九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

# 腺様嚢胞癌におけるPR55βを介したβカテニンのリン酸化制御機構の解明

石橋, 佳奈

https://hdl.handle.net/2324/1959092

出版情報:Kyushu University, 2018, 博士(歯学), 課程博士 バージョン: 権利関係:

# 腺様嚢胞癌における PR55β を介した βカテニンの

# リン酸化制御機構の解明

2018年3月

九州大学大学院歯学府 歯学専攻 口腔顎顔面外科学分野

石橋 佳奈

九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

指導教官 森 悦秀 教授

## 対象論文

本論文の一部は下記の論文に掲載されたものである。

Regulation of  $\beta$ -catenin phosphorylation by PR55 $\beta$  in adenoid cystic carcinoma

Kana Ishibashi, Kotaro Ishii, Goro Sugiyama, Yu Kamata, Azusa Suzuki, Wataru Kumamaru, Yukiko Ohyama, Hiroyuki Nakano, Tamotsu Kiyoshima, Tomoki Sumida, Tomohiro Yamada and Yoshihide Mori

Cancer Genomics and Proteomics, 15: 53-60, 2018, accepted

#### 略語一覧

AdCC: adenoid cystic carcinoma (腺樣囊胞癌)

cDNA: complementary DNA (相補的 DNA)

DAB: diaminobenzidine (ジアミノベンジン)

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6- ジアミノ -2- フェニルインドール)

EMT: epithelial mesenchymal transition (上皮間葉転換)

GFP: green fluorescent protein (緑色蛍光蛋白質)

GSK3β: glycogen synthase kinase 3β (グリコーゲン合成リン酸化酵素 3β)

mRNA: messenger ribonucleic acid (メッセンジャーリボ核酸)

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis (ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)

PCR: polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

PFA: paraformaldehyde (パラホルムアルデヒド)

PP2A: protein phosphatase 2A (タンパク質脱リン酸化酵素 2A)

PR55β: protein phosphatase 2A regulatory subunit 55 beta (タンパク質脱リン酸化酵素 2A 調

節サブユニット 55β)

SDS: sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)

siRNA: small interfering RNA (低分子干涉性 RNA)

TBST : Tris-buffer saline Tween- 20 (Tween-20 含有トリス緩衝液)

要旨・	• • •	•••	•••	•••	••	••	• •	••	• •	•	••	• •	• •	••	•	•	• •	•	••	1
緒言•	•••	•••	•••		• • •	••	••	••	••	•	••	• •	• •	••	•	•	••	•	••	3
材料と	:方》	去••	•••	••	••	••	••	••	•	••	••	•	••	•	••	•	•	••	••	6
結果·	•••	•••	•••		• • •	••	••	••	• •	•	••	• •	••	• •	•	•	••	•	•	16
考察·	•••	•••	•••		• • •	••	••	••	• •	• •	••	• •	••	••	•	•	••	•	•	24
謝辞·	•••	•••	•••		• • •	••	••	••	••	•	••	• •	••	••	•	•	••	•	•	30
参考了	文献	• • •	• • •	•••		••	••	••	••	•	••	• •	••	••	•	•	••	•	•	31

腺様嚢胞癌 (AdCC) は、神経組織などへの高い浸潤能と肺などへの遠隔転移を特徴とする悪性 度の高い唾液腺腫瘍である。この癌細胞の悪性転換には、様々な調節分子による相互作用が関係 する。βカテニンは、細胞増殖や腫瘍形成に関連する主要なシグナル伝達分子であり、AdCC を含 む多くの悪性腫瘍で恒常的な活性化が認められている。そのため β カテニンの分子挙動を解明す ることは、AdCC における浸潤や転移の抑制につながるものと考えられる。このうちβカテニンの脱リ ン酸化とそれにともなう核移行は、β カテニンを介したシグナル伝達に極めて重要な役割を担うが、 AdCC における β カテニンのリン酸化制御機構については不明である。一方、タンパク質脱リン酸化 酵素 2A (PP2A) は細胞内の主要な脱リン酸化酵素の一つであり、β カテニンの脱リン酸化にも関与 する。タンパク質ホスファターゼによるリン酸化制御を可能にするためには、酵素活性を規定する触 媒サブユニットに加えて、その酵素に特性を付与する調節サブユニット (B サブユニット) の役割が重 要である。しかしながら、AdCC における PP2A の B サブユニットに関する詳細な研究は少ない。そ こで本研究では、ヒト AdCC において、悪性度の異なる二つの培養細胞株を用いて AdCC におけ る B サブユニットの発現動態を明らかにすることで、AdCC の悪性化に関連する B サブユニットの 存在を検討した。発現量の増加が認められた分子に関しては、AdCC の細胞特性に対する影響や β カテニンの脱リン酸化制御機構との関連性についても検討した。さらにヒト AdCC 組織においても、 その分子の発現動態について免疫組織化学的手法を用いて検討した。

各 PP2A 調節サブユニットをコードする遺伝子のプライマーを用いた定量的リアルタイムポリメラー

ゼ連鎖反応法により、ACCS および ACCS-M 細胞に対する mRNA 量の発現動態を検討した。 ACCS 細胞に対して転移能の高い ACCS-M 細胞では、Ppp2r2b, Ppp2r3a および Ppp2r5e の遺 伝子発現量が増加した。これらの遺伝子のうち、Ppp2r2b に関してはウエスタンブロット法による解 析においても翻訳産物である PR55β の発現量が増加していた。次に ACCS-M 細胞において低分 子干渉性 RNA (siRNA) を用いて PR55β のタンパク質発現量を抑制したところ、ACCS-M の細胞 '遊走能とコラーゲン膜への浸潤能は、いずれも対照群と比較して有意に低下した。さらに、β カテニ ンのリン酸化状態や細胞内局在についても siRNA を用いて検討した。対照群と比較して PR55βの 発現を抑制した群ではβカテニンのリン酸化が亢進し、さらに総タンパク質量も減少した。また、対照 群で顕著に認められたβカテニンの核内移行も認められなかった。このことから、ACCS-M細胞の 転移能とβカテニンの脱リン酸化に PR55β が関与していることが示唆された。最後に、ヒト AdCC 組 織に対して抗 PR55β 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、転移能が高いとされる Solid 型の AdCC において染色される割合が高かった。以上のことから、AdCC に対して、PR558 は β カテニ ンの脱リン酸化を促進することで腫瘍の転移能獲得に寄与する分子であることが示唆された。

