

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：83903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670283

研究課題名(和文)細胞老化関連遺伝子TARSHを用いた肺癌の治療と予防

研究課題名(英文)Healing and preventive approach with cellular senescence related gene, TARSH

## 研究代表者

丸山 光生 (Maruyama, Mitsuo)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・老化機構研究部・部長

研究者番号：00212225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：不可逆的な細胞増殖の停止である細胞老化は、個体老化との関連とともに癌の抑制との関連が近年注目されている。細胞老化に伴い発現が上昇するTARSH遺伝子は正常肺で高発現しているが、ヒト肺癌組織では著しく低下することから、癌化の抑制に関連していると考えられる。TARSH 遺伝子の発現制御機構の解明を目的にTARSH遺伝子のプロモーター領域の候補を選定し、TARSH 遺伝子の転写を促進する領域を明らかにした。今後種々の細胞株や発現組織等を用いた TARSH 遺伝子の発現制御機構を解明することで、老化に関連した発癌の基礎的な分子レベルでの仕組みの理解に寄与できる。

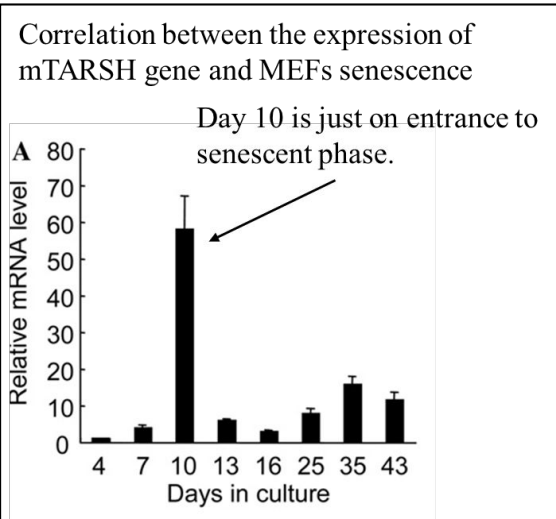
研究成果の概要(英文)：Aging is known as an irreversible decline of various tissue functions. We have identified a gene, target of NESH-SH3 (TARSH/Abi3bp) that was robustly upregulated at the beginning of cellular senescence in mouse embryonic fibroblasts. In addition, TARSH gene was dominantly expressed in lung tissue but the expression was strongly suppressed in human lung cancer specimens. These results suggest TARSH gene expression is involved in regulation of cellular proliferation and tumorigenesis. We predicted the candidate promoter of TARSH gene that includes the upstream of transcriptional initiation site and first intron, and validated the promoter function of that region. We are now going to narrow the functional region of the TARSH promoter. Consequently elucidation of senescence-associated regulation of TARSH gene expression may contribute to understanding the potential common mechanism underlying senescence, physiological aging and geriatric diseases including cancer.

研究分野：分子老化学

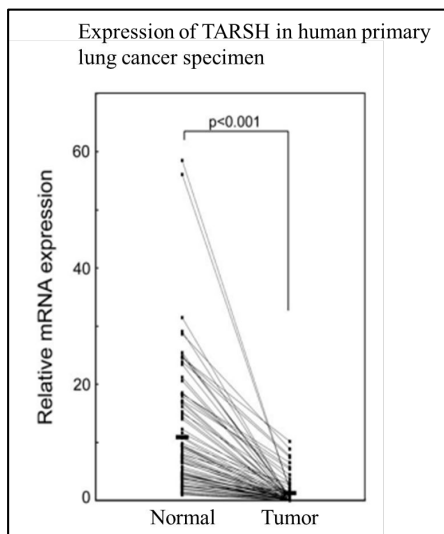
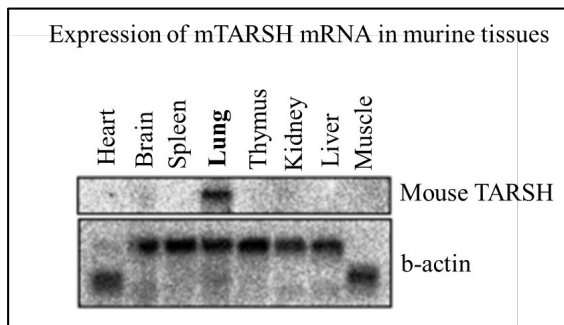
キーワード：肺癌 細胞老化 遺伝子発現 転写 TARSH

