

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

山口大学大学院共同獣医学研究科

幸柳 尚規

2024 年 9 月

第 1 章 諸言	6
1-1 Protein phosphatase 2A (PP2A) とがん	7
1-2 内因性 PP2A 阻害タンパク質 SET/I2PP2A	8
1-3 研究目的	10
第 2 章 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	11
2-1 背景および目的	12
2-1-1 SET タンパク質発現量の制御機構	12
2-1-2 がん組織で認められる細胞密度の上昇	13
2-1-3 研究目的	14
2-2 実験結果	15
2-2-1 培養細胞密度の上昇ががん細胞株の SET タンパク質発現量に与える影響	15
2-2-2 培養細胞密度の上昇が正常細胞株の SET タンパク質発現量に与える影響	18
2-2-3 細胞密度が SET mRNA 発現に与える影響	20
2-2-4 細胞密度が miR-199b 発現に与える影響	22
2-2-5 細胞密度が SET タンパク質分解に与える影響	24
2-2-6 プロテアソーム阻害が SET タンパク質発現量に与える影響	26
2-2-7 オートファジー阻害が SET タンパク質発現量に与える影響	28
2-2-8 細胞密度が SET タンパク質分解およびオートファジー活性に与える影響	30
2-2-9 細胞密度が SETBP1 発現量に与える影響	33
2-2-10 SETBP1 が細胞密度の上昇による SET 発現量の増加に与える影響	35
2-2-11 SETBP1 がオートファジーによる SET 分解に与える影響	37
2-2-12 細胞密度が SET 切断体発現に与える影響	39

2-3 考察.....	41
2-3-1 細胞密度の上昇とがん.....	41
2-3-2 細胞密度の上昇が SET タンパク質発現上昇を引き起こす分子機構.....	41
2-3-2-1 転写調節による制御.....	41
2-3-2-2 MicroRNA による制御.....	42
2-3-2-3 タンパク質分解系による制御.....	43
2-3-2-4 プロテアーゼによる制御.....	44
2-3-3 総括.....	45

第3章 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.....	47
3-1 背景および目的.....	48
3-1-1 SET による幹細胞性維持の分子機構.....	48
3-1-2 研究目的.....	48
3-2 実験結果.....	50
3-2-1 SET 発現抑制が c-Myc および E2F1 タンパク質の発現量とコロニー形成能に与える影響.....	50
3-2-2 SET 発現抑制がスフェロイド形成能、細胞増殖能に与える影響.....	53
3-2-3 SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響.....	55
3-2-4 SET 発現抑制が mTORC1 シグナルに与える影響.....	57
3-2-5 PP2A 阻害が Akt および p70S6K のリン酸化レベルに与える影響.....	59
3-2-6 Akt、mTOR 阻害が HOS 細胞の幹細胞性に与える影響.....	61
3-2-7 SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下における Akt/mTORC1 シグナルの役割.....	63
3-2-8 DEGs を用いたエンリッチメント解析.....	66

3-2-9	SET 発現抑制が Bmi-1 発現に与える影響	68
3-2-10	プロテアソーム阻害が SET による Bmi-1 安定化に与える影響	70
3-2-11	Akt が Bmi-1 発現量に与える影響	72
3-2-12	mTORC1 が Bmi-1 発現量に与える影響	75
3-2-13	Bmi-1 発現量の変化が Akt 活性に与える影響	77
3-2-14	Bmi-1 発現抑制が HOS 細胞のコロニー形成能に与える影響	79
3-2-15	Bmi-1 が SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下に与える影響	81
3-2-16	骨由来がん細胞株において SET が Bmi-1 発現に与える影響	84
3-2-17	多様ながん細胞株において SET が Bmi-1 発現に与える影響	86
3-2-18	SET 発現抑制による Bmi-1 分解を誘導する要因の解析	91
3-3	考察	94
3-3-1	SET 発現抑制による Akt/mTORC1/p70S6K 活性阻害	94
3-3-2	Bmi-1 のリン酸化とタンパク質分解	94
3-3-3	SET による Bmi-1 安定化と CDKN2A	95
3-3-4	CDKN2A 欠損細胞の幹細胞性維持における Bmi-1 の役割	96
3-3-5	Myc の高活性が SET 発現抑制による Bmi-1 タンパク質分解を引き起こす分子機構	96
3-3-6	総括	97
第 4 章	総合討論	99
4-1	細胞種に依存した SET による幹細胞性維持機構の解明	100
4-2	SET 阻害剤と既存の阻害剤の併用効果	100
4-3	PP2A 活性を標的とした抗がん剤の展望	101
第 5 章	実験材料および実験方法	106

5-1	細胞培養方法	107
5-2	プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製	108
5-2-1	プラスミドの作製	108
5-2-2	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	108
5-2-3	プラスミドのトランスフェクション	109
5-2-4	レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入	109
5-3	タンパク質発現量の定量法	110
5-3-1	タンパク質抽出	110
5-3-2	Western blotting	110
5-4	Real-time PCR 法	111
5-5	Cycloheximide chase assay	113
5-6	コロニー形成試験	113
5-7	スフェロイド形成試験	113
5-8	細胞増殖試験	113
5-9	免疫蛍光染色法	113
5-10	Transcriptome analysis	114
5-11	統計処理	115
5-12	使用抗体および薬物	115

引用文献

謝辞

第1章 諸言

1-1 Protein phosphatase 2A (PP2A) とがん

細胞内のタンパク質は可逆的なリン酸化制御を受けることでその構造を変化させ、活性や細胞内局在、他のタンパク質との相互作用などを調節する。タンパク質のリン酸化の約 98%はセリン・スレオニン残基で起こり、約 400 種のリン酸化酵素 (protein kinase) により制御されている (1, 2)。一方で、セリン・スレオニン残基の脱リン酸化を担う脱リン酸化酵素 (protein phosphatase) は約 40 種存在し、大きく PPP、PPM、Asp phosphatase の 3 つのスーパーファミリーに分けられる (3)。なかでも PPP スーパーファミリーに分類される protein phosphatase (PP) 1、PP5、および type 2A protein phosphatase である PP2A、PP4、PP6 は細胞内のセリン・スレオニン残基の脱リン酸化の大部分を担う。PP2A は、PP1 とあわせて細胞内の脱リン酸化活性の約 90%を占めると言われる主要なタンパク質脱リン酸化酵素である (4)。また、PP2A は進化的に高く保存されており、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している (5)。

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 (5, 6)。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 (7)。PP2A 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、がん細胞の増殖や生存に関与する PI3K/Akt シグナルの活性を抑制することや、転写因子 c-Myc、E2F1 の分解を促進することが報告されている (8-10)。多くのがんで、SE translocation (SET) などの内在性 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 (11)。

1-2 内因性 PP2A 阻害タンパク質 SET/I2PP2A

SET は、急性未分化白血病における染色体の転座によって生じた *SET-CAN* 融合遺伝子の構成因子として同定された (12)。その後、牛の腎臓から単離された PP2A 阻害タンパク質 I2PP2A が SET 遺伝子によりコードされることが示され、SET と I2PP2A が同一のタンパク質であることが明らかになった (13)。SET はユビキタスに発現する多機能タンパク質であり、転写、クロマチンリモデリング、細胞増殖、遊走など細胞の多様なプロセスに関与する (14)。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持ち、PI3K/Akt シグナルの活性化や c-Myc、E2F1 タンパク質の安定化などに関与することでがんの悪性を引き起こす (10, 15, 16)。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 には PP2A 非依存的な機能も存在し、広く研究が進められている。SET はヒストンシャペロンとして、リンカーヒストン H1 の動態を制御するとともに、コアヒストンとも相互作用し、クロマチンリモデリングに関与して転写因子や RNA ポリメラーゼ II と DNA の結合を容易にすることで様々な遺伝子の転写を促進する (17-20)。また、SET は p53 や KLF5 などの転写因子に結合してアセチル化を阻害することで、これらの転写因子が制御する遺伝子の発現を抑制する (21, 22)。さらに、SET は Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac1 と結合することで、細胞の形態や遊走を制御する (23)。

SET は、乳がん、胃がん、膵臓がん、大腸がん、肺がん、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病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 (16, 24-30)。慢性骨髄性白血病において、慢性期に比べて急性転化期で SET 発現量が増加することが認められ、悪性度の高いがんで発現が上昇する傾向がある (25)。当研究室でも SET 発現が高い胃がん患者は予後が悪いことを報告し

ており、SET 発現と予後の悪さには正の相関関係がある (10)。しかし、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 (10)。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幹細胞性を評価する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。このことは、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分子機構が存在することを強く示唆する。

1-3 研究目的

本研究では、がん促進因子である多機能タンパク質 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。

第2章では、がん組織で一般的に認められる細胞密度の上昇が SET 発現量に与える影響とその分子機構を解析した。第3章では、SET によるがん幹細胞性の維持機構について、c-Myc や E2F1 のタンパク質安定化に依存しない第3の分子機構を解明した。

第2章 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

2-1 背景および目的

2-1-1 SET タンパク質発現量の制御機構

様々ながんで SET タンパク質の蓄積が確認されているが、SET タンパク質発現量を制御する詳細な分子機構は未だ解明されていない。生体内のタンパク質発現量はタンパク質合成と分解のバランスによって決定される。タンパク質合成には、mRNA への転写とタンパク質への翻訳が関与する。SET mRNA の転写については、EVI1 や ZFX、Myc/SP1/RUNX1/GATA2 転写因子複合体などが SET の転写を促進することが報告されている (26, 31, 32)。また、microRNA (miR)-199b は、SET mRNA と結合して SET タンパク質の翻訳を抑制することが報告されており (33)、急性骨髄性白血病、大腸がんにおいて、miR-199b 発現と SET タンパク質発現に負の相関関係があることが示されている (26, 34, 35)。タンパク質分解は、主にユビキチン・プロテアソーム系とオートファジーの2つの機構で制御される。SET タンパク質の分解に関しては明らかになっていないことが多いが、近年ユビキチン・プロテアソーム系の関与が報告された (36)。また、急性骨髄性白血病の予後不良因子である SET binding protein 1 (SETBP1) は、SET と結合してプロテアーゼによる切断から保護することで SET タンパク質の安定化に寄与する (37)。

2-1-2 がん組織で認められる細胞密度の上昇

正常組織では、細胞同士の接触により増殖や運動が抑制される接触阻害などを介して (38–40)、組織内の細胞密度が厳密に制御されている。古くから接触阻害機構の崩壊が、がんの発生と進行における重要な過程であることが知られている (39, 41)。接触阻害から解放されたがん細胞は、無秩序に増殖を繰り返してがん組織内の細胞密度を上昇させ、がん細胞の細胞接着関連シグナル伝達の変化や外力による形態変化を引き起こし、がん細胞の増殖、浸潤など悪性化に関与する (41–43)。

2-1-3 研究目的

がん組織において、SET タンパク質が蓄積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、本章では、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明らかにし、その分子機構を解明することを目的とした。

2-2 実験結果

2-2-1 培養細胞密度の上昇ががん細胞株の SET タンパク質発現量に与える影響

がん細胞の無秩序な増殖は、がん組織中の細胞密度の上昇を引き起こす。そこで様々な固形がん細胞株において、細胞密度の上昇が SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。ヒト骨肉腫細胞株 HOS、Saos-2、U2OS、ヒト乳がん細胞株 MCF7、ヒト肺がん細胞株 A549、ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 において、低細胞密度と比較して高細胞密度の細胞で SET タンパク質発現が高いことが認められた (図 1A-F、H)。一方、浮遊系細胞株であるヒト T 細胞リンパ腫細胞株 HUT78 では、細胞密度の上昇は SET 発現に影響を与えなかった (図 1G-H)。

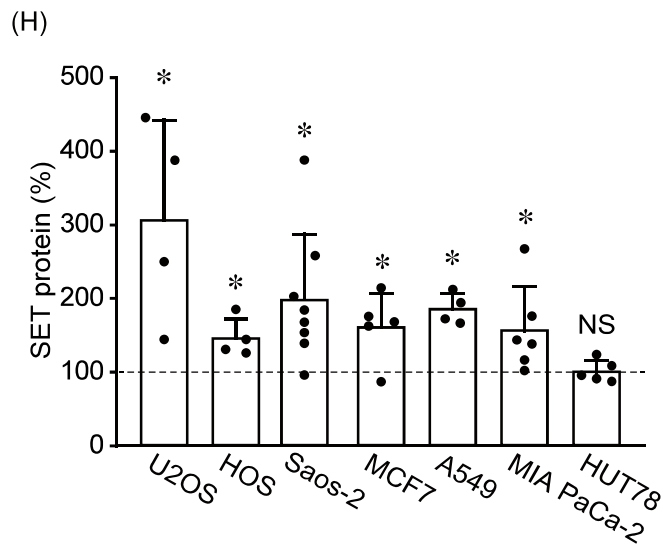
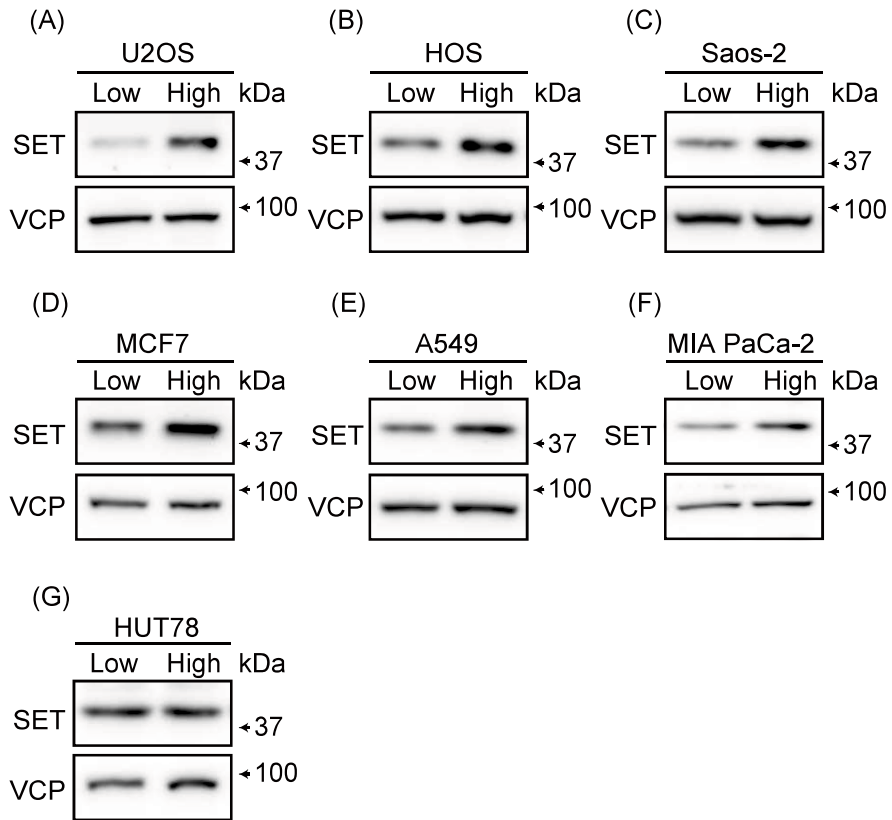


図1 培養細胞密度の上昇ががん細胞株の SET タンパク質発現量に与える影響
(A-G) HOS (A)、Saos-2 (B)、U2OS (C)、MCF7 (D)、A549 (E)、MIA PaCa-2 (F)、HUT78 (G) 細胞を低細胞密度 (Low) と高細胞密度 (High) で培養し、細胞密度が SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真と Low の SET タンパク質発現量を 100%として相対値で表した定量図 (H)。N=4-8。NS : 有意差なし。

2-2-2 培養細胞密度の上昇が正常細胞株の SET タンパク質発現量に与える影響

細胞密度の上昇による SET タンパク質発現量の増加が、がん細胞株特異的な現象であるかを検討するために、ヒト胎児腎臓上皮細胞株 293T、マウス結腸上皮細胞株 aMoC1、イヌ腎臓尿細管上皮細胞株 MDCK、マウス胎児線維芽細胞 MEF において、細胞密度が SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。全ての正常細胞株において、低細胞密度と比較して高細胞密度の細胞で SET タンパク質発現が高いことが認められた (図 2A-E)。以上の結果から、がん細胞株と正常細胞株の区別なく、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ることが示唆された。

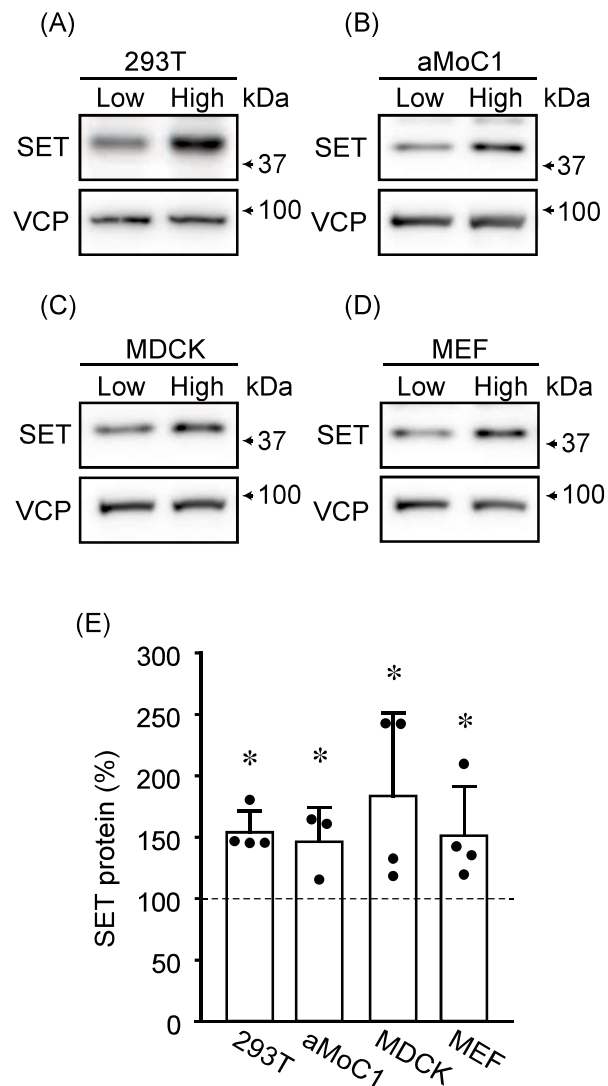


図2 培養細胞密度の上昇が正常細胞株の SET タンパク質発現量に与える影響
 (A-D) 293T (A)、aMoC1 (B)、MDCK (C)、MEF (D) 細胞を Low と High で培養し、細胞密度が SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真と Low の SET タンパク質発現量を 100%として相対値で表した定量図 (E)。N=3-4。*: $P < 0.05$ 。

2-2-3 細胞密度が SET mRNA 発現に与える影響

SET タンパク質発現量が増加する分子機構を解明するため、今後の解析には細胞密度の上昇による SET 発現の変化が最も大きい U2OS 細胞を用いた。タンパク質発現量が増加する要因として、転写の促進、翻訳やタンパク質分解の抑制が挙げられる。細胞密度の上昇が SET mRNA 発現量に与える影響を real-time PCR により解析した。細胞密度の上昇による SET mRNA 発現量の変化は認められなかった (図 3A)。

また、レンチウイルスベクターを用いて A549 細胞に FLAG-SET を安定発現させ、タンパク質発現に対する細胞密度の影響を western blotting により解析した。FLAG-SET は内在性の SET の転写機構とは独立した機構で発現するが、FLAG-SET も内在性の SET と同様に高細胞密度の細胞で発現量が高いことが確認された (図 3B)。以上の結果から、細胞密度の上昇による SET タンパク質発現量の増加には、転写レベルでの制御は関与していないことが示された。

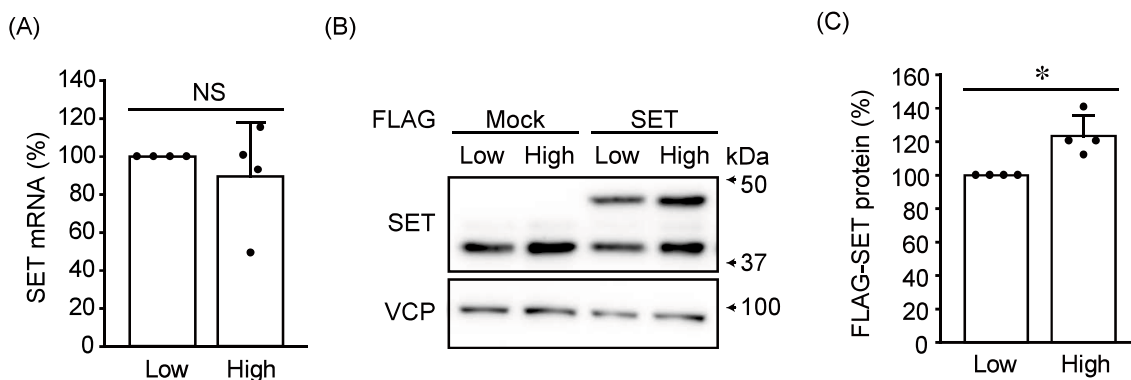


図3 細胞密度が SET mRNA 発現に与える影響

(A) U2OS 細胞を Low と High で培養し、細胞密度が SET mRNA 発現に与える影響を real-time PCR により解析した。Low の SET mRNA 発現量を 100%として相対値で表した定量図。N=4。NS : 有意差なし。(B) FLAG-SET 安定発現 A549 細胞を Low と High で培養し、細胞密度が FLAG-SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真と Low の FLAG-SET 発現量を 100%として相対値で表した定量図 (C)。N=4。*: $P < 0.05$ 。(Low との比較)。

2-2-4 細胞密度が miR-199b 発現に与える影響

mRNA の転写後制御には microRNA (miR) が重要な役割を果たす。MicroRNA は 22 塩基程度の 1 本鎖 RNA であり、mRNA と結合して標的タンパク質の翻訳を抑制する (44)。miR-199b は、SET mRNA と結合して SET タンパク質の翻訳を抑制することが報告されている (33)。そこで細胞密度が miR-199b 発現に与える影響を real-time PCR により解析したが、細胞密度の上昇は、miR-199b 発現量を低下させなかった (図 4)。

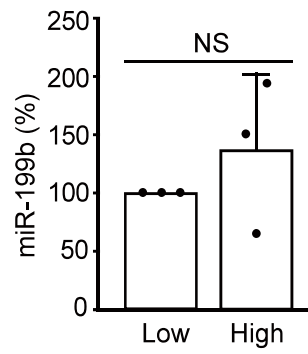


図 4 細胞密度が miR-199b 発現に与える影響

U2OS 細胞を Low と High で培養し、細胞密度が miR-199b 発現に与える影響を real-time PCR により解析した。Low の miR-199b 発現量を 100% として相対値で表した定量図。N=3。NS : 有意差なし。

2-2-5 細胞密度が SET タンパク質分解に与える影響

細胞密度の上昇が SET タンパク質の分解速度に与える影響を、タンパク質合成阻害剤 cycloheximide (CHX) を用いた CHX chase assay により解析した。CHX 処置前と比べて CHX 処置 8 時間では、低細胞密度でのみ SET タンパク質発現量の減少が認められた (図 5A-B)。また、CHX 処置 24 時間では、低細胞密度と比べて高細胞密度で SET タンパク質の残存量が多いことが認められた。したがって、細胞密度の上昇により SET タンパク質の分解速度が低下し、SET タンパク質の蓄積につながることを示唆された。

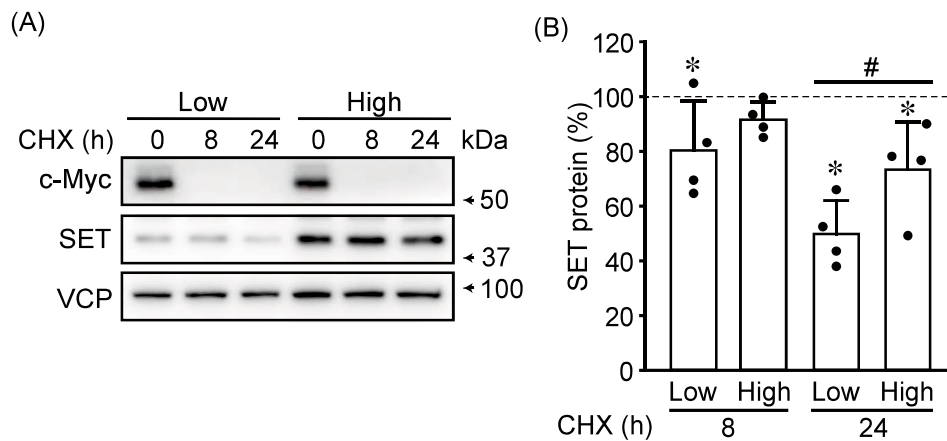


図5 細胞密度がSETタンパク質分解に与える影響

(A-B) Low および High で培養中の U2OS 細胞を cycloheximide (CHX、100 $\mu\text{g/ml}$) で処置し、CHX chase assay を行った。典型的な写真 (A) と各細胞密度の CHX 処置前の SET タンパク質発現量を 100% として相対値で表した定量図 (B)。c-Myc はポジティブコントロールとして用いた。N=4。* : $P < 0.05$ 。(各細胞密度の CHX 処置前との比較)。# : $P < 0.05$ 。(Low/CHX 処置 24 時間との比較)。

2-2-6 プロテアソーム阻害が SET タンパク質発現量に与える影響

タンパク質の分解は、主にユビキチン・プロテアソーム系とオートファジーの2つの機構によって引き起こされる。そこで、SET タンパク質の分解がいずれの経路によって制御されるかを検討した。

はじめに、ユビキチン・プロテアソーム系の SET 分解への関与を明らかにするため、U2OS 細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で処置し、SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。MG132 処置により、SET タンパク質はむしろ減少することが認められた (図 6)。この結果から、SET の分解にユビキチン・プロテアソーム系は関与しないことが示唆された。

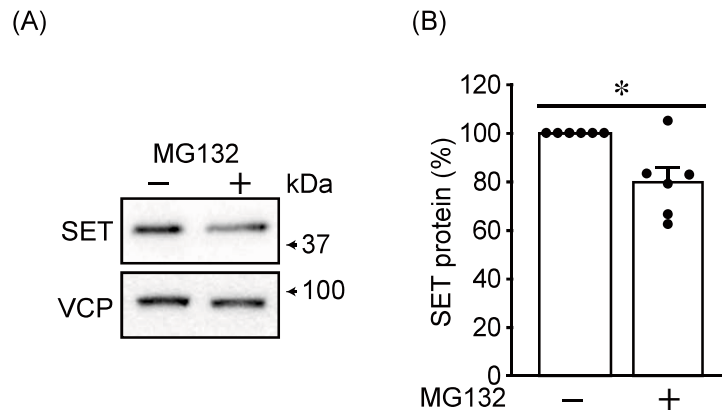


図 6 プロテアソーム阻害が SET タンパク質発現量に与える影響

(A-B) U2OS 細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 (10 μ M、12 時間) で処置し、SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と MG132 非処置の SET タンパク質発現量を 100%として相対値で表した定量図 (B)。N=6。* : $P < 0.05$ 。(MG132 非処置との比較)。

