

腺様嚢胞癌におけるPR55 β 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 PR55 β 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 β -catenin phosphorylation by PR55 β 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 (腺様嚢胞癌)

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)

GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β (グリコーゲン合成リン酸化酵素 3 β)

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)

PR55 β : 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 55 β)

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

siRNA : small interfering RNA (低分子干渉性 RNA)

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

目 次

要旨	1
緒言	3
材料と方法	6
結果	16
考察	24
謝辞	30
参考文献	31

要 旨

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まなう核移行は、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* に関してはウェ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 PR55 β 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 PR55 β 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 PR55 β 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 PR55 β 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 PR55 β 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、PR55 β 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

腺様嚢胞癌 (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 (GSK3 β) 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

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 PR55 β 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 μ g/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 μ g/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

す。

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を用いた。

ACCS-M 細胞を培養液中で細胞密度が 2.5×10^7 個 / mL になるように調製し、この細胞浮遊液 40 μ L (1.0×10^6 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 Industries) 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。

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、音波破碎により溶解し、室温で 10 分間放置した。その後、クロロホルム (Wako Pure Chemical Indutstres) 200 μ L を加えて 3 分間攪拌し、室温で 3 分間放置後、4°C、14,500 rpm で 10 分間遠心分離した。RNA を含む水層を約 300 μ L 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 μ L を加えて混合し、室温で 10 分間放置した。その後、4°C、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°C、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 H₂O 20 μ L に溶解した。その後、65°C で 10 分間保温し、攪拌後氷冷した。RNase Inhibitor (Promega, Madison, WI) を 1 μ L 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 μ g の全 RNA を鋳型として、40 U/ μ L の recombinant RNasin[®]Ribonuclease Inhibitor (Promega) を 0.5 μ L、0.5 μ g/ μ L の逆転写プライマー pd(T)₁₂₋₁₈ を 1 μ L、250 mM トリス塩酸塩 (pH 8.3)、375 mM KCl および 15 mM MgCl₂ を含む 5 × 反応緩衝液を 4 μ L、100 mM dithiothreitol を 2 μ L、200 U/ μ L の SUSPERSCRIPT[™]II RNase H- Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を 0.5 μ L 加えて合計 20 μ L とし、42°C で 1 時間インキュベートした。その後、95°C 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 H₂O 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

<i>Ppp2r2a</i>	(F) 5'-GCAACAGGAGATAAAGGTGGTAG-3'
	(R) 5'-TGGTTCATGGCTCTGGAAGGTG-3'
<i>Ppp2r2b</i>	(F) 5'-GCGTGATAAGAGGCCAGAAG-3'
	(R) 5'-TGTGTGCGTTGGCAAATACT-3'
<i>Ppp2r2c</i>	(F) 5'-AGAGCTGATGACCTCACCGTTGTT-3'
	(R) 5'-ATCAGATGAGGACACAGGCACACA-3'
<i>Ppp2r2d</i>	(F) 5'-CGTGAACAAGAGAATAAAAGCCG-3'
	(R) 5'-CTTCAATATTGGGACCCGTAG-3'
<i>Ppp2r3a</i>	(F) 5'-ACGCTTGTTGCAGAGGAATC-3'
	(R) 5'-TCCAAATTCAGAGGGAGAGG-3'
<i>Ppp2r3c</i>	(F) 5'-TCGTCGGCGCCTAGCGACGCCAACACCTG-3'
	(R) 5'-ATCGCTTCCTCTCCAATCATAGGTGGTGTCT

GGTGTTTGTCCAGC-3'