1. 研究開始当初の背景

ヒトは加齢に伴い筋量や免疫力などの生理機能が低下し、サルコペニアや癌などの様々な老化関連疾病を引き起こす。一方、老化の原因の一つと考えられている細胞老化は、不可逆的な細胞増殖の停止として定義され、こうした個体老化や癌の抑制との関連が近年注目されている。Target of NESH-SH3 (TARSH) は、マウス胚性繊維芽細胞の複製老化に伴い発現が上昇する、細胞老化関連遺伝子として私達が見出した。



TARSH は正常肺で高発現しているが、細胞増殖が盛んであるヒト肺癌組織では、その発現は著しく低下している。



また、細胞増殖が抑制される血清飢餓や接触阻害の条件下では、TARSH の発現は上昇することも、これまでに報告してきた。これらのことから、TARSH の発現は細胞増殖活性と負の相関があり、癌化の抑制に関連していると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト肺癌における新しい予防と治療法の確立に資するため、肺の癌化によって著しく発現が低下する TARSH の発現制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)マウス線維芽細胞株 NIH3T3 と、マウス悪性黒色腫株 B16F10 における内在性 TARSH 遺伝子発現を調べるため、マウス TARSH に特異的な配列を持つプライマーと SYBR Green を用いた定量 PCR 法により、mRNA 量を測定した。また、NIH3T3 を、血清飢餓(0.1% FBS and 0.04% BSA)と接触阻害(100%以上の細胞密度)にして、RNA を取得し、同様に定量した。実験手技による誤差を補正するため、内在性コントロールとして 18S rRNA も定量した。

(2)血清飢餓による TARSH 遺伝子の mRNA の安定性の変化を調べるため、NIH3T3 を血清存在下または血清飢餓状態で培養し、アクチノマイシン D を加えて転写を阻害した後、0, 1, 2, 4, 8 時間後の RNA を取得し、定量 PCR により mRNA 量を測定した。血清刺激により mRNA の安定性が低下する FOS 遺伝子もコントロールとして定量した。

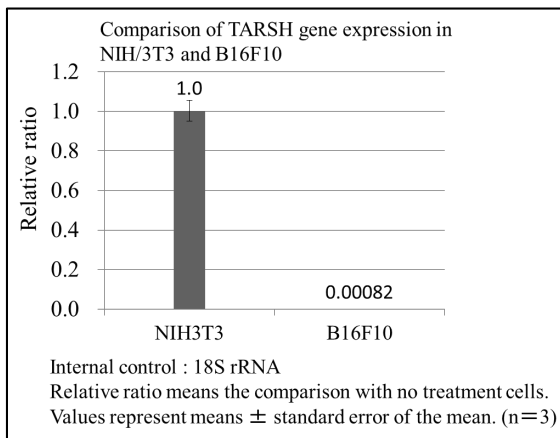
(3)TARSH 発現制御領域を予測するため、UCSC ゲノムブラウザー上で、1: プロモーターと関連のある H3K4Me3 修飾、2: エンハンサーと関連のある H3K4Me1 修飾、3: 転写活性と関連のある H3K27Ac 修飾、4: クロマチン接近性と関連のある DNase I 高感受性領域、5: 機能配列と関連のある脊椎動物間での配列保存度の情報を取得し、これらの項目の重なる領域を、候補領域とした。

