

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06155・19K21266

研究課題名(和文) 肺癌における活性イオウ分子種とイオウ代謝酵素の役割の解明

研究課題名(英文) The role of reactive sulfur species and cysteinyl-tRNA synthetase2 in lung cancer

研究代表者

突田 容子 (Tsukita, Yoko)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：50822566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：システイニルtRNA合成酵素(CARS)2は活性イオウ分子種の一つであるシステインパーサルファイドの合成酵素である。CARS2遺伝子発現は、手術摘出肺の非癌部位に比して、肺癌部位で低下していることが明らかとなった。また、手術後に再発した症例は非再発症例よりもCARS2のタンパク発現が低い傾向を認めた。肺癌部位における検討ではCARS2とその他イオウ代謝関連酵素である2つの遺伝子発現との間に正の相関関係を認めた。以上よりイオウ代謝と発癌には関連があり、個々の癌でイオウ代謝への依存度が異なり、癌の悪性度に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CARS2が肺癌における発癌・悪性度に寄与している可能性を示した。肺癌におけるCARS2を含むイオウ代謝の関与を明らかにすることは、肺癌の発生や進展に関する未知のメカニズムの解明につながる。さらには、現在の薬物療法の主体である殺細胞性抗がん剤、分子標的治療、免疫療法とは異なる治療標的の発見につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Cysteinyl-tRNA synthetase (CARS)2 is known as a novel cysteine hydropersulfide synthase. In our lung cancer tissue biobank, CARS2 mRNA expression decreased in cancer tissues compared to normal tissues. The protein expression of CARS2 in relapsed cancers tended to be lower than in non-relapsed cancers. CARS2 expression significantly correlated with expression of genes encoding other enzymes involved in sulfur metabolism. These data suggest that sulfur metabolism is associated with the carcinogenesis and cancers vary in their dependence on sulfur metabolism.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 CARS2

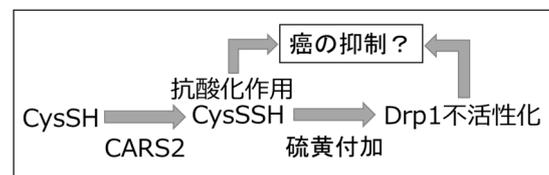
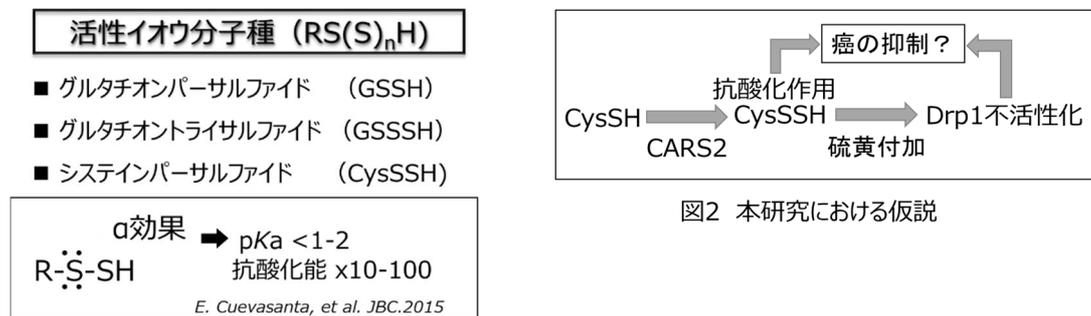
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスが癌を促進するか抑制するかについては、相反する見解が存在する。活性酸素種 (ROS) は遺伝子変異によって腫瘍形成を誘導し、癌の転移を促進することが報告されている。一方、抗酸化剤である N-アセチルシステインも転移を促進すること、抗酸化分子の発現を調節する Nrf2 が癌細胞で活性化していることが報告されている (Trends Mol Med. 2017;23:411-429)。以上のように酸化ストレスと癌の関係についてはまだ理解されていない部分が多い。

近年、活性酸素の強力な消去剤である“システインパーサルファイド (Cys-SSH)” が本学の赤池らによって発見された (PNAS 2014;111:7606-7611)。システインパーサルファイドはシステインのチオール側鎖 (Cys-SH) に、硫黄原子 (S) が 1 個付加した構造を有する。1 つのイオウ原子の付加によりその抗酸化活性がシステインに比して 10 - 100 倍高まっており、赤池らが開発した質量分析法により、ヒトやマウスの血液や臓器に存在することが明らかとなった (図 1)。本研究室の沼倉らは赤池らとの共同研究により、COPD では活性イオウ分子種の産生が低下して病態に関与している可能性を報告した (Thorax 2017;72:1074-1083)。その後、赤池らはミトコンドリア内に存在するシステニル tRNA 合成酵素 (cysteinyI-tRNA synthetase: CARS) 2 がシステイン (CysSH) を基質としてシステインパーサルファイドを合成することを発見した (Nat. Commun. 2017;8:1177)。また、同論文ではシステインパーサルファイドが dynamin-related protein (Drp) 1 を硫黄付加により不活性化することも報告されている。Drp1 はミトコンドリアの分裂を促進し、癌において予後不良因子と考えられている。

