

# 炎症を起因としたがん悪性化の生体内分子機構の解明

指導教官 佐藤 晃一 教授

山口大学大学院 連合獣医学研究科 獣医薬理学研究室

円城寺 秀平

2018年3月

第1章 緒言.....	1
1-1 上皮細胞の機能と細胞間接着 .....	3
1-2 タイトジャンクションの構造 .....	3
1-3 タイトジャンクションと炎症反応 .....	6
1-4 Protease activated receptor 2 (PAR2) .....	7
1-5 Protein phosphatase 2A (PP2A) .....	8
1-6 SET/I2PP2A .....	11
1-7 本研究の目的 .....	15
第2章 プロテアーゼ活性化受容体-2 による上皮細胞のタイトジャンクション 制御機構の解明.....	16
第1節 背景および目的.....	17
2-1 本研究の目的 .....	17
第2節 実験結果.....	18
2-2-1 PAR2 活性化が経上皮抵抗値に与える影響 .....	18
2-2-2 上皮細胞における PAR2 局在 .....	20
2-2-3 PAR2 活性化によるタイトジャンクション構造の変化 .....	22
2-2-4 PAR2 活性化によるシグナル伝達経路 .....	24
2-2-5 各種キナーゼ阻害剤による PAR2 活性化の抑制 .....	26
第3節 考察.....	28
2-3-1 PAR2 活性化によるタイトジャンクションの崩壊 .....	28
2-3-2 上皮細胞における PAR2 の局在 .....	29
2-3-3 PAR2 活性化によるタイトジャンクション崩壊の分子機構 .....	30

第3章 イヌのメラノーマにおける SET の機能解明と SET 標的薬の効果検討	32
.....	32
第1節 背景および目的.....	33
3-1-1 イヌ悪性黒色腫（メラノーマ） .....	33
3-1-2 本研究の目的.....	34
第2節 実験結果.....	35
3-2-1 イヌメラノーマ細胞株における SET タンパク質発現.....	35
3-2-2 SET 発現抑制が細胞増殖能に与える影響.....	37
3-2-3 SET 発現抑制が細胞浸潤能に与える影響.....	39
3-2-4 SET 発現抑制がコロニー形成能に与える影響.....	41
3-2-5 SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響.....	43
3-2-6 SET 標的薬がイヌメラノーマ細胞の生存率に与える影響.....	45
3-2-7 SET 標的薬がイヌメラノーマ細胞の PP2A 活性に与える影響 .....	47
第3節 考察.....	49
3-3-1 SET によるイヌメラノーマ細胞の悪性度上昇の分子機構.....	49
3-3-2 SET タンパク質発現量とがんの悪性度との関係.....	51
3-3-3 SET 標的薬 FTY720 と OP449 の作用機序.....	54
第4章 SET によるヒト胃癌悪性化分子機構の解明と SET 標的薬の効果 .....	57
第1節 背景および目的.....	58
4-1-1 ヒトの胃癌.....	58
4-1-2 本研究の目的.....	59
第2節 実験結果.....	60

4-2-1	SET タンパク質発現量と胃癌患者の予後との関係.....	60
4-2-2	胃癌モデルマウスにおける SET 発現の検討.....	62
4-2-3	SET 発現抑制細胞株の作製.....	64
4-2-4	SET 発現抑制が細胞増殖能に与える影響.....	66
4-2-5	SET 発現抑制がコロニー形成能に与える影響.....	68
4-2-6	SET 発現抑制が胃癌細胞の生体内での成長に与える影響.....	70
4-2-7	SET 発現抑制に対するレスキュー実験.....	72
4-2-8	SET 発現が胃上皮オルガノイドに与える影響.....	74
4-2-9	SET 発現抑制が c-Myc タンパク質発現量に与える影響 .....	76
4-2-10	SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響.....	78
4-2-11	SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響のマイクロアレイを用いた解析.....	80
4-2-12	SET 発現抑制が E2F1 発現に与える影響.....	82
4-2-13	<i>Gan</i> マウスにおける E2F1 タンパク質発現量の検討 .....	84
4-2-14	SET 発現抑制に対する E2F1 レスキュー発現の影響.....	86
4-2-15	SET 発現抑制が幹細胞マーカー発現に与える影響.....	88
4-2-16	SET による E2F1 の発現調節分子機構の検討 .....	90
4-2-17	SET-PP2A-E2F1 の相互作用の検討 .....	92
4-2-18	胃癌細胞株に対する SET 標的薬の効果.....	94
4-2-19	胃癌細胞株の生体内での成長に対する SET 標的薬の効果.....	96
第 3 節	考察.....	98
4-3-1	SET による胃癌細胞悪性化の分子機構.....	99

4-3-2	E2F1 タンパク質の発現調節機構 .....	100
4-3-3	SET 発現抑制により E2F1 タンパク質発現が減少したがん細胞株の 特徴.....	103
4-3-4	SET のアイソフォームによる機能の違い.....	104
4-3-5	SET 標的薬 OP449 の胃癌治療薬としての可能性.....	106
4-3-6	SET 発現上昇の分子機構.....	107
第5章	総合考察.....	111
5-1	PAR2 によるがん悪性化分子機構.....	112
5-2	イヌのがんに対する新規治療標的としての SET の有用性と展望 ....	113
5-3	ヒトのがん治療における SET 標的薬の展望 .....	114
第6章	実験材料および実験方法.....	119
6-1	細胞培養法 .....	120
6-2	胃上皮オルガノイド培養法 .....	120
6-3	プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製.....	121
6-3-1	プラスミドの作製.....	121
6-3-2	プラスミドのトランスフォーメーションおよびミニプレップ .....	122
6-3-3	プラスミドのトランスフェクション .....	122
6-3-4	レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入.....	123
6-4	経上皮電気抵抗値 (Trans Epithelial Resistance: TER) の測定 .....	123
6-5	マトリゲルを用いた 3次元培養 .....	123
6-6	培養細胞免疫染色法 .....	124
6-7	PP2A 活性の測定 .....	124

6-7-1	細胞全体（タンパク質抽出液）の PP2A 活性測定法 .....	124
6-7-2	免疫沈降法を用いた PP2A 活性測定法 .....	125
6-8	Western blotting によるタンパク質発現量の解析.....	126
6-8-1	タンパク質抽出.....	126
6-8-2	Western blotting .....	126
6-9	FLAG M2 beads を用いた免疫沈降法.....	127
6-10	細胞増殖能と細胞生存率の測定 .....	127
6-11	Transwell を用いた Matrigel Invasion Assay .....	128
6-12	コロニー形成試験 .....	128
6-13	ソフトアガーコロニー形成試験 .....	129
6-14	免疫不全マウスを用いた異種移植（Xenograft） .....	129
6-15	Real-time PCR 法.....	130
6-16	DNA マイクロアレイ.....	131
6-17	免疫組織化学染色法 .....	132
6-17-1	組織サンプルの免疫化学染色.....	132
6-17-2	胃癌患者組織サンプルの SET 発現量解析.....	133
6-18	統計処理 .....	135
6-19	使用抗体リスト .....	135
6-20	使用薬物リスト .....	136
	引用文献.....	137
	謝辞.....	163

## 第 1 章 緒言

炎症反応は、生体の恒常性維持に重要な機構であるが、慢性的な炎症反応はクローン病などの炎症性腸疾患やがんの発生に寄与する (1,2)。プロテアーゼ活性化受容体-2 (PAR2) は、炎症反応を惹起・増悪化させることが知られている (3)。また、近年、PAR2 の発現上昇ががんの悪性度と相関することも明らかになってきており、炎症の増悪化を介して、がん悪性化にも関与していると考えられる (4)。一方、上皮細胞の細胞間結合であるタイトジャンクションは生体のバリア機構として働き、その崩壊は異物の侵入と共に炎症反応を誘導する (5)。タイトジャンクションが崩壊する詳細な分子機構は未解明な点が多く、PAR2 との関係についても明らかになっていない。

がんは、獣医療・人医療双方において克服すべき重要な疾患である。アメリカでは年間 166 万人以上のヒトと 420 万頭以上のイヌが新たにがんと診断されており (6)、日本でもヒトとイヌの死亡原因の第 1 位はがん (ヒト 28.7%、イヌ：14.9%) となっている (7, 厚生労働省 HP)。ヒトだけでなく、イヌやネコにおいても食餌の改善や獣医療の進歩により高齢化が進んでいる現状から、獣医領域におけるがん罹患数はさらに増加すると考えられる。ヒトのがんとイヌのがんには、分子生物学的にも共通する点が多くあることから (6,8)、がんを自然発症したイヌを新規抗がん剤開発のモデル動物として用いる取り組みも行われている (9)。このように、ヒトとイヌでは双方で得られた知見が互いに活用できる可能性が指摘されており、比較腫瘍学的な観点が新たな抗がん戦略の創出に有効であると考えられる。



## 1-1 上皮細胞の機能と細胞間接着

ヒトの身体は生体と外部を区切る最外層の上皮細胞が存在することにより、生体内の恒常性が保たれている。これは皮膚組織だけにあてはまることではなく、体の内側にありながら実際には外部と接している腸管上皮細胞や肺上皮細胞も細菌や異物の侵入を防ぐバリアとして働く。また、血管や腎臓上皮では、コンパートメントや物質の選択的な透過といった働きにおいて上皮細胞が重要な役割を果たしている (10,11)。このような上皮細胞の働きにおいては、細胞間接着が重要な役割を果たしている。上皮細胞間には密着結合（タイトジャンクション）、接着結合（アドヘレンスジャンクション）、デスモゾーム結合、ギャップ結合が存在し、中でも上皮のバリア形成には最も強固な結合であるタイトジャンクションが重要な働きをしている (12,13)。

## 1-2 タイトジャンクションの構造

上皮細胞間に形成されるタイトジャンクションは、4回膜貫通型タンパク質である occludin や claudin がその細胞外領域でホモフィリックな結合をすることで形成される (図 1A)。さらにその細胞内領域では、ZO-1 などの裏打ちタンパク質が結合することで結合が安定化する (14)。

タイトジャンクションの強固な結合は、隣接する細胞の細胞膜同士をほぼ完全につながり合わせるため、タンパク質などの多くの物質 (>500 Da) が細胞間隙を通過することができなくなる。これにより上皮細胞は生体内外を分けるバリアとして働く。また、タイトジャンクションは本来流動的である膜タンパク質の自由な拡散を防ぐことで、二つのコンパートメントを形成し、それぞれの

面には特異的なタンパク質が局在して細胞極性が形成される (15)。タイトジャンクションを境目として、上部である管腔側を **apical** と呼び、タイトジャンクションよりも下部の細胞間部分である **lateral** と基底膜と接する部分である **basal** をあわせて **basolateral** と呼ぶ (図 1B)。近年、多くのタイトジャンクション構成因子が同定され、その機能や複合体形成の調節機構についての研究が進められているが、未だ十分な理解には至っていない。

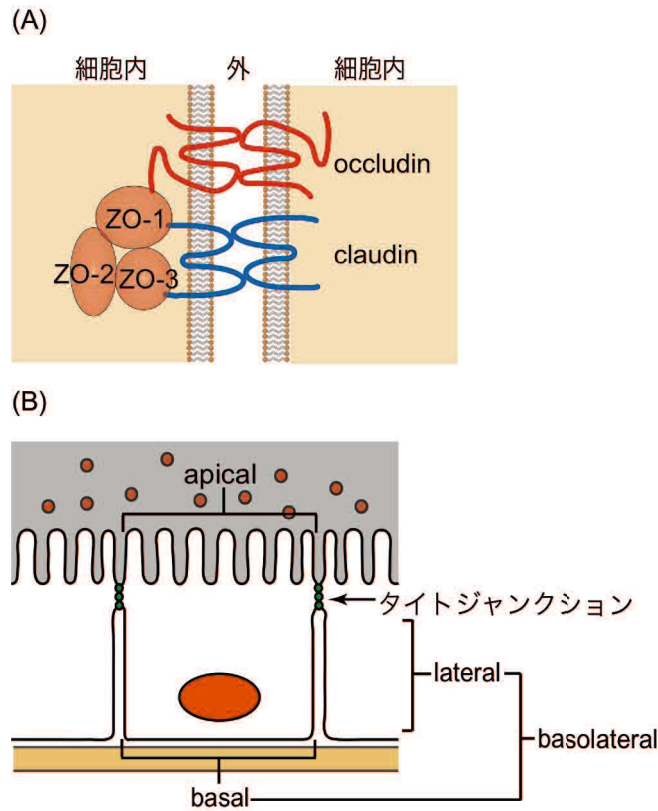


図1 タイトジャンクションの構造と上皮細胞の極性

(A)4回膜貫通型タンパク質の occludin や claudin が細胞外領域で結合している。細胞内領域では ZO-1 などの裏打ちタンパク質が結合することで安定化する。

(B)上皮細胞では、タイトジャンクションを境目にして外部と接する apical 側、細胞間の lateral 側、基底膜側の basal 側という細胞極性が形成され、lateral と basal を合わせて basolateral と呼ばれる。

### 1-3 タイトジャンクションと炎症反応

タイトジャンクション構成タンパク質の欠損や変異などによるタイトジャンクションの形成不全は、細胞間透過性の上昇を引き起こし、虚血性網膜症、肺水腫、腎障害、上皮性腫瘍、遅延型過敏症、リウマチ性関節症、乾癬など各組織において様々な疾病の原因になることが報告されている (5)。また、腸上皮細胞ではタイトジャンクションの崩壊は、細菌や異物の侵入を許すことになり、炎症の惹起・増悪化の原因となる (5)。実際に腸炎などの炎症性疾患において、タイトジャンクションが崩壊し、上皮細胞の透過性が亢進していることが確認されている (16,17)。

タイトジャンクションの崩壊は、様々な刺激が原因となって引き起こされる。Apical 側からの刺激として、細菌、細菌産生毒素、アレルゲン物質などがタイトジャンクションの構成に影響を与えることが報告されている (18,19)。一方、basal 側からの刺激として、主に免疫系細胞が産生する炎症性サイトカインがタイトジャンクションの崩壊を引き起こすことが知られている (20)。したがって、炎症病態においてタイトジャンクションの崩壊は apical 側、basal 側から様々な刺激により引き起こされると考えられるが、その詳細な分子機構については十分に解明されていない。

#### 1-4 Protease activated receptor 2 (PAR2)

プロテアーゼ活性化受容体 (Protease Activated Receptor ; PAR) は G タンパク質共役 7 回膜貫通型受容体であり, 血液凝固, 血管新生, 炎症などにおいて重要な役割を果たすことが知られている (21)。PAR には PAR1 ~ PAR4 の 4 つのサブタイプが存在し, その中でも PAR2 は消化管, 膵臓, 肝臓, 腎臓などを中心に生体内に広く発現している (22)。PAR の活性化分子機構は特殊であり, 細胞外に出ている N 末端をプロテアーゼが作用して切断することにより, 残った N 末端のペプチド配列がそのままリガンド (tethered ligand) となって PAR 自身を活性化する。PAR2 の内因性アゴニストとしては, 消化酵素であるトリプシン, 肥満細胞が分泌するトリプターゼ, 血液凝固第 VIIa, Xa 因子などが知られている (23)。また, 外因性アゴニストとして一部の細菌が産生するプロテアーゼも報告されている (3)。PAR2 tethered ligand のアミノ酸配列を合成したペプチドである PAR2AP も PAR2 に結合することで特異的に活性化することが知られている。

PAR2 の活性化は, 炎症の惹起・増悪化との関与が指摘されている。PAR2 ノックアウトマウスでは, 腸炎発症時の炎症メディエーターの減少, 顆粒球浸潤の減少, サイトカイン分泌の低下など炎症反応の抑制が確認されている (3)。また, マウス結腸内への PAR2 特異的アゴニストの投与により炎症が引き起こされることや (24), 血管内皮や気道上皮において PAR2 の活性化が炎症性サイトカインの産生を促進することが報告されている (25,26)。しかし, PAR2 の活性化が上皮細胞のタイトジャンクションの構成に与える影響については明らかになっていない。

## 1-5 Protein phosphatase 2A (PP2A)

タンパク質のリン酸化と脱リン酸化は、細胞内のほぼすべてのシグナル伝達に用いられている翻訳後修飾であり、リン酸化酵素であるキナーゼ (kinase) と脱リン酸化酵素であるホスファターゼ (phosphatase) により可逆的に調節されている。がんをはじめとする様々な疾患において、キナーゼの過剰な活性化と、ホスファターゼの活性低下が認められ、リン酸化シグナルが亢進している (27)。リン酸化の約 98%はセリン・スレオニン残基に引き起こされ、その脱リン酸化は phosphoprotein phosphatase (PPP) ファミリー, metal-dependent protein phosphatase (PPM) ファミリー, DxTxT ホスファターゼファミリーに分類されるセリン・スレオニンホスファターゼにより制御される (27-30)。

PP2A は、PPP ファミリーのうち type2A protein phosphatase に属する、進化的に高く保存されたセリン・スレオニンホスファターゼである。PP2A は細胞内タンパク質の約 1%を占め、PP1 と合わせて細胞内のホスファターゼ活性の約 90%を担う主要なホスファターゼであり、細胞周期、アポトーシス、細胞分化など多岐にわたる細胞機能を制御している (31)。PP2A は、足場となる A サブユニット、酵素活性を持つ C サブユニットから構成される AC 二量体に、基質特異性を決定する B サブユニットのうちの一つが結合し、特異的な基質へとリクルートされる。B サブユニットには大きく分けて B55, B56, PR72, Striatin の 4 つのファミリーが存在する (図 2)。

PP2A は重要ながん抑制因子であり、細胞のがん化には PP2A 活性の抑制が必須であることが報告されている (32)。多くのがんで認められる Ras の活性化変異は、MAPK や PI3K/Akt などを活性化させるが、PP2A はこれら下流シグナル

の ERK1/2 や Akt を脱リン酸化することで不活性化する (33)。また、大腸癌などで多く認められる Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化においても、GSK3 $\beta$  を脱リン酸化して活性化し、 $\beta$ -catenin の分解を促進することで抑制的に作用する (34)。さらに、がん促進性の転写因子である c-Myc は、PP2A に脱リン酸化されることでユビキチン・プロテアソーム系による分解が促進される (35)。アポトーシス経路においても、アポトーシス抑制性タンパク質である Bcl-2 を脱リン酸化することでその機能を阻害し (36)、反対にアポトーシス促進性のタンパク質である Bim や Bad に対しては、脱リン酸化により活性や発現を上昇させることで細胞をアポトーシス誘導に導く (37,38)。

以上のように PP2A は、がん抑制因子として極めて重要であり、ほとんどのがんで PP2A 複合体構成因子の変異や発現低下、PP2A 阻害タンパク質の発現上昇による PP2A 活性の低下が報告されている (39)。近年、様々ながんにおいて PP2A 活性が抑制される分子機構が明らかにされてきており、PP2A 活性を回復させる抗がん戦略が注目されている (40,41)。現在の抗がん戦略の中心はキナーゼに対する阻害剤であるが、すでに承認済みの抗がん剤や臨床試験中の低分子抗がん剤の約 7 割を占めており、従来の治療薬と差別化を図る薬剤開発は困難な状況にある。そのため、「ホスファターゼの活性化」は現状を打破する新たな抗がん戦略であり、PP2A はその創薬標的として極めて魅力的な因子である。

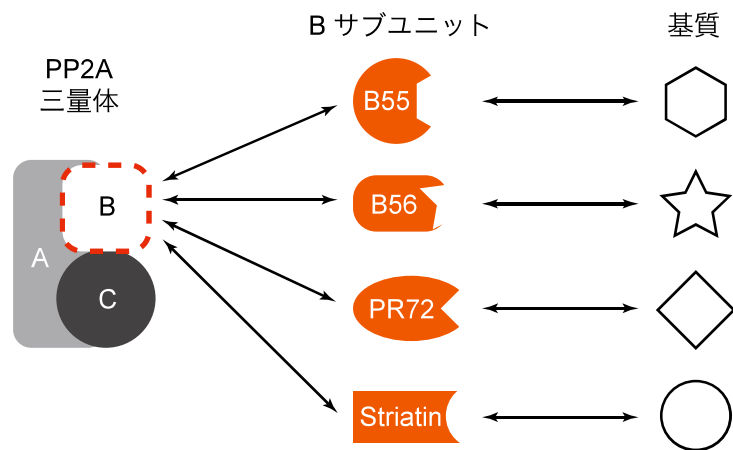


図2 PP2A 複合体

PP2A は足場となる A サブユニット，酵素活性を持つ C サブユニット，基質特異性を決定する B サブユニットからなる三量体を構成する。結合する B サブユニットの種類が変化することで，特異的な基質へとリクルートされる。B サブユニットは大きく分けて B55，B56，PR72，Striatin の 4 つのファミリーが存在し，アイソフォームも含めて 20 種類以上のタンパク質が存在する。



## 1-6 SET/I2PP2A

PP2A には, PME-1, CIP2A, SET/I2PP2A (SET) などの内因性阻害タンパク質が存在する。様々ながんにおいて, これら PP2A 阻害タンパク質の発現量が上昇しており, 悪性度との相関が報告されている (24-26)。SET は, 急性未分化白血病における染色体の転座によって生じた *SET-CAN* (*SET-NUP214*) 融合遺伝子の構成因子の一つとして同定されたが (28), その後の研究で PP2A 特異的阻害タンパク質として同定されていた I2PP2A が, SET と同じタンパク質であることが明らかになった (45)。SET 発現の上昇は, 乳癌や膵臓癌, 大腸癌, 慢性骨髄性白血病など多くのがん種で報告されている (40,46-48)。SET は PP2A 複合体である C サブユニットと B サブユニットに直接結合することでその活性を阻害し, PI3K/Akt シグナル (49), ERK1/2 シグナル (50) のリン酸化や c-Myc (47),  $\beta$ -catenin (51) のタンパク質発現を亢進させることでがんの悪性化を引き起こす。

(図 3)。ヒトの SET には, 4つのアイソフォームが存在することが知られているが, これまでにその発現や機能について報告されているものは SET $\alpha$  と SET $\beta$  の二つである。SET $\alpha$  と SET $\beta$  は N 末端のアミノ酸配列が異なるが, PP2A 活性を抑制する作用は同程度である (52)。また, SET $\beta$  は PP2A 阻害活性の他にクロマチンリモデリング活性を持つことが報告されており, Template-activating factor 1 $\beta$  (TAF-1 $\beta$ ) とも呼ばれている (53,54)。一方, SET $\alpha$  (TAF-1 $\alpha$ ) はクロマチンリモデリング活性を持たない (55)。SET は各アイソフォームでホモまたはヘテロ二量体を形成しており (56), 二量体化はクロマチンリモデリング作用を増強するが (57), PP2A 阻害作用には影響を与えないことが報告されている (52,58)。当研究室では, イヌにおいて 4つの SET アイソフォーム (SET $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) を

同定し、ヒト SET $\alpha$  とイヌ SET $\alpha$  の相同性が 94%と極めて高いことを明らかにした (59)。したがって、ヒトと同様にイヌにおいても、がんの発症や悪性化に SET が寄与している可能性が考えられる。実際我々は、イヌ乳腺腫瘍において、ステージの進行にともない SET 発現が上昇すること、SET 発現抑制が乳腺腫瘍細胞の成長を抑制することを確認している (51)。

FTY720 (fingolimod) や OP449 などの SET 標的薬は、SET と PP2A の結合を阻害することで PP2A 活性を回復させ、抗がん効果を発揮する (60–62)。FTY720 は、生体内でリン酸化を受けて sphingosin-1-phosphate (S1P) 受容体の一種である S1P1 受容体をダウンレギュレートすることで免疫抑制作用を示すことから、免疫抑制剤として臨床に用いられている (63)。一方、リン酸化されていない FTY720 は、SET と結合して PP2A 活性を回復させることが報告されており、SET 阻害剤として肺癌やリンパ腫の細胞株に対して抗がん効果が認められている (64,65)。我々も、FTY720 が一部のイヌ乳腺腫瘍細胞株に対して抗がん効果を示すことを報告している (51)。また、OP449 は、アポリポプロテイン E の抗炎症作用を再現することを期待して作製された模倣ペプチド COG112 が、SET と結合して PP2A との結合を阻害することが明らかになったことから、構造最適化により合成された SET 標的薬である。OP449 は、リンパ腫、膵臓癌、乳癌の細胞株に対して PP2A 活性を回復させ、抗がん効果を発揮することが報告されている (40,47,66)。当研究室においても、イヌのリンパ腫細胞株に対して OP449 が PP2A 活性を回復させ、アポトーシスを誘導することを報告している (67)。マウスに対する OP449 投与は体重減少を引き起こさず、代謝系に対する副作用もほとんどないことが報告されており、抗がん剤の標的としての SET の有用性が強く示

唆される (68)。しかし、SET ががんの発症や悪性化を引き起こす分子機構は未だ十分に明らかになっておらず、また、獣医領域での応用の可能性についてはほとんど検討されていない。

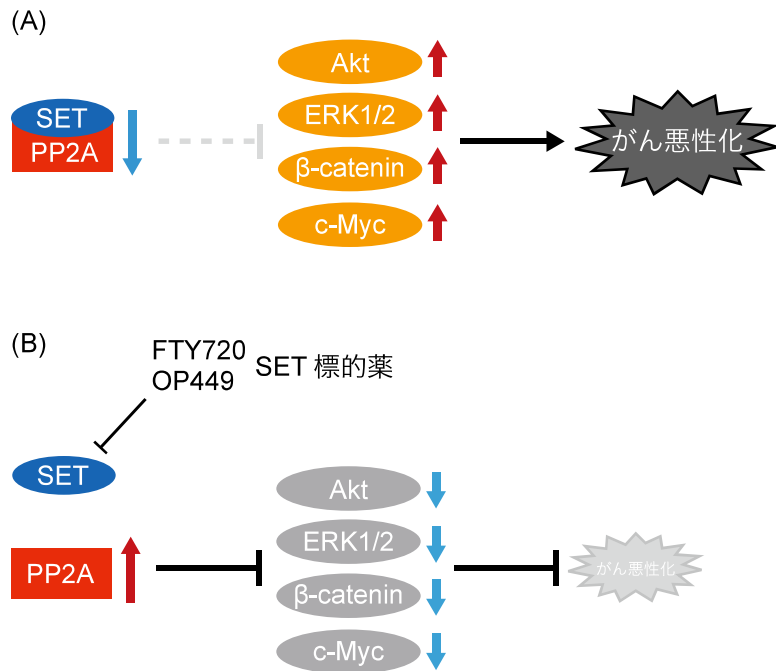


図3 SETによるがん悪性化分子機構とSET標的薬の作用

(A) PP2AはPI3K/Aktシグナル、ERK1/2シグナルのリン酸化やc-Myc、β-cateninのタンパク質発現を抑制することでがん抑制因子として機能している。がん細胞ではSETがPP2Aに結合して活性を阻害することで、これらのシグナルが亢進し、がんの悪性化を引き起こす。

(B) SET標的薬(FTY720, OP449)はSETとPP2Aの結合を阻害することで、PP2A活性を回復させ、抗がん効果を発揮する。

## 1-7 本研究の目的

本研究は、プロテアーゼ活性化受容体-2 (PAR2) とタンパク質脱リン酸化酵素 PP2A 阻害タンパク質 SET/I2PP2A (SET) を介した炎症およびがん悪性化の生体内分子機構を解明することで、新規治療法開発の基盤形成を目的に実施した。第2章では、PAR2の活性化が上皮細胞のタイトジャンクションを崩壊させることで、炎症の増悪化を引き起こす可能性について明らかにした。第3章では、SETがイヌメラノーマの悪性化に寄与する分子機構とSET標的薬の抗がん効果を明らかにした。第4章では、SETがヒトがん細胞の幹細胞性の維持に寄与して悪性化を引き起こす分子機構を解明し、胃癌に対するSET標的薬の抗がん効果を明らかにした。

第2章 プロテアーゼ活性化受容体-2による上皮細胞のタイトジャンクション制御機構の解明

## 第1節 背景および目的

### 2-1 本研究の目的

上皮細胞のタイトジャンクションの崩壊は、炎症反応を引き起こすことが知られているが (5), 炎症を増強させることが報告されているプロテアーゼ活性化受容体-2 (PAR2) との関係については未だ明らかになっていない (3)。本研究では、タイトジャンクションに対する PAR2 の影響を解析することで、上皮細胞における炎症反応調節分子機構を解明することを目的に研究を行った。

## 第2節 実験結果

### 2-2-1 PAR2 活性化が経上皮抵抗値に与える影響

経上皮抵抗値 (TER) はタイトジャンクション形成の指標となり、数値の低下はタイトジャンクションの崩壊を意味する (69)。そこで、PAR2 活性化がタイトジャンクションに与える影響を明らかにするため、MDCK 細胞を用いて PAR2 刺激を行った後の TER の変化を解析した。PAR2 特異的なアゴニストである PAR2AP を MDCK 細胞の apical 側にあたるインサート内と、basal 側にあたるウェル内へそれぞれ 100  $\mu$ M 投与した。Apical 側からの PAR2AP 処置は TER に大きな変化を与えなかったが、basal 側からの PAR2AP 処置は投与後 30 分をピークとした TER の顕著な減少を引き起こした (図 4)。



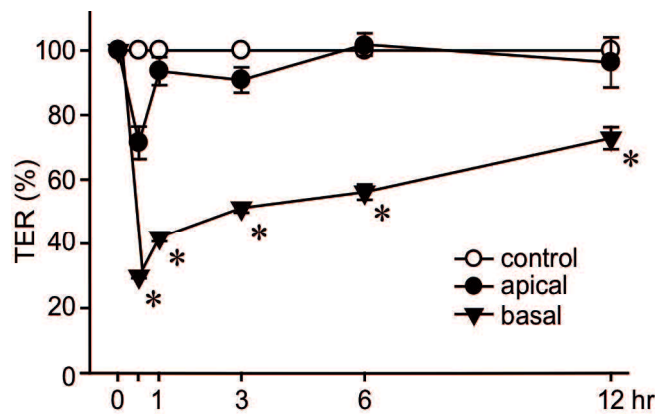


図4 PAR2 刺激後の経上皮抵抗値 TER の変化

Apical 側, basal 側それぞれに PAR2 特異的アゴニスト PAR2AP (100  $\mu$ M) を投与し TER の変化を解析した。無処置を control として, 各々の 0 hr を 100% としてその後の変化を示した。\* :  $P < 0.05$  (control との比較)。N=3。

### 2-2-2 上皮細胞における PAR2 局在

Basal 側からの PAR2AP 処置が TER の減少を引き起こしたのに対して, apical 側からの PAR2AP 処置は TER の減少を引き起こさなかった。Apical と basolateral はタイトジャンクションによって分けられるため, 上皮細胞において PAR2 がタイトジャンクションよりも生体側である basolateral に特異的に局在している可能性が考えられた。そこで, 上皮細胞における PAR2 の局在を解明するために, マトリゲルを用いた MDCK 細胞の三次元培養を行った。MDCK 細胞は, マトリゲルを含む培地中で培養を行うと球状のシストを形成する。その構造は中空で管腔構造になっている (図 5A)。このシストを apical マーカーである actin (青色), lateral マーカーである E-cadherin (緑色) で染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察することで上皮極性の判別しやすい免疫染色像を得ることができる (図 5B)。mCherry-PAR2 MDCK 細胞をマトリゲル中で培養し, 上皮細胞における mCherry-PAR2 の局在を観察したところ, mCherry-PAR2 (赤色) は E-cadherin (緑色) と同様の局在を示した (図 5C)。このことから PAR2 は上皮細胞において, lateral 側に特異的に局在することが明らかになった。

