

主論文の要旨

**Involvement of TGF β -Induced Phosphorylation of the
PTEN C-Terminus on TGF β -Induced Acquisition of
Malignant Phenotypes in Lung Cancer Cells**

〔 TGF β 誘導による肺癌細胞の悪性表現型獲得における
PTEN-C 末端リン酸化の関与 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：長谷川 好規 教授)

青山 大輔

1. 緒言

近年、肺癌細胞の上皮間葉系移行(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)や細胞遊走能亢進で示唆される悪性表現型獲得における腫瘍微小環境の重要性への認識の高まりがある。腫瘍微小環境由来TGFβは肺癌悪性表現型獲得の重要な因子であることが知られている。PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10) はそのフォスファターゼ活性によりTGFβ刺激で活性化されるAkt・FAK経路に対して負の制御をもたらす。しかし、肺癌ではPTENの遺伝子変異はほとんど見られないにも関わらずTGFβシグナルの活性化がしばしば観察される。こうした中、PTEN C末端のリン酸化によってPTENの立体構造変化が誘導され、PTENのフォスファターゼ活性が減弱することが報告された。腫瘍微小環境由来TGFβ刺激がPTEN C末端のリン酸化を介してPTEN活性減弱や肺癌悪性表現型獲得をもたらすかどうかは明らかではなかった。今回我々はPTEN C末端リン酸化部位修飾 (PTEN4A) 遺伝子導入肺癌細胞株を作成して腫瘍微小環境由来TGFβ刺激のPTENC末端リン酸化および肺癌悪性表現型獲得に対する影響を検討した。

2. 方法

腫瘍微小環境因子である TGFβ 刺激による PTEN C 末端リン酸化修飾への影響を評価した。ドキシサイクリン(Dox)調節型遺伝子発現システムを導入した肺癌細胞株 H358 細胞(H358ON)に対して、Dox 依存性 GFP、GFP-PTENWild (GFPPTENWt)、PTENC 末端 4 リン酸化部位アラニン(Ala)置換(GFPPTEN4A)遺伝子導入を行った。また、肺癌細胞株 H1299 細胞に恒常的発現性 PTENWt、PTEN4A 遺伝子導入を行った。悪性表現型獲得として EMT 表現型をウエスタンブロット法にて評価を行い、細胞遊走能亢進をケモアトラクトチャンバー アッセイで評価を行った。さらに β-catenin に対する免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて β-catenin の細胞内局在を評価した。

3. 結果

3-1. TGFβ 刺激は肺癌細胞における PTEN C 末端リン酸化レベル修飾と PTEN 活性減弱を伴い EMT や細胞遊走能亢進で示唆される悪性表現型獲得をもたらす。

TGFβ 刺激は肺癌細胞株 H358 細胞において smad の活性化だけでなく Akt および FAK の smad 非依存経路の活性化を誘導して(Fig.1E, F, G)、Fibronectin/E-cadherin 比の増加で示唆される EMT 表現型獲得と細胞遊走能亢進をもたらした(Fig.1A, B, C, D)。また、TGFβ 刺激は PTEN C 末端のリン酸化(p-PTEN)の亢進と総 PTEN レベルの低下をもたらし、p-PTEN/PTEN 比の有意な増加を誘導した(Fig.1H, I)。

3-2. PTEN C 末端リン酸化部位修飾は TGFβ 誘導肺癌悪性表現型獲得を抑制する。

Dox 依存性 GFP、GFPPTENWt、GFPPTEN4A 遺伝子導入肺癌細胞株 H358ON 細胞を用いて、TGFβ 誘導悪性表現型獲得に対する PTEN C 末端リン酸化修飾の効果を評価した。Dox 依存性 GFP、GFPPTENWt 発現は TGFβ 誘導細胞遊走能亢進を抑制しなかつ

たが、GFPPTEN4A 発現は有意に TGF β 誘導細胞遊走能亢進を抑制した (Fig.2E)。また、GFPPTEN4A 発現は有意に TGF β 誘導 EMT を抑制したが、GFPPTENWt 発現による効果は限定的であり有意な抑制を示さなかった (Fig.2D)。

