

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15779

研究課題名(和文) RGS5遺伝子の甲状腺癌抑制効果解明による新規癌リスク評価検査の開発

研究課題名(英文) Development of novel strategy to stratify the risk of thyroid cancer with RGS5 gene which exhibits tumor suppressive effects

研究代表者

伊藤 祐子 (Ito, Yuko)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60402038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺転写因子TTF-1発現が消失して本来の甲状腺細胞機能を失った甲状腺乳頭癌培養細胞に、アデノウイルスベクターを用いてTTF-1遺伝子を導入した結果、アポトーシスとネクローシスを介して癌細胞死が誘導されることが示された。またPCR解析において、TTF-1導入後にRGS5およびRGS4遺伝子の発現が著増した。RGSはGタンパクを介して細胞内シグナル伝達を調節する。このうちRGS4の発現を抑制すると、TTF-1導入による細胞死、アポトーシスおよびネクローシスの誘導効果は減弱した。TTF-1再発現による甲状腺癌細胞死誘導にはRGS4が関与する機序が存在することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺癌は一般的に予後の良い乳頭癌のような分化型甲状腺癌が大部分を占めるが、一部は分化度が低下し治療抵抗性である。本研究の成果は、このような悪性度の高い脱分化甲状腺癌にTTF-1を再発現させることができれば癌細胞死を誘導することにより甲状腺癌の治療に繋がる可能性を示唆している。また、RGS4はTTF-1導入による甲状腺癌細胞死誘導に関与することが明らかとなったが、他臓器癌におけるRGS4の役割も報告されていることから、癌細胞増殖とRGS4の関連について今後さらに研究する意義が示された。

研究成果の概要(英文)：The forced expression of NKX2-1 using adenoviral vectors induced cell death in dedifferentiated thyroid cancer cells not-expressing NKX2-1. The induction of NKX2-1 expression also caused cell apoptosis and necrosis in those cells. RGS4 and RGS5 mRNA expressions were greatly increased in the Nkx2-1-transduced cells. RGS limits the lifetime of signaling events in G protein, which regulate all aspects of cell and organ physiology. The suppression of RGS4 expressions resulted in inhibition of cell death, apoptosis, and necrosis after the re-expression of NKX2-1. Our study results suggest that RGS4 plays partial roles in the suppression of tumor progression in the dedifferentiated thyroid carcinoma cells.

研究分野：内分泌学

キーワード：RGS4 甲状腺転写因子 脱分化甲状腺癌 分化誘導 癌細胞死 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、世界的に甲状腺癌に対する過剰診療の憂慮が高まっており、甲状腺癌の治療方針決定のための正確なリスク評価が求められている。本研究代表者の所属する研究室では、甲状腺の発生・機能に重要な転写因子 TTF-1 (Nkx2-1) 遺伝子の発現が低下している甲状腺癌細胞に同遺伝子を導入する事により、細胞死を誘導すると共に、G タンパク質シグナル伝達の調節因子である Regulator of G protein signaling 5 (RGS5) 遺伝子発現が甲状腺癌細胞特異的に約 1000 倍に増加することを発見していた。これまで肺癌などにおいて、RGS5 の発現量と癌細胞の分化度や遠隔転移能と正の相関があることが報告されており、癌細胞において過剰に活性化している増殖シグナルの抑制因子として機能している事が示唆されている。これらより、甲状腺癌細胞において RGS5 遺伝子は、TTF-1 による細胞死誘導に寄与していることが示唆されると共に、甲状腺癌の増殖能や転移能等の悪性度を示すマーカーにもなりうる。RGS5 遺伝子検査が甲状腺癌の重症度・予後を評価するリスク因子となれば、従来の甲状腺癌診療の戦略に大きな変革をもたらすと考えられた。

2. 研究の目的

RGS5 遺伝子誘導の甲状腺癌細胞に対する作用を明らかにするとともに、RGS5 発現レベルと甲状腺癌の悪性度・予後との関連性を明らかにし、RGS5 遺伝子を用いた新たなリスク評価検査方法を確立する。

(1) RGS5 発現アデノウイルスベクターを構築し、TTF-1 発現が低下あるいは欠損している甲状腺癌細胞に遺伝子発現し、癌細胞の増殖、アポトーシス等への作用を検討する。

(2) RGS5 の発現誘導による、甲状腺癌細胞におけるヘッジホッグ系の情報伝達系の変化を測定し、甲状腺癌細胞における RGS5 の機能を解析する。

(3) 成人の甲状腺癌手術症例から得られた甲状腺癌組織において、遺伝子発現を測定し、その結果を既知の増殖、転移能マーカーの発現量および転移・浸潤などの臨床像との比較を行い、RGS5 発現量と甲状腺癌の悪性度との関係を検討する。

(4) 甲状腺癌の予後と関連する遺伝子の同定後、成人において甲状腺結節に対する細胞診を行う際に、細胞診検体作成後、針内に残存している細胞を回収し、同定した遺伝子発現量を定量する検査技術の開発のための基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

RGS5 遺伝子発現アデノウイルスベクターを作製し、TTF-1 遺伝子発現を欠損しているヒト甲状腺癌培養細胞 BHP18-21v 細胞に RGS5 遺伝子導入を行い、癌細胞の増殖抑制効果、細胞死誘導効果が認められるかどうか検討する計画であった。RGS5 発現アデノウイルスベクターの構築が困難であったため、甲状腺癌細胞への TTF-1 遺伝子導入とともに、RGS5 遺伝子に対する siRNA を導入し、TTF-1 遺伝子発現下での RGS5 遺伝子発現を抑制することにより RGS5 遺伝子発現の効果を検証した。ウェスタンブロット法にて RGS5 蛋白の発現を調べた。

