

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15322

研究課題名(和文) 生体応答を模倣した細胞内導入デリバリーシステムを用いた肺線維症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of new therapy for pulmonary fibrosis by using exogenous protein delivery system mimicked biological mechanism

研究代表者

橋本 直純 (HASHIMOTO, NAOZUMI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30378020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：PTEN細胞外分泌誘導ドメインGFP発現株(N173GFP)を構築した。N173の開始コドンにkozakシーケンスを加えることによって細胞内発現効率が改善した。N173GFPの細胞内発現を確認した後、培養上清における細胞外分泌蛋白を評価したが、細胞上清中にPTEN細胞外ドメイン(N151)は検出できなかった。細胞内移行に用いるPTEN細胞外分泌誘導ドメイン(N151)を樹立できた。N151蛋白を肺上皮細胞への細胞外投与を行なったが、細胞内GFPの蛍光は同定できなかった。今後誘導効率を改善する遺伝子修飾と細胞外分泌PTENの回収効率を改善させる手法を確立することにより新規治療確立につなげる。

研究成果の概要(英文)：We established the cells with the GFP-fused domain to induce secretion of PTEN (N173GFP). The additional kozak sequence to an alternative translation start site of PTEN improved the expression level of N173GFP. Although intracellular expression of N173GFP was detected, N151GFP, the secreted type of N173GFP, could not be detected in the culture media. To directly treat epithelial cells with exogenous PTEN, we established the cells which produce the GFP-fused secreted alternative domain of PTEN (N151GFP). When exogenous administration of GFPN151 to epithelial cells was performed in vitro, immunofluorescent evaluation could not show GFP expression in the cells. By not only the gene modification of alternative translation start site of PTEN to improve expression rate but also the determination of appropriate condition to improve recovery rate of secreted PTEN protein, we establish the new therapeutic strategy to regulate tissue microenvironment.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：分子細胞尾呼吸器学 線維芽細胞 細胞内導入デリバリーシステム PTEN

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎は呼吸不全の進行とともに高率に肺癌合併を伴う予後不良の病態として認識されている。さらに間質性肺炎の急性増悪は間質性肺炎合併肺癌での化学療法中および外科手術後にしばしば発症する解決が急務な臨床的課題である。間質性肺炎の線維化病変では VEGF, FGF, PDGF などの受容体チロシンリン酸化シグナル(RTK)亢進が認められるなど肺癌と共通するメカニズムが提唱されている。しかしながら間質性肺炎に対する分子標的薬治療効果は十分と言えない。研究代表者の橋本は、線維化病変は肺構成細胞 - 間葉系細胞形質転換 (Lung Cells-Mesenchymal Transition; EMT)誘導刺激である TGFβ 活性化状態や遷延化低酸素 (persistent hypoxia)状態にあり、これらの刺激に対して本来負の制御を行う PTEN 活性が减弱していることを明らかにした。さらに、組織微小環境下の線維芽細胞における PTEN 活性減弱が線維化および腫瘍増殖を直接的に促進するという報告もなされた。我々は非リン酸化C末端含有PTEN(PTEN4A)発現誘導は、蛋白脱リン酸化活性によって TGFβ および遷延化低酸素誘導 EMT および異常細胞遊走を制御することを報告した。さらに、間質性肺炎の治療戦略を目的とした PTEN4A のヒトへの臨床応用を具現化するため PTEN4A 導入ヒトウイルスベクターを作成して外的導入 PTEN4A が TGFβ 誘導 EMT を抑制することを確認した。これらの知見は、組織微小環境下においても蛋白脱リン酸化活性を保つ PTEN4A を外的投与する治療戦略は組織微小環境の制御を介した新たな治療となりうると考えられた。そうした中、間葉系細胞が alternative splicing によって誘導される細胞外分泌 PTEN を介して周囲の細胞の活性化制御を行う可能性が報告された。

今回我々は、蛋白脱リン酸化活性を保つ PTEN4A と細胞外分泌 PTEN の長所を融合し

て、細胞外分泌 PTEN4A を新規開発することによって間質性肺炎と肺癌の治療戦略を構築することが可能になると考えるに至った。

2. 研究の目的

研究代表者の橋本が明らかにした肺構成細胞-間葉系細胞形質転換(EMT)由来線維芽細胞を制御することは線維化制御において重要な課題と考えた。組織微小環境化での EMT 制御を可能にする細胞外分泌 PTEN4A を製剤化することを目的とするとともに、細胞内輸送機能を有する細胞外分泌細胞内蛋白デリバリーシステム構築して、製剤化を目指すことを目的とした。