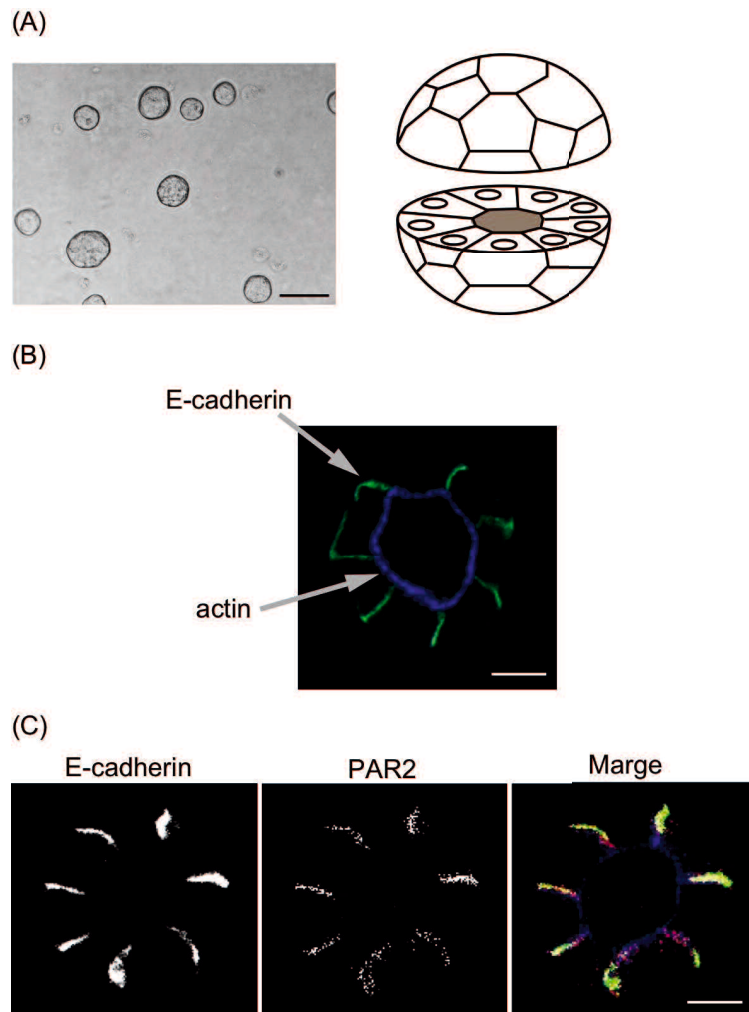


図5 3次元培養した上皮細胞における PAR2 の局在

(A) マトリゲル培養により形成される MDCK 細胞のシストの透過光像 (左) と模式図 (右)。スケールバー : 800  $\mu\text{m}$ 。

(B) シストにおける lateral マーカーの E-cadherin (緑) および apical マーカーの actin (青) 局在の観察像。スケールバー : 50  $\mu\text{m}$ 。

(C) mCherry-PAR2 MDCK 細胞のシストにおける mCherry-PAR2 の局在を免疫染色により観察した。左から E-cadherin, PAR2, Marge 像であり, Marge 像において緑色の E-cadherin と赤色の PAR2 が重なり黄色になっている。Marge 像の青色は actin を示す。スケールバー : 50  $\mu\text{m}$ 。

### 2-2-3 PAR2 活性化によるタイトジャンクション構造の変化

Basal 側からの PAR2AP 処置により TER が減少したことから、PAR2 の活性化がタイトジャンクション構成タンパク質の局在に与える影響について、免疫染色法を用いて検討した。TER 測定時と同様に apical 側, basal 側それぞれに 100  $\mu$ M の PAR2AP を投与し、TER に最大の変化が認められた 30 分後に細胞を固定した。その後、タイトジャンクションの構成タンパク質である occludin と ZO-1 を免疫染色して観察した。無処置および apical 側からの PAR2 刺激では正常な格子状のタイトジャンクション構造が occludin (図 6A) および ZO-1 (図 6B) の免疫染色で観察された。一方、basal 側からの PAR2 刺激では occludin の局在に変化は認められなかったが、ZO-1 の細胞質への局在の変化が観察された。

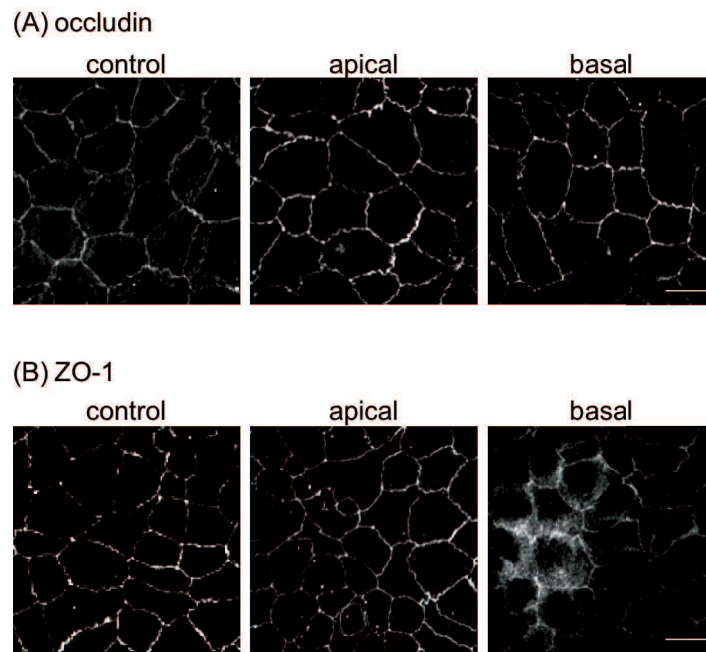


図6 PAR2 刺激によるタイトジャンクション構造の変化

無処置 (control) および apical 側, basal 側それぞれへの PAR2AP (100  $\mu$ M) 投与による occludin (A) および ZO-1 (B) の局在の変化を免疫染色により観察した。N=3。スケールバー : 50  $\mu$ m。

#### 2-2-4 PAR2 活性化によるシグナル伝達経路

上皮細胞における PAR2 の活性化は, ZO-1 の局在を変化させ TER を低下させたことから, 次に PAR2 活性化から TER 低下までのシグナル伝達経路を検討した。Basal 側からの PAR2AP 刺激後の p38 MAPK, ERK1/2 および Akt/PKB のリン酸化の経時的な変化を western blotting 法を用いて解析したところ, 10 分をピークとして p38 MAPK, ERK1/2 および Akt/PKB のリン酸化が観察された(図 7A, B)。

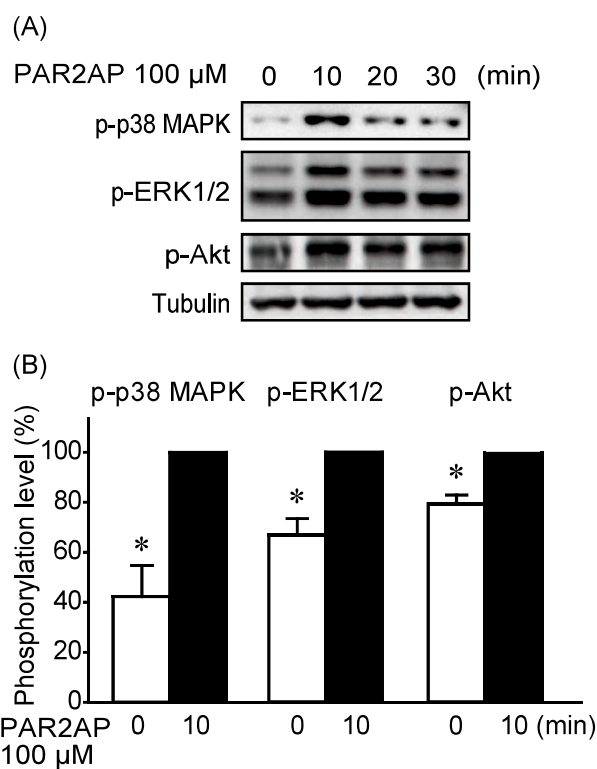


図7 PAR2 活性化によるシグナル伝達

Basal 側から PAR2AP を処置し 10, 20, 30 分後の p38 MAPK, ERK1/2 および Akt のリン酸化レベルを western blotting で解析した。典型的な例 (A) と PAR2AP 処置 10 分後を 100%として相対値で示した定量図 (B)。Tubulin はローディングコントロールとして用いた。\* :  $P < 0.05$  (PAR2AP 処置 10 min との比較)。N=3。

#### 2-2-5 各種キナーゼ阻害剤による PAR2 活性化の抑制

ERK1/2, p38 MAPK, JNK, PI3K-Akt に対する各阻害剤を前処置することで, PAR2 刺激による TER の減少におけるこれらシグナル伝達経路の関与を解析した。ERK 阻害剤 FR1802904 (30  $\mu$ M), p38 MAPK 阻害剤 SB202190 (10  $\mu$ M), JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) および PI3K-Akt シグナル阻害剤 wortmannin (100  $\mu$ M) の単独処置は, TER に影響を与えなかった (data not shown)。ERK1/2, JNK, PI3K/Akt の阻害剤の前処置は PAR2 刺激による TER 低下に影響を与えなかったが, p38 MAPK 阻害剤の前処置により, PAR2 刺激による TER 減少の有意な回復が認められた (図 8)。以上の結果から, 上皮細胞における PAR2 の活性化の少なくとも一部は, p38 MAPK のリン酸化を介して TER の減少を引き起こしていることが示唆された。



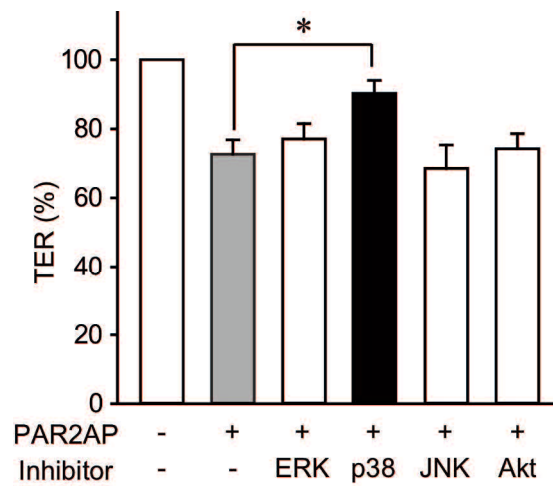


図8 PAR2活性化によるTER減少に対する各種キナーゼ阻害剤の影響

ERK阻害剤FR1802904 (30  $\mu$ M), p38 MAPK阻害剤SB202190 (10  $\mu$ M), JNK阻害剤SP600125 (10  $\mu$ M) およびPI3K-Akt阻害剤wortmannin (100  $\mu$ M) を30分間前処置し, PAR2AP刺激によるTER変化へ与える影響を検討した。

\* :  $P < 0.05$  (PAR2AP処置のみとの比較)。N=3。

### 第3節 考察

本研究において、MDCK 細胞では PAR2 は lateral 側に限局し、apical 側からの PAR2 活性化因子の刺激にはタイトジャンクションが障壁となって抵抗性を示すことが明らかになった。一方、basal 側から曝露された PAR2 活性化因子は p38 MAPK を活性化し、タイトジャンクション構成因子である ZO-1 の局在変化を引き起こして細胞間透過性を亢進させる。したがって、炎症反応やアレルギー反応における上皮組織の肥満細胞の脱顆粒や、血管透過性の亢進が上皮細胞の PAR2 を活性化し、タイトジャンクションを崩壊させることで炎症の増悪をもたらす可能性が考えられ、PAR2 阻害剤の抗炎症薬としての可能性が期待される。

#### 2-3-1 PAR2 活性化によるタイトジャンクションの崩壊

上皮細胞は細菌や異物などの体内への侵入を防ぐなど、多細胞生物の生存にとって極めて重要な役割を果たしており、その機能の中心を担っているのは細胞間に形成されるタイトジャンクションである (5)。しかし、タイトジャンクションは生体内外からの様々な刺激により崩壊し、炎症の発生や増悪の原因となる。本研究は、MDCK 細胞において、basal 側すなわち生体内からの PAR2 刺激がタイトジャンクションの崩壊を引き起こすことを明らかにした。

PAR2 は肥満細胞が分泌するトリプターゼや血液凝固第 VIIa, Xa 因子などにより活性化されることが知られている (70)。そのため、炎症反応やアレルギー反応における上皮組織の肥満細胞の脱顆粒や、血管透過性の亢進が上皮細胞の PAR2 を活性化し、タイトジャンクションを崩壊させることで炎症の増悪をもたらす可能性が考えられる。実際、食物アレルギーにおいて apical 側から摂取

された食物タンパク質が生体内でアレルギー反応を引き起こし、その結果放出される肥満細胞の炎症性物質が basal 側から腸上皮細胞のタイトジャンクションを崩壊させることが知られている (71)。また、様々な原因で細胞間接着が緩み細胞間の透過性が亢進した状態では、apical 側からの活性化因子の曝露が PAR2 活性化の原因となる可能性が考えられる。特に小腸や大腸においては、細胞間の透過性の亢進は細菌や菌体外毒素の侵入をもたらすことになる。一部の *Helicobacter* 属細菌が産生するプロテアーゼには PAR2 活性化作用が報告されており (3)、PAR2 活性化による腸炎の増悪化の原因の一つとなる可能性が考えられる。

### 2-3-2 上皮細胞における PAR2 の局在

本研究から、MDCK 細胞においては PAR2 の局在が lateral 側に限局していることが明らかとなった。極性が形成される上皮細胞での PAR2 の局在については、ヒト角膜上皮細胞において apical 側に (72)、ヒト食道上皮細胞において basal 側に (73)、ヒトとモルモットの膵管上皮細胞において apical 側に (74)、ヒト結腸上皮細胞において apical 側、lateral 側、basal 側に分布することが報告されている (75)。このような局在の差は、細胞種による翻訳後修飾の違いに起因する可能性が考えられる。グリコシル化は、タンパク質の膜移行、安定化、生体活性に重要であり (76)、グリコシル化の一つであるグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) は、タンパク質を apical 側へ選択的に移行させることが知られている (77)。PAR2 はグリコシル化を受けることが報告されており (78)、各細胞や組織によるグリコシル化の違いが、PAR2 の局在の多様性をもたらす可能性

が考えられる。MDCK 細胞において、PAR2 が lateral 側に局在する分子機構は明らかになっていない。PAR2 の細胞膜移行には、脂質修飾の一種であるパルミトイル化が関与することが報告されている (79)。パルミトイル化を受けたタンパク質は細胞膜上の脂質ラフトに高い親和性を持つため (80)、MDCK 細胞の脂質ラフトの局在を検討することで、PAR2 が lateral 側へ限局する原因を解明できるかもしれない。

またこれまでの PAR2 局在に関する報告は、PAR2 抗体を用いた組織切片の免疫染色や、蛍光タンパク質を付加した PAR2 アゴニストを用いた培養細胞の染色によって得られた結果であり、抗体と PAR2 アゴニストはともに非特異的に結合する可能性を持つ。したがって、mCherry タグを付加した PAR2 の局在を観察した本研究の結果が、より正確な PAR2 の局在を示していると考えられる。

### 2-3-3 PAR2 活性化によるタイトジャンクション崩壊の分子機構

本研究では、PAR2 活性化によりタイトジャンクション構造タンパク質の一つである ZO-1 の局在変化が認められた。PAR2 活性化は ERK1/2, p38 MAPK, Akt の活性化を引き起こしたが、ZO-1 の解離による TER の減少には p38 MAPK が関与する可能性が示唆された。ZO-1 の局在変化や発現減少を引き起こすシグナル伝達機構として、p38 MAPK 活性化の関与が報告されており、本研究の結果を支持する (81,82)。一方、ERK1/2 の活性化に関しても ZO-1 の分解、mRNA 量の低下を引き起こすことでタイトジャンクションの崩壊をもたらすことが報告されているが (83)、本研究ではその関与は確認できなかった。しかし、本研究においても p38 MAPK の阻害のみでは、PAR2AP 処置による TER 減少は完全には

抑制されなかったことから、これまでにタイトジャンクション崩壊に関与することが報告されている Rho-A, ROCK (84), PKC- $\theta$  (20) などの関与についても今後検討する必要がある。

今回、TER の減少は 30 分をピークとしており、極めて短時間に引き起こされたことから、TER の減少はタイトジャンクション構成タンパク質発現量の低下以外に起因する可能性が高い。細胞間透過性は、ZO-1 のリン酸化により亢進することが知られており (85), p38 MAPK が直接 ZO-1 をリン酸化するという報告はないが、p38 MAPK もしくはその下流のキナーゼが ZO-1 をリン酸化することで TER の低下を引き起こした可能性が考えられる。また、protein kinase C- $\epsilon$  (PKC- $\epsilon$ ) が ZO-1 の Ser168 をリン酸化すること (86), PKC- $\epsilon$  が ZO-1 の局在化に必要であることから (87), PKC- $\epsilon$  活性の低下が PAR2 活性化による ZO-1 の局在変化に関与している可能性も考えられる。

本研究では、TER の減少に際して ZO-1 の局在だけに変化がみられ、occludin の局在に変化が認められなかった。Occludin 欠損細胞でも正常なタイトジャンクション構造が維持され TER に影響を与えないことが報告されており (88), occludin の局在変化は必ずしも必要でないと考えられる。一方、ZO-1 の局在変化のみで TER が低下するかも明らかではなく、今後 claudin など他のタイトジャンクション構成因子の局在変化についても検討する必要がある。

### 第3章 イヌのメラノーマにおけるSETの機能解明とSET標的薬の 効果検討

## 第1節 背景および目的

### 3-1-1 イヌ悪性黒色腫（メラノーマ）

悪性黒色腫（メラノーマ）は、イヌに発症する腫瘍全体の3%を占め、特に悪性腫瘍の約7%を占める予後の悪いがんである。ヒトのメラノーマが体幹や腕に原発することが多いのに対して (89), イヌのメラノーマは、口腔内 (56%), 口唇 (23%), 皮膚 (11%), 手足の指 (8%) など様々な部位に原発することが知られている。ヒトとイヌともに、遺伝、老化、紫外線などがリスクファクターと考えられているが、発生原因の詳細は明らかになっていない。イヌのメラノーマの半数以上は口腔内を原発とするため、初期段階での発見が難しいことや広範囲における外科的切除が難しいこともメラノーマの予後を悪化させている原因の一つである (90)。現在、イヌのメラノーマに対して行われている治療法の中で、放射線療法は単独または外科的手術の後に適応され、一定の効果が認められている (91)。しかし、小動物臨床においては放射線療法を受けることができる施設は限られており、すべての症例に対して適応することは難しいのが現状である。また、一部の症例において、白金系抗悪性腫瘍薬である **carboplatin** が効果を示すことが報告されているが、完全寛解に至るものは極めて少ない (92)。したがって、イヌメラノーマの治療成績を改善するための新規治療標的の同定が求められている。

### 3-1-2 本研究の目的

ヒトのメラノーマにおいて、SET 発現を抑制すると細胞増殖能や免疫不全マウス体内での腫瘍成長が抑制されることが報告されている (93)。一方、イヌのメラノーマにおける SET の役割については全く明らかになっていない。そこで、本研究では、イヌのメラノーマにおける SET の機能を解明し、新規イヌメラノーマ治療薬としての SET 標的薬の効果の検討を目的に研究を行った。



## 第2節 実験結果

### 3-2-1 イヌメラノーマ細胞株における SET タンパク質発現

イヌのメラノーマにおける SET タンパク質の発現量を比較するために、6 種類のイヌメラノーマ細胞株 (CMeC-1, CMeC-2, KMeC, LMeC, CMGD2, CMGD5) の SET タンパク質発現量を western blotting を用いて検討した。全ての細胞株において SET タンパク質の発現が認められ、興味深いことに、原発巣由来の細胞株 (CMeC-1, KMeC, CMGD2) と比較すると、対応する転移巣由来の細胞株 (CMeC-2, LMeC, CMGD5) では SET タンパク質発現量が有意に低い、または低下傾向であることが認められた (図 9A, B)。一方, PP2A の C サブユニット (PP2Ac) の発現に変化は見られなかった。

CMeC-1 細胞は、オスのチャウチャウの右肩に発症したメラノーマの原発巣から樹立された細胞株であり、CMeC-2 は、CMeC-1 をヌードマウスに移植して肺に形成された転移巣から樹立された細胞株であることから、がんの悪性化が細胞株に与える影響を比較解析する上で有用なツールである。そこで、イヌメラノーマ細胞の悪性化にともなう SET の機能変化を検討するため、レンチウイルスベクターを用いて non-target shRNA (shNT) および SET に対する shRNA (shSET) を安定的に発現させた CMeC-1 および CMeC-2 細胞を作製した。SET 発現量を western blotting により検討したところ、shSET により CMeC-1 および CMeC-2 の SET タンパク質発現が顕著に抑制されていることが確認された (図 9C)。

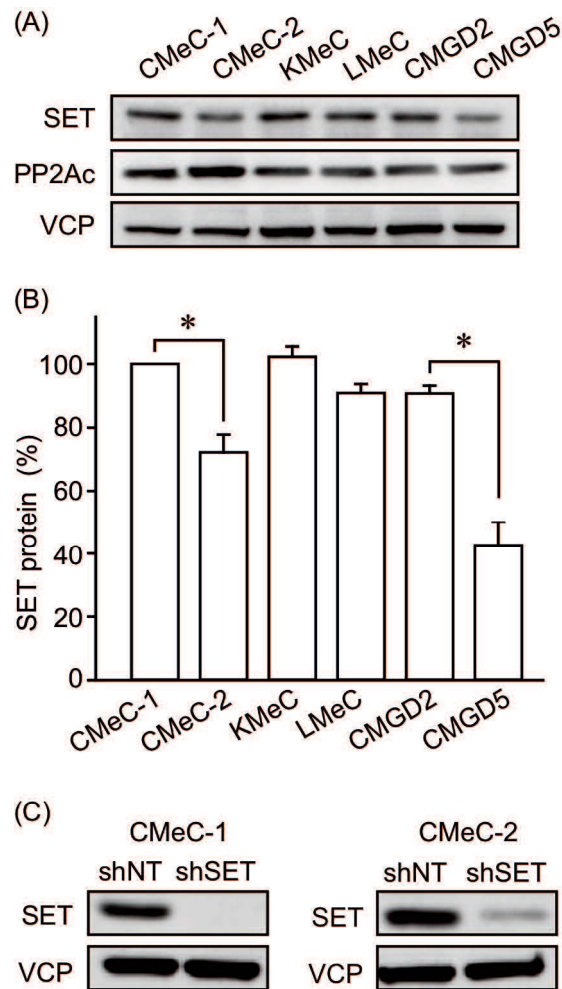


図9 イヌメラノーマ細胞株における SET タンパク質発現

(A, B) 各種イヌメラノーマ細胞株 (CMeC-1, CMeC-2, KMeC, LMeC, CMGD2, CMGD5) の SET タンパク質発現を western blotting により検討した。典型的なデータの一部 (A) と CMeC-1 の発現量を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=3。\* :  $P < 0.05$  (CMeC-1, CMGD2 との比較)。VCP はローディングコントロールとして用いた。

(C) shNT および shSET を発現させた CMeC-1, CMeC-2 における SET タンパク質発現量の変化を western blotting により検討した代表例。

### 3-2-2 SET 発現抑制が細胞増殖能に与える影響

一般に、がん細胞では増殖シグナルが常時活性化状態となっており、細胞増殖が異常に亢進しているため、細胞増殖能の増加はがん細胞の悪性度の指標の一つとなる。そこで、SET 発現を抑制した CMeC-1 および CMeC-2 細胞を用いて、SET 発現が細胞増殖能に与える影響を、Cell count kit8 (CCK8) を用いて解析した。SET 発現抑制は、CMeC-1 細胞の増殖には影響を与えなかったが (図 10A)、CMeC-2 細胞の増殖を有意に抑制した (図 10B)。

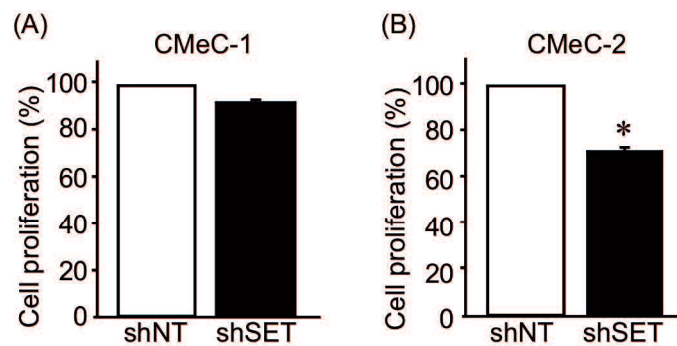


図 10 SET 発現抑制が細胞増殖能に与える影響

shNT および shSET を発現させた CMeC-1 (A), CMeC-2 (B) を 3 日間培養し、CCK8 を用いて細胞増殖能を解析した。shNT の細胞増殖率を 100%として相対値で表した。N=4。\* :  $P < 0.05$  (shNT との比較)。

### 3-2-3 SET 発現抑制が細胞浸潤能に与える影響

がん細胞の浸潤能の亢進は、原発巣からの転移において重要な役割を果たし、悪性度の指標の一つとなる。SET 発現抑制が細胞浸潤能に与える影響を検討するため、Matrigel Invasion Assay を行なった。SET 発現抑制は CMeC-1 の細胞浸潤には影響を与えなかったが、CMeC-2 の細胞浸潤を顕著に抑制した (図 11)。

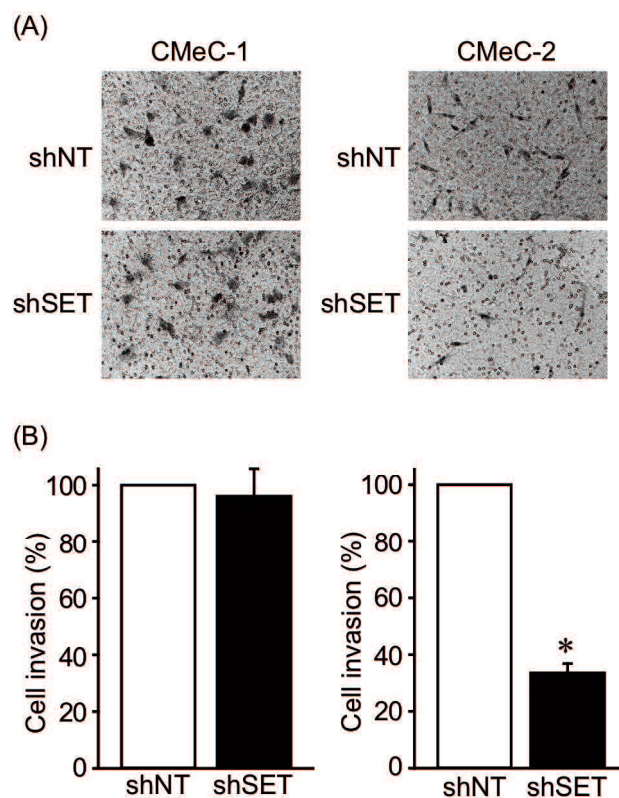


図 11 SET 発現抑制が細胞浸潤能に与える影響

shNT および shSET を発現させた CMeC-1, CMeC-2 の細胞浸潤能を Matrigel Invasion Assay を用いて解析した。典型的なデータの一部 (A) と shNT を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=4。\* :  $P < 0.05$  (shNT との比較)。

#### 3-2-4 SET 発現抑制がコロニー形成能に与える影響

がん細胞を単一細胞にしてディッシュ上に低い細胞密度で播種すると、悪性度の高い細胞のみが自己増殖を行い、コロニーを形成する。そのため、コロニー形成能はがん細胞の悪性度の指標の一つとなる。そこで、SET 発現抑制がコロニー形成能に与える影響を解析した。SET 発現抑制は CMeC-1 のコロニー形成数には影響を与えなかったが (図 12A), CMeC-2 のコロニー形成数を有意に低下させた (図 12B)。

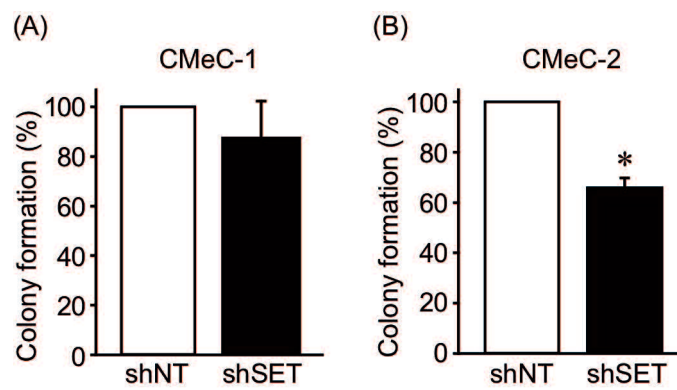


図 12 SET 発現抑制がコロニー形成能に与える影響

shNT および shSET を発現させた CMeC-1 と CMeC-2 を用いて、コロニー形成試験を行った。shNT を発現させた細胞のコロニー形成数を 100%として相対値で表した。N=4。\* :  $P < 0.05$  (shNT との比較)。



### 3-2-5 SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響

SET 発現抑制は、転移巣由来の細胞株である CMeC-2 でのみ細胞増殖能，細胞浸潤能，コロニー形成能を抑制した。これらの表現型の変化を引き起こした分子機構を明らかにするため，SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響を western blotting により検討した。

これまで SET 発現抑制により変化することが報告されている様々な細胞内シグナル (ERK1/2, PI3K/Akt, NFκB, Wnt/β-catenin, mTOR, c-Myc) について，リン酸化およびタンパク質発現量の変化を検討したところ，CMeC-2 においてのみ mTOR シグナル活性の指標である p70 S6 Kinase (Thr389) のリン酸化レベル低下が認められた (図 13)。一方，その他検討したシグナルについては，両細胞で変化が認められなかった。これらの結果より，SET はイヌメラノーマの転移巣由来細胞において，mTOR シグナルを活性化することで細胞増殖能，細胞浸潤能，コロニー形成能を上昇させる可能性が示唆された。

