

主論文の要旨

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

肺線維芽細胞における非リン酸化 PTEN の外因性導入は
TGF β によって誘導された細胞外マトリクスの発現を減少させる

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)

木村 元宏

【緒言】

特発性肺線維症は過剰な細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)沈着を示す線維化病巣を伴うが、Transforming growth factor β (TGF β)は肺胞上皮細胞や線維芽細胞からの過剰 ECM 産生刺激因子の一つである。

Phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10(PTEN)はがん抑制遺伝子で、PTEN 発現欠損により肺癌悪性表現型獲得や線維化悪化が報告されている。野生型 PTEN(PTENWt)過剰発現により線維芽細胞の ECM 産生能が回復することが報告されたが、PTENC 末端リン酸化部位のリン酸化亢進によって細胞悪性表現型獲得がおこることが知られている。こうした中、上皮細胞において TGF β 刺激により PTENC 末端がリン酸化されて活性化減弱が誘導されることが報告された。さらに、上皮細胞において細胞内 C 末端非リン酸化 PTEN(PTEN4A)発現誘導により TGF β 誘導 ECM 産生が抑制されることが報告された。しかしながら、PTEN4A が線維芽細胞において TGF 刺激 ECM 産生を抑制するかどうかは十分検討されていない。

今回、細胞外 PTEN4A 導入が線維芽細胞における TGF β 刺激 ECM 産生を抑制するかを検討した。

【方法】

GFP、GFP-PTENWt、GFP-PTEN4A をそれぞれ発現するアデノウイルスベクターを作成した。それぞれのアデノウイルスを肺上皮細胞である H358 細胞、ヒト成人肺線維芽細胞 CC2512、マウスから抽出した肺線維芽細胞に感染させた。ウェスタンブロッティング法による ECM の発現の評価と共焦点レーザー顕微鏡を用いた β -catenin の細胞内局在評価を行った。

【結果】

1. 上皮細胞におけるアデノウイルスによる非リン酸化 PTEN C 末端発現導入は TGF β 誘導 ECM 発現を減少させる

H358 において TGF β によって誘導される FAK のリン酸化は GFP-PTENWt によって回復せず、GFP-PTEN4A によってのみ回復した(Fig.1C)。TGF β による Fibronectin の発現は GFP-PTENWt により部分的にしか抑制されなかったが、GFP-PTEN4A により有意に抑制された(Fig.1E)。TGF β による β -catenin の細胞質・核内移行は、GFP-PTENWt によって抑制されず、GFP-PTEN4A によってのみ抑制された(Fig.2)。

2. ヒト成人肺線維芽細胞におけるアデノウイルスによる非リン酸化 PTEN C 末端の発現は TGF β 誘導 ECM 発現を減少させる

ヒト成人肺線維芽細胞 CC2512 において TGF β 誘導 ECM である Fibronectin, Collagen I の発現は、GFP-PTENWt により抑制されなかったが、GFP-PTEN4A により有意に抑制された(Fig.3CD)。TGF β 誘導 α -SMA 発現は、GFP-PTENWt、GFP-PTEN4A のいずれによっても抑制されなかった(Fig.3E)。TGF β による β -catenin の

細胞質・核内移行は、GFP-PTENWtによって抑制されず、GFP-PTEN4Aによってのみ抑制された(Fig.4)。

3. マウス肺線維芽細胞におけるアデノウイルスによる非リン酸化 PTEN C 末端の発現は TGF β 誘導 ECM 発現を減少させる

マウス肺線維芽細胞において、TGF β 刺激による Fibronectin, Collagen I の発現は GFP-PTENWt により抑制されなかったが、GFP-PTEN4A により有意に抑制された(Fig.5CD)。TGF β 刺激 α -SMA 発現は、GFP-PTENWt、GFP-PTEN4A のいずれによっても抑制されなかった(Fig.5E)。TGF β による β -catenin の細胞質・核内移行は、GFP-PTENWt によって抑制されず、GFP-PTEN4A によってのみ抑制された(Fig.6)。

【考察】

TGF β 経路を制御することが肺線維症治療において重要であると考えられている。PTENはそのフォスファターゼ活性を介してさまざまなシグナル経路活性を負に制御する。肺胞上皮細胞や線維芽細胞では十分な PTEN 発現が維持されているが、肺線維化病変では TGF β 経路の恒常的活性化状態にあることが知られていた。そうした中、PTENC 末端リン酸化によりフォスファターゼ活性が低下することが報告された。そこで、TGF β 誘導 ECM 産生を最大限抑制する手段として C 末端非リン酸化 PTEN(PTEN4A)の細胞外導入が治療戦略として考えられた。

まず、細胞外 PTEN4A 導入効果を評価した。上皮細胞における細胞外 PTEN4A 発現誘導はドキシサイクリン誘導性 PTEN4A 発現と同程度の発現誘導をもたらした。PTEN4A 導入は TGF β 誘導 FAK リン酸化を抑制した。この結果から、C 末端非リン酸化 PTEN の細胞外導入が TGF β 刺激を効果的に抑制することを確認できた。TGF β 誘導 ECM 産生は β -catenin の細胞膜から細胞質・核内への移行を介して起こる。細胞外 PTEN4A 導入は、上皮細胞において TGF β 刺激による β -catenin の細胞質・核内移行を抑制して、その下流経路の Fibronectin 発現を抑制した。

2つの線維芽細胞株においてもPTEN4AはTGF β 誘導FAKリン酸化を抑制した。野生型PTENと比較して、外的導入されたPTEN4AはTGF β によるPTENC末端のリン酸化を受けないことの結果であると推察された。さらに、TGF β 誘導Fibronectin, Collagen Iの発現はGFP-PTEN4Aによって抑制された。一方で、Smad依存性と報告されている α -SMAの発現は抑制していなかった。既報の通り、PTEN4AはSmad非依存経路の抑制を介してTGF β 誘導ECMの制御をしていることが推察された。

線維芽細胞の β -catenin の核内移行は肺線維症の病態との関連が示唆されており、線維芽細胞では、TGF β 非刺激状態において β -catenin は細胞膜表面に局在して、TGF β 刺激により細胞質・核へ移行することが知られている。GFP、GFP-PTENWt の導入では TGF β 刺激による β -catenin の細胞内への移行を抑制できなかったが、GFP-PTEN4A の導入により β -catenin の細胞膜局在を維持した。TGF β 誘導Fibronectin, Collagen I の発現抑制は、PTEN4A による β -catenin の膜局在維持によると考えられた。本研究では β -catenin の細胞膜局在の維持機構を明らかにしていないが、過去の

報告と合わせて、PTEN4AがTGF β による β -cateninのリン酸化を抑制することによるのかもしれない。

【結語】

線維芽細胞への外因性 PTEN4A の導入は細胞内 PTEN 脱リン酸化酵素活性の保持をもたらして TGF β によって誘導される過剰 ECM 産生を抑制する可能性が示された。