### 緒言

腺様囊胞癌 (AdCC) は比較的緩徐な発育を示す一方で、周囲組織への浸潤と、肺を中心とした 遠隔臓器への転移を特徴とした、悪性度の高い唾液腺腫瘍の一つである(1)。特に、神経組織への 局所浸潤を認めるため、進行癌では知覚異常などの症状が出現することがある。また AdCC による 肺転移は、予後悪化因子の一つとなっている(2)。 唾液腺腫瘍の中では比較的その発生頻度が高く、 発生率は 10 万人に 4-5 人で、わずかに女性に多い (3)。 発生部位や腫瘍の性状は様々であり、耳 下腺や顎下腺などの大唾液腺に限らず、口腔粘膜に存在する小唾液腺からも発生する(4)。病理組 織学的には、特徴的な篩状構造を呈する Cribriform 型の他に、Tubular 型、Solid 型の3 種類に 分類される。腫瘍の病態を評価することを目的として、これまで多くの統計学的検討が行われており、 Cribriform 型では比較的再発や転移することが少なく、Tubular 型から Solid 型への変化に順じて、 予後が不良になると考えられている (5)。 加えて近年では、様々なタンパク質や癌関連遺伝子群の 変異などが AdCC の悪性転換に寄与することが示唆されている (6-8)。この癌細胞の悪性転換は、 様々な調節分子が複雑に相互作用を及ぼしながら、シグナル経路を構築することで、獲得されてい くと考えられている。中でもこれまで多くの腫瘍において恒常的活性化が認められる Wnt/βカテニン シグナルは、腫瘍の増殖や浸潤、転移と密接に関わる重要なシグナル伝達経路として知られている。 このうち βカテニンの脱リン酸化とそれにともなう核移行が、特に重要な分子挙動である (9)。Wnt シ グナルの活性化により、リン酸化修飾を免れ細胞質内で安定化した βカテニンは核内へ移行し、浸 潤や転移に関わる遺伝子群の発現を促す。この時、癌細胞の浸潤や離脱に極めて重要な上皮間葉

転換 (EMT) が引き起こされると考えられている。当研究室では、ヒト AdCC 細胞をマウス舌に接種 することで、異なる二つの転移能をもつヒト AdCC 細胞株を樹立した (10)。すなわち、腫瘍塊の形成 は認めるが転移する確率が低い ACCS 細胞と、ACCS 細胞をさらに舌へ接種することで、顎下リン パ節へ高確率で転移する ACCS-M 細胞が樹立された。Ishii らは、これらの細胞株の分子生物学 的特性について解析を行うことにより、βカテニンの局在変化と EMT の関連性について述べている。 βカテニンの局在変化については、グリコーゲン合成リン酸化酵素 (GSK3β) などによる βカテニンの リン酸化修飾が βカテニンの細胞内発現量調節に関与していると考えられており、多くのキナーゼに よるリン酸化調節機構の存在が示唆されている (11)。一方で、こうしたキナーゼに対する脱リン酸化 酵素に関する研究は少なく、AdCC における βカテニンのリン酸化制御機構については未だ不明な 点が多い。

タンパク質脱リン酸化酵素 2A (PP2A) は主要なタンパク質ホスファターゼの一つであり、生体内の あらゆる組織でユビキタスに発現するセリン・スレオニンホスファターゼである (12)。細胞内では主に 二量体もしくは三量体として存在する (13)。足場サブユニットと触媒活性の中心を担う触媒サブユニ ットによって構成される二量体に加えて、基質特異性や細胞内局在、酵素活性の強度などの機能を 調節する役割を担う、様々な異なる調節サブユニット (B サブユニット) が存在する。B サブユニット は大きく四つのクラス (PR/B, PR/B', PR/B'', PR/B''') に分類され、それぞれのサブクラスに対して複 数のアイソフォームが見出されている (14)。生体内に圧倒的多数のセリン・スレオニンキナーゼが存 在するのに対して、ヒトゲノムに存在するセリン・スレオニンホスファターゼは僅か 45 種類程度しか存

- 4 -

在しない(15)。この不均衡状態にもかかわらず、迅速かつ正確に細胞内のシグナル伝達を作用させ るためには、適切にホスファターゼを機能させるための調節サブユニットの役割が極めて重要である。 すなわち、各組織に存在する細胞の中では、その生理的環境に適応した B サブユニットによる機能 制御機構が構築され、厳密なリン酸化制御を行っていると考えられる。一方、PP2A と悪性腫瘍につ いては、これまで多くの研究が、その関連性を示している。例えば、オカダ酸は PP2A の代表的な阻 害剤であると同時に、発がん性物質として認識されている。これは、PP2A によるリン酸化制御機構 の破綻による腫瘍形成の促進作用と考えられている。多くの文献的報告により、腫瘍細胞内のシグ ナル伝達分子が PP2A により脱リン酸化され、腫瘍の悪性化に促進的に作用することが示されてい る (16)。しかしながら、その多くは触媒サブユニットの酵素活性や分子挙動に対する解析であり、そ の機能を調節する B サブユニットの発現動態に焦点をあてた研究はほとんど行われていない。

そこで、本研究では前述の二つのヒト AdCC 細胞株を用いて、AdCC の悪性転換に関わる PP2A の B サブユニットのメッセンジャーリボ核酸 (mRNA) 発現動態について検討した。さらに発現 が認められた分子については、免疫組織化学的手法を用いてヒト AdCC 組織についても発現量と 悪性転換に関する検討を行った。その結果、従来では AdCC の腫瘍形成に抑制的に作用すると考 えられていた PP2A の脱リン酸化作用においても、B サブユニットの特性を利用した、AdCC の効 率的なリン酸化制御機構の構築について、その一端を解明したので、ここに報告する。

# 材料と方法

1. 抗体

ウサギ抗ヒトβカテニン抗体およびウサギ抗ヒトリン酸化βカテニン抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA) より購入した。マウス抗ヒトβ-actin 抗体は Sigma Aldrich (St Louis, MO) より購入した。ウサギ抗ヒト PR55β 抗体は Abcam (Cambridge, UK) より購入した。

#### 2. 細胞培養

ヒト唾液腺腺様嚢胞癌細胞株は大阪大学歯学部第一口腔外科にて樹立されたものを使用した (17)。実験に用いた培養細胞株は、当分野の Ishii らによって樹立された ACCS 細胞および ACCS-M 細胞を使用した (10)。培地は、ダルベッコ変法イーグル培地 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA ) に L(+)-アスコルビン酸 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka) 100 µg/mL、ペニシリン G カリウム (Meiji Seika Pharma, Tokyo) 100 U/mL、ストレプトマイシン (Meiji Seika Pharma) 100 µg/mL を添加して用い、終濃度が 10% となるようにウシ胎仔血清 (FBS) を加え た。37 °C、湿度 100%、5% 二酸化炭素気相下で培養した。細胞株の継代は、phosphate-buffered saline (PBS) と 0.05% Trypsin / エチレンジアミン四酢酸 (Gibco) を用いて行った。ACCS-M 細胞 は、必要に応じて *Ppp2r2b* 遺伝子の塩基配列もしくはコントロールの塩基配列を用いた低分子干渉 性 RNA (siRNA) を用いた遺伝子導入を行った。 siRNA の遺伝子導入には Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific) を使用した。用いた siRNA の塩基配列を以下に記

