

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591638
 研究課題名（和文） 微小肺癌における NESH/TARSH 経路の癌抑制機構の解明と
 臨床診断への応用
 研究課題名（英文） Cancer-associated transcriptional inactivation of NESH-TARSH
 in small-sized primary lung cancer
 研究代表者
 島田 順一（SHIMADA JUNICHI）
 京都府立医科大学・医学研究科・講師
 研究者番号：60315942

研究成果の概要：

肺癌における TARSH および NESH 遺伝子の発現状況を定量 RT-PCR 法を用いて解析したところ、肺癌臨床検体の微小肺癌 12 例において全例で TARSH mRNA の発現低下を認めた。また TARSH 分子の機能解析においては、TARSH 遺伝子をノックダウンすると p21 の活性化を伴って著しい細胞増殖抑制が認められた。以上より TARSH が細胞の安定性を司って細胞周期に関連した機能を持ち、TARSH の不活化により細胞が老化やアポトーシス、さらには癌化という pathway に導くものであり、その結果、臨床肺癌の初期段階より TARSH が発現低下していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード： TARSH 肺癌 mRNA 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでTARSH (Target of NESH-SH3) に対して、細胞老化関連遺伝子としての機能を捉えてきた。またTARSH遺伝子の発現をsiRNAにてノックダウンさせると細胞増殖が変化することをみつけ、TARSHがcell cycleの進行を含めた制御にも関与している可能性を見出した。さらには「細胞老化と癌化」の関連性に着目し、quantitative real-time

RT-PCRによる定量解析にて、検索した15種類のヒト肺癌細胞株および原発性肺癌の臨床検体32症例の「全て」においてそのmRNA発現レベルが顕著に低下していることを確認し、TARSH遺伝子の癌関連性をも見出してきた。

2. 研究の目的

今日の画像診断技術の進歩から肺癌がより早期に発見できるようになり、その治療成績も向上してきた。特にスリガラス状陰影などの直径 1 cm 前後の微小な肺病変が多数指摘されるようになってきており、前癌病変との鑑別を含めた微小肺癌における統括された診断・治療指針が必要不可欠である。しかしこれら微小肺癌の発生や進展に関連する分子生物学的なエビデンスは未だ得られていない。

我々は肺癌の発生過程において、「正常肺組織の正常老化からの逸脱」と「正常な細胞増殖制御からの逸脱」の2点に着目し、ヒト肺癌細胞株および原発性肺癌の臨床検体を用いて TARSH および NESH 遺伝子の mRNA 発現レベルを検討し、微小肺癌と前癌病変、非浸潤癌と浸潤癌との分子生物学的な差異を見出すことを目指した。また TARSH 遺伝子の分子生物学的な機能の解析を追究した。

3. 研究の方法

ヒト肺癌細胞株より RNA を抽出し、NESH 特異的プライマーによる定量 RT-PCR を行って、ヒト肺癌細胞株における NESH の mRNA 発現量を定量化した。

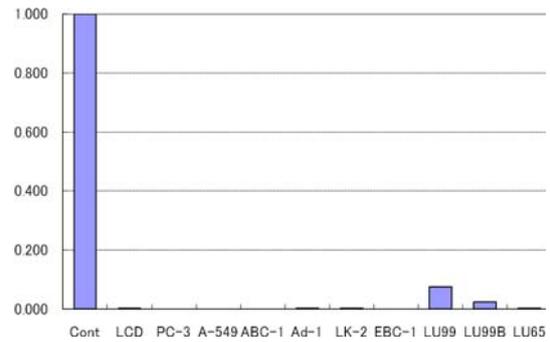
続いて肺癌臨床検体よりそれぞれ total RNA を抽出し、cDNA を作製した。これを real-time RT-PCR 法により TARSH 遺伝子の mRNA 発現量を定量した。

また shRNA を用いて TARSH をノックダウンさせた細胞株を樹立し、フローサイトメトリーにて細胞増殖パターンを検索した。この際、FACS を用いて、アネキシンおよび PI 染色によるアポトーシス細胞の数を測定した。さらに p53 や p21 などの細胞周期関連分子の発現量を調べ、その関連性を解析した。

