

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

山口大学大学院連合獣医学研究科

辻 竣也

2020年3月

山口大学博士(獣医学)学位論文

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

山口大学大学院連合獣医学研究科

辻 竣也

2020年3月

指導教官 大浜 剛 准教授

目次

第1章 背景および目的	1
1-1 Protein phosphatase 2A	2
1-2 PP2A とがん	4
1-3 研究目的	7
第2章 向精神薬 perphenazine の抗がん効果の検討	8
2-1 背景および研究目的	9
2-2 実験結果	10
2-2-1 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株に対し抗がん効果 を示す	10
2-2-2 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株にアポトーシスを 誘導する	12
2-2-3 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株の Akt シグナルを 抑制する	14
2-2-4 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株の ERK1/2 シグナル を抑制する	17
2-2-5 PPZ は PP2A 活性依存的に Akt を、チロシンホスファターゼ依存 的に ERK1/2 を脱リン酸化する	20
2-2-6 Akt 阻害剤はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株に細胞死を 誘導する	24
2-3 考察	26

2-3-1	ヒトとイヌの細胞の感受性の違い.....	26
2-3-2	PPZによる細胞死誘導の分子機構.....	27
2-3-3	PPZの抗がん効果におけるドパミン受容体の関与の可能性.....	30
2-3-4	PPZのERK1/2シグナルに対する作用.....	30
2-3-5	臨床応用の可能性.....	31
2-4	総括.....	32
第3章	イヌ骨肉腫におけるSETの役割の解明.....	33
3-1	背景と研究目的.....	34
3-1-1	PP2A阻害タンパク質SETとがん.....	34
3-1-2	SETによるがん悪性化の分子機構.....	35
3-1-3	SETを標的としたPP2A活性化剤.....	35
3-1-4	肉腫におけるSETの役割.....	36
3-1-5	研究目的.....	37
3-2	実験結果.....	38
3-2-1	SET発現抑制がイヌ骨肉腫細胞株の表現型に与える影響.....	38
3-2-2	SET発現抑制がイヌ骨肉腫細胞株の細胞内シグナルに与える影響	41
3-2-3	SET発現抑制がイヌ骨肉腫細胞株の転写因子に与える影響.....	43
3-2-4	イヌ骨肉腫細胞株におけるERK1/2阻害剤の感受性の検討.....	45
3-2-5	イヌ骨肉腫細胞株におけるSET標的薬の効果の検討.....	47
3-3	考察.....	49

3-3-1	イヌ骨肉腫細胞間で、SET 発現抑制がもたらす効果の差	49
3-3-2	上皮系、血液系のがんと骨肉腫における SET が制御するシグナル の比較	50
3-3-3	SET 阻害剤 FTY720 が cisplatin と相乗効果を示す分子機構	51
3-4	総括	52
第4章	SET による PP2A 阻害メカニズムの解明	53
4-1	背景および研究目的	54
4-1-1	PP2A/B56 複合体の機能	54
4-1-2	SET による PP2A 阻害機構	54
4-1-4	研究目的	55
4-2	実験結果	56
4-2-1	SET α は PP2A/B56 複合体と選択的に結合する	56
4-2-2	SET α と B56 α および B56 γ 3 の結合領域の同定	59
4-2-2-1	SET α が結合する B56 α および B56 γ 3 の領域の同定	59
4-2-2-2	B56 α および B56 γ 3 に結合する SET α の領域の同定	62
4-2-3	SET α の 2 量体化は、B56 α および B56 γ 3 との結合に必要	64
4-2-4	SET α の 2 量体化を阻害する化合物の探索	69
4-2-5	Xanthohumol、KN-93 は SET α /B56 α 、SET α /B56 γ 3 結合を阻害する	73
4-2-6	KN-93 標的因子が SET α の 2 量体化に与える影響	75
4-2-7	KN-93 は SET α の 2 量体化を直接阻害する	77

4-3 考察.....	80
4-3-1 SET α と PP2A 複合体の結合.....	80
4-3-2 SET の 2 量体化制御機構と PP2A 活性への影響.....	81
4-3-3 SET α と B56 ファミリーの結合様式.....	83
4-3-4 Xanthohumol および KN-93 が SET α の 2 量体化を阻害するメカニ ズム.....	84
4-4 総括.....	85
第 5 章 総合討論.....	86
5-1 PP2A を標的とした抗がん戦略の今後の展望.....	87
5-2 SET の発現、機能調節機構.....	90
5-3 PP2A 活性化剤とキナーゼ阻害剤の併用について.....	91
第 6 章 実験材料および実験方法.....	93
6-1 細胞培養法.....	94
6-2 プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製.....	94
6-2-1 プラスミドの作製.....	94
6-2-2 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....	95
6-2-3 プラスミドのトランスフェクション.....	96
6-2-4 レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入.....	96
6-3 リコンビナントタンパク質の精製.....	97
6-4 Western blotting によるタンパク質発現量測定.....	98
6-4-1 タンパク質抽出.....	98

6-4-2 Western blotting	98
6-5 免疫沈降法および pull down assay	99
6-5-1 FLAG M2 ビーズを用いた免疫沈降法.....	99
6-5-2 GST pull down assay	100
6-6 細胞増殖能と細胞生存率の測定.....	100
6-7 コロニー形成試験.....	100
6-8 NanoBiT 法.....	101
6-8-1 一過性発現による NanoBiT 法.....	101
6-8-2 NanoBiT 法用 A549 細胞株の作製.....	103
6-8-3 NanoBiT 法用 A549 細胞株を用いたスクリーニング.....	103
6-8-4 In vitro NanoBiT 法.....	104
6-9 アポトーシスの解析.....	104
6-10 統計処理.....	105
引用文献.....	108
謝辞.....	133

第1章 背景および目的

1-1 Protein phosphatase 2A

細胞内タンパク質は、可逆的なリン酸化を受けることで立体構造を変化させ、活性や細胞内局在、相互作用を変化させている。リン酸化反応の 98%は、タンパク質のセリンおよびスレオニン残基に起こることが知られており、約 400 種類のタンパク質リン酸化酵素 (protein kinase) によって制御されている [28, 34]。一方、セリン・スレオニン残基の脱リン酸化反応は、PPP、PPM、Asp phosphatase の3つのスーパーファミリーに分類される、約 40 種類の脱リン酸化酵素 (protein phosphatase) により引き起こされている [17]。Protein phosphatase 1 (PP1)、PP5、および type 2A protein phosphatase である protein phosphatase 2A (PP2A)、PP4、PP6 は PPP スーパーファミリーに分類され、細胞内のセリン・スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素活性の大部分を占めている [130]。これらのうち、PP2A は細胞内タンパク質の約 1%を占めるとも言われ、PP1 と合わせて細胞内の脱リン酸化活性の約 90%を担う主要な脱リン酸化酵素である [155]。また、PP2A は進化的に高く保存されており、細胞周期の制御、アポトーシス、細胞分化の調節など多岐にわたる細胞機能を制御している [70]。

PP2A は3つのサブユニットによる複合体を形成し機能するホロ酵素である。酵素活性を持つ C サブユニット (PP2Ac) および足場サブユニットである A サブユニット (PP2A A) がコア2量体を形成し、そこに調節サブユニットである B サブユニットが結合することで ABC3量体を形成している。B サブユニットには、B (B55/PR55)、B' (B56/PR61)、B'' (PR72/PR130)、B''' (PR93/PR110) の4つの異なるファミリーからなる 20 種類以上のアイソフォームが存在し、基質特異性や細胞内局在を調節する [125] (図1A)。

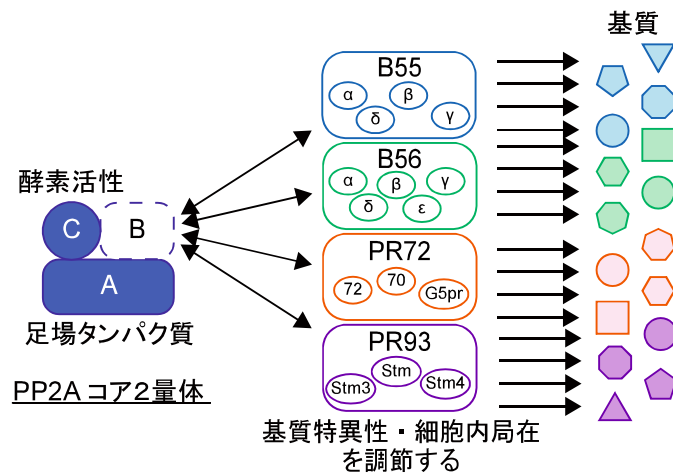


図1A Protein phosphatase 2A (PP2A)

PP2A は A、B、C の3つのサブユニットによる複合体を形成し機能するホロ酵素である。C サブユニットは酵素活性を持ち、A サブユニットとコア2量体を形成する。B サブユニットは、4つの異なるファミリーからなる 20 種類以上のアイソフォームがある調節サブユニットとして機能し、AC コア2量体の基質特異性や細胞内局在を決定している。

1-2 PP2A とがん

Weinberg らのグループは、ヒトの細胞をがん化させるために必要な因子を同定する研究の中で、ヒト正常細胞に hTERT (telomerase catalytic subunit)、H-RAS、simian virus 40 early region protein (SV40-ER) の遺伝子を外来的に導入することでがん化が誘導できることを明らかにした [57]。SV40-ER からは、SV40 large-T protein (SV40-LT) と small-t protein (SV40-ST) の2種のタンパク質が発現し、SV40-LT は p53、Rb を、SV40-ST は PP2A を阻害する。Weinberg らはその後、ヒト正常上皮細胞や線維芽細胞に、hTERT、H-RAS、SV40-LT を発現させると、細胞が不死化するが、足場非依存的細胞増殖能に代表されるがんの表現型が認められないことを明らかにした。しかし、この細胞にさらに SV40-ST を発現させると、足場非依存的細胞増殖を示しがん化したことから [57]、PP2A 活性の阻害は、細胞のがん化に必須であると考えられている。その後、SV40-ST の代わりに PP2A B56 γ 3 発現を抑制してもがん化することが明らかになった [27]。B56 α 、B56 γ および PR72 を含む PP2A 複合体ががんの悪性を防ぐことも報告されており [117]、特定の PP2A 複合体活性の抑制が、細胞のがん化やがんの悪性化に関与していることが示唆されている。PP2A 複合体ががんを抑制する分子機構は完全には明らかになっていないが、がん抑制因子である p53 および Rb などを活性化することや、がん促進因子である cMyc の分解を促進することで、重要ながん抑制因子として機能していると考えられている [75]。

ヒト、イヌのがん細胞における、PP2A 活性の低下は PP2A 遺伝子の変異や、内在性阻害タンパク質により引き起こされている [8, 9, 12, 16, 21, 22, 28, 43, 44,

69] (図 1 B)。変異による PP2A 活性の低下は、非常に低頻度であることが明らかになっているが、子宮内膜がんでは、約 1/3 の患者で認められ、PP2A A サブユニットの 5 番目の HEAT リピートに位置する P179R 変異が多く報告されている [113]。P179R 変異は、AC コア 2 量体と B55 や B56 ファミリーの結合性を低下させ、がんの悪性化に寄与する [28, 146, 147]。

一方、多くのがんでは、内在性の PP2A 阻害タンパク質である CIP2A、PME-1 および SET の発現上昇が、がんの悪性化に関与していると考えられる。CIP2A は、2 量体化することで、B56 α や B56 γ と結合し、cMyc タンパク質を安定化することが報告されている [141]。CIP2A の発現上昇はヒトすい臓がんや頭頸部扁平上皮がんなど様々ながんの悪性度と正の相関を示す [135, 138]。また、PME-1 は、PP2A 特異的脱メチル化酵素であるが、同時に PP2Ac の酵素活性部位に直接結合することで PP2A 阻害タンパク質としても機能する [149]。PME-1 発現の上昇は ERK1/2 シグナルなどの活性化を引き起こすことが報告されており、グリオーマや子宮内膜がんの予後不良と正の相関を示す [110, 140]。SET は、はじめ牛の腎臓から PP2A を阻害するタンパク質として単離され、ERK1/2 や Akt シグナルの活性化、cMyc や E2F1 タンパク質の安定化を介してがんの悪性化に寄与することが明らかになってきた [43, 69, 84, 88]。SET 発現の上昇は、慢性リンパ性白血病や胃がんなどの予後不良と正の相関を示す [29, 43]。したがって、がん細胞における PP2A 活性低下の分子機構を理解し、PP2A 活性を正常に戻す手段を構築することは、有効な抗がん戦略につながることを期待される。

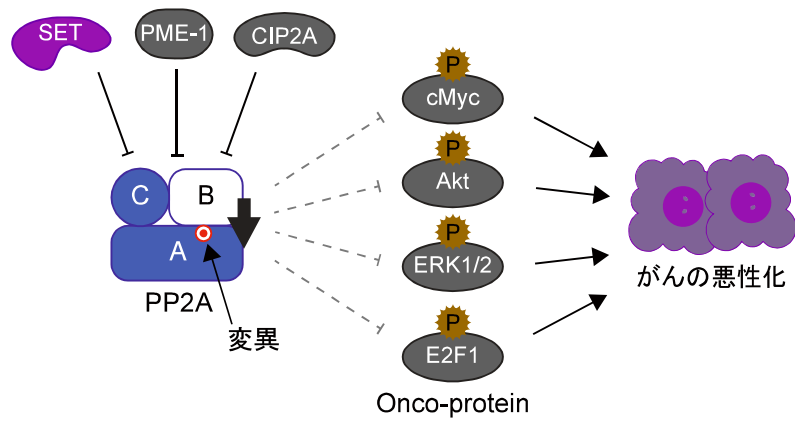


図1B PP2A とがん

PP2A 活性の低下はがんの発生や悪性化に関与している。がん細胞では、PP2A 活性は変異や内在性の PP2A 阻害タンパク質 (SET、PME-1、CIP2A) により抑制されている。

1-3 研究目的

PP2A は生物種やがん種を越えて重要ながん抑制因子である。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 活性化剤として報告された 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。

第2章 向精神薬 perphenazine の抗がん効果の検討

2-1 背景および研究目的

がん細胞内の PP2A を再活性化させる抗がん戦略が注目されており、PP2A に直接結合して活性化を促す化合物や、内在性の PP2A 阻害タンパク質と PP2A の相互作用を阻害して PP2A 活性を回復させる化合物の開発が進んでいる。

フェノチアジン系向精神薬である perphenazine (PPZ) は、中枢神経系におけるドパミン作動性神経や、セロトニン作動性神経を抑制することで統合失調症の治療薬としてヒト・イヌにおいて古くから臨床利用されている [39, 54, 60, 107, 137]。最近、ヒト T 細胞性急性リンパ芽球性白血病細胞を用いた研究から、PPZ は PP2A A サブユニットに結合して PP2A 活性を上昇させることで、抗がん効果を発揮することが報告された [55]。以前我々の研究室では、イヌの T 細胞性リンパ腫において、SET を標的とした PP2A の再活性化が抗がん効果を示すことを明らかにした [49]。したがって、PPZ による PP2A 活性化も抗がん効果が期待できるが、PPZ が T 細胞性リンパ腫に有効であるかは、ヒト・イヌの双方で不明である。また、PPZ が、どのようなシグナルを介して抗がん効果を発揮しているのかは明らかになっていない。

そこで、第2章では、PP2A を直接活性化させる手法として、PPZ に注目し、イヌおよびヒトの T 細胞性リンパ腫細胞に対する PPZ の抗がん効果を検証し、その詳細な分子機構を明らかにすることを目的とした研究を行った。

2-2 実験結果

2-2-1 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株に対し抗がん効果を示す

ヒト T 細胞性リンパ腫細胞株と T 細胞性白血病細胞株の PPZ に対する感受性を比較検討するため、ヒト T 細胞性リンパ腫細胞株である HUT78 細胞およびヒト T 細胞性白血病細胞株である CCRF-CEM 細胞、SKW3 細胞、Jurkat 細胞、TALL1 細胞を PPZ で処置し、細胞生存率を解析した(図2A)。また、イヌ T 細胞性リンパ腫細胞株に対する PPZ の抗がん効果を検討するため、イヌ T 細胞性リンパ腫由来細胞株である Ema 細胞、UL-1 細胞を PPZ で処置し、細胞生存率を解析した(図2B)。PPZ は、ヒトおよびイヌの T 細胞性リンパ腫細胞株に対して、濃度依存的に抗がん効果を示すことが明らかになった。

PPZ の細胞毒性ががん細胞特異的であるかを検討するため、イヌ末梢血単核球(PBMC)に対する PPZ の効果を解析した。PBMC、Ema 細胞、UL-1 細胞を PPZ で処置し、細胞生存率を解析した(図2C)。PPZ は Ema 細胞、UL-1 細胞にのみ細胞毒性を示し、PBMC に対しては細胞毒性を示さないことが認められた。以上の結果から、PPZ はイヌにおいて、T 細胞性リンパ腫細胞特異的に抗がん効果を示すことが明らかとなった。

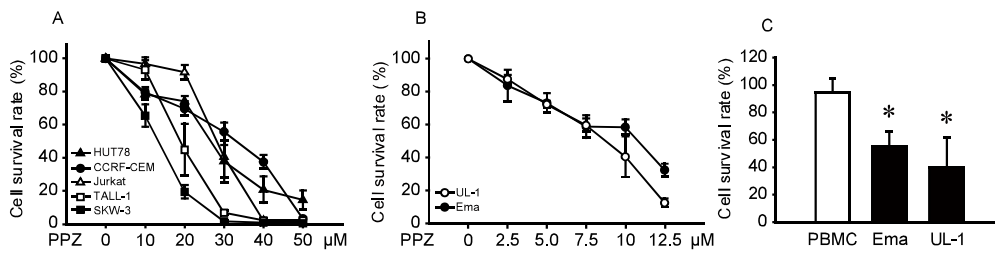


図2 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株に対し抗がん効果を示す

(A)ヒト T 細胞性リンパ腫細胞株 HUT78 細胞およびヒト T 細胞性白血病細胞株 CCRF-CEM 細胞、Jurkat 細胞、TALL1 細胞、SKW3 細胞を PPZ (10-50 μ M) で処置し、72 時間後の細胞生存率を CCK8 により解析した。PPZ 無処置の際の吸光度を 100% とし、その相対値で示した。N = 6。

(B)イヌ T 細胞性リンパ腫細胞株 Ema 細胞、UL-1 細胞を PPZ (2.5-12.5 μ M) で処置し、72 時間後の細胞生存率を CCK8 により解析した。PPZ 無処置の際の吸光度を 100% とし、その相対値で示した。N = 6。

(C)イヌ末梢血単核球 (PBMC)、Ema 細胞、UL-1 細胞を PPZ (10 μ M) で処置し、72 時間後の細胞生存率を CCK8 により解析した。各細胞における PPZ 無処置の際の吸光度を 100% とし、PPZ 処置時の相対値を比較した。N = 4。*: $P < 0.05$ (PBMC との比較)。

2-2-2 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株にアポトーシスを誘導する

PP2A の再活性化による抗がん効果には、アポトーシスが関与していることが報告されている [49, 139]。そこで、PPZ により誘導されるヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株の細胞死がアポトーシス経路の活性化によるものかを検討するため、HUT78 細胞および UL-1 細胞を PPZ で処置し、アポトーシス活性化の指標である cleaved (active) caspase 3 の発現量を解析した (図3A-D)。PPZ 処置により cleaved caspase 3 の発現の上昇が認められた。

次に、Annexin V-FITC Apoptosis Kit (Bio Vision) を用いた FACS による解析で、PPZ が HUT78 細胞および UL-1 細胞にアポトーシスを誘導しているか検討した。どちらの細胞においても PPZ 処置により、Annexin V 陽性細胞が増加し、PPZ 処置群 (赤線) が非処置群 (青線) と比較し右方向へシフトしていることが認められた (図3E、F)。

以上の結果より、PPZ は HUT78 細胞および UL-1 細胞に対してアポトーシスを誘導していることが示唆された。

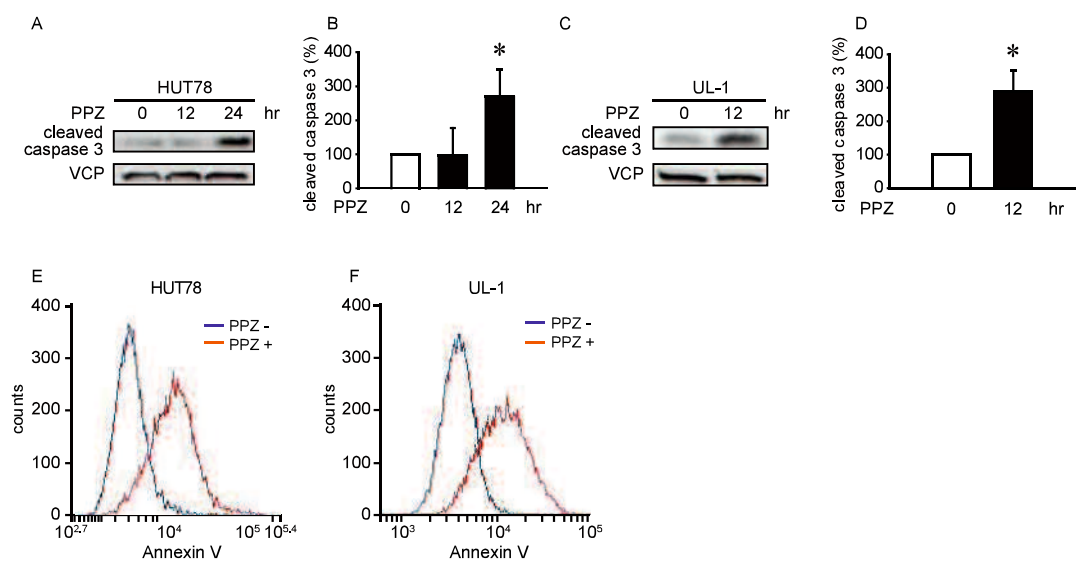


図3 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株にアポトーシスを誘導する

(A-D) HUT78 (A、B) を PPZ (15 μM) で 12、24 時間、UL-1 (C、D) を PPZ (20 μM) で 12 時間処置し、cleaved (active) caspase 3 の発現量を western blotting により解析した。代表的な写真 (A、C) と、PPZ 無処置の際を 100% とした定量図 (B、D)。N = 3。*: $P < 0.05$ (PPZ 無処置との比較)。

(E、F) HUT78 (E) および UL-1 (F) をそれぞれ PPZ (20 μM) で 12 時間処置し、FACS を用いて Annexin V 陽性の細胞を解析した。N = 2-3。

2-2-3 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株の Akt シグナルを抑制する

HUT78 細胞および UL-1 細胞を PPZ で処置し、細胞の増殖および生存に重要な Akt の活性に対する影響を検討した(図4A-F)。PPZ 処置後 15-30 分で Akt の Thr308 と Ser473 のリン酸化レベルの顕著な低下が認められた。

Akt Thr308 リン酸化は PDK1 によって [4]、Akt Ser473 リン酸化は mTORC2 によって引き起こされる [123]。PDK1 は Ser241 がリン酸化されると活性化する [25]。一方、mTORC2 の活性制御機構については不明な点が多く、Akt Ser473 や NDRG1 のリン酸化レベルが mTORC2 活性化の指標として用いられる [51]。HUT78 細胞および UL-1 細胞を PPZ で 15 分間処置し、PDK1、NDRG1 のリン酸化レベルの変化を解析したところ、PPZ 処置による PDK1 や NDRG1 のリン酸化レベルへの影響は認められなかった(図4G-L)。

以上の結果より、PPZ は PP2A を活性化させ、PDK1 や mTORC2 など上流因子の活性を抑制するのではなく、直接 Akt の脱リン酸化を引き起こしている可能性が示された。

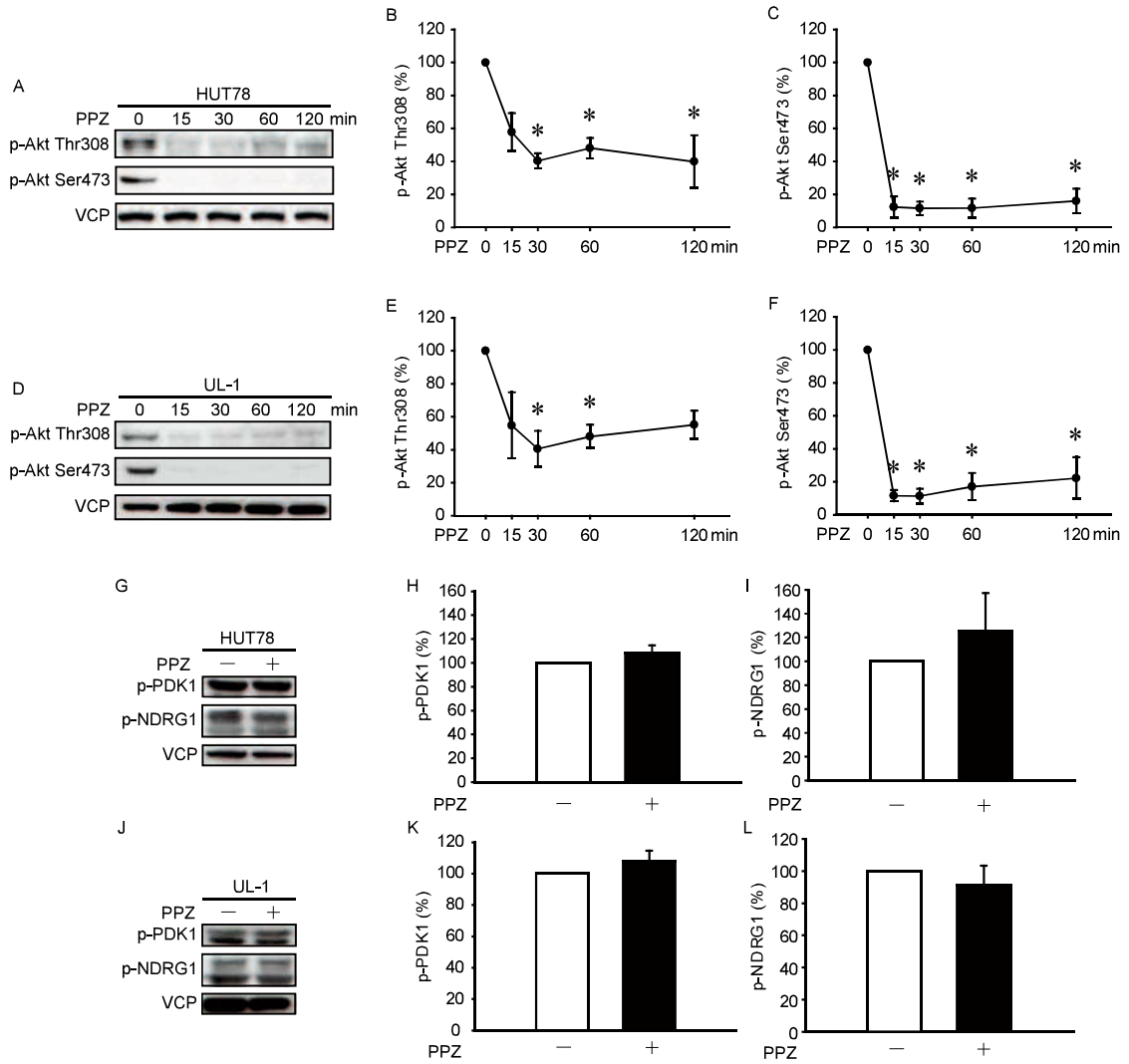


図4 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株の Akt シグナルを抑制する

(A-F) HUT78 細胞 (A-C) を PPZ (20 μ M) で、UL-1 細胞 (D-F) を PPZ (10 μ M) で 15-120 分間処置し、Akt Thr308 リン酸化および Ser473 リン酸化レベルを western blotting により解析した。代表的な写真 (A、D) と 0 min を 100% として相対値で表したリン酸化 Akt Thr308 (B、E) およびリン酸化 Akt Ser473 (C、F) の定量図。N = 3。*: $P < 0.05$ (0 min との比較)。