(1) アポトーシス・ネクローシスの検出試薬を用い、細胞死の機序を検討した。さらに、細胞死、アポトーシス、ネクローシスを定量化し、RGS5 遺伝子に対する siRNA 導入の有無によりそれらと比較した。

(2) RGS5 遺伝子に対する siRNA 導入の有無による細胞死誘導の効果が明らかではなかったため、TTF-1 遺伝子導入により遺伝子発現量が著増した RGS4 についても同様の検証を加えた。

4. 研究成果

(1) BHP18-21v 細胞にアデノウイルスベクターを用いて TTF-1 遺伝子を導入した結果、癌細胞死が誘導され、その機序としてアポトーシスとネクローシスが認められた (図 1)。

(2) real-time PCR による解析において、TTF-1 導入後に RGS5 遺伝子発現はコントロールに対し 550 倍に増加した。一方、ウェスタンブロット法において RGS5 蛋白は複数の抗体にて検出されなかった。また、siRNA 導入により RGS5 遺伝子発現を抑制した細胞においてもコントロールに比し細胞生存率に統計学的有意差を認めなかった。従って、甲状腺癌における RGS5 の機能解析を進めることは断念した。

(3) RGS4 遺伝子は、real-time PCR において TTF-1 導入後の発現量はコントロールに対し 130 倍

に増加した。RGS4 蛋白もウェスタンブロット法により TTF-1 導入後に発現増加を認め、その発現量は RGS4-siRNA により約 30%に抑制された。

(4) RGS4-siRNA 導入細胞においては細胞生存率が 116~121%へ有意に増加した。また、アポトーシスは 68~79%、ネクローシスは 71~77%に抑制された (図 2)。

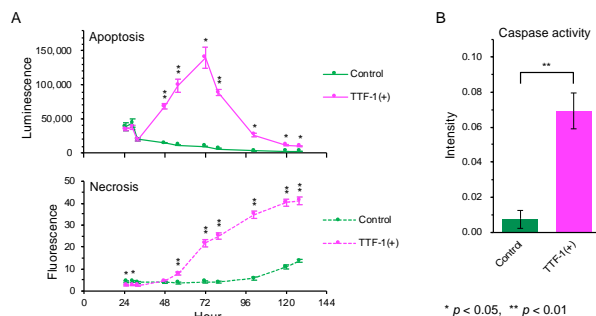


図1

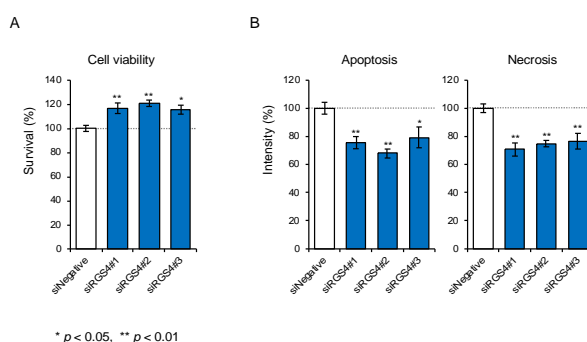


図2

これらの結果から、RGS4 は TTF-1 導入後のアポトーシスおよびネクローシスを介した細胞死誘導に関与することが示された。しかし、細胞死における RGS4 の影響は部分的な効果に留まった。当初の計画では TTF-1 導入により発現が著増する遺伝子が細胞死誘導に関与していると予想し、甲状腺癌のリスク評価に応用できる可能性を考えたが、RGS4 遺伝子単独で評価することは困難と考えられる。

しかしながら、本研究の成果として、悪性度が高く治療抵抗性である脱分化甲状腺癌に TTF-1 を再発現させることができれば癌細胞死を誘導することにより甲状腺癌の治療に繋がる可能性が示唆された。また、RGS4 は TTF-1 導入による甲状腺癌細胞死誘導に関与することが明らかとなったが、乳癌や膀胱癌における RGS4 の癌抑制効果も報告されていることから、癌細胞増殖と RGS4 の関連について今後さらに研究する意義が示された。

< 引用文献 >

Huang G, Song H, et al. The relationship between RGS5 expression and cancer differentiation and metastasis in non-small cell lung cancer, *J Surg Oncol*, 105(4), 2012, 420-424

Xie Y, Wolff DW, et al. Breast cancer migration and invasion depend on proteasome degradation of regulator of G-protein signaling 4, *Cancer Res*, 69(14), 2009, 5743-5751

Park HJ, Kim SH, et al. Growth inhibition of human breast carcinoma cells by overexpression of regulator of G-protein signaling 4. *Oncol Lett*, 13(6), 2017, 4357-4363

Lee EK, Ye Y, et al. Genetic variations in regulator of G-protein signaling (RGS) confer risk of bladder cancer. *Cancer*, 119(9), 2013, 1643-1651

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤祐子
2. 発表標題 TTF-1非発現甲状腺癌細胞の細胞死誘導におけるARG2遺伝子の役割
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019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
研究協力者	志村 浩己 (Shimura Hiroki)		
研究協力者	鈴木 英明 (Suzuki Hideaki)		
研究協力者	滝 克己 (Taki Katsumi)		
研究協力者	古屋 文彦 (Furuya Fumihiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------