4. 研究成果

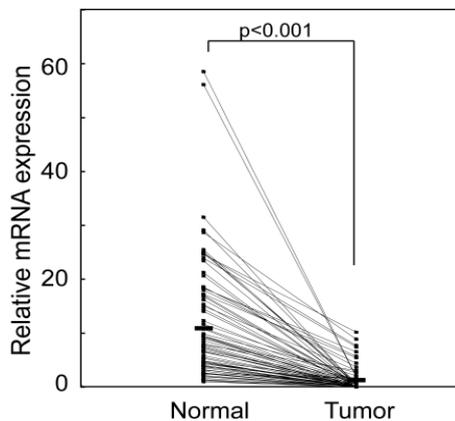
まず

1) ヒト非小細胞肺癌細胞株 12 種による NESH 遺伝子の mRNA 発現レベルを定量 RT-PCR 法を用いて測定したところ、全例において顕著な発現低下を認めた。



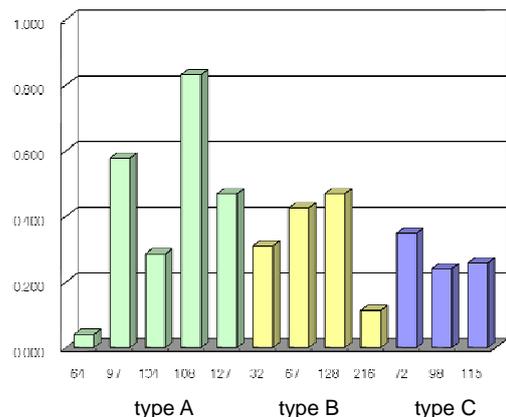
<ヒト肺癌細胞株における NESH mRNA 発現>

2) 肺癌臨床検体 88 例における TARSH mRNA 発現量解析では腫瘍部位における mRNA 量が同一症例の非腫瘍部位よりも有意に低下している事が明らかとなった。



<肺癌臨床検体における TARSH mRNA 発現>

3) またそのうちの微小肺癌 12 例においても非浸潤癌、浸潤癌を問わず全例に同様の結果を得たが、特に野口分類に示されるタイプ別 (A > B > C) に発現量の差がみられる傾向にあった。

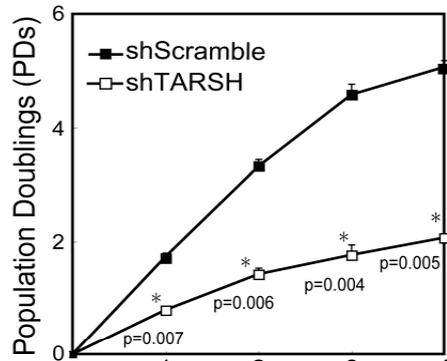


<微小肺癌における TARSH 発現量>

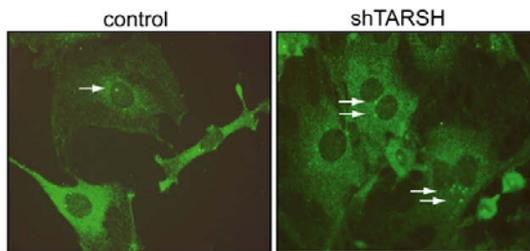
以上より TARSH 遺伝子は肺癌の初期段階より発現低下がみられ、その発現レベルは腫瘍の

分化度に依存することが示唆された。

さらに TARSH 分子の機能については、
4) 胎児線維芽細胞 (MEF) において TARSH 遺伝子をノックダウンさせると二核細胞の出現とともに細胞増殖が抑制された。

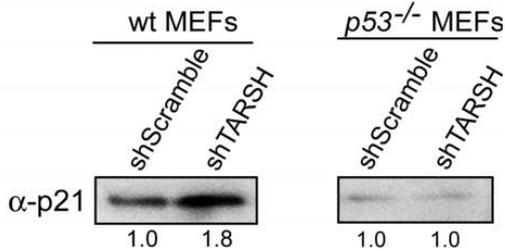


< TARSH ノックダウン MEF の細胞増殖 >



< TARSH ノックダウン細胞の二核化 >

TARSH の細胞周期との関連性を追究すると、
5) TARSH 遺伝子をノックダウンさせて MEF では、p21 が活性化していた。しかし p53 と TARSH とのダブルノックダウンでは p21 は変化しなかった。



