

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591162

研究課題名(和文)肺構成細胞間葉系形質転換に対するPTENC末端リン酸化を標的とした新規治療戦略

研究課題名(英文)New therapeutic strategy targeting phosphorylation sites of the PTEN C-terminus for lung epithelial/endothelial-mesenchymal transition

研究代表者

橋本 直純 (Hashimoto, Naozumi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：30378020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉系移行(EMT)誘導因子がPTENのC末端リン酸化亢進を介して脱リン酸化活性化を減弱させることに着目して、PTENC末端リン酸化部位修飾(PTEN4A)発現誘導がPTENの脱リン酸化活性化を保持してTGF β 誘導EMTを抑制することを明らかにした。外的PTEN4A遺伝子導入効果を評価するためにadenovirusを用いて外的PTEN4A遺伝子導入を行い、TGF β 誘導EMTを抑制することの知見を得ることができた。さらに、PTENC末端部位自体はPTENの脱リン酸化活性を示さないが、PTENのphosphatase domainとC2 domainの相互作用が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although many pathways in the tumor microenvironment are negatively regulated by the concerted lipid and protein phosphatase activities of PTEN, pulmonary fibrosis and lung cancers often show hyperactivation of these pathways. We recently showed that TGF β and other factors stimulation modifies both phosphorylation of PTEN on its C-terminus (p-PTEN) and total PTEN levels in lung cancer cells, and consequently leads to the loss of PTEN activities. Unphosphorylated PTEN with four alanine (Ala) substitution of the phosphorylation sites in the PTEN C-terminus (PTEN4A) rescues cells from TGF β -induced loss of PTEN activities and the acquisition of EMT phenotypes. In this project, we demonstrated that exogenous induction of adenovirus carrying PTEN4A repressed TGF β -induced EMT in alveolar cells. Furthermore, by structural and function analysis of PTEN, we showed that the phosphatase activity of PTEN4A depended on an essential association between the C2 and phosphatase domains.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：線維症 肺癌 PTEN TGFbeta

1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎 (IIPs) は、臓器不全の終末症状として呼吸不全をもたらす予後不良な疾患であるが有効な治療法は確立されておらず対策が急務な疾患であると認識されている。肺線維症の線維化病変に存在する多様な表現型を有する線維芽細胞とその線維化経路自体への関与が示唆され、骨髄由来線維芽細胞や肺上皮細胞および肺血管内皮細胞による肺構成細胞間葉系形質転換(Lung Cells-Mesenchymal transition; EMT)を介したさまざまな細胞起源由来線維芽細胞の存在が証明された。組織微小環境である線維化病変は EMT を誘導して更なる線維化病変の過剰形成をもたらすと同時に、間質性肺炎が高率に肺癌を合併するという臨床知見と合わせて過剰形成された線維化病変が腫瘍微小環境として高率に肺癌の発症母地となるといった認識に至った。PTEN は脂質および蛋白に対する脱リン酸化酵素活性を示し、組織微小環境下で活性化される種々のリン酸化シグナルを脱リン酸化することにより負の制御機構を担っている。PTEN C 末端に存在する 4 つのリン酸化部位のリン酸化によって PTEN の " Opened " 構造から " Closed " 構造への立体構造変化が起こり、PTEN の脱リン酸化作用が負の制御を受けることが示された。

2. 研究の目的

組織微小環境由来 EMT 誘導因子である TGFβ および低酸素刺激を標的とする PTEN C 末端リン酸化部位リン酸化制御を用いた肺線維症の新規治療戦略を構築することを目的とした。

(1) 非リン酸化 C 末端を有する PTEN を含むアデノウイルス作成

我々は、PTEN C 末端の 4 つのリン酸化部位に対してアラニン残基置換を行い、非リン酸化 C 末端を有する PTEN を作成した (PTEN4A)。

(2) アデノウイルス PTEN4A 外的遺伝子導入による EMT 制御効果の検証

内因性 PTEN4A が TGFβ 誘導 EMT の表現型獲得を抑制する知見を得ているので、アデノウイルスを用いた PTEN4A の外的導入が TGFβ 誘導 EMT の表現型獲得するかどうかを評価した。