#### siCont.: 5'-AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-3'

siPpp2r2b:5'-ACUUUCCACAGCUUCACAGTT-3'

3. 培養細胞の接種

すべての実験動物の取扱いは九州大学実験動物倫理委員会の承認を得て、日本学術会議によ り策定された「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(2006 年 6 月 1 日施行)に従った。 動物実験計画は九州大学動物実験規則第 10 条第 4 項の規定に基づき承認(A29-194-0)を得た。 実験動物は 8 週齢のヌードマウス(BALB/cAJcl-nu/nu; Kyudo, Fukuoka)の雌を使用した。飼料及 び飲料水は自由摂取とし、飼育管理は無菌状態にて行い、固形飼料、飲料水、床敷及びゲージは 全て滅菌したものを用いた。

ACCS-M 細胞を培養液中で細胞密度が 2.5×10<sup>7</sup> 個 / mL になるように調製し、この細胞浮遊液 40 µL(1.0×10<sup>6</sup> 個) を 27 G 注射針付注射器 (TOP Plastic Syringe, Tokyo) を用い、セボフルラン (Wako Pure Chemical Industres) 吸入麻酔下でヌードマウスの舌に接種した。 接種後、舌に形成され た腫瘍塊を確認し、セボフルラン麻酔下に安楽死させた後、顎下リンパ節へ転移した ACCS-M 細 胞の有無を、マルチアングル実体システム (VG-G25; KEYENCE, Osaka) を用いて 470 nm の励起 光下に確認した。

す。

#### 4. Total RNA 抽出方法

前述の培地下で培養された ACCS および ACCS-M 細胞は、PBS で十分に洗浄後に回収した。 回収した培養細胞に TRIzol (Thermo Fisher Scientific ) 1 mL を加え、音波破砕により溶解し、室温 で 10 分間放置した。その後、クロロホルム (Wako Pure Chemical Indutstres) 200 µL を加えて 3 分間 撹拌し、室温で3分間放置後、4℃、14,500 rpm で10分間遠心分離した。RNA を含む水層を約 300 µL 採取して新たなチューブに移し、これにイソプロピルアルコール (Wako Pure Chemical Indutstres) 150 µL を加えて混合し、室温で 10 分間放置した。その後、4 ℃、14,500 rpm で 30 分 間遠心分離し、RNA を沈殿させた。上清を除去後、70% エタノール(Wako Pure Chemical Indutstres) 1 mL を加えて沈殿物を洗浄し、振盪攪拌した。混合後、4℃、14,500 rpm で 10 分間遠 心分離し、沈殿物を室温で乾燥させ、RNase-Free H<sub>2</sub>O 20 µL に溶解した。その後、65 ℃ で 10 分 間保温し、撹拌後氷冷した。RNase Inhibitor (Promega, Madison, WI)を1 μL を加え、分光光度計 (Ultrospec 3300 pro, GE Healthcare/Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)を用いて全 RNA の濃度を測定した。回収した約 3 µg の全 RNA を鋳型として、 40 U/µL の recombinant RNasin<sup>®</sup>Ribonuclease Inhibitor (Promega) を 0.5 µL、0.5 µg/µL の逆転写プライマー pd (T)<sub>12-18</sub> を 1 µL、250 mM トリス塩酸塩 (pH 8.3)、375 mM KCl および 15 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 5 × 反応緩衝液を 4 μL、 100 mM dithiothreitol を 2 μL、 200 U/μL の SUSPERSCRIPT<sup>™</sup>II RNase H- Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を 0.5 µL 加えて合計 20 µL とし、42 ℃ で 1 時間インキュ ベートした。その後、95 ℃ で 5 分間加温して酵素を失活させ、直ちに氷冷して 相補的 DNA (cDNA)を合成した。これを RNase-Free H<sub>2</sub>O で 10 倍に希釈し、mRNA の解析に用いた。

#### 5. リアルタイム PCR 法による mRNA 発現の解析

定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法 は、Light Cycler FastStart DNA Master SYBER Green 1 kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いた。反応条件は、熱変性を 95 °C で 1 サイクル 10 分間行い、2 サイクル以降 10 秒間行った。アニーリング/伸長反応は 60 °C で 10 秒間、72 °C で 10 秒間とし、すべて 47 サイクルの増幅を行った。リアルタイム PCR は LightCycler Software Version 3.5 (Roche Diagnostics) を使用した。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の mRNA 発現量と比較し、相対的発現量を算出した。用いたプライマーの塩基配 列を表 1. に示す。

表 1. プライマー塩基配列

Ppp2r2a	(F) 5'-GCAACAGGAGATAAAGGTGGTAG-3'
	(R) 5'-TGGTTCATGGCTCTGGAAGGTG-3'
Ppp2r2b	(F) 5'-GCGTGATAAGAGGCCAGAAG-3'
	(R) 5'-TGTGTGCGTTGGCAAATACT-3'
Ppp2r2c	(F) 5'-AGAGCTGATGACCTCACCGTTGTT-3'
	(R) 5'-ATCAGATGAGGACACAGGCACACA-3'
Ppp2r2d	(F) 5'-CGTGAACAAGAGAATAAAAGCCG-3'
	(R) 5'-CTTCAATATTGGGACCCGTAG-3'
Ppp2r3a	(F) 5'-ACGCTTGTTGCAGAGGAATC-3'
	(R) 5'-TCCAAATTCAGAGGGAGAGGG3'
Ppp2r3c	(F) 5'-TCGTCGGCGCCTAGCGACGCCCAACACCTG-3'
	(R) 5'-ATCGCTTCCTCTCCAATCATAGGTGGTGTCT

GGTGTTTGTCCAGC-3'