2-2-7 オートファジー阻害が SET タンパク質発現量に与える影響

オートファジーは、タンパク質や細胞内小器官を内包したオートファゴソームと、様々な加水分解酵素を含むリソソームが融合して内容物を分解するタンパク質分解機構である。オートファジーが SET タンパク質分解に関与する可能性を明らかにするため、リソソーム酸性化阻害剤である bafilomycin A1 (Baf) で U2OS 細胞を処置し、オートファジー阻害が SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。Baf 処置により、SET タンパク質発現量が増加することが認められた (図 7A-B)。また、オートファゴソーム形成に必須の因子である Atg7 を欠損した MEF 細胞を用いて、オートファジー不全が SET タンパク質発現量に与える影響を解析した。Atg7 欠損細胞では、野生型細胞と比べて SET タンパク質が蓄積していることが明らかになった (図 7C-D)。以上の結果から、SET タンパク質分解にオートファジーが関与することが示された。

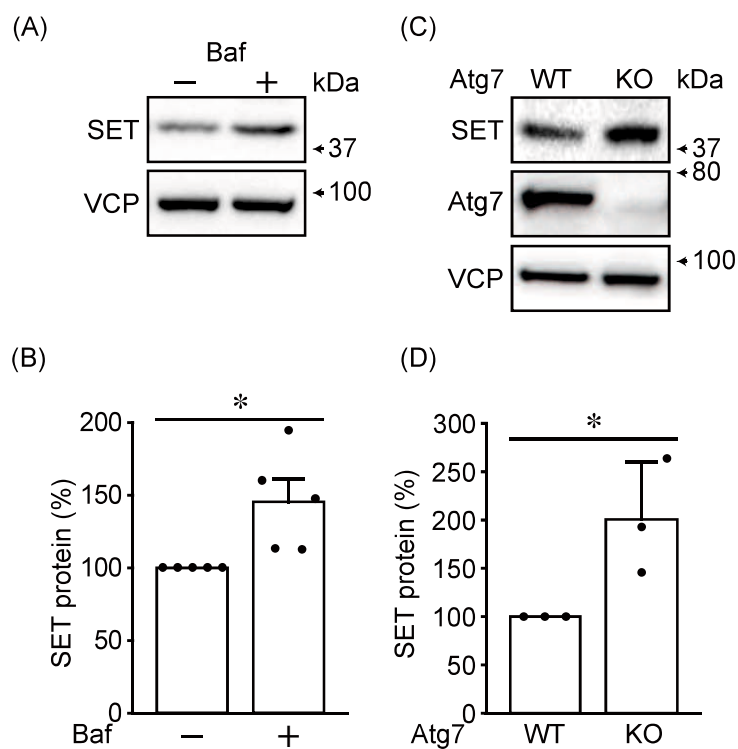


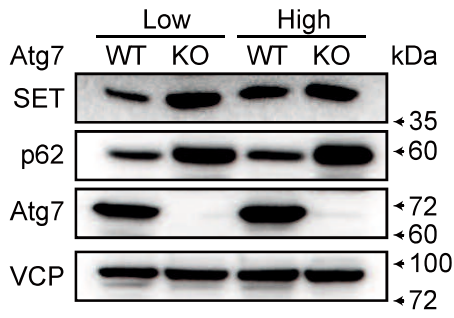
図7 オートファジー阻害がSETタンパク質発現量に与える影響

(A-B) U2OS細胞をリソソーム酸性化阻害剤 bafilomycin A1 (Baf、100 nM、24時間)で処置し、SETタンパク質発現量に与える影響をwestern blottingにより解析した。典型的な写真(A)とBaf非処置のSETタンパク質発現量を100%として相対値で表した定量図(B)。N=5。*: $P < 0.05$ 。(Baf非処置との比較)。(C-D) 野生型(WT)およびAtg7欠損(KO)MEFのSETタンパク質発現量をwestern blottingにより解析した。典型的な写真(C)とWTのSETタンパク質発現量を100%として相対値で表した定量図(D)。N=3。*: $P < 0.05$ 。(Atg7 WTとの比較)。

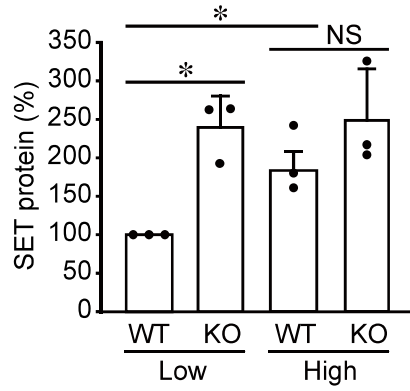
2-2-8 細胞密度が SET タンパク質分解およびオートファジー活性に与える影響

SET タンパク質分解にオートファジーが関与することが示されたことから、細胞密度がオートファジーによる SET 分解に与える影響を western blotting により解析した。低細胞密度で培養した MEF 細胞では、Atg7 欠損により SET タンパク質が蓄積することが認められたが。一方で、高細胞密度で培養した細胞では、Atg7 欠損による SET タンパク質の蓄積が認められなかった (図 8A-B)。また、U2OS 細胞において、Baf 処置は、低細胞密度では SET タンパク質を蓄積させ、高細胞密度では SET タンパク質の蓄積を引き起こさなかった (図 8C-D)。これらのことは、高細胞密度ではオートファジーによる SET タンパク質分解が起きていないことを示唆する。しかし、オートファジー活性の指標である LC3-II/LC3-I 比や p62 タンパク質の蓄積は高細胞密度でも確認され、非選択的オートファジーの活性は細胞密度に影響されないことが明らかになった (図 8C、E-F)。したがって、SET タンパク質の分解には、非選択的なオートファジーではなく選択的オートファジーが関与する可能性が示された。

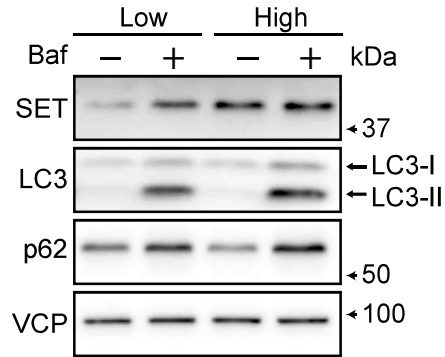
(A)



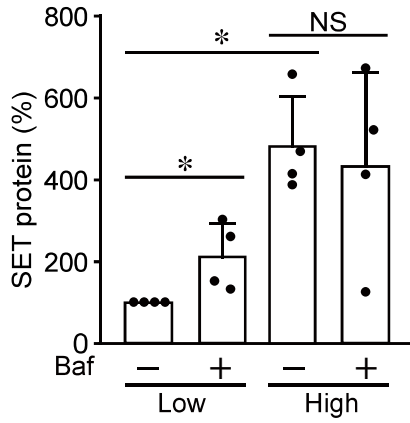
(B)



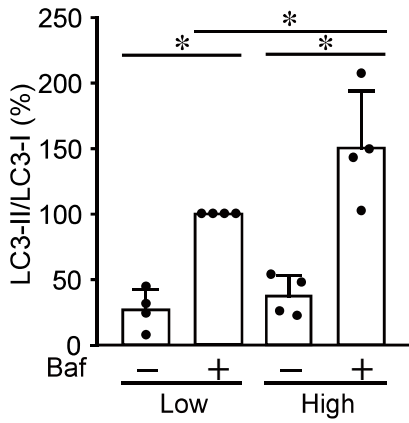
(C)



(D)



(E)



(F)

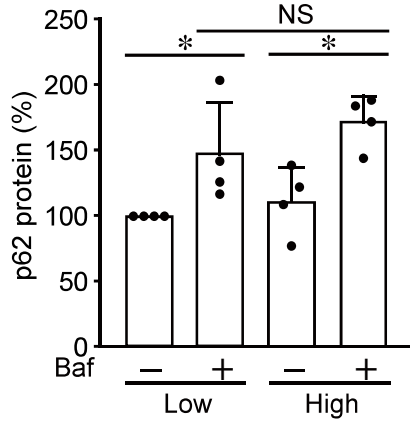


図 8 細胞密度が SET タンパク質分解およびオートファジー活性に与える影響

(A-B) WT および Atg7 KO MEF 細胞を Low および High で培養し、SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と SET (B) の定量図。Low/WT を 100% として相対値で表した。N=3。* : $P < 0.05$ 。NS : 有意差なし。(C-F) Low および High で培養中の U2OS 細胞を Baf (100 nM、24 時間) で処置し、SET タンパク質発現量およびオートファジー活性の指標である LC3-II/LC3-I 比、p62 タンパク質の蓄積に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (C) と SET (D)、LC3 (E)、p62 (F) の定量図。SET および p62 は Low/Baf 非処置を、LC3 は Low/Baf 処置を 100% として相対値で表した。N=4。* : $P < 0.05$ 。NS : 有意差なし。

2-2-9 細胞密度が SETBP1 発現量に与える影響

SET binding protein 1 (SETBP1) は、SET に結合してプロテアーゼによる切断から保護することが報告されている (37)。そこで U2OS 細胞を用いて、細胞密度が SETBP1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により、mRNA 発現量に与える影響を real-time PCR により解析した。高細胞密度では SETBP1 タンパク質および mRNA 発現量が増加することが認められた (図 9A-C)。したがって、細胞密度の上昇は SETBP1 の転写を促進し、SETBP1 タンパク質発現量を増加させることが示唆された。

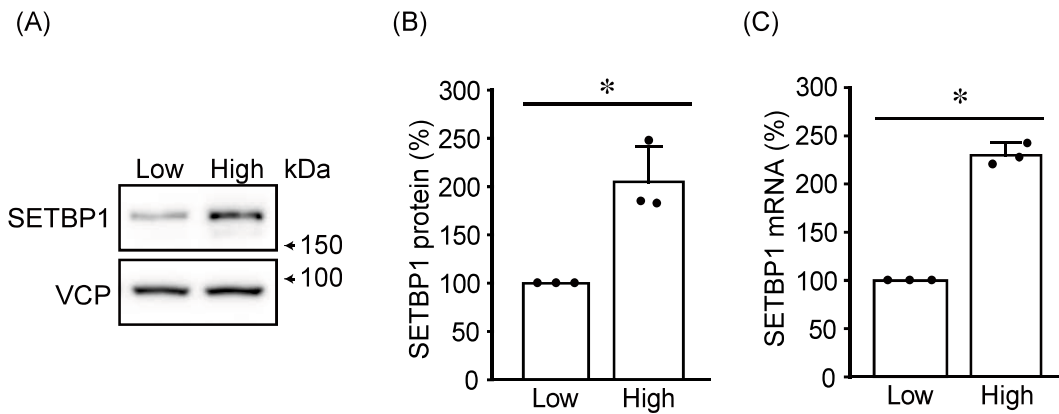


図9 細胞密度が SETBP1 タンパク質発現量に与える影響

U2OS 細胞を Low と High で培養した。(A-B) 細胞密度が SETBP1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と Low の SETBP1 タンパク質発現量を 100%として相対値で表した定量図 (B)。N=3。* : $P < 0.05$ 。(Low との比較)。(C) 細胞密度が SETBP1 mRNA 発現量に与える影響を real-time PCR により解析した。Low の SETBP1 mRNA 発現量を 100%として相対値で表した定量図。N=3。* : $P < 0.05$ 。(Low との比較)。

2-2-10 SETBP1 が細胞密度の上昇による SET 発現量の増加に与える影響

細胞密度の上昇による SETBP1 発現上昇が、SET 発現量の増加に関与するか明らかにするため、SETBP1 発現を抑制した U2OS 細胞を高細胞密度で培養し、SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。SETBP1 発現抑制により、SET 発現量が低下することが認められた (図 10A-B)。様々な血液がんで認められる SETBP1 G870S 変異は、SETBP1 のユビキチンリガーゼ β -TrCP への結合性を低下させることで、SETBP1 タンパク質を安定化する (45)。SETBP1 G870S 変異体を発現させた細胞を低細胞密度で培養し、SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析したところ、SETBP1 G870S 変異体の発現により SET タンパク質が蓄積することが認められた (図 10C-D)。これらの結果から、SETBP1 が細胞密度の上昇による SET タンパク質発現量の増加に関与することが示唆された。

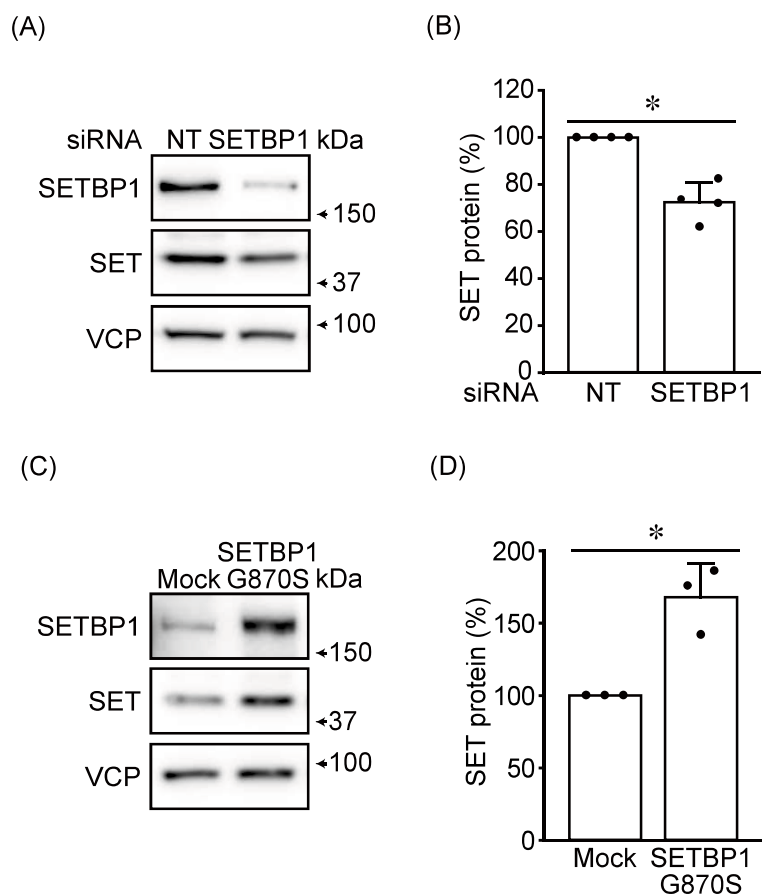


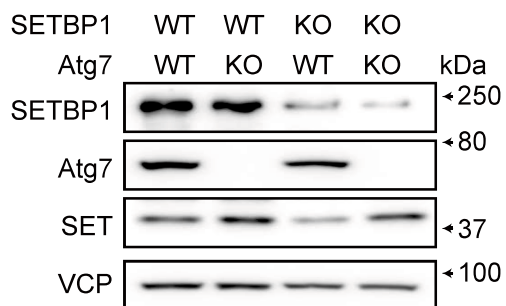
図 10 SETBP1 が細胞密度の上昇による SET 発現量の増加に与える影響

(A-B) non-targeting siRNA (siNT) および SETBP1-targeting siRNA (siSETBP1) を発現させた U2OS 細胞を High で培養し、SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と siNT の SET タンパク質発現量を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=4。* : $P < 0.05$ 。(siNT との比較)。(C-D) Mock および FLAG-SETBP1 G870S を発現させた U2OS 細胞を Low で培養し、SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (C) と Mock の SET タンパク質発現量を 100% として相対値で表した定量図 (D)。N=3。* : $P < 0.05$ 。(Mock との比較)。

2-2-11 SETBP1 がオートファジーによる SET 分解に与える影響

オートファジーによる SET タンパク質分解に SETBP1 が関与するか明らかにするために、Atg7 欠損 MEF で SETBP1 発現を抑制し、SET 発現量に与える影響を western blotting により解析した。SETBP1 発現抑制は、Atg7 欠損 MEF に比べ WT の MEF において、SET 発現量を顕著に低下させることが認められた (図 11A-B)。この結果から、SETBP1 がオートファジーによる SET 分解を阻害することが示唆された。

(A)



(B)

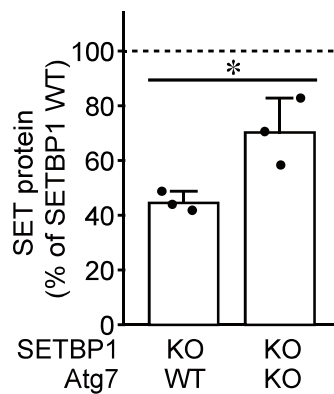


図 11 SETBP1 がオートファジーによる SET 分解に与える影響

(A-B) WT および Atg7 KO MEF で SETBP1 の発現を抑制し、SET タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と SET の定量図 (B)。それぞれの SETBP1 WT を 100% として相対値で表した。N=3。

* : $P < 0.05$ 。(SETBP1KO/Atg7WT との比較)。

2-2-12 細胞密度が SET 切断体発現に与える影響

Asparagine endopeptidase (AEP) は、リソソームの酸性環境下で活性化するプロテアーゼであり、SET タンパク質の切断を引き起こす (46)。SETBP1 は、SET と直接結合することでプロテアーゼによる切断から保護する (37)。Baf はリソソーム酸性化阻害剤であることから、Baf 処置による SET タンパク質の蓄積には、AEP 活性の低下が関与する可能性が考えられる。そこで、低細胞密度および高細胞密度で培養した 293T 細胞の細胞抽出液を酸性条件 (pH 6.0) でインキュベートし、細胞密度が SET 切断に与える影響を western blotting により解析した。SET は酸性条件により約 19、23、26 kDa の断片に切断され、細胞密度はこの切断に影響を与えないことが認められた (図 12)。これらの結果から、細胞密度の上昇による SET タンパク質の蓄積には、AEP による SET 切断は関与しないことが示唆された。

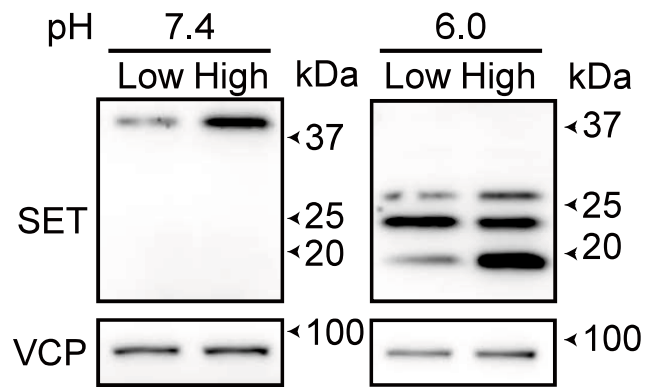


図 12 細胞密度が SET 切断体発現に与える影響

Low および High で培養した 293T 細胞の細胞抽出液を、生理的条件 (pH 7.4) および酸性条件 (pH 6.0) でインキュベート (37°C、1 時間) し、細胞密度が SET の切断に与える影響を western blotting により解析した典型的な写真。

2-3 考察

2-3-1 細胞密度の上昇とがん

我々の身体を形成する細胞の増殖は、様々な機構により厳密に制御されている。その機構の 1 つとして、細胞同士の接触により増殖や運動が抑制される接触阻害がある。接触阻害の報告は、1950 年代に、ニワトリ心臓胚性線維芽細胞が近接した細胞に接触すると運動を停止し、接触前と異なる方向に運動を再開することが観察されたことに遡る (47)。その後、上皮細胞や神経堤細胞においても、接触による運動や細胞増殖の停止が報告され (48, 49)、接触阻害は一般的に認められる機構であることが明らかになった。正常組織では、接触阻害により細胞増殖が制御されることで、細胞密度が保たれる。一方で、多くのがん細胞では接触阻害の機構が崩壊しており、無秩序な増殖とそれにとまなう細胞密度の上昇が引き起こされる。

2-3-2 細胞密度の上昇が SET タンパク質発現上昇を引き起こす分子機構

様々ながん組織で、正常組織と比較して SET 発現量が増加することが報告されているが、その詳細な分子機構は明らかになっていなかった。本研究では、細胞密度の上昇にとまなない SET タンパク質が蓄積することを見出し、がん組織における細胞密度の上昇が SET タンパク質発現量の増加を引き起こす一因である可能性を示した。

2-3-2-1 転写調節による制御

急性骨髄性白血病細胞では、Myc/SP1/RUNX1/GATA2 転写因子複合体が SET 遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を誘導することが報告されている (32)。また、EVI1 や ZFX などの転写因子も SET の転写への関与が指摘されている (26, 31)。当研究室では以前、胃がん自然発症モデルマウス *Gan* マウスにおい

て、非腫瘍部と比べて腫瘍部で、SET mRNA 発現が上昇することを報告しており、生体における腫瘍形成においては、SET の転写レベルでの制御機構も重要な役割を果たすと考えられる (10)。Gan マウスでは PGE₂ 産生の亢進により引き起こされる慢性炎症が、Myc や RUNX1 などの転写因子の活性化を介して SET mRNA 転写を促進し、SET タンパク質発現量の上昇に関与している可能性が考えられる (32, 50)。一方で、本研究では、細胞密度の上昇は SET mRNA 発現に影響を与えなかったことから、転写レベルでの制御機構は関与していないと考えられた。

Gan マウス腫瘍部における SET mRNA 発現上昇量は、SET タンパク質の蓄積量と比較すると軽微であった (10)。したがって、SET タンパク質への翻訳促進やタンパク質の分解抑制も、Gan マウスにおける SET タンパク質の蓄積に寄与すると考えられた。がん組織は正常組織よりも細胞密度が高いことから、Gan マウスの腫瘍部における SET タンパク質の蓄積に、細胞密度の上昇にともなう SET タンパク質の安定化も関与する可能性が考えられる。

2-3-2-2 MicroRNA による制御

MicroRNA (miR) は 22 塩基程度の長さの 1 本鎖 RNA であり、標的タンパク質の mRNA と結合して翻訳を抑制する (44)。miR-199b は、SET mRNA と結合して SET タンパク質の翻訳を抑制する (33)。また、急性骨髄性白血病、大腸がんにおいて、SET タンパク質発現量と miR-199b の発現量に負の相関関係があることが報告されている (26, 34, 35)。本研究では、miR-199b 発現低下による SET mRNA 翻訳の促進が SET タンパク質の蓄積に関与する可能性を検証したが、細胞密度の上昇による miR-199b の発現低下は観察されなかった。したがって、細胞密度の上昇による SET タンパク質発現の蓄積に miR-199b は関与していない

と考えられる。一方、慢性骨髄性白血病患者の造血幹細胞において miR-300 が SET 発現を抑制すること (51)、肺癌細胞株 A549 において miR-21 5p が SET mRNA に結合し、SET α タンパク質発現量を抑制することが報告されており (52)、細胞密度の上昇がこれらの microRNA の発現に影響を与える可能性も検討が必要である。

2-3-2-3 タンパク質分解系による制御

細胞内のタンパク質分解には、主にユビキチン・プロテアソーム系とオートファジーの2つの経路が関与する。本研究では、いずれの機構が SET タンパク質分解に関与しているかを解析した。オートファジー阻害剤 Baf 処置およびオートファゴソーム形成に必須の因子である Atg7 の欠損によって SET タンパク質の蓄積が認められた。これらのことから、SET のタンパク質レベルの制御にオートファジーが関与していることが明らかになった。一方、プロテアソーム阻害剤 MG132 処置はむしろ SET タンパク質を減少させた (図 6A-B)。2つの分解機構にはクロストークが存在し、プロテアソーム阻害がオートファジーを誘導することや、反対にオートファジー阻害がプロテアソーム経路を活性化することが報告されている (53-55)。したがって、MG132 処置による SET タンパク質の減少は、代替的なオートファジー活性化が原因である可能性が考えられる。また、細胞密度の上昇はオートファジー活性に影響を与えない一方で、高細胞密度におけるオートファジー阻害は SET タンパク質の蓄積を起こさなかった。これらのデータは、SET タンパク質分解が選択的オートファジーによって制御されており、細胞密度の上昇により SET 選択的オートファジーが抑制されることで、間接的に SET タンパク質が蓄積する可能性を示す。一方で、Han らは、乳がん細胞株において、E3 ユビキチンリガーゼ TRIM4 が SET をポリユビキチン化し、

プロテアソーム系による分解を誘導することを報告した (36)。本研究結果との矛盾の原因は明らかになっていないが、使用した細胞種の違いが一因である可能性が考えられる。本研究では U2OS 細胞と MEF 細胞を用いてオートファジーの関与を示したが、Han らは、MCF7 細胞、T47D 細胞、293T 細胞を用いている。SET 分解機構の違いを生み出す分子機構に関しては、さらなる解析が必要である。

2-3-2-4 プロテアーゼによる制御

SET は、AEP や granzyme A などのプロテアーゼによる切断を受けることが報告されている (46, 56)。酵母 two-hybrid 法を用いたスクリーニングにより SET と結合するタンパク質として同定された SETBP1 は (57)、SET をプロテアーゼによる切断から保護する (37)。SETBP1 遺伝子は、重度の精神遅滞、顔面中央部の退縮、多発先天奇形を特徴とする Schinzel-Giedion 症候群の原因遺伝子である (58)。Schinzel-Giedion 症候群で認められる SETBP1 の変異は、がん促進因子 SKI 遺伝子との相同領域 (SKI 相同領域) のデグロンに局限しており、変異により SETBP1 のタンパク質安定性が上昇する (58)。興味深いことに、多くの血液がんでも SKI 相同領域に変異が認められ、予後不良に関与している (59)。

本章では、細胞密度の上昇が SETBP1 の転写を促進することでタンパク質発現量を増加させることを見出した。細胞密度の上昇は、低酸素、低栄養、細胞接着関連シグナル伝達の変化や細胞外からの物理的な圧力の上昇による細胞形態の変化など様々な状況を引き起こす。したがって、これらの状態下で活性化する転写因子が、SETBP1 の転写に関与すると考えられ、低酸素応答に関わる HIF1 α 、細胞間接着応答に関わる β -catenin/TCF、細胞密度応答に関わる YAP/TEAD などが (60–62)、SETBP1 の転写を制御する因子の候補となる。また、ヒト遺伝子デ

