

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03915

研究課題名(和文) ホスファターゼを標的とした新規抗がん戦略への基盤的研究

研究課題名(英文) Development of novel anti-cancer strategy targeting protein phosphatases

研究代表者

大浜 剛 (Ohama, Takashi)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：50579018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がんでSET発現が上昇しPP2Aの活性を抑制する分子機構を解明することで、旧来の分子標的薬開発とは逆転の発想である「ホスファターゼを活性化する創薬」を提案するための基盤になることを目的とした。その結果、イヌの乳腺腫瘍、骨肉腫、ヒトの胃癌等でSETががんの悪性化に寄与する分子機構を解明し、SET標的薬が抗がん効果を発揮することを明らかにした。一連の研究成果は、プロジェクト期間中に5報の原著論文として発表され、現在2つの研究課題についても発表準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、リン酸化酵素キナーゼに対する阻害剤に偏重している分子標的抗がん剤開発の分野に「ホスファターゼを活性化する」創薬という新たな視座を提供するための基盤的研究である。この視座に立った創薬は、従来の「キナーゼを阻害する」薬剤と相加・相乗効果が期待できるだけでなく、ホスファターゼ活性の低下はキナーゼ阻害剤に対する耐性の獲得にも重要であることから、キナーゼ阻害剤に抵抗性または耐性を獲得した症例に対しても効果が期待でき、ファースト・イン・クラスの画期的な創薬に繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to propose the efficacy of anti-cancer drug development targeting protein phosphatase activation, by clearing the role of SET/12PP2A, an endogenous inhibitory protein for protein phosphatase 2A (PP2A), on cancer promotion. We revealed the molecular mechanisms of SET-mediated cancer promotion in canine mammary tumors, canine osteosarcomas, and human various tumors including stomach cancers. We also found that SET-targeting drugs exert anti-cancer effects on these canine and human cancers. We published five original papers for these research findings, and are preparing for the submission for two sub-projects.

研究分野：薬理学

キーワード：がん幹細胞 PP2A

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブが登場して以降、分子標的抗がん剤の研究はタンパク質リン酸化酵素キナーゼの異常な活性化を阻害することに焦点が当てられてきた。そのため、現在上市または臨床試験中にある分子標的抗がん剤の約7割がキナーゼ阻害剤であり、この視点からの創薬研究は飽和状態にある(化学療法支援活動がん分子標的薬開発状況に関する情報)。

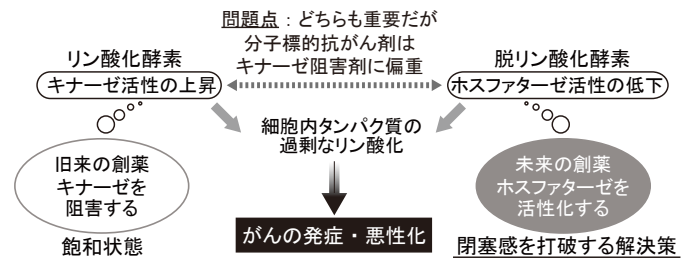


図1 キナーゼ阻害剤に偏重する抗がん剤創薬に対しホスファターゼを活性化する創薬を提唱する。

キナーゼの異常な活性化は、下流の因子の過剰なリン酸化を引き起こすことで、がんの発症や悪性化の原因になる。しかし、リン酸化制御のもう一方の担い手である脱リン酸化酵素ホスファターゼが正常に機能しているうちは、シグナルが強力に伝わることはない。そのため、ホスファターゼ活性の低下は、がんの発症・悪性化やキナーゼ阻害剤に対する耐性獲得に重要な役割を果たす。したがって、「ホスファターゼを活性化する」薬剤は、新たな分子標的抗がん剤として期待されるが、分子基盤の理解が不十分で臨床研究段階には至っていない(図1)。

研究代表者は、これまで一貫して、ホスファターゼの活性調節機構について研究し、がんや炎症性疾患の発症や悪性化に重要な役割を果たすことを報告してきた。近年は重要ながん抑制因子 Protein Phosphatase 2A (PP2A) に着目して研究を進め、本研究開始前の段階で(A) PP2A がタンパク質分解を受ける分子機構 (*PLoS One*. 2015; 10(12): e0145226)、(B) がん細胞の生存に寄与するオートファジーを PP2A が抑制する分子機構 (*J Biol Chem*. 2016; 291(20): 10858-)、(C) PP2A を活性化することで抗がん効果が得られること (*J Vet Med Sci*. 2016; 78(8):1293-8)などを報告していた。