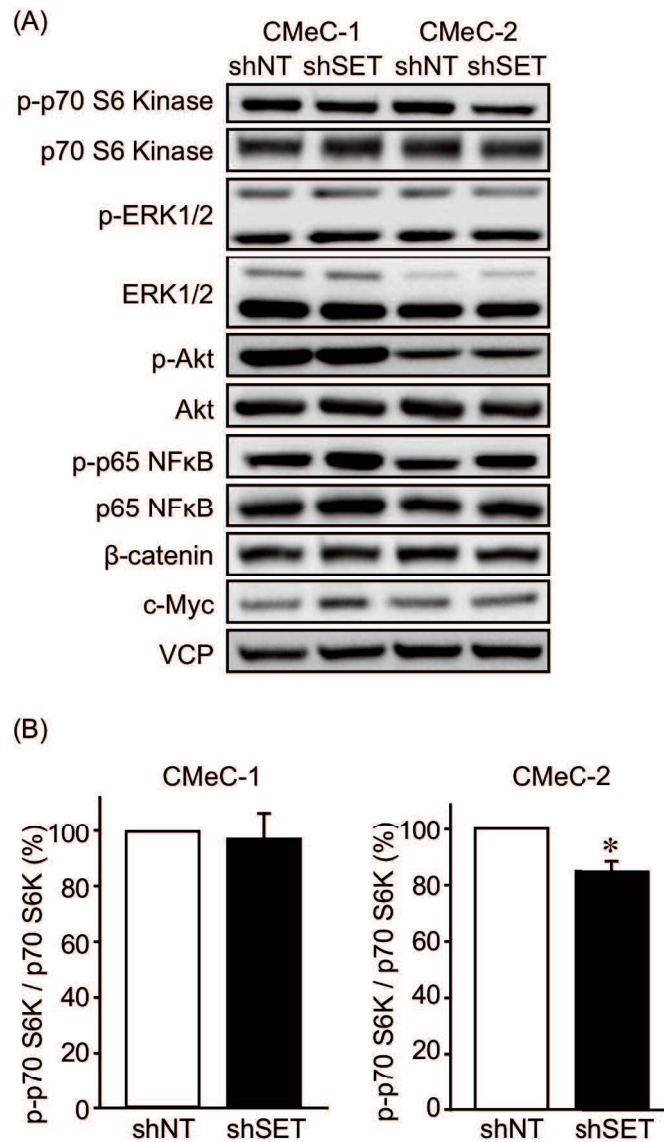


図 13 SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響

shNT および shSET を発現させた CMeC-1 および CMeC-2 を用いて, SET 発現抑制が p70 S6 Kinase, ERK1/2, Akt, NFκB のリン酸化レベルおよび β-catenin, c-Myc のタンパク質発現量に与える影響を western blotting により検討した。VCP はローディングコントロールとして用いた。典型的なデータの一部 (A) とそれぞれ細胞株の shNT を 100%とした p70 S6 Kinase (Thr389) リン酸化レベルの定量図 (B)。N=3。\* :  $P < 0.05$  (shNT との比較)。

### 3-2-6 SET 標的薬がイヌメラノーマ細胞の生存率に与える影響

SET 標的薬 OP449 および FTY720 のイヌメラノーマに対する抗がん効果を検討するため、CMeC-1 と CMeC-2 を OP449 と FTY720 で処置し、細胞生存率を trypan blue exclusion assay により解析した。OP449 は濃度依存的に両細胞株の細胞生存率を低下させたが、その効果は CMeC-2 に対してより強く認められた (図 14A)。また、FTY720 は CMeC-2 に対してのみ細胞生存率の低下を引き起こした。(図 14B)。以上の結果から、SET 標的薬はイヌメラノーマの転移巣由来細胞株である CMeC-2 に対して、より強く抗がん効果を示すことが明らかになった。このことは、shRNA による SET 発現抑制と同様の結果であり、CMeC-2 では SET が悪性化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

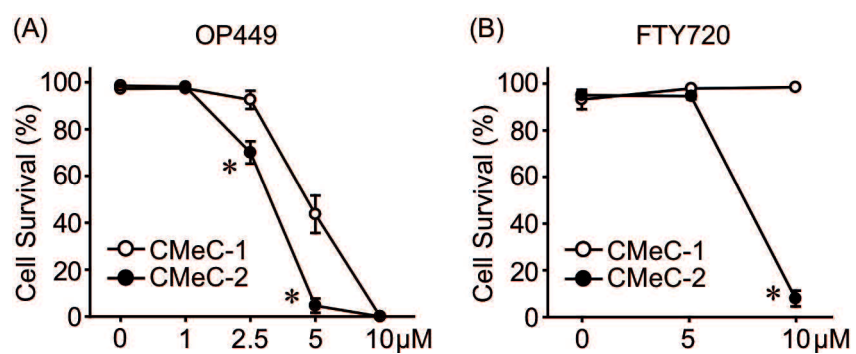


図 14 SET 標的薬がイヌメラノーマ細胞の生存率に与える影響

CMeC-1 と CMeC-2 を OP449 で 24 時間 (A), FTY720 で 48 時間 (B) 処置し、細胞生存率を trypan blue exclusion assay により解析した。それぞれの無処置細胞株の細胞生存の平均を 100%として定量化した。N=3-5。\* :  $P < 0.05$  (CMeC-1 との比較)。

### 3-2-7 SET 標的薬がイヌメラノーマ細胞の PP2A 活性に与える影響

ヒトの乳癌やリンパ腫, 肺癌細胞において, SET 標的薬 OP449 および FTY720 は, PP2A 活性を回復させることで抗がん効果を示すことが報告されている (11-14)。そこで, CMeC-1 と CMeC-2 を OP449 および FTY720 で処置した際の PP2A 活性の変化を検討した。CMeC-1 では PP2A 活性に変化は認められなかったのに対して (図 15A), CMeC-2 では OP449, FTY720 どちらの処置においても PP2A 活性が上昇することが認められた (図 15B)。これらの結果から, OP449 および FTY720 はイヌメラノーマ細胞の SET に作用し, PP2A 活性を回復させる効果を持つことが示唆された。

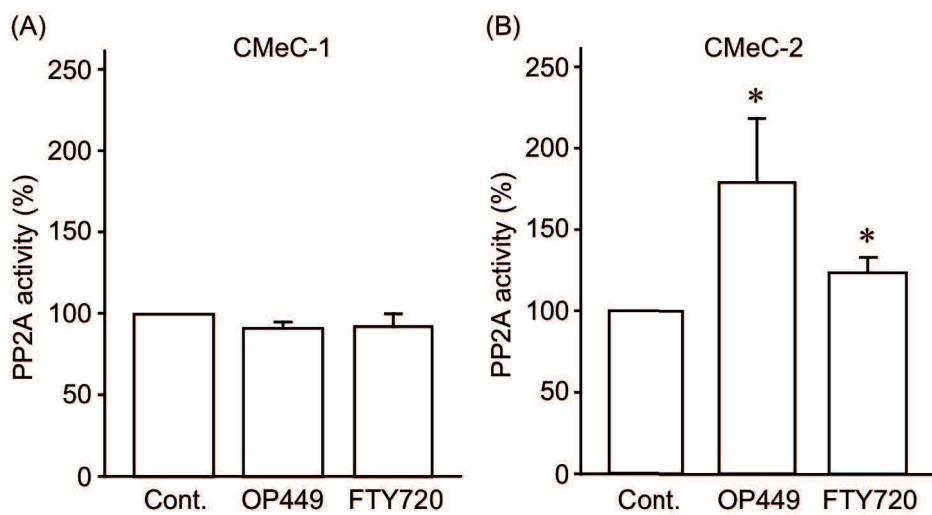


図 15 SET 標的薬がイヌメラノーマ細胞の PP2A 活性に与える影響

CMeC-1 (A)と CMeC-2 (B)を OP449 (2.5  $\mu$ M), FTY720 (10  $\mu$ M) で 2 時間処置し, PP2A 活性を測定した。それぞれの細胞株の Cont.の値を 100%として定量化した。N=3-8。\* :  $P < 0.05$  (Cont.との比較)

### 第3節 考察

本研究では、イヌのメラノーマにおける SET の機能を解明するため、イヌメラノーマ原発巣由来細胞株である CMeC-1 と、CMeC-1 を免疫不全マウスに移植して樹立した転移巣由来細胞株である CMeC-2 を用いて解析を行った。SET 特異的な shRNA を用いた SET 発現抑制は、CMeC-2 に対してのみ細胞増殖能、細胞浸潤能、コロニー形成能を低下させた。また、SET 標的薬 OP449 および FTY720 は、CMeC-2 に対してより強い抗がん効果を示した。これらの結果は、SET がイヌのメラノーマの悪性化に重要な役割を果たし、新たな治療標的として有用である可能性を示す。

#### 3-3-1 SET によるイヌメラノーマ細胞の悪性度上昇の分子機構

SET 発現抑制は CMeC-2 の細胞増殖能、細胞浸潤能、コロニー形成能を低下させたことから、がん細胞の悪性度の上昇に重要な働きをしていると考えられる。ヒト乳癌細胞株において、SET が PP2A 活性を抑制することで c-Myc タンパク質発現を安定化することが報告されているが (47)、SET 発現を抑制した CMeC-2 では c-Myc タンパク質発現量に変化は認められなかった。一般に、がんでは ERK1/2, PI3K/Akt, NFκB, Wnt/β-catenin, mTOR などの細胞内シグナルが亢進している。これらの腫瘍促進性シグナルは PP2A により抑制されることが報告されているが (33)、本研究では、ERK1/2, PI3K/Akt, NFκB, Wnt/β-catenin, c-Myc シグナルは SET 発現抑制により影響は認められなかった。一方、CMeC-2 において p70 S6 kinase Thr389 リン酸化レベルの減少が認められ、mTOR シグナルの抑制が示唆された。p70 S6 kinase の活性化はコロニー形成能や細胞浸潤能を

亢進ことが報告されており (94), p70 S6 kinase Thr389 は, PP2A/B56 複合体により直接脱リン酸化される (95,96)。p70 S6 kinase は上流の mTORC1 によりリン酸化を受けて活性化するが, mTORC1 の活性化を促進する MAP4K3 (GLK) は, Ser170 が PP2A により脱リン酸化されることで活性が抑制される (97,98)。したがって, CMeC-2 における SET 発現抑制は, PP2A 活性を回復し, MAP4K3 や p70 S6 kinase の脱リン酸化を引き起こすことで mTOR シグナルを抑制し, 悪性度の低下を引き起こした可能性が考えられる。しかし, SET 発現抑制による p70 S6 kinase リン酸化レベルの低下はわずかであり, 確認された表現型の変化が mTOR シグナルの抑制のみで引き起こされているとは考え難く, 今回検討したシグナル以外の関与の可能性が考えられる。ヒトのメラノーマにおいて, E2F1 が悪性度に関与することが報告されており (99), CMeC-2 でも同様の分子機構が働いている可能性が考えられる。本研究でも, 第4章において, SET が PP2A を介して転写因子 E2F1 のタンパク質を安定化することで, がんの悪性化に寄与することを明らかにしている。

CMeC-2 は, CMeC-1 をヌードマウスに移植して肺に形成された転移巣から樹立された細胞株であることから, 上皮間葉転換 (EMT : epithelial-mesenchymal transition) により間葉系の形質を獲得している可能性が考えられる。ヒト肺癌細胞において, SET が EMT の誘導を促進することが報告されており (100), CMeC-2 では, SET 発現が抑制されることで間葉系の形質維持が困難になったことが, CMeC-1 よりも SET 発現抑制の効果が強く現れた一因である可能性も考えられる。この点は, E-cadherin や N-cadherin, vimentin などの EMT マーカーの発現を解析する必要があると考える。



CMeC-2 では、SET 発現抑制により、特に細胞浸潤能が大きく低下した。Rac1 は細胞遊走に重要な役割を果たし、がんの浸潤や転移にも関わるが (101)、活性化した Rac1 に SET と PP2A が結合することが明らかになっている (102)。SET $\beta$  は、Ser9 がリン酸化されると核から細胞質に移行して Rac1 と結合し、Rac1 に結合している PP2A の活性を阻害することで細胞遊走を促進する (102)。また、SET の発現上昇は Rac1/JNK シグナルを増強することも報告されており (103)、JNK の活性化は N-cadherin 発現を亢進して EMT を促進することが知られている (104)。したがって、CMeC-2 では Rac1/JNK シグナルの活性化により EMT が誘導されている可能性が考えられる。今後、JNK や p38 MAPK など Rac1 の下流シグナルが、CMeC-2 の SET 発現抑制で変化するのか検討する必要がある。

SET は、PP2A だけでなく Granzyme A-activated DNase (GAAD) との相互作用も報告されている。GAAD は、通常時は SET が阻害タンパク質として結合することで機能が抑制されている。しかし、がん細胞やウイルス感染細胞などが細胞傷害性 T 細胞に攻撃された際には、細胞傷害性 T 細胞の産生する Granzyme A により SET が切断されることで GAAD が核内に移動し、DNA を切断してアポトーシスを引き起こす (105)。本研究では腫瘍免疫に関する解析は行なっていないが、CMeC-2 では GAAD 阻害タンパク質としての SET の機能が、がん悪性化に関与している可能性も考えられる。

### 3-3-2 SET タンパク質発現量とがんの悪性度との関係

ヒトの大腸癌や急性骨髄性白血病では、SET タンパク質発現の上昇とがんの悪性度に正の相関が報告されている (46,106)。一方、本研究では、SET タンパ

ク質発現量がより低い CMeC-2 細胞においてのみ SET 阻害の効果が認められた。これは、SET タンパク質発現量の高さだけが、がん細胞の悪性度への寄与の度合いを決定しているわけではないことを示唆している。SET タンパク質発現量が低い CMeC-2 細胞において、SET 阻害の効果がより強く認められた分子機構は明らかにできていない。しかし、SET は PP2A に直接結合することで阻害作用を示すため、SET と PP2A の結合量の違いを両細胞株で比較することで原因の一端を明らかにできるかもしれない。SET と PP2A の結合量については、SET 自身の遺伝的な変異や翻訳後修飾などを起因とした SET の活性化状態の違いも原因の一つとなっている可能性が考えられる。SET には、その活性や局在に影響を与える翻訳後修飾がいくつか報告されている。例えば、SET $\beta$  の Ser9 や Ser24 が PKC によりリン酸化を受けると SET の二量体化が阻害され、核内から細胞質へと局在が変化する (102,107,108)。また、SET $\beta$  の Ser9 と Ser93 が PI3K $\gamma$  によりリン酸化を受けると PP2A との相互作用が増強されることや (108)、SET $\beta$  の Ser171 が Protein Kinase D2 (PKD2) によりリン酸化されると PP2A 活性の阻害作用が増強されることが報告されている (56)。SET の二量体化は PP2A 活性の阻害作用に影響しないことが報告されているが (58)、翻訳後修飾による局在や PP2A との相互作用の変化が、SET タンパク質発現量が低い CMeC-2 細胞で SET 阻害の効果がより強く認められた一因になっているかもしれない。PP2A は AC 二量体をコア複合体として、ここに B サブユニットのうちの一つが結合することで三量体となって基質特異的な脱リン酸化を引き起こす。アフリカツメガエルでは、SET はすべての PP2A 複合体に結合するのではなく、一部の B サブユニットを含む PP2A 複合体とのみ結合することが報告されている (61)。我々も

第4章において、ヒトの胃癌細胞株においても SET が特定の B サブユニットと特異的に結合することを明らかにしている。このことから、CMeC-1 と CMeC-2 に発現している SET は翻訳後修飾の違いから、結合する PP2A 複合体の種類が異なり、CMeC-2 ではがん細胞の生存や悪性度に影響の強い複合体を選択的に抑制している可能性も考えられる。今後、SET の発現量だけでなく、SET の活性や局在、PP2A への結合性を制御する分子機構の詳細が明らかになれば、SET を標的とした抗がん戦略のバイオマーカーになりうる。

PP2A 活性は、PP2Ac Tyr 307 のリン酸化により抑制されることが知られている (110)。本研究において、CMeC-1 と CMeC-2 では PP2Ac Tyr 307 のリン酸化レベルに有意な差は認められず、PP2A 活性も両細胞間に差はなかった (data not shown)。したがって、SET タンパク質発現量に関係なく両細胞で PP2A 活性が同程度に抑制されていると考えられる。また、SET 標的薬 FTY720 と OP449 は CMeC-2 でのみ PP2A 活性を回復させたことから、CMeC-2 では PP2A 活性の抑制が主に SET により行われており、CMeC-1 では SET 以外の要因により抑制されていた可能性が考えられる。PP2A 活性を抑制する他の要因としては、PP2A 阻害タンパク質 CIP2A や PME-1 が挙げられる (43,111)。イヌ SET とヒト SET が高い相同性を保っていたことや、イヌメラノーマ細胞株においても SET 阻害によって抗がん効果が示されたことから (59,67)、CIP2A や PME-1 がヒトと同様にイヌのがん悪性化に関与する可能性は十分に考えられる。

また、イヌには4つの SET アイソフォーム (SET $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) が存在することが関係している可能性も考えられる。イヌ SET アイソフォームの中で、SET $\alpha$  と SET $\beta$  には PP2A との結合能がある (59)。本研究では、用いた抗体の特異性や

タンパクの大きさから、SET $\beta$  のタンパク発現量のみを比較・検討していると考えられる。そのため、CMeC-1 ではSET $\beta$  タンパク質発現量が高く SET $\alpha$  タンパク質発現量が低い、逆に CMeC-2 ではSET $\beta$  タンパク質発現量が低く SET $\alpha$  タンパク質発現量が高い可能性が考えられる。PP2A との結合能が SET $\alpha$  の方が強い可能性も考えられるため、各アイソフォームの発現量について検討することで今回の結果について明らかにできるかもしれない。また、アルツハイマー病において、SET は Asparaginyl EndoPeptidase (AEP) により Asn175 が特異的に切断されて、N 末端 (I2NTF) と C 末端 (I2CTF) 切断体になることが知られている。これらの切断体はそれぞれが PP2Ac に結合して、その活性を抑制することができる (112–114)。イヌ SET が切断体を形成するかは明らかではないが、CMeC-2 の SET 標的薬感受性には SET 切断体の存在が関与する可能性も考えられる。この点は、それぞれの細胞株における各アイソフォームや切断体のタンパク質発現量、PP2A との結合量を検討することで明らかにできるだろう。

### 3-3-3 SET 標的薬 FTY720 と OP449 の作用機序

当研究室では以前、イヌリンパ腫細胞株を用いた検討において、SET 標的薬 OP449 が SET 発現の高い細胞株に選択的に細胞死を引き起こすことを報告している (35)。しかし本研究では、OP449 と FTY720 は、SET 発現が低い細胞株である CMeC-2 に対してより強く抗がん効果を示した。OP449 および FTY720 はともに SET に直接結合することで PP2A から解離させ、PP2A 活性を回復させると考えられている (62,115)。今回、SET 標的薬 FTY720 と OP449 は CMeC-2 でのみ PP2A 活性の回復が認められたことから、前述のように、CMeC-2 では PP2A

活性の抑制が主に SET により行われており, CMeC-1 では SET 以外の要因により PP2A 活性が抑制されていた可能性が考えられる。この場合, OP449 が CMeC-1 に対しても細胞死を誘導した分子機構は明らかではない。OP449 は SET 阻害以外の作用については明らかになっていないため, SET 標的薬の PP2A 活性化以外の作用が関与していると考えられる。SET は PP2A 非依存的な作用として GAAD に直接結合し, 活性を阻害することでアポトーシスを抑制することが知られている (105)。CMeC-1 では SET が GAAD に結合することでアポトーシスを抑制しており, OP449 が SET を阻害したことで GAAD との結合が解除され, アポトーシスを誘導した可能性が考えられる。また最近, SET は p53 に結合することで, PP2A 非依存的にその活性を抑制することが報告された (116)。したがって, CMeC-1 において p53 と SET の結合が OP449 により阻害されることで, p53 が活性化してアポトーシスを誘導した可能性も考えられる。これらの可能性については, SET と GAAD, p53 との結合の有無や OP449 処置により結合が阻害されるかを検討することで明らかにできるだろう。

本研究では, OP449 と FTY720 の効果に差異が観察された。FTY720 処置は, OP449 処置に比べて PP2A 活性を上昇させる効果が弱かったにも関わらず, より強く細胞死を引き起こした。さらに, FTY720 は CMeC-2 をほぼ死滅させる濃度 (10  $\mu$ M) でも CMeC-1 の生存率に影響はおよぼさなかった。このことは, OP449 と FTY720 の作用機序に違いがある可能性を示唆する。FTY720 は, 生体内で sphingosine kinase 2 によりリン酸化を受ける。リン酸化 FTY720 は, S1P1 受容体に作用してダウンレギュレーションさせるが, SET への阻害作用は低下する (115)。S1P1 受容体の活性化は, がん細胞の生存や血管新生を増強させることで

悪性化に寄与することが報告されている (117)。FTY720 が CMeC-2 細胞に対して選択的に毒性を示した一因として、CMeC-2 細胞では細胞の悪性化に S1P1 受容体の活性化も関与しており、FTY720 の PP2A 非依存的な作用が発揮された可能性が考えられる。また、SET の Tyr122 と Lys209 残基は ceramide や FTY720 が結合して SET を阻害するために必須であるため (64,118)、この残基の翻訳後修飾や変異が SET 標的薬の効果の違いを生んだ可能性もある。本研究では、FTY720 の方がより特異的に細胞死を引き起こす結果が得られたが、PP2A 活性化への効果では OP449 が優位にあった。SET 標的薬をイヌのメラノーマに対する化学療法として用いる上では、SET と PP2A の結合量や S1P1 受容体の関与などを考慮することで、より高い抗がん効果を得ることができるだろう。

## 第4章 SETによるヒト胃癌悪性化分子機構の解明とSET標的薬の 効果

## 第1節 背景および目的

### 4-1-1 ヒトの胃癌

胃癌は、がんによる死亡者数で世界第3位のがんであり、日本を含む東アジアや南アメリカでは特に罹患者数が多い (119)。胃癌は、発症初期には自覚症状が出るのが少なく、かなり進行しても無症状の場合があるため、発見された時点で悪性度が高くなっている場合が多い (120)。胃癌の発生については、喫煙や食生活などの生活習慣がリスク要因として指摘されているが、中でもヘリコバクターピロリ菌の持続感染が引き起こす慢性炎症が重要なリスク要因として知られており、胃癌の原因の約80%はピロリ菌感染であるという報告がされている (121,122)。胃における慢性炎症は、Wnt シグナル亢進による前癌化とプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生の亢進による過形成を引き起こす。モデルマウスに胃癌を発症させるためには、この二つのシグナルの活性化が必須であることから、炎症反応が重要な役割を果たす腫瘍であると考えられる (123)。

早期発見された胃癌に対しては、外科的切除が治療の第一選択になり、化学療法は主に補助療法として用いられている。一方、所属リンパ節以外に転移を認めるなど切除不能な進行・再発胃癌の場合は、化学療法が治療の中心になる。通常、5-fluorouracil, irinotecan, cisplatin などの抗がん剤併用療法が行われるが、副作用が大きいことが問題となっている (124)。また、胃癌患者の10~20%には受容体型チロシンキナーゼ HER2 の発現が認められ (125)、HER2 に対するモノクローナル抗体である trastuzumab が、HER2 陽性の胃癌に対する分子標的抗がん剤として承認されているが、効果は限定的である (126)。このため、胃癌に対する新規治療標的の同定と、新規治療薬の開発が求められている (120)。



#### 4-1-2 本研究の目的

ヒトでは、乳癌や膵臓癌、大腸癌、慢性骨髄性白血病など様々ながん種において SET タンパク質発現上昇と悪性度に正の相関が報告されている (40,46-48)。しかし、胃癌における SET 発現と予後の関係や、SET ががんの悪性化をもたらす分子機構は明らかになっていない。SET は、PP2A 阻害タンパク質の中で唯一、炎症反応を促進する作用が報告されている (127,128)。がん微小環境としての炎症、さらにがん細胞自身における PP2A 阻害という二つの観点から、SET が胃癌の発症や悪性化において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで、本研究では、胃癌における SET の発現様式と機能を解明し、SET 標的薬の効果を検討することを目的に研究を行った。

## 第2節 実験結果

### 4-2-1 SET タンパク質発現量と胃癌患者の予後との関係

SET タンパク質発現量と胃癌患者の予後との関係を解析するために、胃癌患者の組織切片を用いて SET タンパク質の免疫組織化学染色を行った。胃癌患者の情報については表 2 に示す。ステージ I ~ III までの胃癌患者 92 名分の胃癌組織を、SET タンパク質の発現レベルに応じて SET Low (図 16A) と SET High (図 16B) の二つのグループに分けて、予後との相関について Kaplan-Meier 法を用いて解析したところ、SET 発現が高いグループでは、SET 発現が低かったグループに比べて全生存期間 (図 16C) および無再発生存期間 (図 16D) が短く、予後が悪いことが示された。一方、カイ二乗検定による解析の結果、がんのステージ (ステージ I, II のグループと III のグループ) と予後との相関は認められなかった ( $P=0.055$ )。また、がん浸潤深達度 (T ;  $P=0.082$ )、リンパ節転移 (N ;  $P=0.164$ )、リンパ節浸潤 (ly ;  $P=0.058$ )、静脈浸潤 (V ;  $P=0.452$ )、腫瘍組織中の結合織の割合を示す間質量 stroma (中間型 int もしくは髄様型 med か硬性型 sci の 2 グループに分類) においても予後との相関は認められなかった ( $P=0.747$ )。一方、多変量 COX 比較ハザードモデルを用いた解析より、SET 発現量はこれらの要因とは独立して胃癌患者の予後との相関が認められ ( $P=0.046$ )、予後マーカーとなりうることが明らかとなった。このことから、胃癌において SET タンパク質発現量は予後を決める重要な因子であり、胃癌の悪性化に関与している可能性が示唆された。

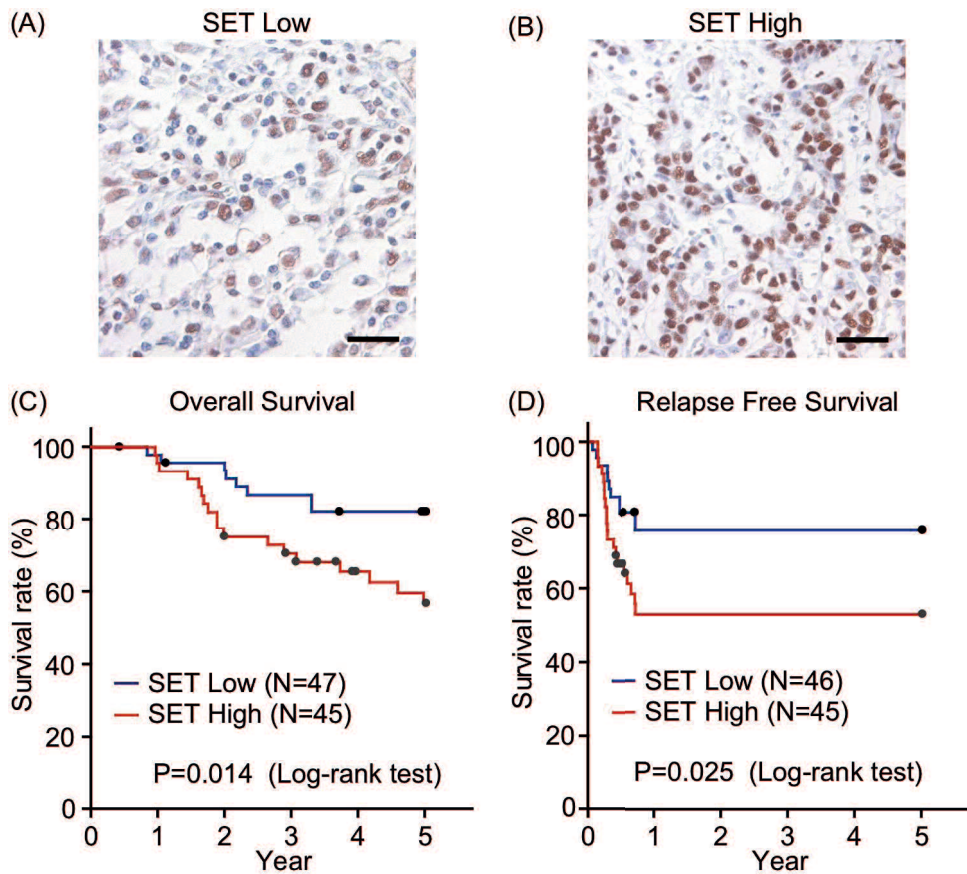


図 16 SET タンパク質発現量とヒト胃癌患者の予後との関係

(A, B) 胃癌組織の SET 免疫組織化学染色像。SET 発現が低いグループ (SET Low) の代表例 (A) と SET 発現が高いグループ (SET High) の代表例 (B)。

スケールバー : 25  $\mu\text{m}$ 。

(C, D) Kaplan-Meier 法を用いて全生存期間 (Overall survival) (C) と無再発生存期間 (Relapse-free survival) (D) を解析した。検定には Log-Rank test を用いた。

#### 4-2-2 胃癌モデルマウスにおける SET 発現の検討

胃癌モデルマウスである *Gan* マウスは、胃粘膜上皮細胞マーカーであるサイトケラチン 19 (K19) のプロモーターを用いて、胃粘膜上皮細胞特異的に Wnt シグナルを活性化した *K19-Wnt1* マウスと、PGE<sub>2</sub> の産生を亢進させた *K19-C2mE* マウスを交配させることで作製される。*Gan* マウス (*K19-Wnt1/C2mE* マウス) は、生後 20 週までに 100% の確率で胃癌を発症することから、有用な胃癌モデルとして用いられている (123)。

胃癌を発症した *Gan* マウスの腫瘍部と非腫瘍部、同腹・同週齢の野生型 (Wildtype) マウスの胃を摘出し、SET タンパク質発現量を免疫組織化学染色および western blotting を用いて、mRNA 発現を real-time PCR を用いて検討した。免疫組織化学染色の結果、野生型マウスの正常な胃組織では、弱い染色像が認められただけであった (図 17A) が、*Gan* マウスの腫瘍部では核内に SET の強い染色像が観察された (図 17B)。また、western blotting の結果、SET タンパク質発現は *Gan* マウスの腫瘍部において顕著に高く、*Gan* マウスの非腫瘍部では野生型マウスの胃と有意な差は認められなかった (図 17C)。さらに、Real-time PCR の結果、*Gan* マウスの腫瘍部において、SET mRNA 発現の顕著な上昇が認められた (図 17D)。これらの結果から、胃癌の発症・悪性化に、SET が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

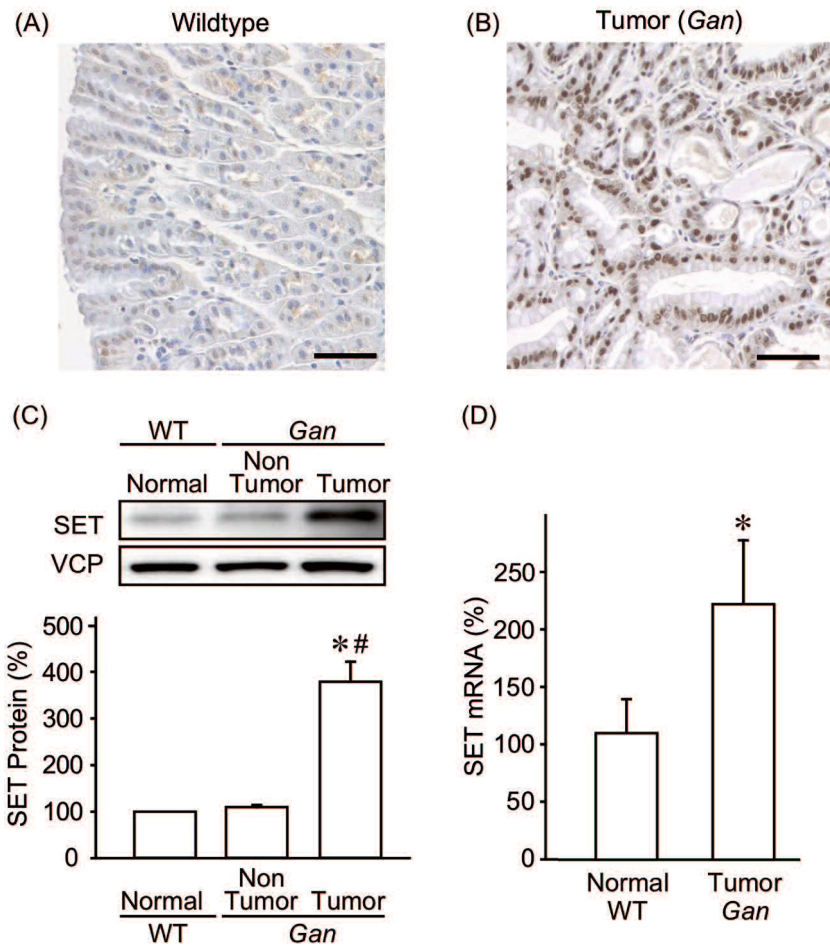


図 17 胃癌モデルマウスにおける SET 発現の検討

(A, B) 野生型マウスの正常な胃組織 (A) と、胃癌モデルマウス *Gan* マウスの腫瘍部 (B) の SET 免疫組織化学染色像。スケールバーは 50  $\mu$ m。