Ppp2r4	(F) 5'-GCTGAGGGCGAGCGGCAGCCGCCGCCA-3'
	(R) 5'-GCCAGATGGGTAGGGACCACTGTGGCCACC-3'
Ppp2r5a	(F) 5'-GAGTATGTTTCAACTAATCGTGGTGTAATTGTTGAATCAGCG-3'
	(R) 5'-TCCCATAAATTCGGTGCAGAACAGTCTTCAGG-3'
Ppp2r5b	(F) 5'-GACAACTGCCACACTGTGCT-3'
	(R) 5'-TCCAGCTTGTAGGAGGCTGT-3'
Ppp2r5c	(F) 5'-GTAATAAAGCGGGCAGCAGG-3'
	(R) 5'-CAAAGT CAAAGAGGACGCAACA-3'
Ppp2r5d	(F) 5'-AACTCCAAGAGCCACTGGAA-3'
	(R) 5'-TGCCACATCTCTTCCCTTTC-3'
Ppp2r5e	(F) 5'-AAGCCAGACAGAAGAGGTCGCA-3'
	(R) 5'-AGGAACAGTTCAGGCTGCTCTG-3'

#### 6. ウエスタンブロッティング法

ACCS および ACCS-M 細胞を PBS で洗浄した後、プロテアーゼ阻害剤を含むドデシル硫酸ナト リウム (SDS) 溶解緩衝溶液 (50 mM Tris-HCl、pH 6.8、2% SDS、10% グリセロール、6% メルカプ トエタノール)を用いて音波破砕により溶解した。溶解液のタンパク濃度を Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を用いて分光光度計により決定した。その後、Laemmili sample buffer (Bio-Rad Laboratories)・2-メルカプトエタノール (Wako Pure Chemical Indutstres)を添 加し、70 ℃、30 分加熱し変性させ、-30 ℃ にて保存した。同濃度のタンパクを含む 30 µL のサン プルを用いて、10% SDS-PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動)を行った。電気泳動後、タンパク をニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratories) に転写した。セルロース膜を TBST (25 mM Tris-HCl、 pH 8.2、144 mM NaCl、0.1% Tween 20) で洗浄した後、常温 1 時間、5% スキムミルク / TBST で ブロッキングを行い、TBST による洗浄後、特異的一次抗体で常温 1 時間処理した。TBST による 洗浄後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体と常温 1 時間反応させて、TBST によ り洗浄した。検出は二次抗体として西洋ワサビ過酸化酵素標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体、ヤギ抗マウ ス IgG 抗体を用い、化学発光試薬として ECL キット (GE Healthcare/Amersham Biosciences) を使用 した。検出したバンドの定量はイメージアナライザー LAS 3000 mini (GE Healthcare/Amersham Biosciences) を用いて行った。

7. 免疫沈降

ACCS および ACCS-M 細胞は細胞破砕液 [50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、1 mM NaF、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1 mM dithiothreitol、2.5 µg/ml pepstatin A、5 µg/ml leupeptin、3 µg/ml aprotinin、25 µg/ml *p*-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride] 中にてセルスクレイパーで培養 皿から回収後 4°C で 1 時間転倒混和した。このようにして調製した破砕液は 15,000g で 30 分間遠 心し、上清を回収して免疫沈降に供した。抗ヒトβ カテニン抗体を加えて 4°C で 2 時間転倒混和し た後に、破砕液で平衡化したプロテイン G セファロースを加えてさらに 4°C で 1 時間転倒混和した。 セファロースビーズは組織破砕液で 3 回洗浄した。その後 SDS-PAGE を行い、抗ヒト PR55β 抗体 を用いてウエスタンブロッティング法を行った。検出は二次抗体として西洋ワサビ過酸化酵素標識ロ バ抗ウサギ IgG 抗体、ヤギ抗マウス IgG 抗体を用い、化学発光試薬として ECL キット (GE

Healthcare/Amersham Biosciences)を使用した。検出したバンドの定量はイメージアナライザー LAS 3000 mini (GE Healthcare/Amersham Biosciences)を用いて行った。

8. 細胞遊走能試験

6 穴平型プレート (Thermo Fisher Scientific) に 1 穴あたり 3×10<sup>5</sup> 個の ACCS-M 細胞を播種し、 24 時間培養した。その後、*Ppp2r2b*の siRNA と対照群として control siRNA を遺伝子導入し、さら に 24 時間培養した。細胞がコンフルエントになっていることを確認して、200 µL ピペットチップの先 端にてウェル内に直線状に傷を付け、その傷によって形成されたスペースの面積を、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE)を用いて計測した。観察はウェル内に傷つけた直後から開始し、6 時間毎 に 24 時間後まで行った。測定は各細胞株で 3 穴ずつ、1 穴ごとに 3 視野の面積を 4 倍の顕微鏡 で観察し、同一の実験を 3 回行った。細胞スペースの面積は以下の計算式を用いて評価した。

面積(%) = (観察時の面積/観察開始直後の創部面積) ×100

統計学的処理は等分散であることを確認して、Student-t 検定を用いた。

9. 細胞浸潤能試験

細胞浸潤能試験はコーニングマトリゲルインベージョンチャンバー (Corning Inc.,Corning, NY)を 用いて行った。24 穴プレート (Collaborative Research, Waltham, MA) に 10–12 μL のマトリゲルで コーティングされた 8 μm のポアサイズを有するフィルターインサートと、何も処理をされていないコン トロールインサートを用いた。PR55β の siRNA と control siRNA を遺伝子導入した ACCS-M の培 養液を各ウェルのフィルター上側にそれぞれ 15×10<sup>4</sup> 個、200 μL の血清培地とともに加え、フィルタ ーの下側には無血清培地を 300 μL 加えた。48 時間の培養後に、4 % PFA で固定し、 Hematoxylin and Eosin (H-E) 染色を行った。フィルター上方に残留した細胞は、綿棒を用いて除去 した。フィルター下面の染色された全細胞数を顕微鏡で観察し、数を計測した。浸潤能は以下の計 算式を用いて評価した。

浸潤能(%)=(フィルターインサートの平均細胞数/コントロールインサートの

#### 平均細胞数)×100

統計学的処理は等分散であることを確認して、Student-t 検定を用いた。

10. 細胞免疫染色法

細胞膜もしくは細胞内に局在する PR55β の検出には間接蛍光抗体法を用いた。イメージングチ ャンバー 8 穴に PR55β の siRNA と control siRNA を遺伝子導入した ACCS-M 細胞の培養液を 24 時間培養した。PBS で 3 回洗浄し、2% PFA (paraformaldehyde)/PBS (3.7% ホルムアルデヒド, 0.2% グルタルアルデヒド)で室温、10分間固定した。PBS で 3 回洗浄し、抗β カテニン抗体 (1:100)を12時間、4℃で反応させ、PBS で 3 回洗浄したのち、Alexa Fluor 標識二次抗体 (1:10000; Thermo Fisher Scientific )を遮光下にて 37℃、90分間反応させた。PBS で 3 回洗浄 後、退色防止剤入り 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 封入剤 (Thermo Fisher Scientific)を用い て封入した。蛍光観察には蛍光顕微鏡 (BZ-9000)を用いて撮影した。