本研究では、

(1) 細胞外分泌 PTEN が有する細胞外分泌特異的部位(alternative N173)を含む薬剤誘導遺伝子発現システムの作成による蛍光標識物質(GFP)の細胞外分泌機能の検証とその効率化改善策の検証

(2) 細胞外分泌 PTEN4A の薬剤誘導遺伝子発現システムの作成

(3) 細胞外分泌 PTEN4A の細胞内導入効果の検証

(4) 細胞外分泌 PTEN が有する細胞外分泌および細胞内輸送機能特異的部位とマルチクローニングサイトを用いた細胞外分泌能を有する細胞内蛋白用発現ベクターの構築に対する評価を行ないその有効性の検証

これらにより細胞内輸送機能を有する細胞外分泌細胞内蛋白として産生できるシステム構築を行い、製剤化を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞外分泌 PTEN が有する細胞外分泌特異的部位(alternative N173)を含む遺伝子発現システムの作成による蛍光標識物質(GFP)の発現効率化改善策の検証

まず、機能的な細胞外分泌ドメインによる GFP 蛋白の細胞外分泌の現象を検証するために、ヒト上皮細胞から alternative N173(N173)をクローニングして、GFP 発現ベクターに in-frame に組み込んだ。これを肺癌細胞株 H1299 細胞に安定化遺伝子導入を行

なったが、発現効率が十分でなかった。そこで、細胞外 PTEN の発現効率を高めるため、alternative N173 の開始コドンに kozak シークエンスを加えた。それにより、細胞内 N173 の強発現が確認された(Figure1)。

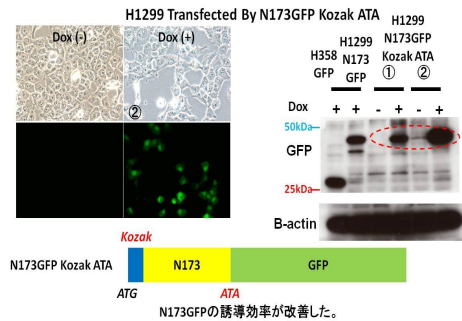


Figure1

(2) 細胞外分泌 PTEN が有する細胞外分泌特異的機能部位(alternative N151)を含む遺伝子発現システムの作成による蛍光標識物質(GFP)の発現効率化改善策の検証

細胞内移入する alternative PTEN (N151)を作成して細胞外投与機能的 PTEN の作成基盤を構築することを行なった。N151 の開始コドンに kozak シークエンスを加えることにより、肺癌細胞株 H1299 細胞に安定化遺伝子導入を行なった細胞内 N151 の強発現が確認された(Figure2)。

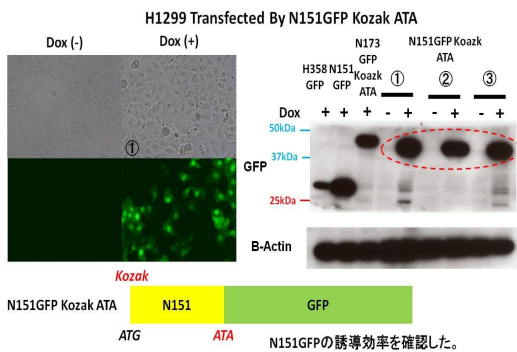


Figure2

(3) 細胞外分泌 PTEN が有する細胞外分泌特異的機能部位(alternative N173)を含む遺伝子発現システムの作成による蛍光標識物質(GFP)の細胞外分泌機能の検証

細胞内発現が確認された N173-GFP の細胞外分泌が効率的に行なわれるかどうかを検証した。全細胞の検体を用いた western blotting 法による検討では、N173 の強発現を確認できた。細胞外分泌された場合には切断されて

N151 の大きさに検出されるはずであるが、細胞上清中には N151 は検出できなかった。実験条件として beta-actin が細胞上清中には検出されなかったので、実験条件は適切と考えられた(Figure3)。

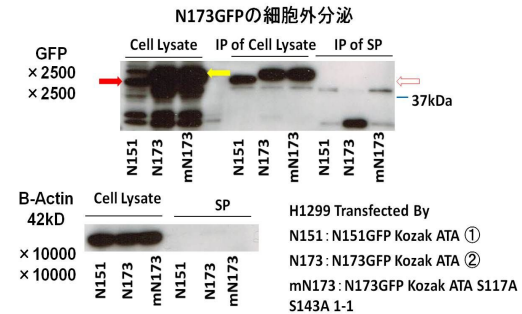


Figure3

(4) 細胞外分泌 PTEN が有する細胞外分泌特異的機能部位(alternative N151)を含む GFP 蛋白投与による細胞内移入の検証

細胞外分泌 PTEN(N151)が細胞外投与により細胞内移入できるかどうかを検証した。N151 安定発現した H1299 細胞から N151GFP を回収・分離して、肺上皮細胞株 H358 に投与した。N151GFP の回収によって GFP の発現維持は確認できた(Figure4)。しかしながら、N151-GFP の細胞外からの投与では GFP の蛍光は同定が明らかではなかった。これは投与蛋白の総量、検出時間などの調整が必要であると推察された。