(C) 野生型マウスの正常な胃組織 (Normal) と *Gan* マウスの非腫瘍部 (Non Tumor) と腫瘍部 (Tumor) の SET タンパク質発現量を western blotting によって比較した典型例と Normal の SET 発現量を 100% として相対値で表した定量図。N=4。\* :  $P < 0.05$  (Normal との比較), # :  $P < 0.05$  (Non Tumor との比較)。

(D) 野生型マウスの胃 (Normal), *Gan* マウスの腫瘍部 (Tumor) における SET mRNA 発現量を Real-time PCR によって解析した。N=3-6。\* :  $P < 0.05$  (WT との比較)。

#### 4-2-3 SET 発現抑制細胞株の作製

これまでに、ヒトの乳癌やリンパ腫、膵臓癌などのがん細胞において、SET 発現を抑制すると細胞増殖能やコロニー形成能が減少することが報告されている (40,47,48)。そこで、SET 発現抑制の影響を検討するために、胃癌細胞株を含む 11 種類のがん細胞株 (胃癌細胞株 MKN45, MKN74, 大腸癌細胞株 HCT116, SW620, メラノーマ細胞株 A2058, COLO679, 肺癌細胞株 A549, PC9, 骨肉腫細胞株 HOS, Saos2, 乳癌細胞株 MCF7) に対して、レンチウイルスベクターを用いて non-target shRNA (shNT) および SET に対する shRNA (shSET) を安定的に発現させ、SET 発現を抑制した細胞を作製した。Western blotting により SET タンパク質発現を解析したところ、すべての細胞株で顕著な発現低下が観察された (図 18)。

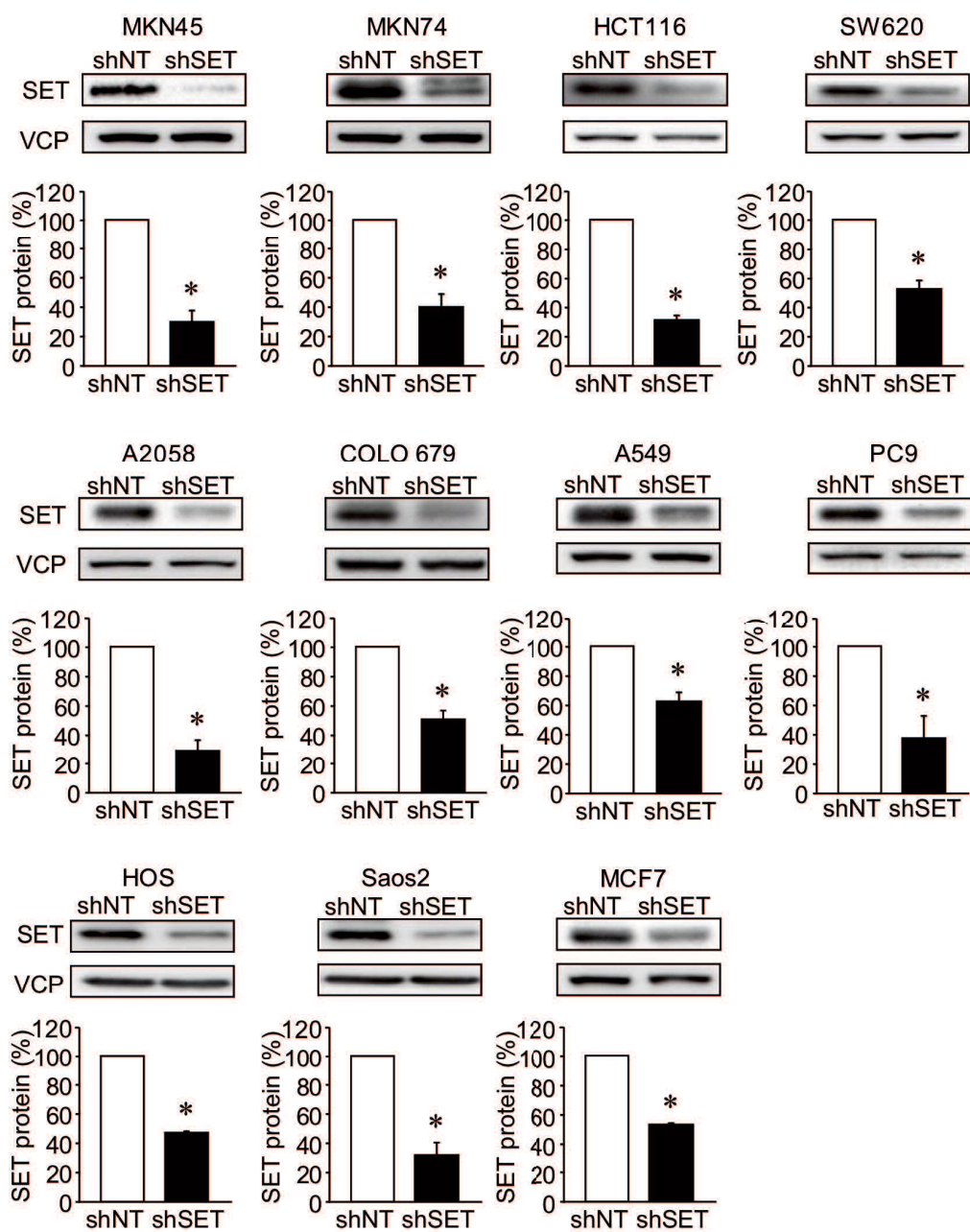


図 18 SET 発現抑制細胞株の作製

各種がん細胞株に shNT もしくは shSET を安定的に発現させ、SET のタンパク質発現量の変化を western blotting により解析した。それぞれの細胞株における典型的なデータの一部と SET のタンパク質発現量を、shNT を 100%として相対値で表した定量図。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3-4。\* :  $P < 0.05$  (shNT との比較)。

#### 4-2-4 SET 発現抑制が細胞増殖能に与える影響

細胞増殖能の高さは、がん細胞の悪性度の指標の一つである。そこで、前項(4-2-3)において作製した SET 発現抑制細胞株を用いて、SET 発現抑制が、がん細胞の細胞増殖能に与える影響を、Cell Count Kit 8 (CCK8) を用いて検討した。SET 発現抑制により、11 細胞株中 5 細胞株 (PC9, A2058, COLO679, HOS, Saos2) で細胞増殖能の有意な低下が認められたが、Saos2 を除いてその変化はわずかであった (図 19)。



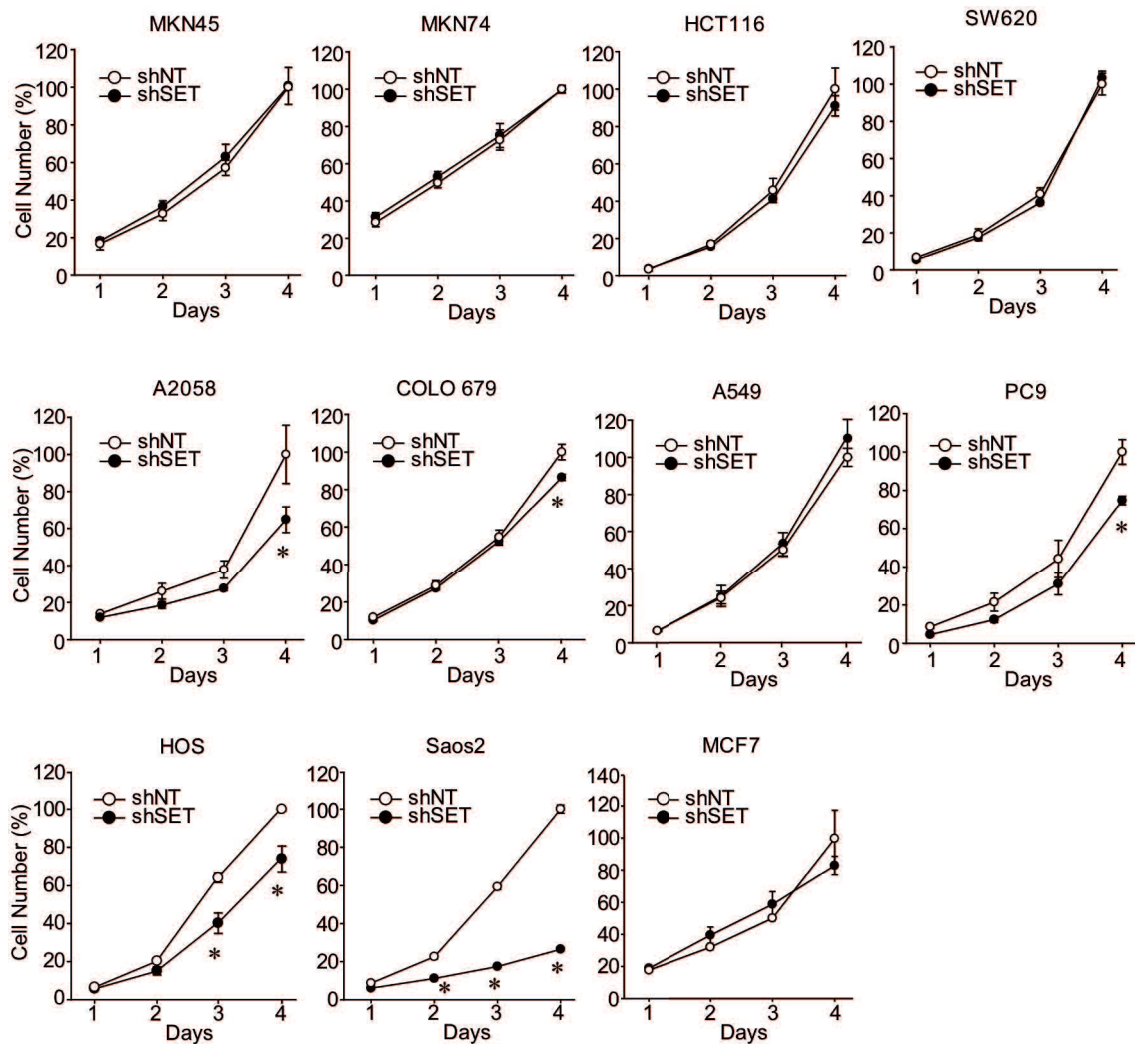


図 19 SET 発現抑制が細胞増殖能に与える影響

shNT および shSET を発現させた各種がん細胞株 11 種類をそれぞれ 4 日間培養し、CCK8 を用いて細胞増殖能を解析した。shNT の 4 日目の細胞数を 100% とし、相対値で表した。N=4。\* :  $P < 0.05$  (shNT との比較)。

#### 4-2-5 SET 発現抑制がコロニー形成能に与える影響

コロニー形成能は、単一のがん細胞が増殖してコロニーを形成する能力であり、その高さはがん細胞の悪性度の指標の一つである。コロニー形成能は、低密度でディッシュ上に播種するコロニー形成試験や、寒天培地中で培養することで足場非依存性の環境を再現したソフトアガーコロニー形成試験によって解析できる。これらの実験系を用いて SET 発現抑制がコロニー形成能 (A549, HOS, MCF7, Saos2) と足場非依存性増殖能 (MKN45, MKN74, HCT116, SW620, A2058, COLO679, PC9) に与える影響を検討した。SET 発現抑制により、全ての細胞株において形成されるコロニー数が減少した (図 20)。SET 発現抑制の効果が細胞増殖能に対してよりも、コロニー形成能に対してより強く現れたことから、SET はがん細胞の細胞増殖よりも幹細胞性の維持に深く関与している可能性が示唆された。

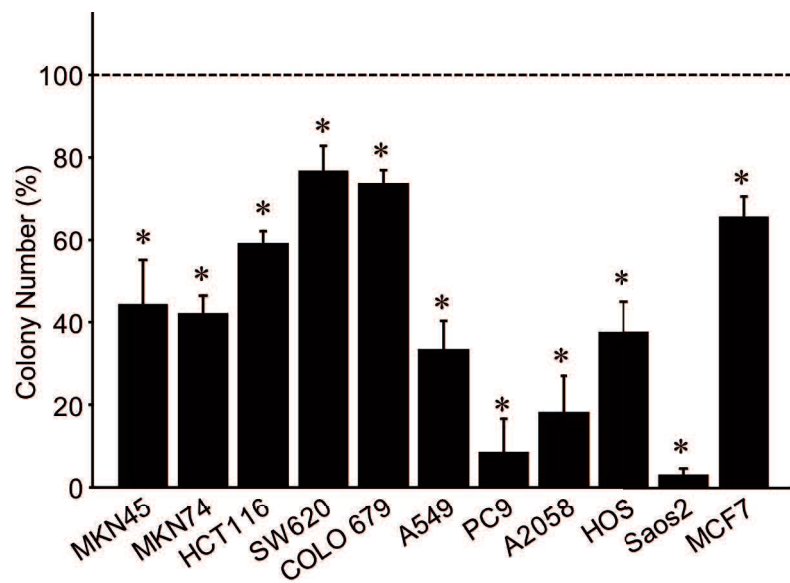


図 20 SET 発現抑制がコロニー形成能に与える影響

shNT および shSET を発現させた各種がん細胞株 11 種類を用いてコロニー形成試験もしくはソフトアガーコロニー形成試験を行い、コロニー形成能を解析した。shNT を発現させた細胞のコロニー数を 100% として相対値で表した定量図。

N=4。\* :  $P < 0.05$  (shNT との比較)。

#### 4-2-6 SET 発現抑制が胃癌細胞の生体内での成長に与える影響

胃癌細胞株である MKN45 と MKN74 において、SET 発現抑制は細胞増殖には影響せず、コロニー形成能を低下させたことから、胃癌において SET は幹細胞性の維持に寄与している可能性が考えられる。そこで、SET 発現抑制が生体内での腫瘍成長に与える影響を検討するため、免疫不全マウスを用いた異種移植 (Xenograft) を行った。免疫不全マウスの左後肢皮下に shNT を安定発現させた MKN45 を、右後肢皮下に shSET を安定発現させた MKN45 を移植し、形成された腫瘍の大きさを 35 日間測定し、最終日に腫瘍を取り出して重量を測定した。SET 発現抑制は、免疫不全マウス生体内での腫瘍の成長を抑制した (図 21A)。また、移植後 35 日目のマウスから摘出した腫瘍の重量も SET 発現抑制により減少した (図 21B)。

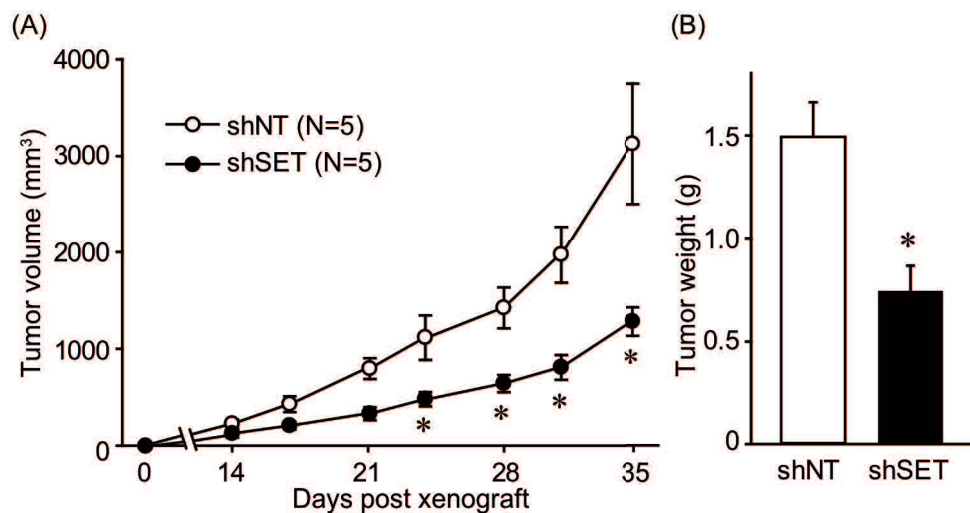


図 21 SET 発現抑制が胃癌細胞の生体内での成長に与える影響

免疫不全マウスの皮下に MKN45 shNT および MKN45 shSET を移植し，腫瘍の成長を測定した。(A) 移植後 35 日間の腫瘍の大きさの経時的変化。(B) 移植後 35 日目のマウスから摘出した腫瘍の重量の定量図。N=5。\* :  $P < 0.05$  (shNT との比較)。

#### 4-2-7 SET 発現抑制に対するレスキュー実験

ヒトの SET には、SET $\alpha$  と SET $\beta$  の相同性の高いアイソフォームが存在し、shSET はどちらのアイソフォームの発現も抑制する。SET 発現抑制による胃癌細胞のコロニー形成能の低下にどちらのアイソフォームが関与しているのか検討するためにレスキュー実験を行った。SET 発現を抑制した胃癌細胞株 MKN74 に対して、shRNA 抵抗性の SET $\alpha$  と SET $\beta$  をそれぞれ発現させてコロニー形成試験を行った。SET 発現抑制により減少するコロニー数が、SET $\alpha$  のレスキュー発現によりほぼ完全に回復した (図 22A)。一方、SET $\beta$  のレスキュー発現では回復傾向であったが有意な変化は認められなかった。このことから、胃癌細胞のコロニー形成能には、主に SET $\alpha$  が関与していると考えられた。

また、SET 発現抑制による胃癌細胞のコロニー形成能の低下に PP2A が関与しているかを検討するために、SET 発現を抑制した胃癌細胞株 MKN74 に対して、PP2A 複合体の酵素活性サブユニットである PP2Ac に特異的な shRNA を発現させ、コロニー形成能に与える影響を検討した。その結果、SET 発現抑制により減少するコロニー数が、PP2A 発現抑制により有意に回復した (図 22B)。したがって、胃癌細胞のコロニー形成能には、SET による PP2A 活性の抑制が重要な役割を果たしている可能性が明らかになった。

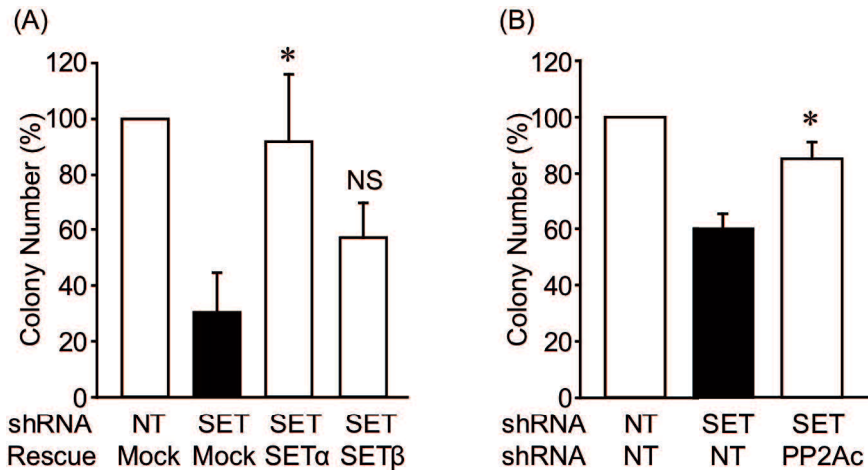


図 22 SET 発現抑制に対するレスキュー実験

(A) SET 発現を抑制した MKN74 に対して、shRNA 抵抗性の SET $\alpha$  と SET $\beta$  をそれぞれ発現させ、SET のレスキュー発現がコロニー形成能に与える影響を解析した。Mock は empty vector plasmid を導入した細胞であり、コントロールとして用いた。shNT/Mock のコロニー形成数を 100% として、相対値で示した定量図。

\* :  $P < 0.05$ , NS : 有意差なし (shSET/Mock との比較)。

(B) SET 発現を抑制した MKN74 に対して、PP2Ac 特異的な shRNA を発現させ、PP2A 活性の抑制がコロニー形成能に与える影響を解析した。shNT/Mock のコロニー形成数を 100% として、相対値で示した定量図。\* :  $P < 0.05$  (shSET/shNT との比較)。

#### 4-2-8 SET 発現が胃上皮オルガノイドに与える影響

胃上皮細胞の幹細胞性に対する SET 発現上昇の影響を解析するため、胃上皮オルガノイド形成試験を行った。C57BL/6J マウスの胃を摘出して胃上皮細胞を単離し、マトリゲル中でオルガノイド用培地を用いて培養すると、幹細胞由来のオルガノイドと呼ばれる組織様構造体が形成される。オルガノイド形成は幹細胞性に依存することから、形成数を測定することで幹細胞性を評価できる (129)。上皮細胞を培養する段階でウイルスベクターを感染させ、SET $\alpha$  と SET $\beta$  をそれぞれ過剰発現させたところ、SET $\alpha$  と SET $\beta$  発現によりオルガノイドの形成数が増加した (図 23A, B)。また、real-time PCR を行ったところ、SET $\alpha$  発現により幹細胞マーカーである CD44 の mRNA 発現量が有意に増加したが、SET $\beta$  発現細胞で増加は認められなかった (図 23C)。これらの結果から、SET $\alpha$  と SET $\beta$  はどちらも胃癌細胞の幹細胞性を上昇させると考えられるが、SET $\beta$  では CD44 mRNA 発現量が増加していなかったことから、その作用は SET $\alpha$  と比較して弱い可能性が考えられた。



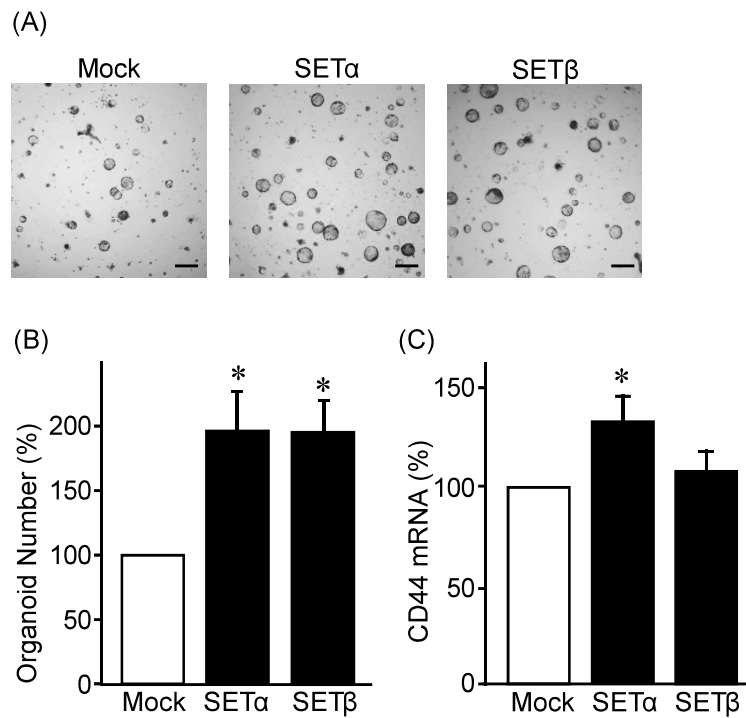


図 23 SET 発現が胃上皮オルガノイドに与える影響

(A, B) 胃上皮オルガノイド形成に対する SETα および SETβ 過剰発現の影響を解析した。代表的な写真 (A) と、Mock のオルガノイド形成数を 100% として相対値で表した定量図 (B)。Mock は empty vector plasmid を導入したものであり、コントロールとして用いた。スケールバー：400 μm。\*： $P < 0.05$  (Mock との比較)。N=3。

(C) 胃上皮オルガノイドの CD44 mRNA 発現量に対する SETα および SETβ 過剰発現の影響を real-time PCR で解析した。Mock の mRNA 発現量を 100% として相対値で表した定量図。Mock は empty vector plasmid を導入したものであり、コントロールとして用いた。\*： $P < 0.05$  (Mock との比較)。N=4。

#### 4-2-9 SET 発現抑制が c-Myc タンパク質発現量に与える影響

ヒトの乳癌やリンパ腫、膵臓癌などのがん細胞において、SET 発現抑制はがん促進性の転写因子 c-Myc タンパク質発現を低下させることで抗がん効果を発揮することが報告されている (40,47)。そこで、SET 発現抑制を行った 11 種類のがん細胞株 (MKN45, MKN74, HCT116, SW620, A2058, COLO679, A549, PC9, HOS, Saos2, MCF7) を用いて、c-Myc のタンパク質発現量を western blotting により解析した (図 24)。c-Myc タンパク質発現量が低下していたものは 11 細胞株中 2 細胞株 (HCT116, Saos2) のみであった。これらの結果から、SET によるがん細胞の悪性化には c-Myc タンパク質発現上昇以外の分子機構が存在する可能性が示された。

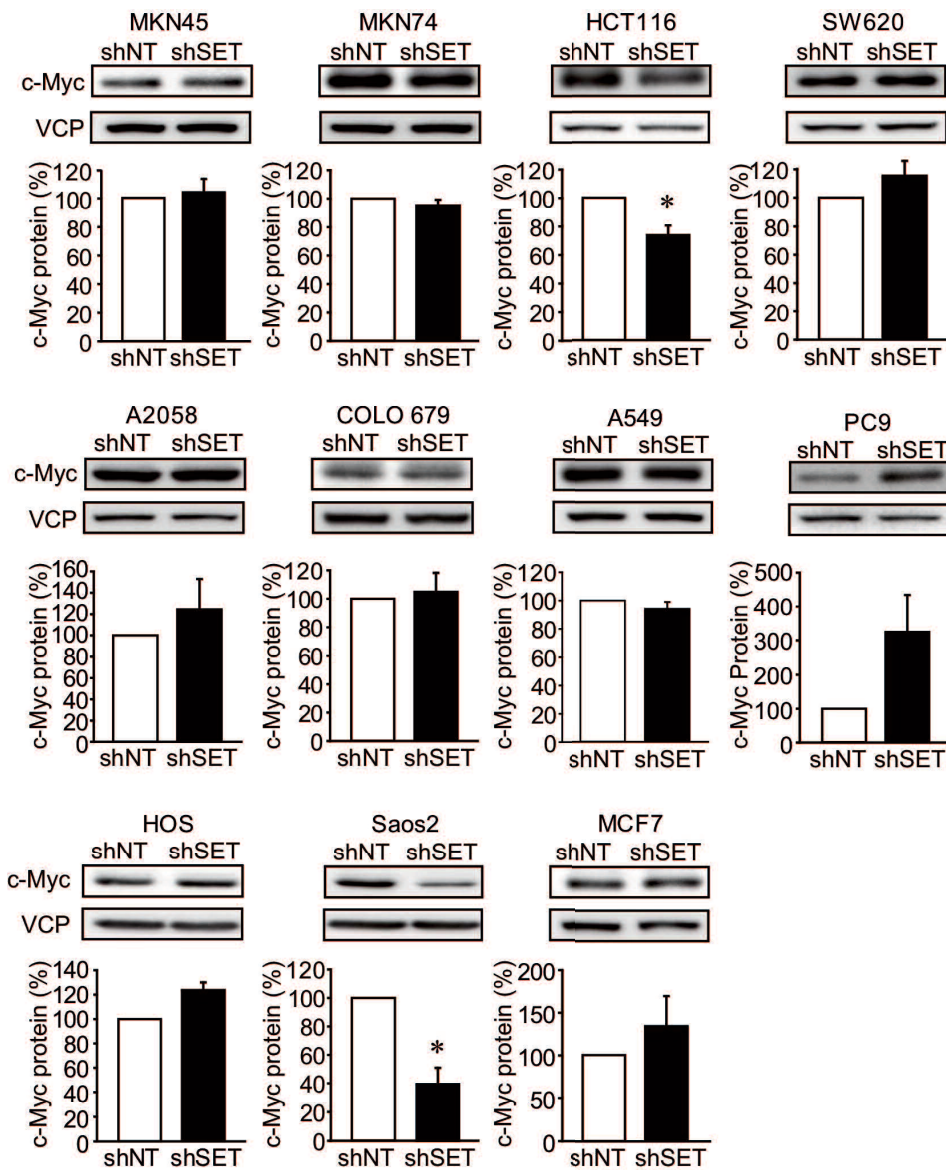


図 24 SET 発現抑制が c-Myc タンパク質発現量に与える影響

各種がん細胞株に shNT もしくは shSET を安定的に発現させ、c-Myc のタンパク質発現量の変化を western blotting により解析した。それぞれの細胞株における典型的なデータの一例と c-Myc タンパク質発現量を、shNT を 100%として相対値で表した定量図。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3-4。\* :  $P < 0.05$  (shNT との比較)。

#### 4-2-10 SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響

SET 発現抑制により，c-Myc に加えて PI3K/Akt シグナル，ERK1/2 シグナル，Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル，NF $\kappa$ B シグナル，mTOR シグナルの活性が低下することが報告されている (40,51,130,131)。そこで，胃癌における SET 発現の上昇がいずれの細胞内シグナルに影響して，悪性化に寄与しているのかを検討するため，SET 発現を抑制した MKN45 を用いて各種シグナル伝達因子の発現量およびリン酸化レベルの変化を western blotting で解析した。しかし，これらのシグナルに SET 発現抑制による変化は認められなかった (図 25)。このことから，胃癌細胞における SET 発現抑制による幹細胞性の低下には，これまでに報告の無い新たな因子が関与している可能性が示唆された。

