとすれば、PP6 機能破綻→CPD の修復不全→DSB の発生の可能性がある。したがって、PP6 がいかに NER に関与するのかが今後の課題となった。

皮膚の腫瘍促進剤として、UV に対する発がん感受性には、かなりのマウス株間では差があると知られている (21)。Kitajima らによると、マウス株による UV 腫瘍促進感度分布パターンは、BALB/c>C3H/He>C57BL/6 となり、C57BL/6 は、慢性的な紫外線暴露による腫瘍誘発に対する感受性が低いことが述べられている (33)。本実験では、UV 誘発腫瘍に比較的

耐性がある C57BL/6 において、*Ppp6c* 欠損で腫瘍を発生させたことは、PP6 の機能が皮膚腫瘍化の抑制で、特に重要な働きを持つことを示唆している。UVB 誘発発がんにおいても、DMBA/TPA2 段階発がんと同様に、乳頭腫から SCC が発症することが知られている (20)。しかし、本実験においては、少なくともそのような所見は認められなかった。それは、C57/BL6 の特徴なのか、または、PP6 欠損における腫瘍発生の特徴なのかは不明である。

以上まとめると、我々は、ケラチノサイト特異的に、*Ppp6c* 欠損マウスにおいて、UVB 照射により、扁平上皮癌の発生頻度が著しく増加することを見出した。UVB 照射後のタイムコースを調べると、p53、Bax そしてアポトーシス経路が、*Ppp6c* 欠損ケラチノサイトにおいて、著しく亢進していることが分かった。これらの知見は、蓄積した DNA 傷害が、アポトーシスを誘導し、結果として代償性の細胞増殖を促すことが、扁平上皮癌発生メカニズムであることが示唆される (図 20)。

2 段階発がん実験は、皮膚以外にもさまざまな臓器で行われており、一般に、臓器ごとに発がんプロモーターが存在する。しかし、オカダ酸類似の化合物は、皮膚だけでなく、ラット胃、肝において発がんプロモーターを示すことが知られている (34)。この事は、PP6 を含む PPP の障害が、組織にかかわらず、発がんプロモーターとして働くということを示唆する。最近、乳腺の悪性腫瘍、乳癌において患者 157 名 (北京、中国) を用いた研究が行われた。乳癌と良性乳房疾患の関係を *Ppp6c* の発現を調べたところ、ヒト乳癌における *Ppp6c* の発現は良性乳房疾患に比べて有意に低い結果であった (9)。COSMIC (Cancer of Somatic Mutation in Cancer) データによると、*Ppp6c* 遺伝子変異は、悪性黒色腫、皮膚がんだけでなく、肺癌、子宮体癌、大腸癌にも検出されている。現在、我々は、当研究所の組織バンクを用いて、皮膚がん以外の、がん組織における *Ppp6c* 異常 (発現低下や変異) の有無を解析中である。現在までのところ、遺伝子発現低下が、いくつかのがん組織で認められている。今後、さらに、各種がん組織に関して解析し、*Ppp6c* 異常の頻度、また病態や予後との関係について明らかにしたい。

今後は、PP6 機能不全によって発生した癌に対する、予防や治療法の開発が重要である。PP6 は、活性をもつ酵素であるので、その活性を標的とした治療が考えられる。第一義的には、PP6 活性低下が原因となって発生した癌に対する、*Ppp6c* 遺伝子発現の正常化や PP6 活性を賦活するという治療法である。また、キナーゼ側からのアプローチも考えられる。すなわち、PP6 に対するキナーゼを同定して、その阻害剤を使うという方法である。これらを現実化させるためには、*Ppp6c* 遺伝子の発現制御および PP6 活性制御機構の詳細な解析が必要になると考える。

7. 結論

プロテインホスファターゼ 6 の触媒サブユニットが、紫外線による皮膚扁平上皮癌の、がん抑制遺伝子であることを示す結果を得た。この遺伝子産物の発がん抑制メカニズムを明らかにする事は、紫外線誘発がんの予防と治療開発への重要な手がかりとなると考える。

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、ご協力をいただきました、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、宮城県立がんセンター臨床検査技術部のスタッフの皆様、宮城県立循環器・呼吸器病センター臨床検査技術部のスタッフの皆様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。

最後に、今日に至るまで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様に心から感謝いたします。

9. 文献

1. Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 2009; 139: 468-484.
2. Brautigan DL. Protein Ser/Thr phosphatases the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J* 2013; 280: 324-345.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Stefansson B, Brautigan DL. Protein phosphatase PP6 N terminal domain restricts G1 to S phase progression in human cancer cells. *Cell Cycle*. 2007; 6: 1386-1392.
9. 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.
10. Zeng K, Bastos RN, Barr FA, Gruneberg U. Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J Cell Biol*. 2010; 191:1315-1332.

11. Hammond D, Zeng K, Espert A, Bastos RN, Baron RD, Gruneberg U, Barr FA. 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.
12. 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; 4: e4395.
13. Hosing AS, Valerie NC, Dziegielewska J, Brautigan DL, Larner JM. PP6 regulatory subunit R1 is bidentate anchor for targeting protein phosphatase-6 to DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2012; 287: 9230-9239.
14. 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.
15. Stefansson B, Brautigan DL. Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets I κ B ϵ . *J Biol Chem* 2006; 281: 22624-22634.
16. Kajino T, Ren H, Iemura S, Natsume T, Stefansson B, Brautigan DL et al. Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem* 2006; 281: 39891-39896.
17. Douglas P, Moorhead G, Xu X, Lees-Miller S. Choreographing the DNA damage response: PP6 joins the dance. *Cell Cycle.* 2010; 9: 1221-1222.
18. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; 44: 1006-1014.
19. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; 150: 251-263.
20. Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat Protoc* 2009; 4: 1350-1362.
21. Rundhaug JE, Fischer SM. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. *Cancers (Basel).* 2010; 2: 436-482.

22. 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, Shima H. Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA. *Oncogene*. in press doi: 10.1038/onc.2014.398.
23. Viros A, Sanchez-Laorden B, Pedersen M, Furney SJ, Rae J, Hogan K, Ejima S, Girotti MR, Cook M, Dhomen N, Marais R. Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature*. 2014; 511: 478-482.
24. Missero C, Antonini D. Crosstalk among p53 family members in cutaneous carcinoma. *Exp Dermatol*. 2014; 23: 143-146.S.
25. Ikehata H, Okuyama R, Ogawa E, Nakamura S, Usami A, Mori T, Tanaka K, Aiba S, Ono T. Influences of p53 deficiency on the apoptotic response, DNA damage removal and mutagenesis in UVB-exposed mouse skin. *Mutagenesis* vol. 25 no. 4 pp. 397–405
26. Yasuhiro Matsumura. Angus M. Moodycliffet, Dat X. Nghiem',Stephen E. Ullrich' and Honnavara N. Ananthaswamy. Inverse relationship between increased apoptosis and decreased skin cancer in UV-irradiated CD1d^{-/-} Mice. *Photochemistry and Photobiology*, 2005, 81 : 46-51
27. Allal Ouhtit, Alexander Gorny, H. Konrad Muller,Laurie L. Hill, Laurie Owen-Schaub, and Honnavara N. Ananthaswamy Loss of Fas-Ligand Expression in Mouse Keratinocytes during UV Carcinogenesis *American Journal of Pathology*, Vol. 157, No. 6, December 2000
28. Ouhtit A, Muller HK, Davis DW, Ullrich SE, McConkey D, Ananthaswamy HN. Temporal events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. *Am J Pathol*. 2000; 156: 201-207.
29. Vasioukhin V, Degenstein L, Wise B, Fuchs E. The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 8551-8556.
30. Kawasumi M, Lemos B, Bradner JE, Thibodeau R, Kim YS, Schmidt M, Higgins E, Koo SW, Angle-Zahn A, Chen A, Levine D, Nguyen L, Heffernan TP, Longo I, Mandinova A, Lu YP, Conney AH, Nghiem P. Protection from UV-induced skin carcinogenesis by

genetic inhibition of the ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 16;108(33):13716-21. doi: 10.1073/pnas.1111378108. Epub 2011 Aug 15.

31. Yogiarti F, Kunisada M, Ono R, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nishigori C. Skin tumours induced by narrowband UVB have higher frequency of p53 mutations than tumours induced by broadband UVB independent of Ogg1 genotype. *Mutagenesis*. 2012; 27: 637-643.
32. Melnikova VO, Ananthaswamy HN. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat Res*. 2005; 571: 91-106.
33. Kitajima T, Iwashiro M, Kuribayashi K, Imamura S. Effect of parent genetic background on latency and antigenicity of UV-induced tumors originating in F1 hybrids. *Exp Dermatol*. 1995 Feb;4(1):42-5.
34. Fujiki H, Suganuma. Tumor promoters-microcystin-LR, nodularin and TNF- α and human cancer development. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11:4-18.