がん細胞内で PP2A は、SET などの内在性阻害タンパク質によって活性が抑制されている。研究代表者は、本研究の立案段階で、イヌのリンパ腫 (*J Vet Med Sci*. 2013; 75(3): 349-)や悪性黒色腫 (*J Vet Med Sci*. 2015; 77(11): 1451-)で、がんの悪性化に SET が重要な役割を果たし抗がん治療の標的となることを報告していた。また、ヒトの胃癌においても SET が予後予測因子や創薬標的になりうるとの知見を得ていた。

2. 研究の目的

以上の背景のもと本研究では、がんで SET 発現が上昇し PP2A の活性を抑制する分子機構を解明することで、旧来の分子標的薬開発とは逆転の発想である「ホスファターゼを活性化する創薬」を提案するための基盤になることを目的とした。特にイヌとヒトの骨肉腫を標的として、比較腫瘍学的な観点を加えることで研究の推進をはかることとした。

3. 研究の方法

がん細胞株として、イヌは骨肉腫と乳腺腫瘍の細胞株を、ヒトは骨肉腫、乳癌、胃癌、大腸癌、肺癌、悪性黒色腫の細胞株を使用し、細胞生物学的手法、生化学的手法で解析を行なった。また、イヌおよびヒトの臨床サンプルを収集し、組織学および生化学的解析を行なった。タンパク質間結合の網羅的な解析には NanoBiT 法を、遺伝子発現の網羅的な解析には次世代シーケンサーを用いた解析を行なった。

4. 研究成果

- (1) イヌ乳腺腫瘍において、SET ががんの悪性化を引き起こす分子機構を明らかにした。
イヌの乳腺腫瘍はメス犬で最も多い腫瘍であり、ヒトの乳癌の自然発症モデルとしても注目されている。我々は、乳腺腫瘍に罹患した13頭のメス犬から腫瘍組織と正常組織を採取し、腫瘍部では正常部と比較して SET タンパク質発現量が平均約4倍高いことを見出した。また、イヌ乳腺腫瘍細胞株を用いた検討から、SET 発現抑制は mTOR シグナル、 β -catenin シグナルおよび NF κ B シグナルを抑制すること、SET 標的薬が抗がん効果を発揮することなどを明らかにした。
一連の研究成果は「The role of SET/I2PP2A in canine mammary tumors」として2017年の Scientific Reports に掲載された。

- (2) ヒトの胃癌細胞の幹細胞性の維持に SET/PP2A/E2F1 軸が重要であり、SET が予後因子になることを明らかにした。

ヒトの胃癌99症例の腫瘍部における SET 発現を免疫組織学的に解析した。SET 発現量の高い群と低い群の予後を Kaplan-Meier 法で解析したところ、SET 発現の高い群は予後が悪く、SET は単独で胃癌の予後因子になることが明らかになった。また、胃癌自然発症モデルマウス Gan マウスを用いた検討から、腫瘍部では正常部や非腫瘍部に比べて SET タンパク質発現量が高いことが確認された。様々なヒトがん細胞株を用いて、SET 発現抑制が細胞の

表現型に与える影響を解析したところ、SET は細胞増殖よりも幹細胞性の維持に重要な役割を果たすことが明らかになった。次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析からその分子機構を解析し、SET が PP2A の活性を抑えることで、転写因子である E2F1 のタンパク質安定化を引き起こすことを見出した。さらに、SET 標的薬が、担がんモデルマウスの腫瘍の成長を抑制することを明らかにした。

一連の研究成果は「Stemness is enhanced in gastric cancer by a SET/PP2A/E2F1 axis」として 2018 年に *Molecular Cancer Research* に掲載された。

