

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 藤原 信行

題 目 : Type 2A protein phosphatase を標的とした抗がん戦略構築に向けた基礎的研究

論文要旨 :

**【背景・目的】** Ser/Thr 残基の脱リン酸化を担う酵素である type 2A protein phosphatase には PP2A、PP4、PP6 が属する。PP2A は細胞周期の制御、アポトーシス、細胞分化の調節など多岐にわたる細胞機能を制御しており、PP2A の機能異常は、がんをはじめ様々な疾患の発症に関与する。がんにおいて、PP2A は重要ながん抑制因子として働き、ほとんどのがんで PP2A 阻害タンパク質の増加などを原因とした PP2A 活性の低下が観察される。しかし、PP2A 活性の低下が、がんの発症や悪性化に寄与する分子機構については、十分に理解されていない。近年、がん細胞において低下した PP2A 活性を回復させることで、抗がん効果が得られることが明らかになってきている。PP2A の阻害タンパク質の一つである SET は、PP2A に直接結合してその活性を抑制し、がんの悪性化機構の一つとして重要な役割を果たす。人医療においては、様々な腫瘍で SET 発現の上昇が認められ、SET 標的薬が抗がん効果を示すことが報告されており、抗がん剤開発の標的としての SET の有用性を強く示唆している。一方獣医療分野では、イヌの腫瘍における SET の発現やその役割、SET 標的薬の抗がん効果に関する情報は全くない。

PP6 は細胞周期の調節、DNA 修復の制御、炎症反応の制御などに関与する。近年、グリオーマで PP6 の発現量と予後に負の相関関係があること、悪性黒色腫において PP6 に高頻度で不活性変異が認められることなどが相次いで報告され、PP6 が、がんの発生や悪性化に関与していることが示唆された。しかし、がんにおける PP6 の役割とその分子機構、PP6 自体の制御機構についての情報は極めて少ない。

一方、オートファジーは進化的に保存された細胞内たんぱく質分解機構であり、細胞を様々なストレスから保護することや傷害を受けたミトコンドリアや核などの細胞内小器官、ユビキチン化された細胞内タンパク質のクリアランスに寄与している。オートファジー機構の異常は、がんや神経変性疾患など様々な疾患に関与している。Beclin 1 はオートファジー誘導に必須の因子であり、その機能は可逆的なリン酸化により制御されているが、Beclin 1 の脱リン酸化制御機構に関する報告は全くない。

以上のような背景のもと、本研究では、がんにおける type2A protein phosphatase の役割と治療標的としての可能性を明らかにするため、特にオートファジー制御機構に着目し、①イヌ T 細胞性リンパ腫に対する SET 標的薬 OP449 の抗がん効果、②PP2A によるオートファジー制御機構、③PP6 によるオートファジー制御機構、の3つの研究を行った。

**【結果・考察】** ①の研究では、各種イヌリンパ腫細胞株を用いて SET のタンパク質発現量を比較したところ、8 細胞株中 7 細胞株で SET 発現量が顕著に増加していることが認められた。SET 標的薬 OP449 は SET 高発現細胞特異的に PP2A 活性を回復させ、アポトーシスを誘導すること

が認められた。これらの結果から、イヌの抗がん戦略において SET が有力な標的となることが示唆された。

②の研究では、Beclin 1 の脱リン酸化を担うホスファターゼを明らかにするため、各種ホスファターゼ阻害剤で細胞を処置し、Beclin 1 のリン酸化レベルを検討した。また、Type2A protein phosphatase の阻害により Beclin 1 の Ser90 がリン酸化されることを同定し、そのリン酸化特異的な抗体を作製した。この抗体を用いた検討から、Beclin 1 Ser90 は飢餓刺激によりリン酸化され、Beclin 1 Ser90 のリン酸化によりオートファジーが誘導されることを発見した。さらに、各種キナーゼ阻害剤や活性化剤を用いた検討から、Beclin 1 Ser90 リン酸化における責任キナーゼとして DAPK3 を同定した。以上の結果から、PP2A が Beclin 1 Ser90 を脱リン酸化しオートファジーを抑制していること、DAPK3 は Beclin 1 Ser90 をリン酸化することでオートファジーを促進していることを明らかにした。

③の研究では、ここまでの結果より type 2A protein phosphatase がオートファジーを抑制していることが明らかとなったことから、オートファジーの type 2A protein phosphatase 分解への関与について検討した。オートファジーの分解を阻害剤やオートファジー関連因子の欠損などで抑制したところ、PP2A や PP4 のタンパク質発現量に変化はなく、PP6 タンパク質発現量の増加が認められた。さらに、飢餓刺激によりオートファジーを誘導したところ、PP6 発現量の減少が細胞レベルのみならず、個体レベルでも確認された。さらに、胃がんモデルの GANマウスを用いた検討から、腫瘍部ではオートファジーが抑制され、PP6 の発現が上昇していることが認められた。そこで、PP6 がオートファジーにより分解されるメカニズムを検討したところ、オートファジー分解に関与する p62 と PP6 が結合すること、p62 の発現抑制により PP6 の分解が阻害されることが認められた。反対に、PP6 がオートファジーに与える影響を検討したところ、PP6 の発現抑制や欠損によりオートファジーが誘導されることが認められた。さらにそのメカニズムとして、オートファジー誘導に関与する Beclin 1-VPS34 複合体を、PP6 が解離させることが明らかとなった。以上の結果より、PP6 とオートファジーは双方向性に制御していることが示唆された。