(G-L) HUT78 (G-I) を PPZ (20 μ M) で、UL-1 (J-L) を PPZ (10 μ M) で 15 分間処置し、PDK1 リン酸化および NDRG1 リン酸化レベルを western blotting により解析した。代表的な写真 (G、J) と 0 min を 100% として相対値で表したリン酸化 PDK1 (H、K)、リン酸化 NDRG1 (I、L) の定量図。N = 3。

2-2-4 PPZ はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株の ERK1/2 シグナルを抑制する

Akt と同様に、細胞増殖や細胞生存に関与している ERK1/2 シグナルは、PP2A により抑制されていることが知られている。HUT78 細胞、UL-1 細胞を PPZ で処置し、ERK1/2 のリン酸化レベルに対する PPZ の影響を検討した(図5A-D)。PPZ 処置後、どちらの細胞株でも ERK1/2 のリン酸化レベルの低下が認められたが、HUT78 細胞に対しては急激な、UL-1 細胞に対しては緩やかな脱リン酸化を引き起こすことが明らかになった。

ERK1/2 は MEK1/2 によってリン酸化され、MEK1/2 は Ser217 と Ser221 がリン酸化されることで活性化する [5]。HUT78 細胞および UL-1 細胞を PPZ で 15 分間処置し、MEK1/2 のリン酸化レベルの変化を解析した。PPZ 処置により MEK1/2 のリン酸化レベルの低下が観察されたが、HUT78 細胞においては ERK1/2 のリン酸化レベルの低下に比べると穏やかだった(図5E-H)。

さらに、PPZ 処置が MEK1/2 の上流因子である B-Raf や C-Raf [93]の活性に与える影響を、活性化の指標であるリン酸化レベルの変化により検討した(図5I-N)。HUT78 細胞では、PPZ 処置による B-Raf、C-Raf のリン酸化レベルへの影響は認められなかった。UL-1 細胞では、B-Raf のリン酸化レベルがわずかであるが有意に低下した。

以上の結果より、PPZ は PP2A を活性化させ、MEK1/2、ERK1/2 の脱リン酸化を誘導していることが示唆された。

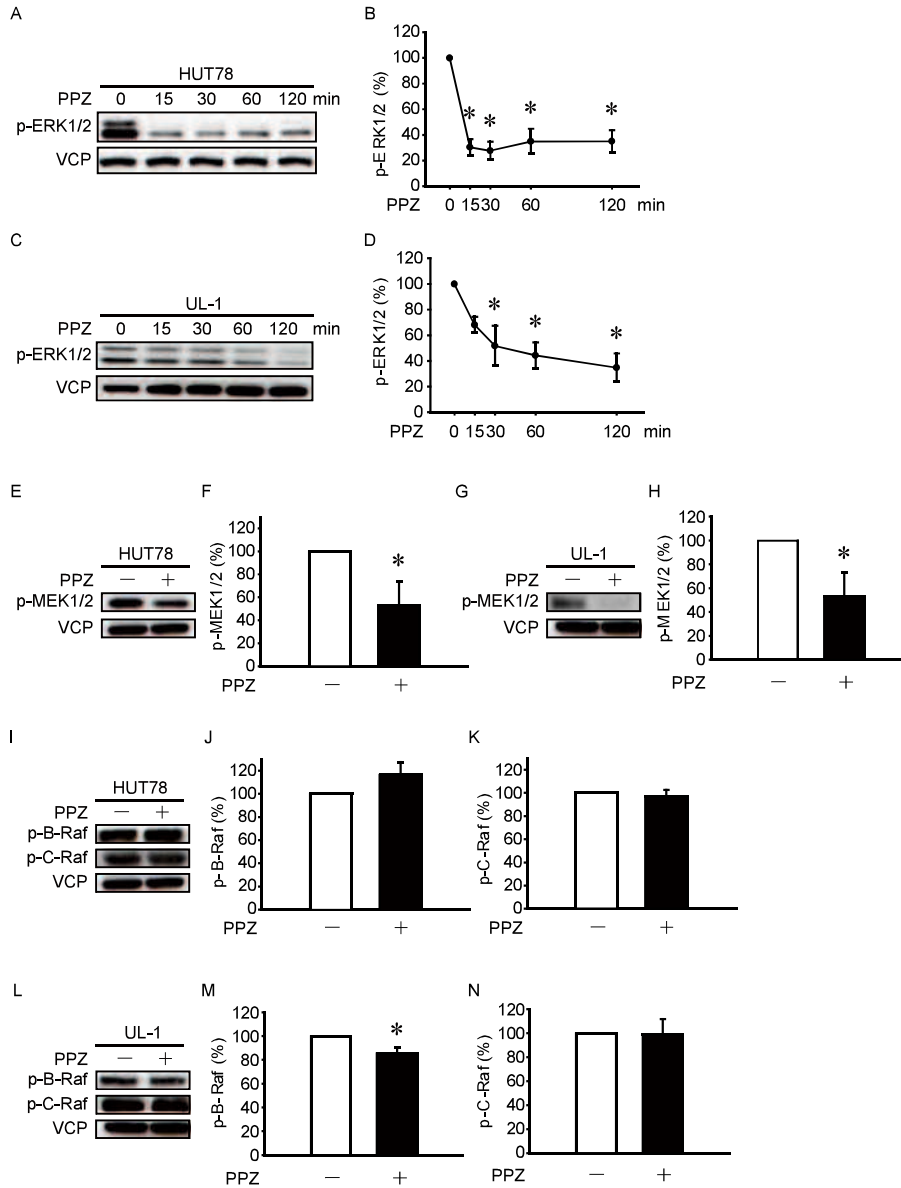


図5 PPZ はヒトおよびヌ T 細胞性リンパ腫細胞株の ERK1/2 シグナルを抑制する (A-D) HUT78 細胞 (A, B) を PPZ (20 μ M) で、UL-1 細胞 (C, D) を PPZ (10 μ M) で 15-120 分間処置し、ERK1/2リン酸化レベルを western blotting により解析した。代表的な写真 (A, C) と 0 min を 100% とした場合の ERK1/2リン酸化レベル (B, D) の定量図。N = 3。*: $P < 0.05$ (0 min との比較)。

(E-H) HUT78 細胞 (E, F) を PPZ (20 μ M) で、UL-1 細胞 (G, H) を PPZ (10 μ M) で 15 分間処置し、MEK1/2 リン酸化レベルを western blotting により解析した。代表的な写真 (E, G) と 0 min を 100% とした場合の MEK1/2 リン酸化レベル (F, H) の定量図。N = 3。*: $P < 0.05$ (0 min との比較)。

(I-N) HUT78 細胞 (I-K) を PPZ (20 μ M) で、UL-1 細胞 (L-N) を PPZ (10 μ M) で 15 分間処置し、B-Raf リン酸化レベルと C-Raf リン酸化レベルを western blotting により解析した。代表的な写真 (I, L) と 0 min を 100% とした場合の B-Raf リン酸化レベル (J, M)、C-Raf リン酸化レベル (K, N) の定量図。N = 3。*: $P < 0.05$ (0 min との比較)。

2-2-5 PPZ は PP2A 活性依存的に Akt を、チロシンホスファターゼ依存的に ERK1/2 を脱リン酸化する

PPZ による Akt (Ser473) および ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 脱リン酸化が、PP2A 活性に依存するかを検討した (図6A、B)。PP2A 特異的阻害剤である okadaic acid (OA) [47] で前処置することで PP2A の活性を抑制した後に、HUT78 細胞、UL-1 細胞を PPZ で処置した。どちらの細胞においても、PPZ 処置による Akt Ser473 の脱リン酸化は OA の前処置で抑制された。一方、ERK1/2 の脱リン酸化は OA 前処置により抑制されなかった。以上の結果から、PPZ により誘導される Akt の脱リン酸化は PP2A 依存的である一方で、ERK1/2 の脱リン酸化は PP2A 非依存的であることが示唆された。

ERK1/2 の脱リン酸化には PP1 や PP2B の関与も報告されている [64, 157]。そこで、PPZ による ERK1/2 の脱リン酸化への PP1 および PP2B の関与を、PP1 阻害剤である tautomycin (TAU) [37]、PP2B 阻害剤である cyclosporin A (CsA) [79] で前処置した後に、HUT78 細胞、UL-1 細胞を PPZ で処置し、ERK1/2 のリン酸化レベルを解析した (図6C、D)。TAU や CsA は PPZ による ERK1/2 の脱リン酸化を抑制しないことが認められた。また、ERK1/2 は、PP2C や DUSP1/6 による脱リン酸化を受けることも報告されている [119, 159]。そこで、PP2C 阻害剤である sanguinarine (SA) [1]、DUSP1/6 阻害剤である BCI [97] で前処置した後に、HUT78 細胞、UL-1 細胞を PPZ で 15-30 分間処置し、ERK1/2 のリン酸化レベルを解析した (図6E、F)。SA や BCI は PPZ による ERK1/2 の脱リン酸化を抑制しないことが認められた。そこで、チロシンホスファターゼ阻害剤である Na_3VO_4 を用いて、PPZ による ERK1/2 の脱リン酸化に、チロシンホスファターゼが関与しているのかを検討した (図6G、H)。 Na_3VO_4 の前処置により、PPZ によ

る ERK1/2 の脱リン酸化が緩やかになることが認められた。以上の結果より、PPZ が誘導する ERK1/2 の脱リン酸化の一部に、なんらかのチロシンホスファターゼが関与していることが示唆された。

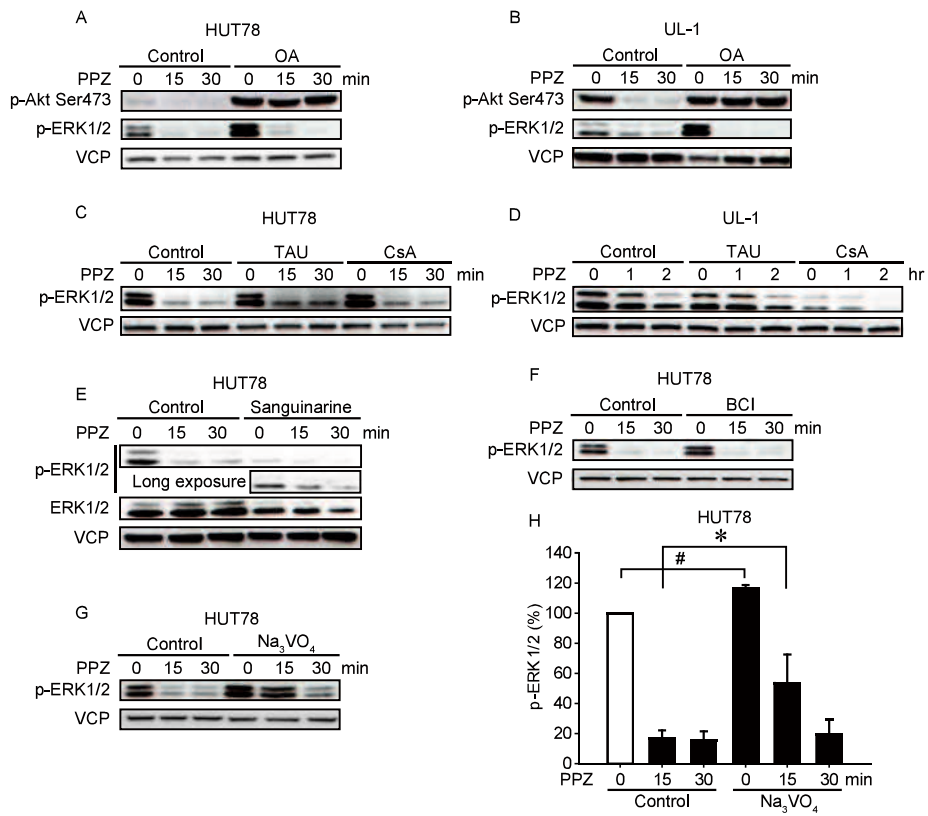


図6 PPZはPP2A活性依存的にAktを、チロシンホスファターゼ依存的にERK1/2を脱リン酸化する

(A、B) HUT78細胞、UL-1細胞をocadaic acid(OA、100 nM)で4時間前処置し、その後PPZ(HUT78:20 μ M、UL-1:10 μ M)で15-30分間処置した。Akt Ser473リン酸化レベルおよびERK1/2リン酸化レベルをwestern blottingにより検討した。N = 3。

(C、D) HUT78細胞、UL-1細胞をtautomycin(TAU、1 μ M)、cyclosporin A(CsA、10 μ M)で4時間前処置し、その後PPZ(HUT78:20 μ M、UL-1:10 μ M)で15-30分間処置した。ERK1/2リン酸化レベルをwestern blottingにより検討した。N = 3。

(E) HUT78細胞をsanguinarine(10 μ M)で4時間前処置し、その後PPZ(20 μ M)で15-30分間処置した。ERK1/2リン酸化レベルをwestern blottingにより検討した。N = 2。

(F) HUT78細胞をBCI(10 μ M)で1時間前処置し、その後PPZ(20 μ M)で15-30分間処置した。ERK1/2リン酸化レベルをwestern blottingにより検討した。N = 2。

(G、H) HUT78細胞をNa₃VO₄(300 μ M)で1時間前処置し、その後PPZ(20 μ M)で15-30分間処置した。ERK1/2リン酸化レベルをwestern blottingにより検討した。代表的な写真(G)と、Na₃VO₄無処置、PPZ 0 minを100%とした場合の定量図(H)。N = 3。

*/#: $P < 0.05$ 。

2-2-6 Akt 阻害剤はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株に細胞死を誘導する

PPZ のヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株に対する抗がん効果に Akt シグナルと ERK1/2 シグナルのいずれが重要であるかを明らかにするため、Akt 阻害剤である Akt inhibitor VIII、ERK1/2 阻害剤である FR180204、MEK1/2 阻害剤である U0126 を用いて細胞生存率を解析した。HUT78 細胞および UL-1 細胞を Akt inhibitor VIII、FR180204 および U0126 でそれぞれ処置し、細胞生存率を解析したところ、Akt inhibitor VIII はヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株の細胞生存率を低下させるのに対して FR180204 は大きな影響を与えないことが認められた(図7A-D)。U0126 は、HUT78 細胞に対し細胞死を、UL-1 細胞に対しては細胞増殖を誘導するという、相反する結果が得られた(図7E、F)。そこで、U0126 が、細胞内シグナルに与える影響を検討した。HUT78 細胞および UL-1 細胞を U0126 で処置し、Akt、ERK1/2 および ERK1/2 の下流の転写因子 CREB のリン酸化レベルに与える影響を解析した(図7G、H)。両細胞において、U0126 は MEK1/2 を阻害することにより、ERK1/2、CREB のリン酸化レベルを低下させることが認められた。一方で、HUT78 細胞では、U0126 は Akt のリン酸化レベルを低下させるのに対して、UL-1 細胞では Akt リン酸化レベルには影響を与えないことが明らかになった。

以上の結果より、Akt シグナルが、HUT78 細胞、UL-1 細胞の生存に重要であることが示唆された。

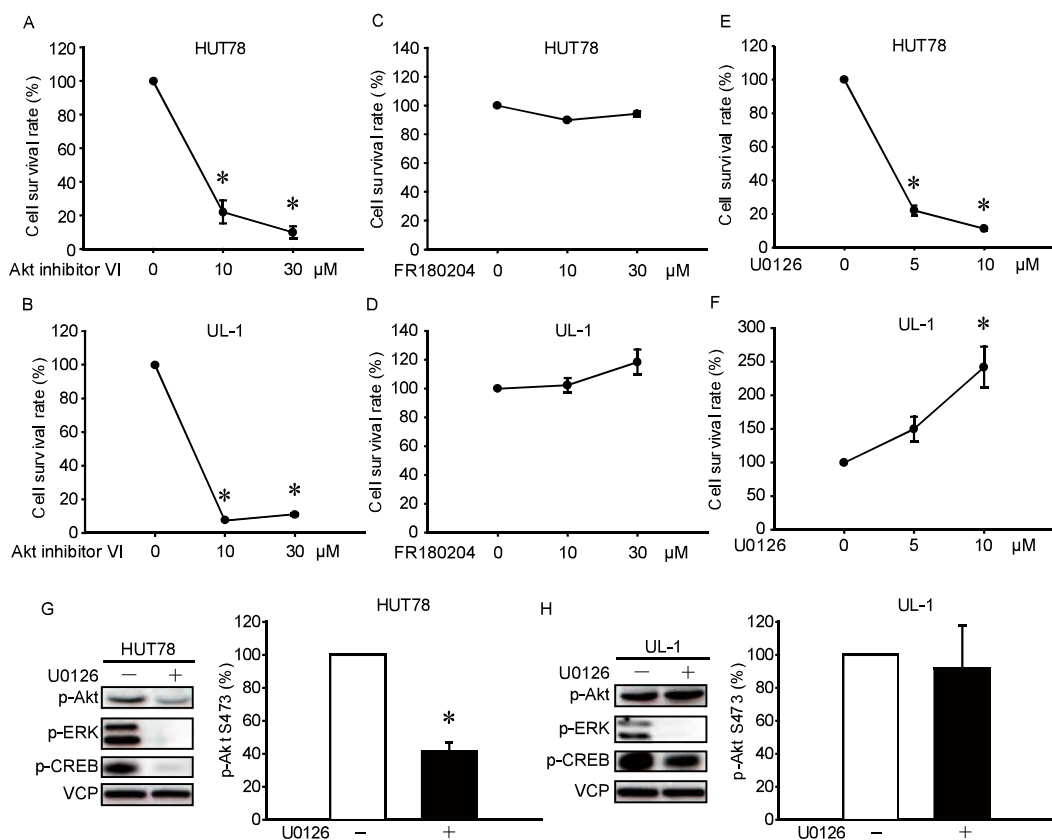


図7 Akt 阻害剤はヒトおよびイヌリンパ腫細胞株に細胞死を誘導する

(A-F) HUT78 細胞 (A, C, E) および UL-1 細胞 (B, D, F) を Akt inhibitor VIII (0-30 μM) (A, B)、FR180204 (0-30 μM) (C, D) もしくは U0126 (0-10 μM) (E, F) で 72 時間処置し、細胞生存率を CCK8 により検討した。試薬無処置の際の吸光度を 100% とし、相対値で示した。N = 4。*: $P < 0.05$ (無処置との比較)。

(G, H) HUT78 細胞 (G)、UL-1 細胞 (H) を U0126 (10 μM) で 24 時間処置し、Akt Ser473 リン酸化レベル、ERK1/2 リン酸化レベル、CREB リン酸化レベルを western blotting により検討した。N = 1-3。

2-3 考察

PPZ は統合失調症などの精神疾患に適用されている向精神薬であるが、最近、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 [55]。この中で、PPZ は PP2A A サブユニットに結合し PP2A 活性を上昇させることで抗がん効果を起こすことが報告されているが、PP2A 活性化がどのような分子機構で抗がん効果につながるか、その詳細は明らかになっておらず、獣医領域での適用の可能性も検討されていない。本章は、ヒトおよびイヌ T 細胞性リンパ腫細胞株において、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を明らかにした。

2-3-1 ヒトとイヌの細胞の感受性の違い

ヒトリンパ腫細胞株 HUT78 細胞を含むヒト T 細胞由来がん細胞株に比べて、イヌ T 細胞性リンパ腫細胞株は低濃度の PPZ で細胞死が引き起こされる傾向が認められた。しかし、ヒト T 細胞性白血病細胞株である SKW3 細胞は、10 μ M の PPZ で、Ema 細胞と同程度の細胞死を起こしており、ヒトとイヌの種差ではなく、細胞株間の違いである可能性が考えられる。

MEK1/2 阻害剤の効果についても、HUT78 細胞と UL-1 細胞の間で異なる結果が得られた。MEK1/2 阻害剤は HUT78 細胞では細胞死を、UL-1 細胞では反対に細胞増殖を誘導した。MEK1/2 阻害剤は、HUT78 細胞では、ERK1/2 の不活性化のみならず、Akt のリン酸化レベルを抑制することが明らかになった。これまでも、乳がん細胞株 MCF7 細胞や胸膜中皮腫細胞株 MSTO-211H 細胞において、ERK1/2 阻害剤や

MEK1/2 阻害剤が Akt リン酸化レベルを低下させることが報告されており [3, 101]、HUT78 細胞においても、MEK/ERK シグナルと Akt シグナルのクロストークが存在し、MEK1/2 阻害剤により Akt シグナルの抑制が生じたことが、細胞死を誘導した原因ではないかと考えられる。一方、UL-1 細胞にはクロストークが存在せず、MEK1/2 阻害剤では Akt シグナルの抑制が生じないことが、細胞死が引き起こされなかった原因であると考えられる。反対に、UL-1 細胞では、MEK1/2 阻害剤で細胞増殖の促進が認められたが、MEK1/2 阻害剤は、ERK1/2 活性化の指標である CREB のリン酸化を抑制したことから、MEK/ERK シグナルは抑制されていると考えられる。なぜ MEK1/2 阻害剤で細胞増殖が促進されたかについては、今後さらなる検討が必要ではあるが、Akt シグナルの活性化は認められないことから、Akt 以外の細胞増殖促進シグナルが活性化されていると考えられる。

2-3-2 PPZ による細胞死誘導の分子機構

細胞死には、アポトーシスをはじめ、ネクローシスや、オートファジー細胞死など多様な形式が存在する [41, 82, 152]。Caspase 3 はアポトーシス経路に必須のプロテアーゼであり、切断されることで活性化し、poly ADP-ribose polymerase (PARP) に代表されるような下流のアポトーシス誘導タンパク質群を活性化する [46]。本研究では、PPZ 処置により cleaved (active) caspase 3 の発現上昇が観察されたことから、PPZ による細胞死は少なくともその一部にアポトーシスが関与していることが示唆される。PP2A 阻害タンパク質 SET を標的とした PP2A 活性化剤である FTY720 や OP449 も同様に、cleaved caspase 3 の発現を上昇させ、アポトーシスを引き起こすことが知られており

[26, 49]、PP2A 活性化を介したがん細胞死にはアポトーシス経路が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

近年、古典的な細胞死であるアポトーシス、ネクローシス、オートファジー細胞死以外にも、分裂期細胞死やネクロプトーシスなど、非古典的な細胞死の機構の存在が明らかになってきた。PP2A はアポトーシスのみならず、これら非古典的な細胞死の誘導にも関与する。例えば、PP2A 阻害剤である LB100 は、抗がん剤である temozolomide を併用すると、ヒト悪性グリオーマ細胞に分裂期細胞死を引き起こすことや、放射線療法と組み合わせることで、髄膜腫に分裂期細胞死を誘導することが報告されている [63, 90]。また、PP2A 活性化剤である FTY720 は、PP2A 阻害タンパク質 SET を PP2A から解離させることで、肺癌細胞にネクロプトーシスを引き起こす [118]。したがって、PPZ による細胞死誘導にも、アポトーシスのみならず様々な種類の細胞死が関与する可能性も考えられる。

T 細胞性リンパ腫において Akt の活性化が、がん細胞のアポトーシス回避機構として重要な働きを示す [111]。PI3K/Akt シグナル阻害剤は、ヒトリンパ腫にアポトーシスを誘導することが報告されているが [18, 50]、本研究でも、Akt 阻害剤により HUT78 細胞および UL-1 細胞の細胞死が引き起こされることが確認された。米国では、リンパ腫の一種である非ホジキンリンパ腫に対して Akt の上流因子である PI3K δ に対する分子標的薬 idelalisib が、再発濾胞性リンパ腫に対して pan-PI3K 阻害薬である copanlisib が認可されている [150]。PI3K/Akt シグナルの阻害は、イヌのリンパ腫等の血液がんに対しても抗がん効果が期待できる可能性が考えられる。

本研究では、PPZ 処置により Akt Thr308 および Ser473 の脱リン酸化が観察された

ことから、PPZ は Akt 活性を抑制すると考えられる。Akt Thr308 のリン酸化は PDK1 によって、Ser473 のリン酸化は mTORC2 によって引き起こされる [4, 123]。Akt は Thr308 のリン酸化のみでも活性を示し、細胞増殖や生存シグナルを抑制している GSK3 β や、タンパク質合成に関与している TSC1/2 の働きを抑制する [68]。さらに、Akt Ser473 のリン酸化が加わると、FOXO1 などの抑制を介し、細胞増殖や生存シグナルを活性化する [68]。本研究では、PPZ 処置により PDK1 および mTORC2 活性に変化は認められなかったこと、Akt の脱リン酸化が PP2A 阻害剤で抑制されたことから、PPZ による Akt 脱リン酸化は、PP2A に依存的であることが示された。PP2A B55 α や B56 α 、B56 γ 複合体が Akt を直接脱リン酸化していることが報告されており [7, 116, 143]、PPZ によりこれらの PP2A 複合体による Akt 脱リン酸化が誘導されると考えられる。

Akt 活性の低下によるアポトーシス誘導機構の中心を担うのが Bcl-2 ファミリータンパク質である。Bcl-2 ファミリータンパク質には Bcl-2 や Bcl-xL などのアポトーシス抑制性タンパク質と、Bax や Bad などのアポトーシス促進性タンパク質が存在し、それぞれがバランスを取りながらアポトーシス誘導を調節している [2]。抗がん剤の多くは Bcl-2 や Bcl-xL の発現量を低下させることや、Bax や Bad の発現量を増加させることで細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている [38, 94, 145]。したがって、Bcl-2 ファミリータンパク質の発現変化を検討することは、アポトーシスに至る詳細な経路を知る上で重要である。今後、PPZ 処置による Bcl-2 ファミリータンパク質の発現変化を検討し、より詳細な細胞死誘導の分子機構を解明する必要があると考える。

2-3-3 PPZ の抗がん効果におけるドパミン受容体の関与の可能性

向精神薬としての PPZ は、ドパミン D1、D2 受容体に対するアンタゴニストとして作用することが知られている [107]。ドパミン受容体には、興奮性の D1、D5 受容体、抑制性の D2、D3、D4 受容体があり [11]、T 細胞性リンパ腫細胞でも全ての受容体の発現が確認されている [15, 158]。D1、D5 受容体は protein kinase A (PKA) や Ras を介して ERK1/2 を活性化し [102]、反対に、D2、D3、D4 受容体は PKA の抑制を介して ERK1/2 を抑制することが報告されている [14]。また、神経細胞において D2 受容体は、 β -arrestin を活性化し、PP2A および Akt と複合体を形成させ、PP2A による Akt の脱リン酸化を促進させる [112]。したがって、ドパミン受容体の活性化・不活性化が、細胞死を促進するか抑制するかは、細胞が発現するドパミン受容体の種類と発現量に依存すると考えられる。実際、ヒトリンパ腫細胞株である Raji、Namalwa、Daudi、Jijoye では dopamine で刺激すると細胞死が引き起こされることが知られている [15]。しかし本研究では、C-Raf、B-Raf の活性にはほとんど影響を与えずに MEK1/2、ERK1/2 の脱リン酸化を引き起こしたことから、PPZ による ERK1/2 脱リン酸化の誘導は、ドパミン受容体に依存しないことが示唆される。さらに、PPZ は D2 アンタゴニストとして働くため [107]、D2 受容体に作用しているのであれば、PPZ 処置で Akt のリン酸化レベルの上昇が予想される。しかし、本研究では、PPZ により Akt の脱リン酸化が認められたため、PPZ による抗がん効果は、ドパミン受容体に依存しないことが示唆される。

