

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 辻 竣也

題 目：ヒト・イヌの悪性腫瘍におけるがん抑制因子 Protein Phosphatase 2A 再活性化の抗がん効果および分子機構の解明

## 論文要旨：

タンパク質の可逆的なリン酸化反応は、リン酸化酵素（キナーゼ）と脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）により厳密に制御されており、その制御機構の異常は、がんや神経変性疾患をはじめとした様々な疾患の原因となる。がんは、ヒトと伴侶動物双方の臨床で最も重要な疾患の1つであり、その発生や悪性化には細胞内タンパク質の過剰なリン酸化が重要な役割を果たしている。これまで、キナーゼの異常な活性化がその一因とされ、分子標的抗がん剤の標的として注目されてきた。しかし、近年、がんの発生や悪性化には、キナーゼ活性の上昇だけではなくホスファターゼ活性の低下も極めて重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。したがって、ホスファターゼ活性を回復させる分子機構が、抗がん剤の新たな標的として有効であると考えられる。

Protein phosphatase 2A (PP2A) は、進化的に保存された主要なセリン・スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素の1つである。PP2A は A、B、C の3つのサブユニットで構成されるヘテロ3量体タンパク質複合体である。足場サブユニットとして機能する A サブユニット (PP2A A) に、酵素活性を持つ C サブユニット (PP2Ac) が結合し、AC コア 2 量体を形成している。そこへ、基質特異性を決定する調節サブユニットである B サブユニットの1つが結合し、AC コア 2 量体を基質へとリクルートする。B サブユニットは、B55、B56、PR72、PR93 の4つのファミリーに分類される約 20 種類が存在する。PP2A は生物種やがん種を越えて重要ながん抑制因子であり、ヒト・イヌの多くのがんにおいて PP2A 活性が低下していることから、PP2A を再活性化させることが有効な抗がん戦略になりうると考えられる。本研究では、「PP2A 活性を回復させる」という新たな抗がん戦略創出の基盤を形成するため、PP2A 活性化作用が報告された perphenazine (PPZ) の抗がん効果の分子機構の解明と、PP2A 阻害タンパク質 SET が PP2A 活性を阻害する分子機構の解明を行うことを目的とした。

向精神薬の1つである PPZ は、PP2A A に結合して PP2A 活性を上昇させ、ヒト T 細胞性急性リンパ芽球性白血病細胞に対して抗がん効果を示すことが報告された。しかしながら、PPZ の抗がん効果の詳細な分子機構や、獣医療への応用の可能性は明らかになっていない。そこで、第2章では、ヒト・イヌ T 細胞性リンパ腫細胞に対する PPZ の効果を解析した。ヒト・イヌ T 細胞性リンパ腫細胞株である HUT78 細胞、UL-1 細胞に対し、PPZ の濃度依存的な細胞死が認められた。さらに、FACS を用いた検討や、アポトーシスの指標である活性型 caspase 3 の発現を western blotting で検討することで、PPZ の抗がん効果には、アポトーシス経路の活性化が関与していることが示唆された。さらに、PPZ は、HUT78 細胞および UL-1 細胞において、Akt、ERK1/2 のリン酸化レベルを低下させることが認められた。PPZ の抗がん作用には、PP2A 依存的な Akt の脱リン

酸化が重要であることが示された。一方、ERK1/2 のリン酸化レベルの低下を引き起こすホスファターゼは同定できなかったが、PP2A は関与していないことが示唆された。

SET は PP2A 阻害タンパク質の1つであり、ヒト・イヌの上皮系がんや血液系がんにおいて、発現量の上昇が PP2A 活性の低下を引き起こし、がんの悪性化に関与していることが報告されている。しかし、希少がんである肉腫における機能はほとんど明らかになっていない。そこで、第3章では、イヌ骨肉腫における SET の機能の解明を行なった。イヌ骨肉腫細胞株である POS 細胞および HM-POS 細胞において、SET 発現抑制を行ったところ、POS 細胞の細胞増殖率、幹細胞性の指標であるコロニー形成能の低下が、HM-POS 細胞ではコロニー形成能の低下のみが認められた。SET 発現抑制は、POS 細胞の ERK1/2 のリン酸化レベルを低下させたのに対して、HM-POS 細胞では、ERK1/2、p70S6K、NF- $\kappa$ B、E2F1 のリン酸化レベルの低下が認められた。また、SET を標的とした PP2A 活性化剤 FTY720 は、単独で抗がん作用を示し、cisplatin との併用で相加的な抗がん効果を発揮した。

これまで、SET は PP2A に結合し、その活性を阻害することが報告されていた。しかし、その結合制御機構や詳細な結合様式は明らかになっていない。そこで、第4章では、SET による PP2A 阻害機構の詳細を、SET-PP2A 結合に注目し解析した。免疫沈降法や NanoBiT 法を用いた検討から、SET は 2 量体化することで、PP2A B56 $\alpha$  や B56 $\gamma$ 3 に結合することが明らかになった。さらに、化合物スクリーニングにより SET の 2 量体化を阻害する化合物として xanthohumol と KN-93 を同定し、SET-B56 $\alpha$ 、SET-B56 $\gamma$ 3 結合に与える影響を検討した。Xanthohumol、KN-93 は SET-B56 $\alpha$ 、SET-B56 $\gamma$ 3 結合を阻害することが認められた。この結果は、SET 2 量体化の阻害が、PP2A を活性化させる新たな手法になることを示唆する重要な見知である。