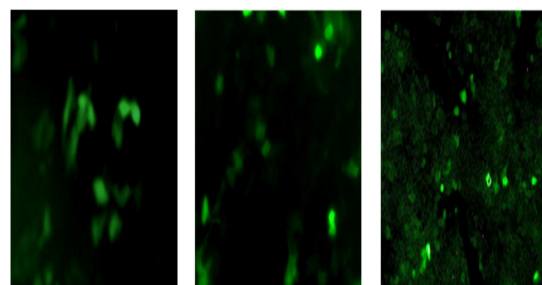
(3) PTEN4A による EMT 制御の直接作用機序の同定のための PTEN 構造機能解析

PTEN は phosphatase ドメイン、C2 ドメイン、そして、C 末端部位から構成されている。今回 PTEN C 末端のリン酸化部位修飾を行うことによって、TGFβ 誘導 EMT の表現型獲得を抑制する知見を得たが、しかしながら、PTEN C 末端リン酸化部位が、直接この効果を示すのかどうかは明らかではない。これらにより組織微小環境としての線維化病変を直接標的とした肺線維症の治療戦略の構築を行なうことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PTEN4A 遺伝子導入アデノウイルス作成及びアデノウイルス PTEN4A 外的遺伝子導入による EMT 制御効果の検証

我々は PTEN C 末端の 4 つのリン酸化部位にリン酸化不応型遺伝子置換を行なった GFP-PTEN4A、GFP、GFP-PTENwild (GFP-PTENwt) を作成した。標的遺伝子発現が外的遺伝子導入によって効率的もたらすことを肺上皮細胞株である H358 細胞に Adeno virus 感染を行って発現を確認した (Figure1)。



Adeno-GFP Adeno-GFP-PTENwt Adeno-GFP-PTEN4A

Figure1

次に、TGFβ 誘導 EMT への抑制効果を評価し

た。Adeno virus 導入遺伝子発現は TGFβ 刺激によって発現は影響されないことが確認された(Figure2)。

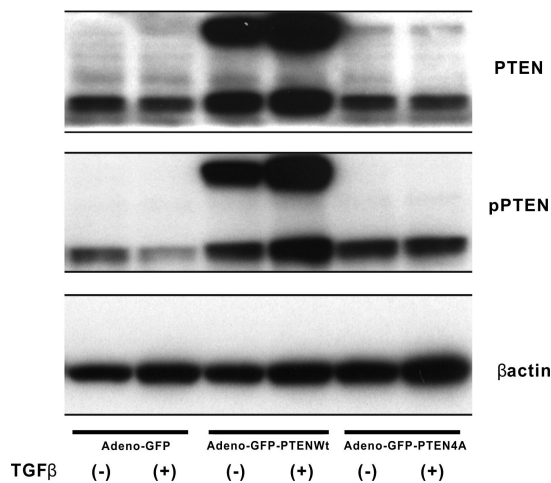


Figure2

Adeno virus 導入遺伝子発現による TGFβ 誘導 EMT は GFP-PTENwt 導入では間葉系表現型である Fibronectin の TGFβ 誘導亢進を抑制することはできず、上皮表現型である E-cadherin の TGFβ 誘導抑制を回復することはできなかった。一方、GFP-PTEN4A 導入では、TGFβ 誘導外的遺伝子導入によって有意に抑制された(Figure3)。

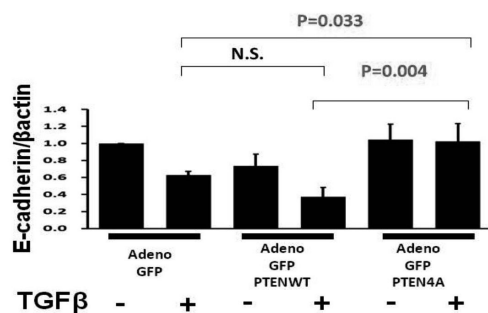
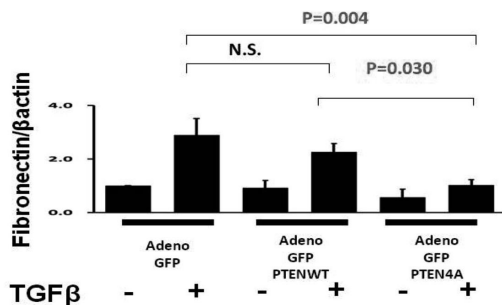