3-3 PTEN C 末端リン酸化部位修飾は TGF β 誘導 smad 非依存性経路の活性化を制御する。

PTEN C 末端リン酸化部位修飾は、TGF β 誘導 smad 依存経路の活性化を抑制しなかった(Fig.3A)。一方、GFPPTEN4A 発現は TGF β 誘導 smad 非依存性経路である Akt および FAK の活性化を TGF β 非刺激時レベルまで抑制した(Fig.3B, C)。

3-4 TGF β 誘導 smad 非依存性経路である FAK に対する inhibitor は TGF β 誘導細胞遊走能亢進を制御するが、TGF β 誘導 EMT を抑制しない。

リン酸化 FAK に対する inhibitor を用いて、PTEN C 末端リン酸化部位修飾がもたらす TGF β 誘導肺癌悪性表現型獲得抑制が FAK のリン酸化制御によるものであるかを評価した。FAK inhibitor は TGF β 誘導細胞遊走能亢進を抑制したが、TGF β 誘導 EMT を抑制しなかった (Fig. 4B, C, D, E, F, G)。

3-5 PTEN C 末端リン酸化部位修飾は β -catenin の細胞膜から細胞内への局在移行を制御することにより TGF β 誘導 EMT を制御する。

PTEN C 末端リン酸化部位修飾は TGF β 刺激による EMT 関連遺伝子の発現増加を抑制しなかった (Fig.5C)。さらに、 β -catenin に対する免疫蛍光染色を行った。TGF β 非刺激の H358 細胞では β -catenin 発現は細胞膜上に限局していたが、TGF β 刺激によりその局在が細胞膜から細胞内および核内へ移行することが確認されて β -catenin のシグナル伝達活性化が確認された。Dox 依存性 GFP、GFPPTENWt 発現は TGF β 誘導 β -catenin 局在移行を制御できなかったが、GFPPTEN4A 発現は TGF β 刺激による β -catenin の細胞質内移行を阻止した(Fig.5D, E, F, G, H, I)。これらの結果は肺癌細胞株 H1299 細胞でも確認できた (Fig. 6)。

3-6 PTEN C 末端リン酸化部位修飾は in vivo 腫瘍生着モデルにおいても有意な腫瘍増殖抑制を示す。

In vivo 腫瘍生着モデルを用いて、PTEN C 末端リン酸化部位修飾の腫瘍増大に対する抑制効果を検討した。GFPPTEN4A 発現腫瘍細胞は、GFP あるいは GFPPTENWt 発現腫瘍細胞と比較して腫瘍増大に対する有意な抑制効果を示した (Fig. 7A, B)。

4. 考察

本研究では、肺癌細胞において腫瘍微小環境因子である TGF β が PTEN C 末端リン酸化修飾を介して PTEN 活性減弱をもたらす可能性を明らかにした。さらに、我々は Dox 調節型遺伝子発現システムと PTENC 末端 4 リン酸化部位アラニン(Ala)置換

(GFPPTEN4A)遺伝子を導入した肺癌細胞株 H358 細胞を用いて、PTEN C 末端リン酸化修飾が TGF β 誘導肺癌悪性表現型獲得を制御できる可能性を明らかにした。また、PTEN C 末端リン酸化修飾が TGF β 刺激による β -catenin 発現の細胞膜から細胞質内への移行を制御することを介して TGF β 誘導 EMT 表現型獲得を抑制することを明らかにした。一方、TGF β 誘導 EMT 表現型獲得が Akt や FAK の活性化を直接介さないことも明らかにした。これらの知見から PTEN C 末端リン酸化部位が肺癌の新たな治療標的になり得ることを明らかにした。さらに、腫瘍微小環境による影響を肺癌遺伝子異常による影響と合わせて検討することがより有効な治療戦略を構築する際に重要であると考えられた。

5. 結語

PTEN C 末端リン酸化部位が、腫瘍微小環境由来 TGF β 刺激による上皮間葉系移行 (EMT) および細胞遊走能亢進で示される肺癌悪性表現型獲得を制御する上で重要な治療標的になる可能性を示した。