活性イオウ分子種や CARS2 が癌に対して促進性に働くのか、抑制性に働くのか、そしてその機序は未知である (図 2) システインパーサルファイドと CARS2 に着目した本研究の結果は、肺癌、さらには癌における全く新しい分子基盤の解明と治療標的の発見につながる可能性を秘めている。



2. 研究の目的

本研究の目的は CARS2 や活性イオウ分子種の癌における関与を明らかにすることである。そこで本研究では下記 3 点を明らかにする。

(1)我々が蓄積した肺癌検体バンクを使用して肺癌の臨床病態と CARS2 発現との関連を明らかにする。(2)肺癌における CARS2 の役割を抗酸化作用の視点から解明する。(3)肺癌における CARS2 の役割を Drp1 との観点から解明する。

3. 研究の方法

(1) 肺癌の臨床病態と CARS2 発現との関連の解明

肺癌組織検体を用いた検討

当院で確立している肺癌検体バンクを用いて、同一肺葉内の癌部と非癌部を入手し、()mRNA を抽出し、qRT-PCR により CARS2 やその他イオウ代謝関連酵素の遺伝子発現を評価する()キットを用いてミトコンドリアを抽出し、癌部と非癌部の CARS2 の発現量をウエスタンブロット法により評価する。CARS2 の発現のプロファイリングを行い、肺癌の臨床病態との関連を決定する。

肺癌組織切片を用いた検討

ホルマリン固定パラフィン包埋をしたヒト肺癌組織切片について、CARS2 の発現を抗 CARS2 抗体を用いて免疫組織化学で検討する。画像解析により陽性部分の面積を定量し、補正はミトコンドリア外膜タンパク質である TOMM20 抗体を用いて行う。すでにデータベース化してある肺癌の組織型、病期、術後再発の有無、予後などの臨床情報との相関を解析し、肺癌の臨床病態との関連を決定する。

(2) 肺癌における CARS2 の役割を抗酸化作用の視点から解明する

ヒト肺癌細胞株である A549 への siRNA 処理により CARS2 をノックダウンする。ノックダウン効率は qRT-PCR 法とウエスタンブロット法により確認する。活性イオウ分子種特異的な蛍光プローブ (SSP-4) を用いて細胞内の活性イオウ分子種の産生量を可視化する。CARS2 ノックダウンによる活性イオウ分子種と酸化ストレスの変化を解析する。CARS2 の発現を減弱させることで細

胞内の活性イオウ分子種量は低下すると考えられ、細胞増殖反応に与える作用を確認する。細胞増殖の評価は細胞増殖アッセイキットを用いて行い、併せて細胞周期についてフローサイトメトリーを用いて解析する。

(3) 肺癌における CARS2 の役割を Drp1 との関連から解明する

Drp1 の活性化はミトコンドリア分裂と癌の増殖を促進することが知られている (N Engl J Med.2014; 370:1073-1074)。Drp1 の活性化は GTP アガロースプルダウンアッセイにより評価する。ミトコンドリアの分裂能は既報にならって評価する (Nat Neurosci .2015;18:501-10)。具体的には TOMM20 染色でミトコンドリアの形状を評価し、電子顕微鏡でミトコンドリアの長さを計測する。CARS2 ノックダウンによる Drp1 の活性化とミトコンドリアの分裂の変化を解析する。

4. 研究成果

(1) 肺癌の臨床病態と CARS2 発現との関連の解明

癌部と非癌部の遺伝子発現を比較するにあたり、まず、6つの Housekeeping gene のうち癌部と非癌部の発現の差が最も小さい RPLP0 を内因性コントロールとして選択した。癌部と非癌部の mRNA を抽出し、正常組織では発現していない遺伝子の発現を確認することで癌部と非癌部が区別できていることを裏付けた。CARS2 の遺伝子発現は、手術摘出肺の非癌部位に比して、癌部で有意に低下していた (図 3、n=20)。癌部における CARS2 遺伝子発現の比較検討 (n=88) では、組織型で有意差を認めたが (腺癌 > 扁平上皮癌, p=0.004)、臨床病期、再発の有無、遺伝子変異の有無の項目では有意差を認めなかった。

免疫組織化学による検討でも、非癌部と比較して癌部における CARS2 の発現は低下していた (図 4) また、術後再発症例は非再発症例よりも CARS2 の発現が低い傾向を認めており、現在検体数を増やしたり、別コホートの検体を用いたりして追加検討を行っている。ミトコンドリアを抽出し、癌部と非癌部の CARS2 の発現量をウエスタンブロット法により評価する工程については、上記 mRNA 抽出と異なり生検体が必要であり現在随時検体採取とミトコンドリア抽出を行っている。