- Ppp2r4* (F) 5'-GCTGAGGGCGAGCGGCAGCCGCCGCA-3'
(R) 5'-GCCAGATGGGTAGGGACCACTGTGGCCACC-3'
- Ppp2r5a* (F) 5'-GAGTATGTTTCAACTAATCGTGGTGTAATTGTTGAATCAGCG-3'
(R) 5'-TCCCATAAATTCGGTGCAGAACAGTCTTCAGG-3'
- Ppp2r5b* (F) 5'-GACAACTGCCCACTGTGCT-3'
(R) 5'-TCCAGCTTGTAGGAGGCTGT-3'
- Ppp2r5c* (F) 5'-GTAATAAAGCGGGCAGCAGG-3'
(R) 5'-CAAAGT CAAAGAGGACGCAACA-3'
- Ppp2r5d* (F) 5'-AACTCCAAGAGCCACTGGAA-3'
(R) 5'-TGCCACATCTCTCCCTTTC-3'
- Ppp2r5e* (F) 5'-AAGCCAGACAGAAGAGGTCGCA-3'
(R) 5'-AGGAACAGTTCAGGCTGCTCTG-3'
-

6. ウェ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) を用いて音波破碎により溶解した。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、Laemmli 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 °C、30 分加熱し変性させ、-30 °C 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、特異的二次抗体で常温 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 細胞は細胞破碎液 [50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、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碎液は 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、破碎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碎液で 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 3×10^5 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 μ L 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。

$$\text{面積 (\%)} = (\text{観察時の面積} / \text{観察開始直後の創部面積}) \times 100$$

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。PR55 β 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 15×10^4 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。

$$\text{浸潤能 (\%)} = (\text{フィルターインサートの平均細胞数} / \text{コントロールインサートの平均細胞数}) \times 100$$

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 PR55 β 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 PR55 β 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 °C 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 °C、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。ヒ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 μ L 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 分間のブ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 °C 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。