(3) PP2A の複合体形成を左右するタンパク質メチル化の制御機構を明らかにした

PP2A は酵素活性サブユニット (PP2Ac)、スキヤフォールディング・サブユニット (A) の二量体に、20 数種類存在する調節サブユニット (B) のうちの 하나가結合することで三量体を形成する。PP2A 複合体の基質特異性を決定するのは B サブユニットであるため、この三量体形成の分子機構解明は、PP2A を活性化する抗がん戦略を考える上で極めて重要である。PP2Ac は C 末端のロイシン残基がメチル化されることが知られている。我々は、PP2Ac タンパク質の脱メチル化を担う酵素 PME-1 が PP2Ac を脱メチル化する際に、PP2Ac との強固な結合は必要ないこと、PP2Ac の脱メチル化が B サブユニットのうち、B55 および PR72 ファミリーとの結合を阻害することを明らかにした。

一連の研究成果は「A stable association with PME-1 may be dispensable for PP2A demethylation - implications for the detection of PP2A methylation and immunoprecipitation」として 2018 年に *FEBS OpenBio* に掲載された。

(4) 正常組織での SET 発現細胞を組織学的に明らかにした

SET を標的とした抗がん剤の開発の上で、SET がどのような正常細胞に発現しているかを明らかにすることは、副作用を予測する上でも重要である。そこで我々は、様々な細胞種が存在する消化管組織に着目し、二重蛍光免疫染色を行うことで、各種細胞の SET 陽性率を解析した。その結果、上皮細胞では十二指腸部分を除いて高い SET 陽性率を示すこと、単球・マクロファージ、神経細胞、筋線維芽細胞、平滑筋細胞においても、SET 陽性の細胞が存在することを明らかにした。

一連の研究成果は「Distribution of SET/I2PP2A protein in gastrointestinal tissues」として 2019 年に *PLOS ONE* に掲載された。

(5) イヌ骨肉腫において、SET 標的薬がシスプラチンと相加的に抗がん効果を発揮することを明らかにした。

ヒトにおいて骨肉腫は希少がん分類されるが、イヌでは骨肉腫の発症率が約 27 と高く、ヒト希少がんのモデルとしても注目されている。我々は、イヌ骨肉腫細胞株において SET は、PP2A 活性を抑制することで ERK1/2 の活性化を引き起こし、がんの悪性度を高めていることを明らかにした。また、SET 標的薬が単独でイヌ骨肉腫細胞株に対して抗がん作用を示すことに加えて、イヌ骨肉腫治療に用いられる cisplatin との相加効果を発揮することを明らかにした。

一連の成果は「Efficacy of an anti-cancer strategy targeting SET in canine osteosarcoma」として 2019 年に *Journal of Veterinary Medicine* に採択された。

(6) ヒト骨肉腫における SET の役割の解明

ヒト骨肉腫細胞株においても SET ががんの悪性化に寄与することを確認した。また、3 種類のヒト骨肉腫細胞株について、SET 発現がシグナル伝達系に与える影響を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析して明らかにした。現在、得られたデータをもとに、着目したシグナル伝達機構について詳細な検討を行っている。また、SET 発現が腫瘍で上昇する分子機構についても、mRNA 転写レベルおよびタンパク質分解レベルでの分子機構の一端を明らかにしている。本研究成果は、現在発表準備中である。