図表説明

図 1 プロテインホスファターゼ

タンパクのセリン、スレオニン、チロシン残基を、リン酸化するプロテインキナーゼ。タンパクのリン酸化セリン、スレオニン、チロシン残基を脱リン化するプロテインホスファターゼ。キナーゼ、ホスファターゼ、この2つの酵素は、表と裏のように、オン/オフを切り替えるスイッチとしての役目を果たしている。そして、多様な細胞機能を制御し、生存、増殖、分化、運動、接着、死などに関与している。

図 2 プロテインホスファターゼの分類

ホスファターゼは、タンパクのリン酸化セリン、スレオニンの脱リン酸化を行う PPP (セリン・スレオニンホスファターゼ) と、タンパクのリン酸化チロシンの脱リン酸化を行う PTP (チロシンホスファターゼ) と、両方の脱リン化を行う DSP (2 重特異性ホスファターゼ) に分けられる。PP6 は PPP ファミリーのなかの PP2A サブファミリーに分類される。

図 3 プロテインホスファターゼ 6 (PP6) の構造

PP6 は、触媒サブユニットである Catalytic domain (*Ppp6c*) と、調節サブユニットの SAPS domain (Sit4-associated protein subunit) と、ARS domain (ankyrin -repeat domain) の3つのサブユニットからなる、ヘテロ 3 量体を形成している。

図 4 *Ppp6c* 欠損マウスの腫瘍形成を促進する (DMBA/TPA、DMBA/OA 2 段階発がん実験)

(A) DMBA/TPA 2 段階発がん実験スケジュール

Ppp6c 欠損マウス (4HT+) とコントロールマウス (4HT-) に対して、DMBA (100 μ g/100ul アセトン) をイニシエーターとして用い、TPA (1 μ g/100ul アセトン) または OA (5 μ g/100ul アセトン) をプロモーターとして使用した時の 2 段階発がん実験のスケジュール。

(B) DMBA/TPA 2 段階発がん実験による腫瘍形成

Ppp6c 欠損マウス (4HT+) (n=8)、コントロールマウス 4HT- (n=6) を用いて、DMBA/TPA 2 段階発がん実験を行った。上は乳頭腫発生マウス割合 (%) を示す。下は 1 匹あたりの平均乳頭腫数を示す。

(C) DMBA/OA 2 段階発がん実験による腫瘍形成

Ppp6c 欠損マウス (4HT+) (n=11)、コントロールマウス (4HT-) (n=7) に対して、DMBA/OA 2 段階発がん実験を行った。上は乳頭腫発生マウス割合 (%) を示す。下は 1 匹あたりの平均乳頭腫数を示す。

図 5 *Ppp6c* 欠損マウスは腫瘍形成を促進する (DMBA 単独での発がん実験)

(A) DMBA 単独による発がんスケジュール

Ppp6c 欠損マウス (4HT+) とコントロールマウス (4HT-) の K14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox} マウスに対して、DMBA (100 μ g/100ul 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

Ppp6c 欠損マウス (4HT+) (n=15)、コントロールマウス (4HT-) (n=7) に対して、DMBA による発がん実験を実施した。上は乳頭腫形成マウス割合 (%) を示す。下は 1 匹あたり平均乳頭腫数を示す。

(C) DMBA 誘発乳頭腫の肉眼的観察

DMBA 投与から、20 週経過後に発生した乳頭腫を示す。

(D) DMBA 誘発乳頭腫 HE 染色

上記 (C) 腫瘍に対して、HE 染色を行った。対物レンズは、4 倍を用いた。スケールバーは 500 μ m を示す。

図 6 *Ppp6c* フロックスアレルの作成

Wild allele : マウス *Ppp6c* ゲノムの構造。Targeting vector : exon4 を囲んで loxp および neo 遺伝子を挿入した。Floxed *Ppp6c* allele : ES 細胞に Targeting vector をトランスフェクトし、相同組換え体を得た。

図 7 本実験に用いたマウス作成

Ppp6c^{flox/+} マウス同士を掛け合わせて *Ppp6c*^{flox/flox} マウスを作製後、K14-CreER^{tam} マウスと、かけ合わせて目的とする K14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox} マウスを作製した。

図 8 CreER^{tam} 活性化による *Ppp6c* 欠損誘導

(A) *Ppp6c*^{flox} アレルと、*Ppp6c*^Δ アレルの模式図。

4HT 投与により CreER は核内に移動し、遺伝子の組換えをおこす。a および b は、exon4 の欠損を検討する PCR の為に用いたプライマーの位置を示す。

(B) 皮膚から調製したゲノム DNA を用いた PCR 解析。

K14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox} マウス皮膚で、4HT 未処理 (レーン 1) または 4HT 処理 (レーン 2)、正常 C57BL/6 マウス皮膚 (レーン 3)、及び *Ppp6c*^{flox/-} マウス皮膚 (レーン 4)。796 bp および 275 bp のフラグメントは、それぞれ、*Ppp6c*^{flox} アレルと、*Ppp6c*^Δ アレル由来の PCR フラグメントである。

図 9 UVB は、*Ppp6c* 欠損マウス皮膚において高率に腫瘍発生を起こす

(A) UVB 誘発発癌のスケジュール。K14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox} マウスは剃毛し、2 グループに分けた。1 つのグループには、前処置として、4HT 投与を 5 日連続投与、コントロールのグループは、アセトンのみを投与した。最終 4HT 処理の 3 日後から UVB 照射を開始した。UVB は 1 回に 2 KJ/m² の用量で、週に 3 回、40 週にわたって照射した。

(B) *Ppp6c* 欠損皮膚では、腫瘍は、約 30 週で出現し、40 週で 14 マウス中 11 マウスが腫瘍を形成 (80%) した。総腫瘍数は、17 であった。

図 10 UVB 誘発皮膚扁平上皮癌の病理学的解析

(A) *Ppp6c* 欠損マウス皮膚で得られた皮膚扁平上皮癌(表 1 tumor No. 14)の肉眼的所見(黄矢印)

(B) 腫瘍(図 3A) のヘマトキシリンエオジン染色(右上、左下は拡大像。対物レンズは右上 10 倍、左下 40 倍)

(C) 免疫組織化学染色(抗 Ki67 抗体)(対物 10 倍)。

図 11 *Ppp6c* 欠損皮膚において、UVB 誘導 p53 および p21 発現が増強する

(A) 8 週齢の K14-CreER^{tam}; *Ppp6c*^{flox/flox} マウスを、図 9 で記したように、2 群に分けて前処理を行い、UVB 照射(2 KJ /m²)を 1 回行った。その後、記載された時間で、皮膚サンプルを調整し、抗 p53 抗体または抗 p21 抗体を用いて、免疫組織染色を行った。4 つの独立した実験からの代表的なデータを提示する。

(B) A において、枠で囲まれた画像を拡大して提示する。p53 陽性および p21 陽性細胞を矢印で示す。

(C) UVB 照射後の出現する p53 または p21 陽性細胞の割合。B で得られたサンプルで、5 つの異なる視野において、100 ケラチノサイトにおける p53 または p21 陽性細胞を計数し、その平均値を求めた。データは、4 匹のマウスを用いた実験の平均値±SE で表す。

図 12 *Ppp6c* 欠損皮膚では UVB 誘導アポトーシス関連タンパクの発現上昇が増強する

図 9 で記したように、2 群に分けて前処理を行い、UVB 照射(2 KJ /m²)を 1 回行った後、記載した時間毎に皮膚組織を切除し、その細胞抽出液を用いてウェスタンブロット解析を行った。1 次抗体として、抗 p53 抗体、抗 PUMA 抗体、抗 Bax 抗体、抗 cleaved caspase3 抗体、および抗 α tubulin 抗体を用いた。3 つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

図 13 *Ppp6c* 欠損皮膚における UVB 誘発皮膚扁平上皮癌における p53 と γ H2AX の同定

UVB 照射 40 週間後に皮膚扁平上皮癌と診断された腫瘍(表 1 tumor No. 8)の肉眼的画像(上)。同じ腫瘍における p53 (中央) と γ H2AX (下) の免疫組織染色を示す。

図 14 UVB による正常な p53 シグナル伝達経路

UVB により DNA ダメージがおこると ATM/ATR 経路により p53 がリン酸化され、p21 を経由して DNA 修復や細胞増殖停止、PUMA, Bax を経由してアポトーシスがおきる。

図 15 なぜ、p53 の活性化(タンパク量の増大)が促進されるのか?