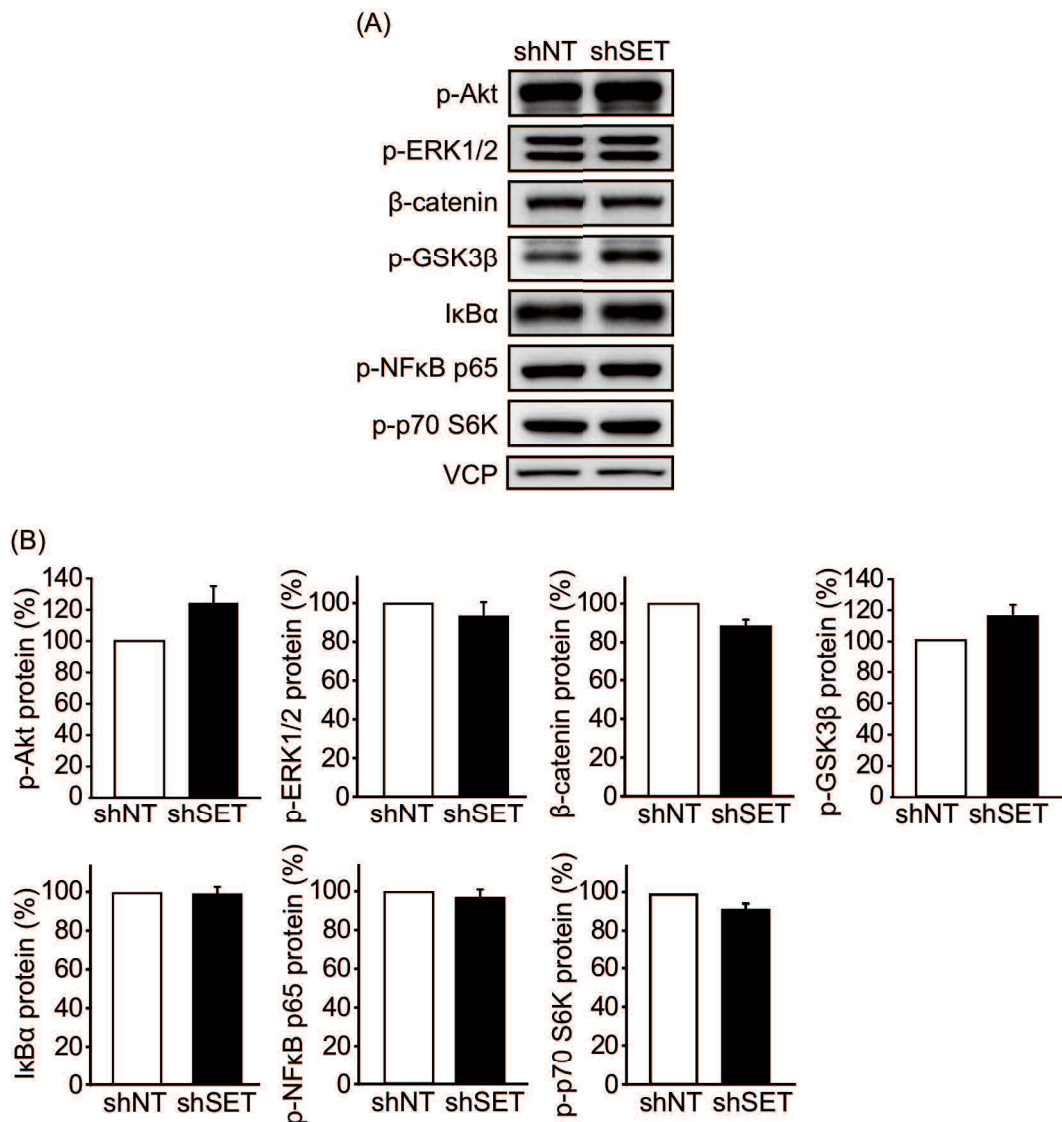


図 25 SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響

SET 発現抑制が MKN45 細胞の各種細胞内シグナルに与える影響を western blotting により解析した。Akt リン酸化, ERK1/2 リン酸化, β-catenin タンパク質, GSK-3β リン酸化, IκBα タンパク質, NFκB p65 タンパク質, p70 S6K リン酸化の典型的な例 (A) と shNT を 100% として相対値で示した定量図 (B)。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3-4。

#### 4-2-11 SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響のマイクロアレイを用いた解析

SET 発現抑制による細胞内シグナルの変化を網羅的に解析するために、マイクロアレイを行った。shNT および shSET を安定的に発現させた MKN45 細胞から RNA を抽出し、26,083 遺伝子についてマイクロアレイを行なったところ、mRNA 発現量が 2 倍以上増加していたものが 525、2 倍以上減少していたものが 177 確認された。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いて、いずれの転写因子の活性が変化しているか検討したところ、SET 発現抑制により E2F ファミリーのターゲット因子群の mRNA 発現量の減少が確認された(図 26A)。さらに、SET 発現抑制は、E2F ファミリーの中でも E2F1 の活性化により転写が促進されるターゲット因子群の mRNA 発現量の減少(図 26B)と、E2F1 の活性化により転写が抑制されるターゲット因子群の mRNA 発現量の増加(図 26C)を引き起こすことが認められた。このことから、SET 発現抑制は E2F1 の活性を阻害している可能性が示された。

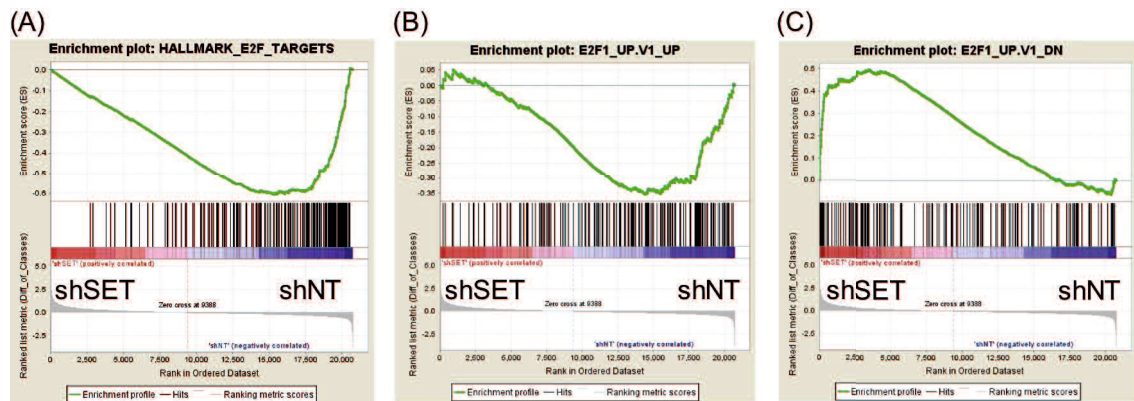


図 26 SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響のマイクロアレイを用いた解析

SET 発現抑制の細胞内シグナルへの影響を網羅的に検討するために、マイクロアレイを行った。(A) 転写因子 E2F ファミリーのターゲット因子群、(B) E2F1 の活性化により転写が促進されるターゲット因子群、(C) E2F1 の活性化により転写が抑制されるターゲット因子群、の mRNA 発現量の変化について GSEA を用いて解析した。

#### 4-2-12 SET 発現抑制が E2F1 発現に与える影響

マイクロアレイの結果, SET 発現抑制で転写因子 E2F1 活性の低下が示唆されたことから, SET 発現抑制が E2F1 タンパク質発現に与える影響を検討した。SET 発現を抑制したがん細胞株 11 種類を用いて western blotting を行ったところ, 11 細胞株中 7 細胞株 (MKN45, MKN74, A549, PC9, A2058, COLO 679, MCF7) において, E2F1 タンパク質発現量の減少が確認された (図 27)。この結果から, 胃癌細胞を含めた多くのがん細胞株において, SET 発現抑制による幹細胞性の低下に, E2F1 タンパク質発現量の低下が関与する可能性が示された。



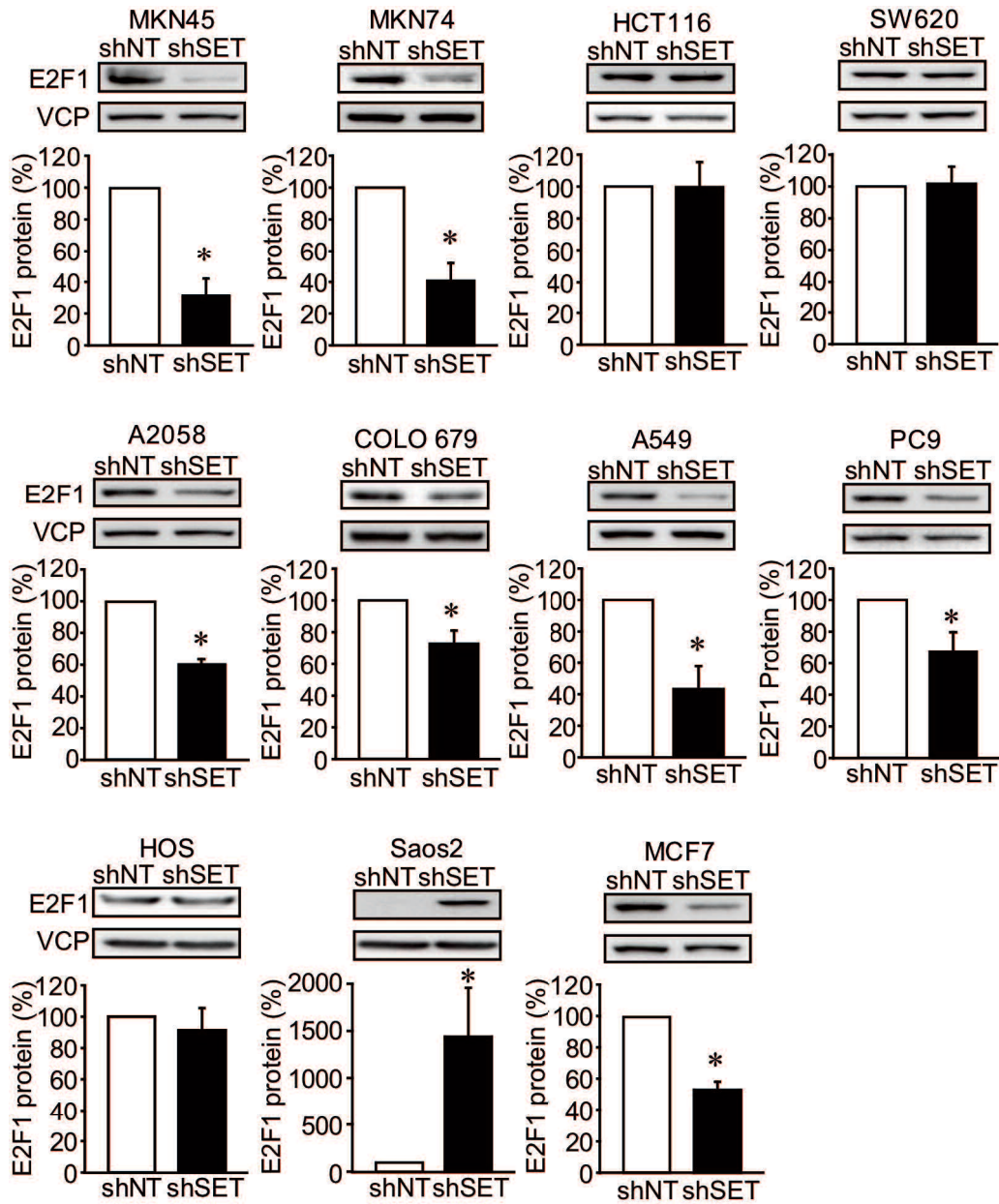


図 27 SET 発現抑制が E2F1 発現に与える影響

各種がん細胞株の SET 発現抑制が E2F1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により検討した。それぞれの細胞株における典型的なデータの一例と shNT の E2F1 タンパク質発現量を 100% として相対値で示した定量図。VCP はローディングコントロールとして用いた。\*:  $P < 0.05$  (shNT との比較)。N=3-4。

#### 4-2-13 *Gan* マウスにおける E2F1 タンパク質発現量の検討

*Gan* マウスの腫瘍部では SET タンパク質発現が上昇していたことから、次に *Gan* マウスの腫瘍部における E2F1 タンパク質発現量を western blotting により解析した。野生型マウスの正常な胃組織と *Gan* マウスの非腫瘍部および腫瘍部で E2F1 タンパク質発現量を比較したところ、*Gan* マウスの腫瘍部において顕著な発現量の増加が認められた (図 28)。

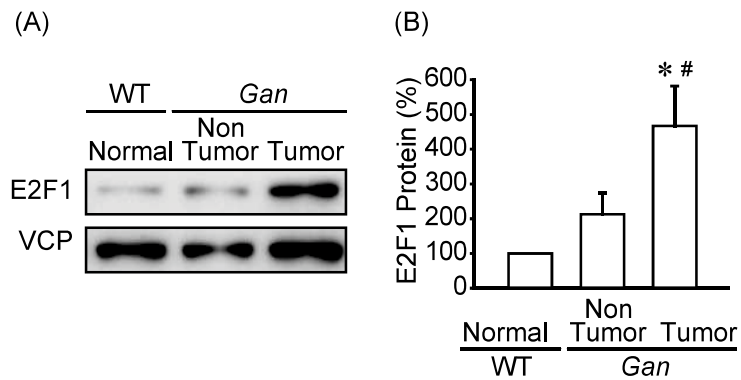


図 28 *Gan* マウスにおける E2F1 タンパク質発現量の検討

野生型マウスの正常な胃組織 (Normal), *Gan* マウスの非腫瘍部 (Non Tumor) および腫瘍部 (Tumor) の E2F1 タンパク質発現量を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と Normal の SET 発現量を 100%として相対値で表した定量図 (B)。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=4。\* :  $P < 0.05$  (Normal との比較), # :  $P < 0.05$  (Non Tumor との比較)。

#### 4-2-14 SET 発現抑制に対する E2F1 レスキュー発現の影響

E2F1 が SET による幹細胞性の維持に関与している可能性を明らかにするため、SET 発現抑制により E2F1 発現が低下した胃癌細胞株 MKN74 に対して E2F1 を発現させ、コロニー形成試験を行った。SET 発現抑制により減少するコロニー数が、E2F1 のレスキュー発現により回復することが明らかとなった (図 29)。このことから、SET は E2F1 を介して胃癌の悪性度を上昇させていると考えられた。

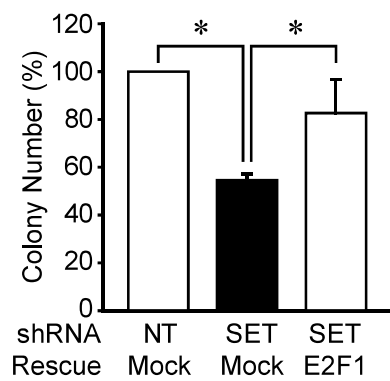


図 29 SET 発現抑制に対する E2F1 レスキュー発現の影響

SET 発現を抑制した MKN74 に対して、E2F1 をレスキュー発現させ、コロニー形成能に与える影響を解析した。Mock は empty vector plasmid を導入した細胞のことであり、コントロールとして用いた。shNT/Mock のコロニー数を 100%として相対値で示した定量図。\* :  $P < 0.05$  (shSET/Mock との比較)。N=5。

#### 4-2-15 SET 発現抑制が幹細胞マーカー発現に与える影響

これまでの実験結果から、SET は E2F1 を介して胃癌細胞の幹細胞性の維持に寄与している可能性が示唆された。そこで、E2F1 により転写が誘導されることが報告されている幹細胞マーカー KLF4 (99,132) の mRNA 発現量を real-time PCR を用いて検討した。MKN45, MKN74 細胞において、SET 発現抑制により KLF4 mRNA 発現量が減少した (図 30)。このことから、SET 発現抑制による胃癌細胞株の幹細胞性の低下には、E2F1 発現量の低下を介した KLF4 発現抑制性が関与している可能性が考えられた。

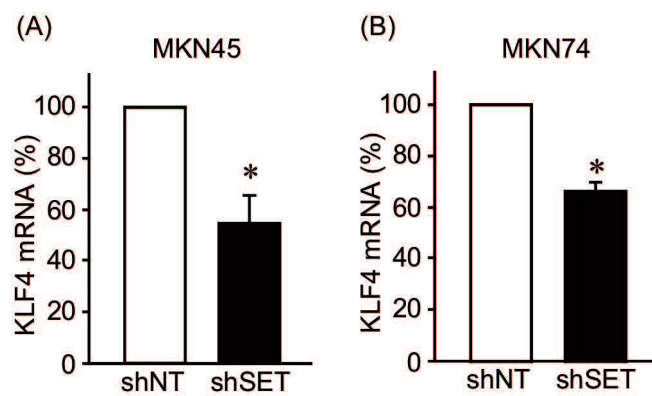


図 30 SET 発現抑制が幹細胞マーカー発現に与える影響

SET 発現抑制が，KLF4 の mRNA 発現量に与える影響を real-time PCR を用いて検討した。MKN45 (A) と MKN74 (B) の shNT を 100%として，相対値で示した定量図。N=4。\* :  $P < 0.05$  (shNT との比較)。

#### 4-2-16 SET による E2F1 の発現調節分子機構の検討

胃癌細胞において E2F1 タンパク質発現量の低下が観察されたことから、SET 発現抑制が E2F1 の mRNA 発現量に与える影響を real-time PCR を用いて検討した。SET 発現を抑制した MKN45 細胞において、E2F1 mRNA 発現量に変化は認められなかった (図 31A)。この結果から、SET は E2F1 のタンパク質発現量を翻訳またはタンパク質分解の段階で調節している可能性が示された。

E2F1 は、PP2A により直接脱リン酸化を受けることで、分解が促進される(41)。そこで、HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した E2F1 を発現させ、PP2A 阻害剤である okadaic acid (OA) が E2F1 リン酸化レベルに与える影響を検討した。OA 処置は、E2F1 タンパク質の安定化をもたらす Ser364 のリン酸化レベルを顕著に上昇させ、さらに E2F1 タンパク質発現量を増加させた (図 31B)。このことから、胃癌細胞において SET は、PP2A を阻害することで E2F1 の脱リン酸化を防ぎ、その結果 E2F1 タンパク質発現量が増加することで胃癌細胞の悪性度を上昇させている可能性が示唆された。



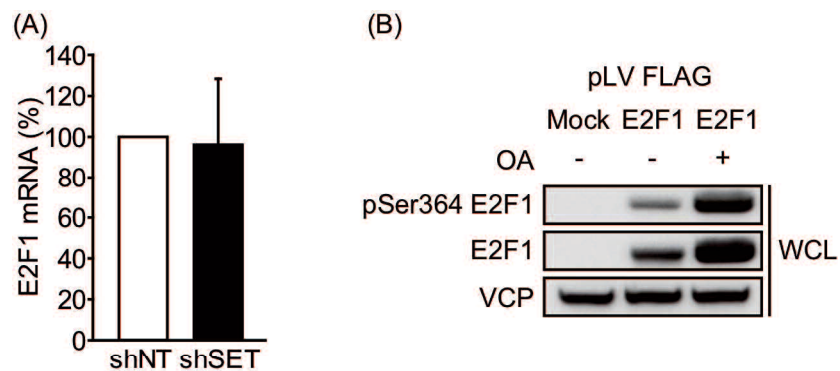


図 31 SET による E2F1 の発現調節分子機構の検討

(A) SET 発現抑制が MKN45 細胞の E2F1 mRNA 発現に与える影響を real-time PCR により検討した。shNT の E2F1 mRNA 発現量を 100%として相対値で示した定量図。N=4。

(B) HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した E2F1 を過剰発現させ、okadaic acid (OA) で処置した際の E2F1 Ser364 リン酸化レベルを western blotting で検討した。Mock は empty vector plasmid を導入した細胞のことであり、コントロールとして用いた。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。

#### 4-2-17 SET-PP2A-E2F1 の相互作用の検討

アフリカツメガエルの SET は、一部の B サブユニットを含む PP2A 複合体と特異的に結合することが報告されている (61)。そこで、ヒト胃癌細胞では、いずれの B サブユニットを含む PP2A 複合体が SET と結合するのかを検討するため、MKN45 細胞に FLAG タグを付加した B55 $\alpha$ , B56 $\alpha$ , PR72 をそれぞれ発現させ、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降を行った。その結果、MKN45 細胞では、SET は B56 $\alpha$  に特異的に結合することが明らかになった。また、E2F1 も B56 $\alpha$  に特異的に結合していた (図 32A)。さらに、FLAG タグを付加した SET $\alpha$  を用いて免疫沈降を行ったところ、B56 $\alpha$  との結合が認められた (図 32B)。これらの結果から、B56 を含む PP2A 複合体が E2F1 の脱リン酸化を引き起こし、SET はこの複合体と結合することで E2F1 に対する PP2A 活性を抑制している可能性が示された。

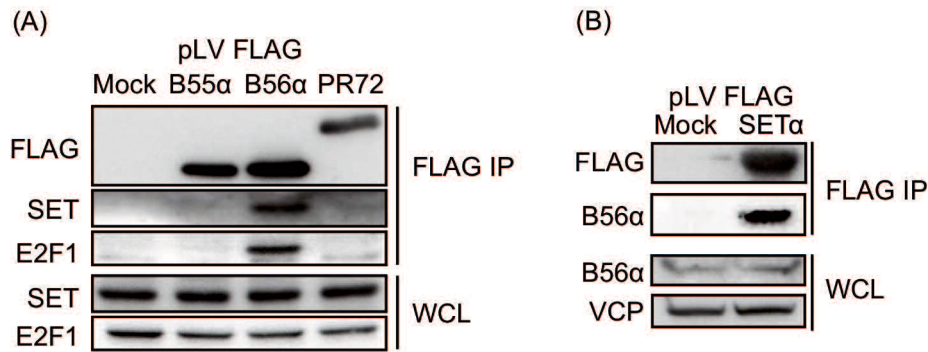


図 32 SET-PP2A-E2F1 の相互作用の検討

(A) MKN45 細胞に pLV FLAG vector plasmid を用いて、FLAG タグを付加した B55α, B56α, PR72 をそれぞれ発現させ、FLAG M2 Beads を用いて免疫沈降を行い、western blotting で SET および E2F1 との結合を解析した。Mock は empty vector plasmid を導入した細胞のことであり、コントロールとして用いた。N=4。

(B) MKN45 細胞に pLV FLAG vector plasmid を用いて、FLAG タグを付加した SETα を発現させて FLAG M2 Beads を用いて免疫沈降を行い、western blotting で B56α との結合を解析した。Mock は empty vector plasmid を導入した細胞のことであり、コントロールとして用いた。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。

#### 4-2-18 胃癌細胞株に対する SET 標的薬の効果

SET 標的薬である OP449 は、SET と PP2A の結合を阻害することで PP2A を活性化させ、抗がん効果を示す (40,47,66)。そこで、OP449 の胃癌細胞株に対する効果を検討した。MKN74 細胞を 1  $\mu$ M の OP449 で処置すると、SET 発現抑制時と同様に、細胞増殖には影響を与えなかったが、コロニー形成能の低下が認められた (図 33A, B)。また、同濃度の OP449 で処置した際の E2F1 と SET のタンパク質発現量を western blotting で解析したところ、MKN74 細胞、MKN45 細胞どちらにおいても E2F1 タンパク質発現量の低下が認められたが、SET タンパク質発現量には変化は認められなかった (図 33C-H)。これらの結果から、SET 標的薬 OP449 は、shRNA を用いた SET 発現抑制時と同様に、SET を阻害することで E2F1 の分解を促進し、胃癌細胞の悪性度を低下させる可能性が示唆された。

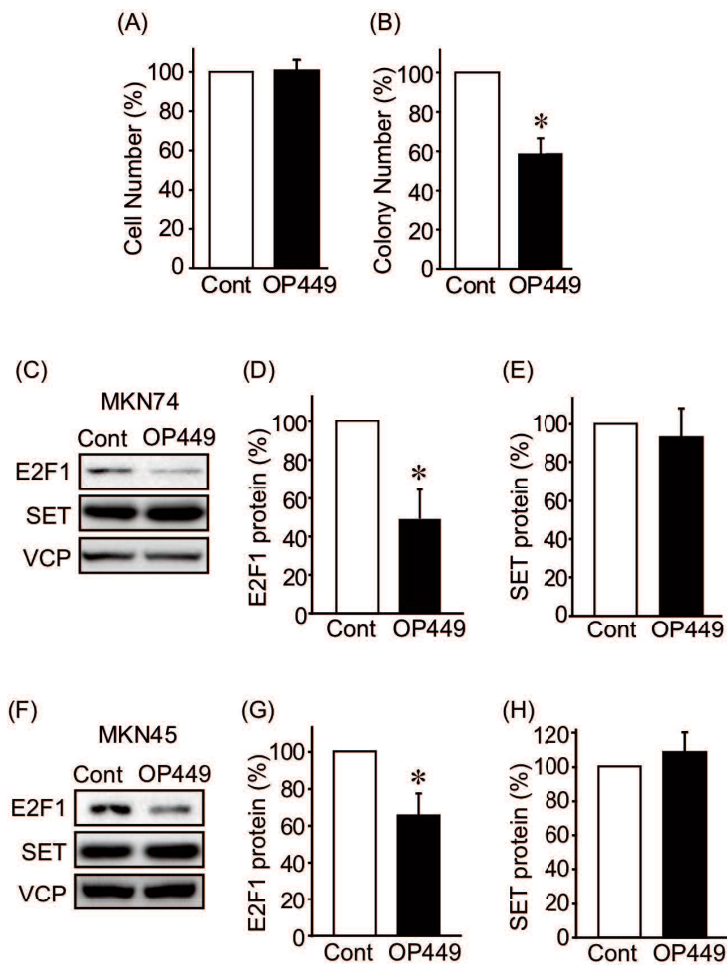


図 33 胃癌細胞株に対する SET 標的薬の効果

(A, B) OP449 (1  $\mu$ M) が MKN74 細胞の細胞生存率 (A) およびコロニー形成能 (B) に与える影響を, CCK8 およびコロニー形成試験により解析した。非処置細胞 (Cont) を 100%として相対値で示した定量図。N=4。\* :  $P < 0.05$  (Cont との比較)。

(C-H) MKN74 細胞 (C-E) と MKN45 細胞 (F-H) を 1  $\mu$ M の OP449 で 72 時間処置した際の E2F1 と SET のタンパク質発現量を western blotting で解析した。典型的な一例 (C, F) と, 非処置細胞 (Cont) のタンパク質発現量を 100%として相対値で示した定量図 (D, E, G, H)。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3-4。\* :  $P < 0.05$  (Cont との比較)。

#### 4-2-19 胃癌細胞株の生体内での成長に対する SET 標的薬の効果

SET 標的薬 OP449 が、生体内での腫瘍成長を抑制するか検討するため、免疫不全マウスを用いた異種移植 (Xenograft) を行った。免疫不全マウスの左後肢皮下に、MKN45 細胞を移植し、14 日後に腫瘍が形成されたことを確認後、毎日 OP449 (10 mg/kg) を腹腔内に投与した。対照としては同量の溶媒 (PBS) を用いた。投与開始から 21 日間腫瘍の大きさを測定し、最終日に腫瘍を摘出して重量を測定した。OP449 投与により、生体内での腫瘍の成長が有意に抑制されることが確認された (図 34A)。また、摘出した腫瘍では、OP449 投与により重量が減少した (図 34B)。さらに、OP449 の投与が、PP2A 活性に与える影響を検討するため、摘出腫瘍組織からタンパク質を抽出し、DuoSet IC kit を用いて PP2A 活性を測定した。その結果、OP449 投与により、腫瘍の PP2A 活性が有意に上昇していることが認められた (図 34C)。

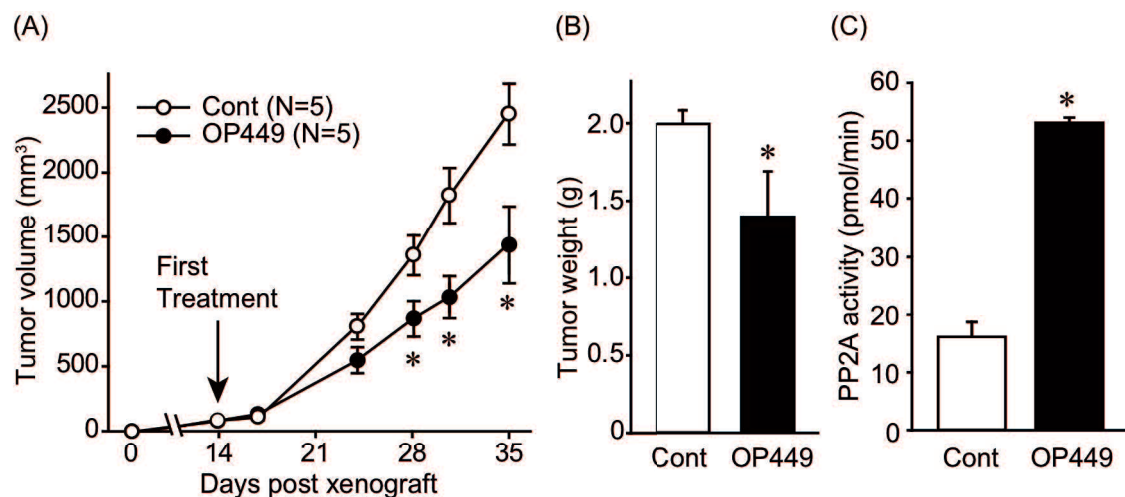


図 34 胃癌細胞株の生体内での成長に対する SET 標的薬の効果

免疫不全マウスの皮下に MKN45 を移植し、14 日目から OP449 (10 mg/kg) を毎日腹腔内投与して腫瘍の成長および PP2A 活性に与える影響を解析した。移植後 35 日間の腫瘍の大きさの経時的変化 (A) と移植後 35 日目の摘出腫瘍の重量 (B) および、腫瘍組織の PP2A 活性の定量図 (C)。Cont : PBS 処置群。OP449 : OP449 処置群。(C) N=3。\* :  $P < 0.05$  (Cont との比較)。

### 第3節 考察

本研究では、ヒトの胃癌における SET 発現の変化やその機能を解明するため、胃癌モデルマウス、胃癌患者組織サンプル、ヒト胃癌細胞株である MKN45 と MKN74 を用いた解析を行った。その結果、胃癌モデルマウスの腫瘍部において顕著な SET タンパク質発現量の増加が認められ、SET タンパク質発現が高い胃癌患者では、発現が低い患者よりも予後が悪く、SET タンパク質発現量が胃癌の悪性度を上昇させていることが明らかになった。また、ヒト胃癌細胞株を含めた 11 種類のがん細胞株(胃癌細胞株 MKN45, MKN74, 大腸癌細胞株 HCT116, SW620, 肺癌細胞株 A549, PC9, メラノーマ細胞株 A2058, COLO 679, 骨肉腫細胞株 HOS, Saos2, 乳癌細胞株 MCF7) において SET 特異的な shRNA を発現させて SET 発現を抑制させたところ、11 細胞株中 5 つの細胞株 (PC9, A2058, COLO679, HOS, Saos2) で細胞増殖能の低下が認められたが、Saos2 を除いてその変化はわずかであった。一方、全ての細胞株において SET 発現抑制はコロニー形成能を低下させた。SET 発現抑制の効果が細胞増殖能よりも、コロニー形成能に対してより強く現れたことから、SET は、がん細胞の細胞増殖よりも幹細胞性の維持により深く関与している可能性が示唆された。本研究では、その分子機構として転写因子 E2F1 の関与を明らかにした。すなわち、SET により PP2A 活性が抑制され、E2F1 のリン酸化レベルが上昇してタンパク質が安定化することで幹細胞性が高まるという分子機構が考えられた。E2F1 タンパク質の脱リン酸化には、PP2A の B サブユニットの中でも特に B56 $\alpha$  の関与が示唆され、SET-PP2A/B56-E2F1 の相互作用という新たな分子機構が明らかになった。また、SET 発現抑制による E2F1 発現の減少が 11 細胞株中 7 細胞株 (MKN45, MKN74,



A549, PC9, A2058, COLO 679, MCF7) で認められたことから, SET が E2F1 を介して幹細胞性を上昇させる分子機構はがん細胞に広く維持されていると考えられる。さらに, SET 標的薬である OP449 は, MKN45, MKN74 に対して細胞増殖能には影響を与えない濃度でコロニー形成を抑制し, E2F1 タンパク質発現量を低下させた。これらの結果は, 胃癌を含む様々ながん種において, SET-PP2A-E2F1 の相互作用を介したがん悪性化機構が, 新たな治療標的となりうる可能性を示す。