2-3-4 PPZ の ERK1/2 シグナルに対する作用

ERK1/2 は MEK1/2 によりリン酸化され、アポトーシス促進因子である Bad をリン酸

化することで分解を誘導したり、FOS や CREB などの転写活性を上昇させたりすることで細胞の増殖や生存に寄与している [8, 13, 87]。しかし、HUT78 細胞および UL-1 細胞は、ERK1/2 阻害剤で細胞死が誘導されなかったことから、PPZ の抗がん効果における ERK1/2 抑制の関与は低いと考えられる。

MEK1/2 や ERK1/2 の脱リン酸化は、PP1 や PP2A、PP2B、PP2C、DUSP1/6 などにより制御されることが報告されているが [64, 76, 78, 157, 159]、本研究では、これらの脱リン酸化酵素に対する阻害剤が、PPZ による ERK1/2 の脱リン酸化を抑制しないことが確認された。したがって、PPZ はこれらの脱リン酸化酵素非依存的に ERK1/2 シグナルを抑制することが明らかになった。チロシンホスファターゼ阻害剤である Na_3VO_4 により PPZ による ERK1/2 の脱リン酸化が緩和されたことから、なんらかのチロシンホスファターゼが関与していることが推測される。その詳細な分子機構は依然として不明だが、ERK1/2 の脱リン酸化には、チロシンホスファターゼとしての活性を持つ DUSP4 の関与も報告されている [78]。現在、DUSP4 特異的な阻害剤は存在しておらず、今後、shRNA 等を用いて、PPZ により誘導される ERK1/2 のリン酸化レベルの低下への関与を検討する必要があると考えている。

2-3-5 臨床応用の可能性

向精神薬として統合失調症等に用いられる PPZ の濃度は、今回の検討で使用したよりも低濃度である [59, 86]。このことから、PPZ を生体で使用した場合、ドパミン神経阻害やセロトニン神経阻害による副作用が生じることが予想され、ドパミン受容体アンタゴニストとしての作用を排除した誘導体の開発が必要である。近年、クロミプラミンな

どの三環系向精神薬合成の中間体であるジベンザゼピンをリード化合物とした PP2A 活性化剤、small molecular activator of PP2A (SMAP) が、肺がんや、前立腺がん、子宮内膜がん、膵臓神経内分泌がんなどに抗がん効果を示すことがマウスレベルで報告された [58, 73, 91, 113, 122, 134]。SMAP は、経口投与が可能であり、マウスにおいて中枢神経系などへの毒性も認められないことも明らかになっており、臨床応用に大きく近づく報告である [122]。SMAP は、PPZ 同様、Akt、ERK1/2 のリン酸化レベルを著しく低下させることが報告されているが、我々が行なった検討のように、PP2A 依存的に脱リン酸化が起きているのかは明らかになっておらず、今後さらなる解析が必要であると考えている。

2-4 総括

本章では、PPZ がヒトおよびヌ T 細胞性リンパ腫に対してアポトーシスを誘導することで抗がん効果を示すことを明らかにした。その分子機構として、PP2A 活性依存的な Akt 脱リン酸化の関与が示唆された。現在、三環系向精神薬を雛形とした SMAP が開発され、様々ながんで、その有効性が検討されている。本研究は、SMAP がヒトおよびヌの T 細胞性リンパ腫にも有効であることを示唆している。

第3章 イヌ骨肉腫における SET の役割の解明

3-1 背景と研究目的

3-1-1 PP2A 阻害タンパク質 SET とがん

SET(別名 I2PP2A、TAF-1)は急性骨髄性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1つとして発見された [85]。ヒトでは、SET タンパク質発現量の上昇が、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、結腸がん、乳がん、肺がんなど様々ながん種で認められており、細胞増殖シグナルである ERK1/2 や Akt のリン酸化レベルを促進することによりがんの悪性化に寄与している [34, 100, 114, 115, 131]。ヒトでは、これまでに2種類のアイソフォーム SET α (I2 β PP2A、TAF-1 α) と SET β (I2 α PP2A、TAF-1 β) が機能解析されているが [120]、データベース上では4種類のアイソフォームが存在する。また、イヌでも、少なくとも4種類のアイソフォームが存在することが報告されており、イヌSET α はヒトSET α のアミノ酸配列と 94%の相同性があることから、ヒト SET α と同様の機能を有していると考えられている [148]。

ヒト SET α と SET β はともに PP2A の阻害タンパク質としての機能を持つが [120]、SET β はクロマチンリモデリング活性も有することが報告されている [77]。ヒトでは、慢性リンパ性白血病において SET α 発現が高い方が、SET β 発現が高い患者に比べて、予後が悪い [16]。また、我々はヒト胃がんにおいて SET α が、がん幹細胞性の維持に寄与していることが報告しており [43]、SET α が、がん悪性化において重要な役割を担っていることを示唆している。

3-1-2 SET によるがん悪性化の分子機構

SET は PP2A 活性を阻害することでがん悪性化に関与することが知られている。ヒト慢性骨髄性白血病細胞において、BCR-ABL により SET 発現が誘導されていること、JAK2/PI3K/PKC シグナルが SET をリン酸化し活性化していることが、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 [100, 103]。また、SET は PP2A 活性を阻害することで、ヒト膵臓がん細胞において Akt や cMyc [45]、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞において ERK1/2 や p53 [131]、ヒト肝がん細胞において NF- κ B [127]、ヒト胃がん細胞において E2F1 [43]、等のタンパク質リン酸化を高く保ち、がんの悪性化に寄与している。さらに、我々はイヌ乳腺腫瘍において、SET 発現が、NF- κ B、p70S6K、GSK3 β のリン酸化レベルを高く保ち、がんの増殖や幹細胞性の維持に寄与していることが報告している [72]。これらのことから、SET による PP2A の阻害は、がん種のみならず、動物種を超えて保存されており、SET による PP2A 活性阻害を解除することができれば、PP2A 活性が回復し抗がん効果を発揮すると考えられる。

3-1-3 SET を標的とした PP2A 活性化剤

Apolipoprotein E (ApoE) タンパク質は、コレステロール輸送と免疫調節機能を合わせ持つ多機能タンパク質であるが、SET β の 178~277 番目のアミノ酸に結合して、その機能を阻害する働きが知られている [31]。この性質を利用し、ApoE の SET 結合部位をミミックしたペプチド COG112 および OP449 (COG449) が合成された [83, 129]。これらのペプチドは、SET に結合して PP2A の活性を回復させ、ヒト慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、膵臓がんにおいて抗がん効果を発揮することが報告されている

[45, 99]。また、免疫抑制剤である FTY720 は、通常リン酸化されることで免疫抑制効果を示すが、非リン酸化 FTY720 は SET と結合して PP2A を活性化することが報告されており [103]、FTY720 の抗腫瘍効果はヒト慢性骨髄性白血病、乳がん、肝細胞がん、グリオーマ、ミエローマで確認されている [32, 98, 105, 115]。イヌに関しては、我々が乳腺腫瘍やメラノーマ、T 細胞性リンパ腫に対して、OP449 や FTY720 が抗がん効果を示すことを報告した [42, 49, 72]。この様に、SET を標的とした化合物は、PP2A 活性依存的に抗がん効果を示すことが報告されており、様々ながんにおいて有効な治療薬となりうることが示唆されている。

3-1-4 肉腫における SET の役割

これまで、我々は、イヌ T 細胞性リンパ腫、イヌメラノーマ、イヌ乳腺腫瘍における SET の機能を解析してきた。さらに、ヒトにおいて SET は上皮系腫瘍である、肺がん、大腸がん、乳がんなど、血液系腫瘍である B 細胞性リンパ腫、慢性骨髄性白血病等で、PP2A 阻害を介して、がん促進的に働くことが報告されてきた [30, 33, 88, 126, 142]。一方、肉腫に関してはヒト胞巣状軟部肉腫において、上皮系腫瘍と同様に、SET は PP2A 活性を阻害することで、Akt シグナルの増強、アポトーシス因子である Bid の抑制を介し、細胞増殖や浸潤能の維持に寄与していることが報告されているのみであり [80]、その他の肉腫に対する検討は行われておらず、肉腫における SET の機能の多くは明らかになっていない。

骨肉腫は、ヒトにおいては希少がん分類されるが、イヌでは発生頻度が高いがんである。イヌ骨肉腫は、ヒト骨肉腫と遺伝学的、組織学的に類似性が高いと考えられて

おり、ヒト骨肉腫を理解するモデルとしての有用性が指摘されている [53]。

3-1-5 研究目的

SET は PP2A 活性を阻害する重要ながん促進性タンパク質である。SET の機能をより包括的に理解するために、代表的な肉腫の1つであるイヌ骨肉腫注目し、SET の機能を解析し、抗がん標的としての有用性を検討すると同時に、他のがん種との機能比較を行うことを研究目的とした。

3-2 実験結果

3-2-1 SET 発現抑制がイヌ骨肉腫細胞株の表現型に与える影響

はじめに、同一個体由来のイヌ骨肉腫細胞株である POS 細胞(原発巣由来)および HM-POS 細胞(転移巣由来)における SET の機能解析を行った。SET の発現量は、PP2A 抑制能との相関が報告されている [100]。そこで、POS 細胞、HM-POS 細胞における SET および PP2Ac 発現量を検討したところ、2細胞株間で SET および PP2Ac 発現量は同程度であることが認められた(図8A、B)。

POS 細胞、HM-POS 細胞における SET の機能を検討するため、shRNA を用いて SET 発現を抑制した細胞株を作製した(図8C、D)。SET target shRNA (shSET)を発現させた細胞では、SET タンパク質発現量の減少が認められた。これらの細胞を用いて、SET 発現抑制がイヌ骨肉腫細胞株の表現型に与える影響を検討した。細胞増殖能を解析したところ、SET 発現抑制は、POS 細胞の細胞増殖能をわずかに抑制したが、HM-POS 細胞の細胞増殖能には影響を与えなかった(図8E)。また、幹細胞性をコロニー形成試験により解析したところ、SET 発現抑制は、POS 細胞および HM-POS 細胞のコロニー形成能を抑制することが明らかになった(図8F、G)。

これらの結果より、SET は POS 細胞において細胞増殖およびがん幹細胞性の維持に、HM-POS 細胞においてがん幹細胞性の維持に寄与していることが示唆された。

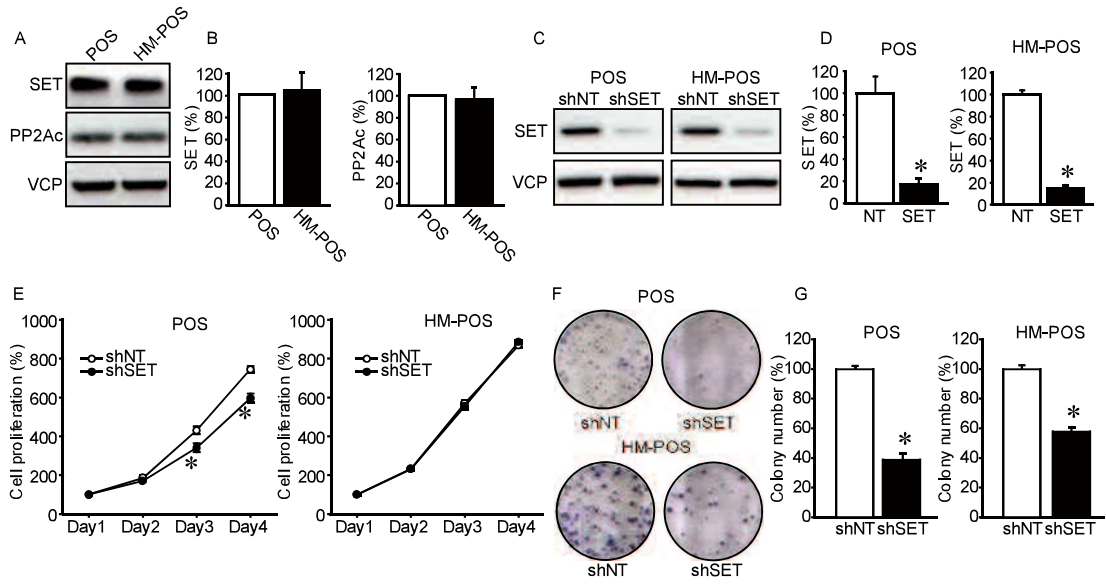


図8 SET 発現抑制がイヌ骨肉腫細胞株の表現型に与える影響

(A、B) POS 細胞および HM-POS 細胞の SET、PP2Ac 発現量を western blotting で解析した。代表的な写真(A)と、POS 細胞の SET または PP2Ac 発現量を 100%とした場合の定量図(B)。N = 3。

(C、D) POS 細胞および HM-POS 細胞に、shNT または shSET を安定的に発現させ、SET 発現量を western blotting により解析した。代表的な写真(C)と、shNT の平均値を 100%として相対値で示した定量図(D)。N = 3。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

(E) POS 細胞および HM-POS 細胞に、shNT または shSET を安定的に発現させ、細胞増殖能 (Day1-4) を CCK8 により解析した。それぞれの shNT を発現させた細胞の Day1 の平均を 100%とし、相対値で表した。N = 6。*: $P < 0.05$ (測定日の shNT と比較)。

(F、G) POS 細胞および HM-POS 細胞に、shNT または shSET を安定的に発現させ、幹細胞性をコロニー形成試験により解析した。代表的な写真(F)と、それぞれの shNT を発現させた細胞のコロニー形成数の平均を 100%とし相対値で表した定量図(G)。N = 6。*: $P < 0.05$ (shNT と比較)。

3-2-2 SET 発現抑制がイヌ骨肉腫細胞株の細胞内シグナルに与える影響

SET は PP2A を阻害することで、ERK1/2 シグナル、mTORC1 シグナルおよび Akt シグナルの活性維持に寄与していることが報告されている [45, 72, 131]。そこで、イヌ骨肉腫細胞において、SET 発現抑制がこれらのシグナル因子に与える影響を検討した。POS 細胞において、SET 発現抑制は、ERK1/2 のリン酸化を抑制することが明らかになった。一方、HM-POS 細胞では、SET 発現抑制は、ERK1/2 および mTORC1 シグナルの下流因子である p70S6K のリン酸化を抑制することが認められた (図9A-H)。以上の結果から、SET 発現抑制は POS 細胞の ERK1/2 活性を、HM-POS 細胞の ERK1/2 および mTORC1 活性を抑制することが示唆された。

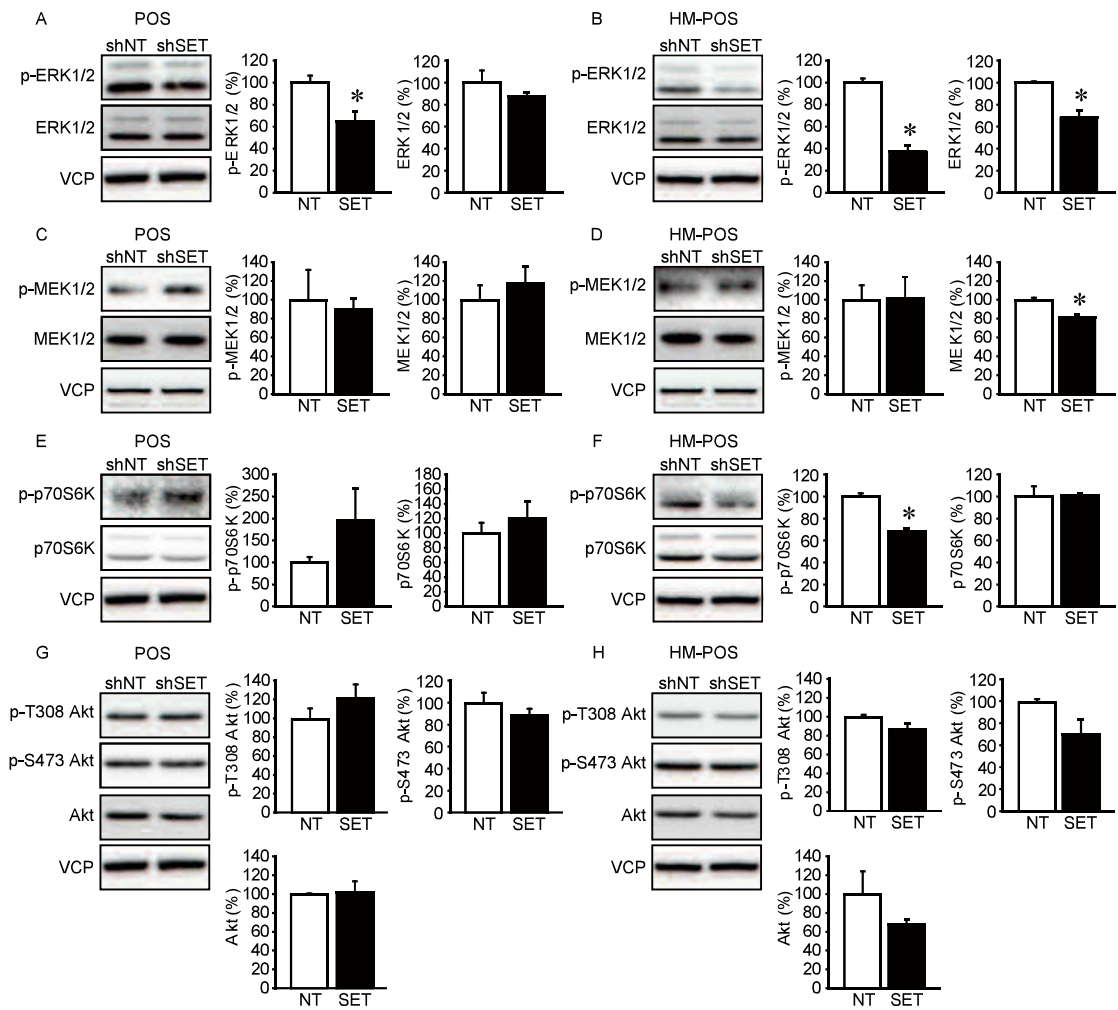


図9 SET 発現抑制がイヌ骨肉腫細胞の細胞内シグナルに与える影響

POS 細胞 (A、C、E、G) および HM-POS 細胞 (B、D、F、H) に、shNT または shSET を安定的に発現させ、ERK1/2 (A、B)、MEK1/2 (C、D)、p70S6K (E、F)、Akt (G、H) のリン酸化レベルおよびタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表的な写真と、shNT を発現させた細胞の平均値を 100% とし、相対値で表した定量図。N = 3。
*: $P < 0.05$ (shNT と比較)。

3-2-3 SET 発現抑制がイヌ骨肉腫細胞株の転写因子に与える影響

SET は PP2A を阻害することで、転写因子である E2F1、NF- κ B および cMyc の発現やリン酸化レベルの維持に関与している [43, 45, 127]。そこで、イヌ骨肉腫細胞において、SET 発現抑制がこれらの転写因子に与える影響を検討した。SET 発現抑制は、POS 細胞においては、これら転写因子のリン酸化レベルに顕著な変化を引き起こさなかったのに対して、HM-POS 細胞においては、E2F1 および NF- κ B のリン酸化を抑制すること、また、cMyc の発現を上昇させることが明らかになった (図10A-F)。

これらの結果より、POS 細胞では、SET は ERK1/2 シグナルの活性を上昇させることで、細胞増殖やがん幹細胞性の維持に寄与していることが示唆された。一方、HM-POS 細胞では、SET は ERK1/2 シグナル、mTORC シグナル、E2F1、NF- κ B の活性を維持することで、がん幹細胞性を維持していることが示唆された。

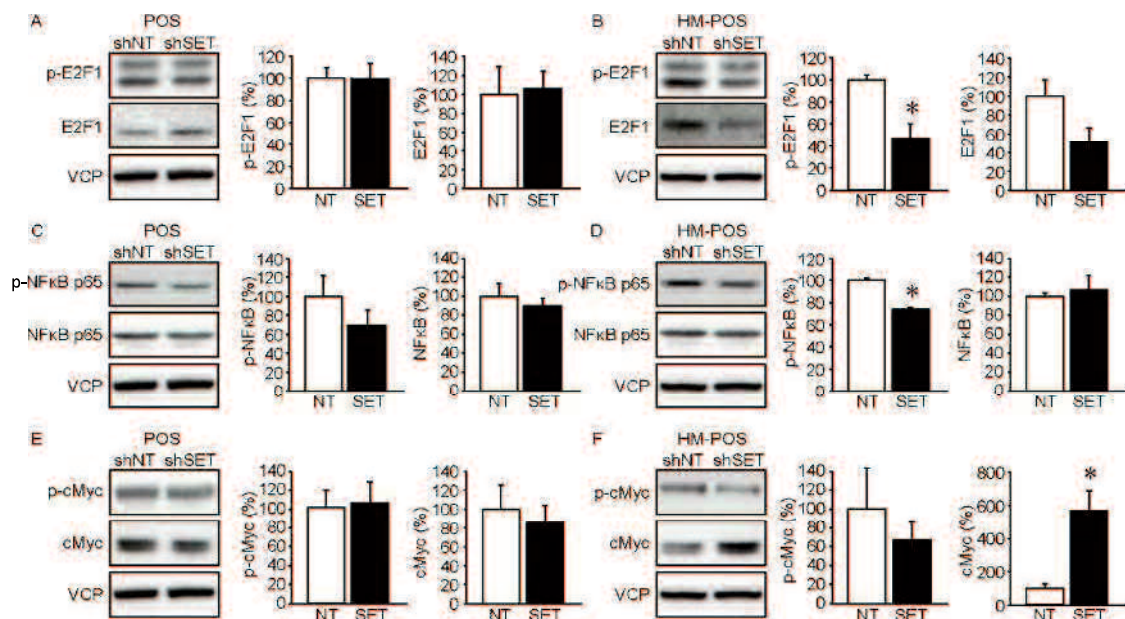


図10 SET 発現抑制がイヌ骨肉腫細胞の転写因子に与える影響

POS 細胞 (A、C、E) および HM-POS 細胞 (B、D、F) に、shNT または shSET を安定的に発現させ、E2F1 (A、B)、NF- κ B (C、D) および cMyc (E、F) のリン酸化レベルおよびタンパク質発現量を western blotting により解析した。代表的な写真と、shNT を発現させた細胞の平均値を 100% とし、相対値で表した定量図。N = 3。*: $P < 0.05$ (shNT と比較)。

3-2-4 イヌ骨肉腫細胞株における ERK1/2 阻害剤の感受性の検討

POS 細胞では、ERK1/2 シグナル以外のシグナルに大きな変化が認められなかったことから、POS 細胞の細胞増殖や幹細胞性の維持には ERK1/2 シグナルが大きく貢献していることが示唆された。そこで、POS 細胞および HM-POS 細胞の、ERK1/2 阻害剤 FR180204 に対する感受性の違いを検討したところ、細胞生存率、コロニー形成数ともに POS 細胞で、HM-POS 細胞よりも強い抑制効果が認められた(図11A-C)。

これらの結果より、POS 細胞、HM-POS 細胞の増殖や幹細胞性の維持には ERK1/2 シグナルが重要であり、POS 細胞では ERK1/2 シグナルに対する依存度が高いことが示唆された。

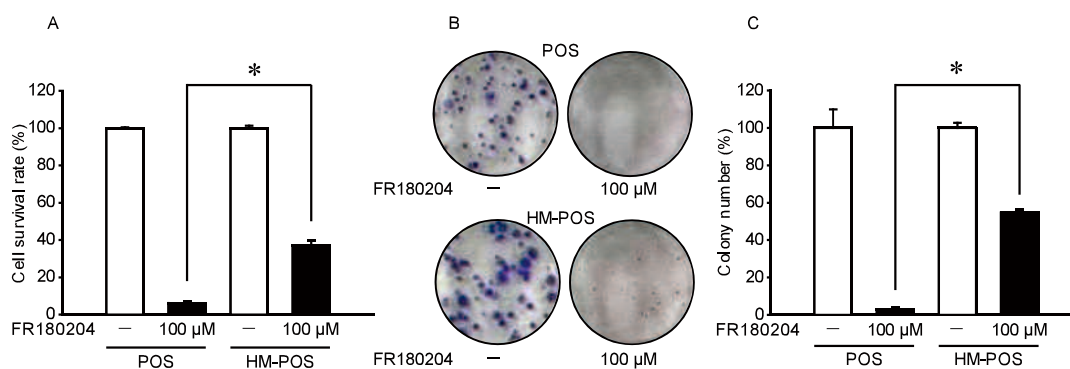


図11 イヌ骨肉腫細胞株における ERK1/2 阻害剤の感受性の検討

(A) POS 細胞および HM-POS 細胞を FR180204 (100 μM) で 72 時間処置し、細胞生存率を CCK8 により解析した。それぞれの FR180204 無処置の際の吸光度の平均値を 100% とし、その相対値で示した。N = 6。*: $P < 0.05$ (FR180204 無処置との比較)。

(B、C) POS 細胞および HM-POS 細胞を FR180204 (100 μM) で 10 日間処置し、コロニー形成数をカウントした。代表的な写真 (B) と、それぞれの FR180204 無処置の際のコロニー形成数の平均値を 100% とし、その相対値で示した定量図 (C)。N = 6。*: $P < 0.05$ (FR180204 無処置との比較)。

3-2-5 イヌ骨肉腫細胞株における SET 標的薬の効果の検討

これまでの結果より、イヌ骨肉腫において SET は有効な抗がん標的になりうることが示唆された。そこで、イヌ骨肉腫に対する SET 標的薬 (FTY720) の効果を検討した。POS 細胞および HM-POS 細胞を FTY720 で処置し、細胞生存率を解析したところ、FTY720 は濃度依存的に細胞生存率を低下させることが認められた (図12A)。そこで、現在イヌ骨肉腫に対して広く使用されている治療薬の 1 つである cisplatin との併用効果を検討した。POS 細胞および HM-POS 細胞を、FTY720、cisplatin を単独および併用で処置し、細胞生存率を解析したところ、FTY720 は cisplatin と相加的に効果を示すことが認められた (図12B)。

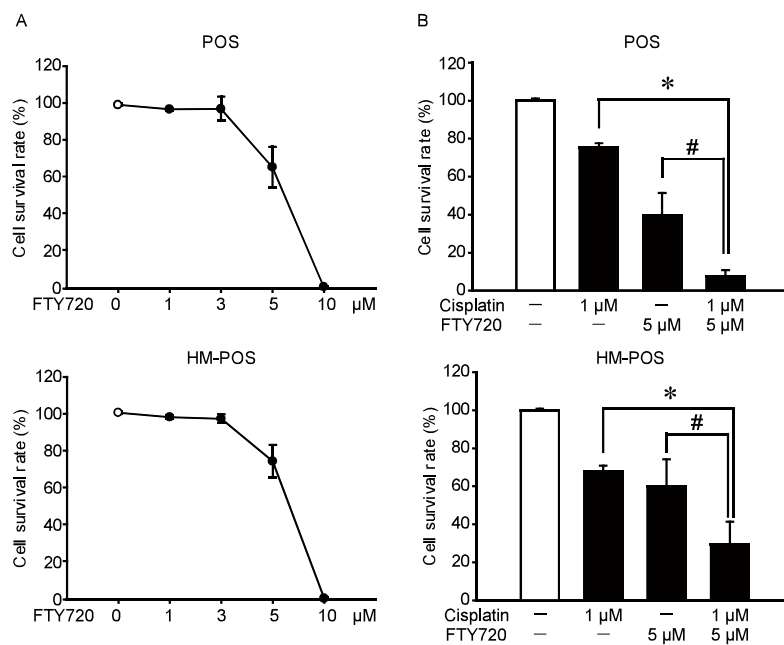


図12 イヌ骨肉腫細胞株における SET 標的薬の効果の検討

(A) POS 細胞および HM-POS 細胞を FTY720 (1-10 μ M) で 72 時間処置し、細胞生存率を CCK8 により解析した。それぞれの FTY720 無処置の際の吸光度の平均値を 100% とし、その相対値で示した。N = 6。*: $P < 0.05$ (FTY720 無処置との比較)。

