

学位論文要旨

氏名 幸柳 尚規

題 目：PP2A 阻害タンパク質 SET を標的とした治療戦略実現のための基盤的研究

論文要旨：

Protein phosphatase 2A (PP2A) は、細胞内の主要なタンパク質脱リン酸化酵素であり、様々なタンパク質を基質として脱リン酸化することで、細胞周期の制御やアポトーシス、細胞分化の調節など、細胞内の広範なシグナル伝達を制御する。PP2A の機能異常は、がんや糖尿病、アルツハイマー病に代表される神経変性疾患など様々な疾病の発症に関与している。特に細胞のがん化には PP2A の活性低下が必須であり、PP2A は重要ながん抑制因子であると考えられている。これまでに多くのがんで、内在性 PP2A 阻害タンパク質の発現上昇を原因とした PP2A 活性の低下が報告されている。

SET は、PP2A と直接結合することでその活性を阻害する PP2A 阻害タンパク質としての機能をもつ。SET は PP2A 阻害を介して PI3K/Akt シグナルの活性化や cMyc、E2F1 タンパク質の安定化を引き起こし、がんを悪性化する。そのため SET を標的とし PP2A 活性を回復させる抗がん戦略が注目されている。SET は乳がん、胃がん、膵臓がんなど多くのがん種でタンパク質発現量の増加が報告されている。さらに SET 発現の高さと予後の悪さには正の相関関係があることも報告されているが、SET 発現の制御機構は未解明であり、がん組織において SET 発現が上昇する要因は明らかになっていない。また、当研究室では以前、SET が PP2A 阻害を介して c-Myc や E2F1 タンパク質を安定化することで幹細胞性の維持に寄与することを報告した。多くのがん細胞株で、SET 発現抑制は c-Myc もしくは E2F1 タンパク質発現量を減少させたが、一部の細胞株においては SET 発現抑制が、がん幹細胞性の指標となるコロニー形成能を抑制するにも関わらず、c-Myc および E2F1 のタンパク質発現量に影響を与えなかった。このことから、SET によるがん幹細胞性の維持機構には、c-Myc や E2F1 のタンパク質安定化に依存しない未知の分子機構が存在することが示唆される。そこで本研究では、SET の発現制御機構と、SET ががん幹細胞性の維持に寄与する分子機構を解明することで、SET を標的とした治療戦略実現のための知見を蓄積することを目的とした。

1. 培養細胞密度の上昇により SET タンパク質発現量が増加する

がん組織において、SET タンパク質発現量が増加する分子機構は明らかになっていない。がん組織では正常組織と比べて細胞密度が高まることから、培養中の細胞密度の上昇が SET タンパク質発現量に与える影響を解析したところ、細胞密度の上昇は接着系細胞株の SET タンパク質発現量を増加させた。さらにこの原因は、細胞密度の上昇によりオートファジー依存的な SET タンパク質分解が阻害されることであることが示唆された。また、細胞密度の上昇は SETBP1 の転写を促進した。低細胞密度における SETBP1G870S 過剰発現は SET 発現量を増加させ、高細胞密度における SETBP1 発現抑制は SET 発現量を低下させた。オートファジーの抑制は、SETBP1 発

(別紙様式第3号)

現抑制による SET 発現量の低下を阻害し、SETBP1 がオートファジー依存的な SET 分解に関与することが示唆された。これらの結果から、細胞密度の上昇により SETBP1 の転写が促進され、オートファジー依存的な SET タンパク質分解が抑制されることで SET タンパク質が蓄積する可能性が示された。

2. SET は Akt 活性化を介して mTOR、Bmi-1 シグナルを活性化しがん細胞のコロニー形成能を維持する

ヒト骨肉腫細胞株 HOS では SET 発現抑制がコロニー形成能を抑制するにも関わらず、c-Myc および E2F1 タンパク質発現量に影響を与えない。そこでこの細胞株を用いて、SET による c-Myc や E2F1 のタンパク質安定化に依存しないがん幹細胞性の維持機構の解明を目指した。SET 発現抑制によるシグナル伝達の変化を網羅的に解析したところ、SET は PP2A 阻害を介して Akt/mTORC1/p70S6K、Bmi-1 シグナルを活性化することが示唆された。さらにこれらのシグナルはどちらも、SET による HOS 細胞の幹細胞性維持に関与することが示唆された。Akt は Bmi-1 をリン酸化し安定化することが知られている。HOS 細胞において SET による Akt 活性化は Bmi-1 タンパク質を安定化し、mTOR は Bmi-1 の安定化に関与しないことが認められた。また 8 種類のヒトがん細胞株における解析から、SET による Akt 活性化を介した Bmi-1 安定化において、Myc 活性が重要な要因であることが示唆された。これらの結果から SET による PP2A 阻害を介した Akt 活性化が、mTOR/p70S6K および Bmi-1 シグナル伝達を促進し、コロニー形成能を高め、がん幹細胞性を維持する可能性を示した。