(7) SET と PP2A の結合・解離を司るシグナル伝達の解析と、新規 SET 標的薬の同定

我々は、NanoBiT法を応用した発光反応によるタンパク質結合解析系を用いて、SET と PP2A の結合・解離を司るシグナル伝達系の網羅的な解析を行なった。キナーゼ阻害剤ライブラリーを用いた解析から上流因子を、各種化合物ライブラリーを用いた解析から直接的に SET と PP2A の解離を引き起こす化合物を同定している。現在は、上流因子の関与を証明する解析、新規 SET 標的薬の構造活性相関を明らかにする解析を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yabe R, Tsuji S, Mochida S, Ikehara T, Usui T, Ohama T*, Sato K	4. 巻 8(9)
2. 論文標題 A stable association with PME-1 may be dispensable for PP2A demethylation - implications for the detection of PP2A methylation and immunoprecipitation -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1486-1496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1002/2211-5463.12485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Enjoji Shuhei, Yabe Ryotaro, Tsuji Shunya, Yoshimura Kazuhiro, Kawasaki Hideyoshi, Sakurai Masashi, Sakai Yusuke, Takenouchi Hiroko, Yoshino Shigefumi, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki, Oshima Hiroko, Oshima Masanobu, Vitek Michael P., Matsuura Tatsuya, Hippo Yoshitaka, Usui Tatsuya, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Stemness Is Enhanced in Gastric Cancer by a SET/PP2A/E2F1 Axis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 554 ~ 563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-17-0393	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kake Satoru, Tsuji Shunya, Enjoji Shuhei, Hanasaki Sayaka, Hayase Hiroshi, Yabe Ryotaro, Tanaka Yuiko, Nakagawa Takayuki, Liu Hao-Ping, Chang Shih-Chieh, Usui Tatsuya, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 7
2. 論文標題 The role of SET/I2PP2A in canine mammary tumors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-04291-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Umata Koji, Sakai Yusuke, Ikeda Shunta, Tsuji Shunya, Kawasaki Hideyoshi, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Distribution of SET/I2PP2A protein in gastrointestinal tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 TSUJI Shunya, OHAMA Takashi, NAKAGAWA Takayuki, SATO Koichi	4. 巻 81
2. 論文標題 Efficacy of an anti-cancer strategy targeting SET in canine osteosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1424 ~ 1430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Ohama T
2. 発表標題 The role of SET in Gastric Cancer
3. 学会等名 Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuji S, Kake S, Enjoji S, Ohama T, Sato K
2. 発表標題 SET dimerization regulates PP2A/B56 association
3. 学会等名 Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunta Ikeda, Yuki Oyama, Tsuji Shunya, Takashi Ohama, Koichi Sato
2. 発表標題 Synergistic anti-cancer effects of PME-1 suppression and p53 activation on A549 cells
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunya Tsuji, Shuhei Enjoji, Takashi Ohama, Koichi Sato
2. 発表標題 Inhibition of SET dimerization restores activity of tumor suppressing phosphatase PP2A/B56
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Ohama
2. 発表標題 Stemness is Enhanced in Gastric Cancer by a SET/PP2A/E2F1 Axis
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻駿也、円城寺秀平、臼井達哉、大浜剛、佐藤晃一
2. 発表標題 SETはPP2A活性阻害を介してE2F1を安定化することで、胃がんの幹細胞性の維持に関与する
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuji S, Kake S, Enjoji S, Ohama T, Sato K
2. 発表標題 The role of SET/I2PP2A in canine mammary tumors
3. 学会等名 Europhosphatase2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohama T, Fujiwara N, Sato K
2. 発表標題 Regulation of Autophagy by Type2A Protein Phosphatases
3. 学会等名 Europhosphatase2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Enjoji S, Ohama T, Sato K
2. 発表標題 SET/I2PP2A Is a Prognostic Marker and a Potential Therapeutic Target for Gastric Cancer.
3. 学会等名 Europhosphatase2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大浜剛、円城寺秀平、佐藤晃一
2. 発表標題 SET/I2PP2A Is a Prognostic Marker and a Potential Therapeutic Target for Gastric Cancer.
3. 学会等名 第8回日本プロテインホスファターゼ研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohama T
2. 発表標題 Targeting PP2A inhibitory protein SET for cancer drug development
3. 学会等名 4th TW-JP Bilateral Phosphatase Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsujii S, Ikeda S, Shibutani S, Enjoji S, Ikeara S, Ohama T, Sato K
2. 発表標題 Luciferase-based protein-protein interaction assay in living cells revealed SET dimerization to be essential for association with PP2A-B56 complex
3. 学会等名 Europhosphatase2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本真春、大山ゆき、大浜剛、佐藤晃一
2. 発表標題 Protein phosphatase 2Aとその阻害タンパク質PME-1のタンパク質間結合を制御する分子機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 幸柳尚規、辻竣也、大浜剛、佐藤晃一
2. 発表標題 Protein phosphatase 2A阻害タンパク質SETの骨肉腫における役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大浜剛
2. 発表標題 PP2A阻害タンパク質SETによる癌悪性化機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田俊太、大山ゆき、大浜剛、佐藤晃一
2. 発表標題 肺がん細胞A549においてPP2A複合体とその阻害タンパク質PME-1の果たす役割の解明
3. 学会等名 肺がん細胞A549においてPP2A複合体とその阻害タンパク質PME-1の果たす役割の解明
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田俊太、大山ゆき、大浜剛、佐藤晃一
2. 発表標題 がん悪性化におけるPP2A脱メチル化酵素PME-1の役割の解明
3. 学会等名 第9回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大松 勉 (Tsutomu Omatsu) (60455392)	東京農工大学・農学部・准教授 (12605)	