Figure3

(2) PTEN4A による EMT 制御の直接作用機序の同定のための PTEN 構造機能解析

PTENC 末端リン酸化修飾が PTEN 活性化に重要である知見を得た。そこで、PTEN4A の C 末端の欠損遺伝子(Tail Del)と C 末端のみ(Tail only)を作成した(Figure4)。Tail Del のア

デノウイルスの遺伝子導入は TGFβ 誘導 EMT を抑制した。一方、Tail only のアデノウイルスの遺伝子導入は TGFβ 誘導 EMT の抑制を誘導しなかった(Figure5)。

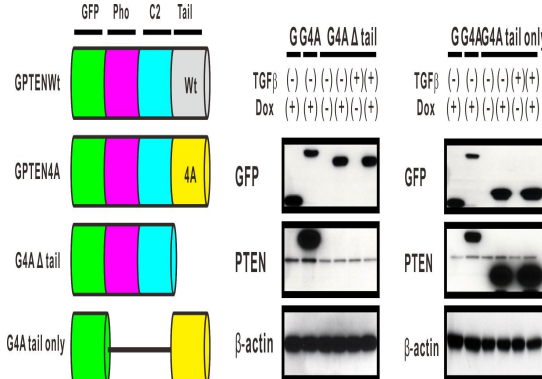


Figure4

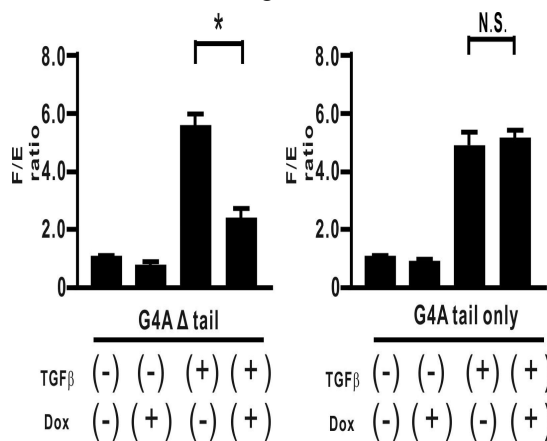


Figure5

PTEN 活性が 2 つの domains の phosphatase domain と C2 domain の相互作用に依るかどうかを評価するために、phosphatase domain deletion (phosphatase)と C2 domain deletion (C2)と C2 domain only を作成した(Figure6)。phosphatase、 C2、および、C2 domain only の外的遺伝子導入は TGFβ 誘導 EMT を抑制することができなかった(Figure7)。

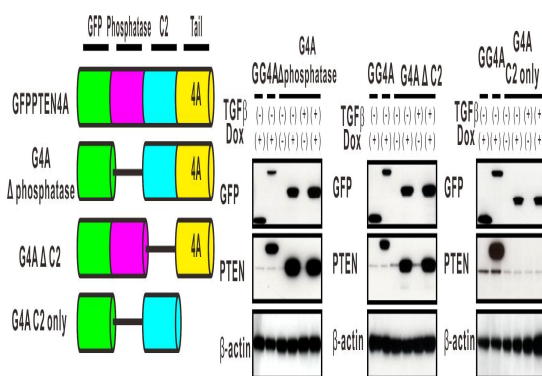
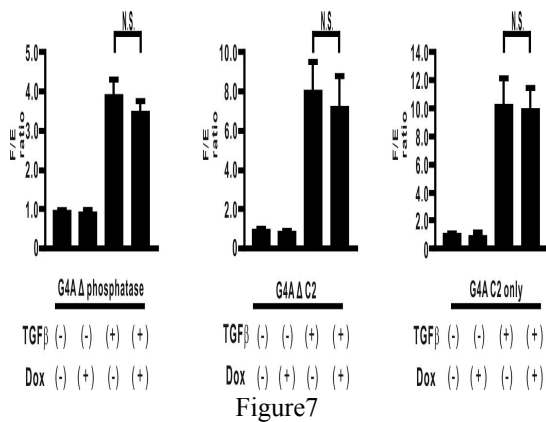