11. 免疫組織化学染色法

実験に用いた組織検体は、九州大学病院口腔顎顔面外科学分野の手術において切除され、病 理組織学的に AdCC と診断されたものを使用した。とト組織検体の使用については、九州大学医系 地区部局臨床研究倫理審査委員会に承認を得た。組織切片は、ホルマリン固定、パラフィン処理後 に 4 µL の厚さで薄切され作製された。キシレンによる脱パラフィン処理とクエン酸による抗原賦活化 処理後に、10% ヤギ正常血清により、常温 30 分間のプロッキングを行った。 TBST による洗浄後、 特異的一次抗体で 4 ℃ 一晩反応させた。 TBST による洗浄後、ビオチン標識二次抗体と常温 1 時間反応させて、TBST により洗浄した。最後に酵素試薬としてペルオキシダーゼ標識ストレプトア ビジンを常温 10 分間反応させた。ブロッキングから酵素試薬までの行程は、ヒストファイン SAB-PO キット (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo)を使用した。発色は 3'-diaminobenzidine (DAB) 基質キット (Merck, Darmstadt, Germany) で行った。発色した標本は、Hematoxylin により対比染色を行った。 蛍光顕微鏡 (BZ-9000) を用いて観察を行い、染色した組織数全体 (n=12) に対する陽性検体数と 陰性検体数の割合を、それぞれ算出した。撮影された組織の画像に対して、画像解析ソフト BZ-X Analyzer (KEYENCE) を用いて、単位面積当たりの染色細胞数の割合を算出した。

#### 1. 各 PP2A 調節サブユニットの mRNA 発現量の比較

Α

AdCC の悪性転換に関連する PP2A 調節サブユニットを調べるために、ACCS および ACCS-M 細胞を用いて分子細胞生物学的検討を行った。まず ACCS-M 細胞をマウス舌に接種し、励起光下 でマウス顎下リンパ節を確認したところ、GFP による蛍光発色が確認された。このことから、恒常的 に GFP を発現している ACCS-M 細胞が、顎下リンパ節へ転移していたことが確認された (図 1A)。 次に、ACCS および ACCS-M 細胞に対して、定量的リアルタイム PCR 法を用いて、各 PP2A 調節 サブユニットの mRNA 発現量を解析した。ACCS 細胞に対して ACCS-M 細胞では、*Ppp2r2b*, *Ppp2r3a* および *Ppp2r5e* の遺伝子発現量が増強した (図 1B)。これらのうち、*Ppp2r2b* はウエスタン ブロッティング (WB) 法による解析により、ACCS-M 細胞において、*Ppp2r2b* 遺伝子の翻訳産物で ある PR55β が発現していることが確認され、さらにその発現量は ACCS-M 細胞において増強した (図 1C)。





\*:P<0.05 \*\*:P<0.01

С



図 1. 各 PP2A 調節サブユニットの mRNA 発現量の比較

使用した ACCS 細胞は、顕微鏡下に確認され、その後励起光下に遺伝子導入された GFP が 発現していることを確認した (写真 A 上段)。また、ACCS 細胞をマウス舌に接種し、顎下リンパ 節へ転移したことを目視下と励起光下に確認した (写真 A 下段)。ACCS および ACCS-M 細 胞から cDNA を合成して、各 B サブユニットの発現量を定量的リアルタイム PCR 法により解析し た (B)。PR556 および  $\beta$ -actin の抗体を用いて WB 解析を行った (C)。 2. ACCS-M 細胞の細胞生物学的特性に対する PR55β の影響

PR55β が ACCS-M 細胞の悪性転換に関与しているか検討するために、*Ppp2r2b* 遺伝子の siRNA を用いて、ACCS-M 細胞の細胞生物学的特性について検討した。まず、*Ppp2r2b* 遺伝子 とスクランブル塩基配列をもつコントロール遺伝子の siRNA を ACCS-M 細胞に遺伝子導入した後、 WB 法により PR55β の発現量に対する影響を確認した(図 2A)。その上で、ACCS-M 細胞に *Ppp2r2b* 遺伝子とコントロール遺伝子の siRNA を遺伝子導入して、細胞遊走能に対する PR55β の 影響を細胞遊走能試験により検討した。対照群に対して *Ppp2r2rb* 遺伝子の siRNA を導入した群 では、ACCS-M 細胞の細胞遊走能が有意に低下した(図 2B)。同様にして、細胞浸潤能試験を行 い、PR55β の影響を検討した。対照群に対して *Ppp2r2rb* 遺伝子の siRNA を導入した群では、 ACCS-M 細胞の細胞遊走能が有意に低下した(図 2C)。このことから、PR55β は ACCS-M 細胞の 悪性転換を促進することが示唆された。



А



С

В



図 2. ACCS-M 細胞の細胞生物学的特性に対する PR55βの影響

ACCS-M 細胞に対して、*Ppp2r2b* 遺伝子もしくはコントロール遺伝子の siRNA を遺伝子導入 した。その後、WB により標的タンパク質の発現が抑制されたことを確認した(A)。ACCS-M 細 胞に *Ppp2r2b* 遺伝子もしくはコントロール遺伝子の siRNA を遺伝子導入した後、細胞遊走能試 験を行った(B)。同様にして、細胞浸潤能試験も行った(C)。 3. βカテニンの脱リン酸化状態に対する PR55βの影響

А

次に、PR55β がどのような作用機序で ACCS-M 細胞の悪性転換に関与しているのかを明らかに するために、β カテニンのリン酸化状態に対する PR55β の及ぼす影響について検討を行った。 *Ppp2r2b* 遺伝子に対する siRNA を遺伝子導入した後、抗ヒトリン酸化 β カテニン抗体を用いた WB 法を行い、β カテニンのリン酸化状態について解析した。対照群と比較して *Ppp2r2b* 遺伝子の siRNA を導入した群では、リン酸化 β カテニンの量が増加した。また、β カテニンの総タンパク質量 は減少していた (図 3A)。さらに、β カテニンの細胞内局在を検討するために ACCS-M 細胞に siRNA 遺伝子導入を行い、抗ヒトβ カテニン抗体を用いて、細胞免疫染色を行った。対照群では、 β カテニンの核内移行が認められたのに対して、*Ppp2r2b* 遺伝子の siRNA を遺伝子導入した群で は、核内移行は認められなかった (図 3B)。すなわち、PR55β は β カテニンの脱リン酸化を促進す ることで、同分子の核内移行を増加させ、同時に細胞内での総タンパク質量を増加させていることが 示された。