(B) POS 細胞および HM-POS 細胞を FTY720 (5 μ M)、cisplatin (1 μ M) で 72 時間処置し、細胞生存率を CCK8 により解析した。それぞれの無処置の際の吸光度の平均値を 100% とし、その相対値で示した。N = 6。*/#: $P < 0.05$ 。

3-3 考察

3-3-1 イヌ骨肉腫細胞間で、SET 発現抑制がもたらす効果の差

POS 細胞と HM-POS 細胞では、SET 発現抑制による細胞内シグナルや表現型の変化が異なっていた。これまで SET 発現量の上昇と PP2A 抑制能には相関があることが報告されているが [42, 49, 66]、POS 細胞と HM-POS 細胞では、SET や PP2Ac の発現量には大きな差は認められなかった。以前我々は、イヌの SET には α 、 β 、 γ 、 δ の少なくとも 4 つのアイソフォームが存在しており、 α および β はヒトの SET 同様に PP2A 結合能を持つこと、さらに、イヌ SET α はヒト SET α と 94% の相同性があることを報告している [148]。ヒト慢性リンパ性白血病において、SET α 発現が高い方が、SET β 発現が高い患者に比べて予後が悪いことが報告されており [16]、我々もヒト胃がんにおいて、SET 発現抑制により低下したがん幹細胞性が、SET α によってレスキューされることを報告している [43]。ヒト SET α と SET β はともに PP2A の阻害タンパク質としての機能を持つが [120]、SET β にはクロマチンリモデリング活性も報告されている [77]。したがって、SET アイソフォーム間で機能が異なると考えられるが、本研究で用いた shRNA は上記のイヌ SET アイソフォームすべての発現を抑制すると考えられることから、アイソフォームの機能の差は検討できていない。両細胞間で SET アイソフォームの発現や活性が異なることが、SET 発現抑制に対する表現型の差を生んだ可能性が考えられる。

HM-POS 細胞は、POS 細胞をヌードマウスに皮下移植した肺転移巣から樹立された細胞株であり、POS 細胞よりも悪性度が高まっていると考えられる [10]。

SET 発現抑制の細胞増殖・コロニー形成能に対する効果は、POS 細胞よりも HM-POS 細胞で弱かったのに対して、興味深いことに、HM-POS 細胞ではより広範な細胞内シグナルが SET 発現抑制によって影響を受けた。膵臓がんにおいて、SET は転移に関与することが報告されており [96]、HM-POS 細胞の樹立にも SET が関与したと考えられる。その結果、細胞内シグナルの SET への依存度が高まった一方で、変異の蓄積などにより SET 発現抑制に抵抗性のシグナルの活性も高まったと推測される。現在、SET による PP2A の阻害機構の詳細は明らかになっておらず、分子機構の解明が SET を標的とした治療の有効性を予測する上で重要であると考えられる。

3-3-2 上皮系、血液系のがんと骨肉腫における SET が制御するシグナルの比較

骨肉腫の悪性化には、上皮系、血液系腫瘍と同様に、MEK/ERK シグナルや、PI3K/Akt シグナルなどが関与していることが報告されている [21]。また、原発巣と転移巣のがん細胞では、大きく性質が異なっており、KRAS や EGFR など様々な悪性化に関連する変異を、転移の過程で獲得していることが報告されている [52]。さらなる検討が必要だが、転移巣由来の HM-POS 細胞では、ERK1/2 シグナル以外に、mTOR シグナルや E2F1、NF- κ B の活性化が引き起こされており、ERK1/2 阻害剤に対し、POS 細胞よりも抵抗性を示したと考えられる。PP2A は、これらのシグナルを負に制御する重要な因子である [43, 72, 76]。本研究から、SET は、骨肉腫においても上皮系腫瘍と同様に、PP2A 活性の抑制を介し、ERK1/2 や p70S6K、E2F1 などの制御に関与し、がんの悪性化に寄与していることが示唆された。このことから、SET による PP2A の

阻害は、ヒト・イヌという種差を越えて保存されているのみならず、上皮、血液、肉腫という、がん種を越えて保存されている重要な抗がん標的である可能性が示された。

SET 発現抑制は、HM-POS 細胞の cMyc 発現を著しく増加させることが認められた。以前、我々は 11 種類のヒトがん細胞株において SET 発現抑制の効果を検討し、E2F1 発現量が低下するタイプ、cMyc 発現量が低下するタイプ、そのどちらでもないタイプが存在していることを報告した [43]。POS 細胞は、E2F1 および cMyc の双方の発現に変化が認められなかったことから、この第三のタイプに属する。SET 発現抑制でこの第三のタイプのがん細胞株に抗がん効果を示す分子機構は明らかになっていないが、本研究から、一部には ERK1/2 シグナルの低下が関与している可能性が示唆される。分子機構は様々であるが、SET 発現抑制は、いずれのタイプの細胞に対しても強く幹細胞性を阻害することから、イヌ骨肉腫を始め広範ながん種に対する有効な抗がん標的となりうると考える。

3-3-3 SET 阻害剤 FTY720 が cisplatin と相乗効果を示す分子機構

イヌ骨肉腫細胞において、SET 発現抑制は、主に幹細胞性の指標であるコロニー形成能を低下させることが明らかになった。11 種類のヒトがん細胞株を用いた SET 発現抑制実験では、すべての細胞株でコロニー形成能が低下したが、増殖能の低下は 5 つの細胞株のみで観察され、その効果は弱かった [43]。これらの結果は、SET が主にがん細胞の幹細胞性の維持に寄与しており、SET 阻害剤は、がん幹細胞性を標的とした抗がん剤になりうることを示唆している。Cisplatin は、DNA を構成しているグアニンおよびアデニンの 7 位の窒素原子に結合して DNA を架橋することで細胞の分裂を

阻害し、がん細胞に対しアポトーシスやネクローシスを誘導する [35]。SET 阻害剤である FTY720 はがん幹細胞性に、cisplatin は増殖細胞に対して抗がん効果を示すことから、相加的な効果を示したことが示唆される。本研究においては、他の化学療法との併用効果については検討していない。しかし、我々は以前、イヌ乳腺腫瘍において、SET 発現抑制が doxorubicin の効果を減弱させることを報告しており、SET 標的薬と併用する抗がん剤の選定についてはさらなる検討が必要である [72]。

3-4 総括

ヒト骨肉腫は希少がんとして認定されており、十分な治験を行うことが困難であることから、古典的な化学療法他に推奨されている抗がん剤は存在していない。イヌではヒトと比較して 27 倍もの高頻度で骨肉腫が発症することが報告されており [128]、イヌの骨肉腫の研究は、ヒトの骨肉腫の病態理解へと外挿できると考えられている。SET は、イヌ骨肉腫細胞において ERK1/2 や p70S6K、E2F1、NF- κ B のリン酸化・活性を維持し、がんの悪性化に寄与していることが明らかになった。さらに、SET 標的薬である FTY720 は単剤でも抗がん効果を示し、イヌ骨肉腫で広く使用されている cisplatin との併用では相加的な効果を示した。SET は、ヒトおよびイヌの様々ながん種で新たながん創薬標的としての可能性が指摘されているが、本研究からイヌ骨肉腫においても有効な創薬標的となり得ることが明らかになった。このことは、ヒトの骨肉腫においても SET が重要な役割を果たす可能性を示唆している。

第4章 SET による PP2A 阻害メカニズムの解明

4-1 背景および研究目的

4-1-1 PP2A/B56 複合体の機能

PP2A の調節サブユニット(B サブユニット)は、約 20 種類が存在しており、シークエンスホモロジーにより、4つのファミリーに分類されている。B サブユニットの中の B56 ファミリーは、18 個の α -helix が折りたたまれた、8個の HEAT リピート構造で形成されている [147]。B56 ファミリーのうち、B56 γ 3 は発がん過程に、B56 α 、B56 γ は、がんの悪性化に重要であることが報告されており、PP2A のがん抑制因子としての働きにおいて中心的な役割を果たすと考えられている [27, 117, 141]。その分子機構は完全には解明されていないが、PP2A/B56 複合体は、がん促進性のタンパク質である cMyc や Akt を抑制すること、がん抑制性タンパク質である p53 を活性化することが報告されている [75]。また、各種がんにおいて前臨床の効果が報告されている SMAP は、PP2A A サブユニットに結合して B56 ファミリーと A サブユニットとの結合性を高めることで抗がん効果を発揮するとされている [122]。したがって、PP2A/B56 複合体は、創薬標的として有望であると考えられる。

4-1-2 SET による PP2A 阻害機構

SET は PP2Ac に直接結合し、PP2A 活性を阻害していると考えられている [104]。PP2A 複合体は、結合する B サブユニットの種類により機能が異なることから、それぞれの複合体の役割の理解が進められているが、現在まで SET がいずれの PP2A 複合体を阻害するのか、その全容は明らかになっていない。我々は、以前、ヒト胃がん細胞株において、SET が B56 α と結合するのに対して、B55 α および PR72 とは結合しないこ

とを報告した [43]。第3章において、SET 発現抑制は、イヌ骨肉腫細胞株の ERK1/2、p70S6K、NF- κ B、E2F1 のリン酸化レベルを低下させることが明らかになったが、我々は以前、PP2A/B56 α 複合体が E2F1 の脱リン酸化を担うことを明らかにしている [43]。また、ERK1/2 は PP2A/B56 γ 1 複合体に、p70S6K は PP2A/B56 γ 複合体や PP2A/B56 δ 複合体に、NF- κ B は PP2A/B56 γ 複合体により、脱リン酸化・活性制御がされていることが報告されている [19, 56, 76]。以上のことより、ヒト SET は PP2A/B56 複合体に選択的に結合し、PP2A 活性を阻害していることが予想される。SET による PP2A 阻害機構の解明は、SET 標的薬が有効ながん種を理解する上で極めて重要であり、また、SET と PP2A の結合を阻害する新たな創薬標的の発見につながると考えられる。

4-1-4 研究目的

PP2A は複合体の構成により機能が決定されるホロ酵素であるが、SET がいずれの PP2A 複合体を、どの様にして阻害しているのかは明らかになっていない。SET による PP2A 阻害機構の解明は、SET を標的とした新規抗がん戦略を創出する上での足がかりとして重要である。そこで、本研究では、SET の2つのアイソフォームのうち、がん悪性化に寄与すると考えられている SET α に注目し、SET α と PP2A 複合体の結合という観点から、SET による PP2A 阻害機構を解明することを目的とした。

4-2 実験結果

4-2-1 SET α は PP2A/B56 複合体と選択的に結合する

はじめに、SET が阻害する PP2A 複合体を特定するため、FLAG タグを付加した9種類の B サブユニットを 293T 細胞に発現させ、免疫沈降法を用いて、SET が結合する B サブユニットを検討した(図13A、B)。SET α は B55 ファミリーや PR72 とは結合せず、B56 ファミリー(B56 α 、B56 β 、B56 γ 2、B56 γ 3、B56 δ 、B56 ϵ)を含む PP2A 複合体と選択的に結合していることが明らかになった。さらに、生細胞内において、SET α が B56 ファミリーに結合しているかを NanoBiT 法により検討した。ルシフェラーゼタンパク質を分割した LgBiT タグおよび SmBiT タグを、SET または B サブユニットに付加し、293T 細胞に発現させ、発光強度をプレートリーダー(GloMax Explorer)により測定した(図13C)。LgBiT タグ、SmBiT タグの組み合わせは、予備検討より、もっとも発光が強い組み合わせで検討した(第 6 章参照)。生細胞内においても、SET α と B56 α および B56 γ 3 の結合が確認された。一方で、免疫沈降法で最も強く結合が認められた B56 γ 2 については、生細胞内での結合性は低いことが明らかになった。

続いて、SET α が B56 α と直接結合するのかを、リコンビナントタンパク質を用いて検討した。GST-SET α と His-B56 α を混合し、glutathione sepharose ビーズを用いて pull down を行った(図13D)。SET α は単量体の B56 α と結合できることが認められた。

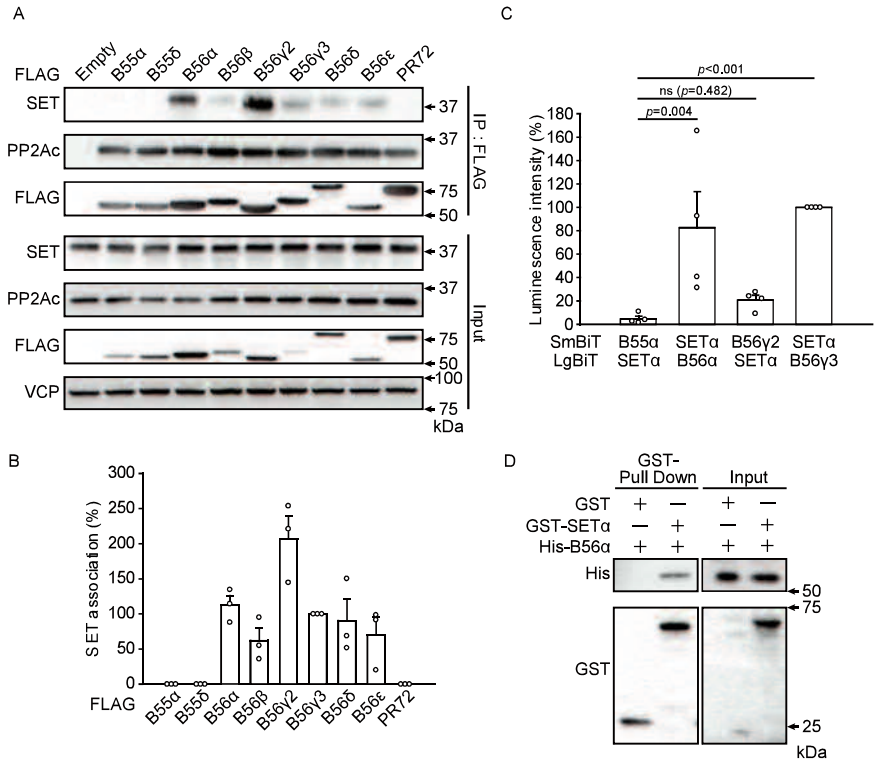


図13 SET α は PP2A/B56 複合体と選択的に結合する

(A、B)293T 細胞に、FLAG タグ付加した各種 B サブユニットを発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行なった。B サブユニットに対する SET の結合量を western blotting で解析した。代表的な写真(A)と、免疫沈降した FLAG 量で補正した後に B56 γ 3 に結合する SET の量を 100%とし、相対値で表した定量図(B)。N = 3。Empty は、空ベクターである。

(C)293T 細胞に、LgBiT タグおよび SmBiT タグを付加した各種 B サブユニットおよび SET α を発現させ、24 時間後に発光強度を測定した。SmBiT-empty を発現した際の発光強度で補正し、LgBiT-SET α /SmBiT-B56 γ 3 の値を 100%とした場合の相対値で表した。N = 4。

(D)リコンビナント GST または GST-SET α と His-B56 α を混合し、glutathione sepharose ビーズで pull down を行なった。GST-SET α に結合する His-B56 α を、western blotting により解析した代表的な写真。N = 4。

4-2-2 SET α と B56 α および B56 γ 3 の結合領域の同定

4-2-2-1 SET α が結合する B56 α および B56 γ 3 の領域の同定

続いて、SET α と B56 ファミリーの結合様式をより詳細に理解するために、B56 α および B56 γ 3 の SET α 結合領域を検討した。B56 ファミリーは、 α -helix が折りたたまれた HEAT リピート構造で構成されているタンパク質である(図14A、B)。B56 α 、B56 γ 3 の N 末端または C 末端から α -helix を切断した変異体を作製し、SET α WT との結合性を免疫沈降法で検討した(図14C-H)。その結果、B56 α および B56 γ 3 は、N 末端、C 末端のどちらを切断した場合でも SET α との結合性が減少することが認められた。また、N 末端の切断体は PP2Ac との結合を維持しているが、C 末端の切断体は PP2Ac との結合が減少していることが認められた。B56 α では、C 末端切断体で SET α と PP2Ac に対する結合性に不一致、すなわち PP2Ac に対する結合性が低い変異体でも SET α と結合することが観察されたが、B56 γ 3 の C 末端切断体では、SET α と PP2Ac に対する結合性に相関関係が認められた。このことから、B56 α と B56 γ 3 では SET α に対する結合様式が異なる可能性が示唆された。

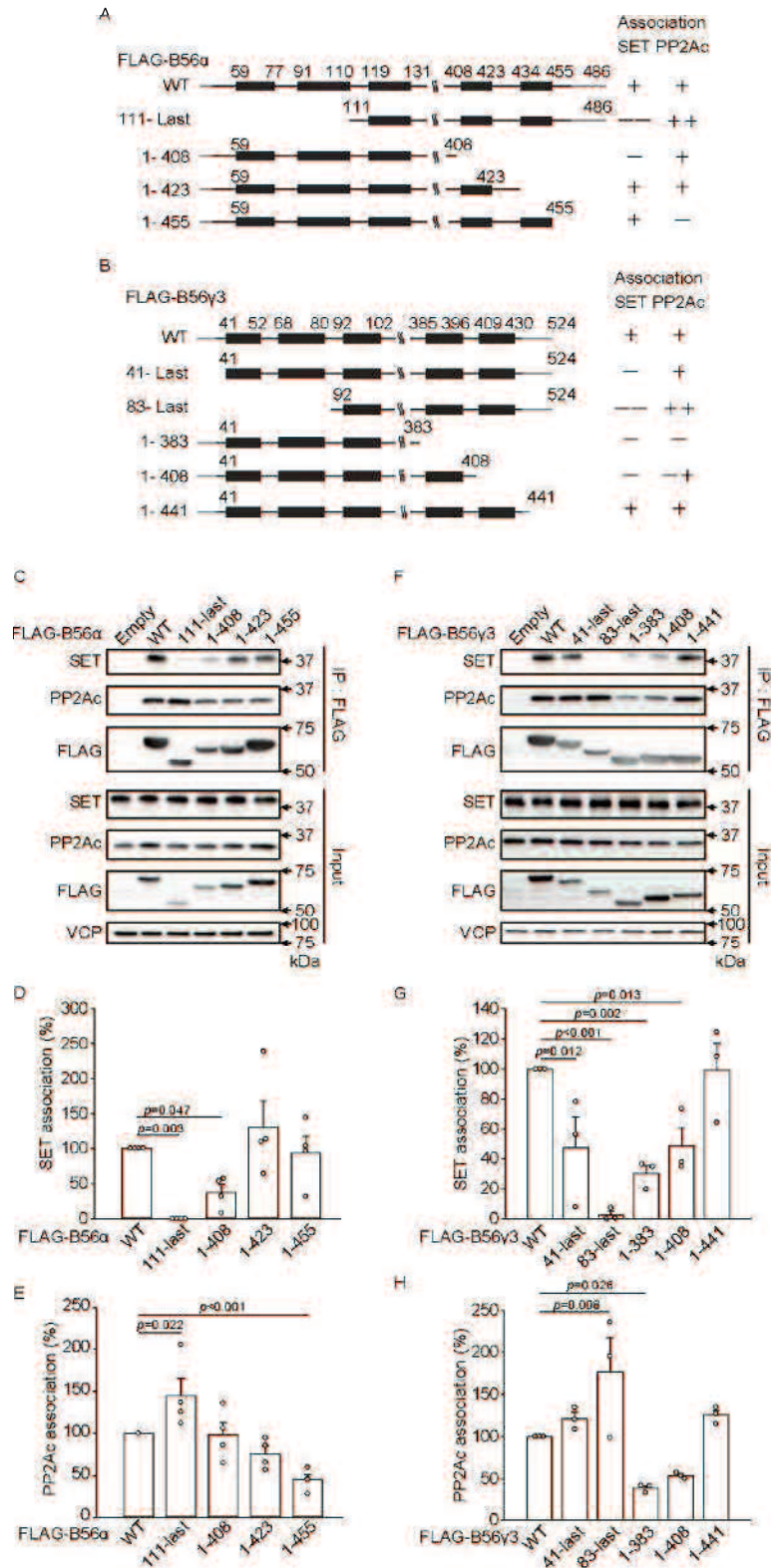


図14 SET α が結合する B56 α および B56 γ 3 の領域の同定

(A、B) 作製した B56 α および B56 γ 3 の変異体の模式図と SET α および PP2Ac との結合性。WT:野生型。

(C-H) 293T 細胞に、FLAG タグ付加した B56 α 切断体(C-E)および B56 γ 3 切断体(F-H)を発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行なった。B56 α 、B56 γ 3 の変異体に対する SET の結合を western blotting で解析した。代表的な写真(C、F)と、免疫沈降した FLAG 量で補正し、WT に結合する SET α (D、G)または PP2Ac(E、H)を 100% として相対値で表した定量図。N = 3。

4-2-2-2 B56 α および B56 γ 3 に結合する SET α の領域の同定

SET は coiled-coil domain (CD)、earmuff domain (ED)、acidic domain (AD) で構成されているタンパク質である(図15A)。これらの領域のうちいずれが、B56 α および B56 γ 3 との結合に重要であるかを、免疫沈降を用いて検討した(図15B)。B56 α は、SET α の AD と結合することが認められた。一方、B56 γ 3 は、いずれの SET α 切断体とも結合しないことから、SET α が全長で存在することが結合に必要であることが示された。したがって、SET α との結合様式は、B56 ファミリーの中でも異なると考えられる。

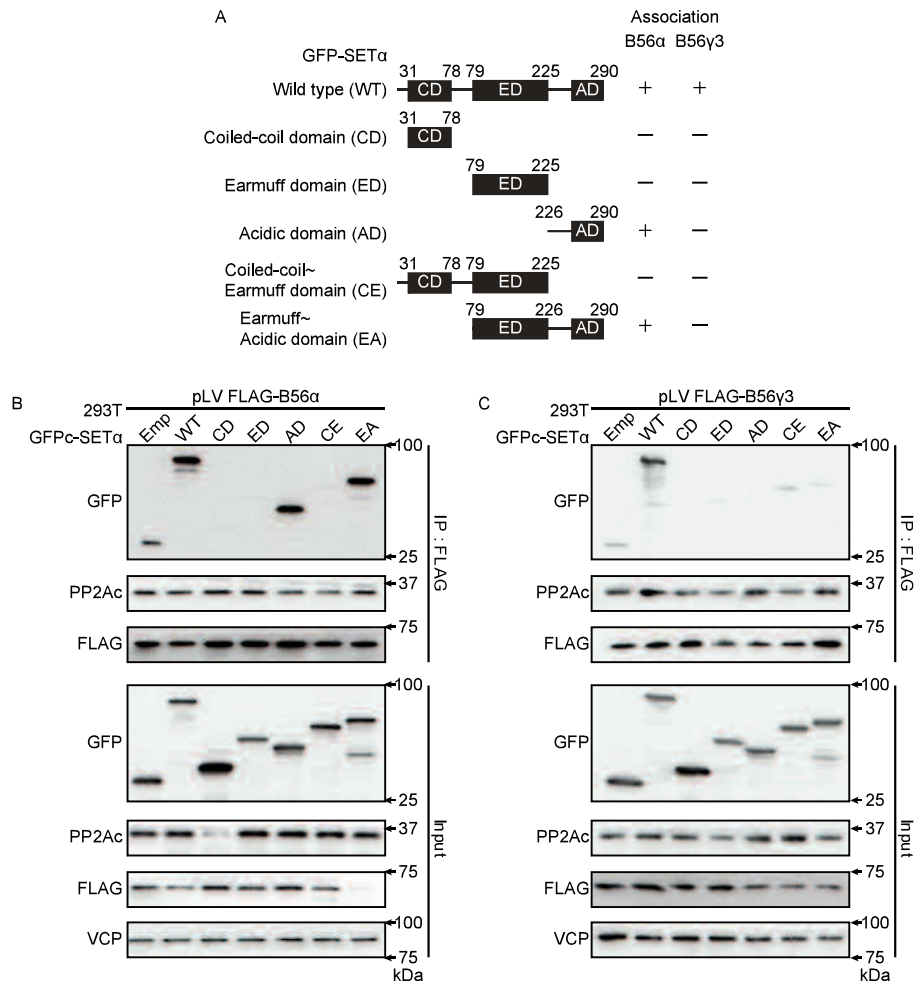


図15 B56 α および B56 γ 3 に結合する SET α の領域の同定

(A) SET α の構造の模式図と B56 α および B56 γ 3 との結合性。CD は coiled-coil domain、ED は earmuff domain、AD は acidic domain を示している。また、CD から ED までを含む切断体を CE、ED から AD までを含む切断体を EA と表記した。WT: 野生型。

(B、C) 293T 細胞に、FLAG タグを付加した B56 α (B) および B56 γ 3 (C) と、GFP タグを付加した SET α WT、CD、ED、AD、CE、EA を共発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行なった。B56 α および B56 γ 3 に対する SET α の各 domain の結合を western blotting で解析した代表的な写真。N = 3。

4-2-3 SET α の2量体化は、B56 α および B56 γ 3 との結合に必要

B56 γ 3 は、いずれの SET α 切断体とも結合しなかったことから、我々は、SET の3つの領域が揃うことで、生じる現象に注目した。SET は、CD を介して2量体化することから [95]、SET の2量体化が、B56 γ 3 との結合に与える影響を検討するため、2量体化能を欠損させた SET α 変異体 (SET α DD) を作製した [95] (図16A)。免疫沈降法を用いて SET α DD の2量体形成能を確認したところ、SET α DD は SET α WT とも結合しないことが認められた (図16B)。SET α DD の2量体化形成能の低下は、NanoBiT 法を用いることで生細胞内でも観察された (図16C)。そこで、SET α DD を用いて SET α の2量体化が B56 γ 3 との結合性に与える影響を検討したところ、SET α DD は、B56 γ 3 との結合能が低下していることが免疫沈降法および NanoBiT 法で認められた (図16D、E)。以上の結果より、SET α の2量体化は、B56 γ 3 との結合に重要であることが示唆された。

B56 α は SET α の acidic domain と結合していることから、SET α の2量体化は、B56 α との結合には関与していないと考えられた。そこで、SET α の2量体化が、B56 α を含む B サブユニットとの結合性に与える影響を解析した (図16F)。しかし、予想に反して、SET α DD は B56 α との結合能が低下していた。また、SET α DD は B56 γ 2 との結合能も低下していること、B55 や PR72 ファミリーとも結合しないことが認められた。さらに NanoBiT 法でも、SET α DD は B56 α との結合能が低下していることが明らかになった (図16G)。そこで、SET α の2量体化が、B56 α の機能抑制に関与しているのかを検討した。A549 細胞に B56 α を過剰発現させると、がん幹細胞性の指標であるコロニー形成能が低下したが、これは SET α WT の発現で回復するのに対して、SET α DD の発現では回復しないことが明らかになった (図16H)。以上のことより、SET α の2量体化は、