データベース GeneCards (<https://www.genecards.org/>) には、MEF2 や FOXO4 などの AMP-activated protein kinase (AMPK) の下流に存在する転写因子が、SETBP1 のプロモーター領域に結合する転写因子として上位に掲載されている。AMPK は細胞のエネルギー状態の恒常性の維持に重要な役割を果たしており (63)、低栄養状態で活性化した AMPK が MEF2 や FOXO4 の転写活性を高め、SETBP1 の転写が誘導された可能性が考えられる。

SETBP1 は AEP などのプロテアーゼによる切断から SET を保護することから、増加した SETBP1 が SET の切断を阻害することが、細胞密度の上昇による SET タンパク質の蓄積の原因である可能性が考えられた。しかし、細胞密度の上昇は SET の切断に影響を与えなかったことから、この可能性は否定された。したがって、SETBP1 は、SET が選択的オートファジー分解のプロセスに入ることを阻害することで、SET タンパク質の蓄積に寄与すると考えられる。

2-3-3 総括

本研究から、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 (図 13)。SET のタンパク質分解にオートファジーが関わるという知見は報告されておらず、がん組織において SET タンパク質発現が上昇する分子機構の理解につながる成果である。

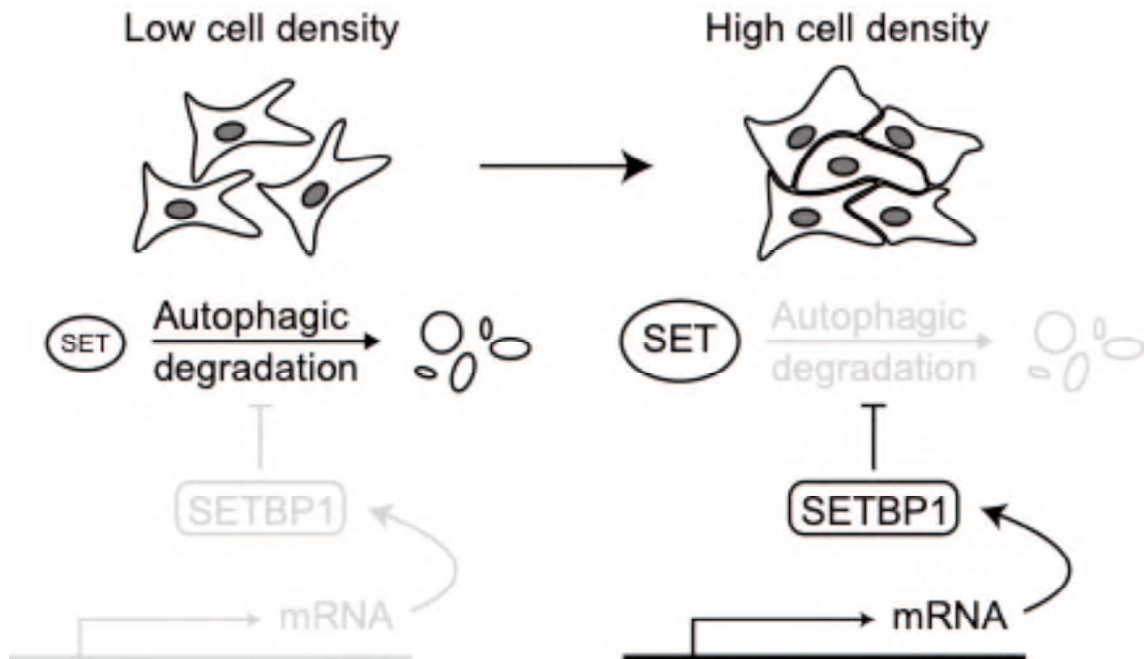


図 13 総括

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。

第3章 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

3-1 背景および目的

3-1-1 SET による幹細胞性維持の分子機構

SET は PP2A 活性を直接阻害し幅広いがん種でがん悪性化を引き起こすが、その詳細な分子機構は明らかにされていない。当研究室では、11 種類のヒトがん細胞株を用いて、SET 発現抑制が全ての細胞株において幹細胞性を評価する指標となるコロニー形成能を低下させ、SET が幹細胞性の維持に寄与していることを報告した (10)。このうちの多くの細胞株で、SET 発現抑制は、c-Myc もしくは E2F1 タンパクの発現を低下させた。一方、ヒト骨肉腫細胞株 HOS とヒト結腸がん細胞株 SW620 では、SET 発現抑制は c-Myc および E2F1 タンパク質発現量に影響を与えないにも関わらず、コロニー形成能を低下させた。したがって、SET による幹細胞性の維持には c-Myc や E2F1 タンパク質の安定化以外の第 3 の分子機構が存在することが示唆された (図 15)。

3-1-2 研究目的

SET によるコロニー形成能の維持には、c-Myc と E2F1 タンパク質の安定化以外の第 3 の分子機構が存在する。そこで、本研究では、この第 3 の分子機構を解明することを目的にした。

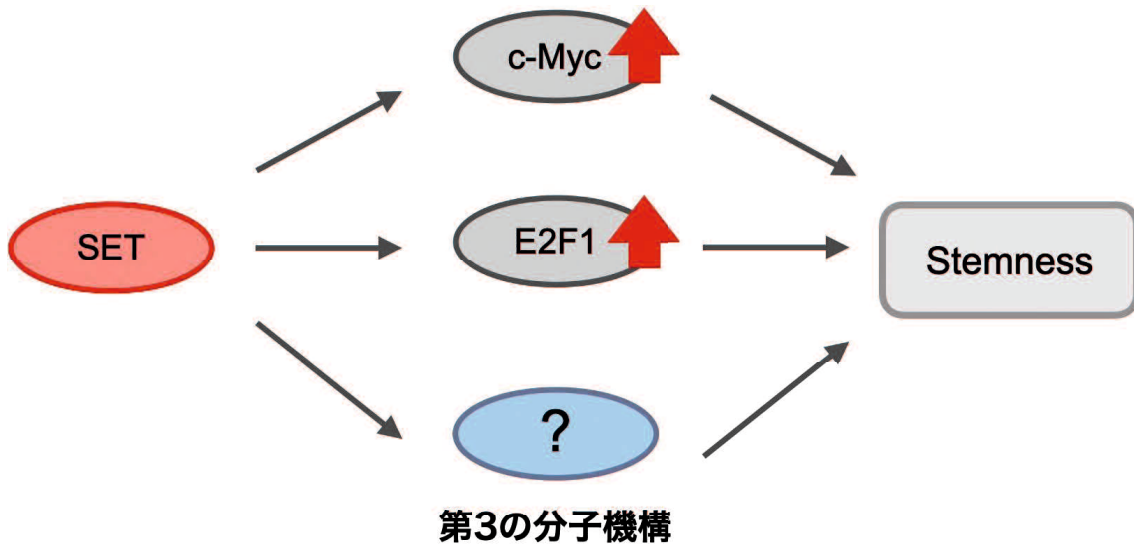


図 14 SET による幹細胞性維持の分子機構

SET は幅広いヒトがん細胞株においてコロニー形成能を高め、幹細胞性の維持に寄与する。多くの細胞株では、SET は c-Myc および E2F1 タンパク質の安定化に寄与する。しかし、ヒト骨肉腫細胞株 HOS やヒト結腸がん細胞株 SW620 では、SET 発現抑制が c-Myc および E2F1 タンパク質発現量に影響を与えずにコロニー形成能を低下させたことから、第 3 の分子機構の存在が示唆された。

3-2 実験結果

3-2-1 SET 発現抑制が c-Myc および E2F1 タンパク質の発現量とコロニー形成能に与える影響

当研究室の過去の報告では、HOS 細胞および SW620 細胞において、SET 発現抑制は、c-Myc および E2F1 タンパク質発現量に影響を与えずにコロニー形成能を低下させた (10)。そこで、SW620 細胞および HOS 細胞において SET targeting shRNA (shSET) を安定的に発現する細胞を作製し、c-Myc および E2F1 タンパク質発現量およびコロニー形成能に与える影響を western blotting、コロニー形成試験により解析した。SW620 細胞では、SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下が確認できたが、過去の報告と異なり、SET 発現抑制により c-Myc 発現量が低下した (図 15A-D)。本研究では、SET 発現量が 90%近く抑制されていたのに対し、過去の報告における SET 発現抑制は約 50%にとどまっていたことが、一因ではないかと考えられる。

一方で、HOS 細胞における SET 発現抑制は、c-Myc および E2F1 タンパク質に影響を与えずにコロニー形成能を低下させた (図 15E-H)。Doxycycline (dox) 誘導性に shSET を発現させた細胞においても、同様の結果が得られた (図 15I-L)。これらの結果から、SET は HOS 細胞において、c-Myc および E2F1 タンパク質の安定化非依存的な分子機構を介してコロニー形成能を高めることが示唆された。

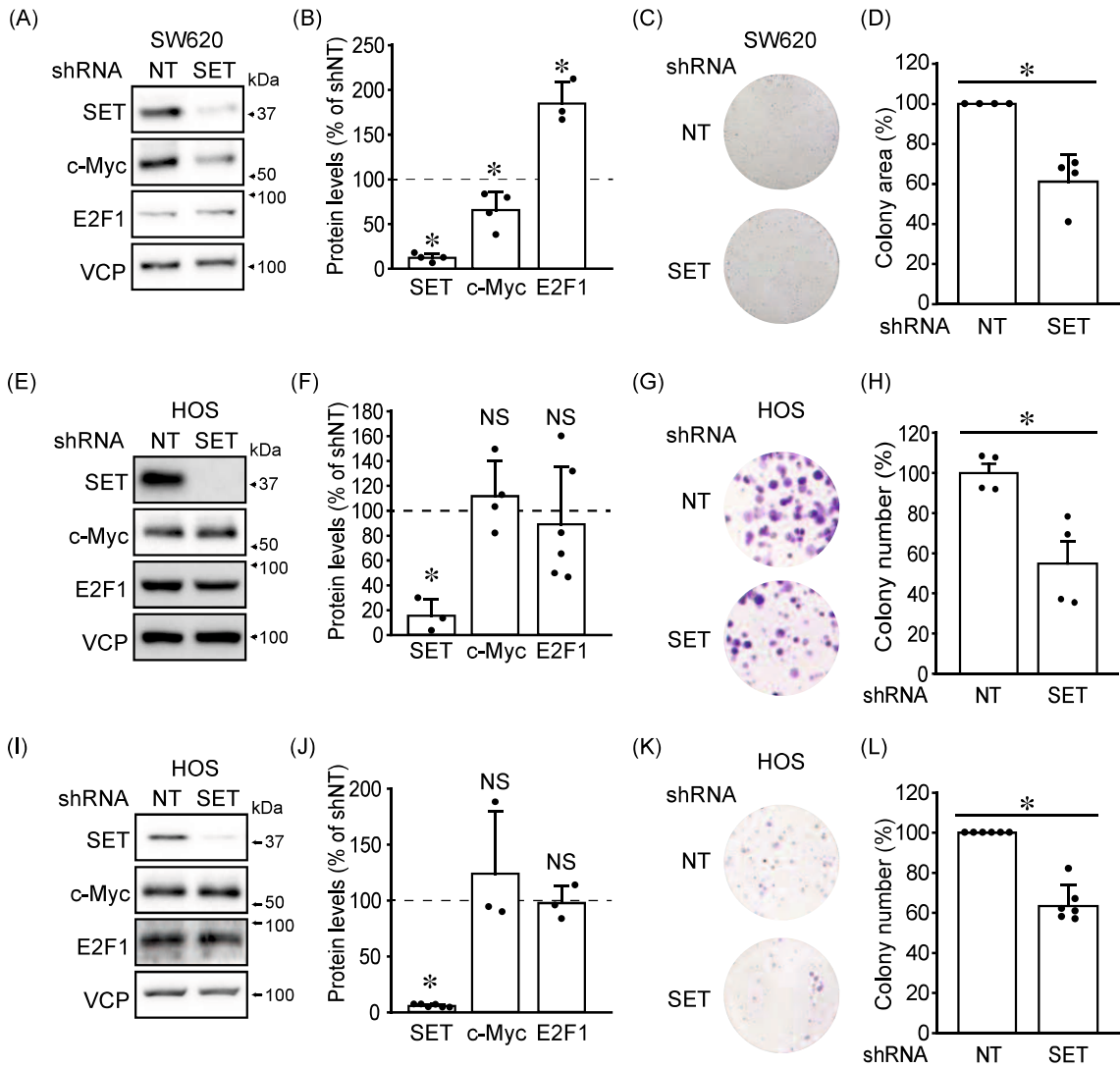


図 15 SET 発現抑制が c-Myc および E2F1 タンパク質の発現量とコロニー形成能に与える影響

SW620 細胞および HOS 細胞において non-targeting shRNA (shNT) または SET targeting shRNA (shSET) を安定的 (SW620 : A-D、HOS : E-H) もしくは dox 誘導性 (HOS : I-L) に発現させた。(A-B、E-F、I-J) SET 発現抑制が c-Myc、E2F1 タンパク質に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A、E、I) と shNT を 100%として相対値で表した定量図 (B、F、J)。N=3-6。
: $P < 0.05$ 。(shNT との比較)。NS : 有意差なし。(C-D、G-H、K-L) SET 発現抑制がコロニー形成能に与える影響をコロニー形成試験により解析した。典型的な写真 (C、G、K) と shNT で形成されたコロニー数を 100%として相対値で表した定量図 (D、H、L)。N=4-6。: $P < 0.05$ 。(shNT との比較)。NS : 有意差なし。

3-2-2 SET 発現抑制がスフェロイド形成能、細胞増殖能に与える影響

細胞を超低接着プレートを用いて3次元培養すると、細胞同士が集合・接着してスフェロイドが形成される。コロニー形成能と同様に、スフェロイド形成能は幹細胞性を評価する指標となる (64)。そこで、dox 誘導性 SET 発現抑制が HOS 細胞のスフェロイド形成能に与える影響を解析したところ、スフェロイド形成能の低下が認められた (図 16A-B)。当研究室の過去の報告において、SET 発現抑制は HOS 細胞の細胞増殖能に影響を与えないことが認められている (10)。そこで、dox 誘導性 SET 発現抑制が細胞増殖に与える影響を解析したところ、細胞増殖能は低下せず、わずかな上昇が認められた (図 16C)。これらの結果から、SET は HOS 細胞の細胞増殖能には大きな影響を与えずに、幹細胞性の維持に寄与することが示唆された。

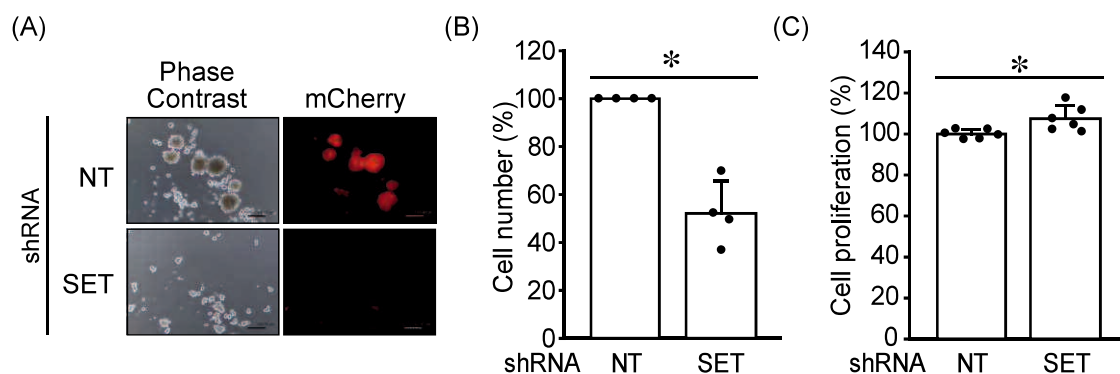


図 16 SET 発現抑制がスフェロイド形成能、細胞増殖能に与える影響

(A–B) Dox 誘導性に HOS 細胞の SET 発現を抑制し、スフェロイド形成能に与える影響を解析した。形成されたスフェロイドの典型的な写真 (A) と shNT の細胞数を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=4。*: $P < 0.05$ 。(shNT との比較)。

(C) Dox 誘導性に HOS 細胞の SET 発現を抑制し、細胞増殖能に与える影響を解析した。shNT の細胞増殖率を 100% として表した定量図。N=6。*: $P < 0.05$ 。(shNT との比較)。

3-2-3 SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響

SET が細胞内のシグナル伝達に与える影響を包括的に明らかにするため、shNT および shSET 発現 HOS 細胞で RNA-seq を行い、取得した遺伝子発現データに対し gene set enrichment analysis (GSEA) を行った。HALLMARK gene sets のうちエンリッチした (NOM p -val <0.05 、FDR q -val <0.25)、上位 5 個の gene set を示した (図 17A)。このうち mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) 関連シグナルに注目した (図 17B)。また、mTORC1 関連 gene set は C6 oncogenic signature collection においても、SET 発現抑制により活性が低下することが示唆された (図 17C-D)。

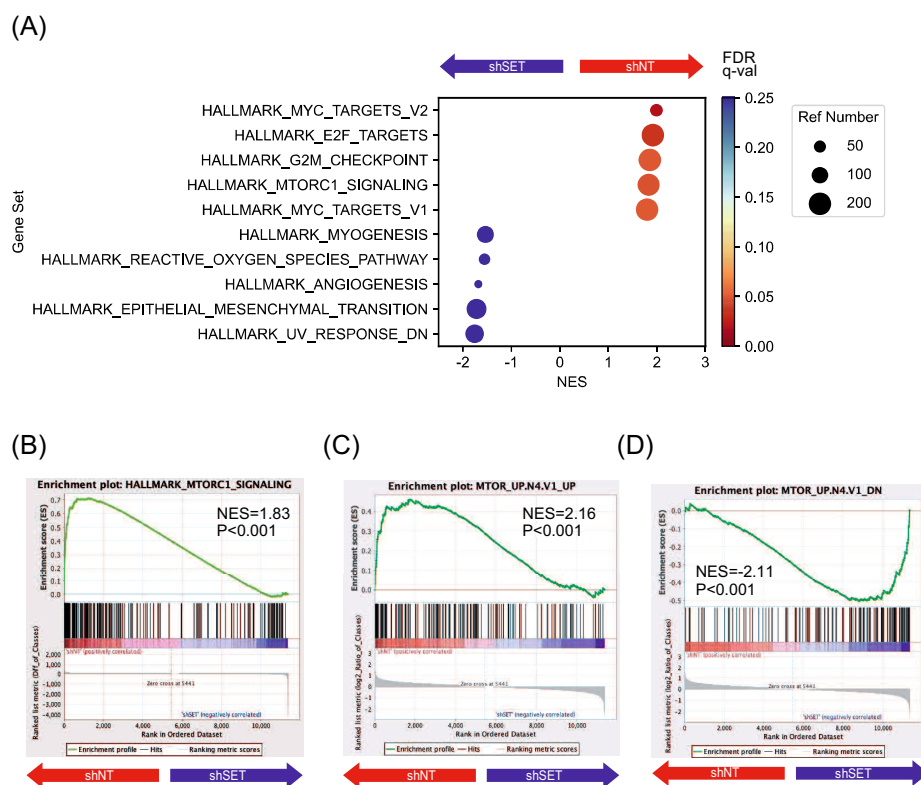


図 17 SET 発現抑制が細胞内シグナルに与える影響

(A-D) Dox 誘導性に SET 発現を抑制した HOS 細胞を用いて、トランスクリプトーム解析を行い、取得した遺伝子発現データに対し GSEA を行った。(A) Hallmark gene sets のうち、それぞれでエンリッチした (NOM p-val< 0.05、 FDR q-val< 0.25)、上位 5 個の gene set を示した。

(B) HALLMARK_MTORC1_SIGNALING、(C) MTOR_UP.N4.V1_UP、(D) MTOR_UP.N4.V1_DN の enrichment plot を示した。

3-2-4 SET 発現抑制が mTORC1 シグナルに与える影響

GSEA の結果から、SET 発現抑制により mTORC1 関連シグナルの活性が低下することが示唆された。mTORC1 は成長因子やアミノ酸などの栄養素のセンサーとして機能するセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞の成長や代謝に関連する mRNA の翻訳を促進する (65)。mTORC1 の基質の 1 つである p70S6K Thr389 リン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析したところ、SET 発現抑制により p70S6K リン酸化レベルの低下が認められ (図 18A-B)、GSEA の結果が裏付けられた。一方で、SET 発現抑制は、mTORC1 のもう 1 つの基質である 4EBP1 のリン酸化レベルには影響を与えなかった (図 18C-D)。mTOR に対するアロステリック阻害剤である rapamycin は、p70S6K のリン酸化レベルを持続的に低下させるのに対して、4EBP1 のリン酸化に対する効果は一時的であることが知られている (66-68)。したがって、SET 発現抑制による mTORC1 活性低下では、rapamycin 処置時と同様の機構が変化している可能性が示された。

SET 発現抑制が mTORC1 活性低下を引き起こす分子機構を明らかにするため、mTORC1 の上流キナーゼである Akt のリン酸化レベルに与える影響を解析したところ、SET 発現抑制による Akt Thr308 および Ser473 リン酸化レベルの低下が認められた (図 18A-B)。一方で、SET 発現抑制は、Akt の上流キナーゼである PDK1 のリン酸化レベルや、アミノ酸による mTORC1 活性化の指標である mTOR とリソソームの局在に影響を与えなかった (図 18C-E)。これらの結果から、SET は Akt を介して mTORC1/p70S6K シグナルに影響を与えることが示唆された。

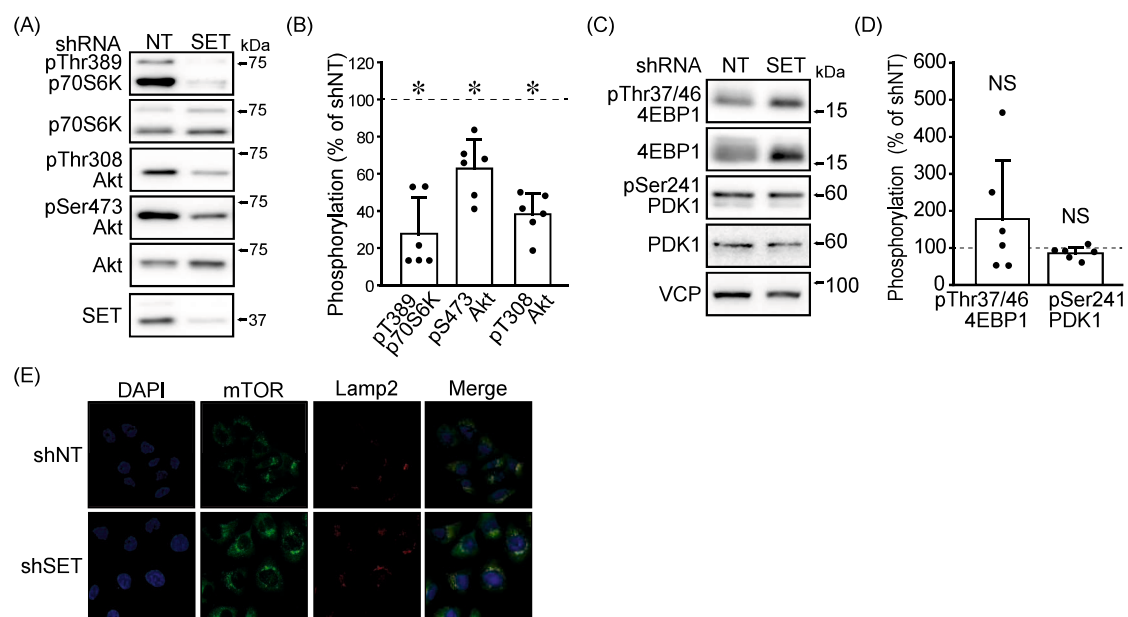


図 18 SET 発現抑制が mTORC1 シグナルに与える影響

(A–D) Dox 誘導性に SET 発現を抑制し、各種タンパク質のリン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A, C) と shNT を 100% として相対値で表した定量図 (B, D)。N=6。*: $P < 0.05$ 。(shNT との比較)。

(E) Dox 誘導性に SET 発現を抑制し、mTOR、Lamp2 の共局在に与える影響を免疫染色により解析した典型的な写真。mTOR (緑)、Lamp2 (赤: リソソーム)、DAPI (青: 核) で染色した。

3-2-5 PP2A 阻害が Akt および p70S6K のリン酸化レベルに与える影響

Akt は PP2A の基質であることが知られている (11)。そこで、SET 発現抑制により活性化した PP2A が Akt を脱リン酸化し、mTORC1 活性を低下させた可能性を考えた。PP2A 阻害剤 okadaic acid (OA) 処置および PP2A 発現抑制により PP2A を阻害し、Akt および p70S6K のリン酸化レベルに与える影響を解析したところ、SET 発現抑制による Akt および p70S6K リン酸化レベルの低下が、PP2A 阻害によりレスキューされることが認められた (図 19A-D)。以上の結果から、SET は PP2A 阻害を介して Akt/mTORC1/p70S6K シグナルを活性化することが示唆された。

