

機関番号：15101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790771

研究課題名 (和文) 呼吸器疾患における時計遺伝子発現の分子生物学的機能解析

研究課題名 (英文) Clock gene function analysis in the respiratory disease

研究代表者

服岡 泰司 (FUKUOKA YASUSHI)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70444627

研究成果の概要 (和文)：

肺癌培養細胞株 16 種および肺切除術をうけた肺癌患者 18 名の切除肺組織について時計遺伝子発現 (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Clock*, *Bmal1*) を検討した。各培養細胞において時計遺伝子の発現パターンは大きく異なることが明らかとなった。さらに遺伝子導入による時計遺伝子の過剰発現, RNA 干渉による発現抑制の実験が現在進行中である。また, これまで癌組織では時計遺伝子 *Per1* の発現が低下していると報告されていたが, 本研究では肺癌組織が正常肺組織に対して必ずしも発現が減弱しているものではないとの結果が得られた。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, Clock gene expression analysis (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Clock*, *Bmal1*) was carried out about 16 kinds of lung cancer culture cells and the excision lungs organizations. Clock gene expression pattern in each culture cells come in a variety of expression levels. In addition, overexpression and suppression of clock genes are now underway. Moreover, though *Per1* expression is reduced on cancer tissue in previous study, our results suggest that it is not always true. It will be necessary to increase the number of cases and to examine continuously in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：呼吸器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：非閉塞性肺疾患癌、肺線維症、呼吸器感染症

1. 研究開始当初の背景

多くの生物で、種々の生理現象における概日リズム (サーカディアンリズム) が認められる。近年、哺乳類の視交叉上核に約 24 時間の周期を刻む体内時計の存在が確認され、

体内時計を駆動する時計遺伝子群も同定された。更に、これまでの時計遺伝子研究の進展により、時計遺伝子発現と発生・肥満・循環器疾患・精神疾患・腫瘍など各種の病態との関連性も報告されている。

癌の発生においては色々な要因が複雑に関与していると考えられるが、時計遺伝子 *Period1 (Per1)* , *Period2 (Per2)* も癌抑制遺伝子の一つとして関与している可能性が示唆されている。

このような背景をもとに、肺癌や炎症性肺疾患である間質性肺炎などの呼吸器疾患と時計遺伝子発現との関わりを調査・研究することとした。

2. 研究の目的

培養細胞を用いた基礎的な時計遺伝子機能解析と、呼吸器疾患患者の肺手術検体を用いた臨床的な時計遺伝子機能解析との両方向からの研究で、呼吸器疾患に対する時計遺伝子の分子生物学的関与を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

時計遺伝子には、視交叉上核に発現する中枢時計遺伝子と、各末梢組織に発現する末梢時計遺伝子がある。臨床症例においては、中枢時計遺伝子の評価は現実的に不可能であるため、本研究においては末梢時計遺伝子における解析を行った。

RT-PCR および Real-time PCR 法を用いた mRNA 発現量の解析を肺癌培養細胞・肺手術検体ともに実施し、これらの時計遺伝子発現の大きな特徴を把握することとした。

培養細胞については、dish 内の細胞が統合してリズムを刻まない可能性が問題である。Single cell での解析は設備上の問題で実施できなかったため、本研究では各細胞についてそれぞれ複数の dish で実験を行い、得られた値を平均化することで時計遺伝子発現量の多少についての細胞間比較を行った。この比較結果を基にして発現量の少ない細胞を過剰発現させたり (transfection), 発現量の多い細胞を発現抑制させたりして (RNAi), 培養細胞の性質の変化を観察することとした。これは過剰発現や発現抑制の細胞の性質への影響をより観察しやすくするためである。

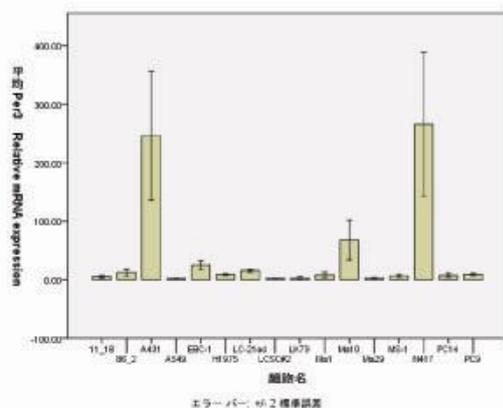
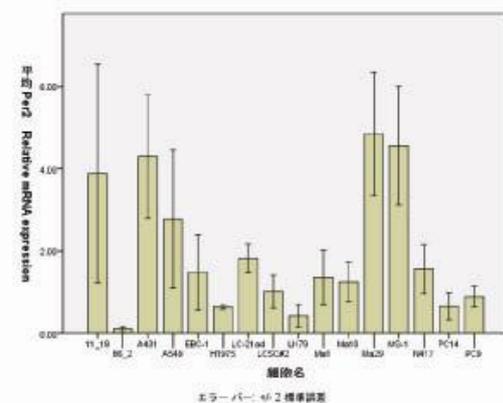
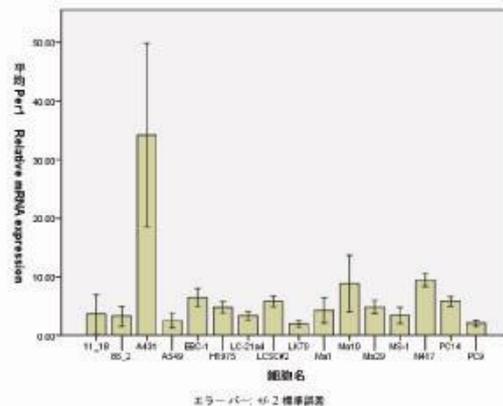
また、肺手術検体においては術中切り出された肺から病変部分 (癌) と正常部分 (病変から十分に離れた周囲肺) を切り分け、液体窒素を用いてただちに凍結したのち RNA 抽出を行った。このため、得られた癌組織と正常組織は同一肺葉に由来しており、生体内での生理的な条件は同様と考えることができた。ただし、患者個体における体内リズムの変化は常に受けることが予想され、手術の時間帯によっても時計遺伝子発現量が異なる可能性が考えられた。このため切除肺における正常部分をコントロールとして病変部分の時計遺伝子発現の相対的变化を検討することとした。

尚、今回の実験では内部標準には β actin を用いた。

4. 研究成果

(1) 肺癌培養細胞における時計遺伝子 mRNA 発現量の解析

肺癌培養細胞 16 株 (11-18, 86-2, A431, A549, EBC-1, H1975, LC-21ad, LCSC#2, LK79, Ma1, Ma10, Ma29, MS-1, N417, PC14, PC9) について、それぞれ時計遺伝子 *Per1*・*Per2*・*Per3*・*Clock*・*Bmal1* の mRNA 発現量を比較検討した (各 n=3)。



〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服岡 泰司 (FUKUOKA YASUSHI)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70444627