B56 α および B56 γ 3 との結合と、それにもなう PP2A/B56 複合体の阻害に重要な役割を果たすことが示唆された。

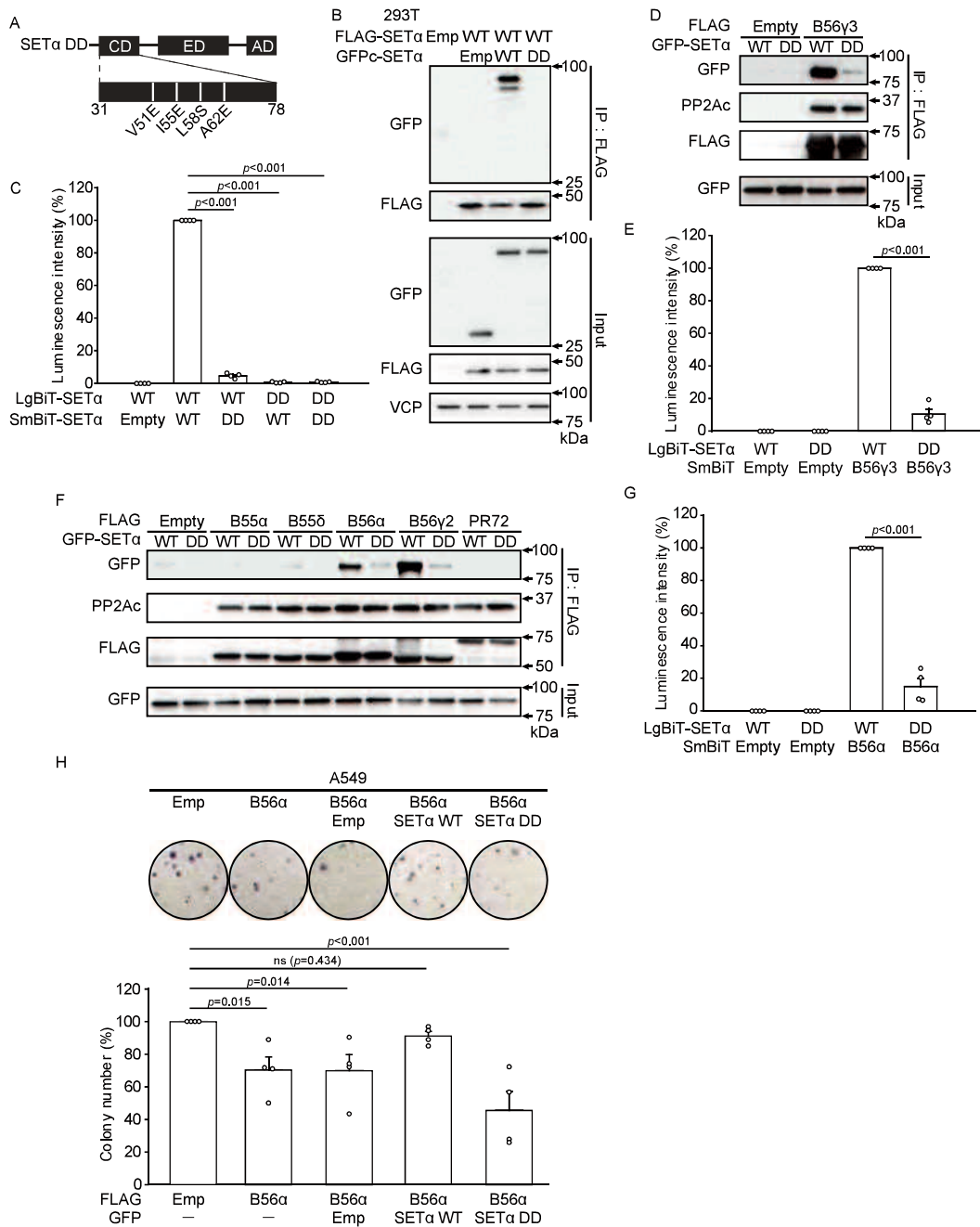


図16 SET α の 2 量体化は、B56 α および B56 γ 3 との結合に必要

(A) SET α DD 変異部位の模式図。

(B) 293T 細胞に、FLAG タグ付加した SET α WT および GFP タグを付加した SET α WT または SET α DD を共発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行なった。SET α WT に対する SET α WT または SET α DD の結合を western blotting で解析した代表的な写真。Empty はコントロールである。N = 3。

(C) 293T 細胞に、LgBiT-SET α WT または DD、SmBiT-SET α WT または DD を発現させ、24 時間後に発光強度を測定した。LgBiT-SET α WT/SmBiT-empty の発光強度で補正し、LgBiT-SET α WT/SmBiT-SET α WT の発光強度を 100%として、相対値で表した定量図。N = 3。

(D) 293T 細胞に、FLAG タグ付加した B56 γ 3、および GFP タグを付加した SET α WT または SET α DD を共発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行なった。B サブユニットに対する SET α WT または SET α DD の結合を western blotting で解析した代表的な写真。Empty はコントロールである。N = 3。

(E) 293T 細胞に、LgBiT-SET α WT または DD、および SmBiT-B56 γ 3 を発現させ、24 時間後に発光強度を測定した。LgBiT-SET α WT/SmBiT-empty の発光強度で補正し、LgBiT-SET α WT/SmBiT-B56 γ 3 の発光強度を 100%として、相対値で表した定量図。N = 4。

(F) 293T 細胞に、FLAG タグ付加した B サブユニット(B55 α 、B55 δ 、B56 α 、B56 γ 2、PR72)、および GFP タグを付加した SET α WT または SET α DD を共発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行なった。B サブユニットに対する SET α WT または SET α DD の結合を western blotting で解析した代表的な写真。Empty はコントロールである。N = 3。

(G) 293T 細胞に、LgBiT-SET α WT または DD、および SmBiT-B56 α を発現させ、24 時間後に発光強度を測定した。LgBiT-SET α WT/SmBiT-empty の発光強度で補正し、LgBiT-SET α WT/SmBiT-B56 α の発光強度を 100%として、相対値で表したグラフである。N = 4。

(H) A549 細胞に、FLAG-B56 α および GFP-SET α WT または DD を安定的に発現させ、コロニー形成試験を行った。14 日間培養後、ギムザ染色を行った後にコロニー数を測定した。代表的な写真と Empty のコロニー形成数を 100%とし、相対値で表した定量図。N = 4。

4-2-4 SET α の2量体化を阻害する化合物の探索

SET α の2量体化は、B56 α や B56 γ 3 の阻害に重要であることが示唆された。しかし、SET α DD は CD の疎水性アミノ酸を、親水性アミノ酸に置換した変異体であり、立体構造が変化している可能性が考えられる [95]。そこで、我々は、SET α の2量体化を阻害する化合物の同定を行った。LgBiT-SET α および SmBiT-SET α を A549 細胞に安定的に発現させた細胞株 (A549-nSET α /cSET α -A2 および C6) を樹立し、標準阻害剤ライブラリー (化学療法基盤支援活動) で5時間処置し (各 5 μ M)、発光強度を測定した。2つの細胞株で得られた結果の平均値をグラフ化したところ、赤丸で示した化合物が、発光を約 15% 以上抑制していることが認められた (図 17A)。そこで、A549-nSET α /cSET α -C6 細胞を用いて、ヒット化合物の効果を検証した。Xanthohumol、KN-93、JAK3 inhibitor VI、tapsigargin、MG132、PP1-analog、indirubin-3'-monoxime (I3'M) で8時間処置し (各 5 μ M)、発光強度を測定したところ、xanthohumol、KN-93 および JAK3 inhibitor VI は、発光を強く抑制すること (xanthohumol: 52%、KN-93: 29%、JAK3 inhibitor VI: 28%)、tapsigargin や MG132 は、弱く発光を抑制することが認められた (図17B)。また、xanthohumol、KN-93 および JAK3 inhibitor VI は、濃度依存的に発光強度を低下させることが確認された (図17C-E)。

NanoBiT 法は、ルシフェラーゼを用いた手法であるため、これらの化合物が NanoBiT luciferase 活性を阻害することで、見かけ上 PPI を阻害している可能性がある。そこで、我々は、LgBiT-タグと SmBiT-タグを 22 アミノ酸のリンカーで接続し、PPI に影響されずに NanoBiT luciferase 活性を示す LSm-BiT を作製した。A549 細胞に LSm-BiT を安定的に発現させた細胞株 (A549-LSm-G1) を、xanthohumol、KN-93 お

よび JAK3 inhibitor VI で8時間処置し、発光強度に与える影響を検討した(図17F)。
xanthohumol、KN-93 は 10 μ M において、LSm-BiT の発光を弱く阻害することが認められたが(xanthohumol:8%、KN-93:9%)、その阻害率は、A549-nSET α /cSET α -C6 細胞と比較して、非常に弱いものであったため、NanoBiT luciferase にはほとんど影響せず、SET α の2量体化を阻害していることが示唆された。一方、JAK3 inhibitor VI は 10 μ M で LSm-BiT の発光を 25% 阻害した。これは、JAK3 inhibitor VI が A549-nSET α /cSET α -C6 細胞の発光に与える影響(32%抑制)とほぼ同程度であり、NanoBiT luciferase 活性を阻害することで、A549-nSET α /cSET α -C6 細胞の発光を抑制している可能性が示唆された。

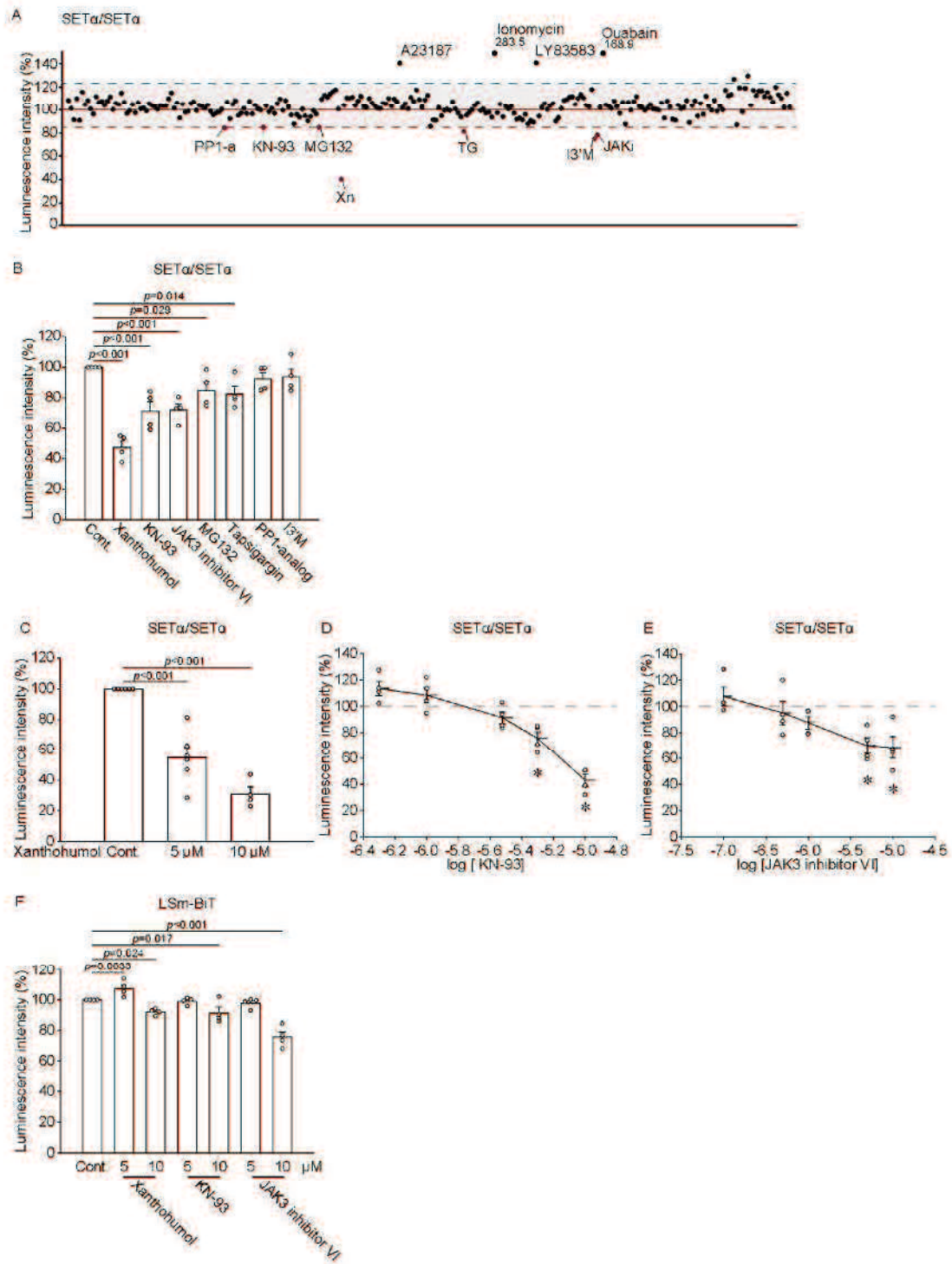


図17 SET α の2量体化を阻害する化合物の探索

(A) A549 細胞に、LgBiT-SET α 、SmBiT-SET α を安定的に発現させた細胞株 (A549-nSET α /cSET α -A2 および C6 細胞) を、標準阻害剤ライブラリーの化合物 (5 μ M) で処置し、5時間後に発光強度を測定した。それぞれのクローンにおいて DMSO 処置時の発光強度を 100% とし、相対値を算出後、2クローンの平均値をグラフ化した。グラフ内に描画できない点は、数値を記入した。

(B) A549-nSET α /cSET α -C6 細胞を 5 μ M の xanthohumol、KN-93、JAK3 inhibitor VI、tapsigargin、MG132、PP1-analog、I3'M で 8時間処置し、発光強度を測定した。DMSO 処置時の発光を 100% とした相対値で表した定量図。N = 4。

(C-E) A549-nSET α /cSET α -C6 細胞を (C) xanthohumol (5-10 μ M)、(D) KN-93 (0.5-10 μ M)、(E) JAK3 inhibitor VI (0.1-10 μ M) で 8時間処置し、発光強度を測定した。DMSO 処置時の発光強度を 100% として表した定量図。N = 4-6。 (D)*: $P \leq 0.001$ 。

(E)*: $P \leq 0.005$ 。

(F) A549 細胞に LSm-BiT を安定的に発現させた細胞株 (A549-LSm-G1 細胞) を 5 μ M および 10 μ M の xanthohumol、KN-93、JAK3 inhibitor VI で 8時間処置し、発光強度を測定した。DMSO 処置時の発光強度を 100% とした相対値で表した定量図。N = 4。

4-2-5 Xanthohumol、KN-93 は SET α /B56 α 、SET α /B56 γ 3 結合を阻害する

SET α の2量体化を阻害する化合物が、SET α -B56 α や SET α -B56 γ 3 の結合に与える影響を検討した。A549 細胞に LgBiT-SET α と SmBiT-B56 α または B56 γ 3 を発現させた細胞株 (A549-nSET α /nB56 α 細胞および A549-nSET α /nB56 γ 3 細胞) を、10 μ M の xanthohumol および KN-93 で8時間処置し、発光強度を測定したところ、xanthohumol および KN-93 は SET α -B56 α や SET α -B56 γ 3 の結合を阻害することが認められた (図18A、B)。以上の結果から、SET α の2量体化は、B56 α および B56 γ 3 との結合に重要であることが示された。

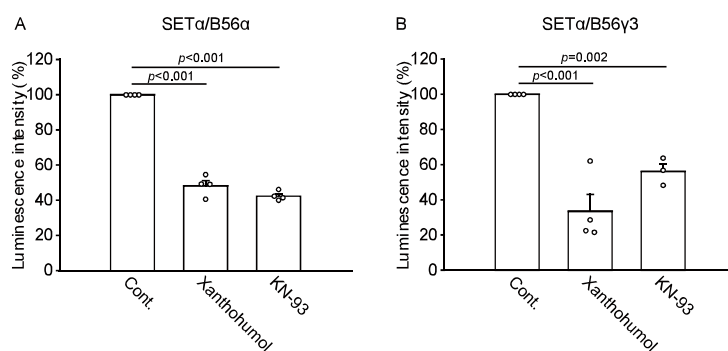


図18 Xanthohumol、KN-93 は SETα-B56α、SETα-B56γ3 結合を阻害する

(A、B) A549 細胞に、LgBiT-SETα、SmBiT-B56α または SmBiT-B56γ3 を安定的に発現させた細胞株 (A : A549-nSETα/nB56α 細胞、B : A549-nSETα/nB56γ3 細胞) を、xanthohumol、KN-93 (10 μM) で8時間処置し、発光強度を測定した。DMSO 処置時の発光を 100%として相対値で表した定量図。N = 4。

4-2-6 KN-93 標的因子が SET α の2量体化に与える影響

SET α の2量体化の分子機構を理解するため、2量体化を阻害した化合物の標的因子に注目した。Xanthohumol は diacylglycerol acyltransferase (DGAT) 阻害剤として知られているが、cytochrome P450 や valosin-containing protein (VCP) などの活性も阻害することが報告されており [61, 124, 132]、標的因子の同定は困難であると考えた。一方、KN-93 は、古くは calmodulin dependent kinase 2 (CaMK2) 阻害剤として使用されていたが、最近、calmodulin (CaM) 阻害能も有する pan-CaM/CaMK シグナル阻害剤であることが報告された [108, 144]。そこで我々は、CaM/CaMK シグナルが、SET α の2量体化に関与するかを NanoBiT 法により検討した。A549-nSET α /cSET α -C6 細胞を、KN-93 のネガティブコントロールである KN-92、CaM 阻害剤 W-7、CaMK1/2/4 阻害剤 KN-62、CaMK2 特異的阻害剤 CaMK2 inhibitor XII で8時間処置し、発光強度を測定した(図19A-D)。KN-92 は SET α の2量体化を阻害しなかったことから、KN-93 に特異的な作用であることが確認された。しかし、予想に反して、W-7、KN-62 および CaMK2 inhibitor XII は、SET α の2量体化を阻害しないことが認められた。

KN-93 は、CaM/CaMK シグナル以外にも、Haspin、Fyn、Hck、Lck、MLCK、Tec、TrkA などのキナーゼを阻害することが報告されている [108]。これらのうち、Fyn、Hck、Lck、MLCK、Tec、TrkA の阻害剤は、スクリーニングに含まれており、SET α の2量体化を阻害しなかった。そこで、Haspin 阻害剤 CHR6494 が、SET α の2量体化に与える影響を NanoBiT 法により検討したところ、CHR6494 は SET α の2量体化を阻害しないことが明らかになった。以上の結果より、KN-93 による SET α の2量体化阻害作用には、KN-93 の既知の作用は関与していないことが示唆された。

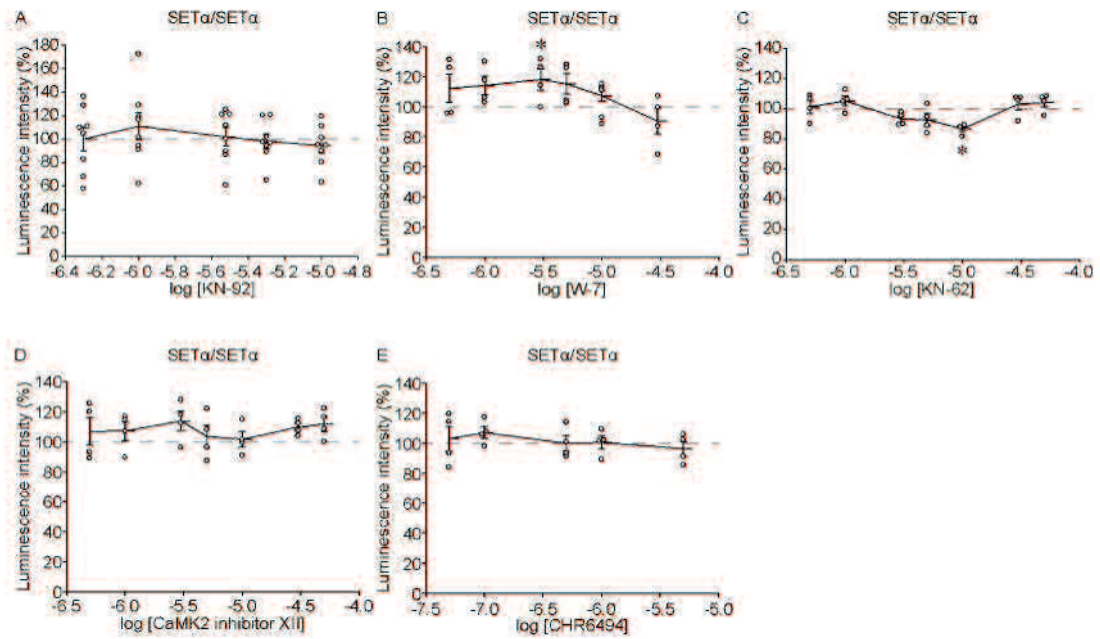


図19 KN-93 標的因子が SET α の2量体化に与える影響

(A-E) A549-nSET α /cSET α -C6 細胞を(A)KN-92、(B)W-7、(C)KN-62、(D)CaMK2 inhibitor XII、(E)CHR6494、(0.05-50 μ M)で8時間処置し、発光強度を測定した。DMSO 処置時の発光強度を 100%とした相対値で表した定量図。N = 4。(B)*: $P = 0.023$ 。(C)*: $P = 0.002$ 。

4-2-7 KN-93 は SET α の2量体化を直接阻害する

KN-93 が SET α の2量体化を直接阻害する可能性を明らかにするため、細胞溶解液を用いた *in vitro* NanoBiT 法による検討を行った。A549-nSET α /cSET α -C6 細胞から抽出した細胞溶解液に KN-93 を加え、発光強度に与える影響を解析した(図20A-C)。KN-93 は、濃度依存的および時間依存的に、細胞溶解液中の SET α の2量体化を阻害した。また、ネガティブコントロールである KN-92 は細胞溶解液中の SET α の2量体化を阻害しないことが認められ、KN-93 特異的な効果であることが示唆された。さらに、KN-93 は、*in vitro* NanoBiT 法でも、LSm-BiT の発光を阻害しないことから、NanoBiT luciferase 活性に直接影響を与えていないことが示された(図20D)。以上の結果より、KN-93 は、SET α の2量体化を直接阻害する可能性が示唆された。

一方、xanthohumol は、*in vitro* NanoBiT 法でも SET α の2量体化を濃度依存的に阻害することが認められたが、LSm-BiT の発光も顕著に抑制することが認められた(図20E、F)。この抑制効果は、SET α の2量体化に対する効果と比較すると弱い。現時点では、xanthohumol が SET α の2量体化を直接阻害しているのかは、結論づけることはできないと考える。

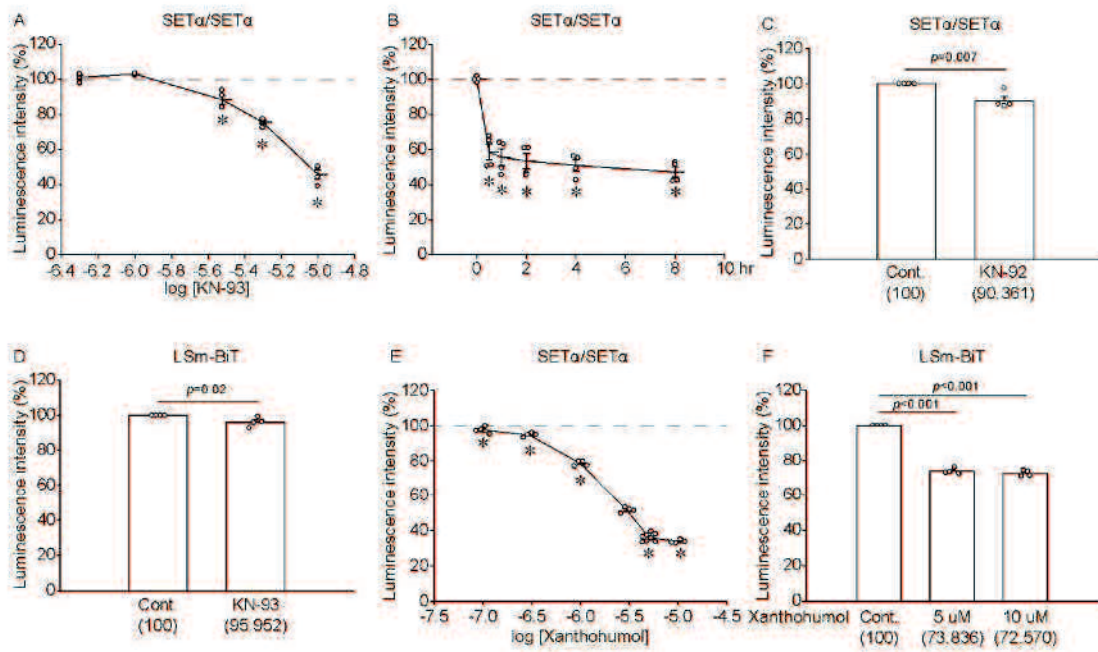


図20 KN-93 は SET α の2量体化を直接阻害する

(A) A549-nSET α /cSET α -C6 細胞から抽出した細胞溶解液を用いて in vitro NanoBiT を行なった。細胞溶解液を、KN-93 (0.5-10 μ M) で8時間処置し、発光強度を測定した。

DMSO 処置時の発光強度を 100%とした相対値で表した定量図。N = 4。*: $P < 0.01$ 。

(B) A549-nSET α /cSET α -C6 細胞から抽出した細胞溶解液を用いて in vitro NanoBiT を行なった。細胞溶解液を、KN-93 (10 μ M) で1-8時間処置し、発光強度を測定した。

無処置の発光強度を 100%とした相対値で表した定量図。N = 4。*: $P < 0.01$ 。

(C) A549-nSET α /cSET α -C6 細胞から抽出した細胞溶解液を用いて in vitro NanoBiT を行なった。細胞溶解液を、KN-92 (10 μ M) で8時間処置し、発光強度を測定した。

DMSO 処置時の発光強度を 100%とした相対値で表した定量図。N = 4。

(D) A549-LSm-G1 細胞から抽出した細胞溶解液を用いて in vitro NanoBiT を行なった。細胞溶解液を、KN-93 (10 μ M)、8時間処置し、発光強度を測定した。DMSO 処

置時の発光強度を 100%とした相対値で表した定量図。N = 4。*: $P < 0.05$ 。

(E) A549-nSET α /cSET α -C6 細胞から抽出した細胞溶解液を用いて in vitro NanoBiT を行なった。細胞溶解液を、xanthohumol (0.1-10 μ M)、1時間処置し、発光強度を測

定した。DMSO 処置時の発光強度を 100%とした相対値で表した定量図。N = 4。

(F) A549-LSm-G1 細胞から抽出した細胞溶解液を用いて in vitro NanoBiT を行なった。細胞溶解液を、xanthohumol (5-10 μ M) で1時間処置し、発光強度を測定した。