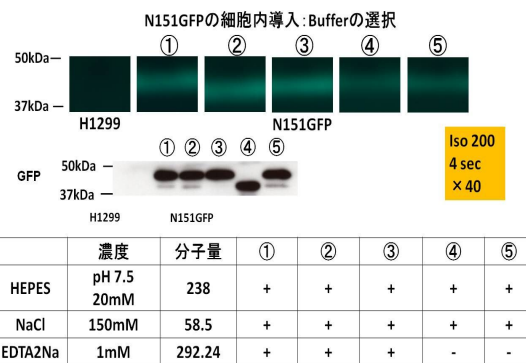


Figure4

4. 研究成果

細胞外分泌 PTEN のうち、細胞外分泌誘導ドメインの樹立は確認できた。今後誘導効率を挙げる遺伝子修飾と回収された細胞外分泌 PTEN の回収効率を挙げることを課題として新規治療作成に向けた実験を検証する。

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 7件)

Kimura M, Hashimoto N, Kusunose M, Aoyama D, Sakamoto K, Miyazaki S, Ando A, Omote N, Imaizumi K, Kawabe T, Hasegawa Y.

Exogenous induction of unphosphorylated PTEN reduces TGF β -induced extracellular matrix expressions in lung fibroblasts.

Wound Rep Reg. 25: 86-97. doi:

10.1111/wrr.12506. 2017. 査読有

Kohnoh T, Hashimoto N, Ando A, Sakamoto K, Miyazaki S, Aoyama D, Kusunose M, Kimura M, Omote N, Imaizumi K, Kawabe T, Hasegawa Y.

Hypoxia-induced modulation of PTEN activity and EMT phenotypes in lung cancers

Cancer Cell International 16:33-42. 2016.

査読有

Hashimoto N, Iwano S, Kawaguchi K, Fukui T, Fukumoto K, Nakamura S, Mori S, Sakamoto K, Wakai K, Yokoi K, Hasegawa Y.

Impact of thin-section computed tomography-determined combined pulmonary fibrosis and emphysema on outcomes among patients with resected lung cancer

Ann Thorac Surg 102 (2):440-447. 2016. 査読有

Matsuzaki A, Hashimoto N, Okachi S, Taniguchi T, Kawaguchi K, Fukui T, Wakai K, Yokoi K, Hasegawa Y.

Clinical impact of the lower limit of normal of FEV1/FVC on survival in lung cancer patients undergoing thoracic surgery

Respir Investig 54:184-192. 2016. 査読有

Kusunose M, Hashimoto N, Kimura M, Ogata R, Aoyama D, Sakamoto K, Miyazaki S, Ando A, Omote N, Imaizumi K, Kawabe T,

Hasegawa Y.

Direct regulation of TGF β -induced EMT by the protein phosphatase activity of unphosphorylated PTEN in lung cancer cells.

Cancer Science 106:1693-1704. 2015. 査読有

Wakayama H, Hashimoto N, Matsushita Y, Matsubara K, Yamamoto N, Hasegawa Y, Ueda M, Yamamoto A.

Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating acute respiratory distress syndrome in mice.

Cytotherapy 17(8):1119-29. 2015. 査読有

Osuka S, Hashimoto N, Sakamoto K, Wakai K, Yokoi K, Hasegawa Y.

Risk stratification by the lower limit of normal of FEV1/FVC for postoperative outcomes in patients with COPD undergoing thoracic surgery.

Respir Investig 53(3):117-23 2015. 査読有

[学会発表](計 2件)

1. Hashimoto N, Aoyama D, Hasegawa Y:

The PTEN protein, not lipid, phosphatase activity negatively regulate TGF β -induced EMT in lung alveolar cells.

The 2015 American Thoracic Society (ATS) International Conference, Denver, USA, 2015. 2015年5月17日.

2. Hashimoto N, Hasegawa Y:

The C2 domain of PTEN might be essential for the protein phosphatase activity of PTEN in lung cancer cells.

第74回日本癌学会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2015. 2015年10月9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・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・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20270986

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
宮崎 晋一 (Shinichi Miyazaki)
名古屋大学・大学院医学系研究科 大学院博士課程