Ppp6c 欠損細胞に対して、UVB を照射することにより、コントロールマウスに比較して、p53 の過剰なリン酸化が引き起こされる。

図 16 仮説 1 : DNA 修復異常

Ppp6c 欠損細胞で、損傷 DNA 修復異常があれば、DSB が蓄積する。それにより ATM、ATR、および CHK2 が過剰な活性化がおこる。

図 17 仮説 2 : ATM/ATR または CHK2 が PP6 の基質である可能性

ATM、ATR、または CHK2 が PP6 機能不全により、過剰な活性化がおこる。

図 18 仮説 3 : p53 が PP6 の基質である可能性

PP6 の機能不全で p53 の N 末端の過剰な活性化が起こり、そのため、ユビキチンリガーゼ MDM2 が結合できず、p53 が安定化する。

図 19 仮説 4 : MDM2 が PP6 の基質である可能性

MDM2 は ATM により、リン酸化されるサイトがある。そのリン酸化は、MDM の機能を阻害することが知られている。PP6 の機能不全で、MDM のこのサイトが、過剰にリン酸化されることで、MDM2 を不活性型に保ち、結果として、p53 の蓄積が起こる。

図 20 なぜ、反復 UVB 照射により、*Ppp6c* 欠損ケラチノサイトで、SCC が発生しやすくなるのか？

CPDs や 6-4PPs ができることにより、DNA 複製阻害をおこし、さらに p53 変異ができたり、DSB ができる。CPDs や 6-4PPs は、DNA の複製を阻害するばかりでなく、複製が阻害された場所において DSB を生じさせる。CPDs は NER で複製されることから、NER が PP6 により制御されるか否かが、重要な課題となる。

Fig.1

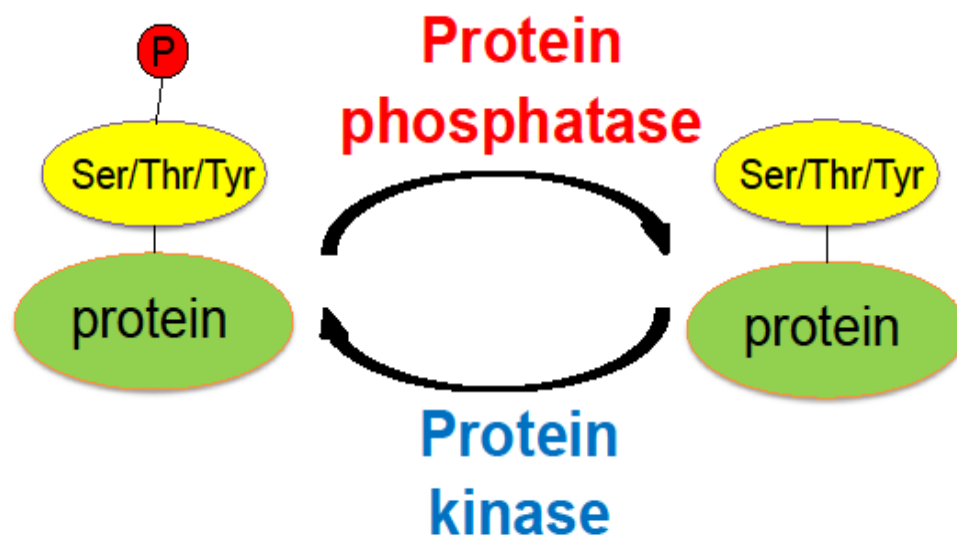


Fig.2

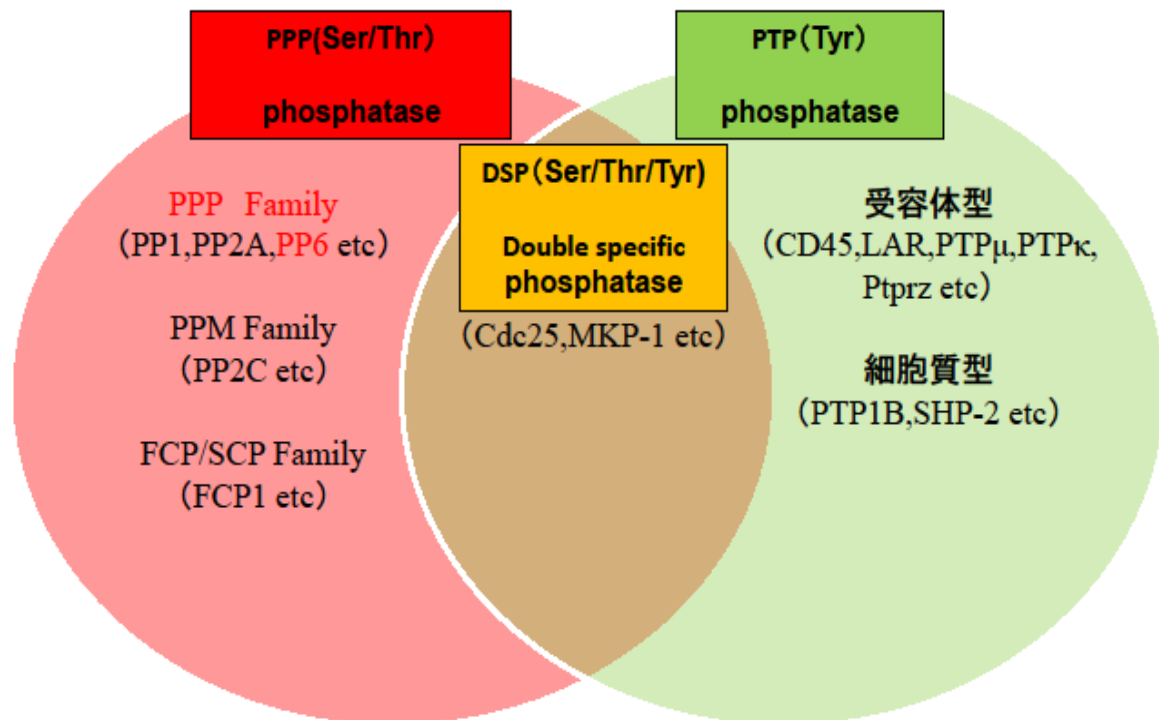
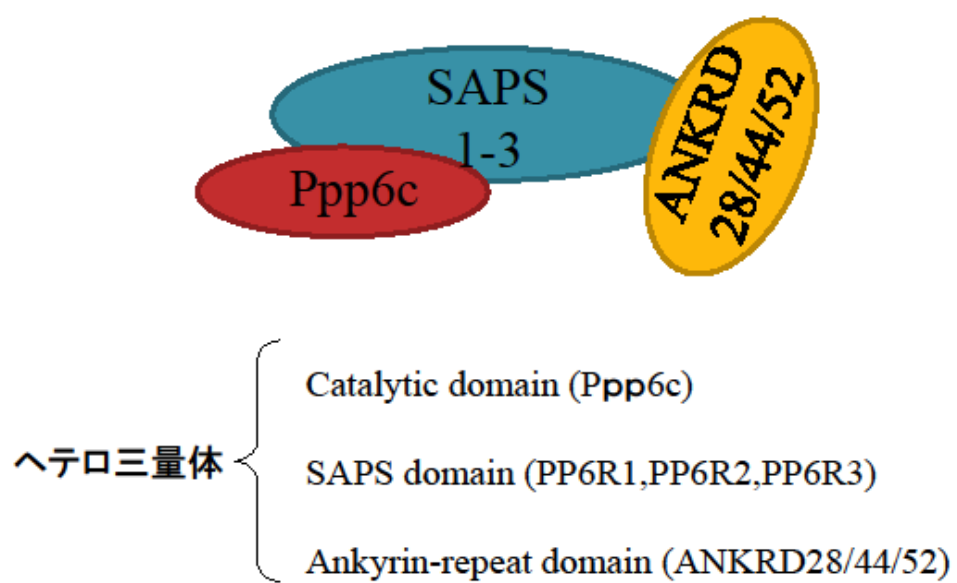
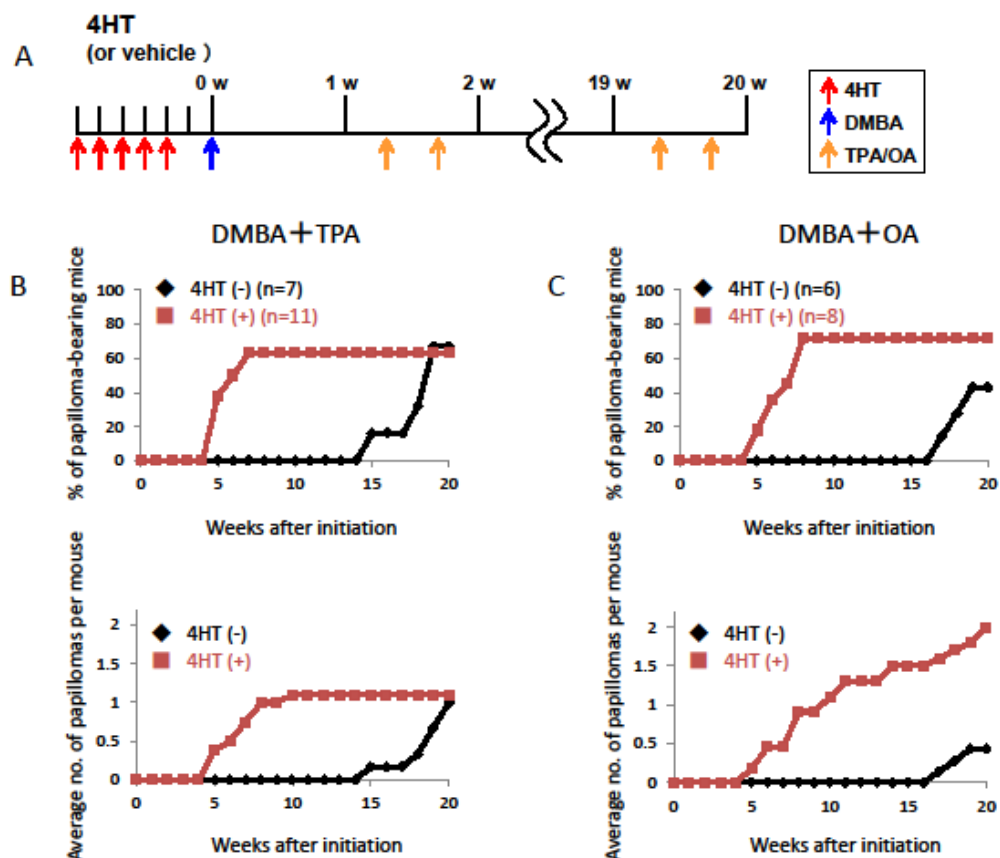