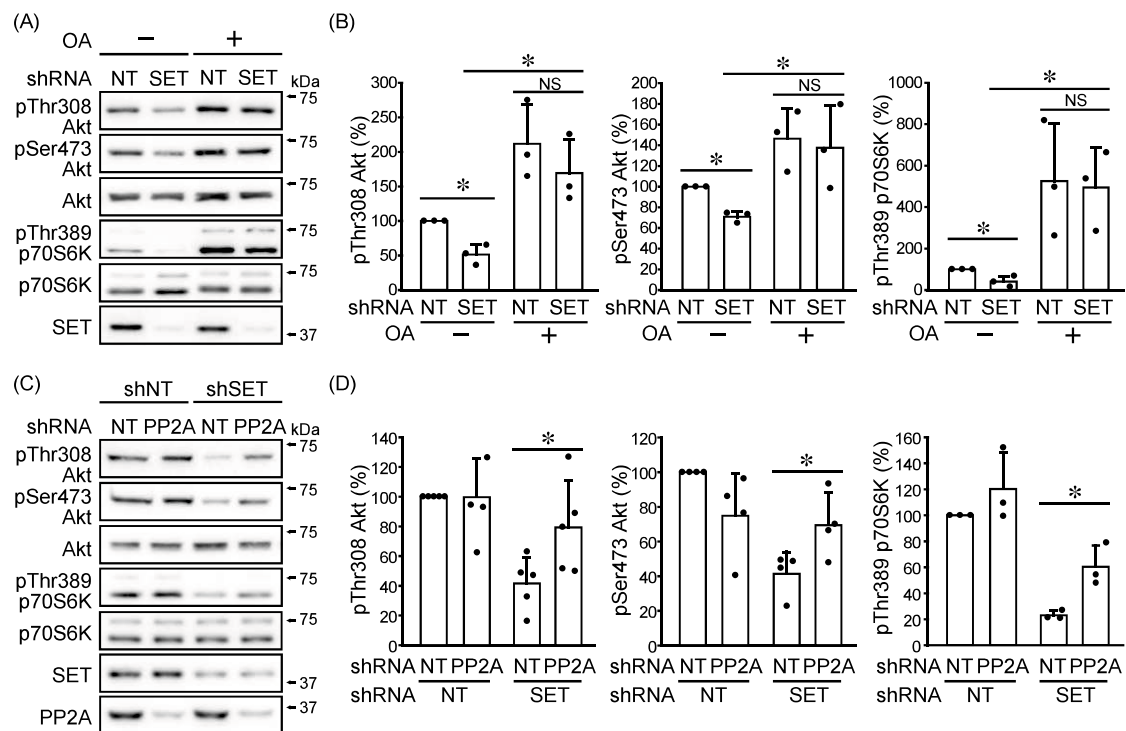


図 19 PP2A 阻害が Akt および p70S6K リン酸化レベルに与える影響

(A-B) Dox 誘導性に SET 発現を抑制した細胞を okadaic acid (OA) で処置 (100 nM、2 時間) し、Akt および p70S6K のリン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と shNT/OA 非処置を 100%として相対値で表した定量図 (B)。N=3。*: $P < 0.05$ 。NS : 有意差なし。

(C-D) Dox 誘導性に SET 発現を抑制した細胞で PP2A 発現を抑制し、Akt および p70S6K のリン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (C) と shNT/shNT を 100%として相対値で表した定量図 (D)。N=3-6。*: $P < 0.05$ (shNT/shSET との比較)。

3-2-6 Akt、mTOR 阻害が HOS 細胞の幹細胞性に与える影響

SET 発現抑制による Akt/mTORC1/p70S6K シグナルの活性低下が、HOS 細胞のコロニー形成能に与える影響を解析するため、Akt 阻害剤 Akt inhibitor VIII、mTOR 阻害剤 rapamycin、torin 1 で細胞を処置し、コロニー形成試験を行った。これらの阻害剤は、Akt および p70S6K のリン酸化レベル、コロニー形成能を顕著に低下させた (図 20A-I)。以上の結果から Akt、mTOR は HOS 細胞の幹細胞性に関与することが示唆された。

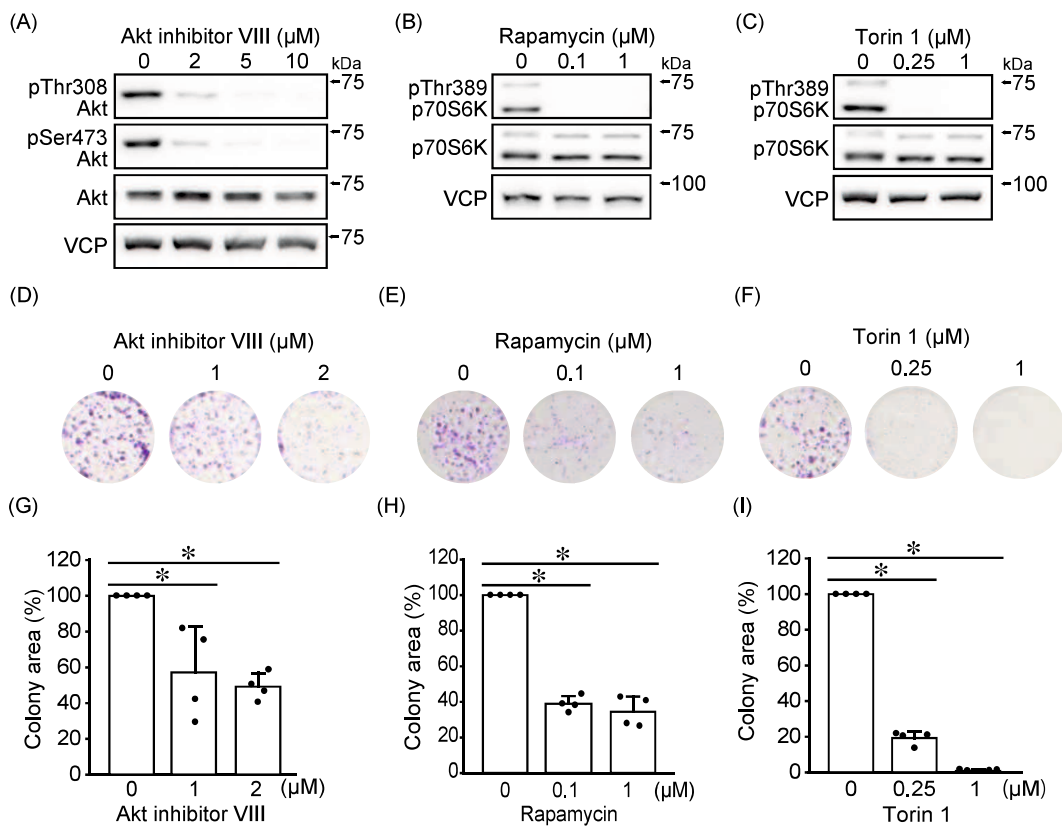


図 20 Akt、mTOR 阻害が HOS 細胞の幹細胞性に与える影響

(A-I) HOS 細胞を Akt inhibitor VIII (A、D、G)、rapamycin (B、E、H)、torin 1 (C、F、I) で処置した。(A-C) Akt および p70S6K のリン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析した典型的な写真。(D-I) コロニー形成能に与える影響をコロニー形成試験により解析した。典型的な写真 (D-F) と阻害剤非処置で形成されたコロニーの総面積を 100%として相対値で表した定量図 (G-I)。N=4。*: $P < 0.05$ 。(阻害剤非処置との比較)。

3-2-7 SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下における Akt/mTORC1 シグナルの役割

SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下への Akt/mTORC1 シグナルの関与を明らかにするために、dox 誘導性に SET 発現を抑制した HOS 細胞を Akt inhibitor VIII、rapamycin で処置し、コロニー形成能に与える影響を解析した。SET 発現抑制細胞では、Akt inhibitor VIII および rapamycin による Akt、mTORC1 活性阻害は、コロニー形成能を低下させないことが認められた (図 21A-D)。

Myristraited Akt (myr-Akt) は恒常的活性化型の Akt として知られる (69)。shNT および shSET 発現 HOS 細胞に myr-Akt を過剰発現させたところ、shSET 発現細胞の p70S6K リン酸化レベルが shNT 発現細胞と同程度まで上昇し、コロニー形成能も回復した (図 21E-G)。また、SET 発現抑制によるスフェロイド形成能の低下も myr-Akt 発現によりレスキューされた (図 21H-I)。これらの結果から、SET は Akt/mTOR シグナルを介して HOS 細胞の幹細胞性を維持することが示唆された。

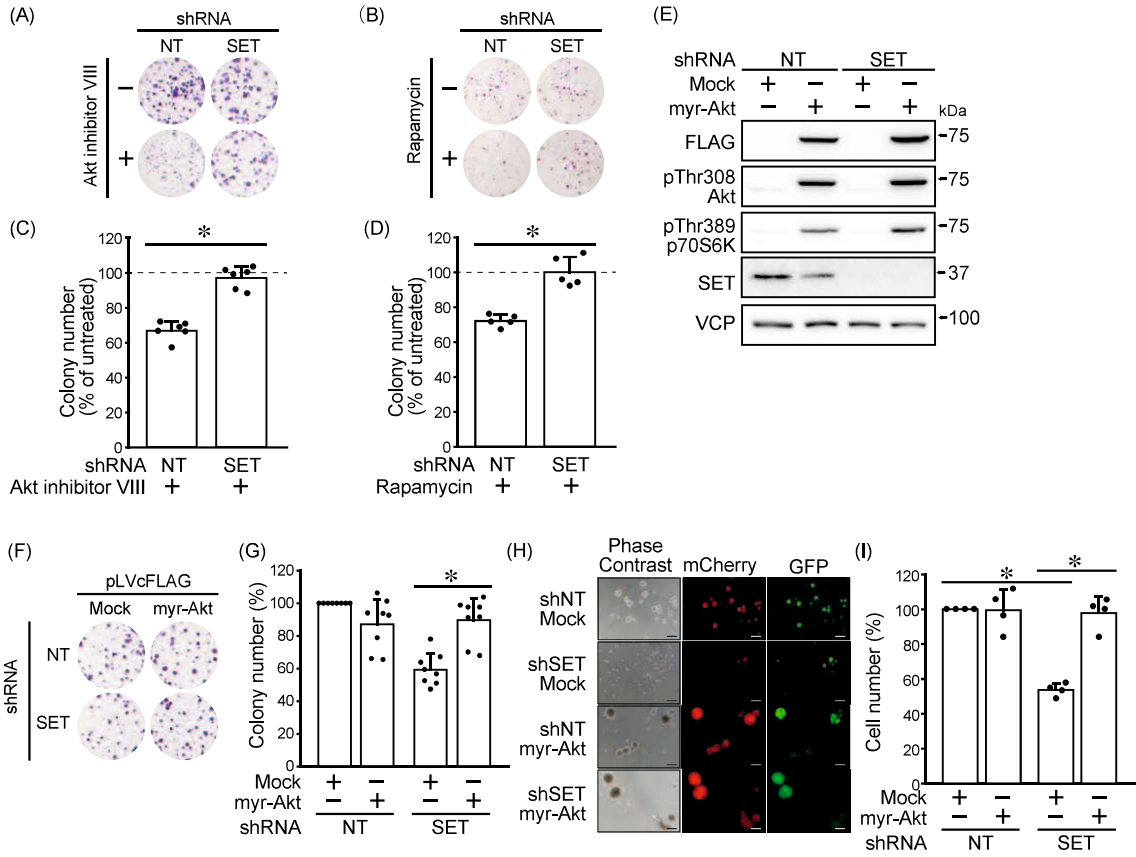


図 21 SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下における Akt/mTORC1 シグナルの役割

(A-D) Dox 誘導性に SET 発現を抑制した細胞を Akt inhibitor VIII (2 μ M)、rapamycin (1 μ M) で処置し、コロニー形成能に与える影響をコロニー形成試験により解析した。典型的な写真 (A-B) と阻害剤非処置で形成されたコロニー数を 100% として相対値で表した定量図 (C-D)。N=5-6。*: $P < 0.05$ 。(阻害剤処置/shNT との比較)。

(E-I) Dox 誘導性に SET 発現を抑制した細胞に myr-Akt を安定的に発現させた。(E) Akt および p70S6K リン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析した典型的な写真。(F-G) コロニー形成能に与える影響をコロニー形成試験、(H-I) スフェロイド形成能に与える影響をスフェロイド形成試験により解析した。典型的な写真 (F、H) と shNT/Mock を 100% として相対値で表した定量図 (G、I)。N=4-8。*: $P < 0.05$ 。

3-2-8 DEGs を用いたエンリッチメント解析

RNA seq から得られた遺伝子発現データから differentially expressed genes (DEGs) ($P < 0.01$, $|\log_2 \text{fold}| > 1.5$) を抽出し、SET 発現抑制により発現量が減少する 83 個の DEGs で、ChEA_2022 gene set ライブラリーに対するエンリッチメント解析を行った。その結果、Bmi-1 抗体を用いた ChIP-seq により同定された遺伝子がエンリッチされることが認められた (図 22A-B)。さらに、GEPIA を用いた相関分析において、sarcoma 患者における SET と Bmi-1 mRNA 発現量に正の相関関係があることが認められた (図 22C)。これらの結果から、SET 発現抑制によるシグナルの変化に、Bmi-1 が関与する可能性が示された。

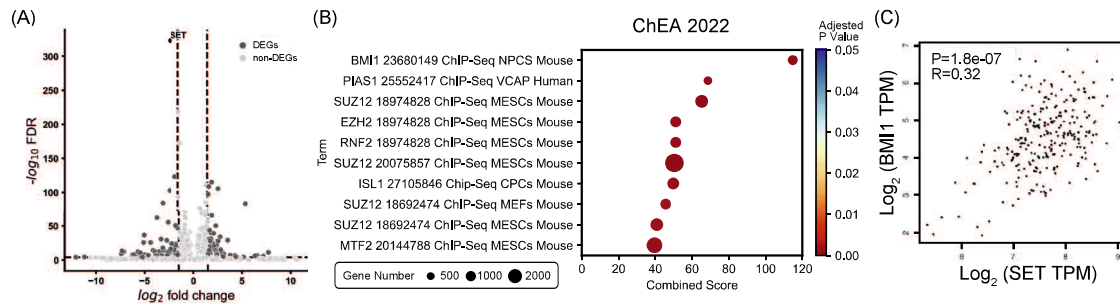


図 22 DEGs を用いたエンリッチメント解析

(A) SET 発現抑制による遺伝子発現の変化を表した volcano plot。

(B) Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr>) で ChEA_2022 gene set ライブラリーに対してエンリッチメント解析を行い、combined score が高い順に 10 種の gene set を表した。解析には SET 発現抑制により発現量が減少する 83 個の DEGs を用いた。

(C) GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) で SARC (sarcoma) データセットにおける Bmi-1 および SET mRNA 発現量に対する相関解析を行った。

3-2-9 SET 発現抑制が Bmi-1 発現に与える影響

Bmi-1 はポリコーム群タンパク質の 1 種であり、Ring1B、Me118 などと polycomb repressive complex 1 (PRC1) を形成する。PRC1 は、ヒストン H2A の Lys119 をモノユビキチン化することで、様々な遺伝子発現を抑制する (70, 71)。Bmi-1 は、PRC1 依存的および非依存的にがんの幹細胞性を高めることが報告されており (72, 73)、骨肉腫を含む様々ながんで発現の上昇が報告されている (74-76)。また、Akt は Bmi-1 をリン酸化し、ユビキチン・プロテアソーム系による分解から保護する (77)。そこで、SET は Akt を介して Bmi-1 タンパク質を安定化し、幹細胞性の維持に寄与しているのではないかと考えた。

この仮説を検証するため、SET 発現抑制が Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により、Bmi-1 mRNA 発現量に与える影響を real-time PCR により解析した。SET 発現抑制は、Bmi-1 タンパク質発現量を低下させたのに対して (図 23A-B)、Bmi-1 mRNA 発現量には影響しなかった (図 23C)。また、SET 発現抑制による Bmi-1 タンパク質発現量の低下は、PP2A 発現抑制よりレスキューされた (図 23D-E)。さらに、HOS 細胞を OA で処置したところ、Bmi-1 のリン酸化を示唆する Bmi-1 バンドの上方シフトが認められた (図 23F)。これらの結果から、SET は Bmi-1 タンパク質を安定化することが示唆された。

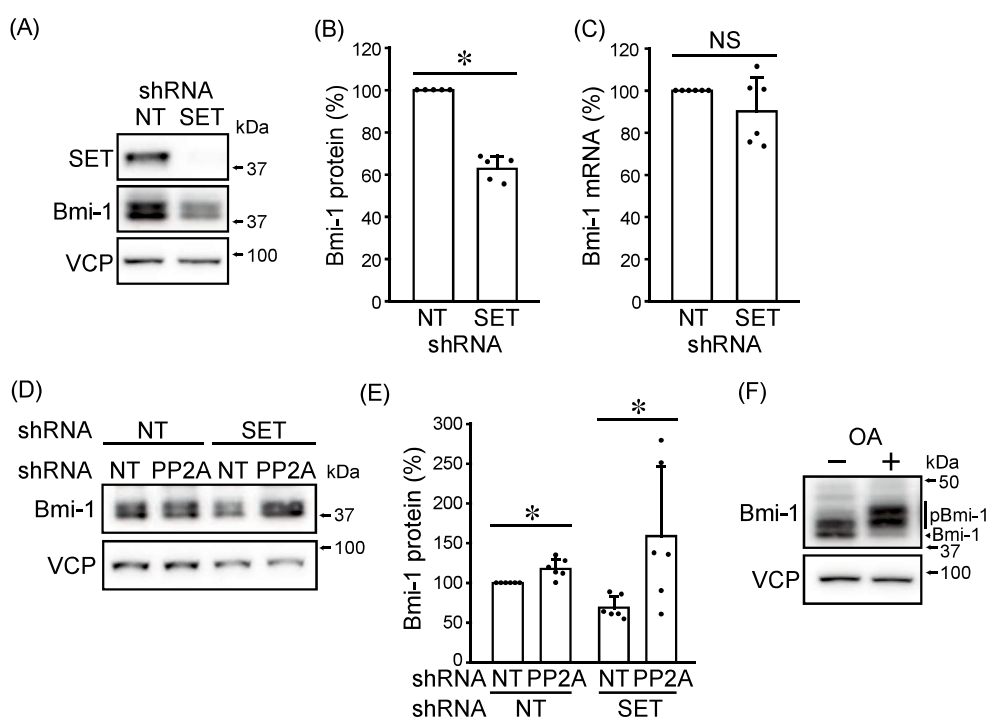


図 23 SET 発現抑制が Bmi-1 発現に与える影響

(A-C) Dox 誘導性に SET 発現を抑制し、Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting (A-B)、Bmi-1 mRNA 発現量に与える影響を real-time PCR (C) により解析した。典型的な写真 (A) と shNT を 100% として相対値で表した定量図 (B-C)。N=5-6。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。NS: 有意差なし。

(D-E) Dox 誘導性に SET 発現を抑制した細胞で PP2A 発現を抑制し、Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (D) と shNT/shNT を 100% として相対値で表した定量図 (E)。N=6。*: $P < 0.05$ 。

(F) HOS 細胞を OA (100 nM、2 時間) で処置し、Bmi-1 のバンドシフトに与える影響を western blotting により解析した典型的な写真。

3-2-10 プロテアソーム阻害が SET による Bmi-1 安定化に与える影響

SET 発現抑制による Bmi-1 タンパク質発現量の低下に、ユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解が関与するか明らかにするため、dox 誘導性に SET 発現を抑制した細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で処置し、Bmi-1 タンパク質に与える影響を western blotting により解析した。SET 発現抑制による Bmi-1 タンパク質発現量の低下は、MG132 処置により阻害された (図 24A-B)。これらの結果から、SET は Bmi-1 のユビキチン・プロテアソーム系による分解を阻害し、Bmi-1 タンパク質を安定化することが示唆された。

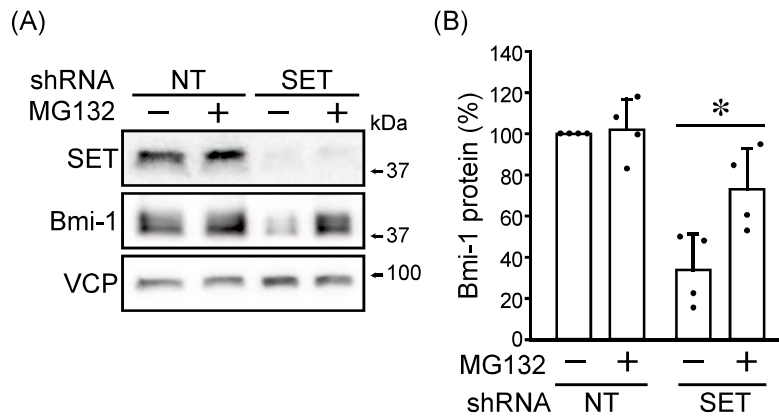


図 24 プロテアソーム阻害が SET による Bmi-1 安定化に与える影響

(A-B) Dox 誘導性に SET 発現を抑制した細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 (100 nM、4 時間) で処置し、Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と shNT/MG132 非処置を 100%として表した定量図 (B)。N=4。*: $P < 0.05$ (shSET/MG132 非処置との比較)。

3-2-11 Akt が Bmi-1 発現量に与える影響

Bmi-1 タンパク質安定化への Akt の関与を明らかにするため、HOS 細胞を Akt inhibitor VIII で処置し、Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により、Bmi-1 mRNA 発現量に与える影響を real-time PCR により解析した。Akt 阻害は、mRNA 発現量に影響を与えずに、Bmi-1 タンパク質発現量を減少させた (図 25A-C)。また、myr-Akt 発現による Akt 活性の上昇は、Bmi-1 mRNA 発現に影響を与えず、Bmi-1 タンパク質発現量を増加させた (図 25 D-F)。これらの結果から、SET は Akt 活性化を介して Bmi-1 タンパク質を安定化することが示唆された。さらに、SET 発現抑制および Akt 阻害は、PRC1 の構成因子である Ring1B のタンパク質発現量を低下させた (図 25G-J)。この結果から、SET は、PRC1 複合体を量的に制御することが示唆された。

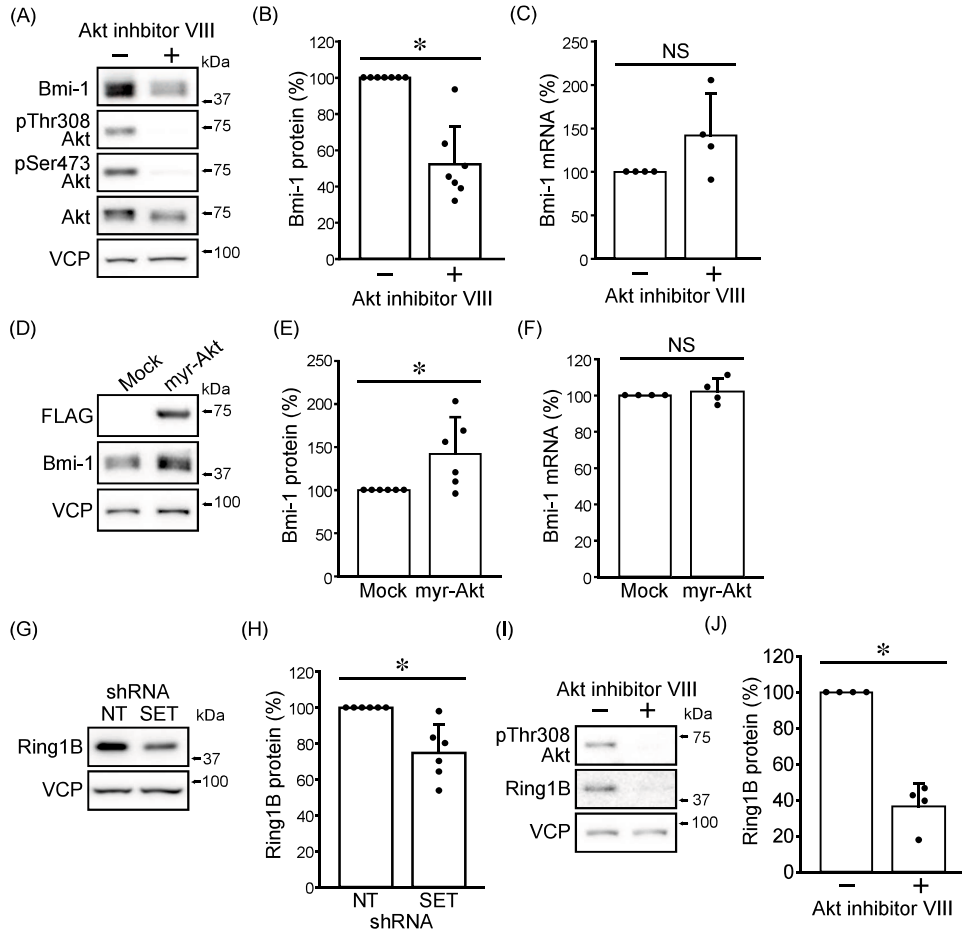


図 25 Akt が Bmi-1 発現量に与える影響

(A–C) HOS 細胞を Akt inhibitor VIII (10 μ M、24 時間) で処置した。(A–B) Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真(A)と Akt inhibitor VIII 非処置を 100%として相対値で表した定量図(B)。N=7。*: $P<0.05$ 。(Akt inhibitor VIII 非処置との比較)。(C) Bmi-1 mRNA 発現量に与える影響を real-time PCR により解析し、Akt inhibitor VIII 非処置を 100%として相対値で表した定量図。N=4。NS : 有意差なし。

(D–F) HOS 細胞に myr-Akt を発現させた。(D–E) Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した典型的な写真(D)と Mock を 100%として相対値で表した定量図(E)。N=6。*: $P<0.05$ 。(Mock との比較)。(F) Bmi-1 mRNA 発現量に与える影響を real-time PCR により解析し、Mock を 100%として相対値で表した定量図。N=4。NS : 有意差なし。

(G–H) Dox 誘導性に SET 発現を抑制し、Ring1B タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真(G)と shNT を 100%として相対値で表した定量図(H)。N=6。*: $P<0.05$ (shNT との比較)。

(I–J) HOS 細胞を Akt inhibitor VIII (10 μ M、24 時間) で処置し、Ring1B タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真(I)と Akt inhibitor VIII 非処置を 100%として相対値で表した定量図(J)。N=4。*: $P<0.05$ 。(Akt inhibitor VIII 非処置との比較)。

3-2-12 mTORC1 が Bmi-1 発現量に与える影響

Akt による Bmi-1 タンパク質の安定化に、mTORC1 が関与するか検討した。Dox 誘導性に SET 発現を抑制した細胞を rapamycin で処置し、western blotting により Bmi-1 タンパク質に与える影響を解析した。Rapamycin による mTORC1 阻害は、shNT 細胞の Bmi-1 タンパク質発現量に影響を与えなかった (図 26A-C)。一方、shSET 細胞では、SET 発現抑制による Bmi-1 発現量の低下が、一部解除された (図 26A-C)。Rapamycin による mTORC1 阻害は、フィードバック機構により Akt を活性化することが知られている (78, 79)。これらの知見と一致して、shNT 細胞、shSET 細胞ともに、rapamycin 処置による Akt の活性化が認められた (図 26A, D-E)。したがって、shSET 細胞においては、フィードバック機構による Akt の活性化が、Bmi-1 発現を回復させたと考えられる。これらの結果から、SET による Bmi-1 安定化には mTORC1 シグナルは関与しないことが示唆された。