本研究では、PP2A がターゲットする新規基質として Beclin 1 Ser90 を同定し、PP2A の機能不全が、がんの悪性化を引き起こす分子機構の一端として、オートファジー活性の亢進が関与していることを明らかとした。SET 標的薬の抗がん効果の作用機序の一部には、PP2A 活性の回復による Beclin 1 Ser90 脱リン酸化と、それにとまうオートファジーの抑制が関与している可能性も示した。また、PP6 は PP2A とは異なり、酵素活性非依存的に Beclin 1 の機能を阻害してオートファジーを抑制していることが明らかとなった。さらに、がんにおいて認められる PP6 発現の上昇や変異は、オートファジー不全につながると考えられ、がんの発生に寄与している可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	藤原 信行
審査委員	主査：山口大学・教授・佐藤晃一
	副査：鳥取大学・教授・太田利男
	副査：鹿児島大学・教授・宮本篤
	副査：山口大学・教授・水野拓也
	副査：山口大学・准教授・大瀨剛
題目	Type 2A protein phosphatase を標的とした抗がん戦略構築に向けた基礎的研究
<p>審査結果の要旨：</p> <p>Type 2A 脱リン酸化酵素である PP2A および PP6 は、様々な細胞機能に関与しており、PP2A は細胞周期やアポトーシスなどを、PP6 は DNA 修復や炎症反応などを制御している。病態においては、PP2A は重要ながん抑制因子として働いており、ほとんどのがんで PP2A 阻害タンパク質の増加などを原因とした PP2A 活性の低下が観察される。PP2A の阻害タンパク質の一つである SET は、PP2A に結合してその活性を抑制し、がんの悪性化機構の一つとして重要な役割を果たす。人医療においては、抗がん剤開発の標的としての SET の有用性が強く示唆されているが、獣医療分野では SET の発現やその役割、SET 標的薬の抗がん効果に関する情報は全くない。PP6 はグリオーマで発現量と予後に負の相関関係があるなど、がんの発生や悪性化に関与していることが示唆されている。しかし、がんにおける PP6 の役割とその分子機構、PP6 自体の制御機構についての情報は極めて少ない。一方、オートファジーは重要な細胞内たんぱく質分解機構であり、ストレスからの細胞保護や異常タンパク質のクリアランスに寄与しており、オートファジー異常は、がんや神経変性疾患など各種疾患に関与している。Beclin 1 はオートファジー誘導に必須の因子であり、その機能は可逆的なリン酸化により制御されているが、Beclin 1 の脱リン酸化制御機構に関する報告は全くない。以上のような背景のもと、本研究では、がんにおける PP2A と PP6 の役割ならびに治療標的としての可能性を明らかにするため、特にオートファジー制御機構に着目して実験を行った。</p> <p>第 2 章では、イヌ T 細胞性リンパ腫に対する SET 標的薬 OP449 の抗がん効果を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、イヌリンパ腫細胞株で SET 発現量が増加しており、OP449 が PP2A 活性を回復させ、アポトーシスを誘導することを明らかとした。これらの結果から、イヌの抗がん戦略において SET が有力な標的となることが示唆された。</p>	

第 3 章では、PP2A によるオートファジー制御機構の解明を目的に研究を行った。その結果、PP2A の阻害によりオートファジー誘導因子である Beclin 1 の Ser90 がリン酸化されることを同定した。また、Ser90 リン酸化特異的抗体を作製し、Ser90 のリン酸化によりオートファジーが誘導されることを発見した。さらに、Ser90 リン酸化の責任キナーゼとして DAPK3 を同定した。以上の結果から、PP2A が Beclin 1 Ser90 を脱リン酸化しオートファジーを抑制していること、DAPK3 は Beclin 1 Ser90 をリン酸化することでオートファジーを促進していることを明らかにした。

第 4 章では、PP6 によるオートファジー制御機構について検討した。オートファジーの阻害により PP6 タンパク質発現量の増加が認められ、飢餓刺激によるオートファジー誘導により PP6 発現量が減少することを、細胞レベルと個体レベルで明らかとした。さらに、胃がんモデルマウスを用いて、腫瘍部ではオートファジーが抑制され PP6 の発現が上昇していることを発見した。また、PP6 がオートファジーにより分解されるメカニズムを検討し、PP6 が選択的オートファジー分解に関与する p62 と結合すること、p62 の発現抑制により PP6 の分解が阻害されることを発見した。さらに、オートファジー誘導に関与する Beclin 1-VPS34 複合体を PP6 が解離させることを明らかとし、PP6 とオートファジーは双方向性に制御していることが示唆された。

このように本研究では、PP2A のターゲット基質として Beclin 1 Ser90 を同定し、がんの悪性化を引き起こす分子機構としてオートファジー活性の亢進が関与していることを明らかとした。また、SET 標的薬の抗がん効果の作用機序には、PP2A 活性の回復による Beclin 1 Ser90 脱リン酸化とオートファジーの抑制が関与している可能性を示した。一方、PP6 は酵素活性非依存的に Beclin 1 を阻害してオートファジーを抑制していることを明らかとした。さらに、PP6 発現の上昇や変異は、オートファジー不全によりがんの発生に寄与している可能性を示唆した。本研究は、PP2A と PP6 によるオートファジー制御機構を解明し、抗がん戦略における治療標的としての可能性を示唆しており、将来的に PP2A や PP6 を標的とした創薬の開発への礎になることが期待される。

以上より、本論文は博士（獣医学）の付与に資する内容と考えられる。