Fig.3



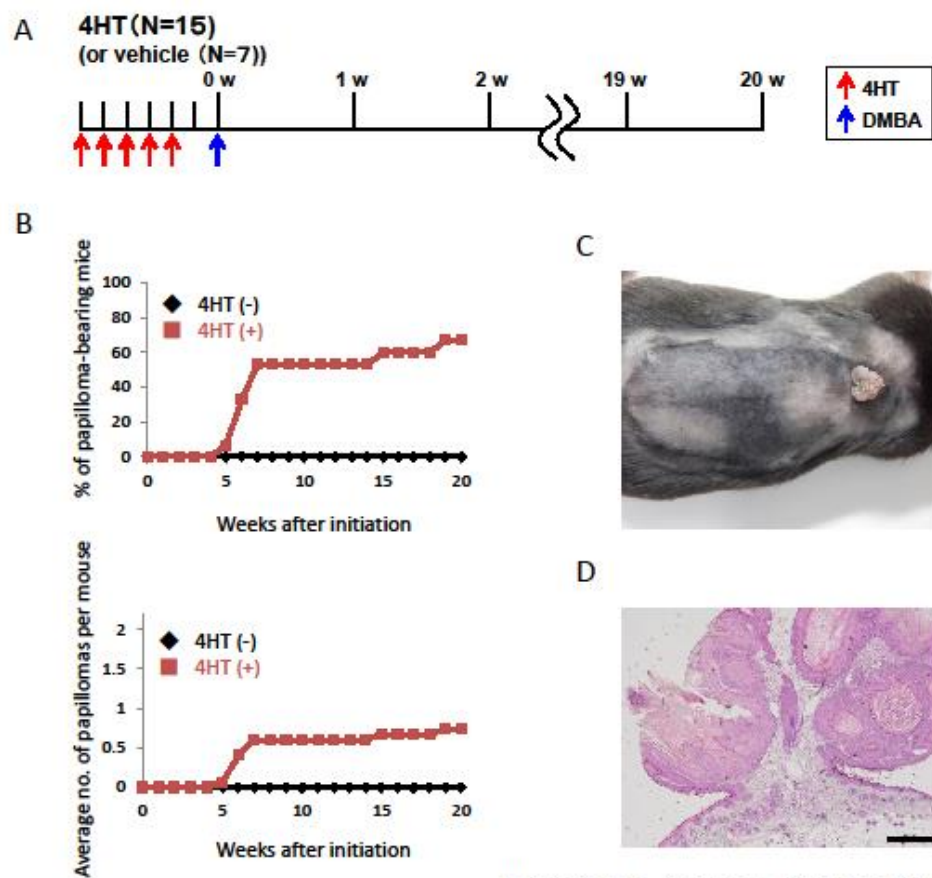
(Zeng et al . J Cell Biol. 2010; 191:1315-1332..)

Fig.4



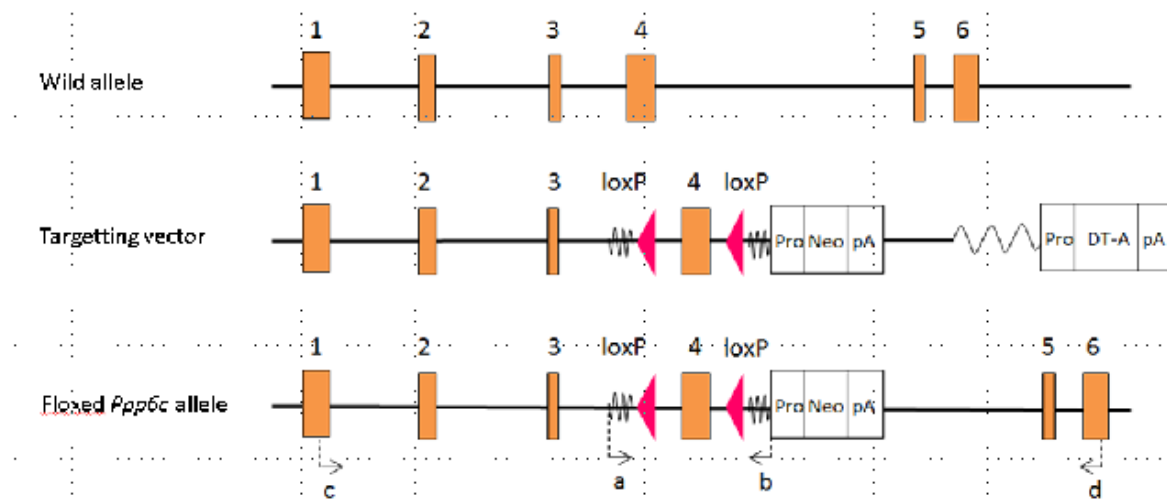
(Hayashi et al. Oncogene. 2014 Dec 8;0. doi: 10.1038/onc.2014.398.)

Fig.5



(Hayashi et al . Oncogene. 2014 Dec 8;0. doi: 10.1038/onc.2014.398.)

Fig.6



(Hayashi et al . Oncogene. 2014 Dec 8;0. doi: 10.1038/onc.2014.398.)

