

主論文の要旨

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

〔 肺癌において低酸素により誘導される
PTEN 活性と EMT 表現型の調節 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 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)

高納 崇

【緒言】

近年、肺癌細胞において種々のシグナル伝達系の活性化を含む腫瘍微小環境が、上皮間葉系移行(Epithelial-Mesenchymal Transition:EMT)による悪性表現系獲得に影響を与えると考えられている。また、持続的な組織低酸素刺激が、EMT 表現型の獲得に寄与することで腫瘍の進展や組織線維化を促進していることが示唆されている。癌抑制遺伝子 phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome10 (PTEN) は、そのホスファターゼ活性により種々のシグナル伝達系を負に制御し、PTEN の欠失が腫瘍の進展を促進することが知られている。近年の研究で PTEN のホスファターゼ活性が、PTEN C 末端側のリン酸化により減弱すると報告された。しかし、持続的な低酸素が PTEN のホスファターゼ活性に与える影響については未だ示されておらず、また、低酸素により誘導される EMT が、脱リン酸化 PTEN により負に制御されているかどうかは不明である。本研究では、PTEN C 末端側リン酸化部位修飾遺伝子(PTEN4A)導入肺癌細胞株を作成し、腫瘍微小環境における持続的な組織低酸素が PTEN C 末端側リン酸化活性に与える影響、および脱リン酸化 PTEN が低酸素誘導 EMT を阻害できるかについて検討した。

【方法】

持続的な低酸素刺激による肺癌細胞株 H358 への影響と PTEN C 末端リン酸化修飾への影響、および PTEN4A による EMT 表現系獲得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-PTEN Wild(GFP-WildPTEN)、PTEN C 末端 4 リン酸化部位アラニン(Ala)置換遺伝子(GFP-PTEN4A)導入を行った。EMT 表現型をウエスタンブロッティング法にて評価を行った。 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。

【結果】

1. 持続的な低酸素が肺癌細胞の PTEN 総発現量および PTEN C 末端側のリン酸化に与える影響

肺癌細胞における PTEN 発現と p-PTEN/PTEN 比を調べたところ、EMT 表現型を持つ H1299 は、H441 や H358 と比較して PTEN 発現が低く、p-PTEN/PTEN 比が約 3 倍高かった(Fig.1A,1B,1C)。PTEN の免疫蛍光染色でも同様の結果であった(Fig.1D,1E)。持続的な低酸素における PTEN 発現の変化を調べるため、ドキシサイクリン処理したヌードマウスの皮下で発育した GFP 発現 H358ON 細胞(Fig.1F)について、低酸素プローブのピモニダゾールを用いた免疫染色を行い組織低酸素を確認(Fig.1G)後、PTEN の免疫染色により低酸素である腫瘍組織では PTEN 発現がなく(Fig.1H,1I)、低酸素ではない皮下組織において発現が見られることを確認した(Fig.1H,1I)。

2. 持続的低酸素が PTEN 発現と EMT 表現型に与える影響

H358 細胞を低酸素下で培養し PTEN 発現量を調べたところ、総 PTEN 発現量は時間依存性に減少するが、p-PTEN 発現量は変化がなかった。そして低酸素下 72 時間後には、p-PTEN/PTEN 比はほぼ 8 倍に増大した(Fig.2A,2B)。また、低酸素における EMT 表現型獲得について、Fibronectin/E-cadherin 比の増加を指標に評価を行ったところ、時間とともに EMT 表現型の誘導が確認された(Fig.2C,2D)。次に、上皮細胞における間葉系遺伝子の発現は β -catenin が細胞膜への局在を失い細胞質、核内へ移行することにより誘導されることが示唆されており、低酸素により β -catenin が局在を失うかについて検討した。その結果、E-cadherin と β -catenin は通常酸素下では共に細胞膜に局在しており(Fig.2E,2F)、低酸素により細胞質および核内へ移行することにより、その局在を失うことが示された(Fig.2E,2F)。

3. 低酸素誘導 EMT への脱リン酸化 PTEN の影響

Dox 依存性遺伝子発現システムを導入した H358 細胞を用いて、PTEN C 末端側のリン酸化が低酸素誘導 EMT に与える影響について検討を行った(Fig.3A)。GFP を発現させた H358 では Fibronectin/E-cadherin 比はほぼ変化がなかったが、GFP-PTEN4A を発現させた場合は著しい減少が見られた(Fig.3B,3C)。GFP-wild PTEN を発現させた場合は僅かな抑制であり、低酸素誘導による Fibronectin の明らかな抑制効果は見られなかった(Fig.3B,3C)。

4. 低酸素による HIF-1 α の安定化、 β -catenin 局在の変化、及び twist 発現に対する脱リン酸化 PTEN の影響

PTEN4A が HIF-1 α 、twist といった分子に与える影響について検討した。GFP, GFP-WildPTEN, GFP-PTEN4A それぞれをドキシサイクリンにより発現させたが、いずれも低酸素による HIF-1 α の発現抑制は見られなかった(Fig.4A)。また、低酸素による EMT 関連遺伝子である twist 発現への影響を検討したところ、Dox 誘導 GFP-Wild PTEN および GFP-PTEN4A により twist 発現増加が抑制された(Fig.4B)。さらに、Dox 誘導 PTEN4A が、低酸素下の肺癌細胞における β -catenin の細胞内移行に与える影響を検討した。正常酸素下では、GFP, GFP-WildPTEN, GFP-PTEN4A のいずれも β -catenin の局在に変化はなかった(Fig.4C-4H)が、低酸素下において GFP, GFP-WildPTEN 導入で観察される β -catenin の細胞内・核内移行(Fig.4C-4F)が、GFP-PTEN4A により阻止された(Fig.4G,4H)。

【考察】

PTEN 変異や機能不全は癌の進行期においてよく見られるが、様々な癌種において治療抵抗性の一因となっている。また、これまでの報告では、p-PTEN/PTEN 比の増大による PTEN ホスファターゼ活性の欠失も、多くの癌種での悪性表現型獲得に重要であるとされる。本研究では、肺癌細胞において腫瘍微小環境因子としての持続的組

組織低酸素が、PTEN 発現低下と 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、GFP-PTEN4A 導入は HIF-1 α の安定化抑制に依存せず EMT を抑制できた。また、細胞膜局在 β -catenin の細胞質内への移行を抑制することで、低酸素誘導 EMT 表現型獲得を抑制する可能性を明らかにした。これらの結果から、低酸素による肺癌細胞の悪性表現型獲得を阻害する脱リン酸化 PTEN は、新たな治療標的となる可能性が示唆された。

【結論】

脱リン酸化 PTEN は、肺癌において組織低酸素による腫瘍微小環境の EMT 表現型獲得を阻害することから、その導入による新たな治療の可能性が示唆された。