

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23659431

研究課題名（和文） 慢性閉塞性肺疾患に対する肺再生治療の基盤構築

研究課題名（英文） Molecular Target of Regenerative Pulmonary Medicine for Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

研究代表者

長谷川 好規 (HASEGAWA YOSHINORI)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20270986

研究成果の概要（和文）：我々は肺構成細胞の再生治療における基盤的知識を構築するために、上皮間葉系移行(EMT)誘導、その復元メカニズムの機序を解明した。1つは、EMT誘導分子とされる Twist について、2つは、肺傷害において組織障害部位に遷延化低酸素状態について明らかにした。その結果、肺上皮細胞機能のひとつとされるサーファクタント D 蛋白は急性低酸素において産生亢進し、遷延化低酸素では EMT に合致する抑制を示した。3つは、慢性難治性呼吸器疾患における PTEN の機能に着目した。その結果、低酸素刺激が PTEN の発現抑制と p-PTEN/PTEN 比率上昇を介して PTEN 活性減弱を誘導することを示した。本研究から、肺再生における遷延化低酸素状態の影響、EMT 制御分子としての PTEN の可能性について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To accumulate the basic research findings for pulmonary tissue regeneration, we focused on the molecular analysis of the Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and its reverse phenomenon (MET). One is Twist, and the other is the effects of prolonged tissue hypoxia on EMT. We found that persistent hypoxia induced de novo twist expression, causing repression of SP-D and acquisition of an EMT phenotype. Third is tissue microenvironment (TM). In TM, many kinds of signaling pathway, which PTEN negatively regulates, are activated. Nevertheless, whether or not persistent hypoxia could affect the PTEN activity remains elusive. In this study, persistent hypoxia caused a decrease in PTEN expression and an increase in p-PTEN/PTEN ration in alveolar cells in vitro and in vivo. These findings suggest that regulation of prolonged tissue hypoxia and EMT might be important for tissue regeneration of the lung.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺の再生、低酸素、PTEN、組織微小環境、上皮間葉系移行

## 1. 研究開始当初の背景

肺構成細胞の再生治療は、COPDをはじめとする『既存の肺構造の破壊』を示す難治性呼吸器疾患に対する治療ストラテジーの重要

な課題である。我々と共同研究者がこれまでに報告してきた、骨髄由来線維芽細胞の存在 (*J Clin Invest* 2004) や、血管内皮由来肺線維

芽細胞の存在(*Am J Respir Cell Mol Biol* 2010)を示した研究データは骨髄由来細胞をはじめ、肺の微小環境下において肺構成細胞である微小血管内皮細胞や気道・肺胞上皮細胞が線維芽細胞に分化・形質転換する可能性を示し、さまざまな細胞期限の線維芽細胞が存在することを示唆している。このような研究背景の下に、肺構成細胞の再生に向けた基盤的知識の集積が必要であると想起した。特に、上皮間葉系移行 (EMT) 誘導およびその復元メカニズムの機序を解明することを計画し、さらにその展開として、線維芽細胞株を用いた幹細胞誘導遺伝子導入 iPS 細胞を樹立して、肺構成細胞への分化誘導機序を解明することを着想した。

## 2. 研究の目的

肺構成細胞の再生治療における基盤的知識を構築するために、上皮間葉系移行 (EMT) 誘導およびその復元メカニズムの機序を解明する。その展開として、線維芽細胞株を用いた幹細胞誘導遺伝子導入 iPS 細胞を樹立して、肺構成細胞への分化誘導機序を解明する。

## 3. 研究の方法

- (1) EMT 誘導因子である Twist の肺細胞における機能を検証する。
- (2) 肺傷害における遷延化低酸素状態の上皮細胞の機能変化について EMT を軸に評価する。
- (3) 低酸素刺激により組織微小環境で活性化されるシグナル経路を制御する PTEN, ならびに、PTEN-C 末端リン酸化のアミノ酸置換の役割について検討する。
- (4) 薬剤誘導遺伝子発現ベクターを用いた幹細胞誘導遺伝子導入安定化細胞株の樹立と、幹細胞誘導遺伝子発現による iPS 細胞の誘導・樹立と維持を行う。
- (5) 薬物調節による幹細胞誘導遺伝子発現抑制と肺構成細胞への誘導条件調節による肺構成細胞への分化細胞の樹立を試みる。