Fig.7

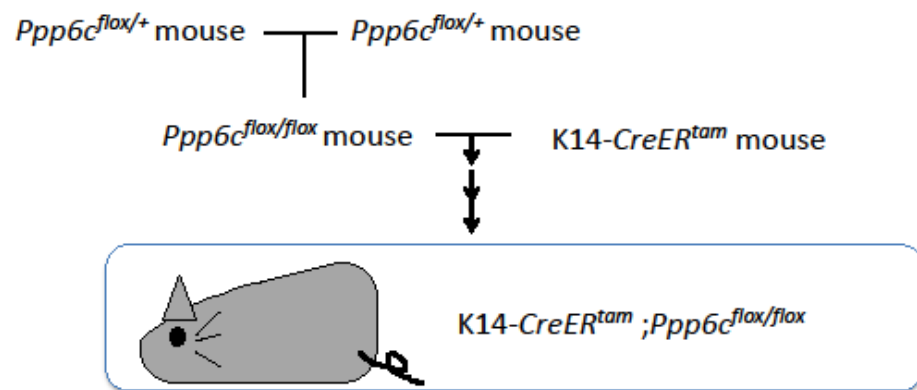


Fig.8

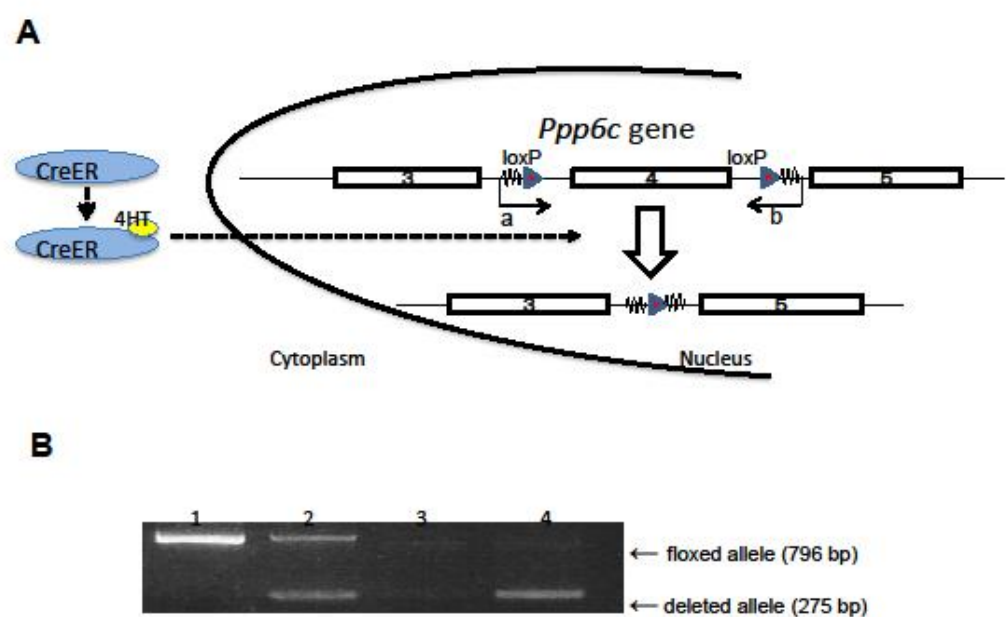


Fig.9

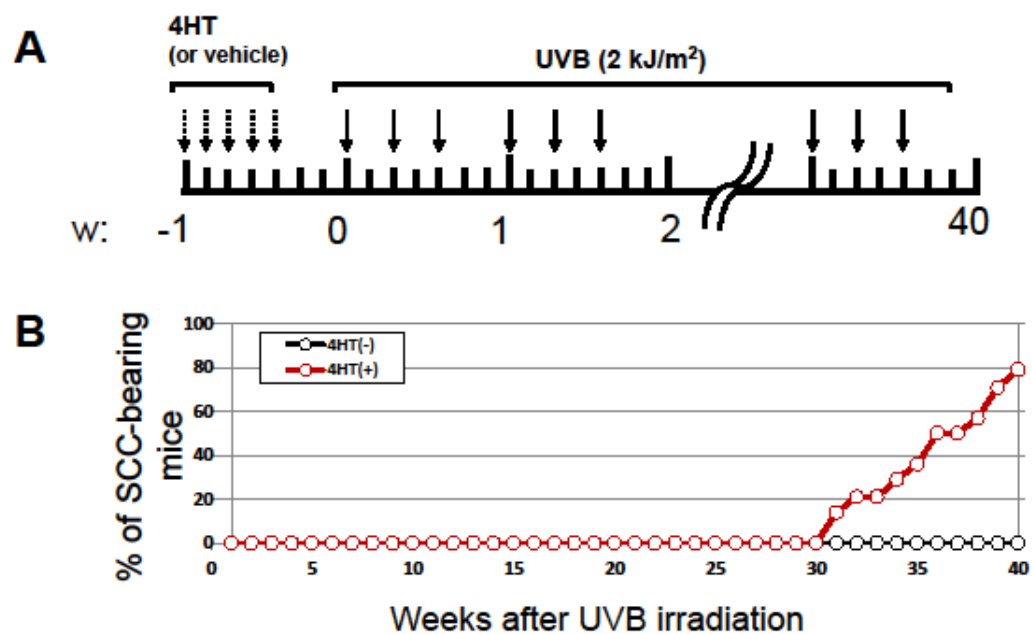


Fig.10

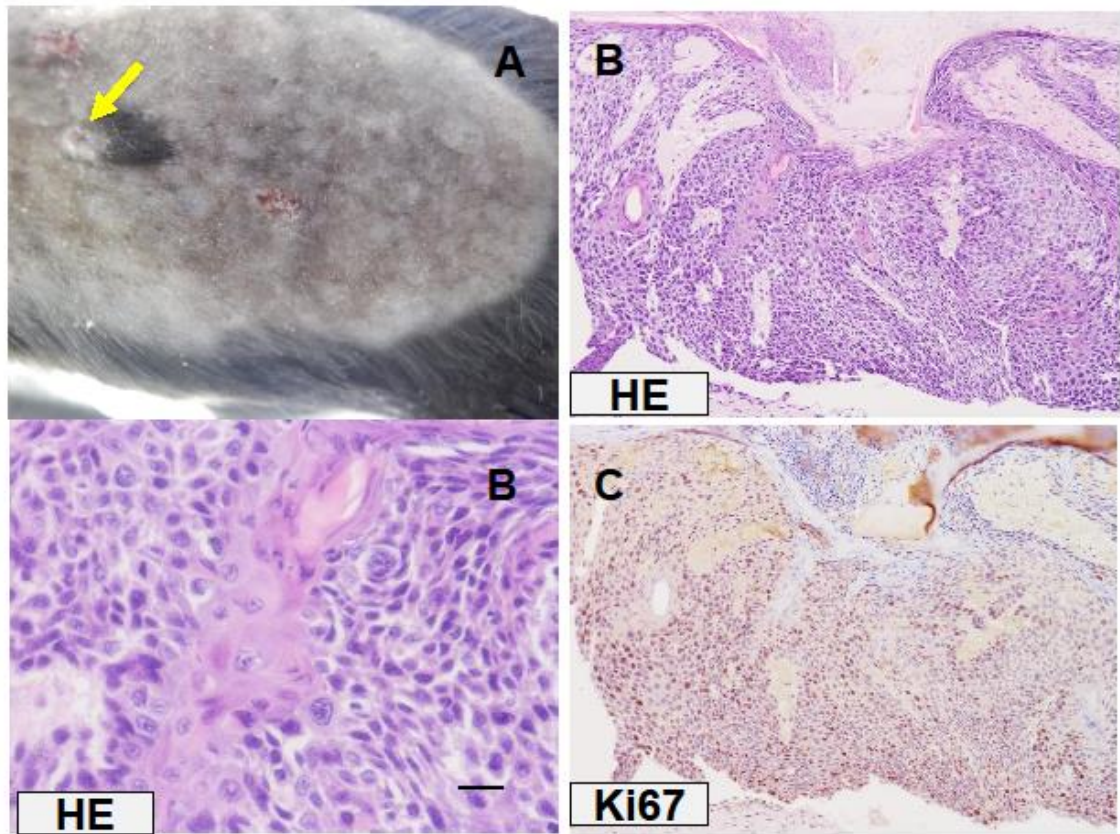


Fig. 11

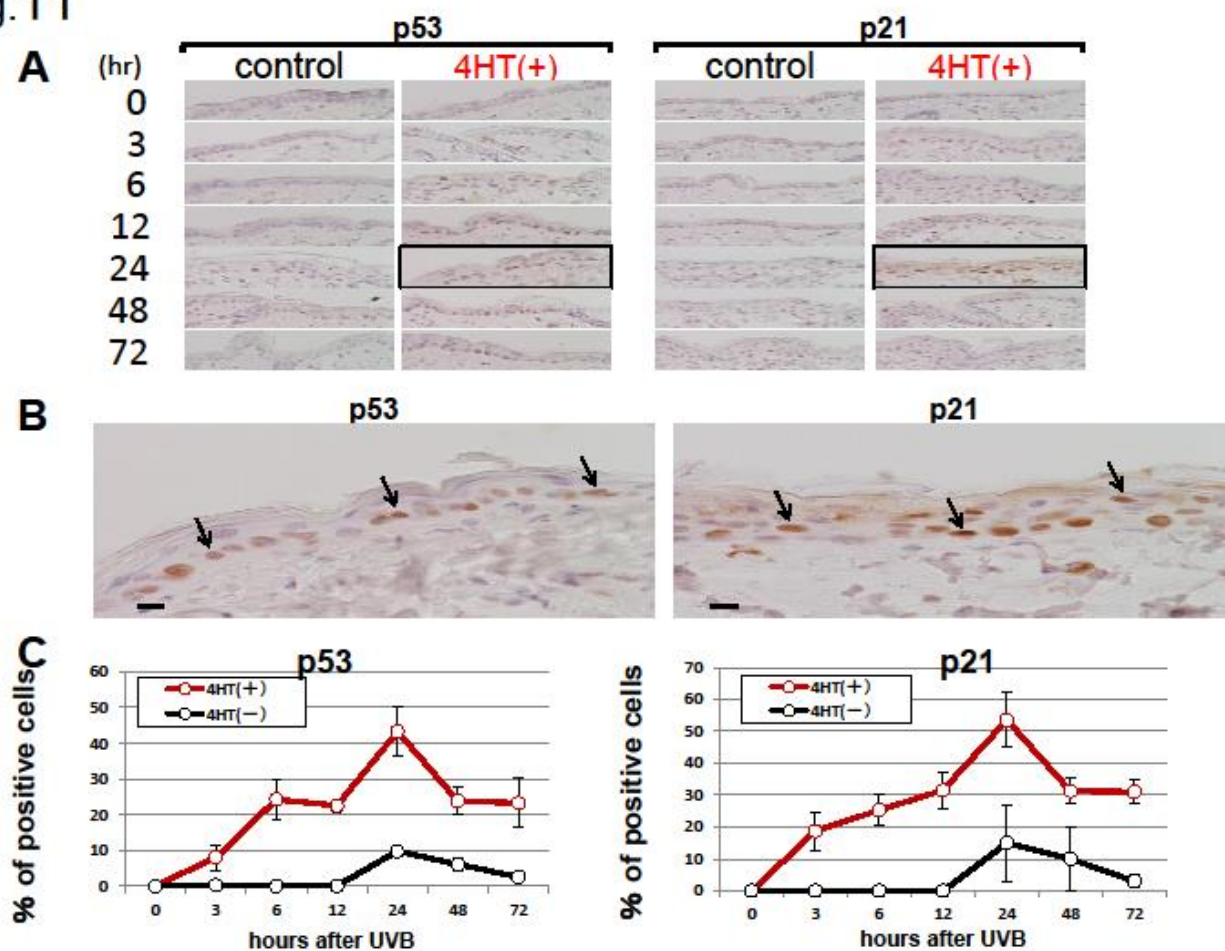


Fig.12

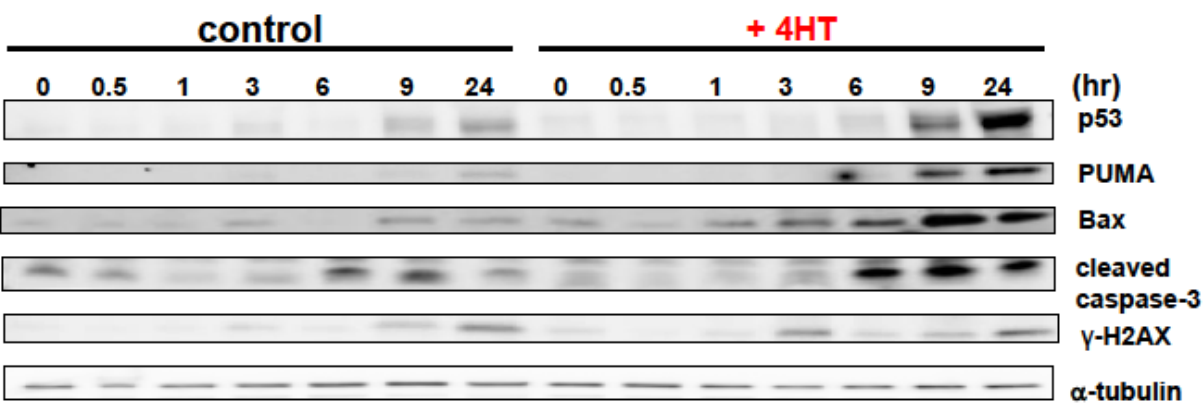


Fig.13