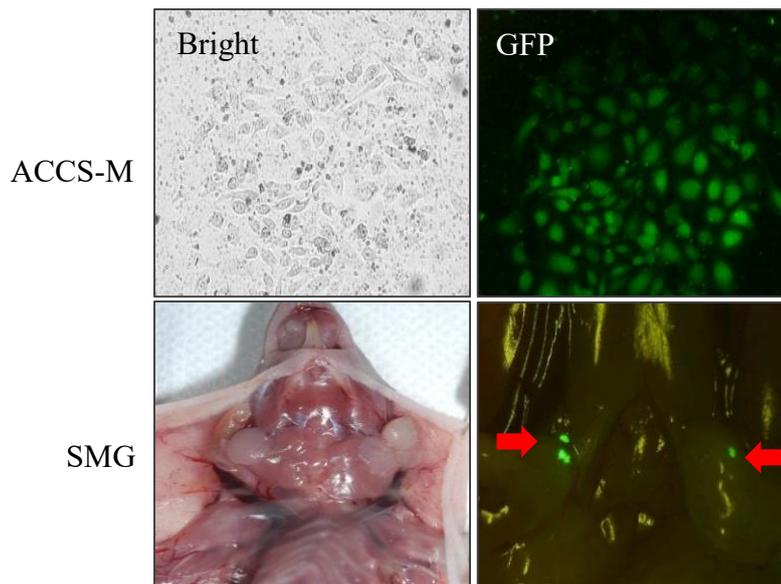
結 果

1. 各 PP2A 調節サブユニットの mRNA 発現量の比較

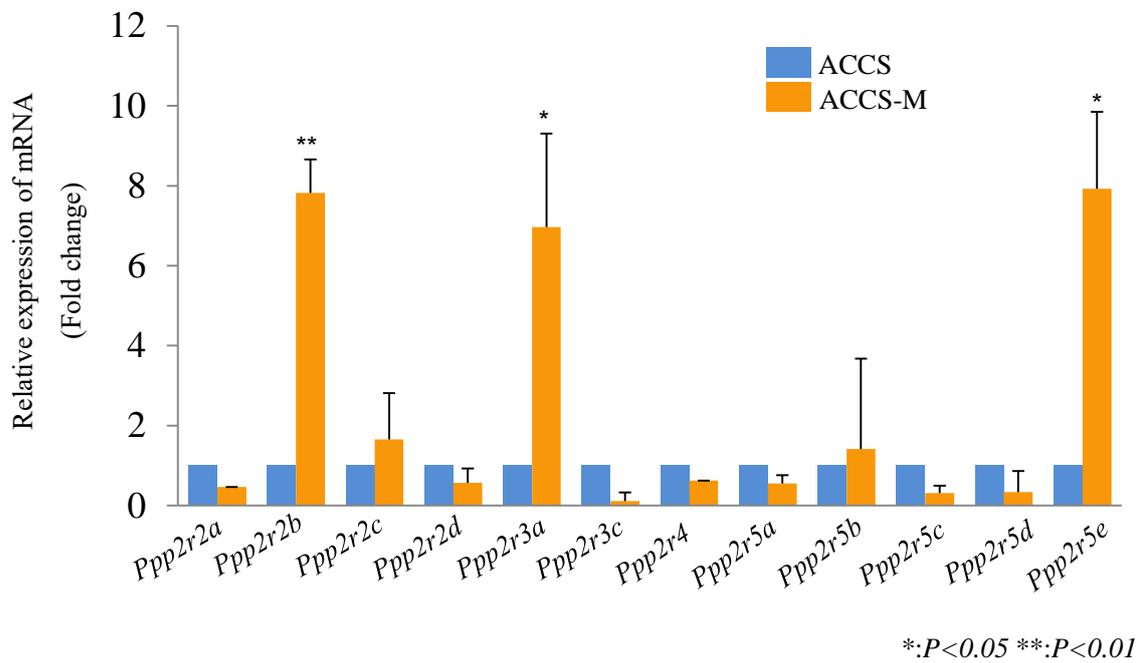
AdCC の悪性転換に関連する PP2A 調節サブユニットを調べるために、ACCS および ACCS-M 細胞を用いて分子細胞生物学的検討を行った。まず ACCS-M 細胞をマウス舌に接種し、励起光下でマウス顎下リンパ節を確認したところ、GFP による蛍光発色が確認された。このことから、恒常的に GFP を発現している ACCS-M 細胞が、顎下リンパ節へ転移していたことが確認された (図 1A)。

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 PR55 β 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)。

A



B



C

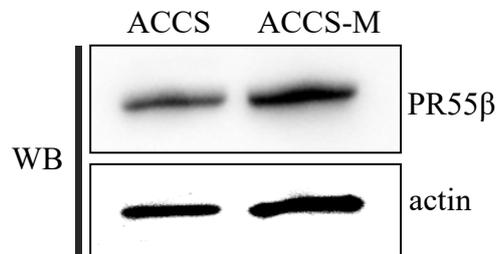


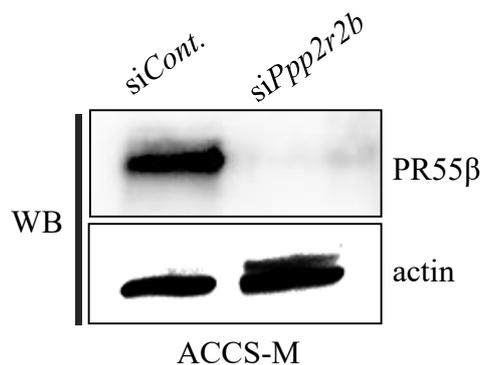
図 1. 各 PP2A 調節サブユニットの mRNA 発現量の比較

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)。PR55β および β-actin の抗体を用いて WB 解析を行った (C)。