#### 4-3-1 SET による胃癌細胞悪性化の分子機構

がん細胞における幹細胞性の上昇は, 胃癌を含む様々ながんにおいて, がんの発生や転移, 抗がん剤耐性獲得によるがんの再発に関わることから, 特に化学療法における大きな障壁となっている (81-83)。そのため, がん細胞の幹細胞性を標的とした抗がん戦略が注目されているが, がん幹細胞性の維持に関わる分子機構には未解明な点が多い。本研究では, 胃癌細胞の幹細胞性維持に, SET-PP2A-E2F1 の相互作用が重要な役割を果たすことを明らかにした。E2F1 は, アデノウイルス DNA 上の E2 遺伝子のプロモーターに結合し, 転写を促進する因子として発見された (137)。E2F1 は, G1 期になると Rb から解離して活性化し, S 期において重要な Cyclin E や Cyclin A, cdc25A などの転写を亢進することで細胞増殖を促進する (137,138)。一方, DNA 傷害時には ARF, p73, APAF1, Casp3, Casp7 などの発現亢進を介してアポトーシスを誘導することが知られている (139)。DNA 傷害により活性化してアポトーシスを起こすため, がん抑制的に機能すると考えられるが, 一部のがんでは E2F1 発現の異常が転移, 浸潤を

促進することが報告されるなど (140,141), 細胞増殖活性化能と合わせて, E2F1 はがん促進的な因子であると考えられる。また近年, E2F1 には幹細胞性を維持する機能が存在することも明らかになってきた。肝細胞癌において, E2F1 が, がん幹細胞の自己複製 (self-renewal) を促進することや, FGF2 の産生亢進を介して幹細胞性を上昇させることが報告されている (142,143)。また, E2F1 は, NANOG, Sox2, Oct4, KLF4 など, 幹細胞性の維持に寄与する転写因子の発現を誘導することが報告されており (144), 本研究でも, SET 発現抑制による KLF4 mRNA 発現量の低下が観察された。抗がん剤耐性は, 予後を悪化させる主要な要因の一つであるが, 胃癌細胞において E2F1 の過剰発現が薬剤排出に関与する MDR1 や MRP, EMT (上皮間葉転換) を促進する ZEB1, TAp73, ZEB2 の発現を上昇させ, cisplatin, doxorubicin, 5-fluorouracil 等の抗がん剤に対する感受性を低下させることが報告されている (145)。したがって, SET-PP2A-E2F1 の相互作用を標的とした PP2A 活性化は, がんの幹細胞性を低下させるとともに, 薬剤耐性を解除する効果が期待できる。

#### 4-3-2 E2F1 タンパク質の発現調節機構

E2F1 Ser364 リン酸化は, E2F1 タンパク質を安定化させると共に, 転写活性を上昇させる (146,147)。E2F1 は, PP2A により脱リン酸化を受けることでタンパク質が不安定化し, 分解が促進される (41)。PP2A 阻害タンパク質の一つである CIP2A により PP2A 活性が抑制されると, E2F1 Ser364 リン酸化レベルが低下して E2F1 タンパク質発現が上昇することが報告されている (148)。さらに, E2F1 は CIP2A の転写を促進することで正のフィードバックを形成することから, あ

る種のがん細胞では CIP2A-PP2A-E2F1 の相互作用が存在すると考えられる (149)。一方、本研究では、胃癌細胞では SET が PP2A/B56 $\alpha$  複合体に結合することで PP2A 活性を抑制し、E2F1 Ser364 リン酸化が亢進して E2F1 タンパク質が安定化する SET-PP2A-E2F1 相互作用の存在を明らかにした。代表的な PP2A 阻害タンパク質である SET と CIP2A が、同様の分子機構でがんの悪性化に関与している理由や、その違いについては明らかになっていないが、SET と CIP2A の発現亢進により悪性化が起きているがん種には、共通のものがいくつか報告されている。乳癌では、SET と CIP2A の双方の発現が亢進しており、どちらの発現抑制も PP2A 活性を回復させ c-Myc Ser62 リン酸化レベルを低下させる (47)。同様に、膵臓癌においても SET と CIP2A の発現上昇と発現抑制による c-Myc Ser62 リン酸化レベルの低下が報告されている (40)。また、前立腺癌患者と唾液腺様癌患者においても、SET と CIP2A どちらの発現も亢進が認められている (150,151)。したがって、SET と CIP2A の発現が亢進し、PP2A 活性が抑制されているがん細胞が存在する可能性がある。これには、共通のシグナルが SET と CIP2A の発現を亢進させることが理由として考えられ、実際に慢性骨髄性白血病では、Bcr-Abl の活性化とそれに続く Jak2 シグナル活性化が CIP2A と SET の発現を亢進させる (111,152)。また、c-Myc は、PP2A を介して SET と CIP2A のいずれからも調節を受けることが報告されており、転写因子として CIP2A の発現を促進させることで正のフィードバックを形成するが (153)、SET のプロモーターに結合して転写を促進することも報告されている (154)。そのため、SET か CIP2A のいずれかの発現が亢進すれば、c-Myc の活性化を介して両方の発現が上昇する可能性がある。しかし、本研究の結果、SET 発現を抑制しても c-Myc タ

ンパク質発現が低下した細胞株は少なく、このような分子機構が働くがん細胞は限られていると考えられる。一方、E2F1 も転写因子として CIP2A の転写を促進させることが報告されているため (149), SET 発現量の増加により E2F1 の活性化が起これば、CIP2A の発現が上昇する可能性も考えられる。慢性骨髄性白血病細胞株では、CIP2A 発現抑制が SET タンパク質発現量を低下させることが報告されており (111), 本研究でも、MKN45 細胞での SET 発現抑制により CIP2A 発現が 20%程度減少することが認められた (data not shown)。一方、胃癌モデルマウスでは CIP2A の発現量は亢進していなかったことから (data not shown), 必ずしも SET と CIP2A 双方の発現量が増加しているわけではない。SET と CIP2A の発現に相関があるならば、一方の阻害により、もう一方の機能が抑制できる可能性も考えられるため、今後、両者の関係についても検討が必要である。

本研究では、E2F1 Ser364 のリン酸化を引き起こすキナーゼについては検討していないが、E2F1 Ser364 は checkpoint kinase 2 (Chk2) によりリン酸化されることが報告されている (146)。Chk2 は、細胞が DNA ダメージを受けた際に、p53 や E2F1 をリン酸化し、細胞周期の停止や DNA を修復する機構に関与しており、がんの発生に対して抑制的に機能すると考えられている (146)。しかし、胃癌細胞において Chk2 による DNA 修復を阻害すると抗がん剤感受性が上昇すること (155), 大腸癌細胞で放射線耐性と化学療法耐性獲得に Chk2 が寄与することが報告されており (156), Chk2 はがん治療への耐性にも関与している。また、Chk2 Thr68 リン酸化は Chk2 活性を上昇させるが (157), PP2A により脱リン酸化されることが報告されている (158)。したがって、胃癌細胞においても、SET による PP2A 活性の抑制は、E2F1 だけでなく Chk2 のリン酸化および活性化を引き起こ

している可能性も考えられる。この点については、Chk2 のリン酸化レベルや B サブユニットとの結合性を解析することで明らかになるだろう。

#### 4-3-3 SET 発現抑制により E2F1 タンパク質発現が減少したがん細胞株の特徴

SET 発現抑制により、胃癌細胞株 MKN45, MKN74, 肺癌細胞株 A549, PC9, メラノーマ細胞株 A2058, COLO679, 乳癌細胞株 MCF7 の 7 細胞株で、E2F1 タンパク質発現の減少が認められた。一方、大腸癌細胞株 HCT116, SW620, 骨肉腫細胞株 HOS, Saos2 では、E2F1 発現の減少は認められなかった。このように細胞株のがん種によって偏りがあり、胃癌、肺癌、メラノーマ、乳癌において、E2F1 の発現調節に SET が関与している可能性が考えられる。胃癌患者では E2F1 発現量が高いグループは全生存期間 (Overall survival) と無増悪生存期間 (Progression-free survival) が悪化すること (159), 肺癌患者では肺癌のステージと E2F1 発現量が相関すること (160), 乳癌患者では E2F1 発現量が高いグループは全生存期間が有意に短いことが知られている (97)。また、正常のメラノサイトと比べてメラノーマ細胞株の多く (9 細胞株中 8 細胞株) で E2F1 発現が亢進している (162)。一方、SET 発現抑制により E2F1 発現の減少が認められなかった大腸癌と骨肉腫においても E2F1 によるがん悪性化が報告されており (163,164), これらのがんでは SET 非依存的に E2F1 発現や活性が亢進している可能性が考えられ、CIP2A-PP2A-E2F1 軸の関与を検討する必要がある。

大腸癌細胞株 HCT116 と骨肉腫細胞株 Saos2 では、SET 発現抑制により c-Myc タンパク質の発現が低下したことから、SET により活性が阻害されている PP2A 複合体の標的が細胞により異なる可能性が考えられる。PP2A の基質特異性は、

結合する B サブユニットにより制御されるため、本研究では B56 $\alpha$  が E2F1 への基質特異性を担っており、SET がその機能を阻害することで E2F1 タンパク質が安定化していると考えられた。しかし、c-Myc を標的として、その安定化に寄与する B サブユニットとして、同様に B56 $\alpha$  が報告されている (165)。したがって、がん細胞によって B56 $\alpha$  が標的とする基質が異なっている可能性が考えられる。すなわち、SET 発現抑制により E2F1 の発現が減少した細胞株では B56 $\alpha$  は E2F1 を標的としており、c-Myc 発現が減少した細胞株では B56 $\alpha$  が c-Myc を標的としている可能性が考えられる。この場合、各種がん細胞株において、B56 $\alpha$  がどのような因子を標的にしているのかが、SET 発現を抑制した際に影響を受けるがん悪性化シグナルを規定するのだろう。また、SET が阻害する B サブユニットは B56 $\alpha$  だけではないと考えられ、各種がん細胞株によって SET が特異的に結合する PP2A 複合体の種類を検討する必要がある。B56 $\alpha$  を含めて、B サブユニットの基質特異性を決定する詳細な分子機構は解明されていないため、SET や B サブユニットの機能ががん種による違いを明らかにすることで、SET や PP2A を標的とした抗がん戦略の開発がさらに発展するだろう。

#### 4-3-4 SET のアイソフォームによる機能の違い

ヒトには相同性の高い SET $\alpha$  と SET $\beta$  の二つのアイソフォームが存在し、どちらも同程度の PP2A 阻害活性を持っているが (52)、SET $\beta$  にのみクロマチンのリモデリング作用がある (166)。本研究において、SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下に対するレスキュー実験では、SET $\beta$  よりも SET $\alpha$  がより効果的な作用を示した。この結果に沿うように、ヒト B 細胞性慢性リンパ性白血病におい

て、SET $\beta$ と比較したSET $\alpha$ の発現量の割合が高いほど、予後が悪いことが報告されている(167)。SET発現抑制によるコロニー形成数の減少が、PP2Acの発現抑制により回復したことから、SET $\beta$ のクロマチンリモデリング作用の胃癌細胞の悪性化への関与は小さいと考えられる。最近、膵臓癌細胞株においてSET $\alpha$ とSET $\beta$ では細胞内での局在が異なることが報告され(103)、胃癌細胞においてもSET $\alpha$ とSET $\beta$ の局在の違いにより、SET $\alpha$ がE2F1を脱リン酸化するPP2A複合体を特異的に阻害した可能性も考えられる。SET $\alpha$ とSET $\beta$ に共通のC末端の酸性ドメインを欠損させると、SETの局在が核内から細胞質に移行することが知られており、その移行はSET $\beta$ において特に顕著である(168)。胃癌細胞内ではSETのC末端領域に翻訳後修飾や変異があり、それがSETの各アイソフォームの局在の違いにつながっているかもしれない。この点は、胃癌細胞におけるSET $\alpha$ 、SET $\beta$ の局在を明らかにすることで解明できるだろう。

SETは、各アイソフォームでホモまたはヘテロ二量体を形成している(56)。二量体化はクロマチンリモデリング作用を増強するが(57)、PP2A阻害作用には影響を与えない(52,58)。SET二量体化の研究に用いられているSET-pme変異体は、SET $\alpha$ とSET $\beta$ の共通アミノ酸領域の親水性アミノ酸を変異させており(SET $\alpha$ はV51E/I55E/L58S/A62Eの変異、SET $\beta$ ではV38E/I42E/L45S/A49Eの変異)、コイルドコイル構造を維持できないため二量体化できない(169)。SETの二量体化は各アイソフォームに共通の領域を介しており、また、クロマチンリモデリング作用の関与が小さいと考えられる本研究では、SETの二量体化による影響は少ないと考えられる。一方、胃上皮オルガノイドに対してSET $\alpha$ とSET $\beta$ を過剰発現させた際に、オルガノイドの形成数が同程度に増加した。SET $\beta$ の過剰発現

では CD44 の mRNA 発現量は上昇していなかったが、オルガノイドの形成数増加は幹細胞性上昇の指標となるため、SET $\beta$ によっても幹細胞性が上昇したと考えられる。コロニー形成試験における SET $\beta$  のレスキューでもコロニー形成数が回復傾向にあり、SET $\beta$  も少なからず幹細胞性維持に寄与していると考えられる。また、オルガノイドを用いた実験では、ノックダウンにより SET 発現抑制を行っているわけではないため、胃上皮細胞に内因性の SET $\alpha$  と SET $\beta$  が発現しており、純粋に SET $\beta$  だけの作用を反映していない可能性がある。生体内において SET はホモまたはヘテロ二量体を形成しているが、ヘテロ二量体形成時には SET $\alpha$  の N 末端領域が SET $\beta$  の C 末端領域に結合して、クロマチンリモデリング作用を低下させることが知られている (55)。PP2A 阻害作用に対するヘテロ二量体の関与については明らかになっていないが、オルガノイドを用いた実験では内因性の SET $\alpha$  と SET $\beta$  の存在により、SET が形成する二量体の種類や割合がレスキュー実験とは異なる可能性があり、特にヘテロ二量体の存在が幹細胞性の上昇を引き起こしたかもしれない。

#### 4-3-5 SET 標的薬 OP449 の胃癌治療薬としての可能性

本研究では、SET 標的薬である OP449 が胃癌細胞株に対して抗がん効果を示すことを明らかにした。その作用は SET 発現抑制と同様に、細胞増殖能には影響を与えずに、コロニー形成能を減少させ、E2F1 タンパク質発現を抑制した。MKN45 細胞を用いて行った xenograft モデルでは、OP449 により腫瘍の成長は抑制されたが、その効果は限定的であった。そのため、SET を標的として PP2A 活性を回復させる OP449 の作用は、キナーゼ阻害剤などの他の抗がん剤との併



用効果が期待される。実際に、慢性骨髄性リンパ腫では、チロシンキナーゼ Bcr-Abl に対する阻害剤 (imatinib, nilotinib, dasatinib) と OP449 の併用効果が報告されている (170)。胃癌治療では、HER2 陽性の患者に対して HER2 特異的抗体 trastuzumab が用いられているが、OP449 を併用することでさらに高い治療効果が得られるかもしれない。MKN45 と MKN74 細胞は HER2 陰性のため、trastuzumab と OP449 の併用効果については検討できていないが、今後 HER2 陽性の細胞株を用いることで併用効果の可能性について明らかにできるだろう。HER2 陰性の胃癌患者に対しては、フルオロピリミジン系薬剤である 5-fluorouracil, S-1, capecitabine, プラチナ系薬剤である cisplatin, oxaliplatin, タキサン系薬剤である paclitaxel, docetaxel や irinotecan, VEGF 受容体に対する分子標的薬 ramucirumab などの抗がん剤が単独または組み合わせて用いられている (国立がんセンターHP : <http://ganjoho.jp/public/cancer/stomach/treatment.html>)。これらの抗がん剤と OP449 の併用効果についてはこれまでに報告されていないが、FTY720 に関しては、大腸癌細胞に対して 5-fluorouracil や SN-38, oxaliplatin との相加効果が認められており (171), cisplatin 耐性メラノーマ細胞に対して cisplatin との併用により細胞死を誘導できることが明らかになっている (172)。したがって、OP449 でも、これらの抗がん剤との併用効果が得られる可能性は十分に考えられる。今後、分子標的薬だけでなく、古典的な抗がん剤との併用効果が明らかになれば、HER2 陽性・陰性に関わらず胃癌治療における有用な治療薬となるだろう。

#### 4-3-6 SET 発現上昇の分子機構

胃癌モデルマウス、胃癌患者の組織切片を用いた免疫組織化学染色の結果から、腫瘍部において SET タンパク質発現が上昇しており、SET タンパク質発現上昇は胃癌患者の予後不良と正の相関を示すことが明らかになった。また、転移性大腸癌 (173)、非小細胞性肺癌 (130)、慢性骨リンパ球性白血病 (167)、急性骨髄性白血病 (174) において SET 発現量と予後不良との相関が報告されている。このように、SET 発現上昇が PP2A 活性を低下させ、がんの発生・悪性化に寄与することは多くの知見から明らかになっているが、がんにおいて SET 発現が上昇する詳細な分子機構については未だ解明されていない。胃癌モデルマウスである *Gan* マウスの遺伝子データベースから、野生型マウスや *K19-Wnt1* マウス (Wnt シグナルが活性化) と比較して、慢性的な胃炎が認められる *K19-C2mE* マウス (COX-2/PGE<sub>2</sub> シグナルが活性化) で、SET の mRNA 発現量が上昇していた (data not shown, *Gan* マウス遺伝子データベース <http://www.ganmouse.net>)。このことから、SET タンパク質発現の上昇には、炎症性のシグナルによる mRNA 発現量の上昇が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。慢性的な炎症は、がんの発生や成長に重要な微小環境の一つであり、実際に、IL-6 や IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカインが血清中に多い肺癌患者は、低い患者に比べて予後が悪い (175)。また、肝細胞癌において、IL-17 受容体の発現や IL-17 産生が高い患者、TNF- $\alpha$  産生が高い患者では、全生存期間が短くなる (176,177)。これらのことから、がんにおける炎症反応の増強は重要な増悪因子であり、炎症刺激により発現が上昇した SET ががんの発生や成長に関与している可能性が考えられる。近年、転写因子である Runt-Related Transcription Factor 1 (RUNX1) が SET mRNA 発現の誘導に関与することが報告された (154)。RUNX1 は、マクロファ

ージにおいて IL-1 $\beta$  と IL-6 産生を上昇させ、炎症反応を増強することが知られている (178)。また、RUNX1 は、IL-4 や IL-13 刺激により活性化される STAT6 により直接活性化されることから (119,120)、炎症性刺激により活性化された RUNX1 が SET mRNA 発現を上昇させることで PP2A 活性を抑制し、がんの発生や成長を促進している可能性が考えられる。実際、RUNX1 の mRNA 発現量も、野生型マウスや *K19-Wnt1* マウスと比較して、*K19-C2mE* マウスと *Gan* マウスの腫瘍部で上昇している (data not shown, *Gan* マウス遺伝子データベース <http://www.ganmouse.net>)。今後、炎症反応に注目することで、SET 発現の調節機構が明らかになるかもしれない。

SET は、Granzyme A や Asparaginyl EndoPeptidase (AEP) により分解や切断を受ける (105,114)。しかし、急性骨髄性白血病などの一部のがんでは SET に特異的に結合して、SET を切断や分解から保護することでタンパク質発現を安定化させる SET Binding Protein 1 (SETBP1) の発現が上昇している (181,182)。この SETBP1 は、SET $\alpha$  と SET $\beta$  の共通のアミノ酸配列に結合することで SET の安定化を介して PP2A 活性を低下させるが、直接 PP2A に結合して阻害することはできない (182)。SETBP1 発現量の高さが、急性骨髄性白血病患者の予後の悪さと相関することや (182)、非定型性慢性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群では SETBP1 の変異 (G870S) がある患者の予後が悪いことが報告されている (183–185)。SET の G870 を含む領域 (868–873 アミノ酸) は、 $\beta$ -TrCP1 が認識してユビキチン化を行うために必須であり、変異があると  $\beta$ -TrCP1 が結合できなくなることで SETBP1 のユビキチン・プロテアソーム分解が抑制される。したがって、SET タンパク質発現量の上昇には SETBP1 発現が亢進されたことによるタ

ンパク質安定化も重要であると考えられる (184)。胃癌における SETBP1 の発現や機能は明らかになっていないが, 炎症による SET mRNA 発現の亢進と SETBP1 によるタンパク質安定化が, SET タンパク質発現量を上昇させているかもしれない。

## 第5章 総合考察

## 5-1 PAR2 によるがん悪性化分子機構

プロテアーゼ活性化受容体-2 (PAR2) は、活性化することで主に炎症反応を促進する。本研究においてもタイトジャンクションの崩壊を介して炎症反応の増悪化を引き起こしている可能性が示された。慢性炎症はがんの発生や悪性化に関与するが、近年、炎症反応を介さずに PAR2 の活性化が直接がんの悪性化に寄与していることが明らかになってきている。実際、胃癌、大腸癌、膵臓癌、口腔扁平癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、前立腺癌、メラノーマ、脳腫瘍といった多くの種類のがんにおいて PAR2 発現の上昇が認められている (186–197)。がん細胞に発現した PAR2 の活性化は、miRNA-34a の抑制を介して cyclin D1 と E2F を活性化させて大腸癌細胞の細胞増殖を亢進させる (198)。また乳癌細胞、前立腺癌細胞において PAR2 の活性化はアポトーシス促進性に機能する DAPK1 の発現を抑制し、大腸癌細胞株では、PKC $\alpha$ 、ERK1/2、NF $\kappa$ B のリン酸化を促進してアポトーシス促進性の Bax 発現を抑制し、アポトーシス抑制性の Bcl2 発現を誘導することで細胞死から回避している (199,200)。転移や浸潤においても、乳癌、大腸癌細胞では PAR2 は JNK、ERK1/2、NF $\kappa$ B のシグナル増強を介してがん細胞の遊走を促進させることで寄与することが知られている (195,200,201)。このように、がん細胞における PAR2 の活性化が、がん細胞の増殖や生存、遊走を増強することでがんの悪性化に関与している。また、膵臓癌細胞において、PAR2 は ERK1/2 と p38 MAPK の活性化を誘導して、VEGF の産生を増強させることで血管新生を促進させるなど (202)、がん細胞自身だけでなく、微小環境の形成にも関わっている。これらのことから、PAR2 の阻害を行うことで抗炎症作用が望めるだけでなく、十分な抗がん効果が得られる可能性が考えられる。さらに炎

症反応はがん促進性に機能するため、炎症と抗がんという二つの観点から治療効果が期待される。

## 5-2 イヌのがんに対する新規治療標的としての SET の有用性と展望

イヌやネコを対象とした獣医療におけるがん治療は、ヒトのがん治療と同様に外科的療法、化学療法、放射線療法が単独または併用で行われる。しかし、ヒト医療とは異なり、専門的で高度な治療を行うことができる施設が限られることが、治療の選択の幅を狭めている (91)。そのため、特別な機器や手技が比較的 unnecessary 化学療法が、獣医療では有用であり、イヌにおいて SET 標的薬の効果を解析することは獣医療に高く貢献できると考えられる。当研究室では、イヌのリンパ腫細胞、乳腺腫瘍において SET の発現亢進と SET 標的薬の抗がん効果を明らかにしており (51,67)、本研究でも第3章において、イヌのメラノーマにおいて、SET ががんの悪性化に寄与し、SET 標的薬が抗がん効果を発揮することを示した。これらの結果は、イヌのがん治療標的としての SET の有用性を示すものであり、今後、益々の進展が期待される。

一方、ヒトとイヌの SET は高い相同性を保持しているが、イヌ特異的な SET アイソフォームの存在も確認されている (59)。ヒト SET については、その機能や発現調節分子機構が明らかになってきているが、イヌ SET についてはいまだ未解明な点が多い。今後は、各アイソフォームによる PP2A 阻害作用や、クロマチンリモデリング作用の違い、二量体形成の有無やその組み合わせ、切断体の存在やその機能、翻訳後修飾を受ける部位とその機能など、ヒト SET との共通点や相違点を明らかにする必要があるだろう。また、ヒトでは SET に結合する

ことで発現を安定化させる SETBP1 が存在するが、イヌにおいて同様の機能を持つタンパク質の存在は発見されていない。獣医療において SET を治療標的とする上でこれらの点が解明されることが必要であると考えられる。

ヒトとイヌは、長い歴史を共に生活することで、共に進化してきたとされており、ヒトとイヌには共通の遺伝子が選択的に多く保存されている (203)。この遺伝子には、がん原遺伝子の一つである MET なども含まれており、がんの原因となる遺伝子を共通して維持していることが、ヒトとイヌの腫瘍性疾患に類似するものが多い理由の一つと考えられている (203)。さらに、ヒトとより近い生活を送るようになってきたイヌは、高齢化も含め、今後さらにヒトに近い疾患が増加していくかもしれない。その上で、ヒトとイヌのがんを比較生物学的観点から捉えることは極めて重要だと考えられる。欧米では、がんを自然発症するイヌを、新規抗がん剤開発のモデル動物として用いる取り組みが行われており (9)、今後、ヒトとイヌの比較腫瘍学的観点に立脚した抗がん剤開発の仕組みの構築と成果を期待する。

### 5-3 ヒトのがん治療における SET 標的薬の展望

本研究では、第4章で胃癌悪性化における SET の役割を初めて解明した。SET タンパク質発現量とヒト胃癌患者の予後に負の相関が認められ、予後マーカーとしての可能性も示された。一方、第3章のイヌメラノーマ細胞株において、SET 阻害の抗がん効果が SET タンパク質発現量に依存しない可能性も示された。したがって、SET 標的薬の効果を判定するためには、正確なバイオマーカーの同定が求められ、SET-PP2A-E2F1 の相互作用や SET $\alpha$ /SET $\beta$  比の解析などが必要



であると考えられる。実際に、粘液癌である muc 型の胃癌患者組織（7例分）では SET の染色度合が非常に悪く、解析に用いることができなかった。原因として、muc 型の胃癌組織では SET の発現量が低いことが考えられ、すべての胃癌において単純な SET 発現量が悪性度の指標になるわけではないことを示唆している。

胃癌における遺伝子変異は、KRas や p53 など多くのがんで一般的に認められるものが多く、胃癌に特異的な遺伝子変異や分子標的薬は未だ存在しない (204)。HER2 陽性の胃癌患者には、HER2 特異的抗体 trastuzumab が用いられているが、trastuzumab 抵抗性を示す HER2 陽性患者も存在する (205)。本研究では、HER2 陽性・trastuzumab 抵抗性のヒト胃癌細胞株 MKN7 に対して、SET 標的薬 OP449 が抗がん効果を示すことを確認している (data not shown)。したがって、SET 標的薬には、分子標的薬に耐性になったがんに対する効果も期待できる。

近年、腫瘍免疫を標的とした免疫チェックポイント阻害剤が注目を集めており、2017年9月には PD-1 阻害剤である nivolumab が国内で胃癌に対して承認された (206)。しかし、適応は進行胃癌の三次治療以降と限定的であることや、重篤な副作用が起こるケースがあるなど改善点は多い。PP2A はがん細胞における Stat3 のリン酸化を阻害することで、PD-1 に結合してその機能を阻害する PD-L1 の発現を抑制することが報告されている (207)。また、制御性 T 細胞の機能には PP2A 活性化が必要であり、制御性 T 細胞における mTORC1 を阻害することで過剰な免疫反応を抑制している (208)。一方、SET は GAAD に結合して、その機能を抑制しているが、細胞傷害性 T 細胞により産生される Granzyme A により SET が切断されることで、GAAD が核内に移行し DNA を切断してアポトーシス

を起こす (105)。そのため、SET 発現が亢進しているがん細胞では、Granzyme A に対する感受性が低下し腫瘍免疫による攻撃から逃れている可能性も考えられる。これらを総合的に考えると、SET は腫瘍免疫に対して抑制的に機能しており、SET 標的薬が腫瘍免疫を誘導できる可能性や、nivolumab などの免疫チェックポイント阻害剤との併用効果を示すことが期待できる。

SET を標的とした抗がん剤の開発を進める上で、SET と結合する PP2A 複合体の種類や、SET の機能阻害により活性化される細胞内シグナルががん種によって異なる分子機構を明らかにする必要がある。本研究では、胃癌細胞株において SET は B56 $\alpha$  特異的に結合しており、その標的は E2F1 であることを示した。しかし、解析した 11 種のがん細胞株において、E2F1 の関与が示唆されるものは 7 細胞株であった（胃癌細胞株 MKN45, MKN74, 肺癌細胞株 A549, PC9, メラノーマ細胞株 A2058, COLO679, 乳癌細胞株 MCF7)。一方、E2F1 タンパク質発現減少が認められなかった細胞株の中には、c-Myc タンパク質発現が減少しているものが存在した（大腸癌細胞株 HCT116, 骨肉腫細胞株 Saos2)。これは、SET により影響を受ける PP2A 複合体や細胞内シグナルが細胞種によって異なることを示唆する。また、c-Myc の脱リン酸化を担う B サブユニットとして、本研究で E2F1 との相互作用を明らかにした B56 $\alpha$  が報告されている (165)。このことは、SET により抑制している PP2A 複合体が同じであっても、その PP2A 複合体が標的とする因子が、がん細胞によって異なる可能性を示唆する。このような PP2A と SET の詳細な分子機構を明らかにしていくことが、SET を標的とした抗がん剤の開発およびバイオマーカーの同定へと大きく進展させると考えられる。

興味深いことに、SET 発現抑制により E2F1 と c-Myc の双方のタンパク質発現量に変化が認められなかった細胞株(大腸癌細胞株 SW620, 骨肉腫細胞株 HOS)も含めて、全ての細胞株でコロニー形成能の低下が認められた。このことは、SET の機能阻害が、あらゆるタイプのがん細胞に対し幹細胞性の低下を介して抗がん効果を発揮する可能性を示す。近年、ES 細胞において、分化の進展に伴い SET $\alpha$  の mRNA 発現量が低下すること、また、幹細胞マーカーである OCT4, SOX2, KLF4, NANOG が SET $\alpha$  のプロモーターに結合して発現を亢進させると、さらに SET $\alpha$  と SET $\beta$  のどちらの過剰発現も ES 細胞の細胞増殖を促進させることが報告された (209)。これは、幹細胞性が高く未分化な細胞では SET 発現が亢進しており、幹細胞自身の増殖を促進することを示唆する。本研究において、E2F1 にも c-Myc にも変化が認められなかった細胞株では、第三の因子が関与していることも考えられるが、SET 自身がより直接的に幹細胞性の維持に寄与している可能性も考えられる。現在、がん細胞の幹細胞性を標的とした抗がん戦略は未だ実現していないが、SET を標的とした分子標的薬は、がんの幹細胞性を低下させる画期的医薬品ファースト・イン・クラスの創薬に繋がるかもしれない。しかし、がん幹細胞を標的とする薬剤は正常な幹細胞にも作用して副作用を起こす可能性も十分に考えられるため、今後さらなる検討が必要だろう。

SET は、PP2A の阻害作用だけでなく、GAAD 阻害作用、p53 阻害作用、幹細胞性の維持など、がん促進性に働く多機能タンパク質である (105,116,209)。幹細胞性や、GAAD 阻害作用が関与する可能性がある腫瘍免疫は、近年、創薬の観点から注目が集まっている分野であり、SET の多機能性は魅力的な創薬標的