DMSO 処置時の発光強度を 100%とした相対値で表した定量図。N = 4。

4-3 考察

4-3-1 SET α とPP2A複合体の結合

SET は、ヒト急性骨髄性白血病患者の6番目と9番目の染色体転座により生じた、*SET-CAN*(*SET-NUP214*)融合遺伝子の構成因子の1つとして発見された [85]。その後、牛の腎臓からPP2Acや、52 kDa および 55 kDa 程度の大きさのBサブユニットを含むPP2A 3量体の活性を阻害する、内在性のPP2A 阻害タンパク質として単離されたI2PP2Aが、SETと同一のタンパク質であることが明らかになった [6, 84]。PP2Acの95~112、133~146番目のアミノ酸配列がSET β と結合すること、SET β の1~18、151~172、165~182番目のアミノ酸配列がPP2Acと結合することから [133]、SETはPP2Acに直接結合すると考えられる。一方、SETのPP2A複合体に対する選択性については、はじめ*Xenopus laevis*の卵抽出液を用いて検討が行われ、SETは、B55 δ 、B56 γ およびPR48と結合することが報告された [62]。我々は以前、ヒト胃癌細胞を用いて、SETがB56 α と結合するが、B55 α やPR72とは結合しないことを明らかにした [43]。本研究ではこの点をより詳細に検討し、免疫沈降法を用いた検討から、ヒトSET α はB56ファミリーに選択的に結合していることを明らかにした。一方、NanoBiT法を用いた検討では、B56 α およびB56 γ 3との結合は免疫沈降法と同様に観察できるのに対して、免疫沈降法で最も強い結合が認められたB56 γ 2については、生細胞内ではSETとの結合性が低いことが明らかになった。このことは、SET α は、B56ファミリータンパク質との結合能を有しているが、生細胞内では、細胞内局在や翻訳後修飾の違いにより、結合性が制御されている可能性を示唆する。SETは主に核に局在し、各種刺激によって細胞質へ移行するタンパク質である [118, 151]。一方、B56 α は核と細胞質 [48]、B56 γ 2はゴル

ジ体 [67]、B56 γ 3 は核に存在することが報告されており [92]、細胞内で B56 α 、B56 γ 3 は SET α と共局在している可能性が考えられる。また、リコンビナントタンパク質や、B56 切断体を用いた検討により、SET α と B56 ファミリータンパク質との結合には PP2Ac の存在は必須ではないことが認められた。B56 γ 3 については、C 末端領域が PP2Ac との結合にも関与しており、PP2Ac の存在が SET α との結合性を高める可能性も考えられる。これらの結果は、B56 α と B56 γ 3 の SET α に対する結合様式が異なることを示唆しており、今後、結晶構造解析等により明らかにする必要があると考える。

4-3-2 SET の2量体化制御機構と PP2A 活性への影響

SET の2量体化は、SET の細胞内局在を変化させる可能性が考えられる。SET β は Ser9 がリン酸化されると単量体となり、importin との結合性が低下することで細胞質へ局在することが報告されている [151]。SET β Ser9 のリン酸化は PKC や CK2 により引き起こされることが報告されているが [103, 154]、なぜ CD 外に存在する Ser9 のリン酸化が2量体化を阻害するのかについては分かっていない。また、SET α の N 末端領域 1~37 アミノ酸は、SET β の 1~24 アミノ酸と配列が異なっており、Ser9 に相当するリン酸化サイトは存在しない。SET α の N 末端領域では、Ser7、Ser28 および Ser30 のリン酸化が、質量分析等のハイスループットな解析で報告されているが (PhosphoSitePlus v6.5.7:2019 年 11 月 25 日検索)、2量体化に対する影響や上流の責任キナーゼなどは全く明らかになっていない。本研究では、NanoBiT 法を用いた阻害剤スクリーニングを行うことで、上流因子の同定を試みたが、ヒット化合物が直接的な阻害作用を示すという予想外の結果を得た。今後、SET α のリン酸化部位を明らかにすることで、SET α の

2量体化を制御するメカニズムの解明に近づけるのではないかと考えている。

これまで、SET の2量体化は、PP2A 活性の抑制には関与していないと考えられていた [103]。しかし、本年 Ogretmen らのグループにより、PP2A と SET を解離させる作用を持つ FTY720 が、SET β の CD を含む Gln29~Lys77 領域に結合して2量体化を阻害すること、これにより SET β を PP2Ac から解離させることが報告された [36]。このことは、SET の2量体化が PP2A 活性の阻害に関与している可能性を示唆する。しかし、我々が NanoBiT 法を用いて行った検討では、FTY720 による SET α の2量体化阻害作用は確認できなかった (Data not shown)。N 末端を除く配列は SET α と SET β で共通であり、FTY720 は、SET α の2量体化も阻害すると予想され、なぜ矛盾する結果が生じたのかは不明である。しかし、N 末端領域が2量体化に何らかの影響を与えている可能性は排除できないため、今後 SET β の2量体化に対する FTY720 の効果を NanoBiT 法で検討する必要がある。また、Ogretmen らは、細胞を FTY720 (5 μ M) で処置し、proximity ligation assay (PLA) を用いて SET β の2量体化を観察している。PLA では NanoBiT 法と異なり、細胞を固定・染色しなければならず、生細胞内の状態を完全に反映したものではないことが、我々の結果との差につながった可能性も考えられる。さらに、Ogretmen らの報告では、細胞を用いた *in vivo* の検討では、5 μ M の FTY720 が SET の2量体化をほぼ完全に阻害しているのに対し、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の検討では、25 μ M 以上の濃度で SET と PP2Ac の解離を引き起こしており矛盾する。この点については、今後、より慎重な検証を行う必要があると考えている。

A549 細胞における B56 α の過剰発現は、がん幹細胞性の指標であるコロニー形成能を阻害することが認められた。この阻害効果は、SET α WT の発現によりレスキューさ

れたが、SET α DD の発現ではレスキューされなかった。このことから、2量体化した SET α が、PP2A/B56 α 複合体の活性を抑制し、A549 細胞のがん幹細胞性維持に寄与している可能性が考えられる。現在、B56 γ 3 に関する検討はできていないが、B56 γ の発現抑制も、がん幹細胞性を上昇させることが報告されており [117]、本研究から SET α の2量体化が B56 γ 3 との結合に重要であることが明らかになったことから、同様の結果が得られるのではないかと考えられる。

また、SET α の2量体化に対する阻害効果が確認された KN-93 は、濃度依存的に A549 細胞のコロニー形成能を低下させた (Data not shown)。しかし、KN-93 の抗がん効果がどの程度 SET α の2量体化阻害効果に依存するかは明らかにはできていない。今後、SET α の2量体化阻害作用を保持しつつ CaM/CaMK に対する阻害作用を持たない KN-93 の誘導体を同定することで、この点について明らかにしていきたい。

4-3-3 SET α と B56 ファミリーの結合様式

B56 α 、B56 γ 3 の切断体を用いた検討から、SET α は AD で B56 α に結合することが明らかになった。B56 α と結合する SET α AD や EA は、CD を欠損しており、2量体を形成しない (Data not shown) ことから、SET α と B56 α の結合には、SET α の2量体化は必須ではないと考えられる。しかし、SET α DD は B56 α と結合しないことが認められ、矛盾する結果が得られた。SET α が単量体で存在する場合、N 末端が AD と何らかの相互作用をして、B56 α との結合を阻害している可能性が考えられる。一方、B56 γ 3 は、SET α AD とは結合しなかったことから、B56 α とは結合様式が異なることが推測される。また、B56 γ 3 は、2量体化能を持つ SET α CD や CE とも結合しないことから、2量体化し

た SET α の AD に結合することが推測される。この様に、B56 ファミリー内でも、SET α との結合様式は異なっている可能性が明らかになった。このことから、創薬標的として、SET α -B56 interface を阻害することは困難であると予想されるため、SET α の2量体化を標的とした創薬がより有効であると考えられる。今後は、SET α と他の B56 ファミリーの結合が、SET α の2量体化の影響を受けるかを検討する必要があると考えている。

4-3-4 Xanthohumol および KN-93 が SET α の2量体化を阻害するメカニズム

SET α の2量体化を標的とした NanoBiT スクリーニングによりヒットした化合物の中で、KN-93 は CaM/CaMK 阻害剤であり、CaM や CaMK シグナルを阻害することで、SET α の2量体化を抑制すると考えられた [108, 144]。しかし、CaM 阻害剤である W-7 や、CaMK2 阻害剤である CaMK2 inhibitor XII、CaMK1/2/4 阻害剤である KN-62 は、SET α の2量体化を阻害しなかった。さらに、*in vitro* で KN-93 による阻害が報告されている Haspin についても、Haspin 阻害剤を用いた検討から SET α の2量体化制御への関与は確認できなかった。興味深いことに、細胞溶解液を使用した *in vitro* NanoBiT 法により、KN-93 が SET α の2量体化を直接阻害する可能性が示唆された。この点については、リコンビナントタンパク質を用いた検討で確認する必要がある。

一方、xanthohumol に関しても、*in vitro* NanoBiT 法で、SET α の2量体化を 60%程度抑制していたが、LSm-BiT に対しても 25%程度の抑制効果を示した。このことから、xanthohumol が SET α の2量体化を直接阻害するかは未だ結論に至っていない。しかし、生細胞では LSm-BiT の発光を抑制しない濃度でも SET α の2量体化を 50%程度抑制したことから、直接的あるいは間接的に SET α の2量体化を阻害する作用がある。

Xanthohumol は、肺がん細胞で MEK/ERK シグナルの抑制、白血病細胞において NF- κ B シグナルの抑制などを介した抗がん効果が報告されており、SET α の2量体化阻害による PP2A 活性化が抗がん効果に関与している可能性が考えられる [71]。

4-4 総括

本章では、SET α が PP2A/B56 複合体に選択的に結合していることを明らかにした。SET α の2量体化は、B56 α 、B56 γ 3 との結合に重要であり、KN-93、xanthohumol は直接的あるいは間接的に SET α の2量体化を阻害することで、SET α -B56 α 、SET α -B56 γ 3 結合を解離させる。SET α と PP2A/B56 複合体との結合様式については、より詳細な検討が必要であるが、SET α の2量体化が PP2A/B56 複合体阻害に重要であることが示された。SET α の2量体化を阻害することが、新たな抗がん戦略として有望であることが示唆された。

第5章 総合討論

5-1 PP2A を標的とした抗がん戦略の今後の展望

現在、PP2A を標的とした抗がん戦略は、PP2A 活性化剤 (PAD) と PP2A 阻害剤 (PID) に大きく分けられる。PAD には、PP2A を直接活性化させる SMAP や PPZ、SET-PP2A 結合を標的とした FTY720 や OP449 などが、PID には LB100 が存在している。

SMAP は、PP2A A サブユニットの5番目の HEAT リピートに結合していることが知られているが、この領域は子宮内膜がん患者の1/3で変異が認められており、SMAP が効果を示すかが注目されていた。最近になり、SMAP は P179R 変異を持つ子宮内膜がん患者由来の細胞に対し、抗がん効果を示すことが報告された [58]。SMAP は、膵臓神経内分泌腫瘍の、Akt 阻害剤に対する耐性の獲得を抑制することも明らかになっており [134]、有効な抗がん剤になり得る可能性が示されている。SMAP の PP2A A サブユニットへの結合は、PP2A B56 ファミリー3量体の形成を促進することが報告されている [122]。本研究より、SMAP の雛型となったジベンザゼピンと類似した構造を持つ PPZ は、PP2A 非依存的に ERK1/2 の脱リン酸化を引き起こすことが明らかになった。現在、SMAP により誘導される ERK1/2 の脱リン酸化は、PP2A に依存的であると考えられているが、実際には検証されていない。我々の結果は、SMAP についても PP2A 非依存的な効果がある可能性を示しており、現在の仮説に疑問を投げかける重要な知見であると考えられる。また、我々の研究において、SET α は PP2A/B56 複合体に結合し、その活性を阻害することが明らかになった。PP2A 阻害タンパク質の1つである CIP2A も、B56 α や B56 γ 複合体と結合することが報告されており [141]、SMAP が SET や CIP2A 発現量の亢進しているがんに対して有効かを検証する必要があると考えてい

る。

FTY720 は、古くから PP2A 活性化作用が知られており、最近 SET β の 2 量体化を阻害することが報告された [36]。FTY720 は本来、sphingosine-1 phosphate (S1P) 受容体を調節することで、リンパ球をリンパ節内に留まらせる免疫抑制作用を示し、多発性硬化症の治療薬として認可されている [20]。FTY720 は細胞内に取り込まれると sphingosine kinase 2 (SPHK2) によりリン酸化されることで、S1P 受容体を阻害する [1]。S1P 受容体は心血管系にも多く発現しており、抗がん効果を示すほどの高濃度では、FTY720 は心臓毒性を示すことから、生体で抗がん剤として使用するには危険性が高い [24]。しかし、SET 阻害効果を示す FTY720 は非リン酸化体であることが知られている [103]。SPHK2 によるリン酸化を受けない FTY720 誘導体 OSU-2S は、S1P 受容体への作用を示さず、ヒト肝細胞がん細胞に対して抗がん効果を示すことが報告されている [105]。また今年、非リン酸化体の FTY720 アナログである CM-1231 が開発され、zebrafish に対する心臓毒性がないこと、ヒト急性骨髄性白血病細胞に対し、PP2A 活性を上昇させ、抗がん効果を示すことが報告された [139]。したがって、FTY720 をリード化合物とした新たな抗がん剤の開発が期待される。本研究から、SET α の 2 量体化が PP2A/B56 複合体との結合に重要であることが明らかになり、KN-93 が SET α の 2 量体化を直接阻害する可能性が示唆された。これらのことから、がんの悪性化には SET α の発現量ではなく、SET α の 2 量体形成数が増加することが重要であると考えられ、今後 SET α の 2 量体化制御機構や、SET α の 2 量体化阻害作用を保持しつつ CaM/CaMK 阻害作用のない KN-93 類縁体の同定などを行っていくことで、「SET α の 2 量体化」を標的とした抗がん戦略の有効性が明らかになると考えている。

一方、PID には LB100 と呼ばれる、第2世代の PP2A 阻害剤が存在する。LB100 は、PP2A 活性を阻害し、チロシンキナーゼ阻害剤抵抗性の慢性骨髄性白血病細胞に対し、チロシンキナーゼ阻害剤感受性を回復させることが報告されている [81]。しかし、PP2A は生体に必須のホスファターゼであり、PP2A 阻害剤である okadaic acid は海産毒として知られている [136]。したがって、LB100 は PP2A 活性そのものを直接阻害しているわけではない可能性がある。PP2A は重要ながん抑制因子であると考えられているが、結合する B サブユニットにより機能が変化し、がん促進性に働く PP2A 複合体も存在する。例えば、B55 α は、Eya3 と結合し、cMyc Thr58 を脱リン酸化して安定化し、マウス乳がん細胞である 66c14 細胞の転移を促進する [153]。また、B55 α は、 β -catenin の Ser33、Ser37、Thr41、Ser45 を脱リン酸化して安定化させ、慢性骨髄性白血病の悪性化に関与することも報告されている [81, 156]。さらに、PR130は、Naked の抑制を介して、GSK3 β 活性を阻害し、 β -catenin を安定化する [40]。現在、LB100 がどのようにして PP2A 活性を阻害しているのかは明らかになっていないが、がん促進性の PP2A 複合体活性を阻害している可能性が考えられる。実際、慢性骨髄性白血病細胞において、LB100 は、 β -catenin Thr41、Ser45 のリン酸化レベルを上昇させ、タンパク質分解を誘導していることが報告されており、PP2A/B55 α 複合体を阻害していることが推測される [81]。今後、LB100 が、PP2A 活性そのものを阻害しているのか、PP2A 複合体に対する選択性があるのかを検証することで、がん促進性の PP2A 複合体を標的とした抗がん戦略の可能性が明らかになると考えている。

PP2A を標的とした抗がん戦略は、様々な視点から発展を遂げている。本研究は、SMAP や SET 阻害剤の知見を深め、PAD の発展に資することができるものであると考

えている。

5-2 SET の発現、機能調節機構

SET は、ヒトおよびイヌの様々ながんで、発現量の上昇が報告されている [16, 43, 49, 65, 66, 72]。近年、SET タンパク質の発現制御機構が少しずつ明らかになってきている。慢性骨髄性白血病細胞では、BCR-ABL が JAK2 を活性化させ、SET のタンパク質発現量を増加させている [100]。また、急性骨髄性白血病細胞では、Myc、SP1、RUNX1、GATA2 複合体が SET 遺伝子のプロモーター領域に結合し、SET mRNA の転写を誘導することが報告されている [109]。これらの転写因子のうち Myc や RUNX1 は、炎症性サイトカインにより活性化することが報告されている [89, 106]。我々は、*K19-Wnt1* マウス (Wnt シグナルの活性化) と *K19-C2mE* マウス (COX2-PGE2 シグナルの活性化) を交配して作製される胃がん自然発症モデルマウス *Gan* マウスで、SET mRNA 発現の上昇を報告しているが [43]、遺伝子発現データベースから、野生型マウスや *K19-Wnt1* マウスと比較して、慢性的な胃炎が認められる *K19-C2mE* マウスで、すでに SET の mRNA 発現が上昇していることが確認できる (*Gan* マウス遺伝子データベース、<http://www.ganmouse.net>)。したがって、慢性炎症による転写因子の活性化が SET mRNA 発現誘導による SET タンパク質発現量の上昇につながっていると考えられるが、詳細な分子機構の解明には至っていない。また、*Gan* マウスの非腫瘍部と比較した腫瘍部の SET mRNA 発現量の上昇レベルは、SET タンパク質のそれと比較して低く、SET タンパク質分解の不全も、がんにおける SET タンパク質発現量の上昇に寄与すると考えられる。しかし、SET タンパク質の分解機構については明らかになっ

ていない。SET 発現抑制は、多くのがん細胞に対して細胞増殖に影響することなくコロニー形成能を低下させることから [43]、がん細胞の SET 発現を低下させることができれば、抗がん効果が期待できる。標的タンパク質のリガンドと E3 ユビキチンリガーゼ認識部位を融合させた分子を利用し、任意のタンパク質にユビキチン/プロテアソームタンパク質分解を誘導する proteolysis targeting chimeric molecules (PROTACs) と呼ばれる技術の登場により、薬剤による目的タンパク質の分解も可能になってきた [121]。KN-93 誘導体などの解析から SET リガンドが得られれば、PROTACs を用いた SET 標的薬の開発も可能かもしれない。

また、B56 α 過剰発現による A549 細胞のコロニー形成能の低下が SET α DD 変異体でレスキューされなかったことから、SET α の2量体化調節機構の解明も必要であると考えられる。現在、SET β においては、CK2 による Ser9 のリン酸化が、2量体制御に関与していることが報告されているが、SET α に関しては2量体化を制御する翻訳後修飾は明らかになっていない。今後、アイソフォーム間の2量体化制御機構の違いについても検討していく必要がある。SET の発現制御、機能調節、分解機構は未だ不明な点が多く、解明すべき課題が多い。本研究は、SET α の2量体化による機能調節機構の一端を明らかにしたことで、この分野の科学的な進歩に貢献できたのではないかと考えている。

5-3 PP2A 活性化剤とキナーゼ阻害剤の併用について

SET はがん細胞の増殖よりも、幹細胞性の維持に寄与していることから [43]、SET 標的薬はがん幹細胞性を標的とした薬剤になる。そのため、単剤での効果は限定され

ると考えられ、実際、SET 標的薬 OP449 は、免疫不全マウス体内での胃がん細胞の成長を完全に阻害することはできない [43]。したがって、細胞増殖を抑制する既存の抗がん剤や、キナーゼ阻害剤などの分子標的薬との併用を検討する必要がある。SET 発現抑制は、aurora kinase 阻害剤などの感受性を高める可能性が報告されている [74]。また、OP449 は、慢性骨髄性白血病細胞や急性骨髄性白血病細胞に対し、imatinib や nilotinib の効果を増強することが報告されており、今後は、認可されているキナーゼ阻害剤との併用効果についての検討も行なっていく必要があると考える。

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、新たな 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

ヒト T 細胞性リンパ腫細胞株 HUT78 細胞、ヒト T 細胞性白血病細胞株 CCRF-CEM 細胞、SKW3 細胞、Jurkat 細胞、TALL1 細胞、イヌ T 細胞性リンパ腫細胞株 UL-1 細胞、Ema 細胞、イヌ末梢血単核球細胞 PBMC、イヌ骨肉腫細胞株 POS 細胞、HM-POS 細胞は、1% antibiotic-antimycotic (AA、Thermo Scientific)、10% fetal bovine serum (FBS、SIGMA) を含む RPMI1640 を培地として用い、ヒト肺癌細胞株 A549 細胞、293T 細胞 (Takara Bio) は 1% AA、10% FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、SIGMA) を培地として用い、37°C、5% CO₂ に保ったインキュベーター (MCO-5AC、SANYO および SCA-80D、ASTECC) 内で培養した。接着細胞の継代は培地を除去して HEPES buffered saline solution (HBS: 25 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4) で 1 回洗浄し、0.05% trypsin、0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 含有 HBS を加えて 3 分間インキュベートした後、ピペッティングをすることで細胞を剥がして行った。なお、培養に必要な器具は全て滅菌して用いた。

6-2 プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製

6-2-1 プラスミドの作製

N 末端側に 3×FLAG タグを付加したヒト PP2A B55α、B55δ、B56α、B56β、B56γ2、B56γ3、B56δ、PR72、および SETα はヒト肝臓 cDNA を鋳型として、N 末端側に 3×FLAG タグを付加したヒト PP2A B56α および B56γ3 切断体、SETα DD 変異体は、pLVSIN 3×FLAG-PP2A B56α、B56γ3 および SETα を鋳型として PCR により増幅し、pLVSIN-EF1α-IRES-ZsGreen1 ベクターに InFusion HD Cloning Kit (Takara Bio) を用

いて組み込んだ。また、C 末端側に GFP タグを付加したヒト SET α WT および DD は、pLVSIN 3 \times FLAG-SET α WT または DD を鋳型として PCR により増幅し、InFusion HD Cloning Kit を用いて pLVGFPC ベクターに組み込んだ。N 末端側に GST タグを付加したヒト SET α および N 末端側に 8 \times His タグを付加したヒト B56 α は、pLVSIN 3 \times FLAG-SET α および PP2A B56 α を鋳型として PCR により増幅し、InFusion HD Cloning Kit を用いて pGEX4T1 ベクターまたは pHEX1 ベクターに組み込んだ。LgBiT、SmBiT タグを N 末端および C 末端に付加させた B55 α 、B56 α 、B56 γ 2、B56 γ 3、SET α WT、SET α DD は、pLVSIN3 \times FLAG PP2A B55 α 、B56 α 、B56 γ 2、B56 γ 3、SET α WT、SET α DD を鋳型として PCR で増幅し、InFusion HD Cloning Kit を用いて pBiT1.1-C[TK/LgBiT]、pBiT2.1-C[TK/SmBiT]、pBiT1.1-N[TK/LgBiT]、pBiT2.1-N[TK/SmBiT] に組み込んだ。

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。

Non-target shRNA (shNT) : 5'-CAACAAGATGAGAGCACCA-3'

SET target shRNA (shSET) : 5'-GGATGAAGGTGAAGAAGAT-3'

6-2-2 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

大腸菌 (XL10GOLD:Stratagene、または HST08:Takara Bio) 10 μ L にプラスミドを 0.5 μ 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 $^{\circ}$ 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、50 μ L の LB

Broth、または 50 μ L の super optimal broth with catabolite repression (SOC) Medium 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 μ 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 μ g/mL ampicillin 添加)に加え 37°C、200 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 4,000 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。

6-2-3 プラスミドのトランスフェクション

12 穴プレートに 293T 細胞を 2×10^5 cell/well で播き一晩培養した。200 μ L の Opti-MEM にプラスミド 1.0 μ g および Polyethylenimine“MAX”(PEI、Polysciences)を 2.5 μ L 混合した後に 30 分静置し、1 mL の培地 (10% FBS・1% AA 含有 DMEM)に加えて 24 時間培養し使用した。上記は最小単位であり、使用する細胞培養プレートの面積、播種細胞数に応じて、スケールアップし使用した。

6-2-4 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 293T 細胞を 4×10^5 cell/well で播き一晩培養した。各種レンチウイルスベクタープラスミド (1 μ g)、packaging plasmid (psPAX2:0.77 μ g)、VSVG coat protein plasmid (pMD2.G:0.43 μ g)と 2.5 μ L の PEI を 333 μ L の Opti-MEM に混合した後に 30 分静置した。その後、1.5 mL の培地 (10%FBS・1%AA 含有 DMEM)に加えて、8時間培養したのちに除去し、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 μm のフィルターでろ過し、レンチウイルスベクターを得た。その後細胞を、ウイルスベクターを含む培地で 12 時間処置し、目的のタンパク質および shRNA を恒常的に発現する細胞を作出した。

6-3 リコンビナントタンパク質の精製

氷上で解凍した大腸菌 (BL21 DE3 Codon Plus RP: Agilent Technologies) 50 μL に pGEX4T1-SET α および pHEX1-B56 α を 1 μL 加え、氷上で 30 分間静置した。大腸菌をガラス管に入った LB Broth (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin, 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chloramphenicol 添加) に加え、37°C、250 rpm で一晩振とう培養した。翌日、培養した大腸菌を 200 mL の LB Broth (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin, 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chloramphenicol 添加) の入った 1 L 三角フラスコに加え、37°C、200 rpm で 3 時間振とうした。その後、IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) を最終濃度 0.2 mM で添加してタンパク質の発現誘導を行い、37°C、200 rpm で 6 時間振とう培養した。大腸菌を 3,000 rpm、15 分、4°C で遠心集菌し、recombinant buffer A (20 mM Tris HCl pH 7.5、150 mM NaCl) で 1 回洗浄したのちに recombinant buffer B (GST-SET α : 20 mM Tris HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.1 mM EGTA、5 mM benzamidine、1 mM PMSF、1 mM DTT、0.1% Tween 20、His-B56 α : 20 mM Tris HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.1 mM EGTA、5 mM benzamidine、1 mM PMSF、20 mM imidazole、0.1% Tween 20) 10 ml と lysozyme で菌体を溶解した。その後、氷上で超音波破碎機を用いてソニケーションを行い、4°C、12,000 rpm で 10 分遠心 (テーブルトップマイクロ冷却遠心機、KUBOTA) した。上清を glutathione sepharose ビーズ (GE Healthcare) または HisPur Ni-NTA (Thermo

Scientific) と混合し、4°C、30 分反応させたのちに、還元型グルタチオンまたは imidazole で GST/His タグ融合タンパク質をビーズから溶出した。溶出したタンパク質溶液は、PD-10 (GE Healthcare) を用いて recombinant storage buffer (20 mM Tris HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.01% Tween 20) に溶液を置換した。精製したリコンビナントタンパク質はポリアクリルアミド電気泳動後に coomassie brilliant blue (CBB) 染色を行うことで濃度を測定した。CBB 染色には、CBB 染色液 (0.1% coomassie brilliant blue、50% methanol、10% acetic acid) および CBB 脱色液 (7.5% acetic acid、5% methanol) を用いた。

6-4 Western blotting によるタンパク質発現量測定

6-4-1 タンパク質抽出

浮遊細胞は、培地ごと回収し、1,500 rpm で3分間遠心することで培地を除去した。Lysate buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na₃VO₄、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。接着細胞は、培地を除去し HBS で洗浄後、lysate buffer を加えて細胞を可溶化した。得られた細胞溶解液を5分間静置した後に、4°C、15,000 rpm 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。

6-4-2 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

(8-15%)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% もしくは 3%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 30-60 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。ローディングコントロールには p97/VCP 抗体を用いた。

6-5 免疫沈降法および pull down assay

6-5-1 FLAG M2 ビーズ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1回洗浄し、CHAPS lysate buffer (40 mM HEPES pH 7.4、2 mM EDTA、10 mM disodium glycerophosphate、0.3% CHAPS、10 mM sodium pyrophosphate、2 tablet/50 mL PhosSTOP、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、15,000 rpm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。CHAPS wash buffer(40 mM HEPES pH 7.4、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 30 分間反応させた。ビーズを洗浄後、結合タンパク質を SDS

sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS, 6% β -mercaptoethanol, 2% Glycerol)もしくは FLAG peptide (SIGMA)で溶出し、western blotting により検出した。