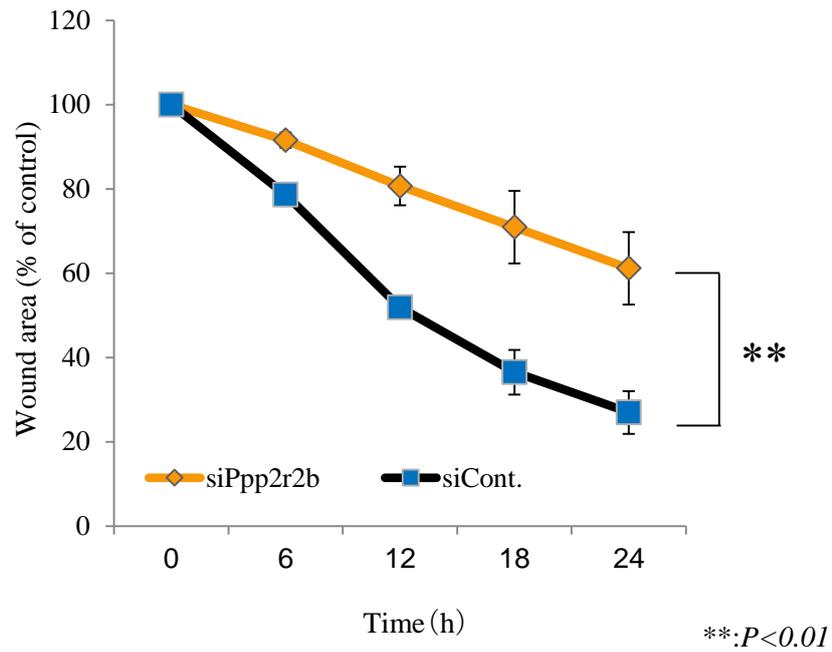
2. ACCS-M 細胞の細胞生物学的特性に対する PR55 β の影響

PR55 β 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 PR55 β 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 PR55 β 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、PR55 β 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 細胞の細胞浸潤能も有意に低下した (図 2C)。このことから、PR55 β は ACCS-M 細胞の悪性転換を促進することが示唆された。

A



B



C

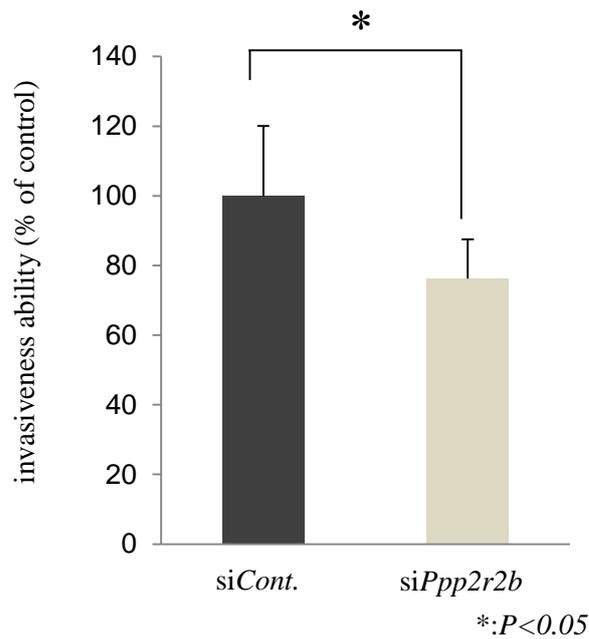


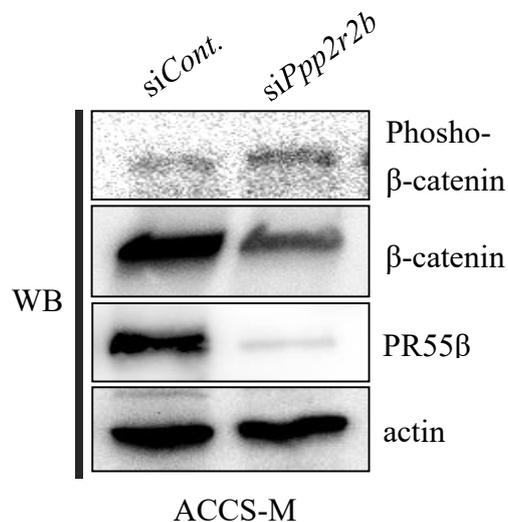
図 2. ACCS-M 細胞の細胞生物学的特性に対する PR55 β の影響

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 PR55 β の影響

次に、PR55 β 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 PR55 β 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 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、PR55 β 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。