Figure6



4. 研究成果

PTEN は脂質および蛋白に対する脱リン酸化酵素活性を示し、組織微小環境下で活性化される種々のリン酸化シグナルを脱リン酸化することにより負の制御機構を担っているが、肺線維症や肺癌では、PTEN 活性の減弱が報告されている。我々は、微小環境で形成される EMT 誘導因子が PTEN の C 末端リン酸化亢進を介して脱リン酸化活性化を減弱させることを示している。さらに、PTEN 末端リン酸化部位修飾 (PTEN4A) 発現誘導が TGFβ 誘導 EMT を抑制することも明らかにした。そうした知見に基づき、PTEN 末端リン酸化部位を治療標的とした治療戦略を構築することが重要であると考えに至った。しかしながら、外的 PTEN4A 遺伝子導入が細胞内発現誘導と同様の効果を示すかどうかの知見は得られていなかった。また、我々は、adenovirus を用いて外的 PTEN4A 遺伝子導入を行い、細胞内発現誘導と同様に TGFβ 誘導 EMT を抑制することの知見を得ることができた。さらに、外的遺伝子導入を具現化するにはできる限り最小限の機能を有した遺伝子導入を行うことが予想外の免疫応答を及ぼす可能性を最小化するために重要であると考えに至った。PTEN の機能解析で、PTEN C 末端部位自体は PTEN の脱リン酸化活性を示さないが、PTEN C 末端部位が存在しなくても PTEN4A が示す EMT 制御効果を示すことを確認した。この知見は、PTEN C 末端がリン酸化されないことが重要であることを示唆している。また、PTEN の phosphatase domain は単独で PTEN 活性を示すかどうかを検証したが、PTEN 活性を示すためには、phosphatase ドメインと C2 ドメインの相互作用が重要であることが明らかになった。これらの結果は、PTEN の外的導入を推進するために極めて重要な知見であり、PTEN 機能を示す最小単位を明らかにしたことが有意義であると考えに至った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

indicates equal contribution.

1. Takashima K, Matsushima M, Hashimoto K, Nose H, Sato M, Hashimoto N, Hasegawa Y, Kawabe T.

Protective effects of intratracheally administered quercetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury.

Respir Res. 15(1):150. 2014 査読有

2. Wu W, Ichihara G, Hashimoto N, Hasegawa Y, Hayashi Y, Tada-Oikawa S, Suzuki Y, Chang J, Kato M, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC, Ichihara S.

Synergistic Effect of Bolus Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles on Bleomycin-Induced Secretion of Pro-Fibrotic Cytokines without Lasting Fibrotic Changes in Murine Lungs.

Int J Mol Sci. 16(1):660-76. 2014 査読有

3. Kitano M, Iwano S, Hashimoto N, Matsuo K, Hasegawa Y, Naganawa S

Lobar analysis of collapsibility indices to assess functional lung volumes in COPD patients.

Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2014 Dec 9;9:1347-1356. eCollection 2014. 査読有

4. Ogawa T, Imaizumi K, Hashimoto I, Shindo Y, Imai N, Uozu S, Shimokata T, Ito S, Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y

Prospective analysis of efficacy and safety of an individualized-midazolam-dosing protocol for sedation during prolonged bronchoscopy.

Respir Investig. 52(3):153-9. 2014 査読有

5. Hashimoto N, Matsuzaki A, Okada Y, Imai N, Iwano S, Wakai K, Imaizumi K, Yokoi K, Hasegawa Y.

Clinical impact of prevalence and severity of COPD on the decision-making process for therapeutic management of lung cancer patients.

BMC Pulm Med 14(1):14. doi: 10.1186/1471-2466-14-14. 2014. 査読有

6. Aoyama D#, Hashimoto N#, Sakamoto K, Kohnoh T, Kusunose M, Kimura M, Ogata R, Imaizumi K, Kawabe T, Hasegawa Y.

Involvement of TGFβ-induced phosphorylation of the PTEN C-terminus on TGFβ-induced acquisition of malignant phenotypes in lung cancer cells.

Plos One 8(11):e81133. 2013. 査読有

7. Takahashi N, Kondo T, Fukuta M, Takemoto A, Takami Y, Sato M, Ando T, Hashimoto N, Suzuki T, Sato J, Yamamura M, Ban N.