本研究により、ヒト・イヌの T 細胞性リンパ腫において、PPZ が同様の作用機序で、PP2A を再活性化し抗がん効果を示すことが認められ、PP2A の再活性化は、ヒト医療、伴侶動物医療において、有効な抗がん戦略になりうることを示唆された。また、PP2A 阻害タンパク質である SET を標的とした PP2A の再活性化は、新たにイヌ骨肉腫において抗がん効果が認められ、動物種やがん種を超えて、SET-PP2A 相互作用を阻害することが有効な抗がん戦略になりうることを示唆する重要な結果が得られた。SET は PP2A 活性を阻害するという報告は多く認められるが、どのようにして PP2A 活性を阻害しているのかという情報が欠如していた。本研究は、SET の 2 量体化が、PP2A との結合に重要であることを明らかにし、新たな SET 標的薬開発の可能性を示した。

本研究より明らかになった、PPZ の作用機序や、SET による PP2A 阻害機構は、PP2A を標的とした新規抗がん剤開発の実現に貢献することが期待される。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	辻竣也
審 査 委 員	主 査：山口大学・准教授・大濱剛
	副 査：山口大学・教授・佐藤晃一
	副 査：鳥取大学・教授・太田利男
	副 査：山口大学・教授・水野拓也
	副 査：山口大学・教授・加納聖
題 目	ヒト・イヌの悪性腫瘍におけるがん抑制因子 Protein Phosphatase 2A 再活性化の抗がん効果および分子機構の解明

審査結果の要旨：

タンパク質の可逆的なリン酸化反応は、リン酸化酵素（キナーゼ）と脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）により厳密に制御されており、その制御機構の異常は、がんや神経変性疾患をはじめとした様々な疾患の原因となる。がんは、ヒトと伴侶動物双方の臨床で最も重要な疾患の1つであり、その発生や悪性化には細胞内タンパク質の過剰なリン酸化が重要な役割を果たしている。これまで、キナーゼの異常な活性化がその一因とされ、分子標的抗がん剤の標的として注目されてきた。しかし、近年、がんの発生や悪性化には、キナーゼ活性の上昇だけではなくホスファターゼ活性の低下も極めて重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。したがって、ホスファターゼ活性を回復させる分子機構が、抗がん剤の新たな標的として有効であると考えられる。

Protein phosphatase 2A (PP2A) は、進化的に保存された主要なセリン・スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素の1つである。PP2A は A、B、C の3つのサブユニットで構成されるヘテロ3量体タンパク質複合体である。足場サブユニットとして機能する A サブユニット (PP2A A) に、酵素活性を持つ C サブユニット (PP2Ac) が結合し、AC コア 2 量体を形成している。そこへ、基質特異性を決定する調節サブユニットである B サブユニットの1つが結合し、AC コア 2 量体を基質へとリクルートする。B サブユニットは、B55、B56、PR72、PR93 の4つのファミリーに分類される約 20 種類が存在する。PP2A は生物種やがん種を越えて重要ながん抑制因子であり、ヒト・イヌの多くのがんにおいて PP2A 活性が低下していることから、PP2A を再活性化させることが有効な抗がん戦略になりうると考えられる。

本学位論文は、「PP2A 活性を回復させる」という新たな抗がん戦略創出の基盤を形成するため、第1章では PP2A 活性化作用が報告された perphenazine (PPZ) の抗がん効果の分

(別紙様式第 10 号)

子機構の解明を行った。また、第 2 章と第 3 章では、それぞれイヌとヒトの PP2A 阻害タンパク質 SET が PP2A 活性を阻害する分子機構の解明を行った。

本研究により、第 2 章では、ヒトおよびイヌの T 細胞性リンパ腫細胞に対して、PPZ が PP2A 依存的に Akt シグナルを抑制することで抗がん効果を発揮することが明らかにした。第 3 章では、イヌの骨肉腫において、SET が主に ERK1/2 シグナルを抑制することで抗がん効果を発揮することを明らかにした。また、SET 標的薬である FTY720 が抗がん効果を示すことに加えて、cisplatin と併用することで相加的な抗がん効果が得られることを見出した。第 4 章では、SET による PP2A 阻害機構の詳細を、SET-PP2A 結合に注目して解析し、免疫沈降法や NanoBiT 法を用いた検討から、SET は 2 量体化することで、PP2A B56 $\alpha$  や B56 $\gamma$ 3 に結合することが明らかにした。また、NanoBiT 法を用いたスクリーニングから、SET の二量体化を阻害する化合物を複数同定した。本研究より明らかになった、PPZ の作用機序や、SET による PP2A 阻害機構は、PP2A を標的とした新規抗がん剤開発の実現に貢献することが期待される。

以上より、本論文は博士（獣医学）の付与に資する内容であると考える。