A



B

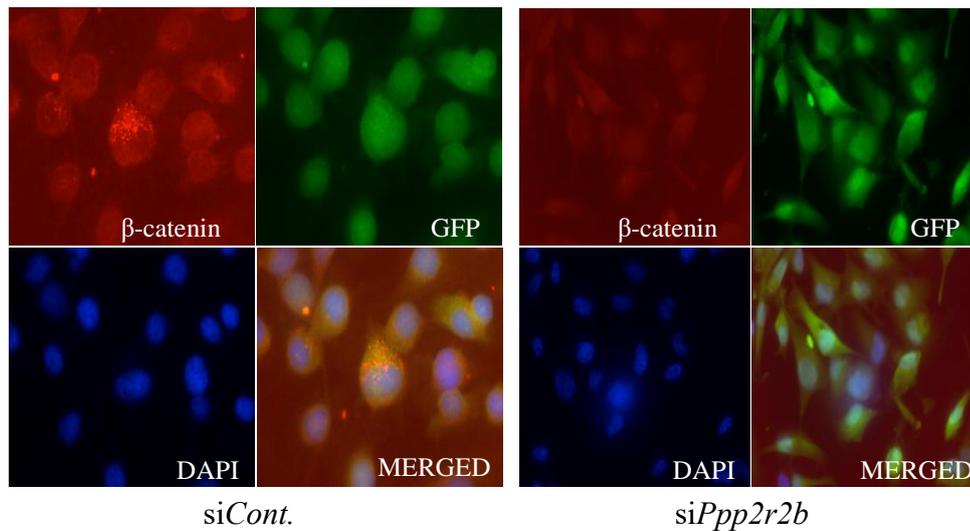


図 3. β カテニンの脱リン酸化状態に対する PR55 β の影響

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 PR55 β の結合

続いて、ACCS および ACCS-M 細胞における β カテニンと PR55 β 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 細胞の細胞破碎液に対して、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 PR55 β 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 PR55 β 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 PR55 β が相互作用することが示された。

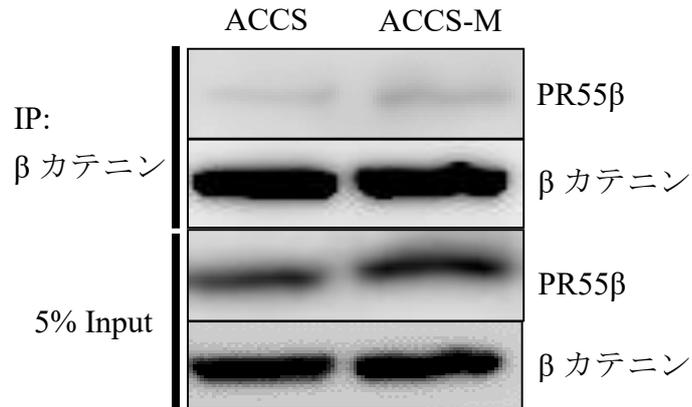


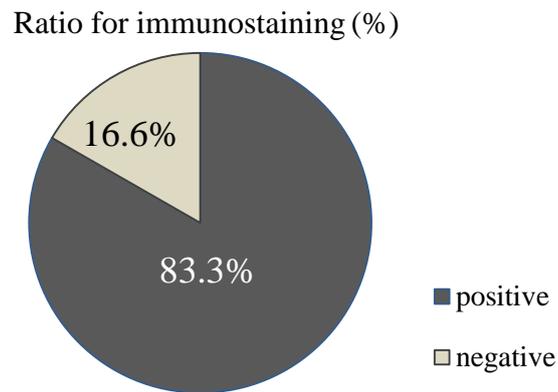
図 4. ACCS および ACCS-M 細胞における β カテニンと PR55 β の結合

ACCS および ACCS-M 細胞を細胞破碎液にて懸濁し、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 PR55 β 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。細胞破碎液の 5% 量を Input として使用した。