ACCS-M



図 3.βカテニンの脱リン酸化状態に対する PR55βの影響

ACCS-M 細胞に対して、*Ppp2r2b* 遺伝子もしくはコントロール遺伝子の siRNA を遺伝子導入 した。その後、各種タンパク質の抗体を用いた WB 解析を行った(A)。同様にして遺伝子導入し た ACCS-M 細胞に対して、各種タンパク質に対する抗体を用いて、細胞免疫染色を行った (B)。全ての実験は独立して3回行い、代表例を提示した。

4. ACCS および ACCS-M 細胞における β カテニンと PR55β の結合

続いて、ACCS および ACCS-M 細胞における β カテニンと PR55β の結合について検討するため に、免疫沈降実験を行った。ACCS および ACCS-M 細胞の細胞破砕液に対して、抗ヒトβ カテニ ン抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物中の PR55β に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロ ッティング法によって検討した。ACCS および ACCS-M 細胞の両者において β カテニンと PR55β の結合が認められた (図 4)。その結合量は、ACCS 細胞と比較して ACCS-M 細胞で増加していた。 このことから ACCS および ACCS-M 細胞において β カテニンと PR55β が相互作用することが示さ れた。



図 4. ACCS および ACCS-M 細胞における β カテニンと PR55β の結合

ACCS および ACCS-M 細胞を細胞破砕液にて懸濁し、抗ヒトβカテニン抗体を用いて免疫 沈降を行った。沈殿物はサンプルバッファに溶解され、SDS-PAGE を行い、抗 PR55β 抗体と 抗ヒトβカテニン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析された。細胞破砕液の 5%量 を Input として使用した。

5. AdCC 組織における病理組織型と PR55β の発現量の関連性

最後に、手術により切除したヒト AdCC 組織における PR55βの発現量について免疫組織学的検 討を行った。採取された組織検体 (n = 12) のうち、PR55βの発現を認めた検体の割合は 83.3% で あった (図 5A)。DAB 発色された標本を顕微鏡 (×20) で観察した (図 5B)。このうち免疫染色され た PR55β は主に、AdCC 組織の導管上皮に局在していた。さらに単位面積あたりの染色割合を Tubular 型と Solid 型で病理組織型に分けて解析したところ、Tubular 型と比較して Solid 型で多く 染色されていた (図 5C)。以上の実験結果から、ヒト AdCC 組織にも PR55β が発現していることが明 らかになった。またその発現量と病理組織型の関連性が示唆された。



図 5. ヒト AdCC 組織における PR55β 発現量と病理組織学的検討

AdCC 組織をホルマリン固定とパラフィン包埋処理をして、4 µm に薄切して切片を作製した。抗 PR55β 抗体を用いて 12 時間、4 °C で反応させ、DAB 基質キットで発色させた。染色した検体数 (n = 12) のうち、陽性であったものと陰性であったものの割合を算出した (A)。染色された組織像を顕微鏡 (×12) にて観察した (B)。Tubular 型と Solid 型のそれぞれに対して、単位面積あたりの陽性細胞数の割合を算出した (C)。

## 考察

癌細胞は、種々の遺伝子異常の蓄積により生じる代謝制御機構の喪失によって、無秩序な腫瘍 増殖を引き起こす。基底膜の破壊と腫瘍塊からの細胞逸脱は、血行性もしくはリンパ行性に全身へ 移動し、やがて他の組織へ生着することで遠隔転移が成立する。それぞれの原発腫瘍には臓器特 異的な性質があり、また同一組織においても遺伝子異常やタンパク質の変性によって違いが認めら れる(18-20)。そして、一旦癌細胞のコロニー形成が組織に定着すると、形成されていく腫瘍塊では、 恒常的に活性化したシグナルが複雑に相互作用することで、厳密な免疫制御機構の監査を回避し、 癌細胞にとって良好な微小環境が構築されていくと考えられる。つまり、癌細胞の発育や性質転換 は、偶発的に生じた異常代謝機構の重積によってもたらされた結果であり、生体内の自然免疫機構 の破綻と認識することができる。AdCC は無数に存在する唾液腺組織から生じる悪性腫瘍であり、 上皮系細胞と間葉系細胞によって構成されるため、この発癌プロセスはさらに多様化しているものと 推察され、口腔癌において制御困難な腫瘍の一つとなっている。Shirasuna らは患者の腫瘍組織か ら採取した AdCC の腫瘍細胞を単離し、培養を繰り返すことで、継代可能な培養細胞株として ACCS 細胞を樹立した(17)。当研究室ではこの細胞株の生物学的特性と分子生物学的特性につい て解析を進め、AdCC の悪性転換に関連する分子の発現と EMT の関連性についての作用機序 の解明してきた。(10)。一方で、癌の代謝に関わるシグナル伝達は、これまで明らかになっていなか った。無数に存在するシグナル伝達分子は、キナーゼとホスファターゼにより、厳密な時空間的リン 酸化制御を受けている。すなわち、癌細胞における無秩序な代謝亢進は、両者の機能的な不均衡 から生じるリン酸化制御機構の破綻と同義である。中でも、圧倒的多数のキナーゼに対応するホスフ

アターゼの機能異常は特に重要な分子挙動と考えられる。このことから本研究では、AdCC における β カテニンの脱リン酸化に焦点をあて、主要なホスファターゼの一つである PP2A の調節サブユニ ットを介した β カテニンのリン酸化制御機構との関連性について検討を行った。

PP2A は主要なセリン・スレオニンホスファターゼであり、シグナル分子の脱リン酸化を介して癌の 増殖や転移に関わるキナーゼの機能に拮抗する。特に、多くの充実性癌や慢性骨髄性白血病など で PP2A の機能低下が認められることから、腫瘍抑制因子として考えられている (21)。 実際、 PP2A 活性化試薬 (FTY720) は癌の増殖を抑制し予後を改善することから、 PP2A は新たな抗腫瘍薬とな り得る (22)。 しかしながら、 PP2A の活性中心である触媒サブユニットのノックアウトマウスは胎生致 死することが知られている (23)。このことは、生体内における PP2A の重要性と新規分子標的薬開発 の難しさを示している。一方、PP2A が正常に機能するために B サブユニットが重要な役割を担う。 ACCS 細胞が ACCS-M 細胞となり、強力な転移能を獲得するためには、悪性転換や転移を規定す る B サブユニットの存在が必要不可欠だと考えられる。そのため、リアルタイム PCR 法および WB 法による解析によって、ACCS-M細胞におけるmRNA発現量の解析を行ったところ、Ppp2r2bの 増加が認められ、翻訳産物である PR55β との関連性が示唆された。PR55β は、胎生期に発現が認 められ、成長とともにその発現量が減少していくタンパク質である (24)。主に、脳や精巣などに発現 が認められ、肺や脾臓などでもわずかに認められる。そのため、胎生期の正常な細胞分化に関連す る分子と考えられている。また、悪性腫瘍においても同様に分化や発達に関連していると推察される (25)。実際、PR55βは、多くの腫瘍において活性化が知られる myc シグナルを介して、大腸癌との