(4)TARSH 発現制御領域の候補の機能性を検証するため、候補領域に特異的な配列を持つプライマーを用いた PCR により増幅させた断片を、プライマーの尾部に持たせた制限酵素部位を利用して、ホタルルシフェラーゼレポーターベクターに挿入した。作成したレポーターベクターを NIH3T3 と B16F10 に一過的にトランスフェクションし、細胞抽出液に含まれるルシフェラーゼ酵素活性に由来する発光強度を測定した。候補領域を持たない

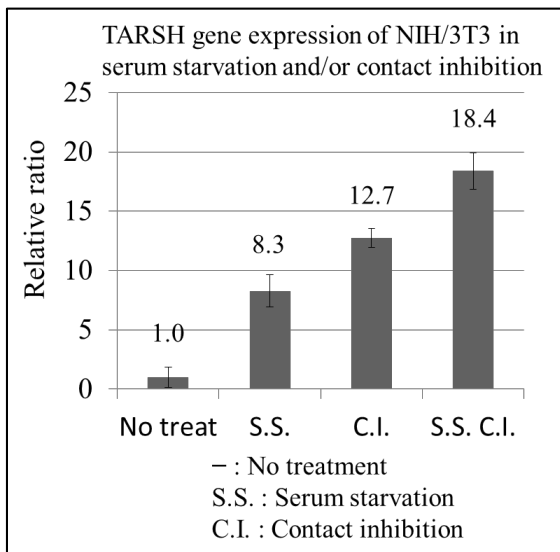
親レポーターと比較して、候補領域の有無により、レポーター活性が変化するかを検証した。NIH3T3 にレポーターベクターをトランスフェクションした後、定量 PCR の際に行ったのと同様の血清飢餓と接触阻害を実施し、ルシフェラーゼ活性を測定した。全ての実験で、トランスフェクション効率等の補正を行う目的でウミシイタケルシフェラーゼレポーターも導入した。

#### 4. 研究成果

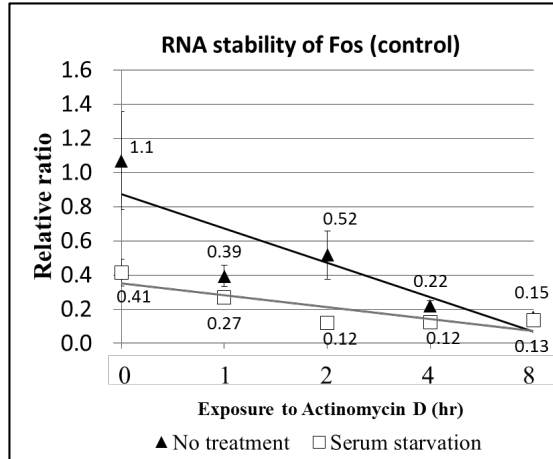
(1) 培養細胞中の内在性 TARSH の発現を明らかにするために、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 と、マウス悪性黒色腫株 B16F10 から RNA を取得し、TARSH mRNA 量を測定した。NIH3T3 では検出に十分な発現を認められたが、B16F10 では発現を検出できなかった。この結果は、悪性腫瘍などの増殖の盛んな細胞で TARSH の発現が低く、増殖を制御された細胞で高いという、これまでの我々の観察と一致する。



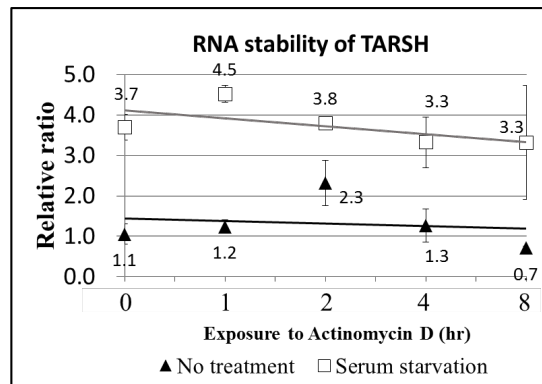
NIH3T3 に対して血清飢餓・接触阻害を組み合わせると細胞増殖を止めると、通常培養に比べて TARSH の発現はさらに高まることが分かった。