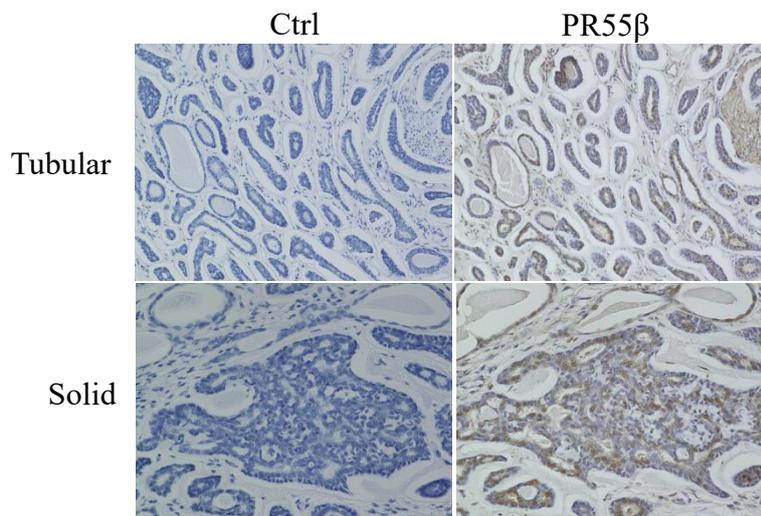
5. AdCC 組織における病理組織型と PR55 β の発現量の関連性

最後に、手術により切除したヒト AdCC 組織における PR55 β 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、PR55 β 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 ($\times 20$) で観察した (図 5B)。このうち免疫染色された PR55 β 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 PR55 β 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。

A



B



C

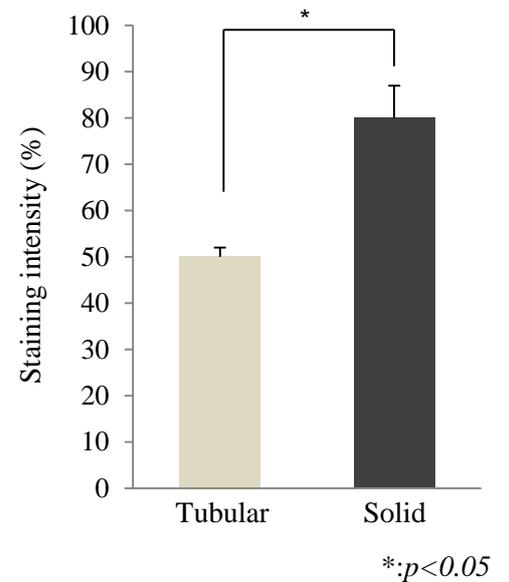


図 5. ヒト AdCC 組織における PR55 β 発現量と病理組織学的検討

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 PR55 β 抗体を用いて 12 時間、4 $^{\circ}\text{C}$ 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 ($\times 12$) 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

ァ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PR55 β との関連性が示唆された。PR55 β 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、PR55 β 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、PR55 β 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、PR55 β が β カテニンの脱リン酸化に寄与し、それにもなう核内移行が促進されたものと考えられる。また、PR55 β 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 PR55 β 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、PR55 β 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 PR55 α 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)。PR55 β に対する siRNA を用いた実験では、PR55 β タンパク質の発現抑制により、ACC5-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、PR55 β 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。PR55 β に対する siRNA を用いた実験では、PR55 β 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、PR55 β 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、PR55 β 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、PR55 β 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 PR55 β 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、GSK3 β 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PR55 β 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PR55 β 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PR55 β 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PR55 β 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)。