## 4. 研究成果

### (1) 低酸素刺激における肺構成細胞の EMT 関連遺伝子に関する検討

低酸素刺激が EMT を誘導することが報告されているが、肺上皮細胞の EMT 誘導転写因

子発現の影響は十分評価されていないことから、Twist と代表的 EMT 誘導転写因子である Snail について検討した。

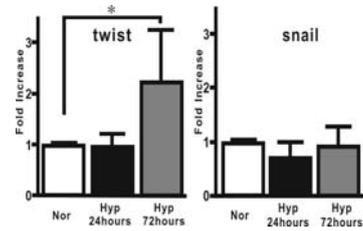


Figure 1

その結果、低酸素刺激は肺上皮細胞の Twist 発現を誘導するが、Snail は誘導しないことを明らかにした。(Figure 1)

さらに、遷延化低酸素暴露下で肺上皮細胞株を培養して、細胞遊走能を評価した。肺上皮細胞は遷延化低酸素刺激により定常酸素状態と比較して有意な細胞遊走亢進を認めた。また、低酸素状態で誘導される EMT 関連遺伝子である Twist の安定発現細胞株ではコントロール株と比較して有意な細胞遊走能の亢進を認めた (Figure 2)。

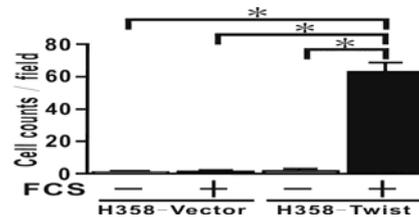


Figure 2

### (2) 遷延化低酸素状態の上皮細胞の機能変化

低酸素刺激による上皮細胞への表現型を検討した。急性低酸素刺激は SP-D を誘導するが、遷延化低酸素刺激は SP-D 発現を抑制することを確認した。遷延化低酸素刺激は E-cadherin, Vimentin 発現によって表現される EMT の誘導を認めた。(Figure 3)

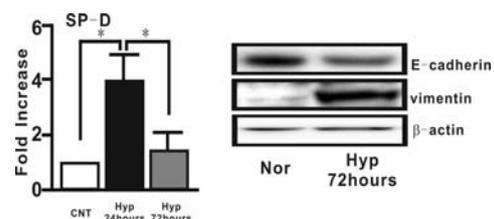


Figure 3

このように、遷延化低酸素刺激は組織微小環境として上皮細胞において EMT 誘導を起こすことを明らかにした。

### (3) 低酸素を示す腫瘍組織の PTEN 発現の検討

研究分担者の橋本は、ブレオマイシン (BLM) 誘導肺線維症モデルを作成して、肺線維症病変が低酸素状態に陥っていることを低酸素反応物質である pimonidazole (PM) に対する免疫染色と低酸素状態で安定発現する hypoxia-inducible factor 1 (HIF1 $\alpha$ ) に対する免疫染色により評価した。その結果、線維化病変に遷延化低酸素状態にあることを確認した (課題番号: 21590987)。

肺構成細胞の再生は組織傷害の結果として形成される組織微小環境下の影響を強く受ける。PTEN は微小環境でもたらされるさまざまな EMT 誘導因子で活性化されるシグナル経路を制御することが知られているが、低酸素刺激が PTEN の活性化に与える影響は十分に解明されていなかった。そこで、まずマウス肺癌モデルにおいて腫瘍病変内の微小環境としての低酸素状態にある腫瘍組織の PTEN の発現を評価した。(Figure 4)

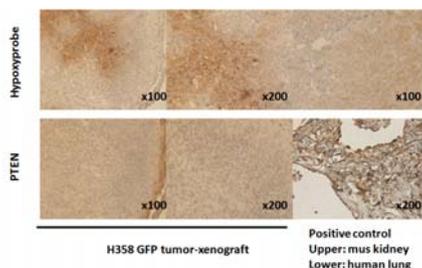


Figure 4

その結果、腫瘍内で発現を認める PM 強発現領域では、PTEN の発現はほとんど認めなかった。投与前の H358 細胞株が PTEN の安定発現を示していたことから、腫瘍組織内では低酸素状態にある領域での PTEN 発現に抑制が起こっている可能性が示唆された。