関連性が示唆されている(26)。今回の結果は、PR55βとβカテニンのリン酸化制御機構の関連性 へと導いた。つまり、PR55β がβカテニンの脱リン酸化に寄与し、それにともなう核内移行が促進さ れたものと考えられる。また、PR55βは神経細胞にも発現していることが、確認されている (24)。この 分子の脳における発現分布を解析した研究から、Alzheimer 病との関連性も示唆されている(27)。 AdCC が神経組織へ浸潤しやすいという臨床的病態には、この解析結果を支持するものである。す なわち、AdCC が神経組織に発現している PR55β と何らかの関連性を示唆するものであり、AdCC の組織浸潤に対する新たな作用機序の解明につながる可能性を秘めている。一方、PR55Bと同じ サブファミリーに属し、細胞増殖や形成などに関わる PR55α では、ヒト腫瘍細胞において、β カテニ ンと相互作用し脱リン酸化に関わることが報告されている (28)。PR55β に対する siRNA を用いた実 験では、PR55βタンパク質の発現抑制により、ACCS-M細胞における細胞遊走能や浸潤能が抑 制された。このことは、AdCC の転移能との関連性を強く支持する結果と思われる。今回の実験結果 は、がん抑制因子と考えられている PP2A が B サブユニットの発現動態によって腫瘍の悪性転換に 促進的にはたらくことを示した。言い換えれば、B サブユニットを介した PP2A のオーダーメイドシス テムの構築という、脱リン酸化機能に対する新たな知見が示された。これは非常に興味深く、AdCC 自身が、効率的に、そして同時選択的に悪性転換を導いた結果と考えられる。さらに特筆すべき点 は、この結果が、PR558 が分子標的薬として新たな標的となる可能性と、AdCC の形質に関する新 たなマーカー分子となる可能性についての洞察へとつながることである。

今回、β カテニンのリン酸化状態および細胞内局在を調べるために、β カテニンのリン酸化抗体を

用いた WB と免疫染色を行った。PR55β に対する siRNA を用いた実験では、PR55β の発現が β カテニンの脱リン酸化と総タンパク質量に影響をおよぼすことが明らかになった。また一部では β カ テニンが核内に局在していることも明らかになった。さらに、PR55β と β カテニンの特異的抗体を用 いた免疫沈降による結合実験から、両者の相互作用が影響している可能性が考えられた。すなわち ACC 細胞内では、PR55β と β カテニンの結合量を増加させることにより、β カテニンのリン酸化状態 を低く保ち、β カテニンの核移行を促進していることが示唆された。しかしながら、PR55β が足場サブ ユニットおよび触媒サブユニットと三量体を形成していることを加味すると、この PR55β と β カテニン の結合が直接的な結合なのか他の分子を介した結合なのかは不明である。この相互作用は ACC 細胞の制御機構の解明に非常に重要な要素であり、今後の更なる解析が期待される。

β カテニンは通常、GSK3β などのリン酸化酵素により、発現量が低く保たれている。このシグナル 伝達の異常は、β カテニンを細胞内に貯留し、核移行を促すことで β カテニンの恒常的活性化につ ながる。また、Wnt/β カテニン経路を介したシグナル伝達と癌の発達については、多くの研究からそ の重要性が示されている。さらに、AdCC と β カテニンの活性化にも強い相関が認められることが知 られている (29)。興味深いことに、膵臓癌細胞において PP2A の阻害剤が β カテニンの脱リン酸化 と分解を抑制し、その結果、腫瘍細胞の遊走能と増殖能が低下することが示された (30)。このことか ら、AdCC においても B サブユニットの発現を介して、同様の分子生物学的挙動が起きていること が考えられる。

これまで多くの文献的考察からヒト AdCC の病理組織型と癌の増殖や転移と相関があると考えら

れている。そのため、AdCC における PR55β の発現量についても、その関連性について考え、免 疫組織化学的解析を行った。その結果、ヒト AdCC から切除された腫瘍細胞においても PR55β が 発現していることが明らかになった。さらに、この発現量には組織型によって違いが認められ、 Tubular 型に比べ Solid 型でその発現量が多い傾向にあった。まだ検体数が少ないため、転移や患 者の予後との関連性については不明であり、今後の更なる解析が必要である。しかしながら、これら の結果は、膵臓癌細胞と同様に、AdCC においても Wnt/β カテニンシグナルと PP2A による重要な 脱リン酸化制御機構の存在を示し、今後 PR55β を標的にした治療戦略につながる可能性があり、 臨床的意義が高い。

今回の研究から、PP2A 調節サブユニットの一つである PR55β を介した AdCC における β カテ ニンのリン酸化制御機構の一端が明らかとなった。AdCC には、PP2A の B サブユニットの発現を コントロールすることで、効率的な悪性転換を可能にする自己促進的な調節機構が存在することが 示唆された (図 6)。



図 6. AdCC における PR55β を介した β カテニンのリン酸化制御機構

# 謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲を頂きました 森 悦秀 教授に謝意を表します。また、本研究の課題を 与え、実験方法や研究に対する姿勢など、直接指導頂きました 石井 広太郎 助教に深謝致します。 また、本研究を遂行するにあたり、実験に関わる御助言頂きました 住田 知樹 講師、杉山 悟郎 博 士に深く感謝致します。そして、様々な御助言や励ましのお言葉を頂いた、九州大学大学院 歯学 研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野の教官各位、研究室の皆様、研究生活を 支えてくださった全ての皆様方に、心から深く感謝致します。