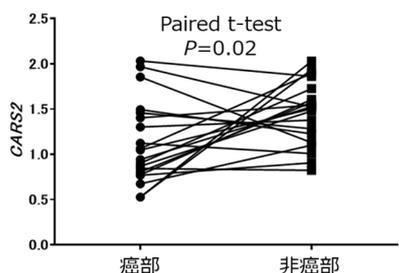


図3 癌部と非癌部における遺伝子発現

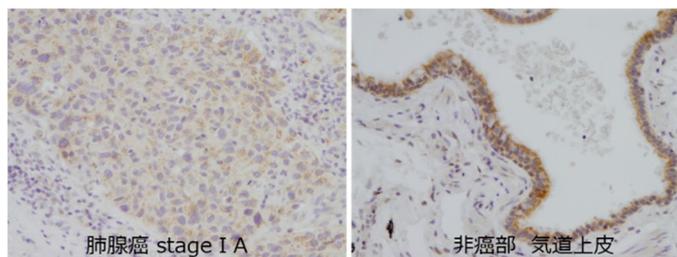


図4 癌部と非癌部における免疫組織化学

イオウ代謝に関連する CARS2 の遺伝子発現と、同様にイオウ代謝関連酵素である succinate quinone reductase (SQR:活性イオウ分子種から産生されたHS-イオンから H+を電子伝達系に輸送する酵素)との遺伝子発現において、強い正の相関関係を認めた (図 5)。この相関関係は非癌部では認めず、癌部でのみ認めた。個々の癌でイオウ代謝への依存度が異なる可能性があり、現在、これらの遺伝子発現に共通する上流経路の検討や酵素の発現が高い癌と低い癌との臨床的な差異を解析中である。

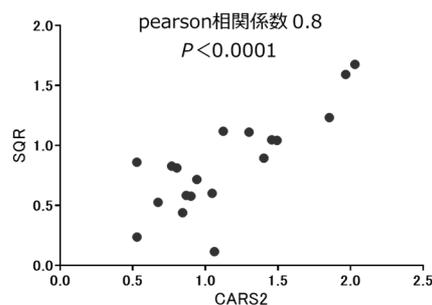


図5 癌部における遺伝子発現の相関

(2) 肺癌における CARS2 の役割を抗酸化作用の視点から解明する

まず、ヒト肺癌細胞株である A549 への siRNA 処理により CARS2 が効率よくノックダウンされることを qRT-PCR 法とウエスタンブロット法により確認した (図 6)。ノックダウンした細胞を培養すると細胞は紡錘形に変形し、増殖能力が 40-50%低下した。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析ではノックダウン群で S 期の割合が有意に減少した。現在、ノックダウンした際の活性イオウ分子種と酸化ストレスの変化を解析中である。

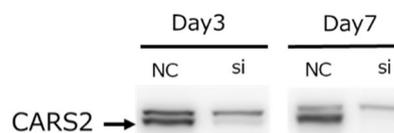


図6 A549 CARS2ノックダウン

(3) 肺癌における CARS2 の役割を Drp1 との関連から解明する

本研究期間では Drp1 との関連までは着手ができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukita Yoko, Fujino Naoya, Miyauchi Eisaku, Saito Ryoko, Fujishima Fumiyoshi, Itakura Koji, Kyogoku Yoriyoko, Okutomo Koji, Yamada Mitsuhiro, Okazaki Tatsuma, Sugiura Hisatoshi, Inoue Akira, Okada Yoshinori, Ichinose Masakazu	4. 巻 18
2. 論文標題 Axl kinase drives immune checkpoint and chemokine signalling pathways in lung adenocarcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12943-019-0953-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsukita Yoko, Okazaki Tatsuma, Ebihara Satoru, Komatsu Riyo, Nihei Mayumi, Kobayashi Makoto, Hirano Taizou, Sugiura Hisatoshi, Tamada Tsutomu, Tanaka Nobuyuki, Sato Yasufumi, Yagita Hideo, Ichinose Masakazu	4. 巻 8
2. 論文標題 Beneficial effects of sunitinib on tumor microenvironment and immunotherapy targeting death receptor5	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/2162402X.2018.1543526	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoko Tsukita, Naoya Fujino, Eisaku Miyauchi, Koji Itakura, Yoriyoko Kyogoku, Mitsuhiro Yamada, Tatsuma Okazaki, Hisatoshi Sugiura, Masakazu Ichinose
2. 発表標題 Axl Receptor Tyrosine Kinase Up-regulates Ligands for Programmed Cell Death 1 in Lung Adenocarcinoma
3. 学会等名 American Thoracic Society Conferance（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Tsukita, Eisaku Miyauchi, Ryoko Saito, Tatsuma Okazaki, Akira Inoue, Yoshinori Okada, Masakazu Ichinose
2. 発表標題 Axl kinase drives immune checkpoint and chemokine signalling pathways in lung adenocarcinomas
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----