6-5-2 GST pull down assay

GST-SET α WT (100 pmol) または GST-tag (100 pmol)、および His-B56 α (10 pmol) を glutathione sepharose ビーズと混合し、recombinant buffer A 中で、4°C、30 分間反応させた。ビーズを洗浄後、結合タンパク質を SDS sample buffer で溶出し、western blotting により検出した。

6-6 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。第1章では、96 穴プレートに細胞を 4.0×10^4 個播き、翌日から PPZ で処置し、72 時間後、細胞生存率を 450 nm の吸光度を測定することで定量した。第2章では、24 穴プレートに細胞を 1.0×10^4 個播き、翌日から細胞増殖率を4日間測定した。また、細胞生存率は、細胞を撒いた翌日から、FTY720 や cisplatin で処置し、72 時間後、細胞生存率を 450 nm の吸光度を測定することで定量した。

6-7 コロニー形成試験

6穴プレートに細胞を 1.0×10^2 個播き、培地 2 mL (10% FBS・1% AA 含有 DMEM または RPMI1640) を加え培養した。10 日後、細胞をエタノールで 10 分間固定してギムザ染色を行い、形成されたコロニー数を計測した。

6-8 NanoBiT 法

6-8-1 一過性発現による NanoBiT 法

293T 細胞を 1.0×10^4 個、発光用 96 穴プレート (Perkin Elmer、6005181) に播種した。24 時間後に、LgBiT-タグおよび SmBiT-タグを付加した目的タンパク質の発現プラスミドをそれぞれ 100 ng と、1 μL の PEI を 36 μL の Opti-MEM に混合し、30 分間静置した。混合液 16 μL を 84 μL の培地に加え、24 時間培養した後に、Nano-Glo Live Cell Substrate、Nano-Glo LCS Dilution Buffer を 5:95 の割合で混合した混合液を各ウェルに 25 μL ずつ加え、10 分間、37°C、5% CO_2 に保たれたインキュベーター内で静置した。その後、37°C に設定したプレートリーダー (ARVO X、PerkinElmer または、GloMAX、Promega) で 1 分おきに 10 回発光強度を測定し、その平均値を算出した。NanoBiT 法は、LgBiT-タグおよび SmBiT-タグを目的タンパク質の N 末端、C 末端に融合させるため、8通りの組み合わせが存在する。タグの組み合わせについては事前に検討を行い、最も発光が強い組み合わせを実験に使用している (図21)。

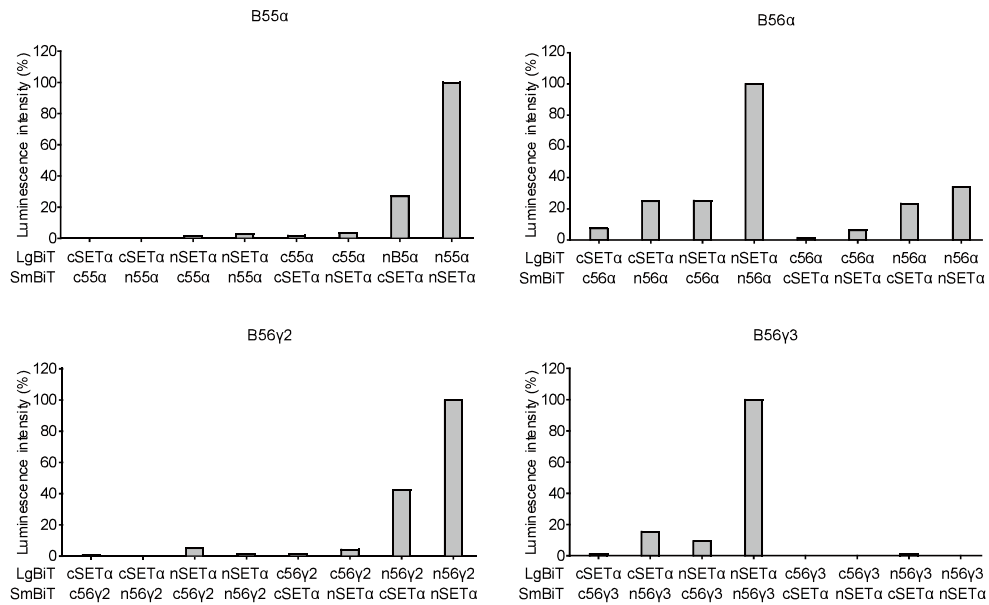


図21 NanoBiT 法に用いる SETα および、B55α、B56α、B56γ2、B56γ3 のタグの組み合わせ

293T 細胞に、図の組み合わせで LgBiT-タグまたは SmBiT-タグを付加した SETα および B55α、B56α、B56γ2、B56γ3 を発現させた。発光強度補正用として SmBiT-タグ側を empty vector に変更した組み合わせも検討した。24 時間後、発光強度を測定し、empty vector による発光を減算して、それぞれで最も発光強度の強い組み合わせを 100%とした相対値で表した。Duplicate で1回実験を行い、平均値をグラフ化した。

6-8-2 NanoBiT 法用 A549 細胞株の作製

LgBiT-nSET α および SmBiT-cSET α 、LgBiT-nSET α および SmBiT-nB56 α 、LgBiT-nSET α および SmBiT-nB56 γ 3 を鋳型に、PCR により増幅し、それぞれ pLVnB2puro および pLVnB2neo に組み込んだ。作製したプラスミドを用いて、6-2-4に従いレンチウイルスベクターを作製し、A549 細胞に遺伝子導入後、ピューロマイシンおよびジェネティシンでセレクションを行った。生き残った細胞を、限界希釈法を用いてクローン化し、発光強度の強い細胞を NanoBiT 法用 A549 細胞株として実験に使用した。

6-8-3 NanoBiT 法用 A549 細胞株を用いたスクリーニング

発光用 96 穴プレートに、LgBiT-nSET α および SmBiT-cSET α を安定的に発現させクローン化した A549 細胞を 2.0×10^4 個播種した。24 時間後、各ウェルを目的の試薬で処置した。処置終了 20 分前、死細胞数補正用のウェルに CellTox Lysis Solution (Promega) を 10 μ L 加え、細胞を破壊した。処置終了後、Nano-Glo Live Cell Substrate、CellTox Green、Nano-Glo LCS Dilution Buffer を 5:1:94 の割合で混合した混合液を各ウェルに 25 μ L ずつ加え、10 分間、37°C、5% CO₂ に保たれたインキュベーター内で静置した後に、37°C に設定したプレートリーダー (ARVO X、PerkinElmer) で1分おきに 10 回発光を測定し、平均値を各ウェルの発光強度として使用した。発光測定後、618 nm のフィルターで蛍光を測定し、死細胞の割合を算出した。発光強度は、各ウェルについて以下の式により補正した値を算出したのちに、溶媒処置ウェルを 100%とした相対値で表した。

ウェルの発光

1 $\frac{\text{溶媒処置ウェルの蛍光} - \text{ウェルの蛍光}}{\text{死細胞補正用ウェルの蛍光}}$

スクリーニングに用いた化合物ライブラリーは、先端モデル動物支援プラットフォーム・分子プロファイリング支援活動から提供を受けた、標準阻害剤キットI~IIIを用いた。スクリーニングは2つのクローン化細胞を用いて行い、平均値を順位付けし、上位7つを確認実験に使用した。

6-8-4 In vitro NanoBiT 法

LgBiT-nSET α および SmBiT-cSET α を安定的に発現した A549 細胞を 1.0×10^5 個/100 μL の割合で CHAPS IP Buffer で溶解した後に 15,000 rpm で 15 分遠心し、得られた上清を in vitro NanoBiT 用細胞抽出液として使用した。50 μL の in vitro NanoBiT 用細胞抽出液を、96 穴プレート(Thermo Scientific、611F96WT)に 2.5 μL の目的の試薬を加え、4°C で振とうしながら反応させた。処置時間終了後、0.625:11.74 の割合で混合した Nano-Glo Live Cell Substrate と Nano-Glo LCS Dilution Buffer の混合液を各ウェルに 12 μL ずつ加え、室温で 10 分間静置した後に、プレートリーダー(GloMAX、Promega)で1分おきに 10 回発光を測定した。発光強度は、各ウェルについて、10 回測定した平均値を算出したのちに、溶媒処置ウェルを 100%とした相対値で表した。

6-9 アポトーシスの解析

HUT78 細胞を PPZ (2.0 μM) で 24 時間、UL-1 細胞を PPZ (2.0 μM) で 12 時間処

置し、細胞死を誘導した。1,500 rpm で5分間遠心し、細胞を回収した。その後、Annexin V-FITC Apoptosis Kit (Bio Vision)を用いて、アポトーシス細胞を Annexin V で標識し、Flow cytometry (FACS) (BD Accuri、BD Biosciences)により全細胞中の Annexin V 陽性率を測定した。

6-10 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2群間の比較では Student's t-test を用い、3群間以上の比較では One way ANOVA を行なった後に Fisher's Least Significant Difference (LSD) test を行い、危険率(P)が 5%未満の場合を有意差ありとした。

表1 使用抗体

抗体	メーカー	型番
p-Akt Ser473	Cell Signaling	4060
p-Akt Thr307	Cell Signaling	13038
Akt	Cell Signaling	2920
p-B-Raf Ser445	Cell Signaling	5284
p-C-Raf Ser338	Cell Signaling	9427
B-catenin	BD Biosciences	610153
cleaved caspase 3 Asp175	Cell Signaling	9664
caspase 3	Gene Tex	GTX11-543
p-cMyc Ser62	Bio Academia	71-161
cMyc	Santa Cruz	sc-764
p-CREB Ser133	Cell Signaling	9198
p-E2F1 Ser364	MBL	D246-3
E2F1	Santa Cruz	sc-193
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204	Cell Signaling	9101
ERK1/2	Cell Signaling	9107
FLAG	Sigma	F7425
GFP	Santa Cruz	sc-9996
p-GSK3 β Ser9	Cell Signaling	D85E12
GSK3 β	Santa Cruz	sc-9166
GST	ABGent	9AT106
His	Gene Tex	GTX115044
p-MEK1/2 Ser217/Ser221	Cell Signaling	9154
MEK1/2	Cell Signaling	4694
p-NDRG1 Thr346	Cell Signaling	5482
p-NF- κ B p65 Ser536	Cell Signaling	3033
NF- κ B p65	Santa Cruz	sc-372
p-PDK1 Ser241	Cell Signaling	3438
PDK1	Cell Signaling	3062
p-p70S6K Thr389	Cell Signaling	9234

p70S6K	Santa Cruz	sc-230
PP2Ac	Millipore	07-324
SET	Santa Cruz	sc-5655
SET	Santa Cruz	sc-133138
p97/VCP	Gene Tex	GTX113030

表2 使用薬物

使用薬物	購入/供給元
Perphenazine	SIGMA
Okadaic acid	LC Laboratories
Tautomycin	Wako
Cyclosporine A	Wako
Sanguinarine	EXTRASYNTHESE
BCI	Merck Millipore
Akt inhibitor VIII	Santa Cruz
FR180204	SIGMA
U0126	LC Laboratories
FTY720	Cayman Chemical
Cisplatin	Wako
Xanthohumol	Cayman Chemical
KN-93	Wako
JAK3 inhibitor VI	Merck Millipore
W-7	Cayman Chemical
KN-62	Cayman Chemical
CaMK2 inhibitor XII	Calbiochem
CHR6494	Tocris Bioscience
KN-92	R&D SYSTEMS

引用文献

1. Aburai, N., Yoshida, M., Ohnishi, M. and Kimura, K. 2010. Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 548–552.
2. Adams, J. M. and Cory, S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 61–66.
3. Aksamitiene, E., Kiyatkin, A. and Kholodenko, B. N. 2012. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem. Soc. Trans.* **40**: 139–146.
4. Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. and Cohen, P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol. CB.* **7**: 261–269.
5. Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J. and Cowley, S. 1994. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* **13**: 1610–1619.
6. Amick, G. D., Reddy, S. A. and Damuni, Z. 1992. Protein phosphatase 2A is a specific protamine-kinase-inactivating phosphatase. *Biochem. J.* **287**: 1019–1022.
7. Arroyo, J. D. and Hahn, W. C. 2005. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene.* **24**: 7746–7755.
8. Balmanno, K. and Cook, S. J. 2008. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.* **16**: 368–377.
9. Baril, C., Sahmi, M., Ashton-Beaucage, D., Stronach, B. and Therrien, M. 2009.

The PP2C Alphabet is a negative regulator of stress-activated protein kinase signaling in *Drosophila*. *Genetics*. **181**: 567–579.

10. Barroga, E. F., Kadosawa, T., Okumura, M. and Fujinaga, T. 1999. Establishment and characterization of the growth and pulmonary metastasis of a highly lung metastasizing cell line from canine osteosarcoma in nude mice. *J. Vet. Med. Sci.* **61**: 361–367.
11. Beaulieu, J.-M., Espinoza, S. and Gainetdinov, R. R. 2015. Dopamine receptors – IUPHAR Review 13. *Br. J. Pharmacol.* **172**: 1–23.
12. Bhaskar, P. T. and Hay, N. 2007. The two TORCs and Akt. *Dev. Cell.* **12**: 487–502.
13. Bhattacharjee, A., Mulya, A., Pal, S., Roy, B., Feldman, G. M. and Cathcart, M. K. Monocyte 15-Lipoxygenase Gene Expression Requires ERK1/2 MAPK Activity. <http://www.jimmunol.org>.
14. Bozzi, Y. and Borrelli, E. 2013. The role of dopamine signaling in epileptogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **7**: 157.
15. Braesch-Andersen, S., Paulie, S. and Stamenkovic, I. 1992. Dopamine-induced lymphoma cell death by inhibition of hormone release. *Scand. J. Immunol.* **36**: 547–553.
16. Brander, D. M., Friedman, D. R., Volkheimer, A. D., Christensen, D. J., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Guadalupe, E., Chen, Y., Zhang, D., Wang, X., Davis, C., Owzar, K. and Weinberg, J. B. 2019. SET alpha and SET beta mRNA isoforms in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **184**: 605–615.
17. Brautigam, D. L. 2012. Protein Ser/Thr Phosphatases : The Ugly Ducklings of Cell Signaling. *FEBS J.*

18. Bresin, A., Cristofaletti, C., Caprini, E., Cantonetti, M., Monopoli, A., Russo, G. and Narducci, M. G. 2019. Preclinical Evidence for Targeting PI3K/mTOR Signaling with Dual-Inhibitors as a New Therapeutic Strategy against Cutaneous T Cell Lymphoma. *J. Invest. Dermatol.*
19. Breuer, R., Becker, M. S., Brechmann, M., Mock, T., Arnold, R. and Krammer, P. H. 2014. The protein phosphatase 2A regulatory subunit B56 γ mediates suppression of T cell receptor (TCR)-induced nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity. *J. Biol. Chem.* **289**: 14996–15004.
20. Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S. and Burtin, P. 2010. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**: 883–897.
21. Broadhead, M. L., Clark, J. C. M., Myers, D. E., Dass, C. R. and Choong, P. F. M. 2011. The Molecular Pathogenesis of Osteosarcoma: A Review. *Sarcoma.* **2011**:
22. Brugge, J., Hung, M.-C. and Mills, G. B. 2007. A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell.* **12**: 104–107.
23. Cai, Q., Huang, H., Qian, D., Chen, K., Luo, J., Tian, Y., Lin, T. and Lin, T. 2013. 13-methyltetradecanoic acid exhibits anti-tumor activity on T-cell lymphomas in vitro and in vivo by down-regulating p-AKT and activating caspase-3. *PloS One.* **8**: e65308.
24. Camm, J., Hla, T., Bakshi, R. and Brinkmann, V. 2014. Cardiac and vascular effects of fingolimod: mechanistic basis and clinical implications. *Am. Heart J.* **168**: 632–644.
25. Casamayor, A., Morrice, N. A. and Alessi, D. R. 1999. Phosphorylation of Ser-241

- is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1:
identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem. J.* **342**: 287–292.
26. Chen, L., Luo, L.-F., Lu, J., Li, L., Liu, Y.-F., Wang, J., Liu, H., Song, H., Jiang, H., Chen, S.-J., Luo, C. and Li, K. K. 2014. FTY720 induces apoptosis of M2 subtype acute myeloid leukemia cells by targeting sphingolipid metabolism and increasing endogenous ceramide levels. *PLoS One.* **9**: e103033.
27. Chen, W., Possemato, R., Campbell, K. T., Plattner, C. A., Pallas, D. C. and Hahn, W. C. 2004. Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell.* **5**: 127–136.
28. Cho, U. S. and Xu, W. 2007. Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature.* **445**: 53–57.
29. Christensen, D. J., Chen, Y., Oddo, J., Matta, K. M., Neil, J., Davis, E. D., Volkheimer, A. D., Lanasa, M. C., Friedman, D. R., Goodman, B. K., Gockerman, J. P., Diehl, L. F., de Castro, C. M., Moore, J. O., Vitek, M. P. and Weinberg, J. B. 2011. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood.* **118**: 4150–4158.
30. Christensen, D. J., Chen, Y., Oddo, J., Matta, K. M., Neil, J., Davis, E. D., Volkheimer, A. D., Lanasa, M. C., Friedman, D. R., Goodman, B. K., Gockerman, J. P., Diehl, L. F., de Castro, C. M., Moore, J. O., Vitek, M. P. and Weinberg, J. B. 2011. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood.* **118**: 4150–4158.
31. Christensen, D. J., Ohkubo, N., Oddo, J., Van Kanegan, M. J., Neil, J., Li, F.,

- Colton, C. A. and Vitek, M. P. 2011. Apolipoprotein E and peptide mimetics modulate inflammation by binding the SET protein and activating protein phosphatase 2A. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. **186**: 2535–2542.
32. Chun, J. and Hartung, H.-P. 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* **33**: 91–101.
33. Cristóbal, I., Caramés, C., Rincón, R., Manso, R., Madoz-Gúrpide, J., Torrejón, B., González-Alonso, P., Rojo, F. and García-Foncillas, J. 2017. Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. **8**: 40169–40180.
34. Cristóbal, I., Rincón, R., Manso, R., Caramés, C., Zazo, S., Madoz-Gúrpide, J., Rojo, F. and García-Foncillas, J. 2015. Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**: 347–356.
35. Dasari, S. and Tchounwou, P. B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **0**: 364–378.
36. De Palma, R. M., Parnham, S. R., Li, Y., Oaks, J. J., Peterson, Y. K., Szulc, Z. M., Roth, B. M., Xing, Y. and Ogretmen, B. 2019. The NMR-based characterization of the FTY720-SET complex reveals an alternative mechanism for the attenuation of the inhibitory SET-PP2A interaction. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **33**: 7647–7666.
37. Dedinszki, D., Kiss, A., Márkász, L., Márton, A., Tóth, E., Székely, L. and Erdódi, F. 2015. Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A decreases the

- chemosensitivity of leukemic cells to chemotherapeutic drugs. *Cell. Signal.* **27**: 363–372.
38. van Delft, M. F., Wei, A. H., Mason, K. D., Vandenberg, C. J., Chen, L., Czabotar, P. E., Willis, S. N., Scott, C. L., Day, C. L., Cory, S., Adams, J. M., Roberts, A. W. and Huang, D. C. S. 2006. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell.* **10**: 389–99.
39. Deliconstantinos, G. and Tsakiris, S. 1985. Differential effect of anionic and cationic drugs on the synaptosome-associated acetylcholinesterase activity of dog brain. *Biochem. J.* **229**: 81–86.
40. Eichhorn, P. J. A., Creighton, M. P. and Bernardis, R. 2009. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer.* **1795**: 1–15.
41. Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**: 495–516.
42. Enjoji, S., Yabe, R., Fujiwara, N., Tsuji, S., Vitek, M. P., Mizuno, T., Nakagawa, T., Usui, T., Ohama, T. and Sato, K. 2015. The therapeutic effects of SET/I2PP2A inhibitors on canine melanoma. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.*
43. Enjoji, S., Yabe, R., Tsuji, S., Yoshimura, K., Kawasaki, H., Sakurai, M., Sakai, Y., Takenouchi, H., Yoshino, S., Hazama, S., Nagano, H., Oshima, H., Oshima, M., Vitek, M. P., Matsuura, T., Hippo, Y., Usui, T., Ohama, T. and Sato, K. 2018. Stemness Is Enhanced in Gastric Cancer by a SET/PP2A/E2F1 Axis. *Mol. Cancer Res. MCR.* **16**: 554–563.
44. Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. and Lieberman, J. 2003. Tumor

- suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. **112**: 659–672.
45. Farrell, A. S., Allen-Petersen, B., Daniel, C. J., Wang, X., Wang, Z., Rodriguez, S., Impey, S., Oddo, J., Vitek, M. P., Lopez, C., Christensen, D. J., Sheppard, B. and Sears, R. C. 2014. Targeting inhibitors of the tumor suppressor PP2A for the treatment of pancreatic cancer. *Mol. Cancer Res. MCR*. **12**: 924–939.
46. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. and Alnemri, E. S. 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J. Biol. Chem*. **269**: 30761–30764.
47. Fernández, J. J., Candenás, M. L., Souto, M. L., Trujillo, M. M. and Norte, M. 2002. Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr. Med. Chem*. **9**: 229–262.
48. Flegg, C. P., Sharma, M., Medina-Palazon, C., Jamieson, C., Galea, M., Brocardo, M. G., Mills, K. and Henderson, B. R. 2010. Nuclear Export and Centrosome Targeting of the Protein Phosphatase 2A Subunit B56 α . *J. Biol. Chem*. **285**: 18144–18154.
49. Fujiwara, N., Kawasaki, H., Yabe, R., Christensen, D. J., Vitek, M. P., Mizuno, T., Sato, K. and Ohama, T. 2013. A potential therapeutic application of SET/I2PP2A inhibitor OP449 for canine T-cell lymphoma. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci*. **75**: 349–354.
50. Galoian, K., Temple, H. T. and Galoyan, A. 2012. mTORC1 inhibition and ECM-cell adhesion-independent drug resistance via PI3K-AKT and

- PI3K-RAS-MAPK feedback loops. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **33**: 885–890.
51. García-Martínez, J. M. and Alessi, D. R. 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem. J.* **416**: 375–385.
52. Gebauer, F., Wicklein, D., Tachezy, M., Grob, T., Steinemann, D., Manukjan, G., Göhring, G., Schlegelberger, B., Maar, H., Izbicki, J. R., Bockhorn, M. and Schumacher, U. 2016. Establishment and Characterization of a Pair of Patient-derived Human Non-small Cell Lung Cancer Cell Lines from a Primary Tumor and Corresponding Lymph Node Metastasis. *Anticancer Res.* **36**: 1507–1518.
53. Guijarro, M. V., Ghivizzani, S. C. and Gibbs, C. P. 2014. Animal Models in Osteosarcoma. *Front. Oncol.* **4**:
54. Gunes, A., Scordo, M. G., Jaanson, P. and Dahl, M.-L. 2007. Serotonin and dopamine receptor gene polymorphisms and the risk of extrapyramidal side effects in perphenazine-treated schizophrenic patients. *Psychopharmacology (Berl.)*. **190**: 479–484.
55. Gutierrez, A., Pan, L., Groen, R. W. J., Baleyrier, F., Kentsis, A., Marineau, J., Grebliunaite, R., Kozakewich, E., Reed, C., Pflumio, F., Poglio, S., Uzan, B., Clemons, P., VerPlank, L., An, F., Burbank, J., Norton, S., Tolliday, N., Steen, H., Weng, A. P., Yuan, H., Bradner, J. E., Mitsiades, C., Look, A. T. and Aster, J. C. 2014. Phenothiazines induce PP2A-mediated apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* **124**: 644–655.
56. Haesen, D., Abbasi Asbagh, L., Derua, R., Hubert, A., Schrauwen, S., Hoorne, Y.,

- Amant, F., Waelkens, E., Sablina, A. and Janssens, V. 2016. Recurrent PPP2R1A Mutations in Uterine Cancer Act through a Dominant-Negative Mechanism to Promote Malignant Cell Growth. *Cancer Res.* **76**: 5719–5731.
57. Hahn, W. C., Dessain, S. K., Brooks, M. W., King, J. E., Elenbaas, B., Sabatini, D. M., DeCaprio, J. A. and Weinberg, R. A. 2002. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 2111–2123.
58. Haines, K. and Huang, G. S. 2019. Precision Therapy for Aggressive Endometrial Cancer by Reactivation of Protein Phosphatase 2A. *Cancer Res.* **79**: 4009–4010.
59. Hartung, B., Sampson, S. and Leucht, S. 2015. Perphenazine for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* **3**: CD003443.
60. Henao, J. P., Peperzak, K. A., Lichvar, A. B., Orebaugh, S. L., Skledar, S. J., Pippi, M. A. and Williams, B. A. 2014. Extrapyrimal Symptoms Following Administration of Oral Perphenazine 4 or 8 mg An 11-Year Retrospective Analysis. *Eur. J. Anaesthesiol.* **31**: 231–235.
61. Henderson, M. C., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L. and Buhler, D. R. 2000. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **30**: 235–251.
62. Hino, H., Takaki, K. and Mochida, S. 2015. Inhibitor-1 and -2 of PP2A have preference between PP2A complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **467**: 297–302.
63. Ho, W. SC., Sizardkhani, S., Hao, S., Song, H., Seldomridge, A., Tandle, A., Maric, D., Kramp, T., Lu, R., Heiss, J. D., Camphausen, K., Gilbert, M. R., Zhuang, Z. and Park, D. M. 2018. LB-100, a novel Protein Phosphatase 2A (PP2A)

- Inhibitor, Sensitizes Malignant Meningioma Cells to the Therapeutic Effects of Radiation. *Cancer Lett.* **415**: 217–226.
64. Hu, X.-D., Liu, Y.-N., Zhang, Z.-Y., Ma, Z.-A., Suo, Z.-W. and Yang, X. 2015. Spinophilin-Targeted Protein Phosphatase-1 Alleviated Inflammatory Pain by Negative Control of MEK/ERK Signaling in Spinal Cord Dorsal Horn of Rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **35**: 13989–14001.
65. Hu, X., Garcia, C., Fazli, L., Gleave, M., Vitek, M. P., Jansen, M., Christensen, D. and Mulholland, D. J. 2015. Inhibition of Pten deficient Castration Resistant Prostate Cancer by Targeting of the SET - PP2A Signaling axis. *Sci. Rep.* **5**: 15182.
66. Huang, Y.-H., Chu, P.-Y., Chen, J.-L., Huang, C.-T., Lee, C.-H., Lau, K.-Y., Wang, W.-L., Wang, Y.-L., Lien, P.-J., Tseng, L.-M., Liu, C.-Y., Huang, Y.-H., Chu, P.-Y., Chen, J.-L., Huang, C.-T., Lee, C.-H., Lau, K.-Y., Wang, W.-L., Wang, Y.-L., Lien, P.-J., Tseng, L.-M. and Liu, C.-Y. 2018. SET Overexpression is Associated with Worse Recurrence-Free Survival in Patients with Primary Breast Cancer Receiving Adjuvant Tamoxifen Treatment. *J. Clin. Med.* **7**: 245.
67. Ito, A., Koma, Y., Sohda, M., Watabe, K., Nagano, T., Misumi, Y., Nojima, H. and Kitamura, Y. 2003. Localization of the PP2A B56gamma regulatory subunit at the Golgi complex: possible role in vesicle transport and migration. *Am. J. Pathol.* **162**: 479–489.
68. Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J. and Su, B. 2006. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell.* **127**: 125–137.
69. Janghorban, M., Farrell, A. S., Allen-Petersen, B. L., Pelz, C., Daniel, C. J., Oddo,

- J., Langer, E. M., Christensen, D. J. and Sears, R. C. 2014. Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 9157–9162.
70. Janssens, V. and Goris, J. 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* **353**: 417–39.
71. Jiang, C.-H., Sun, T.-L., Xiang, D.-X., Wei, S.-S. and Li, W.-Q. 2018. Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid From Hops (*Humulus lupulus* L.). *Front. Pharmacol.* **9**:
72. Kake, S., Tsuji, S., Enjoji, S., Hanasaki, S., Hayase, H., Yabe, R., Tanaka, Y., Nakagawa, T., Liu, H.-P., Chang, S.-C., Usui, T., Ohama, T. and Sato, K. 2017. The role of SET/I2PP2A in canine mammary tumors. *Sci. Rep.* **7**: 4279.
73. Kastrinsky, D. B., Sangodkar, J., Zaware, N., Izadmehr, S., Dhawan, N. S., Narla, G. and Ohlmeyer, M. 2015. Reengineered tricyclic anti-cancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **23**: 6528–6534.
74. Kauko, O., Imanishi, S. Y., Kuleskiy, E., Laajala, T. D., Yetukuri, L., Laine, A., Jumppanen, M., Haapaniemi, P., Ruan, L., Yadav, B., Suni, V., Varila, T., Corthals, G., Reimand, J., Wennerberg, K., Aittokallio, T. and Westermarck, J. 2018. Rules for PP2A-controlled phosphosignalling and drug responses. *bioRxiv.* 271841.
75. Kauko, O. and Westermarck, J. 2018. Non-genomic mechanisms of protein phosphatase 2A (PP2A) regulation in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **96**: 157–164.
76. Kawahara, E., Maenaka, S., Shimada, E., Nishimura, Y. and Sakurai, H. 2013. Dynamic regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by protein

- phosphatase 2A regulatory subunit B56 γ 1 in nuclei induces cell migration. *PLoS One*. **8**: e63729.
77. Kawase, H., Okuwaki, M., Miyaji, M., Ohba, R., Handa, H., Ishimi, Y., Fujii-Nakata, T., Kikuchi, A. and Nagata, K. 1996. 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 Devoted Mol. Cell. Mech.* **1**: 1045–1056.
78. Keyse, S. M. 2008. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **27**: 253–261.
79. Kockx, M., Guo, D. L., Traini, M., Gaus, K., Kay, J., Wimmer-Kleikamp, S., Rentero, C., Burnett, J. R., Le Goff, W., Van Eck, M., Stow, J. L., Jessup, W. and Kritharides, L. 2009. Cyclosporin A decreases apolipoprotein E secretion from human macrophages via a protein phosphatase 2B-dependent and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **284**: 24144–24154.
80. Kubota, D., Yoshida, A., Kawai, A. and Kondo, T. 2014. Proteomics identified overexpression of SET oncogene product and possible therapeutic utility of protein phosphatase 2A in alveolar soft part sarcoma. *J. Proteome Res.* **13**: 2250–2261.
81. Lai, D., Chen, M., Su, J., Liu, X., Rothe, K., Hu, K., Forrest, D. L., Eaves, C. J., Morin, G. B. and Jiang, X. 2018. PP2A inhibition sensitizes cancer stem cells to ABL tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL⁺ human leukemia. *Sci. Transl. Med.* **10**.
82. Levine, B. and Yuan, J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* **115**: 2679–2688.