Selective IgA deficiency mimicking Churg-Strauss syndrome and hypereosinophilic syndrome: a case report.

Nagoya J Med Sci 75(1-2):139-46. 2013. 査読有

8. Imai N, Imaizumi K, Ando M, Shimokata T, Ogawa T, Ito S, Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y.

Echoic features of lymph nodes with sarcoidosis determined by endobronchial ultrasound.

Intern Med 52(13):1473-8.2013. 査読有

9. Okachi S, Imai N, Imaizumi K, Hase T, Shindo

Y, Sakamoto K, Aso H, Wakahara K, Hashimoto I, Ito S, Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y.

Endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration in older people.

Geriatr Gerontol Int 13(4):986-92. 2013. 査読有
10. Ohno T, Okamoto M, Hara T, Hashimoto N, Imaizumi K, Matsushima M, Nishimura M, Shimokata K, Hasegawa Y, Kawabe T.

Detection of loci for allergic asthma using SMXA recombinant inbred strains of mice. Immunogenetics 65(1):17-24. 2013. 査読有

11. Oguri T, Imai N, Imaizumi K, Elshazley M, Hashimoto I, Hashimoto N, Hasegawa Y.

Febrile complications after endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for intra-pulmonary mass lesions of lung cancer--a series of 3 cases.

Respir Investig 50(4):162-5. 2012. 査読有

12. Hashimoto I, Imaizumi K, Hashimoto N, Furukawa H, Noda Y, Kawabe T, Honda T, Ogawa T, Matsuo M, Imai N, Ito S, Sato M, Kondo M, Shimokata K, Hasegawa Y.

An aqueous fraction of *Sauropus androgynus* might be responsible for bronchiolitis obliterans.

Respirology 18 (2): 340-347. 2012. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Hashimoto N, Kusunose M, Aoyama D, Kimura M, Hasegawa Y:

“Comprehensive analysis of the PTEN domains on TGFβ-induced aberrant cell motility in lung alveolar/epithelial cells by using PTEN constructs with deletion mutants”

European Respiratory Society Annual Congress 2014, Munchen, Germany, 2014 年 9 月 8 日

2. Hashimoto N, Aoyama D, Hasegawa Y:

“Translocation of β-catenin into cytoplasm during TGFβ-induced EMT is negatively regulated by phosphorylation of the PTEN C-terminus in lung cancers”

European Respiratory Society Annual Congress 2013, Barcelona, Spain, 2013 年 9 月 8 日

3. Hashimoto N, Aoyama D, Hasegawa Y:

“Modulation of Phosphorylation Sites In The PTEN C-Terminal Inhibits TGFβ-Induced EMT In Lung Cancers Via Blockade Of Translocation Of β-Catenin Into Cytoplasm”

The 2013 American Thoracic Society (ATS) International Conference, Philadelphia, USA, 2013 年 5 月 20 日

4. Hashimoto N, Aoyama D, Sakamoto K, Hasegawa Y:

“Compensatory induction of mutated phosphorylation sites in the PTEN C-terminal suppresses tumor growth in lung cancers in vivo.”

The 2012 American Thoracic Society (ATS)

International Conference, San Francisco, USA, 2012 年 5 月 23 日

5. Hashimoto N, Matsuo M, Usami N, Yokoi K, Hasegawa Y:

“Spirometric inspiratory capacity is a useful preoperative assessment in patients undergoing thoracic surgery”,

The 2012 American Thoracic Society (ATS) International Conference, San Francisco, USA, 2012 年 5 月 23 日

6. Hashimoto N, Sakamoto K, Hasegawa Y:

“Acute and persistent hypoxia differentially induces surfactant protein D modulation and epithelial-mesenchymal transition via hypoxia-inducible factor 1α and twist stimulation in acute lung injury/fibrosis.”

The 2012 American Thoracic Society (ATS) International Conference, San Francisco, USA, 2012 年 5 月 22 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med-nagoya-respmed.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 直純 (Naozumi Hashimoto)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：30378020

(2)研究分担者

長谷川 好規 (Yoshinori Hasegawa)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20270986