#### 参考文献

- 1. Shenoy, V. S., Kamath, M. P., Sreedharan, S., and Suhas, S. S. (2015) Adenoid cystic carcinoma of the parotid gland associated with salivary calculi: An unusual presentation. *J Cancer Res Ther* **11**, 652
- 2. Thompson, L. D. (2015) Salivary gland adenoid cystic carcinoma. Ear Nose Throat J 94, 262-264
- Chae, Y. K., Chung, S. Y., Davis, A. A., Carneiro, B. A., Chandra, S., Kaplan, J., Kalyan, A., and Giles,
  F. J. (2015) Adenoid cystic carcinoma: current therapy and potential therapeutic advances based on genomic profiling. *Oncotarget* 6, 37117-37134
- Goodwin, L. (2004) Adenoid cystic adenocarcinoma of a minor salivary gland--an under-estimated risk? J Insur Med 36, 339-340
- Matsuba, H. M., Spector, G. J., Thawley, S. E., Simpson, J. R., Mauney, M., and Pikul, F. J. (1986) Adenoid cystic salivary gland carcinoma. A histopathologic review of treatment failure patterns. *Cancer* 57, 519-524
- Brazao-Silva, M. T., Cardoso, S. V., de Faria, P. R., Dias, F. L., Lima, R. A., Eisenberg, A. L., Nascimento, M. F., and Loyola, A. M. (2013) Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland: a clinicopathological study of 49 cases and of metallothionein expression with regard to tumour behaviour. *Histopathology* 63, 802-809
- Bell, D., Bell, A., Roberts, D., Weber, R. S., and El-Naggar, A. K. (2012) Developmental transcription factor EN1--a novel biomarker in human salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 118, 1288-1292
- Ramer, N., Wu, H., Sabo, E., Ramer, Y., Emanuel, P., Orta, L., and Burstein, D. E. (2010) Prognostic value of quantitative p63 immunostaining in adenoid cystic carcinoma of salivary gland assessed by computerized image analysis. *Cancer* 116, 77-83
- Perez-Yepez, E. A., Ayala-Sumuano, J. T., Lezama, R., and Meza, I. (2014) A novel beta-catenin signaling pathway activated by IL-1beta leads to the onset of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Cancer Lett* 354, 164-171
- Ishii, K., Shimoda, M., Sugiura, T., Seki, K., Takahashi, M., Abe, M., Matsuki, R., Inoue, Y., and Shirasuna, K. (2011) Involvement of epithelial-mesenchymal transition in adenoid cystic carcinoma metastasis. *Int J Oncol* 38, 921-931
- 11. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797-3804
- 12. Mumby, M. C., and Walter, G. (1993) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* **73**, 673-699
- 13. Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58, 453-508
- Magnusdottir, A., Stenmark, P., Flodin, S., Nyman, T., Kotenyova, T., Graslund, S., Ogg, D., and Nordlund, P. (2009) The structure of the PP2A regulatory subunit B56 gamma: the remaining piece of the

PP2A jigsaw puzzle. Proteins 74, 212-221

- 15. Kiely, M., and Kiely, P. A. (2015) PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing? Cancers (Basel) 7, 648-669
- Seshacharyulu, P., Pandey, P., Datta, K., and Batra, S. K. (2013) Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett* 335, 9-18
- Shirasuna, K., Watatani, K., Furusawa, H., Saka, M., Morioka, S., Yoshioka, H., and Matsuya, T. (1990) Biological characterization of pseudocyst-forming cell lines from human adenoid cystic carcinomas of minor salivary gland origin. *Cancer Res* 50, 4139-4145
- 18. Yang, H., Wei, Q., Zhong, X., Yang, H., and Li, B. (2017) Cancer driver gene discovery through an integrative genomics approach in a non-parametric Bayesian framework. *Bioinformatics* **33**, 483-490
- 19. Khurana, E. (2016) Cancer genomics: Hard-to-reach repairs. Nature 532, 181-182
- Zhang, D., Chen, P., Zheng, C. H., and Xia, J. (2016) Identification of ovarian cancer subtype-specific network modules and candidate drivers through an integrative genomics approach. *Oncotarget* 7, 4298-4309
- Perrotti, D., and Neviani, P. (2013) Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *Lancet Oncol* 14, e229-238
- 22. Chang, H. Y., Jennings, P. C., Stewart, J., Verrills, N. M., and Jones, K. T. (2011) Essential role of protein phosphatase 2A in metaphase II arrest and activation of mouse eggs shown by okadaic acid, dominant negative protein phosphatase 2A, and FTY720. *J Biol Chem* **286**, 14705-14712
- 23. Gotz, J., Probst, A., Ehler, E., Hemmings, B., and Kues, W. (1998) Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12370-12375
- Schmidt, K., Kins, S., Schild, A., Nitsch, R. M., Hemmings, B. A., and Gotz, J. (2002) Diversity, developmental regulation and distribution of murine PR55/B subunits of protein phosphatase 2A. *Eur J Neurosci* 16, 2039-2048
- Sents, W., Meeusen, B., Kalev, P., Radaelli, E., Sagaert, X., Miermans, E., Haesen, D., Lambrecht, C., Dewerchin, M., Carmeliet, P., Westermarck, J., Sablina, A., and Janssens, V. (2017) PP2A Inactivation Mediated by PPP2R4 Haploinsufficiency Promotes Cancer Development. *Cancer Res* 77, 6825-6837
- 26. Tan, J., Lee, P. L., Li, Z., Jiang, X., Lim, Y. C., Hooi, S. C., and Yu, Q. (2010) B55beta-associated PP2A complex controls PDK1-directed myc signaling and modulates rapamycin sensitivity in colorectal cancer. *Cancer Cell* 18, 459-471
- Kins, S., Crameri, A., Evans, D. R., Hemmings, B. A., Nitsch, R. M., and Gotz, J. (2001) Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. *J Biol Chem* 276, 38193-38200
- Zhang, W., Yang, J., Liu, Y., Chen, X., Yu, T., Jia, J., and Liu, C. (2009) PR55 alpha, a regulatory subunit of PP2A, specifically regulates PP2A-mediated beta-catenin dephosphorylation. *J Biol Chem* 284, 22649-22656
- Wang, R., Geng, N., Zhou, Y., Zhang, D., Li, L., Li, J., Ji, N., Zhou, M., Chen, Y., and Chen, Q. (2015) Aberrant Wnt-1/beta-catenin signaling and WIF-1 deficiency are important events which promote tumor

cell invasion and metastasis in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Biomed Mater Eng* **26 Suppl 1**, S2145-2153

Wu, M. Y., Xie, X., Xu, Z. K., Xie, L., Chen, Z., Shou, L. M., Gong, F. R., Xie, Y. F., Li, W., and Tao, M. (2014) PP2A inhibitors suppress migration and growth of PANC-1 pancreatic cancer cells through inhibition on the Wnt/beta-catenin pathway by phosphorylation and degradation of beta-catenin. *Oncol Rep* 32, 513-522