本研究では、SET の発現制御機構、SET のがん幹細胞性維持機構の一端を明らかにした。本研究成果は SET、PP2A に関する新たな知見を提供し、今後 SET を標的とし PP2A 活性を回復させる治療戦略実現に貢献することが期待される。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	幸柳尚規
審査委員	主査： 山口大学・准教授・大濱 剛
	副査： 山口大学・教授・佐藤 晃一
	副査： 鹿児島大学・教授・宇野 泰広
	副査： 山口大学・教授・加納 聖
	副査： 山口大学・教授・水野 拓也
題目	PP2A 阻害タンパク質 SET を標的とした治療戦略実現のための基盤的研究

審査結果の要旨：

タンパク質の可逆的なリン酸化反応は、リン酸化酵素（キナーゼ）と脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）により厳密に制御されており、その制御機構の異常は、がんや神経変性疾患をはじめとした様々な疾患の原因となる。Protein phosphatase 2A (PP2A) は、進化的に保存された主要なセリン・スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素の 1 つである。PP2A は A、B、C の 3 つのサブユニットで構成されるヘテロ 3 量体ホロ酵素である。足場サブユニットとして機能する A サブユニット (PP2A A) に、酵素活性を持つ C サブユニット (PP2Ac) が結合し、AC コア 2 量体を形成する。そこへ、調節 B サブユニットの 1 つが結合し、AC コア 2 量体を基質へとリクルートすることで基質特異的な脱リン酸化が引き起こされる。B サブユニットは、B55、B56、PR72、PR93 の 4 つのファミリーに分類される約 20 種類が存在する。

がんは、獣医療・人医療双方において克服すべき重要な疾患である。イヌとヒトのがんには、分子生物学的にも共通点が多数あり、双方で得られた知見が互いに活用できる可能性が指摘されている。PP2A は重要ながん抑制因子であり、Weinberg 博士の著書「The Biology of Cancer」においても、p53 や Rb などとともに、ヒトの細胞ががん化する上で変化する必要のある 5 つの因子のうちの 1 つとして報告されている。がんにおいて、PP2A 関連遺伝子の変異はまれであり、SE translocation (SET) を始めとした PP2A 阻害タンパク質の発現上昇が、PP2A 活性低下の原因であることが明らかになってきている。SET 発現の上昇は、乳がんや胃がん、慢性骨髄性白血病を始めとして多様ながん種で報告されており、予後不良と相関する。しかし、なぜがん細胞内に SET が蓄積するのか、なぜ SET ががんの悪性化をもたらすのか、といった疑問に対する答えは完全には出ていない。

本学位論文では、SET を標的として PP2A 活性を回復させる創薬への基盤的研究となるこ

(別紙様式第 10 号)

とを目的とし、まず、第 3 章において SET タンパク質の分解機構の解析を行った。タンパク質分解機構には、大きくユビキチン・プロテアソーム系とオートファジーの 2 つが存在する。薬理的・細胞生物学的な解析の結果、SET タンパク質レベルはオートファジーによって制御されていることが明らかになった。SETBP1 は SET に結合するタンパク質であり、一部の血液がんにおいて予後不良の原因になる。細胞密度の上昇や変異による SETBP1 タンパク質レベルの増加が、SET をオートファジー分解から保護することで SET タンパク質の蓄積に寄与していることが明らかになった。第 4 章では、SET ががんの幹細胞性の維持に寄与する分子機構を解析した。これまでに、SET は E2F1 や c-Myc のタンパク質を安定化させることでがん幹細胞性を高めることが明らかになっていた。しかし、骨肉腫細胞株 HOS では、SET 発現抑制が E2F1 および c-Myc タンパク質レベルに影響を与えることなく、幹細胞性が低下する。この分子機構を明らかにするため、RNA-seq による網羅的な解析を行い、SET が PP2A を抑制することで Akt シグナルを活性化し、mTORC1/p70S6K シグナルや Bmi-1 シグナルを促進することが、幹細胞性の上昇に寄与していることを明らかにした。本研究より明らかになった SET によるがん悪性化の分子機構は、将来的な SET/PP2A 軸を標的とした創薬実現に貢献することが期待される。

以上より、本論文は博士（獣医学）の付与に資する内容であると考える。