の一つである。幹細胞性や腫瘍免疫に対する SET 標的薬の効果や既存の抗がん剤との併用により相加・相乗作用が明らかになれば、SET を標的とした抗がん剤創成が格段に進展することも期待できる。

以上のことから、本研究で得られた知見は、SET を標的とした抗がん戦略の発展に重要な知見を提供するものであり、SET 標的薬創成の実現に貢献するものであると考える。

## 第6章 実験材料および実験方法

## 6-1 細胞培養法

レンチウイルス産生用細胞株 Lenti-X HEK293T (Takara Bio), イヌ腎臓上皮細胞株 (MDCK), ヒト結腸癌由来細胞株 HCT116, SW620, ヒト肺癌由来細胞株 A549, ヒト乳癌由来細胞株 MCF7 は 1% antibiotic-antimycotic (AA, Life Technologies), 10% fetal bovine serum (FBS, メーカー) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用い, イヌメラノーマ由来細胞株 CMeC-1, CMeC-2, KMeC, LMeC, CMGD2, CMGD5, ヒト胃癌由来細胞株 MKN45, MKN74, ヒト肺癌由来細胞株 PC9, ヒトメラノーマ由来細胞株 A2058, COLO 679, ヒト骨肉腫由来細胞株 Saos2, HOS は 1% AA, 10% FBS を含む RPMI1640 を用い, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> に保ったインキュベーター (MCO-5AC, SANYO) 内で培養した。細胞の継代は培地を除去して HEPES buffered saline (HBS: 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) で 1 回洗浄した後, trypsin/EDTA {0.05% trypsin, 0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 含有 HBS} を加えてピペッティングすることにより細胞を剥がし行った。なお, 培養に必要な器具は全て滅菌して用いた。

## 6-2 胃上皮オルガノイド培養法

4~6 週齢の C57BL/6J マウスから胃を摘出し, 氷上で眼科用はさみを用いて細かく切断した後に, 氷上で冷却した滅菌 PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) の入った 50 m チューブに加えて, 激しく混和することで洗浄した。その後, 0.1% type I collagenase (Wako) で 37°C, 20 分間振とうしながら処置した。その後, 遠心と洗浄を 3 回繰り返す, 組織中から分

離された胃上皮細胞を 70  $\mu\text{m}$  のセルストレイナー (BD Falcon) を通して回収し、オルガノイド用培地中で攪拌して 15  $\mu\text{l}$  のマトリゲル (Matrigel Matrix, BD Biosciences) を敷いた 48 穴プレート (住友ベークライト) に播いた。さらに、5-3-4 において作製した 200  $\mu\text{l}$  のウイルス溶液と 200  $\mu\text{l}$  のオルガノイド用培地 (2 mM L-Glutamine (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco), 0.2% Fungizone Amphotencin B (Gibco), 50 ng/ml EGF (Peprotech), 250 ng/ml R-Spondin 1 (R&D), 100 ng/ml Noggin (Peprotech), 1  $\mu\text{M}$  Jagged-1 (ANASPEC), 10  $\mu\text{M}$  Y27632 (Wako) 含有 Advanced DMEM/F12 (BD)) を加えることで、ウイルスベクターを観戦させた。翌日、培地を除去した後にさらに 20  $\mu\text{l}$  のマトリゲルを重層させ、マトリゲルが重合した後に培地を加えて、さらに 3 日間培養した。

### 6-3 プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製

#### 6-3-1 プラスミドの作製

FLAG PP2A B55 $\alpha$ , B56 $\alpha$ , PR72, E2F1 はヒト肝臓 cDNA を鋳型として PCR を用いて増幅し、pLVSIN-EF1 $\alpha$ -IRES-ZsGreen1 ベクターに組み込んだ。pLVmCC hPAR2 は、ヒト PAR2 のアミノ酸コード領域を pcDNA3 FLAG-human PAR2 から制限酵素 BamHI/NotI により切り出し、pLVmCC の BamHI/NotI サイトにライゲーションすることで作成した。

shRNA 発現プラスミドは、標的因子の配列に合わせ設計したプライマーをアニーリングした後に、pLVmC の ClaI/MluI サイトに T4 DNA ligase (Takara Bio) を用いてライゲーションすることで作製した。shRNA の標的配列は以下の通りである。

shNonTarget : 5'-CAACAAGATGAGAGCACCA-3'  
shSET : 5'-GGATGAAGGTGAAGAAGAT-3'  
shPP2Ac : 5'-GATACACTGGATCATATCA-3'

### 6-3-2 プラスミドのトランスフォーメーションおよびミニプレップ

氷上で解凍した大腸菌 (XL10GOLD, Stratagene) 10  $\mu$ l にプラスミドを 0.5  $\mu$ l 加え、氷上で 30 分間静置した。ドライバス (Dry Bath Incubator, Major Science) を用いて 42°C で 45 秒間ヒートショックを加えた後、氷上で 2 分間静置し、100  $\mu$ l の LB Broth を加え、37°C で 1 時間振とう培養 (BioShaker BR-22FP, Taitec) した。その後、LB agar (100  $\mu$ g/ml ampicillin 添加) プレートに播種し 37°C で一晩培養した。出芽したコロニーを単離し、ガラス管に入った LB Broth (100  $\mu$ g/ml ampicillin 添加) に加え 37°C, 180 rpm で一晩振とう培養した。培養液をチューブに移し、室温にて 4000 rpm で 10 分間遠心 (卓上小型遠心機 2420, KUBOTA) して、上清を除いた後に、Plasmid Mini Kit I (Omega) を使用してプラスミドを抽出した。

### 6-3-3 プラスミドのトランスフェクション

12 穴プレートに  $2 \times 10^5$  cell/well の HEK293T 細胞を播き一晩培養した。200  $\mu$ l の Opti-MEM (Gibco) にプラスミド 1.0  $\mu$ g および Polyethylenimine“MAX” (PEI, Polysciences) を 2.5  $\mu$ l 混合した後に 30 分静置し、1 ml の培地 (10% FBS・1% AA 含有 DMEM) に加え 24 時間培養し使用した。



#### 6-3-4 レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入

6 穴プレートに  $3 \times 10^5$  cell/well の HEK293T 細胞を播いて、1.5 ml の培地 (10% FBS・1%AA 含有 DMEM) で一晩培養した。各種レンチウイルスベクタープラスミド (1  $\mu$ g), packaging plasmid (psPAX2 ; 0.77  $\mu$ g), VSVG coat protein plasmid (pDM2.G ; 0.43  $\mu$ g) と 2.5  $\mu$ l の PEI を 1 ml の Opti-MEM に混合した後に 30 分静置した。その後、培地に加え、8 時間培養し、1.5 ml の培地に交換した。40 時間後、ウイルスを含む培地を 0.22  $\mu$ m のフィルターでろ過し、レンチウイルスベクターを得た。目的の細胞を、ウイルスベクターを含む培地で 12 時間処置し、タンパク質および shRNA を恒常的に発現する細胞を作出した。

#### 6-4 経上皮電気抵抗値 (Trans Epithelial Resistance: TER) の測定

$2 \times 10^5$  個の MDCK 細胞を 24 well type Cell Culture Insert (pore size 0.4 $\mu$ m) (BD Falcon) 上で 3~4 日間培養後、十分な TER の上昇によるタイトジャンクションの形成を確認し、STX2 Electrode と EVOM2 Epithelial Voltohmmeter (WPI) を用いて測定した。上層のインサート内の培地は 200  $\mu$ l, 下層のウェル内の培地は 800  $\mu$ l とし、測定の前日に培地を交換した。測定は細胞をインキュベーター内から取り出し、室温にて 3 分間静置してから行った。

#### 6-5 マトリゲルを用いた 3 次元培養

24 well plate に直径 12 mm の cover glass (Fisherbrand) を入れ、50  $\mu$ l のマトリゲル (Matrigel Matrix, BD Biosciences) を加え、37°C で 15 分間静置し、マトリゲルを重合させた。 $5 \times 10^4$  個の mCherry-PAR2 MDCK 細胞を含む細胞懸濁液 1 ml

に 20  $\mu$ l のマトリゲルを加えて攪拌した後に、重合させたマトリゲル上に加えた。  
3 日間培養することで球状のシストを形成させた。

## 6-6 培養細胞免疫染色法

$7 \times 10^5$  個の mCherry-PAR2 MDCK 細胞を 12 well type Transwell (Corning Incorporated) 上で 3 日間培養した後に、methanol (Wako), acetone (Wako) 1 : 1 混合液で  $-20^{\circ}\text{C}$ , 10 分間処置することで固定した。マトリゲルを用いた 3 次元培養では、4% paraformaldehyde 含有 PBS を用いて室温, 30 分間固定を行った。PBS-T (0.05% Tween 20 含有 PBS) で洗浄し, 3% skim milk 含有 PBS-T を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。一次抗体 (1 : 400 で PBS-T に希釈) は  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩, 二次抗体 (alexa Flour 488, 1 : 2000 で PBS-T に希釈) は遮光して 60 分間振とう処置した。標本は aqueous permanent mounting medium (Dbiosys) を用いて封入し, 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss) を用いて観察した。Actin の染色には, DY-649-Phalloidin (DYOMICS) を 1 : 2000 希釈で用い, 二次抗体と同時に処置し 60 分間反応させた。本実験で使用した一次抗体は表 1 に記した。

PBS (pH7.4) の組成は次の通りである。137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 。

## 6-7 PP2A 活性の測定

### 6-7-1 細胞全体 (タンパク質抽出液) の PP2A 活性測定法

細胞全体の PP2A 活性の測定にはマラカイトグリーンアッセイを用いた。MEF 細胞に脱リン酸化活性測定用 lysate buffer (50 mM MOPS pH7.4, 0.1% NP-40, 0.1

mM EGTA, 1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えてタンパク質を抽出した。ネガティブコントロールとして、細胞溶解液を okadaic acid (10 nM) で 5 分間処置したサンプルを作製した。その後、リン酸化ペプチド (K-R-pT-I-R-R) を含む reaction buffer (50 mM MOPS pH7.4, 24 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.03% 2-mercaptoethanol, 2.9% glycerol) と混合し、室温で 20 分間処置した。反応を 60% HClO<sub>4</sub> を加えることで停止させ、マラカイトグリーンアッセイを用いて反応液中のリン酸塩量を 620 nm の吸光度を測定することで定量した。ネガティブコントロールとの差をサンプルの PP2A 活性とした。

#### 6-7-2 免疫沈降法を用いた PP2A 活性測定法

免疫沈降法を用いた PP2A 活性の測定には DuoSET IC PP2A activity kit (R&D) の基質ペプチド配列部分を改変して用いた。MEF 細胞に DuoSET IC lysate buffer (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, Brij-35 0.02%, 1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor, HCl で pH7.5 に調整) を加えてタンパク質を抽出した。キット付属の active PP2Ac 抗体を 96 well plate に加え、一晩インキュベートして吸着させた。抗体を PBS-T で洗い、blocking buffer (1% BSA, 0.05% sodium azide 含有 PBS) で 30 分ブロッキングを行い、PBS-T で洗浄後にタンパク質抽出サンプルを加えて 4°C で 3 時間インキュベートし免疫沈降を行った。サンプルを IC Diluent #10 buffer (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, Brij-35 0.02%, HCl で pH 7.5 に調整) で洗浄し、リン酸化ペプチド (K-R-pT-I-R-R) を含む IC Diluent #17 buffer (50 mM HEPES pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, NaOH を用いて pH 7.5 に調整) と混合し、37°C で 30 分, 100 rpm で振と

うした。その後、キット付属のマラカイトグリーンアッセイにより、反応液中のリン酸塩量を 620 nm の吸光度を測定することで定量した。

## **6-8 Western blotting によるタンパク質発現量の解析**

### **6-8-1 タンパク質抽出**

培地を除去した細胞を HBS で洗浄し, standard lysate buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM sodium pyrophosphate, 1% Triton X-100, 1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えて細胞を可溶化した。得られた細胞溶解液に約 3 秒間, 超音波破碎 (VP-5<sup>S</sup>, TAITEC) を行い, 5 分間静置した後に, 4°C, 15000 g で 15 分間遠心し, 上清をタンパク質抽出液として使用した。

### **6-8-2 Western blotting**

得られたサンプルのタンパク質濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて Lowry 法により測定した。タンパク質サンプル 10 - 40 µg を SDS ポリアクリルアミドゲル (8 - 12%) で泳動して分離した後に, 転写装置 (Bio-Rad) を用いて PVDF 膜 (Bio-Rad) もしくはニトロセルロース膜 (wako) に転写した。PVDF 膜もしくはニトロセルロース膜を 0.5% スキムミルク含有 TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) により室温で 60 分間ブロッキングした後に, 一次抗体を 4°C で振とうしながら一晩反応させた。

洗浄後, 二次抗体を室温で 1 時間反応させ, ECL Pro western blotting Detection Reagent (PerkinElmer) で発光させ LAS3000mini (FUJIFILM) で観察した。イメ

ージスキャナーで取り込んだバンドは、ImageJ (National Institutes of Health) を用いて測定し数値化した。

#### **6-9 FLAG M2 beads を用いた免疫沈降法**

培養細胞の培地を除去した後に、氷上で冷却した HBS で一回洗浄し、CHAPS lysate buffer : (40 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM disodium glycerophosphate, 0.3% CHAPS, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えて可溶化した。得られた細胞溶解液を氷上で 5 分間静置した後に 4°C, 15000g で 15 分間遠心し、上清を採取してタンパク質サンプルとして使用した。Wash buffer (CHAPS wash buffer : 40 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM disodium glycerophosphate, 0.3% CHAPS, 10 mM sodium pyrophosphate) を用いて洗浄した FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA) をサンプルに加え、4°C で 2-3 時間反応させた。ビーズを洗浄後、結合タンパク質を FLAG peptide (SIGMA) で溶出した後、SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl pH6.8, 0.4% SDS, 6%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% Glycerol) で溶出し、western blotting により検出した。

#### **6-10 細胞増殖能と細胞生存率の測定**

細胞増殖能および細胞生存率の測定には Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いた。96 穴プレートに  $5 \times 10^3$  個の各種がん細胞を播き、翌日から細胞生存率を 450 nm の吸光度を測定することで定量した。

### 6-11 Transwell を用いた Matrigel Invasion Assay

Transwell には、ポアサイズ 8  $\mu\text{m}$  のポリカーボネート製メンブレンインサート (Costar) を用いた。FBS free DMEM でインサートおよび 24 well plate を wash した後、HBS で希釈して 2% に調整した Matrigel を Transwell のメンブレン上で重合させた。その上に FBS free RPMI1640 で 200  $\mu\text{l}$  に調節した shNT および shSET を発現させた CMeC-1 ( $1.5 \times 10^4$  cells) と CMeC-2 ( $4 \times 10^4$  cells) を播き、24 well plate に 800  $\mu\text{l}$  の FBS free RPMI1640 を加えて 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  に保ったインキュベーター内で培養した。2 時間後、下層の 24 well plate に 80  $\mu\text{l}$  の FBS を加えて、さらに 24 時間培養した。その後、100% methanol (Wako) を用いて室温、15 分間固定した後に 1 時間乾燥させた。乾燥後、MilliQ で 20 倍希釈したギムザ染色液 (Muto Pure Chemicals) を用いて 15 分間染色し、MilliQ を用いて洗浄した。インサートの膜上部に残った浸潤していない細胞を綿棒でぬぐい取った後に、スライドガラスに乗せて位相差顕微鏡を用いて観察し、浸潤細胞数をカウントした。200 倍の倍率でランダムに 3~5 視野をカウントし、その平均値を浸潤細胞数とした。細胞の浸潤率は、CMeC-1 と CMeC-2 共に shNT における浸潤細胞数を 100% として計算した。

### 6-12 コロニー形成試験

6 穴プレート (TPP) に A549, HOS, Saos2 細胞は  $1 \times 10^2$  個, MCF7 細胞は  $1 \times 10^3$  個の細胞を播き、1-2 週間培養した。培養後、細胞を HBS で一回洗浄し、99.5% ethanol (Wako) で固定した。さらに HBS で一回洗浄した後にギムザ染色を行うことで、形成されたコロニー数を計測した。

### 6-13 ソフトアガーコロニー形成試験

足場非依存性コロニー形成の検討にはソフトアガーコロニー形成試験を用いた。2.5 ml の bottom agar (1% AA, 10% FBS, 2.8% NaHCO<sub>3</sub> (Wako), 0.75% agarose 含有 RPMI-1640) を 6 穴プレート (TPP) に敷き, 4°C で 8 分間冷却して固めた後, その上に MKN45, MKN74, HCT116 細胞は  $1 \times 10^3$  個, SW620 細胞は  $2 \times 10^3$  個, PC9 細胞は  $1 \times 10^3$  個, A2058, COLO 679 細胞は  $4 \times 10^3$  個の細胞が含まれた 1.5 ml の top agar (1% AA, 10% FBS, 2.8% NaHCO<sub>3</sub>, 0.36% アガロース含有 RPMI-1640) を播き培養した。3 週間後, クリスタルバイオレット染色 (Wako) を行い, 形成されたコロニー数を計測した。

### 6-14 免疫不全マウスを用いた異種移植 (Xenograft)

NOD/SCID マウス (NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup> マウス) の左後肢の皮下に, コントロールとして non-target shRNA (shNT) を安定発現させた MKN45-shNT 細胞を, 右後肢に SET を標的とした shRNA (shSET#1) を安定発現させた MKN45-shSET 細胞をそれぞれ  $1 \times 10^6$  個移植した。移植後 35 日間, 形成される腫瘍の大きさを, ノギスを用いて測定した。SET 標的薬の効果の解析では,  $1 \times 10^6$  個の MKN45 細胞を NOD/SCID マウスの左後肢の皮下に注入し, 14 日後に腫瘍が形成されたことを確認した後にランダムに群分けし, 腹腔内に 10 mg/kg/day の OP449 (Dr. Michael P. Vitek から提供) もしくは PBS を毎日投与した。投与開始後 21 日間腫瘍の大きさを測定した。体積の算出は,  $\frac{4}{3} \times (\text{腫瘍の半径})^3 \times 3.14$  に測定した腫瘍の直径を用いて行った。最終日にマウスを安楽殺した後に, 腫瘍を取り出

して重量を測定した。また、腫瘍組織からタンパク質を抽出して 6-7-2 の免疫沈降法を用いた PP2A 活性測定法で PP2A 活性を測定した。

## 6-15 Real-time PCR 法

TRIzol Reagents (Invitrogen) または ISOGEN (日本ジーン) を用いて MKN45 細胞と MKN74 細胞, *Gan* マウスの胃腫瘍部と同月齢同腹子の C57BL/6J マウスの胃組織の総 RNA を抽出し, RNA 0.5  $\mu$ g を QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) または Prime Script RT Master Mix (TaKaRa) を用いて逆転写した。合成された cDNA を QuantiTect SYBR Green I Kit (Qiagen) および StepOne Plus (Applied Biosystems), または SYBR Premix ExTaqII (TaKaRa) および Mx-3000P (Agilent Technology) を用いて PCR を行った。PCR 反応は, 熱変性 (94°C, 15 秒間), アニーリング (60°C, 30 秒間), 伸長 (72°C, 30 秒間) を 45 サイクルまで行った。各発現量は GAPDH または  $\beta$ -actin により規準化し, 比較した相対値は comparative Ct ( $2^{- (\Delta Ct - Cc)}$ ) method を用いて表した。使用したプライマーは表 1 にまとめた。



表 1 Realtime PCR に使用したプライマー

プライマー		配列
mouse CD44	forward	CACATATTGCTTCAATGCCTCAG
	reverse	CCATCACGGTTGACAATAGTTATG
human KLF4	forward	CCGCTCCATTACCAAGAGCT
	reverse	ATCGTCTTCCCCTCTTTGGC
human GAPDH	forward	AACAGCGACACCCACTCCTC
	reverse	GGAGGGGAGATTCAGTGTGGT

プライマー	Takara Set ID
mouse SET	MA136048
mouse $\beta$ -actin	MA050368
human E2F1	HA274561

## 6-16 DNA マイクロアレイ

MKN45-shNT 細胞と MKN45-shSET 細胞の RNA を TRIzol Reagents (Invitrogen) を用いて抽出した後に, RNA の濃度と純度を ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop) と Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) で測定した。その後, One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol に沿って RNA のラベリングとハイブリダイゼーションを行った。RNA を Cy3-dCTP で標識して, RNaseasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した後に, blocking agent と

fragmentation buffer を加えて 60°C で 30 分加熱することで RNA を切断した。GE hybridization buffer を加えて希釈した後に， hybridization solution を加えて 40  $\mu$ l ずつガセットスライドに分注し， Agilent SurePrint G3 Human GE 8X60K V3 Microarrays kit (Agilent) を用いて分析を行った。スライドは 65°C で 17 時間インキュベートしてハイブリダイゼーションさせた後速やかに， Agilent Microarray Scanner D (Agilent Technologies, Inc.) を用いて解析した。得られたデータは shNT と shSET での比較を行った。データは Gene Expression Omnibus (GEO) (accession number GSE86437; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) で閲覧可能である。また， Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) は， The Molecular Signature Database (MSigDB database v5.1) を基に GSEA software を用いて行った。

## 6-17 免疫組織化学染色法

### 6-17-1 組織サンプルの免疫化学染色

*Gan* マウスの胃腫瘍部と同月齢同腹子の C57BL/6J マウスの胃組織サンプルまたは胃癌患者組織サンプルを 4%の paraformaldehyde で固定した後， パラフィン包埋した。*Gan* マウスサンプルは 4  $\mu$ m， 胃癌患者組織サンプルは 5  $\mu$ m の厚さにスライスして作製した組織切片を， xylene と ethanol (Wako) を用いて脱パラフィン操作を行った。その後， 免疫賦活液 (Dako Target Retrieval Solution pH9) およびマイクロウェーブ装置 (MI-77 型， 東屋医科器械) を用いて免疫賦活操作を行った。その後， Dako Wash Buffer (Dako) を用いて洗浄し， ブロッキング溶液 (ブロッキング溶液 1 : 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> メタノール溶液， ブロッキング溶液 2 : Protein Block Serum-Free (Dako)) でブロッキングした。一次抗体反応には， SET/I2PP2A

(SANTA CRUZ sc-5655) を Antibody Diluent (Dako) を用いて 1000 倍に希釈して用いた。二次抗体反応には、ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (Goat) (ニチレイバイオ) を使用し、基質反応には、Dako REAL B substrate buffer (Dako) および Dako REAL C DAB+ chromogen (Dako) の混合液を用いた。その後、Hematoxylin Solution (Wako) を用いて Hematoxylin 染色を行ったのちに、封入剤 (HSR 液, シスメックス) を滴下し、カバーガラスで封入したのちに、観察を行った。基質反応 (DAB), Hematoxylin 染色の行程は DAKO Autostainer Plus Slide Stainer (DAKO) を使用した。

#### 6-17-2 胃癌患者組織サンプルの SET 発現量解析

山口大学医学系研究科 消化器・腫瘍外科研究室から 99 名分の胃癌患者の腫瘍組織サンプルの提供を受けた。これらのサンプルは、2004 年から 2010 年の間に山口大学病院にて胃癌と診断され、外科的切除が行われた方々の腫瘍組織であり、手術前に化学療法や放射線療法などの治療を受けた患者は含まれていない。腫瘍の病理学的な診断と分類は、胃癌取扱い規約 ((第 14 版), 日本胃癌学会編) の TNM 分類を参考に行った。患者の詳細な情報は表 2 に記した。

SET を染色した組織切片は、顕微鏡下で腫瘍部の写真を撮影後、3 名がそれぞれの写真について盲検下で SET 発現量を染色強度で判断し、解析した。各細胞の SET 発現量は、その染色強度により low, medium, high に分類し、腫瘍組織の SET 染色強度を (low%) × 1 + (medium%) × 2 + (high%) × 3 で計算して算出された 3 人分の数値を平均化したものを SET 発現スコアとして用いた。数値は 100 から 300 までの範囲で算出されるが、240 よりも高い数値を SET High

グループとし、それ以下のグループを SET Low とした。Mucinous-type の胃癌患者サンプルは、7名分全て SET の染色が悪く、SET 発現が陰性であるか組織切片に問題があるか判断できなかつたため、解析に使用せず除外した。

表 2 解析に使用した胃癌患者の情報

Number of patients	99
Average Age (Years)	64.99 (23-92)
Gender (Male/Femal)	70 / 29
Histologic classification (por / tub / pap / sig / muc / AdenoSCC)	41 / 37 / 2 / 11 / 7 / 1
Stage (I / II / III / IV)	20 / 35 / 44 / 0
Depth of tumor invasion (T) (T1 / T2 / T3 / T4)	5 / 26 / 24 / 44
Regional lymph nodes (N) (N0 / N1 / N2 / N3)	31 / 29 / 22 / 17
Lymphatic invasion (ly) (0 / 1 / 2 / 3)	9 / 27 / 40 / 23
Venous invasion (v) (0 / 1 / 2 / 3)	29 / 48 / 19 / 3
Pattern of tumor infiltration (INF) (a / b / c)	4 / 45 / 32
Stroma (med / int / sci)	4 / 52 / 34

## 6-18 統計処理

実験成績は、平均±標準誤差で示した。有意差検定は Student t-test もしくは one-way ANOVA を用いた後に Student-Newman-Keuls test を行い、危険率 ( $P$ ) が 5%未満の場合を有意差ありとした。

## 6-19 使用抗体リスト

使用した抗体は以下の表 3 にまとめた。

表 3 使用抗体リスト

抗体	メーカー	カタログナンバー
SET	Santa Cruz	sc-5655
CIP2A	Santa Cruz	sc-80659
E2F1	Santa Cruz	sc-251
p-ERK 1/2 (T202/Y204)	Cell signaling	9216
p-Akt (S473)	Cell signaling	4060
c-Myc	Cell signaling	5605
GSK3 $\beta$ (S9)	Cell signaling	5558
I $\kappa$ B $\alpha$	Cell signaling	4814
p65 NF $\kappa$ B (S536)	Cell signaling	3033
p70S6K (T389)	Cell signaling	9234
NANOG	Cell signaling	4903
E2F1	abcam	ab179445
PP2Ac	Millipore	07-324
$\beta$ -catenin	BD Biosciences	610153
p- E2F1 (S364)	MBL	D246-3
FLAG	SIGMA	F7425
Tubulin	Thermo Scientific	RB-9281-P0
p97/VCP	Gene Tex	GTX113030

## 6-20 使用薬物リスト

使用した薬物は以下の表4にまとめた。

表4 使用薬物リスト

薬物	購入元/供与元
FR180204 (ERK inhibitor)	SIGMA
SB202190 (p38-MAPK inhibitor)	SIGMA
SLIGRL-NH2 PAR2 activating peptide (PAR2AP)	ABGENT
SP600125 (JNK inhibitor)	Cayman
Wortmannin (PI3K/Akt inhibitor)	SIGMA
FTY720	Cayman CHEMICAL
OP449 (Dr. Michael P. Vitek より提供)	Oncotide Pharmaceutical
オカダ酸 (Okadaic Acid : OA)	Wako

## 引用文献

1. Rachmilewitz D, Okon E, Karmeli F. Sulphydryl blocker induced small intestinal inflammation in rats: a new model mimicking Crohn's disease. *Gut*. 1997;41(3):358–365.
2. Enjoji S, Ohama T. The role of protein phosphatase 2A in inflammation and cancer. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2017;149(5):208–212.
3. Velin D, Narayan S, Bernasconi E, et al. PAR2 promotes vaccine-induced protection against Helicobacter infection in mice. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1273–1282, 1282.e1.
4. Ungefroren H, Witte D, Rauch BH, et al. Proteinase-Activated Receptor 2 May Drive Cancer Progression by Facilitating TGF- $\beta$  Signaling. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11).
5. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2004;36(7):1206–1237.
6. Schiffman JD, Breen M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2015;370(1673):20140231.
7. Inoue M, Hasegawa A, Hosoi Y, et al. A current life table and causes of death for insured dogs in Japan. *Preventive Veterinary Medicine*. 2015;120(2):210–218.
8. Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, et al. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res*. 2012;159(3):165–172.
9. Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat. Rev. Cancer*. 2008;8(2):147–156.

10. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2004;286(6):C1213-1228.
11. Ikari A. [Molecular physiological study of electrolyte transporters in renal tubular epithelial cells]. *Yakugaku Zasshi.* 2009;129(9):1025–1031.
12. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 1963;17:375–412.
13. Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.* 1981;241(4):G275-288.
14. Furuse M, Itoh M, Hirase T, et al. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.* 1994;127(6 Pt 1):1617–1626.
15. Fletcher GC, Lucas EP, Brain R, et al. Positive feedback and mutual antagonism combine to polarize Crumbs in the Drosophila follicle cell epithelium. *Curr. Biol.* 2012;22(12):1116–1122.
16. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1999;116(2):301–309.
17. McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, et al. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(13):7761–7766.
18. Chen ML, Pothoulakis C, LaMont JT. Protein kinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of T84 colonocytes exposed to



- Clostridium difficile toxin A. *J. Biol. Chem.* 2002;277(6):4247–4254.
19. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J. Immunol.* 2003;171(11):6164–6172.
  20. Rigor RR, Beard RS, Litovka OP, et al. Interleukin-1 $\beta$ -induced barrier dysfunction is signaled through PKC- $\theta$  in human brain microvascular endothelium. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2012;302(10):C1513-1522.
  21. Arora P, Ricks TK, Trejo J. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *J. Cell. Sci.* 2007;120(Pt 6):921–928.
  22. Kawabata A, Kuroda R. Protease-activated receptor (PAR), a novel family of G protein-coupled seven trans-membrane domain receptors: activation mechanisms and physiological roles. *Jpn. J. Pharmacol.* 2000;82(3):171–174.
  23. Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y, et al. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *Am. J. Pathol.* 1998;153(3):937–944.
  24. Cenac N, Coelho A-M, Nguyen C, et al. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am. J. Pathol.* 2002;161(5):1903–1915.
  25. Houliston RA, Keogh RJ, Sugden D, et al. Protease-activated receptors upregulate cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 2002;88(2):321–328.
  26. Asokanathan N, Graham PT, Fink J, et al. Activation of protease-activated

receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J. Immunol.* 2002;168(7):3577–3585.

27. Schönthal AH. Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett.* 2001;170(1):1–13.

28. von Lindern M, van Baal S, Wiegant J, et al. Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol. Cell. Biol.* 1992;12(8):3346–3355.

29. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 2006;127(3):635–648.

30. Brautigan DL. Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J.* 2013;280(2):324–345.

31. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* 2001;353(Pt 3):417–439.

32. Hahn WC, Dessain SK, Brooks MW, et al. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(7):2111–2123.

33. Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.* 1999;24(5):186–191.

34. Jeon K-I, Jono H, Miller CL, et al. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated PDE1 regulates the beta-catenin/TCF signaling through PP2A B56 gamma subunit in proliferating vascular smooth muscle cells. *FEBS J.* 2010;277(24):5026–5039.