(2) 血清飢餓による TARSH の発現上昇の原因を探るため、mRNA の安定性を比較した。血清刺激によって mRNA の安定性が減少することが知られる FOS 遺伝子をコントロールとして定量したところ、血清存在下の mRNA の安定性が減少し、分解の速度が速まることが確認できた。



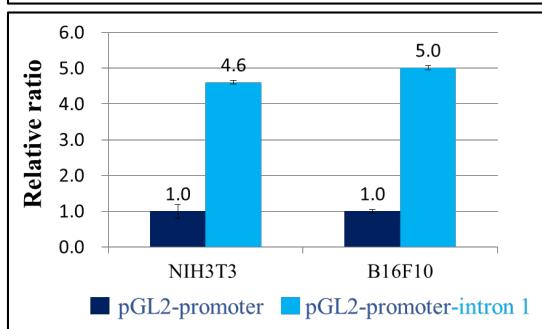
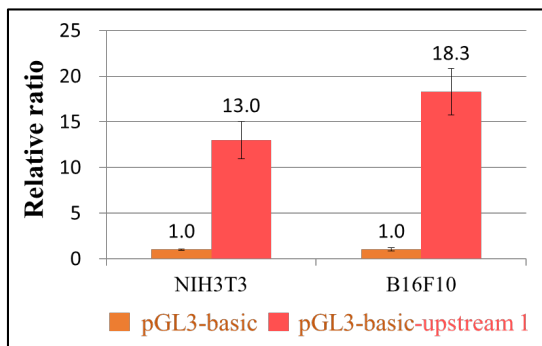
同じサンプル内の TARSH の mRNA の安定性を検証すると、血清存在下で血清飢餓でも、mRNA の安定性は変化しないことが分かった。以上のことから、血清飢餓による TARSH 遺伝子の発現上昇は RNA の安定性制御とは別の仕組みで行われていることが分かった。



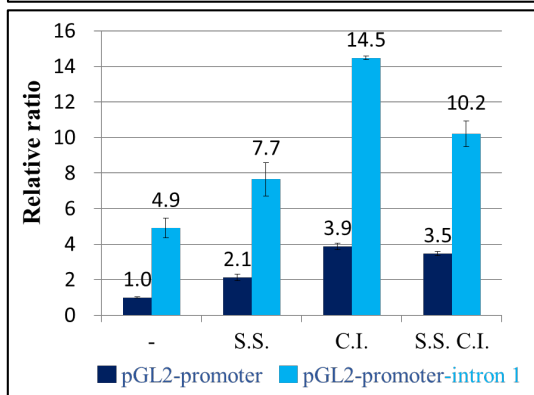
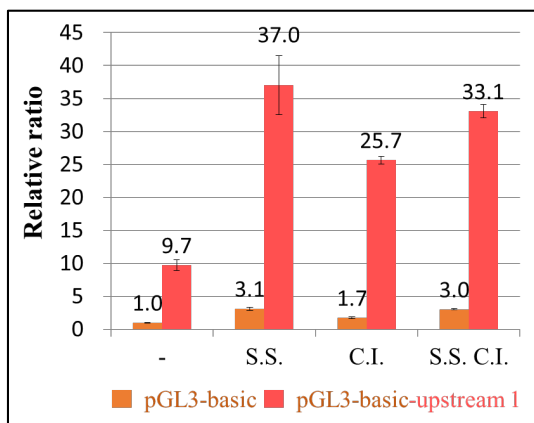
(3) 次に、血清飢餓等による TARSH 発現上昇の原因のもう一つの可能性として、転写による制御を検討した。UCSC ゲノムブラウザを用いて、転写と関連のある予測機能配列の重なりを参考に、転写開始点より上流に、それぞれ約 3 kb の領域を 5 つ、転写制御の候補領域として予測した。その中で、もっとも機能性が高いと期待される、TARSH 遺伝子の転写開始点上流の約 600 bp (Upstream1) と、エクソン 1 と接するイントロン 1 の約 1500 bp (Intron1) に焦点を絞った。