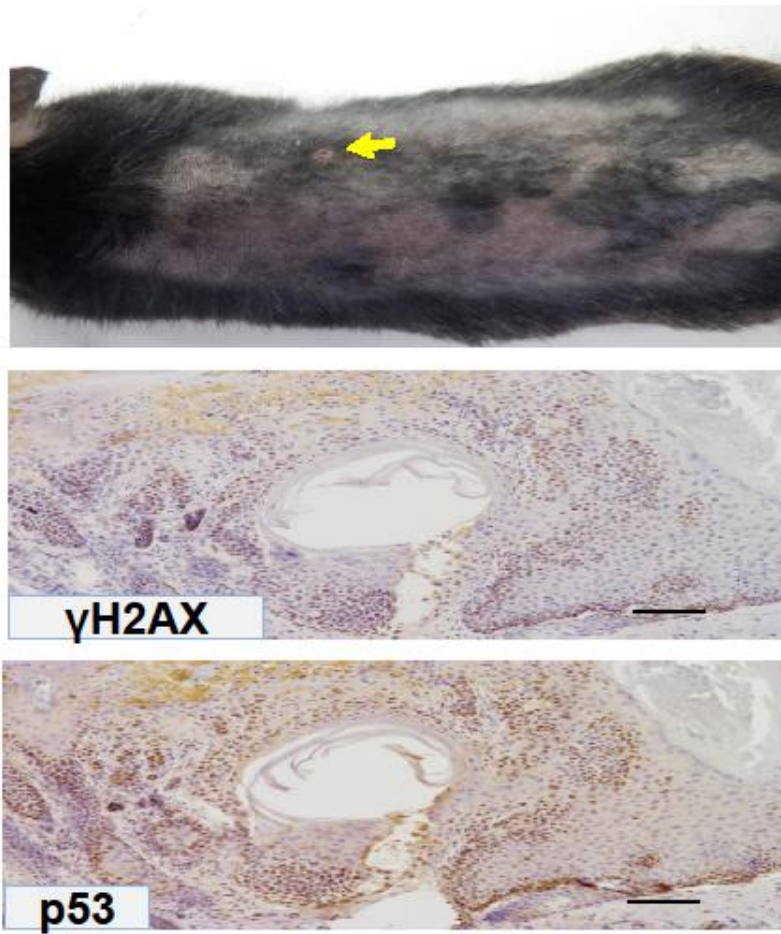


Fig.14

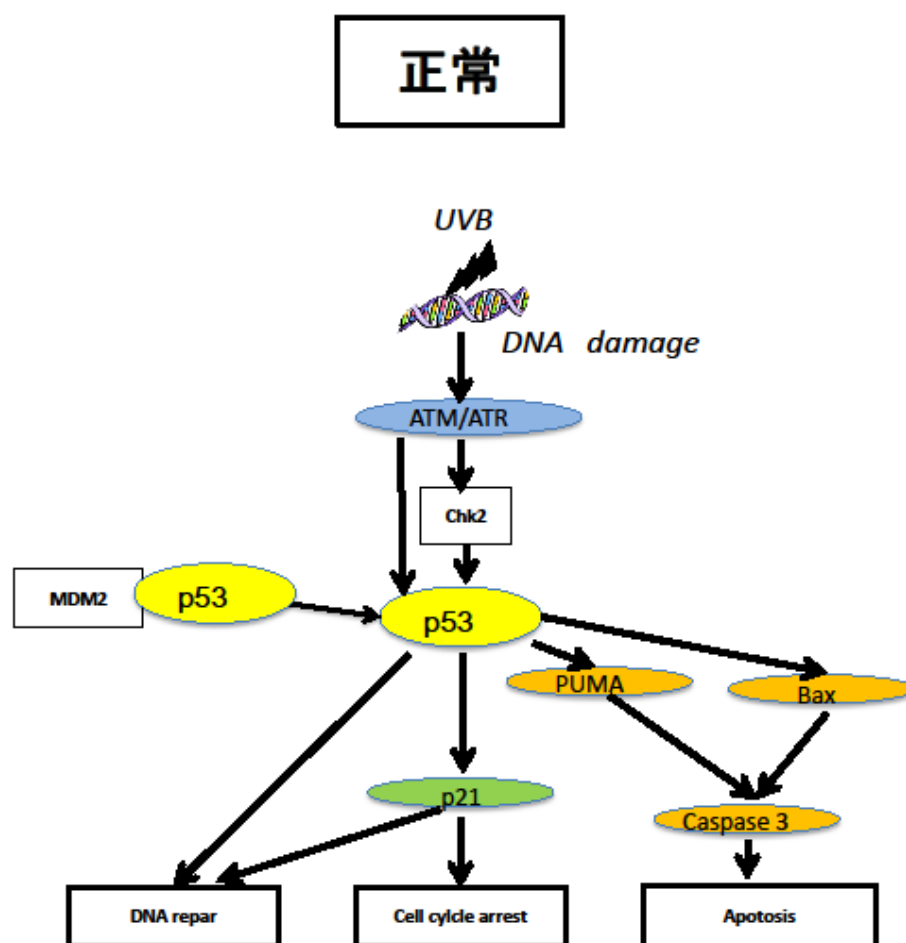


Fig.15

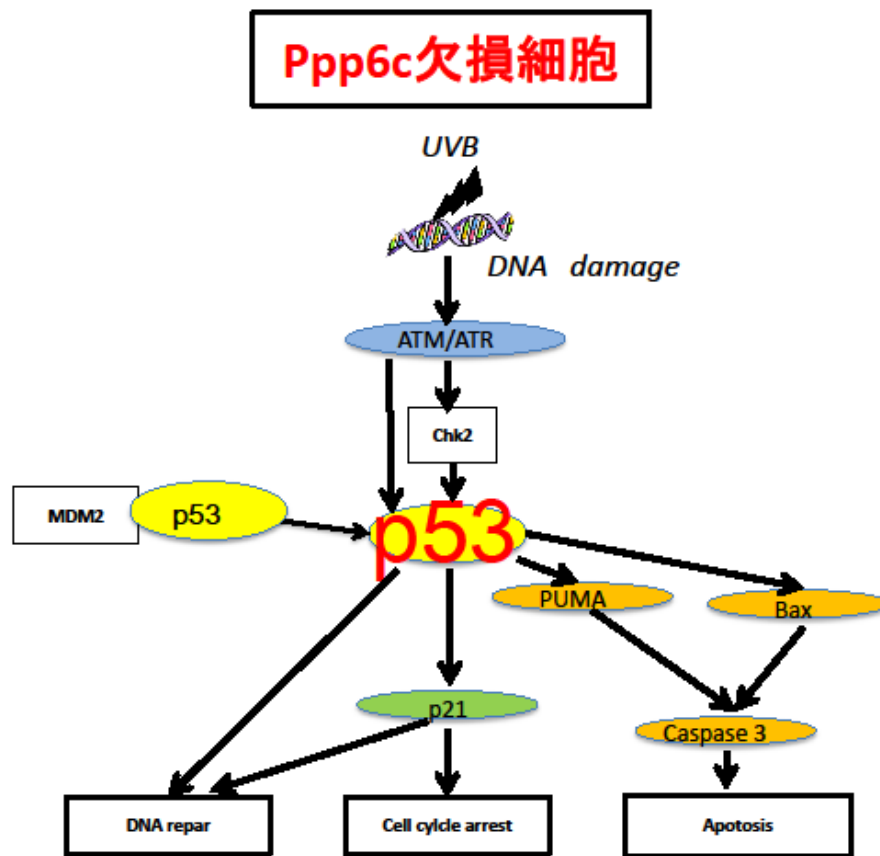


Fig.16

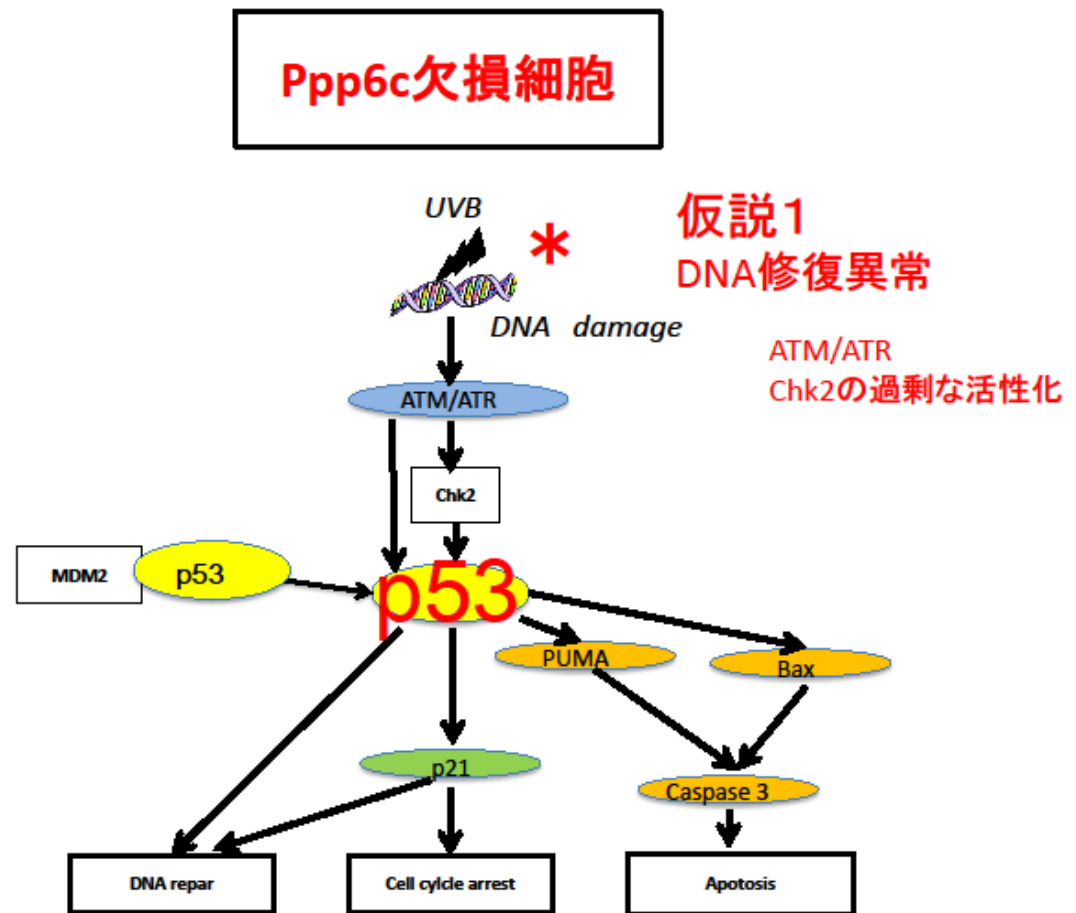


Fig.17

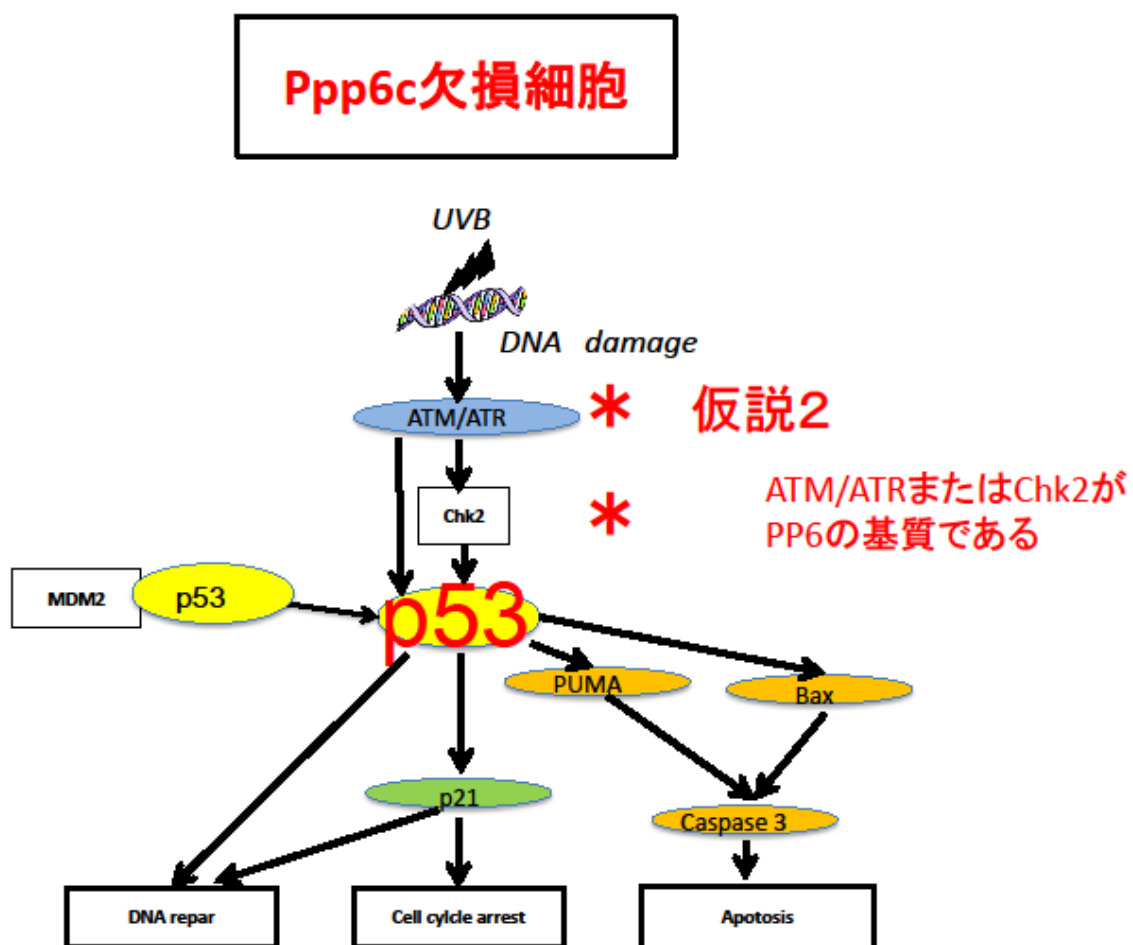


Fig.18

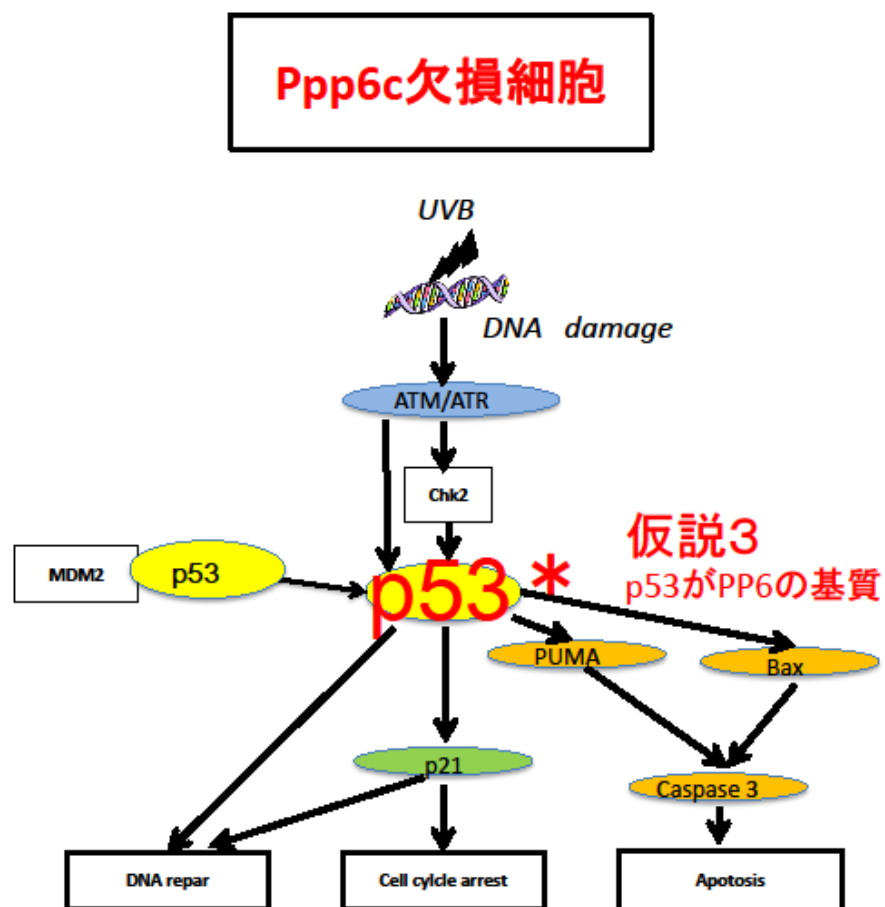


Fig.19

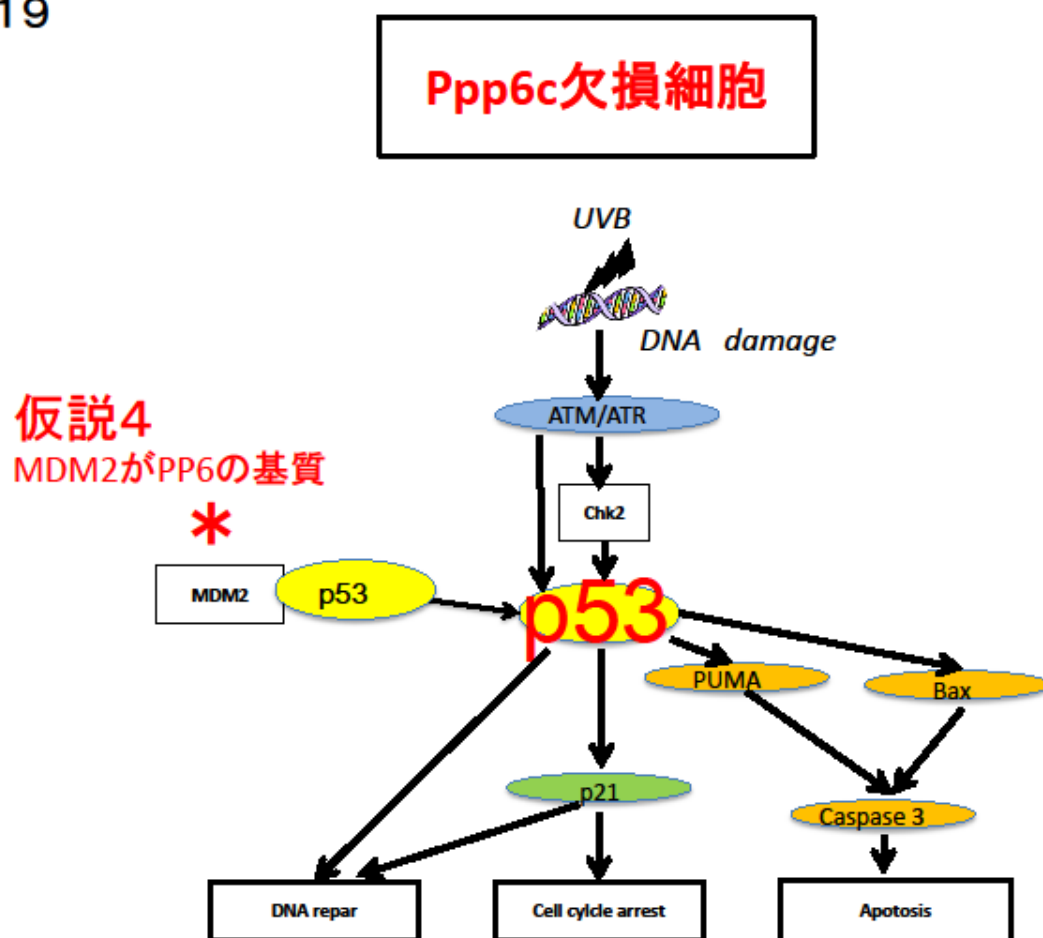