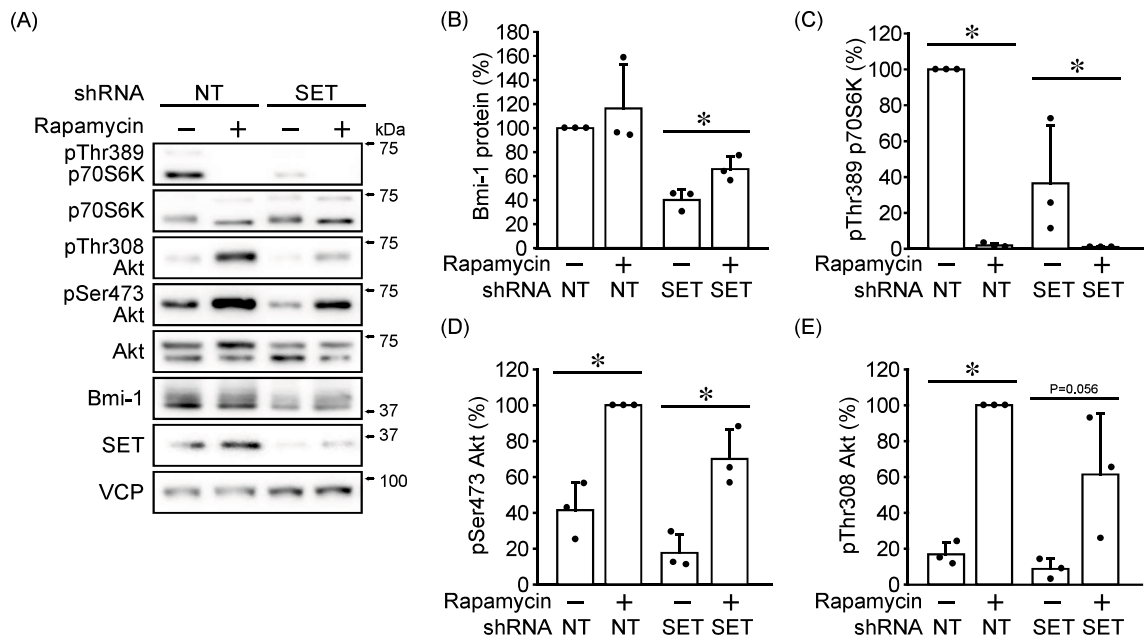


図 26 mTORC1 が Bmi-1 発現量に与える影響

(A-E) shNT および shSET 細胞を rapamycin (1 μ M、24 時間) で処置し、Bmi-1 タンパク質発現量、Akt および p70S6K リン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と shNT/rapamycin 非処置 (B-C)、shNT/rapamycin 処置 (D-E) を 100% として相対値で表した定量図。N=3。*: $P < 0.05$ 。

3-2-13 Bmi-1 発現量の変化が Akt 活性に与える影響

これまでの結果から、Akt は Bmi-1 の上流に位置し、mTORC1 非依存的に Bmi-1 を安定化することが示唆された。一方、Bmi-1 が Akt を活性化するという報告も存在する (80, 81)。そこで、HOS 細胞における Bmi-1 発現量の変化が Akt 活性に与える影響を検討した。HOS 細胞において、Bmi-1 発現を抑制したところ、Akt リン酸化レベルに変化は認められなかった (図 27A-B)。一方、Bmi-1 の過剰発現は、Akt リン酸化レベルを低下させることが認められた (図 27C-D)。これらの結果から、HOS 細胞では Bmi-1 は Akt の活性化を誘導しないことが明らかになった。

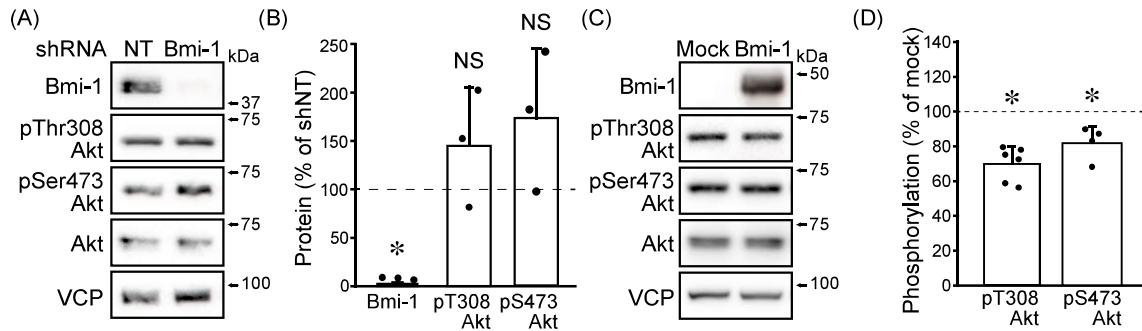


図 27 Bmi-1 発現量の変化が Akt 活性に与える影響

(A-B) Bmi-1 発現を抑制した細胞で、Akt リン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と shNT を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=3。*: $P < 0.05$ 。(shNT との比較)。NS: 有意差なし。

(C-D) Bmi-1 を過剰発現させた細胞で Akt リン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (C) と Mock を 100% として相対値で表した定量図 (D)。N=4-6。*: $P < 0.05$ 。(Mock との比較)。

3-2-14 Bmi-1 発現抑制が HOS 細胞のコロニー形成能に与える影響

Akt を介した Bmi-1 安定化が HOS 細胞の幹細胞性に関与するか明らかにするため、HOS 細胞において shRNA を用いて Bmi-1 発現を抑制し、コロニー形成試験を行った。Bmi-1 発現抑制は、HOS 細胞のコロニー形成能を抑制した (図 28A-B)。また、HOS 細胞を Bmi-1 阻害剤 PTC-209 で処置したところ、同様にコロニー形成能の低下が観察された (図 28C-E)。これらの結果から、Bmi-1 は HOS 細胞の幹細胞性の維持に寄与することが示唆された。

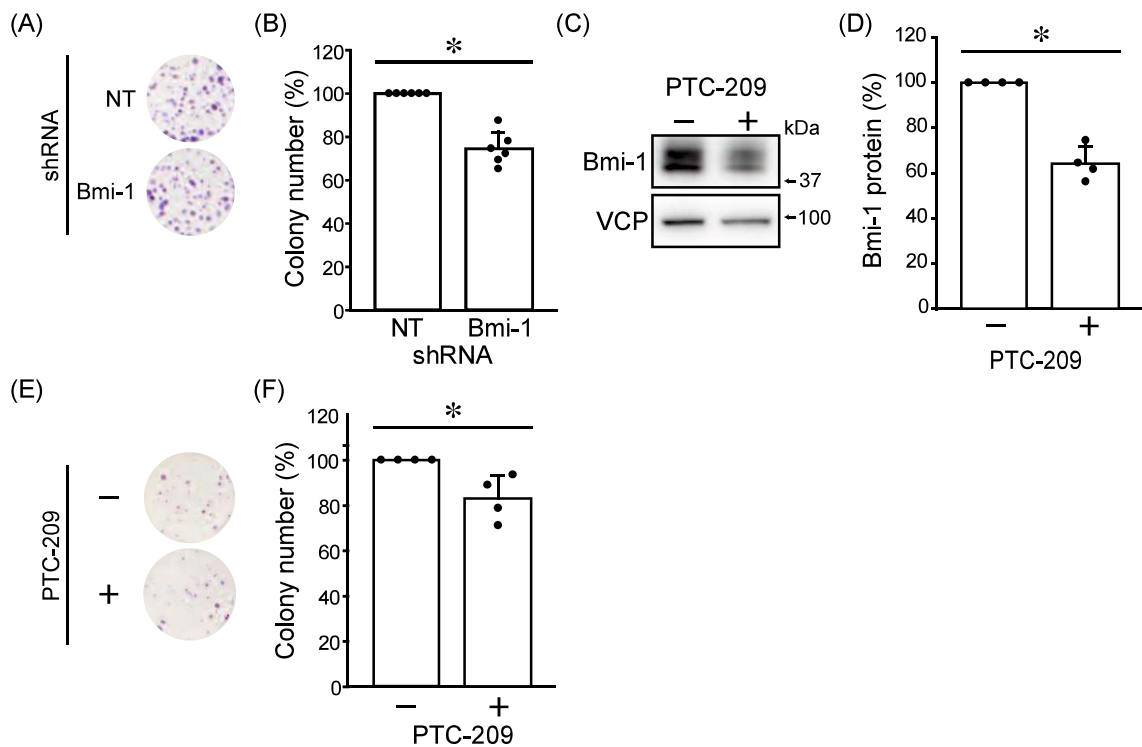


図 28 Bmi-1 発現抑制が HOS 細胞のコロニー形成能に与える影響

(A-B) Bmi-1 発現を抑制した細胞で、コロニー形成能に与える影響をコロニー形成試験により解析した。典型的な写真 (A) と shNT で形成されたコロニー数を 100% として相対値で表した定量図 (B)。N=6。*: $P < 0.05$ 。(shNT との比較)。

(C-F) HOS 細胞を PTC-209 (0.4 μ M、24 時間) で処置した。(C-D) Bmi-1 タンパク質発現に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (C) と PTC-209 非処置を 100% として相対値で表した定量図 (D)。N=4。*: $P < 0.05$ 。(PTC-209 非処置との比較)。

(E-F) コロニー形成能に与える影響をコロニー形成試験により解析した。典型的な写真 (E) と PTC-209 非処置で形成されたコロニー数を 100% として相対値で示した定量図 (F)。N=4。*: $P < 0.05$ 。(PTC-209 非処置との比較)。

3-2-15 Bmi-1 が SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下に与える影響

次に SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下への Bmi-1 の関与を明らかにするために、SET 発現を抑制した HOS 細胞で Bmi-1 発現を抑制し、コロニー形成能を解析した。shBmi-1 および PTC-209 処置による Bmi-1 発現抑制は、shNT 細胞のコロニー形成能を低下させたが、shSET 細胞のコロニー形成能には影響を与えなかった (図 29A-E)。一方、Bmi-1 の過剰発現は、shNT 細胞のコロニー形成能には影響を与えなかったが、SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下を阻害することが認められた (図 29F-H)。また、Bmi-1 の過剰発現は、SET 発現抑制によるスフェロイド形成能の低下も阻害した (図 29I-J)。これらの結果から、Bmi-1 が SET によるコロニー形成能の維持に寄与することが示された。

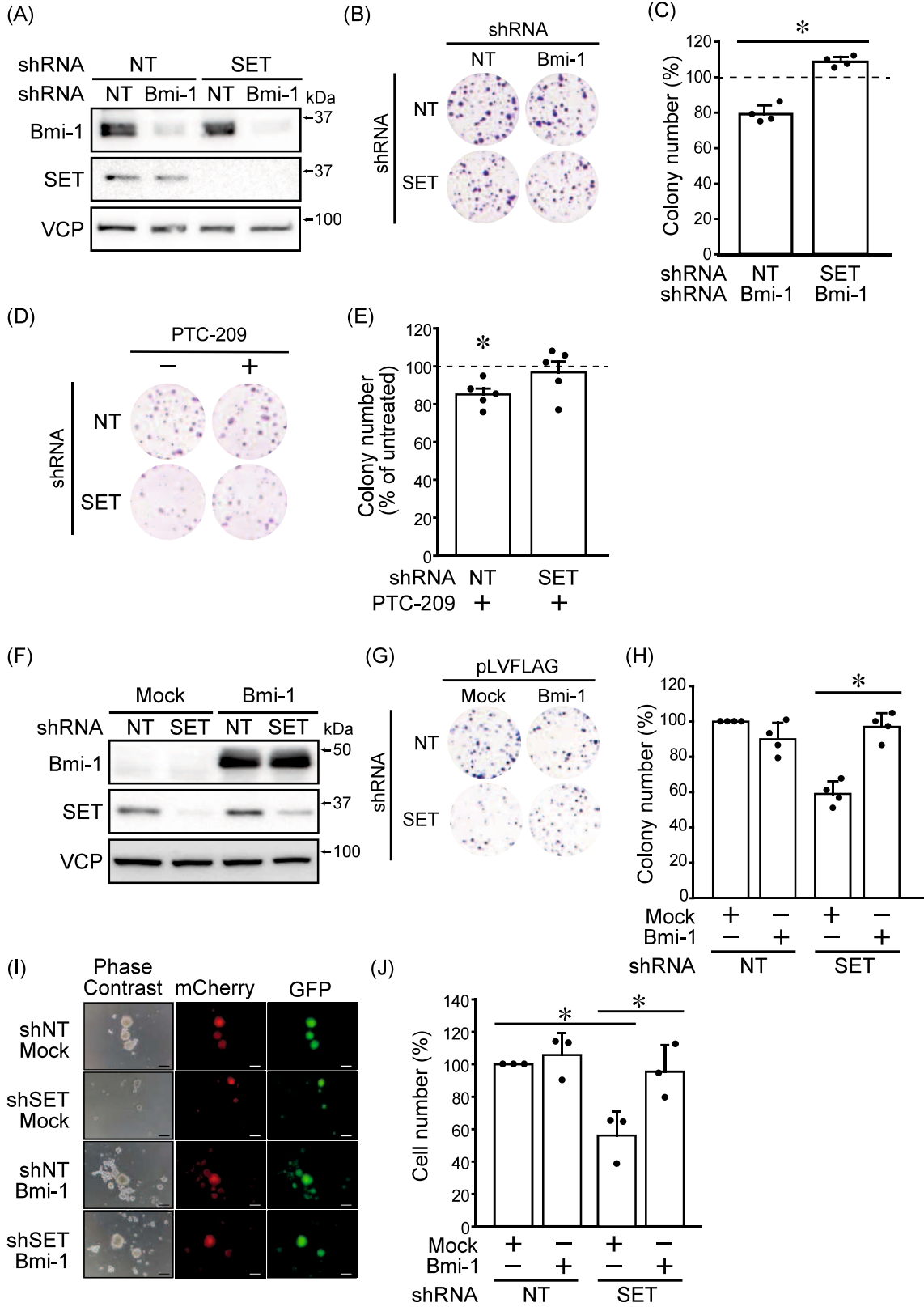


図 29 Bmi-1 が SET 発現抑制によるコロニー形成能の低下に与える影響

(A-E) SET 発現を抑制した細胞で shBmi-1 発現もしくは PTC-209 処置 (0.4 μ M、24 時間) により Bmi-1 発現を抑制した。(A) SET および Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した典型的な写真。(B-E) コロニー形成能に与える影響をコロニー形成試験により解析した。典型的な写真 (B、D) と shNT で形成されたコロニー数を 100%として相対値で表した定量図 (C、E)。N=4-5。*: $P<0.05$ 。(F-J) SET 発現を抑制した細胞で Bmi-1 を過剰発現させた。(F) SET および Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した典型的な写真。(G-H) コロニー形成能に与える影響をコロニー形成試験により解析した。典型的な写真 (G) と shNT/Mock で形成されたコロニー数を 100%として相対値で表した定量図 (H)。N=4。*: $P<0.05$ 。(shSET/Mock との比較)。(I-J) スフェロイド形成能に与える影響をスフェロイド形成試験により解析した。典型的な写真 (I) と shNT/Mock でカウントされた細胞数を 100%として相対値で表した定量図 (J)。N=3。*: $P<0.05$ 。

3-2-16 骨由来がん細胞株において SET が Bmi-1 発現に与える影響

SET 発現抑制による Akt を介した Bmi-1 発現量の低下が、HOS 細胞に特有の現象であるか確認するために、ヒト Ewing 肉腫細胞株 A673、ヒト骨肉腫細胞株 Saos-2 および U2OS において SET 発現を抑制し、Akt、p70S6K リン酸化レベル、Bmi-1 発現量に与える影響を western blotting により解析した。A673 細胞では SET 発現抑制により、HOS 細胞と同様に Akt および p70S6K リン酸化レベルが低下し、Bmi-1 発現量が低下することが認められた (図 30A-B)。一方で、Saos-2 および U2OS 細胞では、SET 発現抑制はこれらに影響を与えなかった (図 30A-B)。この結果から、同じ骨由来のがん細胞株においても、SET 発現抑制により Bmi-1 タンパク質分解が起きる細胞株 (sensitive) と起きない細胞株 (insensitive) に分かれることが示唆された。この違いを生み出す分子機構を明らかにするために、4つの細胞株で Akt リン酸化レベル、Bmi-1、PP2A、SET タンパク質発現量を western blotting により比較したが、各群の間に相関は認められなかった (図 30C-D)。

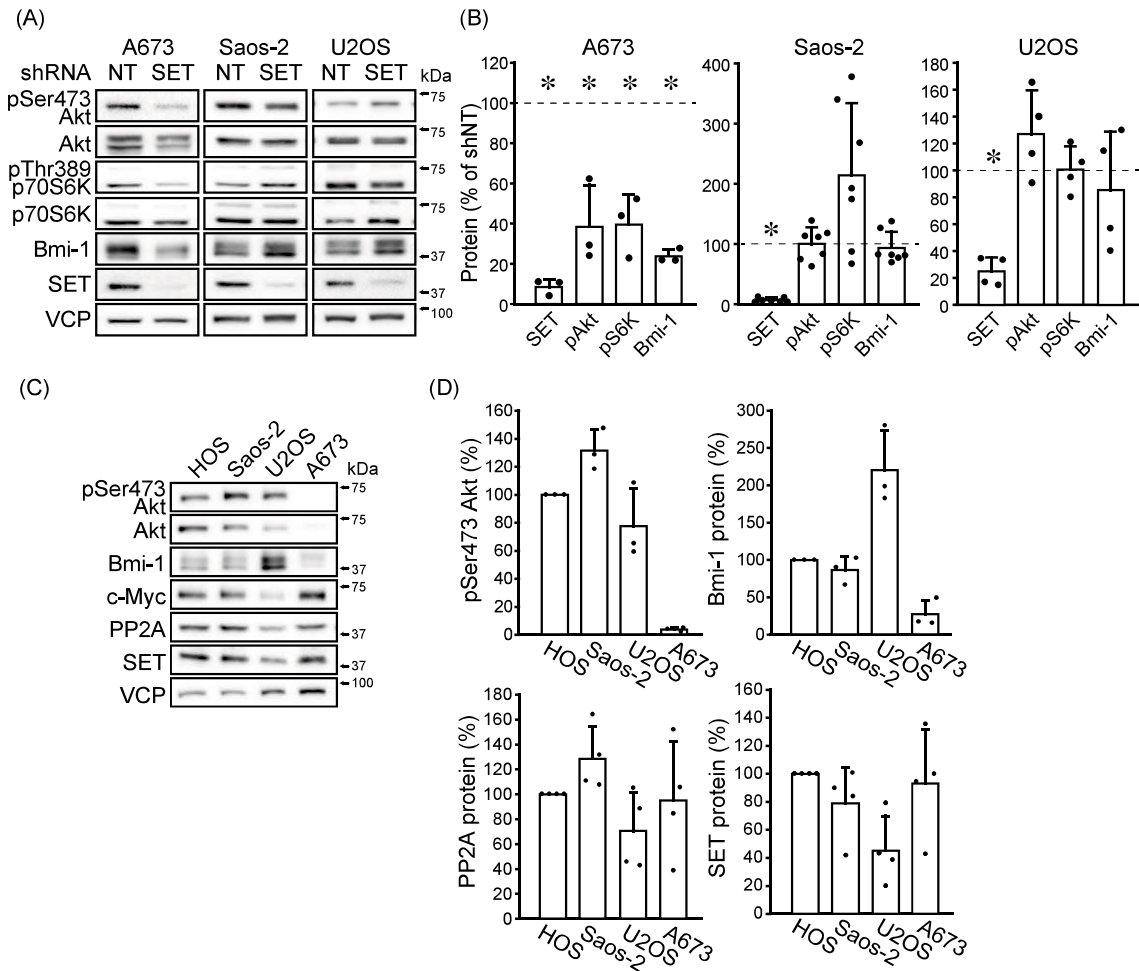


図 30 骨由来がん細胞株において SET が Bmi-1 発現に与える影響

(A–B) Ewing 肉腫細胞株 A673、骨肉腫細胞株 Saos-2、U2OS において SET 発現を抑制し、Akt、p70S6K リン酸化レベル、Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と shNT を 100%として相対値で表した定量図 (B)。N=3–7。*: $P < 0.05$ 。

(C–D) HOS、Saos-2、U2OS、A673 細胞において、Akt リン酸化レベル、Bmi-1、PP2A、SET タンパク質発現量を western blotting により比較した。典型的な写真 (C) と HOS 細胞を 100%として相対値で表した定量図 (D)。N=3–4。

3-2-17 多様ながん細胞株において SET が Bmi-1 発現に与える影響

SET 発現抑制が Bmi-1 タンパク質分解に与える影響の違いを生み出す分子機構を解明するため、がん種を拡大して解析を行った。ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2、ヒト肺がん細胞株 A549、ヒト結腸がん細胞株 HT-29、ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y において SET 発現を抑制し、Bmi-1 発現量、Akt リン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析した。MIA PaCa-2 および A549 細胞では、SET 発現抑制により Akt リン酸化レベルが低下し、Bmi-1 発現量が低下することが認められた (図 31A-D)。一方で、SH-SY5Y 細胞では、SET 発現抑制による Akt リン酸化レベルおよび Bmi-1 発現量の低下は認められなかった。興味深いことに、HT-29 細胞では、SET 発現抑制は Akt リン酸化レベルを低下させるにも関わらず、Bmi-1 タンパク質発現量に影響しなかった (図 31A-D)。これらの結果から、Akt 活性の抑制は、SET 発現抑制による Bmi-1 分解に必要なものが十分ではない可能性が示された。

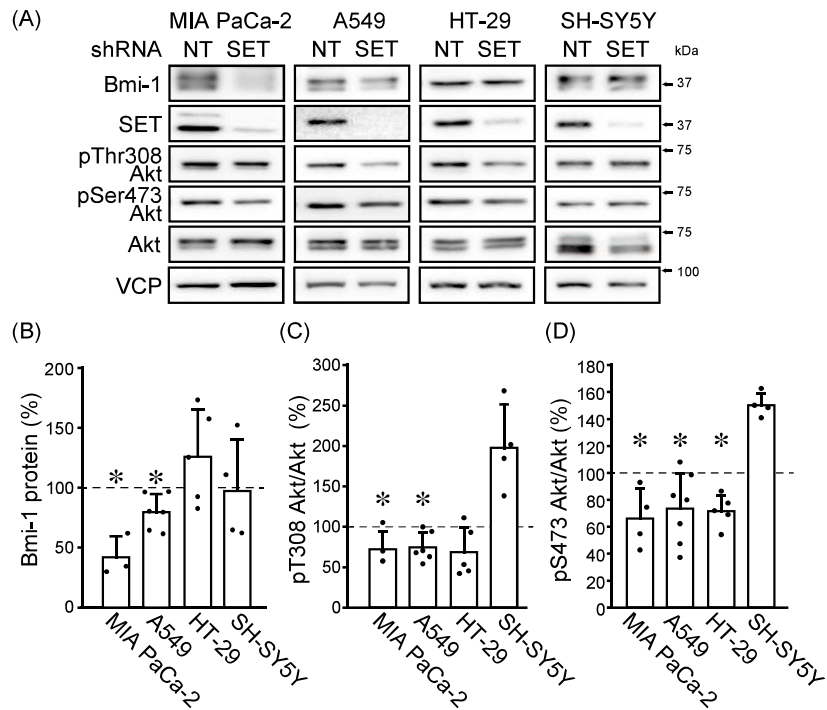


図 31 多様ながん細胞株において SET が Bmi-1 発現に与える影響

(A-D) 膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2、肺癌細胞株 A549、結腸がん細胞株 HT-29、神経芽腫細胞株 SH-SY5Y において SET 発現を抑制し、Akt リン酸化レベル、Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (A) と shNT を 100% として相対値で表した Bmi-1 タンパク質発現量 (B)、Akt Thr308 リン酸化レベル (C)、Akt Ser473 リン酸化レベル (D) の定量図。N=3-6。*: $P < 0.05$ 。(shNT との比較)。

3-2-17 SETによるAktを介したBmi-1安定化がA549細胞の幹細胞性に与える影響

SETによるAktを介したBmi-1の安定化が、HOS細胞以外の細胞株でも幹細胞性に関与するか明らかにするために、dox誘導性にshSETを発現させたA549細胞に、Bmi-1を過剰発現させた。Western blottingによりSET発現抑制やBmi-1の過剰発現を確認した後（図32A）、コロニー形成試験およびスフェロイド形成試験を行った。その結果、A549細胞においても、SET発現抑制によりコロニー形成能およびスフェロイド形成能が低下し、これがBmi-1の過剰発現により阻害されることが認められた（図32B-E）。また、myr-Aktの発現でも同様に、SET発現抑制によるコロニー形成能およびスフェロイド形成能の低下が阻害された（図32F-J）。これらの結果から、SETによるAkt/Bmi-1を介した幹細胞性維持機構はHOS細胞に特異的な現象ではないことが示された。