(4) 予測した候補領域をレポーターであるルシフェラーゼベクターに挿入し、NIH3T3 または B16F10 におけるレポーター活性を比較した。候補領域を持たない親レポーターをコントロールとした。どちらの細胞でも、

Upstream1 や Intron1 を挿入したレポーターの方が、挿入配列を持たない親レポーターに比べて、5-10 倍高いレポーター活性を示した。つまり、内在性 TARSH の発現の有無に関わらず、これらの配列は転写を促進する機能を持つことが分かった。



レポーターを NIH3T3 に導入後、血清飢餓と接触阻害を組み合わせて培養すると、通常培養に比べてさらに高いレポーター活性が示されたが、挿入配列を持たない親レポーターでも同様の発現変化が示されたので、今回同定した転写制御配列は、これらの細胞状態の変化に応答する配列ではないと結論した。



現在、更に詳細な領域の検証を行うため、今回同定した転写制御領域を両方持つレポーターの作成を行っている。今後、レポーターの欠失・置換変異体の作成・機能解析を行い、転写制御に必要な責任配列を明らかにするとともに、責任配列に結合する転写因子の同定を行う予定である。また、今回検証した以外の候補配列が、血清飢餓等に応答して TARSH の発現を上昇させるか検証する。種々の細胞株や発現組織等を用いた TARSH 遺伝子の発現制御機構を解明していくことで、老化に関連した発癌の基礎的な分子レベルでの仕組みの理解に寄与できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計6件)

Iwashita Y, Harada T, Matsuda T, Sugimoto M, Maruyama M.  
Implication of a cellular senescence-related gene, TARSH in cell proliferation and cancer metastasis  
The 37th Annual Meeting of Japan Society for Biomedical Gerontology,  
June 27, 2014, Aichi

Iwashita Y, Harada T, Matsuda T, Terauchi K, Shimada J, Sugimoto M, Maruyama M.  
Functional role of a cellular senescence-related gene, TARSH/Abi3bp in cell proliferation and cancer metastasis  
Molecular Genetics of Aging, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cold Spring Harbor, NY, USA,  
September 30, 2014

Iwashita Y, Harada T, Ishizawa K, Matsuda T, Terauchi K, Shimada J, Sugimoto M, Maruyama M.  
Implication of a cellular senescence-related gene, TARSH/Abi3bp in cellular proliferation and lung cancer metastasis  
第 37 回日本分子生物学会年会、  
2014 年 11 月 25 日、横浜市

Ishizawa K, Iwashita Y, Matsuda T, Sugimoto M, Maruyama M.  
Analysis of functional promoter region of a cellular senescence-related gene, TARSH  
第 37 回日本分子生物学会年会、  
2014 年 11 月 27 日、横浜市

岩下雄二、原田種展、石澤和也、松田剛典、寺内邦彦、島田順一、杉本昌隆、丸山 光生  
Investigation of a cellular

senescence-related gene, TARSH/Abi3bp in cellular proliferation and lung cancer metastasis

第 7 回 NAGOYA グローバルリトリート、  
2015 年 2 月 13 日、愛知

Iwashita Y, Maruyama M

Functional role of a cellular senescence-related gene, TARSH/Abi3bp in cell

proliferation and cancer metastasis

VCU progress report Oct 07, 2014,

Richmond, VA USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/research/organization/rokakiko.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

丸山 光生 (MARUYAMA, Mitsuo)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・老化機構研究部・部長

研究者番号：

00212225

### (2)研究協力者

岩下 雄二 (IWASHITA, Yuji)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・老化機構研究部・流動研究員

研究者番号： 70730406