### (4) 肺上皮細胞の PTEN 発現に対する低酸素状態がもたらす影響の検討

低酸素刺激が PTEN の発現と PTEN-C 末端リン酸化部位リン酸化に与える影響を検討するために肺上皮細胞 H358 細胞株を低酸素刺

激で培養して、PTEN の活性化をウエスタンブロッティング法にて評価した。(Figure 5)

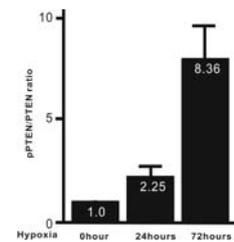


Figure 5

その結果、低酸素刺激によって p-PTEN/PTEN 比率は増加することが確認された。

### (5) 肺上皮細胞の Akt シグナル経路に対する低酸素状態がもたらす影響の検討

低酸素刺激が Akt シグナル経路に与える影響を検討するために肺上皮細胞 H358 細胞株を低酸素刺激で培養して、Akt の活性化をウエスタンブロッティング法にて評価した。(Figure 6)

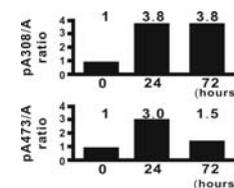


Figure 6

その結果、低酸素刺激が PTEN のリン酸化比率を増加させる一方、PTEN により制御されているシグナル経路の活性化を誘導していることが明らかになった。

### (6) PTEN 活性化における PTEN-C 末端リン酸化の影響に関する検討

近年、PTEN-C 末端リン酸化部位のリン酸化によって構造変化を介して PTEN 活性化の減弱に至ることが報告された。そこで、PTEN-C 末端リン酸化部位の遺伝子置換した発現細胞株を作成して低酸素刺激に対する PTEN-C 末端遺伝子置換を介したシグナル経路を評価した。(Figure 7)

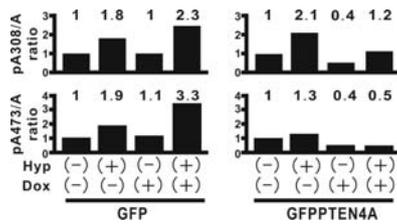


Figure 7

その結果、PTEN-C 末端リン酸化部位の遺伝子置換は低酸素刺激によって誘導される Akt の活性化を抑制することが示された。

今回の我々の研究から、以下の内容が考察としてあげられる。

我々が考えた肺構成細胞の再生治療のストラテジーの一つは、COPD をはじめとする難治性呼吸器疾患がもたらす『既存の肺構造の破壊』により形成される組織微小環境という視点に立脚し、その環境で重要な役割を果たす分子の機能解析を目的とした。特に、上皮間葉系移行 (EMT) 誘導およびその復元メカニズム、低酸素を key word に肺構成細胞に影響を与える分子について研究を実施した。その結果、EMT 誘導分子とされる Twist について、肺由来細胞において EMT 誘導分子として機能すること、さらに遷延低酸素刺激は EMT 誘導転写因子の中で、Twist の発現誘導を示す一方、EMT 誘導分子として知られている Snail 発現誘導は示さなかった。この知見はさまざまな組織微小環境が複雑に EMT 誘導転写因子を制御していることを示唆するものである。

次に、低酸素状態での肺上皮細胞の機能変化を知ることは、肺再生治療の戦略を達成させるために極めて重要な情報をもたらす。本研究では、遷延化低酸素状態が上皮細胞の機能変化 (EMT) をもたらし、肺上皮細胞機能のひとつとされるサーファクタント D 蛋白 (SP-D) は、遷延化低酸素で EMT に合致する抑制を示した。このように、肺上皮再生機序において遷延化低酸素刺激が重要な因子になることが示唆される。今後、低酸素状態で安定化発現する HIF1 $\alpha$  および HIF2 $\alpha$  の薬剤調節型遺伝子発現安定肺上皮細胞を樹立してその影響を詳細に検討してゆきたいと考えている。