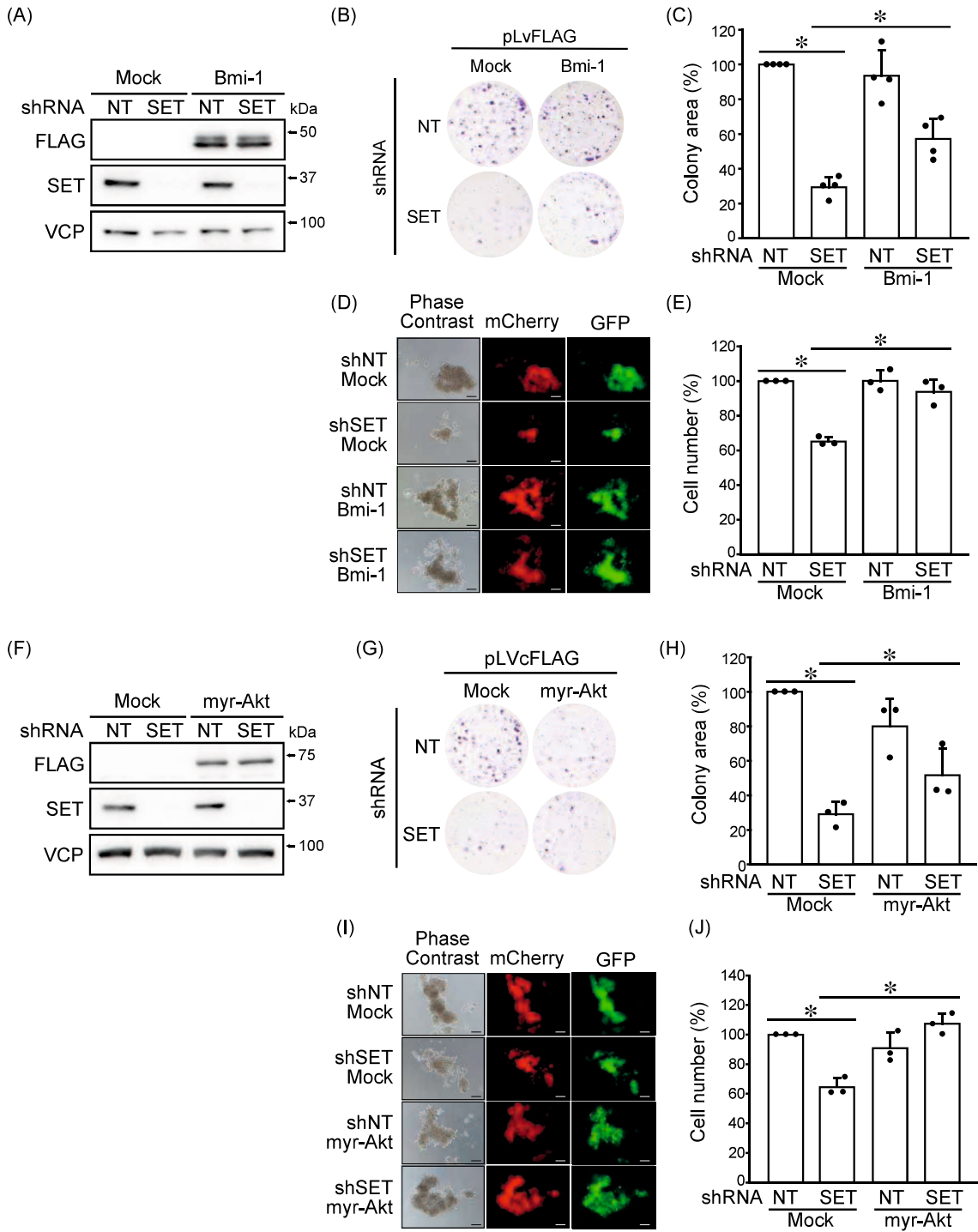


図 32 SET による Akt を介した Bmi-1 安定化が A549 細胞の幹細胞性に与える影響

(A-J) A549 細胞において dox 誘導性に SET 発現を抑制し、Bmi-1 (A-E) もしくは myr-Akt (F-J) を過剰発現させた。(B-C、G-H) コロニー形成能に与える影響をコロニー形成試験により解析した。典型的な写真 (B、G) と shNT/Mock で形成されたコロニーの総面積を 100%とし相対値で表した定量図 (C、H)。N=3-4。*: $P < 0.05$ 。(D-E、I-J) スフェロイド形成能に与える影響をスフェロイド形成試験により解析した。典型的な写真 (D、I) と shNT/Mock でカウントされた細胞数を 100%とし相対値で表した定量図 (E、J)。N=3。*: $P < 0.05$ 。

3-2-18 SET 発現抑制による Bmi-1 分解を誘導する要因の解析

これまで解析した 8 種類のがん細胞株は、SET 発現抑制により Bmi-1 タンパク質分解が起きる sensitive 群 (HOS、A673、MIA PaCa-2、A549) と、起きない insensitive 群 (Saos-2、U2OS、HT-29、SH-SY5Y) に分類された。そこで、感受性の違いを生み出す要因を明らかにするため、トランスクリプトームデータを depmap (<https://depmap.org/portal/>) から取得した (図 33A)。GSEA を行ったところ、HALLMARK gene sets の中で 3 種の gene set が sensitive 群でエンリッチされていた。このうち 2 種が Myc に関連する gene set であり、sensitive 群では Myc 活性が高いことが示唆された (図 33B-D)。一方で、insensitive 群でエンリッチされる gene set は見つからなかった。

SET 発現抑制による Bmi-1 分解と Myc 活性の関係を明らかにするため、正常細胞株であるヒト胎児腎臓上皮細胞株 293T において、SET 発現抑制および c-Myc 過剰発現が Bmi-1 発現量に与える影響を western blotting により解析した。Mock 発現細胞では、SET 発現抑制は Akt リン酸化、Bmi-1 発現量に影響を与えず、293T が insensitive 群に分類される細胞株であることが確認された。一方で、c-Myc 過剰発現と SET 発現抑制を組み合わせると、Akt リン酸化レベルの低下と Bmi-1 発現量の減少が認められた (図 33E-G)。これらの結果から、SET 発現抑制による Bmi-1 分解において、Myc 活性が重要な要因であることが示唆された。

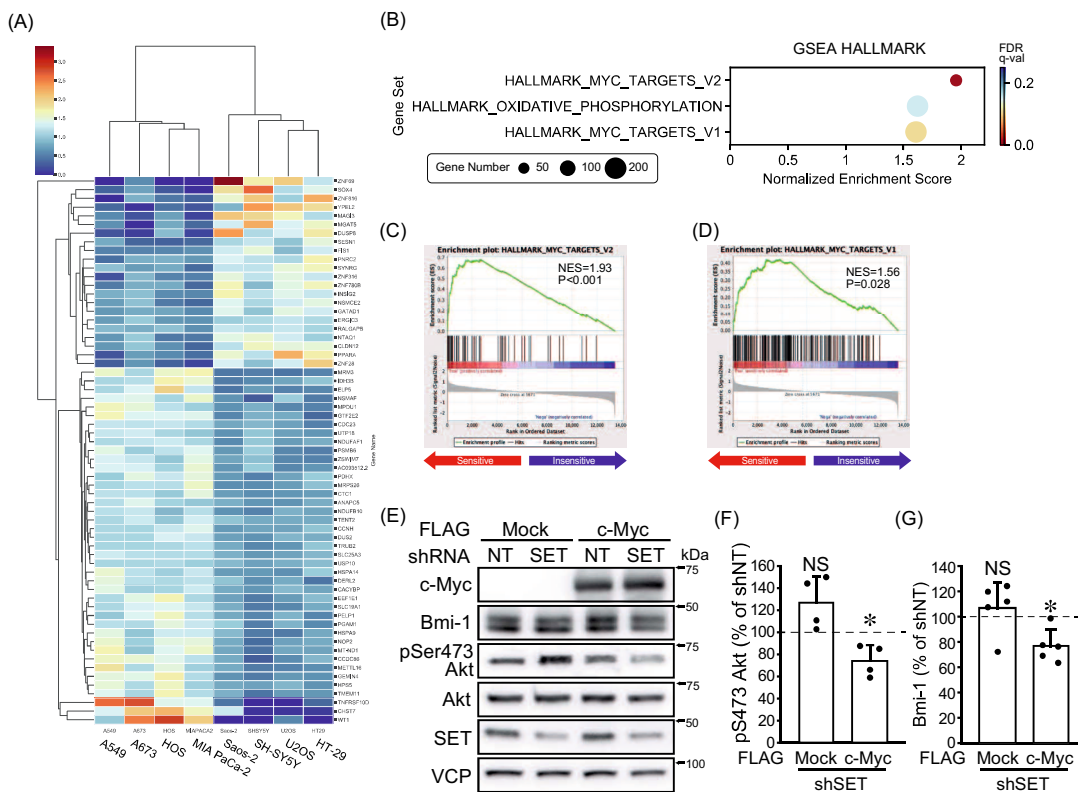


図 33 SET 発現抑制による Bmi-1 分解を誘導する要因の解析

(A) SET 発現抑制より Bmi-1 発現量が低下する細胞株 (sensitive 群 : HOS、A673、MIA PaCa-2、A549)、低下しない細胞株 (insensitive 群 : Saos-2、U2OS、HT-29、SH-SY5Y) のトランスクリプトームデータから作製されたヒートマップ。

(B-D) GSEA において、sensitive 群でエンリッチされた gene set (B) と HALLMARK_MYC_TARGETS_V2 (C)、HALLMARK_MYC_TARGETS_V1 (D) の enrichment plot を示した。

(E-G) 293T shNT および shSET 細胞に c-Myc を過剰発現させ、Akt リン酸化レベル、Bmi-1 タンパク質発現量に与える影響を western blotting により解析した。典型的な写真 (E) と shNT を 100% とし相対値で表した Akt Ser473 リン酸化レベル (F)、Bmi-1 タンパク質発現量 (G) の定量図。N=4-5。*: $P < 0.05$ 。NS : 有意差なし。

3-3 考察

3-3-1 SET 発現抑制による Akt/mTORC1/p70S6K 活性阻害

本研究から、SET は PP2A を阻害することで Akt/mTORC1/p70S6K を活性化することが明らかになった。mTORC1 の基質として、p70S6K と 4EBP1 が知られているが、mTORC1 阻害剤 rapamycin は、p70S6K のリン酸化レベルを低下させるのに対して、4EBP1 のリン酸化レベルには影響を与えない (66–68)。一方、mTOR 阻害剤 torin 1 は双方のリン酸化レベルを低下させる (67, 68)。この違いは、rapamycin が FK506 binding protein 12 (FKBP12) と結合して mTOR の活性部位への基質のアクセスを阻害するのに対して、torin 1 は直接 mTOR の活性部位結合することに起因する (68)。HOS 細胞のコロニー形成に対しても、rapamycin の阻害効果がプラトーに達したのに対し、torin 1 はコロニー形成を完全に阻害し、rapamycin と torin 1 の作用機序の違いが反映された。興味深いことに、SET 発現抑制による Akt/mTORC1 シグナルの活性化は、p70S6K のリン酸化レベルを低下させたのに対して、4EBP1 のリン酸化レベルには影響を与えなかった。SET 発現抑制による Akt/mTORC1 シグナルの活性低下が、p70S6K のリン酸化レベルにのみ影響を与える理由は、解明できていない。

3-3-2 Bmi-1 のリン酸化とタンパク質分解

SET 発現抑制による Bmi-1 タンパク質発現量の減少は、PP2A 発現抑制によってレスキューされたことから、Bmi-1 の分解に PP2A が関与していることが示唆された。OA で HOS 細胞を処置したところ、Bmi-1 のバンドが上方にシフトし、Bmi-1 がリン酸化されたことが示唆された。このことから、PP2A が Bmi-1 のリン酸化レベルを制御し、タンパク質分解を誘導することが示唆されるが、長時間の OA 処置は HOS 細胞に対して毒性を示したことから、Bmi-1 タンパク質

の蓄積を観察することはできなかった。PP2A が Bmi-1 を直接脱リン酸化するという報告はこれまでになく、キナーゼの活性低下を介して間接的に脱リン酸化を誘導している可能性も否定できない。

本研究では、Akt シグナルの活性化による Bmi-1 タンパク質の蓄積が認められた。神経幹細胞では Akt シグナルの活性化によって Bmi-1 がリン酸化され、タンパク質が安定化することが報告されているが、これに関わる Bmi-1 のリン酸化部位は明らかになっていない (77)。一方、casein kinase 2 は Bmi-1 の Ser110 をリン酸化することでタンパク質を安定化する (82)。Bmi-1 Ser110 の直前の配列 (AANGpS) は、Akt のリン酸化モチーフと弱く一致しており、Akt もこの部位をリン酸化する可能性が考えられる (83)。また、マウス前立腺がんにおいて、Akt が Bmi-1 Ser251、Ser253 および Ser255 をリン酸化する可能性が示されているが、Bmi-1 タンパク質の増加は観察されておらず、タンパク質安定化への関与は不明である (84)。さらに、Bmi-1 阻害剤 PTC-596 は、Bmi-1 をリン酸化してタンパク質発現量を減少させることが報告されており (85, 86)、Bmi-1 のリン酸化とタンパク質分解の関係の解明にはさらなる検討が必要である。

3-3-3 SET による Bmi-1 安定化と CDKN2A

Bmi-1 は、正常細胞およびがん細胞において、幹細胞性の維持に寄与している。Bmi-1 は polycomb repressive complex 1 (PRC1) のサブユニットとして、細胞周期制御因子 p16 (Ink4a) とがん抑制因子 p19 (Arf) をコードする CDKN2A の転写を抑制し、幹細胞の自己複製を促進する (87, 88)。Liu らは、Akt が Bmi-1 Ser316 をリン酸化すると、Ink4a-Arf1 遺伝子座に対する転写抑制が阻害されることを報告している (89)。この結果は、Akt を介した Bmi-1 のリン酸化が幹細胞性を抑制することを示唆しており、我々の結果と一見矛盾する。しかし、HOS 細胞は

CDKN2A 遺伝子を欠失 (c.1_471del471) しており、p16/Ink4a や p19/Arf が幹細胞性に関わっていないことが、この違いを生じさせたと考えられる。興味深いことに、SET 発現抑制により Bmi-1 分解が誘導された sensitive 群の細胞株 (HOS、A673、MIA PaCa-2、A549) はすべて *CDKN2A* c.1_471del471 を有しており、insensitive 群の細胞株 (Saos-2、U2OS、HT-29、SH-SY5Y) は野生型 *CDKN2A* を有している。SET を介した Bmi-1 タンパク質の安定化に *CDKN2A* の転写産物が関与するかは、検討する価値があると考ええる。

3-3-4 *CDKN2A* 欠損細胞の幹細胞性維持における Bmi-1 の役割

CDKN2A c.1_471del471 を有する細胞において、Bmi-1 はどのように幹細胞性に寄与するのか？ Bmi-1 は様々ながん種において、Ink4a/Arf 非依存的に腫瘍の成長に寄与することが報告されている (90–92)。卵巣がんでは、Bmi-1 の抑制は ATP 枯渇を介してオートファジーを誘導する (93)。また、肝がんでは、Bmi-1 は TGF- β /Smad シグナルを抑制することでがんを悪性化する (94)。しかし GSEA では、SET 発現抑制により mTORC1 シグナルの抑制に起因したオートファジーの促進と、TGF- β シグナル伝達の抑制が認められた。したがって、オートファジーや TGF- β シグナルは SET/Akt/Bmi-1 軸による腫瘍促進には寄与していないと考えられる。Ink4a/Arf1 非依存的な Bmi-1 のがん促進機構については、さらなる解析が必要である。

3-3-5 Myc の高活性が SET 発現抑制による Bmi-1 タンパク質分解を引き起こす分子機構

HT-29 細胞では、SET 発現抑制によって Akt 活性が抑制されたにもかかわらず、Bmi-1 の発現は低下しなかった。この知見は、Bmi-1 分解が誘導されるには、

Akt 活性の抑制だけでは不十分であることを示唆している。公開データのトランスクリプトーム解析から、sensitive 群では Myc 活性が高いことが示され、insensitive な細胞に対して、c-Myc の過剰発現が SET 発現抑制による Bmi-1 分解を誘導することが明らかになった。Bmi-1 は、B 細胞リンパ腫において c-Myc と協同して腫瘍形成を促進するタンパク質として同定されており (95)、c-Myc 活性と Bmi-1 の機能には密接な関係があると考えられる。

Myc の高活性は、Bmi-1 タンパク質の分解に関わる因子の発現を誘導、もしくは安定化に関わる因子の発現を阻害することで、SET 発現抑制による Bmi-1 タンパク質分解に対する感受性に影響を与えると考えられる。Bmi-1 タンパク質の安定性には様々な因子が関与しており、ubiquitin-specific protease (USP) 15、USP22、basic transcription factor 3、O-GlcNAc transferase は Bmi-1 を安定化し (96–99)、 β -transducin repeat containing protein は Bmi-1 の分解を促進する (100)。しかし、トランスクリプトーム解析では、これらの因子のいずれについても sensitive 群と insensitive 群の間に差は認められなかった。Myc は幅広いシグナル伝達に影響を与えるマスターレギュレーターであるため、Myc 活性の高さと SET 発現抑制による Bmi-1 分解の関係については、様々な可能性を検証する必要があると考える。

3-3-6 総括

本章では、SET が PP2A を阻害することで Akt を活性化し、mTOR/p70S6K および Bmi-1 シグナルを促進してコロニー形成能およびスフェロイド形成能を高めることを明らかにした。SET による Bmi-1 タンパク質の安定化は複数のがん細胞株で確認され、この分子機構が Myc 活性の高い様々ながん種で悪性化に寄与している可能性を示した。

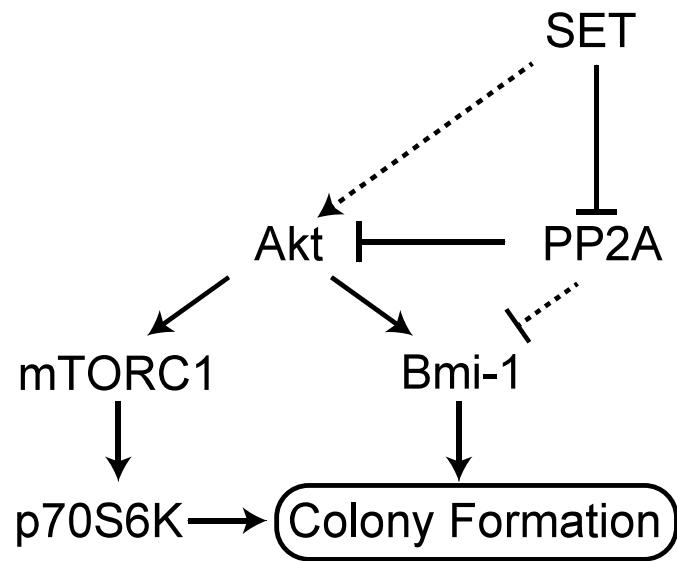


図 34 総括

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、コロニー形成能やスフェロイド形成能を高める可能性を示した。

第4章 総合討論

4-1 細胞種に依存した SET による幹細胞性維持機構の解明

がん幹細胞は「腫瘍組織中に少数存在する自己複製能と多分化能を持つ細胞」であり、がんの再発の原因となる。当研究室では以前、SET が、c-Myc もしくは E2F1 のタンパク質安定化を介して、広範ながん種の幹細胞性の維持に寄与することを報告した (10)。一方で、c-Myc や E2F1 に依存しない分子機構の存在も示唆されていた。本研究では、SET が PP2A 阻害を介して Akt を活性化し、Bmi-1 タンパク質を安定化することを示した。このように、SET による幹細胞性維持機構は、細胞種によって異なることが明らかになったが、この違いを生み出す分子機構は不明である。本研究では、その一端として、SET 発現抑制による Bmi-1 タンパク質分解に、Myc 活性の高さが鍵になることを明らかにした。

ヒト SET には、4つのアイソフォームが存在するが、SET α と SET β の2つのアイソフォームに関する研究が進んでいる (18, 101)。2つのアイソフォームは、主要なドメイン構造部分は完全に一致しているが、N 末端の数十アミノ酸が異なり、それぞれの機能に大きな影響を与える。慢性リンパ球性白血病患者では SET α /SET β 発現比が高いほど予後が悪いことが知られており (102, 103)、細胞種間の SET α /SET β 発現比の違いが、SET による幹細胞性維持機構の違いに関与している可能性も考えられる。

4-2 SET 阻害剤と既存の阻害剤の併用効果

当研究室では以前、SET はがん細胞の増殖よりも幹細胞性の維持に寄与することを明らかにした (10)。したがって、SET 阻害はがん幹細胞を標的とした抗がん戦略になる。一方で、SET 標的薬は細胞増殖を抑制しないことから、単剤では抗がん効果が限られると考えられる。実際、xenograft モデルでの胃がん細胞の成長に対して、SET 標的薬 OP449 の効果は限定的であった (10)。SET 標的薬

の効果を高めるためには、細胞周期に作用する既存の化学療法剤やキナーゼ阻害剤などの分子標的薬との併用が必要であると考えられる。

SET 標的薬 OP449 は、T 細胞性急性リンパ性白血病に対するマルチターゲットチロシンキナーゼ阻害剤 dovitinib との相乗的な効果や (104)、慢性骨髄性リンパ腫に対するチロシンキナーゼ Bcr-Abl 阻害剤 imatinib、nilotinib、dasatinib との併用効果 (105)、神経芽腫細胞株に対する dasatinib との相乗効果 (106)、膵管腺がんに対する mTOR 阻害剤 INK128 との相乗効果 (107)が報告されている。また、FTY720 は、急性骨髄性白血病に対する venetoclax および azacytidine との相乗効果や (108)、大腸がんに対する 5-Fluorouracil、SN-38、oxaliplatin、doxorubicin や etoposide (VP16) との相乗効果が明らかになっている (109, 110)。一方で、FTY720 は、cisplatin 耐性のメラノーマや肺癌において、cisplatin の効果を高めるのに対して (111, 112)、卵巣がん細胞においては、cisplatin に対する感受性に関わらず cisplatin の効果を減弱させることが報告されている (113)。FTY720 による cisplatin 抵抗性の付与には、オートファジー誘導が関与しており、オートファジー阻害剤 3-MA との 3 剤併用では細胞死が誘導された (113)。当研究室でも以前、イヌの乳腺腫瘍細胞で、SET 発現抑制が doxorubicin に対する抵抗性を付与することを報告しており (114)、SET 阻害剤と既存の抗がん剤の併用については、より詳細な検討が不可欠である。

4-3 PP2A 活性を標的とした抗がん剤の展望

PP2A は、A、B、C の 3 つのサブユニットによるヘテロ三量体のホロ酵素である。酵素活性をもつ C サブユニット (PP2Ac) が足場となる A サブユニットとコア 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。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

フォームが存在し、基質特異性や細胞内局在を調節する (115)。SET は、PP2Ac や一部の B サブユニットと直接結合し、その活性を抑制する (116–118)。様々ながん種で、SET を始めとした内因性の PP2A 阻害タンパク質の発現上昇が報告されており (16, 24–30)、PP2A 活性低下の原因になっている (11)。そのため、低下した PP2A 活性を回復させる治療戦略が注目され、PP2A 活性を直接的もしくは PP2A-SET の結合を標的とし間接的に回復させる抗がん戦略の創出が試みられている。

PP2A を直接活性化させる薬剤として perphenazine (PPZ) や small molecular activators of PP2A (SMAP) が知られている。フェノチアジン系向精神薬である 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用いられている。一方で、ヒト T 細胞性急性リンパ芽球性白血病細胞において、PPZ は PP2A 活性を上昇させ抗がん効果を発揮することが報告されている (119)。当研究室においても、PPZ がヒト非ホジキンリンパ腫細胞株に対し、PP2A 依存的に Akt を脱リン酸化することでアポトーシスを誘導することを報告している (120)。しかし、PPZ は選択性が低く高濃度では神経毒性を示すことから (121)、PP2A に対する選択性を高めたフェノチアジン類縁体の合成が求められる。

SMAP は、三環系向精神薬合成の中間体である dipenzapine をリード化合物とし開発された PP2A 活性化剤であり、PP2A-B56 複合体形成を促進することで PP2A 活性を高める (122, 123)。SMAP は、腭神経内分泌腫瘍、バーキットリンパ腫、トリプルネガティブ乳がん、多剤耐性慢性リンパ球性白血病など、様々ながん種に対して抗がん効果を発揮する (124–126)。しかし、PP2A に対する特異性に関する反証も存在し、注意が必要である (127)。

FTY720 (fingolimod) や OP449 は、SET と PP2A の結合を阻害することで、PP2A

を間接的に活性化させる。FTY720は、スフィンゴシン誘導体の免疫抑制剤であり、多発性硬化症の治療薬として承認されている。FTY720は、sphingosine kinase 2 (SPHK2) によってリン酸化されることで、免疫抑制効果を発揮する (128)。一方で、非リン酸化FTY720は、SETと結合してPP2Acから解離させ、PP2A活性を回復させる (129, 130)。SETは、coiled-coil domain (CD)、earmuff domain (ED)、acidic domain (AD) で構成されるタンパク質であり、CDを介して二量体を形成する (131, 132)。FTY720は、CDのGln29–Lys77領域に結合してSETの二量体化を抑制し、PP2AcとSETの結合を阻害する (117)。FTY720は、幅広いがん種で高い抗がん効果が示されているが、抗がん剤としての濃度では、リン酸化FTY720による心毒性や免疫抑制などの副作用が生じる (133, 134)。そこで、SPHK2によるリン酸化を受けないFTY720誘導体としてOSU-2Sが開発され、チロシンキナーゼ阻害剤抵抗性の慢性骨髄性白血病に対する効果が確認された (135)。また近年、非リン酸化FTY720のアナログであるCM-1231が、zebrafishで心毒性を示さずに、急性骨髄性白血病に対して、PP2A活性を上昇させ、抗がん効果を示すことが報告された (136)。今後、非リン酸化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。

細胞透過性ペプチドOP449は、apolipoprotein Eの受容体結合ドメインを元にしたペプチド模倣薬である (103)。OP449は、SETの177–277残基に結合し、PP2Aとの相互作用を阻害することでPP2A活性を回復させる (137)。OP449は、乳がん、膵臓がん、T細胞性急性リンパ性白血病など幅広いがん種で抗がん効果が報告されているが (16, 105, 129, 138)、現在この視点からの薬剤開発は進んでいない。

PP2A は、がん細胞内部では重要ながん抑制因子であるが、腫瘍免疫という観点では、がん促進因子としての側面を持つことが明らかになってきた。腫瘍免疫療法は、主にごんに対する免疫応答を増強することで抗がん効果を期待する治

療法であり、手術、放射線療法、化学療法に次ぐ、第4のがんの治療法として注目を集めている。免疫チェックポイント阻害薬（ICI）はがん細胞による免疫細胞の活性抑制を解除することでがんに対する免疫応答を高め、がん細胞を排除する。ICIは一部の患者に劇的な効果を示す一方で、その奏効率の低さが問題とされており、反応予測マーカーが求められてきた。DNA修復機能の欠損によるマイクロサテライト不安性（MSI）は、がん細胞にネオアンチゲンの産生を誘導することでICIに対する反応性を高めることから、反応予測マーカーとして機能する(139)。PP2Aの欠損や阻害は、がん細胞にMSIを誘導することでICIに対する反応性を高めることが報告されている(140)。

また、PP2Aの阻害は、免疫系の活性化を介してICIの効果を高める可能性が考えられる。PP2AはT cell receptor（TCR）刺激下のNFκBシグナルを抑制することでT細胞の活性を制限する(141, 142)。制御性T細胞特異的（Foxp3-Cre）なPP2Aの欠損は、肺、胃、膵臓、唾液腺など広範囲で炎症を引き起こす(143)。マクロファージ特異的（LysM-Cre）*Ppp2ca*（PP2Ac）KOマウスでは、xenograftモデルにおいて腫瘍微小環境中のIFN活性化マクロファージとCD8陽性T細胞が増加し、がん細胞の成長が抑制される(144)。さらに、*in vivo* shRNAスクリーニングから、PP2Aの調節サブユニットB55δの発現抑制が、CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞の増殖と腫瘍細胞内への浸潤を促進することが明らかになっている(145)。これらの背景のもと、PP2A活性を阻害する抗がん戦略についても注目が集まっている。

LB-100は、PP2Aに対する選択性を高めたPP1/PP2A阻害剤cantharidinのアナログである(146)。様々ながん種において、LB-100は化学療法や腫瘍免疫療法の効果を高めることが報告されており(147)、再発性の固形がんを対象とした第I相試験（NCT01837667）、再発性神経膠腫を対象とした第II相試験