< TARSH ノックダウンによる p21 蛋白発現 >

6) TARSH 遺伝子を抑制させると、PI(+) / Annexin(+) のアポトーシス細胞およびその前段階の細胞 (PI(-) / Annexin(+)) が増えた。

| | | Annexin V + | |
|------------------------|-------------|-------------|-------|
| | | PI - | PI + |
| wt MEF | sh-Scramble | 5.2% | 8.3% |
| | sh-TARSH | 29.2% | 16.7% |
| p53 ^{-/-} MEF | sh-Scramble | 1.0% | 0.4% |
| | sh-TARSH | 1.4% | 1.6% |

< TARSH 遺伝子抑制によるアポトーシス >

以上より、TARSH が細胞の安定性を司って p53 経路の細胞周期に関連した機能を持ち、TARSH の不活化により細胞が老化やアポトーシス、さらには癌化という pathway に導くものであると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Wakoh T, Uekawa N, Terauchi K, Sugimoto M, Ishigami A, Shimada J, Maruyama M. Implication of p53-dependent cellular senescence related gene, TARSH in tumor suppression. *BBRC* 2009;380: 807-812
- ② Uekawa N, Nishioka T, Terauchi T, Ohta S, Sugimoto M, Shimada J, Maruyama M. Generation and characterization of novel monoclonal antibodies against murine and human TARSH proteins. *Hybridoma* 2007;26(6): 381-385

[学会発表] (計 7 件)

- ① 寺内邦彦、島田順一、若生武、伊藤和弘、柳田正志、下村雅律、常塚啓彰、矢追毅、丸山光生、伏木信次. IA期の肺腺癌症例におけるTARSH mRNAの発現低下. 第25回日本呼吸器外科学会総会. 宇都宮. 2008年5月
- ② Terauchi K, Shimada J, Uekawa N, Ito K, Yanada M, Shimomura M, Tsunezuka H, Yaoi T, Maruyama M, Fushiki S. Loss of TARSH gene expression in primary lung adenocarcinoma. 12th Congress of the Asia Pacific Society of Respiriology. ゴールドコースト (オーストラリア). 2007年11月
- ③ 寺内邦彦、島田順一、上川奈都子、伊藤和弘、柳田正志、下村雅律、常塚啓彰、矢追毅、丸山光生、伏木信次. 細胞老化関連遺伝子 *TARSH* の肺腺癌における

発現の検討. 第 48 回日本肺癌学会総会. 名古屋. 2007 年 11 月

- ④ 寺内邦彦、島田順一、上川奈都子、伊藤和弘、柳田正志、下村雅律、常塚啓彰、矢追毅、丸山光生、伏木信次. Cancer-associated transcriptional inactivation of *TARSH* in primary lung cancer. 第 66 回日本癌学会総会. 横浜. 2007 年 10 月
- ⑤ Terauchi K, Shimada J, Uekawa N, Ito K, Yanada M, Shimomura M, Yaoi T, Maruyama M, Fushiki S. Marked decline of TARSH gene expression in primary lung cancer. 12th World Conference on Lung Cancer. ソウル (韓国). 2007 年 9 月
- ⑥ 寺内邦彦、島田順一、上川奈都子、伊藤和弘、柳田正志、下村雅律、矢追毅、丸山光生、伏木信次. I 期非小細胞肺癌における TARSH 遺伝子発現の検討. 第 24 回日本呼吸器外科学会総会. 横浜. 2007 年 5 月
- ⑦ 寺内邦彦、島田順一、上川奈都子、伊藤和弘、柳田正志、下村雅律、矢追毅、丸山光生、伏木信次. TARSH 遺伝子は非小細胞肺癌において mRNA 発現レベルの顕著な低下を示す. 第 107 回日本外科学会定期学術集会. 大阪. 2007 年 4 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 順一 (SHIMADA JUNICHI)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：60315942

(2) 研究分担者

加藤 大志朗 (KATO DAISHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：70315943

寺内 邦彦 (TERAUCHI KUNIHICO)
京都府立医科大学・附属病院・研究員
研究者番号：10515290

若生 武 (WAKOH TAKESHI)
国立長寿医療センター (研究所)・
老化機構研究部・研究員
研究者番号：10435878

丸山 光生 (MARUYAMA MITSUO)
国立長寿医療センター (研究所)・
老化機構研究部・部長
研究者番号：00212225

(3) 連携研究者

なし