Fig.20

なぜ、反復UVB照射により、Ppp6c欠損ケラチノサイトで、SCCが発生しやすくなるのか？

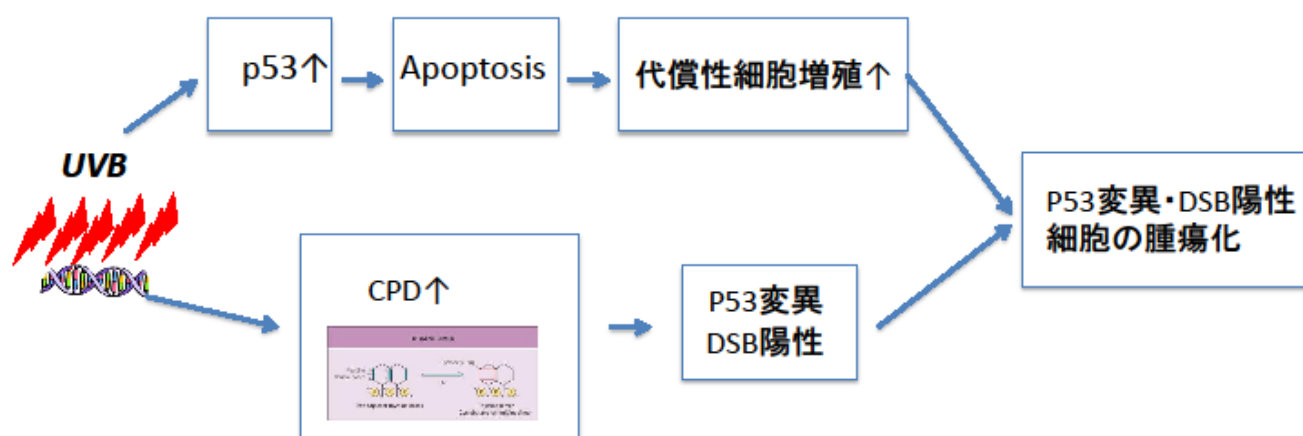


Table.1

mouse ID	tumor	tumor No.	Histology	γ H2AX	p53
1	2	1-1	SCC	+	+
		1-2	SCC	+	+
2	1	2	SCC	-	+
3	0				
4	1	4	SCC	++	+
5	1	5	SCC	-	-
6	1	6	SCC	-	-
7	0				
8	1	8	SCC	+	++
9	2	9-1	SCC	++	++
		9-2	SCC	++	+
10	2	10-1	SCC	-	-
		10-2	SCC	+	-
11	2	11-1	SCC	-	-
		11-2	SCC	++	++
12	0				
13	1	13	SCC	-	-
14	3	14-1	SCC	++	+
		14-2	SCC	++	++
		14-3	SCC	-	-

Tumor cell immunopositivity was assigned three possible scores based on anti-p53 and anti- γ H2AX staining. +, ++, or - indicate that, respectively, 5-60%, >60%, or <5% of cells were positive for the indicated stain.