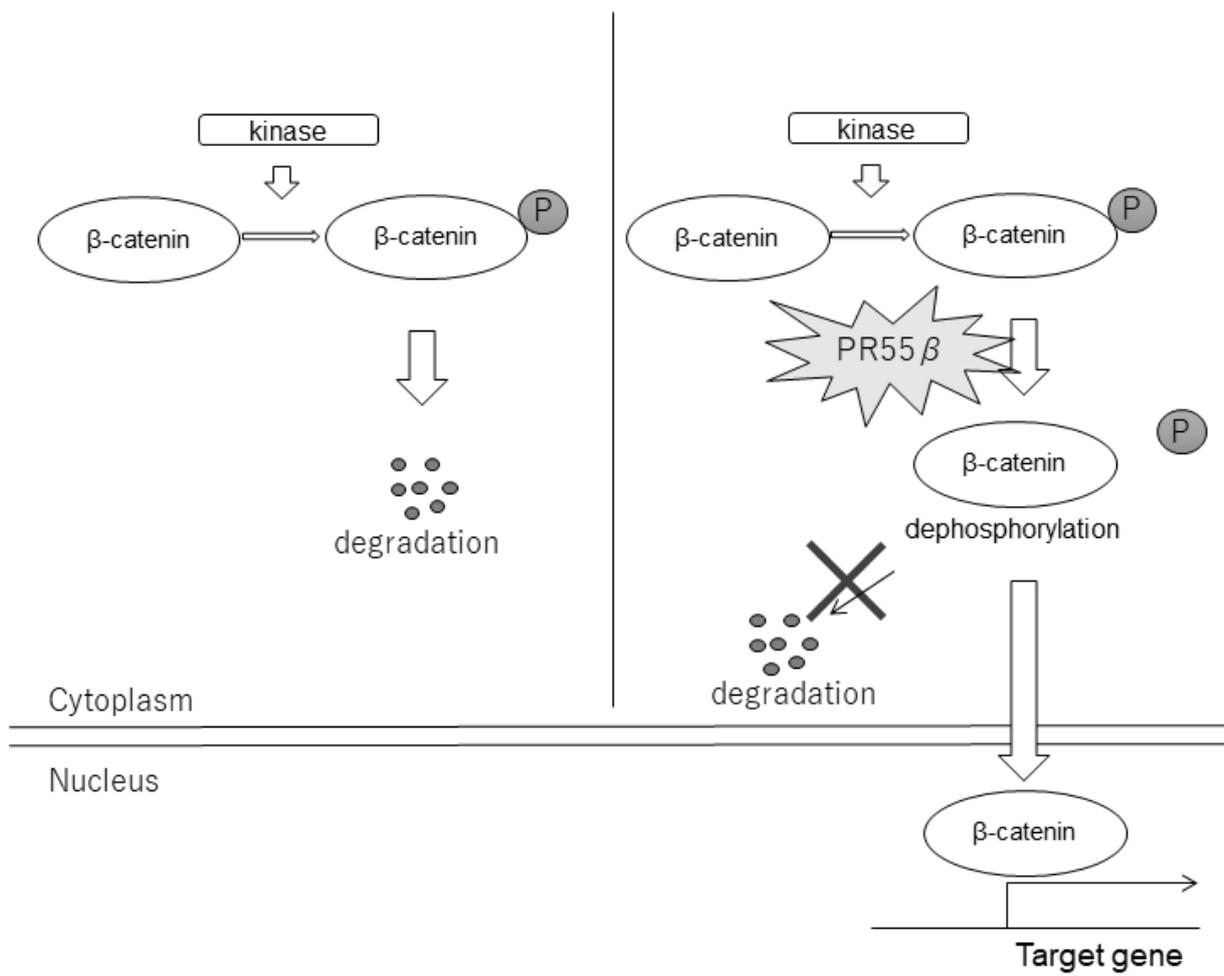


図 6. AdCC における PR55β を介した β カテニンのリン酸化制御機構

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
3. 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
4. Goodwin, L. (2004) Adenoid cystic adenocarcinoma of a minor salivary gland--an under-estimated risk? *J Insur Med* **36**, 339-340
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. Perez-Yepe, 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
10. 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
14. 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
 16. 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
 17. 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
 20. 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
 21. 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
 24. 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
 25. 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
 27. Kins, S., Cramer, 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
 28. 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
 29. 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

30. 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