(NCT03027388)、骨髄異形成症候群を対象とした第 I/II 相試験 (NCT03886662) がこれまでに終了している。これらの臨床試験を通して、LB-100 の安全性と抗がん剤としての有用性が評価され、現在 LIXIT 社が化学療法や腫瘍免疫療法との併用で、いくつかの臨床試験を進めている。しかし、LB-100 は、PP2A だけでなく PP5 の活性も阻害する可能性が指摘されているなど (148)、PP2A に対する選択性には疑問が残り、LB-100 の抗がん効果の分子機構についてはさらなる解析が必要である。

腫瘍免疫における SET の役割に関する情報は少ないが、マクロファージ特異的 (LysM-Cre) *Set* KO マウスでは、腫瘍関連マクロファージ (TAM) の腫瘍内低酸素領域への浸潤が抑制されることで、TAM の抗腫瘍活性が高まることが報告されている (149)。一方、制御性 T 細胞においては、ceramide 合成が促進しているため SET が阻害され、PP2A 活性が上昇して免疫抑制活性が高まる (143)。したがって、SET 阻害が腫瘍免疫に与える影響は状況依存的であると考えられる。PP2A に関しても、T 細胞特異的 (Lck-Cre) な *Ppp2ca* (PP2A α) KO、*Ppp2r2a* (B55 α) KO、*Ppp2r2d* (B55 δ) KO マウスにおいて、自己免疫疾患モデルの症状が軽減することが報告されており (150–152)、PP2A 活性の抑制が必ずしも免疫の活性化をもたらすわけではない。各 PP2A 複合体やその阻害タンパク質が、各細胞種でどのような機能を果たしているかを理解することが、PP2A を標的とした抗がん戦略実現に不可欠である。

第5章 実験材料および実験方法

5-1 細胞培養方法

ヒト骨肉腫細胞株 U2OS、ヒト乳がん細胞株 MCF7、ヒト肺がん細胞株 A549、ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2、ヒト胎児腎臓上皮細胞株 293T、イヌ腎臓尿管上皮細胞株 MDCK、マウス胎児線維芽細胞 MEF、ヒト結腸がん細胞株 SW620、HT-29、ヒト Ewing 肉腫細胞株 A673、ヒト神経芽種細胞株 SH-SY5Y、ヒト肺がん細胞株 A549 は 1% antibiotic-antimycotic (AA、Thermo Scientific)、10% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培地として用いて、37°C、5% CO₂ に保ったインキュベーターで培養した。ヒト骨肉腫細胞株 HOS、Saos-2、ヒト T 細胞リンパ腫細胞株 HUT78 は DMEM の代わりに RPMI1640 Medium を培地として用いた。マウス結腸上皮細胞株 aMoC1 は 1% antibiotic-antimycotic、5% FBS、1% insulin transferrin selenium X (ITS、life technologies) を含む DMEM を培地として用いた。継代は培地をサクシオンで吸って除去し、HEPES buffered saline (HBS: 25 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4) で一回洗浄した後に、0.05% trypsin、0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 含有 HBS を加え、ピペッティングにより細胞を剥がして行った。

HOS、Saos-2、U2OS、MCF7、A549、HUT78、293T、MDCK 細胞は 6 well プレートに 0.5×10^6 個および 2.0×10^6 個播いたものをそれぞれ低細胞密度 (Low) および高細胞密度 (High) とした。MIA PaCa-2、aMoC1、MEF 細胞は Low を 0.3×10^6 個、High を 1.0×10^6 個とした。

5-2 プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製

5-2-1 プラスミドの作製

N 末端側に 3×FLAG タグを付加したヒト SET、ヒト Bmi-1、ヒト SETBP1 G870S、C 末端側に 3×FLAG タグを付加したヒト myr-Akt は目的の遺伝子を PCR により増幅し、InFusion HD Cloning Kit (Takara Bio) を用いてベクターに組み込んだ。

CRISPR による SETBP1 遺伝子のノックアウトには、lentiCRISPR v2 システム (153) を用いた。使用した guide RNA は以下の通りである。

SETBP1 target sgRNA (sgSETBP1) : 5'-TCGAAGCATAGCCGGAGGTT-3'

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'

PP2Ac target shRNA (shPP2Ac) : 5'-GATACACTGGATCATATCA-3'

Bmi-1 target shRNA (shBmi-1) : 5'-AGAGTTCGACCTACTTGTA-3'

siRNA プラスミドは Dharmacon から購入した (ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #1 および ON-TARGETplus Human SETBP1 siRNA-SMARTpool)。Dox 誘導性 shRNA 発現プラスミド pTRIPZ は Horizon から購入した (Non-target shRNA : RHS4743、SET target shRNA : RHS4696-201903403 および RHS4696-201904577)。

5-2-2 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 HST08 (Takara Bio) 10 μL にプラスミドを 0.5 μl 加え、氷上で 30 分間

静置した。ドライバスで 42°C、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 super optimal broth with catabolite repression (SOC) medium を加え、37°C、200 rpm で 1 時間振とう培養 (BioShaker BR-22FP、Taitec) した。その後、LB agar (ampicillin 100 μ g/ml 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、5.0 ml の LB Broth (ampicillin 100 μ g/ml 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、Plasmid Mini Kit I (Omega) を使用してプラスミドを抽出した。

5-2-3 プラスミドのトランスフェクション

6 well プレートに細胞を 2.0×10^5 個播き一晩培養した。200 μ l の Opti-MEM にプラスミド 1.0 μ g および 2.5 μ l の Polyethylenimine “MAX” (PEI、Polysciences) を混合した後 30 分間静置し、1.0 ml の培地 (10% FBS・1% AA 含有 DMEM) に加え 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表面積に応じて、適宜調整し使用した。

5-2-4 レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入

6 well プレートに 293T 細胞を 4.0×10^5 個播き一晩培養した。各種レンチウイルスベクタープラスミド (1.0 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 (Thermo Fisher) 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、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 μ m のフィルターでろ過し、レンチウイルス

スペクターを得た。その後細胞を、Polybrene (5 µg/ml、OMEGA) を添加したウイルススペクターを含む培地で8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。

5-3 タンパク質発現量の定量法

5-3-1 タンパク質抽出

培地を除去した細胞を HBS で洗浄し、lysate buffer (50 mM Tris-HCl、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、0.01% triton X-100、1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor cocktail、pH 8.0) を加えて細胞を可溶化した。5分間氷上で静置した後に、得られた細胞懸濁液を 4°C、15,000 g で15分間遠心 (テーブルトップマイクロ冷却遠心機 3500、KUBOTA) し、上清をタンパク質サンプルとして使用した。

5-3-2 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。等量の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 または ATTO) 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) を用いて室温で 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)、Amersham

ImageQuant 800 (Cytiva)、または LuminoGraph II EM (ATTO) で観察した。イメージスキャナーで取り込んだ画像のバンド濃度は、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抗 p97/VCP 抗体を用いた。

5-4 Real-time PCR 法

TRIzol Reagents (Invitrogen) を用いて細胞から全 RNA を抽出し、RNA 0.5 μ g を QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて逆転写した。合成された cDNA は QuantiTect SYBR Green I Kit (Qiagen) または THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Kit (TOYOBO) を用いて PCR を行った。PCR 反応は熱変性 (94°C、15 秒間)、アニーリング (60°C、30 秒間)、伸長 (72°C、30 秒間) を 40 サイクルまで行った。MicroRNA については Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio) を用いて逆転写し、Mir-X miRNA TB Green qRT-PCR Kit (Takara Bio) を用いて PCR を行った。PCR 反応は熱変性 (95°C、5 秒間)、アニーリングおよび伸長 (60°C、20 秒間) を 40 サイクルまで行った。*SET* および *SETBP1* mRNA 発現量は β 2-microglobulin (*B2M*) および TATA box binding protein (*TBP*) の発現量で、miR-199b 発現量は miR-191 3p の発現量で、*BMI1* mRNA 発現量は *ACTB* または *GAPDH* の発現量を用いて標準化し、comparative Ct ($2^{-(\Delta Ct-Cc)}$) method で表した。使用したプライマーは (表 1) に示した。

表 1 Real-time PCR に使用したプライマー

プライマー		配列
β2-microglobulin (human)	forward	CGGGCATTCTGAAGCTGA
	reverse	GGATGGATGAAACCCAGACACAT
TATA box binding protein (human)	forward	TGCTGCGGTAATCATGAGGATA
	reverse	TGAAGTCCAAGAAGCTTAGCTGGAA
SET (human)	forward	GGACAGTTGCTGGCATGTCTTC
	reverse	CAGGGACAGTTACTGCTCACCAT
SETBP1 (human)	forward	AGATCAAGATCACCATCAAGCAGTC
	reverse	AGGTCACTGGCTGCAAGGTC
miR-191 3p (human)	forward	GCUGCGCUUGGAUUUCGUCCCC
miR-199b (human)	forward	GAGGACACCTCCACTCCGTCTA
ACTB (human)	forward	TGGCACCCAGCACAATGAA
	reverse	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA
GAPDH (human)	forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	reverse	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
Bmi-1 (human)	forward	CTGCAGCTCGCTTCAAGATG
	reverse	TTAGCTCAGTGATCTTGATTCTC

プライマー	メーカー
β2-microglobulin	Takara Bio (HA067806)
TATA box binding protein	Takara Bio (HA067808)
SET	Takara Bio (HA189701)
SETBP1	Takara Bio (HA143141)
miR-191 3p	SIGMA (MIRAP00227)
miR-199b	Takara Bio (HA199107)
ACTB	Takara Bio (HA067803)
GAPDH	Takara Bio (HA067812)
Bmi-1	Takara Bio (HA152363)

5-5 Cycloheximide chase assay

6 well プレートに U2OS 細胞を 0.5×10^6 もしくは 2.0×10^6 個播き、24 時間後に cycloheximide (CHX、100 $\mu\text{g/ml}$) で処置した。0、8、24 時間後に細胞からタンパク質を抽出し、western blotting で SET 発現量を解析した。

5-6 コロニー形成試験

6 well プレートに細胞を 1.0×10^2 もしくは 1.0×10^3 個播き、翌日各種試薬を加え、さらに7日間培養した。細胞を HBS で洗浄後、99.5% ethanol (Wako) で固定した。再度 HBS で洗浄後、ギムザ染色 (Muto pure chemicals) もしくはグラム染色 (Hayashi pure chemicals) を用いて可視化した。形成されたコロニーの面積は ImageJ を用いて解析した。

5-7 スフェロイド形成試験

PrimeSurface plate 24F (FUJIFILM) に細胞を 1.0×10^3 もしくは 3.0×10^3 個播き、4 日間培養した。細胞を回収しトリプシンで一晩処置した後に、細胞計算盤を用いて細胞数をカウントした。

5-8 細胞増殖試験

24 well プレートに細胞を 1.0×10^4 個播き、4 日後に cell counting kit 8 (CCK-8; Dojindo) を用いて、細胞増殖率を解析した。

5-9 免疫蛍光染色法

6 well プレートに細胞を 2.5×10^5 個播き、dox (500 ng/ml) で処置した。2 日後、ガラスプレート上に細胞を 2.5×10^5 個播いた。翌日、PBS (137 mM NaCl、

2.7 mM KCl、1.76 mM KH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄) で洗浄後、4% paraformaldehyde (Wako) を用いて室温で 20 分間固定した。PBS で洗浄後、0.05% Triton-X 含有 PBS で、室温、5 分間振とう (Wave-SI、TAITEC) することで脱膜化を行った。その後、0.2%ゼラチン含有 PBS を用いて、室温で 20 分間振とうすることでブロッキングを行った。一次抗体を 0.2%ゼラチン含有 PBS もしくは PBS で希釈し、4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、遮光して二次抗体を 60 分間反応させた。標本は ProLong Gold with DAPI (Thermo Fisher Scientific) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 710、Zeiss) を用いて観察した。

使用した一次抗体と二次抗体は、以下の通りである。Rabbit anti-mTOR (1:400、Cell Signaling Technology)、mouse anti-Lamp1 (1:400、Santa Cruz H4A3)、anti-rabbit Alexa-488 (1:200、Invitrogen)、anti-mouse Alexa-568 (1:200、Invitrogen)。

5-10 Transcriptome analysis

6 well プレートに HOS 細胞を 2.5×10^5 個播き、dox (500 ng/ml) で 2 日間処置した。TRIzol Reagents (Invitrogen) を用いて抽出した RNA を RNA-seq (Bioengineering Lab) に用いた。総 RNA の濃度は、Quantus Fluorometer および QuantiFluor RNA system (Promega) を用いて測定した。Fragment Analyzer System および Agilent HS RNA Kit (Agilent Technologies) を用いて総 RNA のクオリティを確認した。MGIEasy RNA Directional Library Prep Set (MGI Tech Co Ltd) のマニュアルに従ってライブラリーを調製し、調製したライブラリーの濃度を Synergy LX (Waken) および QuantiFluor dsDNA System (Promega) を用いて測定した。Fragment Analyzer および dsDNA Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies) を用いて作製したライブラリーの品質を確認した。DNBSEQ G400 RS High throughput Sequencing Kit (MGI Tech) を用いて DNA ナノボール (DNB) を調製

した。DNBSEQ G400 (MGI Tech) を用いて、 2×100 bp で塩基配列を決定し、FASTQ ファイルを作成した。生データは Gene Expression Omnibus (GEO) にアクセス番号 GSE235621 として登録した。得られた次世代シーケンスデータは、TrimGalore (バージョン 0.6.6) を用いてクリーニングとクオリティチェックを行い、HISAT2 (バージョン 2.2.1) を用いて参照ゲノム (hg38) にマッピングした。断片化されたフラグメントは、StringTie (version 2.1.5) を用いて、transcripts per million 法で正規化した。Dox 処理によって誘導された shNT および shSET を発現する HOS 細胞のデータセットに関して、サンプル間の平均カウント数が 10 以下の遺伝子を排除し、エンリッチメント解析 (GSEA : バージョン 4.2.2) (154) を行った。DEGs は TCC-GUI を用いて、fold change と p 値のカットオフ値をそれぞれ -1.5 から +1.5 と 0.01 に設定し抽出した。

5-11 統計処理

実験成績は平均±標準偏差で示した。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 を行った後に Fisher's 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。

5-12 使用抗体および薬物

使用した抗体を表 2、薬物を表 3 に示した

表 2 使用抗体リスト

抗体	宿主	メーカー	型番
Atg7	Rabbit	Cell Signaling	8588
c-Myc	Rabbit	Cell Signaling	D84C12
LC3	Rabbit	MBL	PM-036
p62/SQSTM1	Rabbit	MBL	PM-045
p97/VCP	Rabbit	Gene Tex	GTX113030
SET	Mouse	Santa Cruz	sc-133138
SET	Goat	Santa Cruz	sc-5655
SETBP1	Rabbit	Bioss	bs-4944R
c-Myc	Rabbit	Cell Signaling	18583
c-Myc	Rabbit	Cell Signaling	5605
E2F1	Rabbit	abcam	ab179445
Akt	Mouse	Cell Signaling	2920
p-Akt Ser473	Rabbit	Cell Signaling	4060
p-Akt Thr308	Rabbit	Cell Signaling	13038
p70S6K	Rabbit	Santa Cruz	sc-230
p-p70S6K Thr389	Rabbit	Cell Signaling	3001
Bmi-1	Mouse	Novus	NBP1-96140
FLAG	Rabbit	Sigma	F7425
Ring1B	Mouse	MBL	D139-3
4EBP1	Rabbit	Cell Signaling	9452
p-4EBP1 Thr37/46	Rabbit	Cell Signaling	2855
PDK1	Rabbit	Cell Signaling	3062
p-PDK1 Ser241	Rabbit	Cell Signaling	3438

表 3 使用薬物リスト

使用薬物	購入元
Bafilomycin (Baf)	LC laboratory
Cycloheximide (CHX)	Wako
MG132	Cayman CHEMICAL
Doxycycline (dox)	LKT laboratory
Okadaic acid (OA)	LC laboratory
Akt inhibitor VIII	ChemScene LLC
Rapamycin	LC laboratory
Torin 1	Tocris Bioscience

引用文献

1. Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. **80**, 225–236
2. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. **127**, 635–648
3. Brautigan, D. L. (2013) Protein Ser/ Thr phosphatases – the ugly ducklings of cell signalling. *The FEBS Journal*. **280**, 324–325
4. Lin, X. H., Walter, J., Scheidtmann, K., Ohst, K., Newport, J., and Walter, G. (1998) Protein phosphatase 2A is required for the initiation of chromosomal DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 14693–14698
5. 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**, 417–439
6. Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci*. **22**, 1942–1950
7. Goyns, M. H., and Hancock, B. W. (1991) Importance of oncogene research to the cancer clinician. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. **3**, 168–176
8. Kuo, Y.-C., Huang, K.-Y., Yang, C.-H., Yang, Y.-S., Lee, W.-Y., and Chiang, C.-W. (2008) Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem*. **283**, 1882–1892
9. Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G.,

Hahn, W. C., Stukenberg, P. T., Shenolikar, S., Uchida, T., Counter, C. M., Nevins, J. R., Means, A. R., and Sears, R. (2004) A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol.* **6**, 308–318

10. 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.* **16**, 554–563

11. 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

12. von Lindern, M., van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeijer, 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

13. 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

14. Dacol, E. C., Wang, S., Chen, Y., and Lepique, A. P. (2021) The interaction of SET and protein phosphatase 2A as target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* **1876**, 188578

15. 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

16. 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.* **12**, 924–939
17. Kadota, S., and Nagata, K. (2014) Silencing of IFN-stimulated gene transcription is regulated by histone H1 and its chaperone TAF-I. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7642–7653
18. Kajitani, K., Kato, K., and Nagata, K. (2017) Histone H1 chaperone activity of TAF-I is regulated by its subtype-dependent intramolecular interaction. *Genes Cells.* **22**, 334–347
19. Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., and Horikoshi, M. (2007) Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 4285–4290
20. Gamble, M. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Freedman, L. P., and Fisher, R. P. (2005) The histone chaperone TAF-I/SET/INHAT is required for transcription in vitro of chromatin templates. *Mol Cell Biol.* **25**, 797–807
21. Miyamoto, S., Suzuki, T., Muto, S., Aizawa, K., Kimura, A., Mizuno, Y., Nagino, T., Imai, Y., Adachi, N., Horikoshi, M., and Nagai, R. (2003) Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA-binding domain. *Mol Cell Biol.* **23**, 8528–8541
22. Wang, D., Kon, N., Lasso, G., Jiang, L., Leng, W., Zhu, W.-G., Qin, J., Honig, B., and Gu, W. (2016) Acetylation-regulated interaction between p53 and SET reveals a widespread regulatory mode. *Nature.* **538**, 118–122

23. ten Klooster, J. P., Leeuwen, I. v, Scheres, N., Anthony, E. C., and Hordijk, P. L. (2007) Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J.* **26**, 336–345
24. 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. *PNAS.* **111**, 9157–9162
25. Neviani, P., Santhanam, R., Trotta, R., Notari, M., Blaser, B. W., Liu, S., Mao, H., Chang, J. S., Galiotta, 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
26. Cristóbal, I., Garcia-Orti, L., Cirauqui, C., Cortes-Lavaud, X., García-Sánchez, M. A., Calasanz, M. J., and Odero, M. D. (2012) Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *l.* **97**, 543–550
27. 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
28. 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

29. Yuan, X., Zhang, T., Zheng, X., Zhang, Y., Feng, T., Liu, P., Sun, Z., Qin, S., Liu, X., Zhang, L., Song, J., and Liu, Y. (2017) Overexpression of SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human gastric cancer. *Oncol Rep.* **38**, 1733–1741
30. Tozuka, K., Wongsirisin, P., Nagai, S. E., Kobayashi, Y., Kanno, M., Kubo, K., Takai, K., Inoue, K., Matsumoto, H., Shimizu, Y., and Suganuma, M. (2021) Deregulation of protein phosphatase 2A inhibitor SET is associated with malignant progression in breast cancer. *Sci Rep.* **11**, 14238
31. Xu, S., Duan, P., Li, J., Senkowski, T., Guo, F., Chen, H., Romero, A., Cui, Y., Liu, J., and Jiang, S.-W. (2016) Zinc Finger and X-Linked Factor (ZFX) Binds to Human SET Transcript 2 Promoter and Transactivates SET Expression. *Int J Mol Sci.* 10.3390/ijms17101737
32. 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
33. Chao, A., Tsai, C.-L., Wei, P.-C., Hsueh, S., Chao, A.-S., Wang, C.-J., Tsai, C.-N., Lee, Y.-S., Wang, T.-H., and Lai, C.-H. (2010) Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Lett.* **291**, 99–107
34. 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

35. Cristóbal, I., Rubio, J., Santos, A., Torrejón, B., Caramés, C., Imedio, L., Mariblanca, S., Luque, M., Sanz-Alvarez, M., Zazo, S., Madoz-Gúrpide, J., Rojo, F., and García-Foncillas, J. (2020) MicroRNA-199b Downregulation Confers Resistance to 5-Fluorouracil Treatment and Predicts Poor Outcome and Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Cancers*. **12**, 1655
36. Han, D., Wang, L., Long, L., Su, P., Luo, D., Zhang, H., Li, Z., Chen, B., Zhao, W., Zhang, N., Wang, X., Liang, Y., Li, Y., Hu, G., and Yang, Q. (2022) The E3 Ligase TRIM4 Facilitates SET Ubiquitin-Mediated Degradation to Enhance ER- α Action in Breast Cancer. *Adv Sci (Weinh)*. **9**, e2201701
37. Cristóbal, I., Blanco, F. J., Garcia-Orti, L., Marcotegui, N., Vicente, C., Rifon, J., Novo, F. J., Bandres, E., Calasanz, M. J., Bernabeu, C., and Odero, M. D. (2010) SETBP1 overexpression is a novel leukemogenic mechanism that predicts adverse outcome in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. **115**, 615–625
38. Eagle, H., and Levine, E. M. (1967) Growth regulatory effects of cellular interaction. *Nature*. **213**, 1102–1106
39. Abercrombie, M., Heaysman, J. E., and Karthausser, H. M. (1957) Social behaviour of cells in tissue culture. III. Mutual influence of sarcoma cells and fibroblasts. *Exp Cell Res*. **13**, 276–291
40. Abercrombie, M., and Heaysman, J. E. (1954) Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts. *Exp Cell Res*. **6**, 293–306
41. Abercrombie, M. (1979) Contact inhibition and malignancy. *Nature*. **281**, 259–262

42. Mendonsa, A. M., Na, T.-Y., and Gumbiner, B. M. (2018) E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*. **37**, 4769–4780
43. Guo, M.-L., Sun, M.-X., Lan, J.-Z., Yan, L.-S., Zhang, J.-J., Hu, X.-X., Xu, S., Mao, D.-H., Yang, H.-S., Liu, Y.-W., and Chen, T.-X. (2019) Proteomic analysis of the effects of cell culture density on the metastasis of breast cancer cells. *Cell Biochem Funct*. **37**, 72–83
44. Ma, C., Liu, Y., and He, L. (2009) MicroRNAs - powerful repression comes from small RNAs. *Sci China C Life Sci*. **52**, 323–330
45. Piazza, R., Valletta, S., Winkelmann, N., Redaelli, S., Spinelli, R., Pirola, A., Antolini, L., Mologni, L., Donadoni, C., Papaemmanuil, E., Schnittger, S., Kim, D.-W., Boultonwood, J., Rossi, F., Gaipa, G., De Martini, G. P., di Celle, P. F., Jang, H. G., Fantin, V., Bignell, G. R., Magistrini, V., Haferlach, T., Pogliani, E. M., Campbell, P. J., Chase, A. J., Tapper, W. J., Cross, N. C. P., and Gambacorti-Passerini, C. (2013) Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*. **45**, 18–24
46. Basurto-Islas, G., Grundke-Iqbal, I., Tung, Y. C., Liu, F., and Iqbal, K. (2013) Activation of asparaginyl endopeptidase leads to Tau hyperphosphorylation in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. **288**, 17495–17507
47. Abercrombie, M., and Heaysman, J. E. M. (1953) Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. *Experimental Cell Research*. **5**, 111–131
48. Mayor, R., and Carmona-Fontaine, C. (2010) Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol*. **20**, 319–328
49. McClatchey, A. I., and Yap, A. S. (2012) Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr Opin Cell Biol*. **24**, 685–694

50. Oshima, H., and Oshima, M. (2013) The role of PGE2-associated inflammatory responses in gastric cancer development. *Semin Immunopathol.* **35**, 139–150
51. Silvestri, G., Trotta, R., Stramucci, L., Ellis, J. J., Harb, J. G., Neviani, P., Wang, S., Eisfeld, A.-K., Walker, C. J., Zhang, B., Srutova, K., Gambacorti-Passerini, C., Pineda, G., Jamieson, C. H. M., Stagno, F., Vigneri, P., Nteliopoulos, G., May, P. C., Reid, A. G., Garzon, R., Roy, D.-C., Moutouou, M. M., Guimond, M., Hokland, P., Deininger, M. W., Fitzgerald, G., Harman, C., Dazzi, F., Milojkovic, D., Apperley, J. F., Marcucci, G., Qi, J., Polakova, K. M., Zou, Y., Fan, X., Baer, M. R., Calabretta, B., and Perrotti, D. (2020) Persistence of Drug-Resistant Leukemic Stem Cells and Impaired NK Cell Immunity in CML Patients Depend on MIR300 Antiproliferative and PP2A-Activating Functions. *Blood Cancer Discov.* **1**, 48–67
52. Zhong, J., Ren, X., Chen, Z., Zhang, H., Zhou, L., Yuan, J., Li, P., Chen, X., Liu, W., Wu, D., Yang, X., and Liu, J. (2019) miR-21-5p promotes lung adenocarcinoma progression partially through targeting SET/TAF-1 α . *Life Sci.* **231**, 116539
53. Milani, M., Rzymiski, T., Mellor, H. R., Pike, L., Bottini, A., Generali, D., and Harris, A. L. (2009) The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res.* **69**, 4415–4423
54. Wu, W. K. K., Cho, C. H., Lee, C. W., Wu, Y. C., Yu, L., Li, Z. J., Wong, C. C. M., Li, H. T., Zhang, L., Ren, S. X., Che, C. T., Wu, K., Fan, D., Yu, J., and Sung, J. Y. (2010) Macroautophagy and ERK phosphorylation counteract the antiproliferative effect of proteasome inhibitor in gastric cancer cells. *Autophagy.* **6**, 228–238
55. Wang, X. J., Yu, J., Wong, S. H., Cheng, A. S., Chan, F. K., Ng, S. S., Cho, C.

