

主論文の要旨

**Direct regulation of transforming growth factor β -induced
epithelial–mesenchymal transition by the protein phosphatase
activity of unphosphorylated PTEN in lung cancer cells**

〔肺癌細胞における非リン酸化PTENの蛋白脱リン酸化酵素活性による
TGF β 誘導上皮間葉系移行への直接的制御〕

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)

楠瀬 公章

【緒言】

肺癌細胞の上皮間葉系移行(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)における腫瘍微小環境の重要性が増している。腫瘍微小環境由来 Transforming growth factor β (TGF β) は肺癌悪性表現型獲得の重要な因子である。こうした中、PTEN(phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10)の C 末端の非リン酸化修飾が TGF β 刺激による β -catenin の細胞膜から細胞質・核内移行を制御して TGF β 誘導 EMT を抑制することが示された。しかし、この非リン酸化 C 末端が EMT 制御を直接もたらすかどうかは明らかでなかった。また、PTEN はその脂質脱リン酸化酵素活性の機能についてはよく知られているが、蛋白脱リン酸化酵素活性の機能については十分に解明されていなかった。今回、肺癌細胞における C 末端非リン酸化 PTEN の TGF β 誘導 EMT 制御機序をその蛋白脱リン酸化酵素活性の観点から検討した。

【方法】

C 末端非リン酸化 PTEN (G4A)に遺伝子改変を加えて、C 末端部位のみを残した G4A tail only、C 末端部位のみを除いた G4A Δ tail、Phosphatase ドメインを除いた G4A Δ Phosphatase、C2 domain を除いた G4A Δ C2、C2 ドメインのみの G4A C2 only を作成した。また、G4A の Phosphatase ドメインの脱リン酸化酵素活性修飾を誘導する G4A C124S、G4A Y138C、G4A G129E を作成した。ドキシサイクリン(Dox)調節型遺伝子発現システムを有する肺癌細胞株 H358 細胞に遺伝子導入した。ウエスタンブロッティング法によってファイブロネクチン(F)と E-カドヘリン(E)の発現を評価した。TGF β 誘導 EMT 表現型として F/E 比を算出した。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。

【結果】

1. 肺癌細胞における非リン酸化 PTEN C 末端と TGF β 誘導 EMT

G4A tail only 発現は F/E 比増加を抑制せず (Fig.1j)、 β -catenin の細胞質・核内移行も抑制しなかった(Fig.1o. p)。一方で G4A Δ tail 発現は TGF β 誘導 EMT を抑制して(Fig.1i)、TGF β 誘導 β -catenin 細胞質・核内移行も抑制した(Fig.1m. n)。

2. TGF β 誘導 EMT 制御における PTEN Phosphatase ドメインと C2 ドメインの役割

G4A Δ Phosphatase 発現は F/E 比増加を抑制せず(Fig.3a)、 β -catenin の細胞質・核内移行も抑制しなかった(Fig.3d. e)。G4A Δ C2 発現は TGF β 誘導 EMT を抑制せず(Fig.3b)、 β -catenin の細胞質・核内移行も抑制しなかった(Fig.3f. g)。G4A C2 only 発現は TGF β 誘導 EMT を抑制せず(Fig.3c)、 β -catenin の細胞質・核内移行を抑制しなかった(Fig.3h. i)。

3. TGF β 誘導 EMT 制御における C 末端非リン酸化 PTEN の蛋白脱リン酸化酵素活性の役割

脂質脱リン酸化酵素活性と蛋白脱リン酸化酵素活性をともに示さない G4A C124S

発現は、F/E 比増加を抑制せず(Fig.5a)、 β -catenin の細胞質・核内移行も抑制しなかった(Fig.5d, e)。脂質脱リン酸化酵素活性を有して、蛋白脱リン酸化酵素活性を示さない G4A Y138C 発現においても F/E 比増加を抑制せず(Fig.5c)、 β -catenin の細胞質・核内移行も抑制しなかった(Fig.5h, i)。一方、脂質脱リン酸化酵素活性を示さず、蛋白脱リン酸化酵素活性を有する G4A G129E 発現は、F/E 比増加を抑制して(Fig.5b)、 β -catenin の細胞質・核内移行を抑制した(Fig.5f, g)。

4. C 末端非リン酸化 PTEN の蛋白脱リン酸化酵素活性における PTEN Phosphatase ドメインと C2 ドメインの役割

G4A G129E から C2 domain を除いた G4A G129E Δ C2 を作成して H358 細胞に遺伝子導入した。G4A G129E Δ C2 発現は TGF β 誘導 FAK リン酸化を抑制しなかった(Fig.6c)。さらに、G4A G129E Δ C2 は F/E 比増加を抑制せず(Fig.6d)、 β -catenin の細胞質・核内移行も抑制しなかった(Fig.6e, f)。次に、C2 ドメインのみを有する G4A C2 only を遺伝子導入した Adenovirus(Adeno G4A C2 only)を作成して、これを Dox 投与下の G4A G129E Δ C2 導入 H358 細胞に感染させて(Fig.6h)、TGF β 誘導 EMT に対する抑制効果を評価した。共発現により TGF β 誘導 FAK リン酸化は抑制された(Fig.6i)。また、共発現により F/E 比増加は抑制されて(Fig.6j)、 β -catenin の細胞質・核内移行も抑制された(Fig.6k, l)。

【考察】

肺癌細胞における TGF β 誘導 EMT 表現型獲得機序の一つとして PTEN 活性化減弱が挙げられる。PTEN 活性化減弱は癌微小環境由来因子による PTEN 発現減弱だけでなく、PTEN C 末端リン酸化によってもたらされることが示唆されている。C 末端非リン酸化 PTEN 発現は TGF β 誘導 β -catenin 細胞内移行を抑制して EMT 表現型獲得を制御したが、C 末端部位が直接的に EMT を制御するかどうかは明らかではなかった。本研究によって、PTEN C 末端は TGF β 誘導 EMT を直接的に制御せず、PTEN C 末端がリン酸化修飾を受けないことによって PTEN 脱リン酸化活性が保持されて TGF β 誘導 EMT 制御をもたらすことを明らかにした。PTEN Phosphatase ドメインは脱リン酸化酵素活性に重要なドメインであるが、C2 ドメインの役割は明らかでなかった。本研究によって、C 末端非リン酸化 PTEN の脱リン酸化酵素活性の保持と TGF β 誘導 EMT の抑制には Phosphatase ドメインと C2 ドメインの両ドメインが必要であることを明らかにした。C 末端非リン酸化 PTEN の脂質脱リン酸化酵素活性は広く知られているが、その蛋白脱リン酸化酵素活性の生物学的意義は明らかにされていなかった。本研究によって、C 末端非リン酸化 PTEN による TGF β 誘導 EMT 制御は、脂質脱リン酸化酵素活性ではなく、蛋白脱リン酸化酵素活性によってもたらされることを明らかにした。さらに、本研究によって、C 末端非リン酸化 PTEN が蛋白脱リン酸化酵素活性を介して TGF β 誘導 EMT を抑制するには、Phosphatase ドメインと C2 ドメインの両ドメインが必要であることを示した。

【結語】

C末端非リン酸化 PTEN が保持する蛋白脱リン酸化酵素活性は TGF β 誘導 EMT を伴う腫瘍微小環境の新たな治療標的になることが示唆された。