PTEN は組織微小環境で活性化されるさまざまなシグナル経路に対して負の制御をもたらす転写因子として知られているが、その

活性化のメカニズムは明らかにされていなかった。近年、PTEN-C 末端リン酸化部位のリン酸化により構造変化がもたらされ、PTEN のフォスファターゼ活性が低下することが報告された。しかしながら、組織微小環境の因子である低酸素刺激は、PTEN-C 末端リン酸化を調整するかどうかは明らかではなかった。今回の我々の解析から、肺上皮細胞 H358 細胞は内在性 PTEN の恒常的発現はあるが、ヌードマウスへの接種により形成された腫瘍において低酸素状態が示された部分には PTEN の発現が減弱していることを明らかにした。低酸素刺激による PTEN 活性化に与える影響を評価したところ、低酸素刺激は時間依存的に p-PTEN/PTEN ratio 増加で表現される PTEN 全体に占める PTEN-C 末端リン酸化の増加を示して PTEN 活性化の低下が推察された。低酸素の時間依存的な Akt の活性化亢進は PTEN が Akt の直接の調節因子であることから矛盾しない結果であった。さらに PTEN 活性化の調節部位は PTEN-C 末端リン酸化部位であることを明らかにするために作成した PTEN-C 末端リン酸化部位のアミノ酸置換を強制発現した細胞株は、持続的低酸素下刺激においても Akt の活性化抑制を受けたままであった。このことは、低酸素刺激で解析した組織微小環境による組織傷害指向性刺激の経路を制御するために、PTEN-C 末端リン酸化部位が有望な治療標的になることを示唆している。組織微小環境は低酸素刺激だけではなく、TGF $\beta$  などの EMT 誘導因子や受容体リン酸化経路など複合的な刺激をもたらす。包括的なシグナル制御を達成する治療戦略として、PTEN-C 末端リン酸化部位は有力な治療標的であると考えている。これらの知見は、肺再生において肺構成細胞の適切な分化誘導に関する重要な情報基盤を示すものであると考える。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Nakashima H, Hashimoto N, Aoyama D, Kohnoh T, Sakamoto K, Kusunose M, Imaizumi K, Takeyama Y, Sato M, Kawabe T, Hasegawa Y. Involvement of the transcription factor twist in phenotype alteration through

epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Mol Carcinog.* 51:400-10, 2012  
査読有り

2. Sakamoto K, Hashimoto N, Kondoh Y, Imaizumi K, Aoyama D, Kohnoh T, Kusunose M, Kimura M, Kawabe T, Taniguchi H, Hasegawa Y. Differential modulation of surfactant protein D under acute and persistent hypoxia in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 303: L43-L53. 2012.  
査読有り
3. Sato M, Shames DS, Hasegawa Y. Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in lung carcinogenesis. *Respirology.* 17:1048-59, 2012. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

1. Kusunose M, Hashimoto N, Kimura M, Hasegawa Y. Various effect of compensatory induction of PTEN wild against TGF $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in epithelial cells. *The FASEB Summer Research Conference*, Saxtons River, USA, 2012, July 22-27
2. Kimura M, Hashimoto N, Kusunose M, Hasegawa Y. Compensatory induction of mutation of phosphorylation sites in PTEN inhibits hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in epithelial cells. *The FASEB Summer Research Conference*, Saxtons River, USA, 2012, July 22-27
3. Hashimoto N, Sakamoto K, Hasegawa Y. Acute and persistent hypoxia differentially induces surfactant protein D modulation and epithelial-mesenchymal transition via

hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and twist stimulation in acute lung injury/fibrosis. *The 2012 American Thoracic Society (ATS) International Conference*, San Francisco, USA, 2012, May 18-23.

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, May 18-23.
5. Hashimoto N, Kusunose M, Kimura M, Hasegawa Y. Inhibition of TGF $\beta$ -induced phenotype alterations through epithelial-mesenchymal transition (EMT) in epithelial cells by gene mutation of phosphorylation sites in PTEN. *The FASEB Summer Research Conference*, Saxtons River, USA, 2012, July 22-27

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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

##### (2) 研究分担者

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

##### (3) 連携研究者 なし