83. Li, F.-Q., Sempowski, G. D., McKenna, S. E., Laskowitz, D. T., Colton, C. A. and Vitek, M. P. 2006. Apolipoprotein E-derived peptides ameliorate clinical disability and inflammatory infiltrates into the spinal cord in a murine model of multiple sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**: 956–965.
84. Li, M., Guo, H. and Damuni, Z. 1995. Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry.* **34**: 1988–1996.
85. Lindern, M. von, Baal, S. van, Wiegant, J., Raap, A., Hagemeyer, A. and Grosveld, G. 1992. 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.* **12**: 3346–3355.
86. Linnet, K. and Wiborg, O. 1996. Steady-state serum concentrations of the neuroleptic perphenazine in relation to CYP2D6 genetic polymorphism. *Clin. Pharmacol. Ther.* **60**: 41–47.
87. Little, A. S., Smith, P. D. and Cook, S. J. 2013. Mechanisms of acquired resistance to ERK1/2 pathway inhibitors. *Oncogene.* **32**: 1207–1215.
88. Liu, H., Gu, Y., Wang, H., Yin, J., Zheng, G., Zhang, Z., Lu, M., Wang, C. and He, Z. 2015. Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* **6**: 14913–14925.
89. Liu, T., Zhou, Y., Ko, K. S. and Yang, H. 2015. Interactions between Myc and Mediators of Inflammation in Chronic Liver Diseases. *Mediators Inflamm.* **2015**: 276850.
90. Lu, J., Kovach, J. S., Johnson, F., Chiang, J., Hodes, R., Lonser, R. and Zhuang, Z.

2009. Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage induced defense mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 11697–11702.
91. McClinch, K., Avelar, R. A., Callejas, D., Izadmehr, S., Wiredja, D., Perl, A., Sangodkar, J., Kastrinsky, D. B., Schlatzer, D., Cooper, M., Kiselar, J., Stachnik, A., Yao, S., Hoon, D., McQuaid, D., Zaware, N., Gong, Y., Brautigan, D. L., Plymate, S. R., Sprenger, C. C. T., Oh, W. K., Levine, A. C., Kirschenbaum, A., Sfakianos, J. P., Sears, R., DiFeo, A., Ioannou, Y., Ohlmeyer, M., Narla, G. and Galsky, M. D. 2018. Small-Molecule Activators of Protein Phosphatase 2A for the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Res.* **78**: 2065–2080.
92. McCright, B., Rivers, A. M., Audlin, S. and Virshup, D. M. 1996. The B56 Family of Protein Phosphatase 2A (PP2A) Regulatory Subunits Encodes Differentiation-induced Phosphoproteins That Target PP2A to Both Nucleus and Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **271**: 22081–22089.
93. McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. WT., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M. and Franklin, R. A. 2007. ROLES OF THE RAF/MEK/ERK PATHWAY IN CELL GROWTH, MALIGNANT TRANSFORMATION AND DRUG RESISTANCE. *Biochim. Biophys. Acta.* **1773**: 1263–1284.
94. Miller, A. V, Hicks, M. a, Nakajima, W., Richardson, A. C., Windle, J. J. and Harada, H. 2013. Paclitaxel-induced apoptosis is BAK-dependent, but BAX and BIM-independent in breast tumor. *PloS One.* **8**: e60685.
95. Miyaji-Yamaguchi, M., Okuwaki, M. and Nagata, K. 1999. Coiled-coil

- structure-mediated dimerization of template activating factor-I is critical for its chromatin remodeling activity¹¹ Edited by T. Richmond. *J. Mol. Biol.* **290**: 547–557.
96. Mody, H. R., Hung, S. W., Naidu, K., Lee, H., Gilbert, C. A., Hoang, T. T., Pathak, R. K., Manoharan, R., Muruganandan, S. and Govindarajan, R. 2017. SET contributes to the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Oncotarget.* **8**: 67966–67979.
97. Molina, G., Vogt, A., Bakan, A., Dai, W., de Oliveira, P. Q., Znosko, W., Smithgall, T. E., Bahar, I., Lazo, J. S., Day, B. W. and Tsang, M. 2009. Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 680–687.
98. Neviani, P., Harb, J. G., Oaks, J. J., Santhanam, R., Walker, C. J., Ellis, J. J., Ferenchak, G., Dorrance, A. M., Paisie, C. A., Eiring, A. M., Ma, Y., Mao, H. C., Zhang, B., Wunderlich, M., May, P. C., Sun, C., Saddoughi, S. A., Bielawski, J., Blum, W., Klisovic, R. B., Solt, J. A., Byrd, J. C., Volinia, S., Cortes, J., Huettner, C. S., Koschmieder, S., Holyoake, T. L., Devine, S., Caligiuri, M. A., Croce, C. M., Garzon, R., Ogretmen, B., Arlinghaus, R. B., Chen, C.-S., Bittman, R., Hokland, P., Roy, D.-C., Milojkovic, D., Apperley, J., Goldman, J. M., Reid, A., Mulloy, J. C., Bhatia, R., Marcucci, G. and Perrotti, D. 2013. PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *J. Clin. Invest.* **123**: 4144–4157.
99. Neviani, P. and Perrotti, D. 2014. SETting OP449 into the PP2A-Activating Drug Family. *Clin. Cancer Res.* **20**: 2026–2028.
100. Neviani, P., Santhanam, R., Trotta, R., Notari, M., Blaser, B. W., Liu, S., Mao, H.,

- Chang, J. S., Galletta, A., Uttam, A., Roy, D. C., Valtieri, M., Bruner-Klisovic, R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., Marcucci, G. and Perrotti, D. 2005. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell*. **8**: 355–368.
101. Niba, E. T. E., Nagaya, H., Kanno, T., Tsuchiya, A., Gotoh, A., Tabata, C., Kuribayashi, K., Nakano, T. and Nishizaki, T. 2013. Crosstalk between PI3 kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK pathways downstream PDGF receptor. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **31**: 905–913.
102. Nishi, A., Kuroiwa, M. and Shuto, T. 2011. Mechanisms for the modulation of dopamine D1 receptor signaling in striatal neurons. *Front. Neuroanat.* **5**: 43.
103. Oaks, J. J., Santhanam, R., Walker, C. J., Roof, S., Harb, J. G., Ferenchak, G., Eisfeld, A.-K., Van Brocklyn, J. R., Briesewitz, R., Saddoughi, S. A., Nagata, K., Bittman, R., Caligiuri, M. A., Abdel-Wahab, O., Levine, R., Arlinghaus, R. B., Quintas-Cardama, A., Goldman, J. M., Apperley, J., Reid, A., Milojkovic, D., Ziolo, M. T., Marcucci, G., Ogretmen, B., Neviani, P. and Perrotti, D. 2013. Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies. *Blood*. **122**: 1923–1934.
104. Oaks, J. and Ogretmen, B. 2014. Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling. *Front. Oncol.* **4**: 388.
105. Omar, H. A., Chou, C.-C., Berman-Booty, L. D., Ma, Y., Hung, J.-H., Wang, D., Kogure, T., Patel, T., Terracciano, L., Muthusamy, N., Byrd, J. C., Kulp, S. K. and

- Chen, C.-S. 2011. Antitumor Effects of OSU-2S, a Non-immunosuppressive Analogue of FTY720, in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol. Baltim. Md.* **53**: 1943–1958.
106. Otálora-Otálora, B. A., Henríquez, B., López-Kleine, L. and Rojas, A. 2019. RUNX family: Oncogenes or tumor suppressors (Review). *Oncol. Rep.* **42**: 3–19.
107. Ozdemir, E., Bagcivan, I. and Gursoy, S. 2013. Role of D1/D2 dopamin receptors antagonist perphenazine in morphine analgesia and tolerance in rats. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **13**: 119–125.
108. Pellicena, P. and Schulman, H. 2014. CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front. Pharmacol.* **5**..
109. Pippa, R., Dominguez, A., Malumbres, R., Endo, A., Arriazu, E., Marcotegui, N., Guruceaga, E. and Odero, M. D. 2017. MYC-dependent recruitment of RUNX1 and GATA2 on the SET oncogene promoter enhances PP2A inactivation in acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* **8**: 53989–54003.
110. Puustinen, P., Junttila, M. R., Vanhatupa, S., Sablina, A. A., Hector, M. E., Teittinen, K., Raheem, O., Ketola, K., Lin, S., Kast, J., Haapasalo, H., Hahn, W. C. and Westermarck, J. 2009. PME-1 protects extracellular signal-regulated kinase pathway activity from protein phosphatase 2A-mediated inactivation in human malignant glioma. *Cancer Res.* **69**: 2870–2877.
111. Querfeld, C., Rizvi, M. A., Kuzel, T. M., Guitart, J., Rademaker, A., Sabharwal, S. S., Krett, N. L. and Rosen, S. T. 2006. The Selective Protein Kinase C β Inhibitor Enzastaurin Induces Apoptosis in Cutaneous T-Cell Lymphoma Cell Lines through the AKT Pathway. *J. Invest. Dermatol.* **126**: 1641–1647.
112. Rangel-Barajas, C., Coronel, I. and Florán, B. 2015. Dopamine Receptors and

- Neurodegeneration. *Aging Dis.* **6**: 349–368.
113. Remmerie, M. and Janssens, V. 2018. Targeted Therapies in Type II Endometrial Cancers: Too Little, but Not Too Late. *Int. J. Mol. Sci.* **19**:
114. Richard, N. P., Pippa, R., Cleary, M. M., Puri, A., Tibbitts, D., Mahmood, S., Christensen, D. J., Jeng, S., McWeeney, S., Look, A. T., Chang, B. H., Tyner, J. W., Vitek, M. P., Odero, M. D., Sears, R. and Agarwal, A. 2016. Combined targeting of SET and tyrosine kinases provides an effective therapeutic approach in human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* **7**: 84214–84227.
115. Rincón, R., Cristóbal, I., Zazo, S., Arpi, O., Menéndez, S., Manso, R., Lluch, A., Eroles, P., Rovira, A., Albanell, J., García-Foncillas, J., Madoz-Gúrpide, J. and Rojo, F. 2015. PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects. *Oncotarget.* **6**: 4299–4314.
116. Ruvolo, P. P. 2016. The broken “Off” switch in cancer signaling: PP2A as a regulator of tumorigenesis, drug resistance, and immune surveillance. *BBA Clin.* **6**: 87–99.
117. Sablina, A. A., Hector, M., Colpaert, N. and Hahn, W. C. 2010. Identification of PP2A complexes and pathways involved in cell transformation. *Cancer Res.* **70**: 10474–10484.
118. Saddoughi, S. A., Gencer, S., Peterson, Y. K., Ward, K. E., Mukhopadhyay, A., Oaks, J., Bielawski, J., Szulc, Z. M., Thomas, R. J., Selvam, S. P., Senkal, C. E., Garrett-Mayer, E., De Palma, R. M., Fedarovich, D., Liu, A., Habib, A. A., Stahelin, R. V., Perrotti, D. and Ogretmen, B. 2013. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation

- of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol. Med.* **5**: 105–121.
119. Saidak, Z., Giacobbi, A.-S., Louandre, C., Sauzay, C., Mammeri, Y. and Galmiche, A. 2017. Mathematical modelling unveils the essential role of cellular phosphatases in the inhibition of RAF-MEK-ERK signalling by sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* **392**: 1–8.
120. Saito, S., Miyaji-Yamaguchi, M., Shimoyama, T. and Nagata, K. 1999. Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**: 471–475.
121. Sakamoto, K. M., Kim, K. B., Verma, R., Ransick, A., Stein, B., Crews, C. M. and Deshaies, R. J. 2003. Development of Proteacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Proteomics MCP.* **2**: 1350–1358.
122. Sangodkar, J., Perl, A., Tohme, R., Kiselar, J., Kastrinsky, D. B., Zaware, N., Izadmehr, S., Mazhar, S., Wiredja, D. D., O'Connor, C. M., Hoon, D., Dhawan, N., S., Schlatzer, D., Yao, S., Leonard, D., Borczuk, A. C., Gokulrangan, G., Wang, L., Svenson, E., Farrington, C. C., Yuan, E., Avelar, R. A., Stachnik, A., Smith, B., Gidwani, V., Giannini, H. M., McQuaid, D., McClinch, K., Wang, Z., Levine, A. C., Sears, R. C., Chen, E. Y., Duan, Q., Datt, M., Haider, S., Ma'ayan, A., DiFeo, A., Sharma, N., Galsky, M. D., Brautigan, D. L., Ioannou, Y. A., Xu, W., Chance, M. R., Ohlmeyer, M. and Narla, G. 2017. Activation of tumor suppressor protein PP2A inhibits KRAS-driven tumor growth. *J. Clin. Invest.* **127**: 2081–2090.
123. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. 2005. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science.* **307**: 1098–1101.
124. Sasazawa, Y., Kanagaki, S., Tashiro, E., Nogawa, T., Muroi, M., Kondoh, Y.,

- Osada, H. and Imoto, M. 2012. Xanthohumol impairs autophagosome maturation through direct inhibition of valosin-containing protein. *ACS Chem. Biol.* **7**: 892–900.
125. Sents, W., Ivanova, E., Lambrecht, C., Haesen, D. and Janssens, V. 2013. The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *FEBS J.* **280**: 644–61.
126. Shlomai, G., Zelenko, Z., Antoniou, I. M., Stasinopoulos, M., Tobin-Hess, A., Vitek, M. P., LeRoith, D. and Gallagher, E. J. 2017. OP449 inhibits breast cancer growth without adverse metabolic effects. *Endocr. Relat. Cancer.* **24**: 519–529.
127. Shu, G., Zhang, L., Jiang, S., Cheng, Z., Wang, G., Huang, X. and Yang, X. 2016. Isolensinine induces dephosphorylation of NF- κ B p65 subunit at Ser536 via a PP2A-dependent mechanism in hepatocellular carcinoma cells: roles of impairing PP2A/I2PP2A interaction. *Oncotarget.* **7**: 40285–40296.
128. Simpson, S., Dunning, M. D., de Brot, S., Grau-Roma, L., Mongan, N. P. and Rutland, C. S. 2017. Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Vet. Scand.* **59**: 71.
129. Singh, K., Chaturvedi, R., Asim, M., Barry, D. P., Lewis, N. D., Vitek, M. P. and Wilson, K. T. 2008. The apolipoprotein E-mimetic peptide COG112 inhibits the inflammatory response to *Citrobacter rodentium* in colonic epithelial cells by preventing NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **283**: 16752–16761.
130. Slupe, A. M., Merrill, R. A. and Strack, S. 2011. Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme Res.* **2011**: 398751.
131. Sobral, L. M., Sousa, L. O., Coletta, R. D., Cabral, H., Greene, L. J., Tajara, E. H.,

- Gutkind, J. S., Curti, C. and Leopoldino, A. M. 2014. Stable SET knockdown in head and neck squamous cell carcinoma promotes cell invasion and the mesenchymal-like phenotype in vitro, as well as necrosis, cisplatin sensitivity and lymph node metastasis in xenograft tumor models. *Mol. Cancer*. **13**: 32.
132. Tabata, N., Ito, M., Tomoda, H. and Omura, S. 1997. Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*. **46**: 683–687.
133. Tian, L., Zhang, X., Haesen, D., Bravo, J., Fominaya, J., Choquet, S., Zini, J. M., Loisel, S., Waelkens, E., Janssens, V. and Rebollo, A. 2017. Identification of PP2A/Set Binding Sites and Design of Interacting Peptides with Potential Clinical Applications. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 1–10.
134. Umesalma, S., Kaemmer, C. A., Kohlmeyer, J. L., Letney, B., Schab, A. M., Reilly, J. A., Sheehy, R. M., Hagen, J., Tiwari, N., Zhan, F., Leidinger, M. R., O'Dorisio, T. M., Dillon, J., Merrill, R. A., Meyerholz, D. K., Perl, A. L., Brown, B. J., Braun, T. A., Scott, A. T., Ginader, T., Taghiyev, A. F., Zamba, G. K., Howe, J. R., Strack, S., Bellizzi, A. M., Narla, G., Darbro, B. W., Quelle, F. W. and Quelle, D. E. 2019. RABL6A inhibits tumor-suppressive PP2A/AKT signaling to drive pancreatic neuroendocrine tumor growth. *J. Clin. Invest.* **130**: 1641–1653.
135. Vaarala, M. H., Väisänen, M.-R. and Ristimäki, A. 2010. CIP2A expression is increased in prostate cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR.* **29**: 136.
136. Valdíglesias, V., Prego-Faraldo, M. V., Pásaro, E., Méndez, J. and Laffon, B. 2013. Okadaic acid: more than a diarrheic toxin. *Mar. Drugs*. **11**: 4328–4349.
137. Van Praag, H. M., Korf, J. and Dols, L. C. 1976. Clozapine versus perphenazine: the value of the biochemical mode of action of neuroleptics in predicting their

- therapeutic activity. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* **129**: 547–555.
138. Ventelä, S., Sittig, E., Mannermaa, L., Mäkelä, J.-A., Kulmala, J., Löyttyniemi, E., Strauss, L., Cárpen, O., Toppari, J., Grénman, R. and Westermarck, J. 2014. CIP2A is an Oct4 target gene involved in head and neck squamous cell cancer oncogenicity and radioresistance. *Oncotarget.* **6**: 144–158.
139. Vicente, C., Arriazu, E., Martínez-Balsalobre, E., Peris, I., Marcotegui, N., García-Ramírez, P., Pippa, R., Rabal, O., Oyarzábal, J., Guruceaga, E., Prósper, F., Mateos, M. C., Cayuela, M. L. and Otero, M. D. 2019. A novel FTY720 analogue targets SET-PP2A interaction and inhibits growth of acute myeloid leukemia cells without inducing cardiac toxicity. *Cancer Lett.*
140. Wandzioch, E., Pusey, M., Werda, A., Bail, S., Bhaskar, A., Nestor, M., Yang, J.-J. and Rice, L. M. 2014. PME-1 modulates protein phosphatase 2A activity to promote the malignant phenotype of endometrial cancer cells. *Cancer Res.* **74**: 4295–4305.
141. Wang, J., Okkeri, J., Pavic, K., Wang, Z., Kauko, O., Halonen, T., Sarek, G., Ojala, P. M., Rao, Z., Xu, W. and Westermarck, J. 2017. Oncoprotein CIP2A is stabilized via interaction with tumor suppressor PP2A/B56. *EMBO Rep.* **18**: 437–450.
142. Wang, S., Xie, W., Wang, D., Peng, Z., Zheng, Y., Liu, N., Dai, W., Wang, Y., Wang, Z., Yang, Y. and Chen, Y. 2015. Discovery of a small molecule targeting SET-PP2A interaction to overcome BCR-ABL T315I mutation of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget.* **6**: 12128–12140.
143. Wlodarchak, N. and Xing, Y. 2016. PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**: 162–184.
144. Wong, M. H., Samal, A. B., Lee, M., Vlach, J., Novikov, N., Niedziela-Majka, A.,

- Feng, J. Y., Koltun, D. O., Brendza, K. M., Kwon, H. J., Schultz, B. E., Sakowicz, R., Saad, J. S. and Papalia, G. A. 2019. The KN-93 Molecule Inhibits Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) Activity by Binding to Ca²⁺/CaM. *J. Mol. Biol.* **431**: 1440–1459.
145. Xiong, Y., Ma, X.-Y., Zhang, Z., Shao, Z.-J., Zhang, Y.-Y. and Zhou, L.-M. 2013. Apoptosis induced by β,β -dimethylacrylshikonin is associated with Bcl-2 and NF- κ B in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol. Lett.* **6**: 1789–1793.
146. Xu, Y., Chen, Y., Zhang, P., Jeffrey, P. D. and Shi, Y. 2008. Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation. *Mol. Cell.* **31**: 873–885.
147. Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J. W., Strack, S., Jeffrey, P. D. and Shi, Y. 2006. Structure of the Protein Phosphatase 2A Holoenzyme. *Cell.* **127**: 1239–1251.
148. Yabe, R., Fujiwara, N., Mizuno, T., Usui, T., Ohama, T. and Sato, K. 2014. Characterization of SET/I2PP2A isoforms in dogs. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* **76**: 1235–1240.
149. Yabe, R., Tsuji, S., Mochida, S., Ikehara, T., Usui, T., Ohama, T. and Sato, K. A stable association with PME-1 may be dispensable for PP2A demethylation – implications for the detection of PP2A methylation and immunoprecipitation. *FEBS Open Bio.* **0**:
150. Yang, J., Nie, J., Ma, X., Wei, Y., Peng, Y. and Wei, X. 2019. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol. Cancer.* **18**: 26.
151. Yu, G., Yan, T., Feng, Y., Liu, X., Xia, Y., Luo, H., Wang, J.-Z. and Wang, X. 2013. Ser9 phosphorylation causes cytoplasmic detention of I2PP2A/SET in

- Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging*. **34**: 1748–1758.
152. Yuan, J. and Kroemer, G. 2010. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev*. **24**: 2592–2602.
153. Zhang, L., Zhou, H., Li, X., Vartuli, R. L., Rowse, M., Xing, Y., Rudra, P., Ghosh, D., Zhao, R. and Ford, H. L. 2018. Eya3 partners with PP2A to induce c-Myc stabilization and tumor progression. *Nat. Commun*. **9**: 1047.
154. Zhang, Q., Xia, Y., Wang, Y., Shentu, Y., Zeng, K., Mahaman, Y. A. R., Huang, F., Wu, M., Ke, D., Wang, Q., Zhang, B., Liu, R., Wang, J.-Z., Ye, K. and Wang, X. 2018. CK2 Phosphorylating I2PP2A/SET Mediates Tau Pathology and Cognitive Impairment. *Front. Mol. Neurosci*. **11**: 146.
155. Zhang, Q. and Claret, F. X. 2012. Phosphatases: the new brakes for cancer development? *Enzyme Res*. **2012**: 659649.
156. Zhang, W., Yang, J., Liu, Y., Chen, X., Yu, T., Jia, J. and Liu, C. 2009. PR55 α , a Regulatory Subunit of PP2A, Specifically Regulates PP2A-mediated β -Catenin Dephosphorylation. *J. Biol. Chem*. **284**: 22649–22656.
157. Zhang, Y., Lin, D.-H., Wang, Z.-J., Jin, Y., Yang, B. and Wang, W.-H. 2008. K restriction inhibits protein phosphatase 2B (PP2B) and suppression of PP2B decreases ROMK channel activity in the CCD. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. **294**: C765-773.
158. Zhao, W., Huang, Y., Liu, Z., Cao, B.-B., Peng, Y.-P. and Qiu, Y.-H. 2013. Dopamine receptors modulate cytotoxicity of natural killer cells via cAMP-PKA-CREB signaling pathway. *PLoS One*. **8**: e65860.
159. Zhou, B., Wang, Z.-X., Zhao, Y., Brautigan, D. L. and Zhang, Z.-Y. 2002. The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein

phosphatases. *J. Biol. Chem.* **277**: 31818–31825.

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 大浜剛准教授、佐藤晃一教授、獣医臨床病理学研究室 水野拓也教授、獣医発生学研究室 加納聖教授、鳥取大学獣医薬理学研究室 太田利男教授、東京農工大学 獣医薬理学研究室 臼井達也特任講師、岡山理科大学獣医学部創薬講座 藤原信行助教に心より厚く感謝の意を表します。

山口大学獣医臨床病理学研究室 水野拓也教授には PMBC、Ema 細胞、UL-1 細胞、HUT78 細胞、Jurkat 細胞、CCRF-CEM 細胞、SKW3 細胞、TALL1 細胞を提供していただきました。東京大学獣医外科学研究室 中川貴之准教授には POS 細胞、HM-POS 細胞を提供していただきました。元・熊本大学大学院先導機構 持田悟特任助教には、リコンビナントタンパク質作製法をご教授いただきました。心より厚く感謝の意を表します。

また、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研究室の大学院の先輩である川崎秀吉先輩、藤原信行先輩、円城寺秀平先輩、矢部滝太郎先輩、同研究室の池田俊太後輩、大山ゆき後輩、幸柳尚規後輩、松本真春後輩、富田耕作後輩、田中慶子技術員に心より感謝いたします。

また私を暖かく見守ってくれた妻・辻明李、辻家の父・辻浩文、母・辻祐子、姉・辻菜々子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。