35. Yeh E, Cunningham M, Arnold H, et al. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat. Cell Biol.* 2004;6(4):308–318.
36. Deng X, Gao F, May WS. Protein phosphatase 2A inactivates Bcl2's antiapoptotic function by dephosphorylation and up-regulation of Bcl2-p53 binding. *Blood.* 2009;113(2):422–428.
37. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell.* 2007;129(7):1337–1349.
38. Chiang C-W, Kanies C, Kim KW, et al. Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23(18):6350–6362.
39. Chen W, Wang Z, Jiang C, et al. PP2A-Mediated Anticancer Therapy. *Gastroenterol Res Pract.* 2013;2013:675429.
40. Farrell AS, Allen-Petersen B, Daniel CJ, et al. Targeting inhibitors of the tumor suppressor PP2A for the treatment of pancreatic cancer. *Mol. Cancer Res.* 2014;12(6):924–939.
41. Baldacchino S, Saliba C, Petroni V, et al. Deregulation of the phosphatase, PP2A is a common event in breast cancer, predicting sensitivity to FTY720. *EPMA J.* 2014;5(1):3.
42. Hung M-H, Chen K-F. Reprogramming the oncogenic response: SET protein as a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2017;21(7):685–694.

43. Kaur A, Westermarck J. Regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) tumor suppressor function by PME-1. *Biochem. Soc. Trans.* 2016;44(6):1683–1693.
44. Cristóbal I, Rojo F, Madoz-Gúrpide J, et al. Cross Talk between Wnt/ $\beta$ -Catenin and CIP2A/Plk1 Signaling in Prostate Cancer: Promising Therapeutic Implications. *Mol. Cell. Biol.* 2016;36(12):1734–1739.
45. Li M, Guo H, Damuni Z. Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry.* 1995;34(6):1988–1996.
46. Dong L, Zhu J, Wen X, et al. Involvement of SET in the Wnt signaling pathway and the development of human colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2014;7(4):1203–1208.
47. Janghorban M, Farrell AS, Allen-Petersen BL, et al. Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014;111(25):9157–9162.
48. Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, et al. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood.* 2011;118(15):4150–4158.
49. Hu X, Garcia C, Fazli L, et al. Inhibition of Pten deficient Castration Resistant Prostate Cancer by Targeting of the SET - PP2A Signaling axis. *Sci Rep.* 2015;5:15182.
50. Bareford MD, Hamed HA, Allegood J, et al. Sorafenib and pemetrexed toxicity in cancer cells is mediated via SRC-ERK signaling. *Cancer Biol. Ther.* 2012;13(9):793–803.
51. Kake S, Tsuji S, Enjoji S, et al. The role of SET/I2PP2A in canine mammary

tumors. *Sci Rep.* 2017;7(1):4279.

52. Saito S, Miyaji-Yamaguchi M, Shimoyama T, et al. Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;259(2):471–475.

53. Nagata K, Kawase H, Handa H, et al. Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(10):4279–4283.

54. Vaesen M, Barnikol-Watanabe S, Götz H, et al. Purification and characterization of two putative HLA class II associated proteins: PHAPI and PHAPII. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1994;375(2):113–126.

55. Kajitani K, Kato K, Nagata K. Histone H1 chaperone activity of TAF-I is regulated by its subtype-dependent intramolecular interaction. *Genes Cells.* 2017;22(4):334–347.

56. Matsumoto K, Okuwaki M, Kawase H, et al. Stimulation of DNA Transcription by the Replication Factor from the Adenovirus Genome in a Chromatin-like Structure. *J. Biol. Chem.* 1995;270(16):9645–9650.

57. Goetzl EJ, Kong Y, Mei B. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of Bax. *J. Immunol.* 1999;162(4):2049–2056.

58. Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, et al. Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies. *Blood.* 2013;122(11):1923–1934.

59. Yabe R, Fujiwara N, Mizuno T, et al. Characterization of SET/I2PP2A isoforms in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 2014;76(9):1235–1240.
60. Oaks J, Ogretmen B. Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. *Front Oncol.* 2014;4:388.
61. Hino H, Takaki K, Mochida S. Inhibitor-1 and -2 of PP2A have preference between PP2A complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;467(2):297–302.
62. Switzer CH, Cheng RYS, Vitek TM, et al. Targeting SET/I(2)PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene.* 2011;30(22):2504–2513.
63. Billich A, Bornancin F, Dévay P, et al. Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J. Biol. Chem.* 2003;278(48):47408–47415.
64. Saddoughi SA, Gencer S, Peterson YK, et al. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol Med.* 2013;5(1):105–121.
65. Chen L, Luo L-F, Lu J, et al. FTY720 induces apoptosis of M2 subtype acute myeloid leukemia cells by targeting sphingolipid metabolism and increasing endogenous ceramide levels. *PLoS ONE.* 2014;9(7):e103033.
66. Agarwal A, MacKenzie RJ, Pippa R, et al. Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2014;20(8):2092–2103.
67. Fujiwara N, Kawasaki H, Yabe R, et al. A potential therapeutic application of

- SET/I2PP2A inhibitor OP449 for canine T-cell lymphoma. *J. Vet. Med. Sci.* 2013;75(3):349–354.
68. Shlomai G, Zelenko Z, Antoniou IM, et al. OP449 inhibits breast cancer growth without adverse metabolic effects. *Endocr. Relat. Cancer.* 2017;24(10):519–529.
69. Cerejido M, González-Mariscal L, Contreras RG, et al. The making of a tight junction. *J. Cell Sci. Suppl.* 1993;17:127–132.
70. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(10):5255–5260.
71. Yu LC-H. Intestinal epithelial barrier dysfunction in food hypersensitivity. *J Allergy (Cairo).* 2012;2012:596081.
72. Lang R, Song PI, Legat FJ, et al. Human corneal epithelial cells express functional PAR-1 and PAR-2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003;44(1):99–105.
73. Shan J, Oshima T, Chen X, et al. Trypsin impaired epithelial barrier function and induced IL-8 secretion through basolateral PAR-2: a lesson from a stratified squamous epithelial model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012;303(10):G1105-1112.
74. Pallagi P, Venglovecz V, Rakonczay Z, et al. Trypsin reduces pancreatic ductal bicarbonate secretion by inhibiting CFTR Cl<sup>-</sup> channels and luminal anion exchangers. *Gastroenterology.* 2011;141(6):2228–2239.e6.
75. Lau C, Lytle C, Straus DS, et al. Apical and basolateral pools of proteinase-activated receptor-2 direct distinct signaling events in the intestinal epithelium.

*Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2011;300(1):C113-123.

76. Weng T-Y, Chiu W-T, Liu H-S, et al. Glycosylation regulates the function and membrane localization of KCC4. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1833(5):1133–1146.

77. Maeda Y, Tashima Y, Houjou T, et al. Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association. *Mol. Biol. Cell.* 2007;18(4):1497–1506.

78. Compton SJ, Renaux B, Wijesuriya SJ, et al. Glycosylation and the activation of proteinase-activated receptor 2 (PAR(2)) by human mast cell tryptase. *Br. J. Pharmacol.* 2001;134(4):705–718.

79. Adams MN, Christensen ME, He Y, et al. The role of palmitoylation in signalling, cellular trafficking and plasma membrane localization of protease-activated receptor-2. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e28018.

80. Hachem J-P, Houben E, Crumrine D, et al. Serine protease signaling of epidermal permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* 2006;126(9):2074–2086.

81. Shirasawa M, Sonoda S, Terasaki H, et al. TNF- $\alpha$  disrupts morphologic and functional barrier properties of polarized retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* 2013;110:59–69.

82. Peerapen P, Thongboonkerd V. p38 MAPK mediates calcium oxalate crystal-induced tight junction disruption in distal renal tubular epithelial cells. *Sci Rep.* 2013;3:1041.

83. Rincon-Heredia R, Flores-Benitez D, Flores-Maldonado C, et al. Ouabain induces endocytosis and degradation of tight junction proteins through



- ERK1/2-dependent pathways. *Exp. Cell Res.* 2014;320(1):108–118.
84. Le Dréan G, Haure-Mirande V, Ferrier L, et al. Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway. *FASEB J.* 2014;28(3):1059–1070.
85. Ohtake K, Maeno T, Ueda H, et al. Poly-L-arginine enhances paracellular permeability via serine/threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine dephosphorylation of occludin in rabbit nasal epithelium. *Pharm. Res.* 2003;20(11):1838–1845.
86. Tuomi S, Mai A, Nevo J, et al. PKCepsilon regulation of an alpha5 integrin-ZO-1 complex controls lamellae formation in migrating cancer cells. *Sci Signal.* 2009;2(77):ra32.
87. Hämälistö S, Pouwels J, de Franceschi N, et al. A ZO-1/ $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integrin complex regulates cytokinesis downstream of PKC $\epsilon$  in NCI-H460 cells plated on fibronectin. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e70696.
88. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell.* 2000;11(12):4131–4142.
89. Melanoma Molecular Map Project.  
(<http://www.mmmp.org/MMMP/import.mmmp?page=epidemiology.mmmp>).  
(Accessed November 20, 2017)
90. Bergman PJ. Canine oral melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2007;22(2):55–60.
91. Blackwood L, Dobson JM. Radiotherapy of oral malignant melanomas in dogs.

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1996;209(1):98–102.

92. Dank G, Rassnick KM, Sokolovsky Y, et al. Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Vet Comp Oncol.* 2014;12(1):78–84.

93. Tsukamoto S, Huang Y, Umeda D, et al. 67-kDa laminin receptor-dependent protein phosphatase 2A (PP2A) activation elicits melanoma-specific antitumor activity overcoming drug resistance. *J. Biol. Chem.* 2014;289(47):32671–32681.

94. Pon YL, Zhou HY, Cheung ANY, et al. p70 S6 Kinase Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition through Snail Induction in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.* 2008;68(16):6524–6532.

95. Peterson RT, Desai BN, Hardwick JS, et al. Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96(8):4438–4442.

96. Hahn K, Miranda M, Francis VA, et al. PP2A regulatory subunit PP2A-B' counteracts S6K phosphorylation. *Cell Metab.* 2010;11(5):438–444.

97. Yan Y, Flinn RJ, Wu H, et al. hVps15, but not Ca<sup>2+</sup>/CaM, is required for the activity and regulation of hVps34 in mammalian cells. *Biochemical Journal.* 2009;417(3):747–755.

98. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Molecular Cell.* 2010;40(2):310–322.

99. Rivero M, Montagnani V, Stecca B. KLF4 is regulated by

RAS/RAF/MEK/ERK signaling through E2F1 and promotes melanoma cell growth.

*Oncogene*. 2017;36(23):3322–3333.

100. Liu H, Gu Y, Yin J, et al. SET-mediated NDRG1 inhibition is involved in acquisition of epithelial-to-mesenchymal transition phenotype and cisplatin resistance in human lung cancer cell. *Cell. Signal*. 2014;26(12):2710–2720.

101. Liu B, Xiong J, Liu G, et al. High expression of Rac1 is correlated with partial reversed cell polarity and poor prognosis in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumour Biol*. 2017;39(7):1010428317710908.

102. ten Klooster JP, Leeuwen I v, Scheres N, et al. Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J*. 2007;26(2):336–345.

103. Mody HR, Hung SW, Naidu K, et al. SET contributes to the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2017;8(40):67966–67979.

104. Park MK, You HJ, Lee HJ, et al. Transglutaminase-2 induces N-cadherin expression in TGF- $\beta$ 1-induced epithelial mesenchymal transition via c-Jun-N-terminal kinase activation by protein phosphatase 2A down-regulation. *Eur. J. Cancer*. 2013;49(7):1692–1705.

105. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, et al. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003;112(5):659–672.

106. Cristóbal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C, et al. Overexpression of SET is a

recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012;97(4):543–550.

107. Adachi Y, Pavlakis GN, Copeland TD. Identification of in vivo phosphorylation sites of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation breakpoint in acute undifferentiated leukemia. *FEBS Lett*. 1994;340(3):231–235.

108. Vasudevan NT, Mohan ML, Gupta MK, et al. Inhibition of protein phosphatase 2A activity by PI3K $\gamma$  regulates  $\beta$ -adrenergic receptor function. *Mol Cell*. 2011;41(6):636–648.

109. Irie A, Harada K, Araki N, et al. Phosphorylation of SET Protein at Ser171 by Protein Kinase D2 Diminishes Its Inhibitory Effect on Protein Phosphatase 2A. *PLOS ONE*. 2012;7(12):e51242.

110. Brautigan DL. Flicking the switches: phosphorylation of serine/threonine protein phosphatases. *Semin. Cancer Biol*. 1995;6(4):211–217.

111. Lucas CM, Harris RJ, Giannoudis A, et al. Cancerous inhibitor of PP2A (CIP2A) at diagnosis of chronic myeloid leukemia is a critical determinant of disease progression. *Blood*. 2011;117(24):6660–6668.

112. Tanimukai H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Up-Regulation of Inhibitors of Protein Phosphatase-2A in Alzheimer's Disease. *Am J Pathol*. 2005;166(6):1761–1771.

113. Arnaud L, Chen S, Liu F, et al. Mechanism of Inhibition of PP2A Activity and Abnormal Hyperphosphorylation of Tau by I2PP2A/SET. *FEBS Lett*. 2011;585(17):2653–2659.

114. Basurto-Islas G, Grundke-Iqbal I, Tung YC, et al. Activation of Asparaginyl

Endopeptidase Leads to Tau Hyperphosphorylation in Alzheimer Disease. *J Biol Chem.* 2013;288(24):17495–17507.

115. Neviani P, Harb JG, Oaks JJ, et al. PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *J. Clin. Invest.* 2013;123(10):4144–4157.

116. Wang D, Kon N, Lasso G, et al. Acetylation-regulated interaction between p53 and SET reveals a widespread regulatory mode. *Nature.* 2016;538(7623):118–122.

117. Patmanathan SN, Wang W, Yap LF, et al. Mechanisms of sphingosine 1-phosphate receptor signalling in cancer. *Cellular Signalling.* 2017;34(Supplement C):66–75.

118. Mukhopadhyay A, Saddoughi SA, Song P, et al. Direct interaction between the inhibitor 2 and ceramide via sphingolipid-protein binding is involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity and signaling. *FASEB J.* 2009;23(3):751–763.

119. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2015;65(2):87–108.

120. Zulueta A, Caretti A, Signorelli P, et al. Resveratrol: A potential challenger against gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 2015;21(37):10636–10643.

121. Amieva M, Peek RM. Pathobiology of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology.* 2016;150(1):64–78.

122. Lu B, Li M. Helicobacter pylori eradication for preventing gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(19):5660–5665.

123. Oshima H, Oshima M. Mouse models of gastric tumors: Wnt activation and

PGE2 induction. *Pathol. Int.* 2010;60(9):599–607.

124. Huang H, Han Y, Zhang C, et al. HNRNPC as a candidate biomarker for chemoresistance in gastric cancer. *Tumour Biol.* 2016;37(3):3527–3534.

125. Aizawa M, Nagatsuma AK, Kitada K, et al. Evaluation of HER2-based biology in 1,006 cases of gastric cancer in a Japanese population. *Gastric Cancer.* 2014;17(1):34–42.

126. Kimura Y, Fujii M, Masuishi T, et al. Multicenter phase II study of trastuzumab plus S-1 alone in elderly patients with HER2-positive advanced gastric cancer (JACCRO GC-06). *Gastric Cancer.* 2017;

127. Trotta R, Ciarlariello D, Dal Col J, et al. The PP2A inhibitor SET regulates natural killer cell IFN-gamma production. *J. Exp. Med.* 2007;204(10):2397–2405.

128. Christensen DJ, Ohkubo N, Oddo J, et al. Apolipoprotein E and peptide mimetics modulate inflammation by binding the SET protein and activating protein phosphatase 2A. *J. Immunol.* 2011;186(4):2535–2542.

129. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459(7244):262–265.

130. Liu H, Gu Y, Wang H, et al. Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2015;6(17):14913–14925.

131. Enjoji S, Yabe R, Fujiwara N, et al. The therapeutic effects of SET/I2PP2A inhibitors on canine melanoma. *J. Vet. Med. Sci.* 2015;77(11):1451–1456.

132. Hadjimichael C, Chanoumidou K, Papadopoulou N, et al. Common stemness

- regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J Stem Cells*. 2015;7(9):1150–1184.
133. Wang J, Okkeri J, Pavic K, et al. Oncoprotein CIP2A is stabilized via interaction with tumor suppressor PP2A/B56. *EMBO Rep*. 2017;18(3):437–450.
134. Li L, Wei X, Wu B, et al. siRNA-mediated knockdown of ID1 disrupts Nanog- and Oct-4-mediated cancer stem cell-likeness and resistance to chemotherapy in gastric cancer cells. *Oncol Lett*. 2017;13(5):3014–3024.
135. MacDonagh L, Gallagher MF, Ffrench B, et al. Targeting the cancer stem cell marker, aldehyde dehydrogenase 1, to circumvent cisplatin resistance in NSCLC. *Oncotarget*. 2017;8(42):72544–72563.
136. El Khoury F, Corcos L, Durand S, et al. Acquisition of anticancer drug resistance is partially associated with cancer stemness in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol*. 2016;49(6):2558–2568.
137. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*. 2005;24(17):2810–2826.
138. Aguilar V, Fajas L. Cycling through metabolism. *EMBO Molecular Medicine*. 2010;2(9):338–348.
139. Engelmann D, Pützer BM. The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis. *Cancer Res*. 2012;72(3):571–575.
140. Meng P, Ghosh R. Transcription addiction: can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy? *Cell Death Dis*. 2014;5:e1360.
141. Alla V, Engelmann D, Niemetz A, et al. E2F1 in melanoma progression and

metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 2010;102(2):127–133.

142. Chen C-L, Uthaya Kumar DB, Punj V, et al. NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab.* 2016;23(1):206–219.

143. Song K-H, Cho H, Kim S, et al. API5 confers cancer stem cell-like properties through the FGF2-NANOG axis. *Oncogenesis.* 2017;6(1):e285.

144. Chen X, Xu H, Yuan P, et al. Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell.* 2008;133(6):1106–1117.

145. Yan L-H, Wei W-Y, Cao W-L, et al. Overexpression of E2F1 in human gastric carcinoma is involved in anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer.* 2014;14:904.

146. Stevens C, Smith L, La Thangue NB. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* 2003;5(5):401–409.

147. Carnevale J, Palander O, Seifried LA, et al. DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2012;32(5):900–912.

148. Khanna A, Pimanda JE, Westermarck J. Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A, an emerging human oncoprotein and a potential cancer therapy target. *Cancer Res.* 2013;73(22):6548–6553.

149. Laine A, Sihto H, Come C, et al. Senescence sensitivity of breast cancer cells is defined by positive feedback loop between CIP2A and E2F1. *Cancer Discov.*



2013;3(2):182–197.

150. Cristóbal I, González-Alonso P, Daoud L, et al. Activation of the Tumor Suppressor PP2A Emerges as a Potential Therapeutic Strategy for Treating Prostate Cancer. *Mar Drugs*. 2015;13(6):3276–3286.

151. Routila J, Mäkelä J-A, Luukkaa H, et al. Potential role for inhibition of protein phosphatase 2A tumor suppressor in salivary gland malignancies. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016;55(1):69–81.

152. Ciccone M, Calin GA, Perrotti D. From the Biology of PP2A to the PADs for Therapy of Hematologic Malignancies. *Front. Oncol.* [electronic article]. 2015;5. (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2015.00021/full>). (Accessed November 24, 2017)

153. Khanna A, Böckelman C, Hemmes A, et al. MYC-Dependent Regulation and Prognostic Role of CIP2A in Gastric Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(11):793–805.

154. Pippa R, Dominguez A, Malumbres R, et al. MYC-dependent recruitment of RUNX1 and GATA2 on the SET oncogene promoter enhances PP2A inactivation in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2016;

155. Gutiérrez-González A, Belda-Iniesta C, Bargiela-Iparraguirre J, et al. Targeting Chk2 improves gastric cancer chemotherapy by impairing DNA damage repair. *Apoptosis*. 2013;18(3):347–360.

156. Wang W, Guo M, Xia X, et al. XRRA1 Targets ATM/CHK1/2-Mediated DNA Repair in Colorectal Cancer. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5718968.

157. Buscemi G, Carlessi L, Zannini L, et al. DNA damage-induced cell cycle

- regulation and function of novel Chk2 phosphoresidues. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26(21):7832–7845.
158. Liang X, Reed E, Yu JJ. Protein phosphatase 2A interacts with Chk2 and regulates phosphorylation at Thr-68 after cisplatin treatment of human ovarian cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine.* 2006;17(5):703–708.
159. Xu T-P, Wang Y-F, Xiong W-L, et al. E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell Death Dis.* 2017;8(6):e2837.
160. Gao Z, Shi R, Yuan K, et al. Expression and prognostic value of E2F activators in NSCLC and subtypes: a research based on bioinformatics analysis. *Tumor Biol.* 2016;37(11):14979–14987.
161. Hallett RM, Hassell JA. E2F1 and KIAA0191 expression predicts breast cancer patient survival. *BMC Res Notes.* 2011;4:95.
162. Nelson MA, Reynolds SH, Rao UNM, et al. Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma. *Cancer Biol. Ther.* 2006;5(4):407–412.
163. Sulzyc-Bielicka V, Domagala P, Bielicki D, et al. E2F1/TS Immunophenotype and Survival of Patients with Colorectal Cancer Treated with 5FU-Based Adjuvant Therapy. *Pathol Oncol Res.* 2016;22:601–608.
164. Wang Z, Sun X, Bao Y, et al. E2F1 silencing inhibits migration and invasion of osteosarcoma cells via regulating DDR1 expression. *International Journal of Oncology.* 2017;51(6):1639–1650.

165. Arnold HK, Sears RC. Protein phosphatase 2A regulatory subunit B56alpha associates with c-myc and negatively regulates c-myc accumulation. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26(7):2832–2844.
166. Kawase H, Okuwaki M, Miyaji M, et al. NAP-I is a functional homologue of TAF-I that is required for replication and transcription of the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *Genes Cells.* 1996;1(12):1045–1056.
167. Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, et al. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood.* 2011;118(15):4150–4158.
168. Nagata K, Saito S, Okuwaki M, et al. Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. *Exp. Cell Res.* 1998;240(2):274–281.
169. Miyaji-Yamaguchi M, Okuwaki M, Nagata K. Coiled-coil structure-mediated dimerization of template activating factor-I is critical for its chromatin remodeling activity1 1Edited by T. Richmond. *Journal of Molecular Biology.* 1999;290(2):547–557.
170. Agarwal A, MacKenzie RJ, Pippa R, et al. Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2014;20(8):2092–2103.
171. Cristóbal I, Manso R, Rincón R, et al. PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. *Mol. Cancer Ther.* 2014;13(4):938–947.
172. Ishitsuka A, Fujine E, Mizutani Y, et al. FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation of the

- PI3K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. *Int. J. Mol. Med.* 2014;34(4):1169–1174.
173. Cristóbal I, Rincón R, Manso R, et al. Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2015;21(2):347–356.
174. Cristóbal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C, et al. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2012;97(4):543–550.
175. Martín F, Santolaria F, Batista N, et al. Cytokine levels (IL-6 and IFN-gamma), acute phase response and nutritional status as prognostic factors in lung cancer. *Cytokine.* 1999;11(1):80–86.
176. Liao R, Sun J, Wu H, et al. High expression of IL-17 and IL-17RE associate with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2013;32:3.
177. Wang H, Liu J, Hu X, et al. Prognostic and Therapeutic Values of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Hepatocellular Carcinoma. *Med Sci Monit.* 2016;22:3694–3704.
178. Luo M-C, Zhou S-Y, Feng D-Y, et al. Runt-related Transcription Factor 1 (RUNX1) Binds to p50 in Macrophages and Enhances TLR4-triggered Inflammation and Septic Shock. *J. Biol. Chem.* 2016;291(42):22011–22020.
179. O’Shea JJ, Lahesmaa R, Vahedi G, et al. Genomic views of STAT function in CD4(+) T helper cell differentiation. *ResearchGate.* 2011;11(4):239–50.
180. Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene.*

2000;19(21):2577–2584.

181. Minakuchi M, Kakazu N, Gorrin-Rivas MJ, et al. Identification and characterization of SEB, a novel protein that binds to the acute undifferentiated leukemia-associated protein SET. *European Journal of Biochemistry*.

2001;268(5):1340–1351.

182. Cristóbal I, Blanco FJ, Garcia-Orti L, et al. SETBP1 overexpression is a novel leukemogenic mechanism that predicts adverse outcome in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;115(3):615–625.

183. Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, et al. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013;45(8):942–946.

184. Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(1):18–24.

185. Hou H-A, Kuo Y-Y, Tang J-L, et al. Clinical implications of the SETBP1 mutation in patients with primary myelodysplastic syndrome and its stability during disease progression. *Am. J. Hematol*. 2014;89(2):181–186.

186. Shimamoto R, Sawada T, Uchima Y, et al. A role for protease-activated receptor-2 in pancreatic cancer cell proliferation. *Int. J. Oncol*. 2004;24(6):1401–1406.

187. Xie L, Zheng Y, Li X, et al. Enhanced proliferation of human hepatoma cells by PAR-2 agonists via the ERK/AP-1 pathway. *Oncol. Rep*. 2012;28(5):1665–1672.

188. Soreide K, Janssen EA, Körner H, et al. Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *J. Pathol*.

2006;209(2):147–156.

189. Nishibori M, Mori S, Takahashi HK. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PAR-2-mediated proliferation of colon cancer cell. *J. Pharmacol. Sci.* 2005;97(1):25–30.
190. Al-Eryani K, Cheng J, Abé T, et al. Protease-activated receptor 2 modulates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Hum. Pathol.* 2015;46(7):991–999.
191. Kaufmann R, Patt S, Zieger M, et al. Presence of the proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) in human brain tumor cells--trypsin- and SLIGRL-induced calcium response in primary cultured meningiomas. *Cancer Lett.* 1999;139(1):109–113.
192. Li X, Tai H-H. Thromboxane A2 receptor-mediated release of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) induces expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by activation of protease-activated receptor 2 (PAR2) in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Mol. Carcinog.* 2014;53(8):659–666.
193. Olejar T, Vetvicka D, Zadinova M, et al. Dual role of host Par2 in a murine model of spontaneous metastatic B16 melanoma. *Anticancer Res.* 2014;34(7):3511–3515.
194. Zheng Y, Xie L, Li X, et al. [Effect of ERK/AP-1 signaling pathway on proliferation of hepatoma cells induced by PAR-2 agonists]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2009;89(44):3116–3121.
195. Su S, Li Y, Luo Y, et al. Proteinase-activated receptor 2 expression in breast cancer and its role in breast cancer cell migration. *Oncogene.* 2009;28(34):3047–3057.
196. Caruso R, Pallone F, Fina D, et al. Protease-activated receptor-2 activation in

- gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor trans-activation and proliferation. *Am. J. Pathol.* 2006;169(1):268–278.
197. Black PC, Mize GJ, Karlin P, et al. Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate.* 2007;67(7):743–756.
198. Ma Y, Bao-Han W, Lv X, et al. MicroRNA-34a mediates the autocrine signaling of PAR2-activating proteinase and its role in colonic cancer cell proliferation. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e72383.
199. Aberg M, Johnell M, Wickström M, et al. Tissue Factor/ FVIIa prevents the extrinsic pathway of apoptosis by regulation of the tumor suppressor Death-Associated Protein Kinase 1 (DAPK1). *Thromb. Res.* 2011;127(2):141–148.
200. Wu B, Zhou H, Hu L, et al. Involvement of PKC $\alpha$  activation in TF/VIIa/PAR2-induced proliferation, migration, and survival of colon cancer cell SW620. *Tumour Biol.* 2013;34(2):837–846.
201. Zhou B, Zhou H, Ling S, et al. Activation of PAR2 or/and TLR4 promotes SW620 cell proliferation and migration via phosphorylation of ERK1/2. *Oncol. Rep.* 2011;25(2):503–511.
202. Chang L-H, Pan S-L, Lai C-Y, et al. Activated PAR-2 regulates pancreatic cancer progression through ILK/HIF- $\alpha$ -induced TGF- $\alpha$  expression and MEK/VEGF-A-mediated angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 2013;183(2):566–575.
203. Wang G, Zhai W, Yang H, et al. The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. *Nat Commun.* 2013;4:1860.

204. Wang K, Yuen ST, Xu J, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat. Genet.* 2014;46(6):573–582.
205. Okines AFC, Cunningham D. Trastuzumab: a novel standard option for patients with HER-2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer. *Therap Adv Gastroenterol.* 2012;5(5):301–318.
206. Kang Y-K, Boku N, Satoh T, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* [electronic article]. 2017;(http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673617318275)
207. M L, P P-V, T K, et al. Essential role of HDAC6 in the regulation of PD-L1 in melanoma. *Mol Oncol.* 2016;10(5):735–750.
208. Apostolidis SA, Rodríguez-Rodríguez N, Suárez-Fueyo A, et al. Protein phosphatase 2A is requisite for the function of regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2016;17(5):556–564.
209. Edupuganti RR, Harikumar A, Aaronson Y, et al. Alternative SET/TAFI Promoters Regulate Embryonic Stem Cell Differentiation. *Stem Cell Reports.* 2017;9(4):1291–1303.



## 謝辞

本研究および論文の作成を進めるにあたり、懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学研究室 佐藤晃一教授，大浜剛准教授，獣医臨床病理学研究室 水野拓也教授，鹿児島大学獣医薬理学研究室 宮本篤教授，白石光也准教授に心より厚く感謝の意を表します。

広島大学動物資源化学研究室 鈴木卓弥教授には TER 測定にあたりご指導・ご協力していただきました。山口大学獣医臨床病理学研究室 水野拓也教授，東京大学獣医外科学研究室 中川貴之准教授には CMeC-1 細胞，CMeC-2 細胞，KMeC 細胞，LMeC 細胞，CMGD2 細胞，CMGD5 細胞を提供していただきました。Duke University Medical Center の Dr. Michael P. Vitek には SET 標的薬である OP449 を提供していただきました。山口大学獣医病理学研究室 櫻井優助教授と山口大学獣医病理学研究室 坂井祐介助教授には胃癌組織切片の撮影にご協力していただきました。山口大学医学部 消化器・腫瘍外科学研究室 学術研究員の竹之内寛子様には胃癌組織切片の免疫化学染色についてご指導・ご協力していただきました。山口大学医学部 消化器・腫瘍外科学研究室 吉野茂文准教授，裕彰一教授，永野浩昭教授には胃癌患者組織切片のご提供とデータ解析にご協力いただきました。金沢大学 がん進展制御研究所 大島浩子准教授，大島正伸教授には，*Gan* マウスサンプルを提供していただきました。横浜市立大学医学部 肝胆膵消化器病学研究室 松浦哲也様，千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部部長 筆宝義隆様，東京農工大学 獣医薬理学研究室 白井達哉先生（特任講師）には，胃上皮オルガノイド作製にあたり，ご指導いただきました。心より厚く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学教室の皆様，特に学部生時代からお世話になった佐藤晃一先生，大浜剛先生，また，大学院の先輩である川崎秀吉先輩，藤原信行先輩，また，矢部滝太郎同輩と辻竣也後輩に心より感謝致します。

私を暖かく見守ってくれた円城寺家の父・円城寺徹，母・円城寺美智子，兄・円城寺亮，姉・堤望に心より感謝の意を表します。

最後に，本研究で犠牲になった多くの動物たちに深く感謝するとともに，その霊が鎮められるよう心よりお祈り致します。