H., Sung, J. J., and Wu, W. K. (2013) A novel crosstalk between two major protein degradation systems: Regulation of proteasomal activity by autophagy. *Autophagy*. **9**, 1500–1508

56. Beresford, P. J., Zhang, D., Oh, D. Y., Fan, Z., Greer, E. L., Russo, M. L., Jaju, M., and Lieberman, J. (2001) Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem*. **276**, 43285–43293

57. Minakuchi, M., Kakazu, N., Gorrin-Rivas, M. J., Abe, T., Copeland, T. D., Ueda, K., and Adachi, Y. (2001) Identification and characterization of SEB, a novel protein that binds to the acute undifferentiated leukemia-associated protein SET: Identification and characterization of SEB. *European Journal of Biochemistry*. **268**, 1340–1351

58. Hoischen, A., van Bon, B. W. M., Gilissen, C., Arts, P., van Lier, B., Steehouwer, M., de Vries, P., de Reuver, R., Wieskamp, N., Mortier, G., Devriendt, K., Amorim, M. Z., Revencu, N., Kidd, A., Barbosa, M., Turner, A., Smith, J., Oley, C., Henderson, A., Hayes, I. M., Thompson, E. M., Brunner, H. G., de Vries, B. B. A., and Veltman, J. A. (2010) De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat Genet*. **42**, 483–485

59. Makishima, H., Yoshida, K., Nguyen, N., Przychodzen, B., Sanada, M., Okuno, Y., Ng, K. P., Gudmundsson, K. O., Vishwakarma, B. A., Jerez, A., Gomez-Segui, I., Takahashi, M., Shiraishi, Y., Nagata, Y., Guinta, K., Mori, H., Sekeres, M. A., Chiba, K., Tanaka, H., Muramatsu, H., Sakaguchi, H., Paquette, R. L., McDevitt, M. A., Kojima, S., Sauntharajah, Y., Miyano, S., Shih, L.-Y., Du, Y., Ogawa, S., and Maciejewski, J. P. (2013) Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat*

Genet. **45**, 942–946

60. Masoud, G. N., and Li, W. (2015) HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* **5**, 378–389
61. Bienz, M. (2005) beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol.* **15**, R64-67
62. Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., and Sasaki, H. (2011) Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development.* **138**, 3907–3914
63. Herzig, S., and Shaw, R. J. (2018) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **19**, 121–135
64. Ishiguro, T., Ohata, H., Sato, A., Yamawaki, K., Enomoto, T., and Okamoto, K. (2017) Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* **108**, 283–289
65. Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., and Sabatini, D. M. (2012) A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature.* **485**, 109–113
66. Choo, A. Y., Yoon, S.-O., Kim, S. G., Roux, P. P., and Blenis, J. (2008) Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 17414–17419
67. Yip, C. K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D. M., and Kang, S. A. (2010) Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell.* **38**, 768–774
68. Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L. J., Sim, T., Sabatini, D. M., and Gray, N. S. (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of

mTORC1. *J Biol Chem.* **284**, 8023–8032

69. Kohn, A. D., Takeuchi, F., and Roth, R. A. (1996) Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J Biol Chem.* **271**, 21920–21926

70. Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., and Zhang, Y. (2004) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature.* **431**, 873–878

71. Cao, R., Tsukada, Y.-I., and Zhang, Y. (2005) Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell.* **20**, 845–854

72. Mourgues, L., Imbert, V., Nebout, M., Colosetti, P., Neffati, Z., Lagadec, P., Verhoeven, E., Peng, C., Duprez, E., Legros, L., Rochet, N., Maguer-Satta, V., Nicolini, F.-E., Mary, D., and Peyron, J.-F. (2015) The BMI1 polycomb protein represses cyclin G2-induced autophagy to support proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia.* **29**, 1993–2002

73. Chiba, T., Seki, A., Aoki, R., Ichikawa, H., Negishi, M., Miyagi, S., Oguro, H., Saraya, A., Kamiya, A., Nakauchi, H., Yokosuka, O., and Iwama, A. (2010) Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and -independent manners in mice. *Hepatology.* **52**, 1111–1123

74. Fan, C., He, L., Kapoor, A., Gillis, A., Rybak, A. P., Cutz, J.-C., and Tang, D. (2008) Bmi1 promotes prostate tumorigenesis via inhibiting p16(INK4A) and p14(ARF) expression. *Biochim Biophys Acta.* **1782**, 642–648

75. Wu, Z., Min, L., Chen, D., Hao, D., Duan, Y., Qiu, G., and Wang, Y. (2011) Overexpression of BMI-1 promotes cell growth and resistance to cisplatin treatment in osteosarcoma. *PLoS One.* **6**, e14648

76. Proctor, E., Waghray, M., Lee, C. J., Heidt, D. G., Yalamanchili, M., Li, C., Bednar, F., and Simeone, D. M. (2013) Bmi1 enhances tumorigenicity and cancer stem cell function in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*. **8**, e55820
77. Kim, J., Hwangbo, J., and Wong, P. K. Y. (2011) p38 MAPK-Mediated Bmi-1 down-regulation and defective proliferation in ATM-deficient neural stem cells can be restored by Akt activation. *PLoS One*. **6**, e16615
78. Nguyen, T. U., Hector, H., Pederson, E. N., Lin, J., Ouyang, Z., Wendel, H.-G., and Singh, K. (2023) Rapamycin-Induced Feedback Activation of eIF4E-EIF4A Dependent mRNA Translation in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. **15**, 1444
79. Wan, X., Harkavy, B., Shen, N., Grohar, P., and Helman, L. J. (2007) Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*. **26**, 1932–1940
80. Zaczek, A., Józwiak, P., Ciesielski, P., Forma, E., Wójcik-Krowiranda, K., Cwonda, Ł., Bieńkiewicz, A., Bryś, M., and Krześlak, A. (2020) Relationship between polycomb-group protein BMI-1 and phosphatases regulating AKT phosphorylation level in endometrial cancer. *J Cell Mol Med*. **24**, 1300–1310
81. Wang, M.-C., Jiao, M., Wu, T., Jing, L., Cui, J., Guo, H., Tian, T., Ruan, Z., Wei, Y.-C., Jiang, L.-L., Sun, H.-F., Huang, L.-X., Nan, K.-J., and Li, C.-L. (2016) Polycomb complex protein BMI-1 promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer stem cells by activating PI3K/AKT signaling, an ex vivo, in vitro, and in vivo study. *Oncotarget*. **7**, 9586–9599
82. Banerjee Mustafi, S., Chakraborty, P. K., Dwivedi, S. K. D., Ding, K., Moxley, K. M., Mukherjee, P., and Bhattacharya, R. (2017) BMI1, a new target of CK2 α . *Mol Cancer*. **16**, 56

83. Johnson, J. L., Yaron, T. M., Huntsman, E. M., Kerelsky, A., Song, J., Regev, A., Lin, T.-Y., Liberatore, K., Cizin, D. M., Cohen, B. M., Vasan, N., Ma, Y., Krismer, K., Robles, J. T., van de Kooij, B., van Vlimmeren, A. E., Andrée-Busch, N., Käufer, N. F., Dorovkov, M. V., Ryazanov, A. G., Takagi, Y., Kasthuber, E. R., Goncalves, M. D., Hopkins, B. D., Elemento, O., Taatjes, D. J., Maucuer, A., Yamashita, A., Degterev, A., Uduman, M., Lu, J., Landry, S. D., Zhang, B., Cossentino, I., Linding, R., Blenis, J., Hornbeck, P. V., Turk, B. E., Yaffe, M. B., and Cantley, L. C. (2023) An atlas of substrate specificities for the human serine/threonine kinome. *Nature*. **613**, 759–766
84. Nacerddine, K., Beaudry, J.-B., Gijjala, V., Westerman, B., Mattioli, F., Song, J.-Y., van der Poel, H., Ponz, O. B., Pritchard, C., Cornelissen-Steijger, P., Zevenhoven, J., Tanger, E., Sixma, T. K., Ganesan, S., and van Lohuizen, M. (2012) Akt-mediated phosphorylation of Bmi1 modulates its oncogenic potential, E3 ligase activity, and DNA damage repair activity in mouse prostate cancer. *J Clin Invest*. **122**, 1920–1932
85. Kim, M. J., Cao, L., Sheedy, J., Risher, N., Dumble, M., Lee, C.-S., Sydorenko, N., Baiazitov, R., Du, W., Moon, Y.-C., Weetall, M. L., Colacino, J., and Davis, T. W. (2014) PTC596-induced Bmi1 hyper-phosphorylation via Cdk1/2 activation resulting in tumor stem cell depletion. *Cancer Research*. **74**, 5517–5517
86. Maeda, A., Nishida, Y., Weetall, M., Cao, L., Branstrom, A., Ishizawa, J., Nii, T., Schober, W. D., Abe, Y., Matsue, K., Yoshimura, M., Kimura, S., and Kojima, K. (2018) Targeting of BMI-1 expression by the novel small molecule PTC596 in mantle cell lymphoma. *Oncotarget*. **9**, 28547–28560
87. Molofsky, A. V., He, S., Bydon, M., Morrison, S. J., and Pardal, R. (2005)

Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways.

Genes Dev. **19**, 1432–1437

88. Park, I., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003) Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*. **423**, 302–305

89. Liu, Y., Liu, F., Yu, H., Zhao, X., Sashida, G., Deblasio, A., Harr, M., She, Q.-B., Chen, Z., Lin, H.-K., Di Giandomenico, S., Elf, S. E., Yang, Y., Miyata, Y., Huang, G., Menendez, S., Mellinghoff, I. K., Rosen, N., Pandolfi, P. P., Hedvat, C. V., and Nimer, S. D. (2012) Akt phosphorylates the transcriptional repressor bmi1 to block its effects on the tumor-suppressing ink4a-arf locus. *Sci Signal*. **5**, ra77

90. Bruggeman, S. W. M., Hulsman, D., Tanger, E., Buckle, T., Blom, M., Zevenhoven, J., van Tellingen, O., and van Lohuizen, M. (2007) Bmi1 controls tumor development in an Ink4a/Arf-independent manner in a mouse model for glioma. *Cancer Cell*. **12**, 328–341

91. Douglas, D., Hsu, J. H.-R., Hung, L., Cooper, A., Abdueva, D., van Doorninck, J., Peng, G., Shimada, H., Triche, T. J., and Lawlor, E. R. (2008) BMI-1 promotes ewing sarcoma tumorigenicity independent of CDKN2A repression. *Cancer Res*. **68**, 6507–6515

92. Xu, C.-R., Lee, S., Ho, C., Bommi, P., Huang, S.-A., Cheung, S. T., Dimri, G. P., and Chen, X. (2009) Bmi1 functions as an oncogene independent of Ink4A/Arf repression in hepatic carcinogenesis. *Mol Cancer Res*. **7**, 1937–1945

93. Dey, A., Mustafi, S. B., Saha, S., Kumar Dhar Dwivedi, S., Mukherjee, P., and Bhattacharya, R. (2016) Inhibition of BMI1 induces autophagy-mediated necroptosis.

Autophagy. **12**, 659–670

94. Li, B., Chen, Y., Wang, F., Guo, J., Fu, W., Li, M., Zheng, Q., Liu, Y., Fan, L., Li, L., and Xu, C. (2020) Bmi1 drives hepatocarcinogenesis by repressing the TGF β 2/SMAD signalling axis. *Oncogene*. **39**, 1063–1079

95. Haupt, Y., Alexander, W. S., Barri, G., Klinken, S. P., and Adams, J. M. (1991) Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell*. **65**, 753–763

96. Zhang, L., Qiang, J., Yang, X., Wang, D., Rehman, A. U., He, X., Chen, W., Sheng, D., Zhou, L., Jiang, Y.-Z., Li, T., Du, Y., Feng, J., Hu, X., Zhang, J., Hu, X.-C., Shao, Z.-M., and Liu, S. (2020) IL1R2 Blockade Suppresses Breast Tumorigenesis and Progression by Impairing USP15-Dependent BMI1 Stability. *Adv Sci (Weinh)*. **7**, 1901728

97. Qiu, G.-Z., Mao, X.-Y., Ma, Y., Gao, X.-C., Wang, Z., Jin, M.-Z., Sun, W., Zou, Y.-X., Lin, J., Fu, H.-L., and Jin, W.-L. (2018) Ubiquitin-specific protease 22 acts as an oncoprotein to maintain glioma malignancy through deubiquitinating B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 for stabilization. *Cancer Sci*. **109**, 2199–2210

98. Hu, J., Sun, F., Chen, W., Zhang, J., Zhang, T., Qi, M., Feng, T., Liu, H., Li, X., Xing, Y., Xiong, X., Shi, B., Zhou, G., and Han, B. (2019) BTF3 sustains cancer stem-like phenotype of prostate cancer via stabilization of BMI1. *J Exp Clin Cancer Res*. **38**, 227

99. Li, Y., Wang, L., Liu, J., Zhang, P., An, M., Han, C., Li, Y., Guan, X., and Zhang, K. (2017) O-GlcNAcylation modulates Bmi-1 protein stability and potential oncogenic function in prostate cancer. *Oncogene*. **36**, 6293–6305

100. Sahasrabudde, A. A., Dimri, M., Bommi, P. V., and Dimri, G. P. (2011) β TrCP regulates BMI1 protein turnover via ubiquitination and degradation. *Cell Cycle*. **10**, 1322–1330
101. Nagata, K., Saito, S., Okuwaki, M., Kawase, H., Furuya, A., Kusano, A., Hanai, N., Okuda, A., and Kikuchi, A. (1998) Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. *Exp Cell Res*. **240**, 274–281
102. 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
103. 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
104. 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
105. Agarwal, A., MacKenzie, R. J., Pippa, R., Eide, C. A., Oddo, J., Tyner, J. W., Sears, R., Vitek, M. P., Odero, M. D., Christensen, D. J., and Druker, B. J. (2014) Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors

and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* **20**, 2092–2103

106. Galiger, C., Dahlhaus, M., Vitek, M. P., Debatin, K.-M., and Beltinger, C. (2022) PPP2CA Is a Novel Therapeutic Target in Neuroblastoma Cells That Can Be Activated by the SET Inhibitor OP449. *Front Oncol.* **12**, 744984

107. Allen-Petersen, B. L., Risom, T., Feng, Z., Wang, Z., Jenny, Z. P., Thoma, M. C., Pelz, K. R., Morton, J. P., Sansom, O. J., Lopez, C. D., Sheppard, B., Christensen, D. J., Ohlmeyer, M., Narla, G., and Sears, R. C. (2019) Activation of PP2A and Inhibition of mTOR Synergistically Reduce MYC Signaling and Decrease Tumor Growth in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **79**, 209–219

108. Peris, I., Romero-Murillo, S., Martínez-Balsalobre, E., Farrington, C. C., Arriazu, E., Marcotegui, N., Jiménez-Muñoz, M., Albuquerque-Prieto, C., Torres-López, A., Fresquet, V., Martínez-Climent, J. A., Mateos, M. C., Cayuela, M. L., Narla, G., Odero, M. D., and Vicente, C. (2023) Activation of the PP2A-B56 α heterocomplex synergizes with venetoclax therapies in AML through BCL2 and MCL1 modulation. *Blood.* **141**, 1047–1059

109. Cristóbal, I., Manso, R., Rincón, R., Caramés, C., Senin, C., Borrero, A., Martínez-Useros, J., Rodriguez, M., Zazo, S., Aguilera, O., Madoz-Gúrpide, J., Rojo, F., and García-Foncillas, J. (2014) PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. *Mol Cancer Ther.* **13**, 938–947

110. Xing, Y., Wang, Z. H., Ma, D. H., and Han, Y. (2014) FTY720 enhances chemosensitivity of colon cancer cells to doxorubicin and etoposide via the modulation of P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1. *J Dig Dis.* **15**, 246–259

111. Ishitsuka, A., Fujine, E., Mizutani, Y., Tawada, C., Kanoh, H., Banno, Y., and

Seishima, M. (2014) FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation of the PI3K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. *Int J Mol Med.* **34**, 1169–1174

112. Li, Y., Hu, T., Chen, T., Yang, T., Ren, H., and Chen, M. (2018) Combination treatment of FTY720 and cisplatin exhibits enhanced antitumour effects on cisplatin-resistant non-small lung cancer cells. *Oncol Rep.* **39**, 565–572

113. Zhang, N., Dai, L., Qi, Y., Di, W., and Xia, P. (2013) Combination of FTY720 with cisplatin exhibits antagonistic effects in ovarian cancer cells: role of autophagy. *Int J Oncol.* **42**, 2053–2059

114. 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

115. 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**, 644–661

116. Li, M., Makkinje, A., and Damuni, Z. (1996) The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* **271**, 11059–11062

117. 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.* **33**, 7647–7666

118. Arnaud, L., Chen, S., Liu, F., Li, B., Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2011) Mechanism of inhibition of PP2A activity and abnormal

hyperphosphorylation of tau by I2(PP2A)/SET. *FEBS Lett.* **585**, 2653–2659

119. 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

120. Tsuji, S., Kohyanagi, N., Mizuno, T., Ohama, T., and Sato, K. (2021) Perphenazine exerts antitumor effects on HUT78 cells through Akt dephosphorylation by protein phosphatase 2A. *Oncol Lett.* **21**, 113

121. 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

122. Leonard, D., Huang, W., Izadmehr, S., O'Connor, C. M., Wiredja, D. D., Wang, Z., Zaware, N., Chen, Y., Schlatzer, D. M., Kiselar, J., Vasireddi, N., Schüchner, S., Perl, A. L., Galsky, M. D., Xu, W., Brautigan, D. L., Ogris, E., Taylor, D. J., and Narla, G. (2020) Selective PP2A Enhancement through Biased Heterotrimer Stabilization. *Cell.* **181**, 688-701.e16

123. Denisova, O. V., Merisaari, J., Huhtaniemi, R., Qiao, X., Yetukuri, L., Jumppanen, M., Kaur, A., Pääkkönen, M., von Schantz-Fant, C., Ohlmeyer, M., Wennerberg, K., Kauko, O., Koch, R., Aittokallio, T., Taipale, M., and Westermarck, J. (2023) PP2A-based triple-strike therapy overcomes mitochondrial apoptosis resistance in brain cancer cells. *Mol Oncol.* **17**, 1803–1820

124. 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.* **129**, 1641–1653
125. Farrington, C. C., Yuan, E., Mazhar, S., Izadmehr, S., Hurst, L., Allen-Petersen, B. L., Janghorban, M., Chung, E., Wolczanski, G., Galsky, M., Sears, R., Sangodkar, J., and Narla, G. (2020) Protein phosphatase 2A activation as a therapeutic strategy for managing MYC-driven cancers. *J Biol Chem.* **295**, 757–770
126. Jayappa, K. D., Tran, B., Gordon, V. L., Morris, C., Saha, S., Farrington, C. C., O’Connor, C. M., Zawacki, K. P., Isaac, K. M., Kester, M., Bender, T. P., Williams, M. E., Portell, C. A., Weber, M. J., and Narla, G. (2023) PP2A modulation overcomes multidrug resistance in chronic lymphocytic leukemia via mPTP-dependent apoptosis. *J Clin Invest.* **133**, e155938
127. Vit, G., Duro, J., Rajendraprasad, G., Hertz, E. P. T., Holland, L. K. K., Weisser, M. B., McEwan, B. C., Lopez-Mendez, B., Sotelo-Parrilla, P., Jeyaprakash, A. A., Montoya, G., Mailand, N., Maeda, K., Kettenbach, A., Barisic, M., and Nilsson, J. (2022) Chemogenetic profiling reveals PP2A-independent cytotoxicity of proposed PP2A activators iHAP1 and DT-061. *EMBO J.* **41**, e110611
128. Zemann, B., Kinzel, B., Müller, M., Reuschel, R., Mechtcheriakova, D., Urtz, N., Bornancin, F., Baumruker, T., and Billich, A. (2006) Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood.* **107**, 1454–1458

129. Pippa, R., Dominguez, A., Christensen, D. J., Moreno-Miralles, I., Blanco-Prieto, M. J., Vitek, M. P., and Odero, M. D. (2014) Effect of FTY720 on the SET-PP2A complex in acute myeloid leukemia; SET binding drugs have antagonistic activity. *Leukemia*. **28**, 1915–1918
130. 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
131. Bayarkhangai, B., Noureldin, S., Yu, L., Zhao, N., Gu, Y., Xu, H., and Guo, C. (2018) A comprehensive and perspective view of oncoprotein SET in cancer. *Cancer Med*. **7**, 3084–3094
132. 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 activity. *J Mol Biol*. **290**, 547–557
133. 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
134. Enjeti, A. K., D’Crus, A., Melville, K., Verrills, N. M., and Rowlings, P. (2016) A systematic evaluation of the safety and toxicity of fingolimod for its potential use in the treatment of acute myeloid leukaemia. *Anticancer Drugs*. **27**, 560–568
135. 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

136. 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 Odero, M. D. (2020) A novel FTY720 analogue targets SET-PP2A interaction and inhibits growth of acute myeloid leukemia cells without inducing cardiac toxicity. *Cancer Lett.* **468**, 1–13

137. 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.* **186**, 2535–2542

138. 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

139. Le, D. T., Durham, J. N., Smith, K. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Aulakh, L. K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Lubber, B. S., Wong, F., Azad, N. S., Rucki, A. A., Laheru, D., Donehower, R., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Greten, T. F., Duffy, A. G., Ciombor, K. K., Eyring, A. D., Lam, B. H., Joe, A., Kang, S. P., Holdhoff, M., Danilova, L., Cope, L., Meyer, C., Zhou, S., Goldberg, R. M.,

Armstrong, D. K., Bever, K. M., Fader, A. N., Taube, J., Housseau, F., Spetzler, D., Xiao, N., Pardoll, D. M., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Eshleman, J. R., Vogelstein, B., Anders, R. A., and Diaz, L. A. (2017) Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. **357**, 409–413

140. Yen, Y.-T., Chien, M., Wu, P.-Y., Ho, C.-C., Ho, C.-T., Huang, K. C.-Y., Chiang, S.-F., Chao, K. S. C., Chen, W. T.-L., and Hung, S.-C. (2021) Protein phosphatase 2A inactivation induces microsatellite instability, neoantigen production and immune response. *Nat Commun*. **12**, 7297

141. 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

142. Eitelhuber, A. C., Warth, S., Schimmack, G., Düwel, M., Hadian, K., Demski, K., Beisker, W., Shinohara, H., Kurosaki, T., Heissmeyer, V., and Krappmann, D. (2011) Dephosphorylation of Carma1 by PP2A negatively regulates T-cell activation. *EMBO J*. **30**, 594–605

143. Apostolidis, S. A., Rodríguez-Rodríguez, N., Suárez-Fueyo, A., Dioufa, N., Ozcan, E., Crispín, J. C., Tsokos, M. G., and Tsokos, G. C. (2016) Phosphatase PP2A is requisite for the function of regulatory T cells. *Nat Immunol*. **17**, 556–564

144. Ho, W. S., Mondal, I., Xu, B., Das, O., Sun, R., Chiou, P., Cai, X., Tahmasebinia, F., McFadden, E., Wu, C. Y.-J., Wu, Z., Matsui, W., Lim, M., Meng, Z., and Lu, R. O. (2023) PP2Ac/STRN4 negatively regulates STING-type I IFN signaling in tumor-associated macrophages. *J Clin Invest*. **133**, e162139

145. Zhou, P., Shaffer, D. R., Alvarez Arias, D. A., Nakazaki, Y., Pos, W., Torres,

A. J., Cremasco, V., Dougan, S. K., Cowley, G. S., Elpek, K., Brogdon, J., Lamb, J., Turley, S. J., Ploegh, H. L., Root, D. E., Love, J. C., Dranoff, G., Hacohen, N., Cantor, H., and Wucherpfennig, K. W. (2014) In vivo discovery of immunotherapy targets in the tumour microenvironment. *Nature*. **506**, 52–57

146. 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

147. Ronk, H., Rosenblum, J. S., Kung, T., and Zhuang, Z. (2022) Targeting PP2A for cancer therapeutic modulation. *Cancer Biol Med*. **19**, 1428–1439

148. D’Arcy, B. M., Swingle, M. R., Papke, C. M., Abney, K. A., Bouska, E. S., Prakash, A., and Honkanen, R. E. (2019) The Antitumor Drug LB-100 Is a Catalytic Inhibitor of Protein Phosphatase 2A (PPP2CA) and 5 (PPP5C) Coordinating with the Active-Site Catalytic Metals in PPP5C. *Mol Cancer Ther*. **18**, 556–566

149. Zhang, S., Zhou, J., Shang, P., Zhao, G., Wang, A., Mao, J., Tao, Y., Chen, Z., Wang, X., and Guo, C. (2022) SET/PP2A signaling regulates macrophage positioning in hypoxic tumor regions by amplifying chemotactic responses. *Exp Mol Med*. **54**, 1741–1755

150. Jiang, Y., Jin, X., Chi, Z., Bai, Y., Manthiram, K., Mudd, P., Zhu, K., Wang, L., Schwartzberg, P. L., Han, Y., Gao, X., Lu, L., and Xu, Q. (2023) Protein phosphatase 2A propels follicular T helper cell development in lupus. *J Autoimmun*. **136**, 103028

151. Pan, W., Nagpal, K., Suárez-Fueyo, A., Ferretti, A., Yoshida, N., Tsokos, M. G., and Tsokos, G. C. (2021) The Regulatory Subunit PPP2R2A of PP2A Enhances Th1

and Th17 Differentiation through Activation of the GEF-H1/RhoA/ROCK Signaling Pathway. *J Immunol.* **206**, 1719–1728

152. Pan, W., Sharabi, A., Ferretti, A., Zhang, Y., Burbano, C., Yoshida, N., Tsokos, M. G., and Tsokos, G. C. (2020) PPP2R2D suppresses IL-2 production and Treg function. *JCI Insight.* **5**, e138215, 138215

153. Sanjana, N. E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods.* **11**, 783–784

154. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 15545–15550

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 大濱剛准教授、佐藤晃一教授、獣医臨床病理学研究室 水野拓也教授、獣医衛生学研究室 渋谷周作准教授、鹿児島大学獣医薬理学研究室 宇野泰広准教授、岡山理科大学獣医学部創薬学講座 藤原信行講師、山口大学医学系研究科薬理学講座 辻竣也助教に心より厚く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学教室の皆様、また私を暖かく見守ってくれた妻・幸柳菜央、父・幸柳浩規、母・幸柳奈美恵、妹・幸柳里奈に心より感謝の意を表します。