

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16516

研究課題名（和文）分泌型タンパク質Tsukushiの臨床応用を目指した研究

研究課題名（英文）Research for the clinical application of the secreted protein Tsukushi

研究代表者

山田 竜也（Yamada, Tatsuya）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：80879841

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：TSKの予後関連マーカーとしての応用を期待し研究を行った。3年間の研究で免疫染色を行いTSKの肺癌組織中の発現レベルと確認と肺癌患者の血清中のTSKの濃度測定をELISA法を用い測定し予後との関係を明らかにすることを目的とした実験を計画した。しかしながら免疫染色とELISAを用いた研究では予後との明らかな関連性を見出すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TsukushiはSmall Leucine-Rich Proteoglycanに属する細胞外マトリックス蛋白質の一つであり、様々なpathwayに関与することは明らかである。残念ながら予後関連マーカーとしての役割は現時点では見出すことはできなかった。しかしながら肺癌に対し何らかの形で関与していることは以前の結果よりも明らかであり、研究を継続する必要があると考える。

研究成果の概要（英文）：In a three-year study, we aimed to verify the expression level of TSK in lung cancer tissues through immunostaining and to quantify the concentration of TSK in the serum of lung cancer patients using ELISA, with the goal of elucidating the association between TSK and prognosis. However, the study utilizing immunostaining and ELISA did not reveal a clear relationship with prognosis.

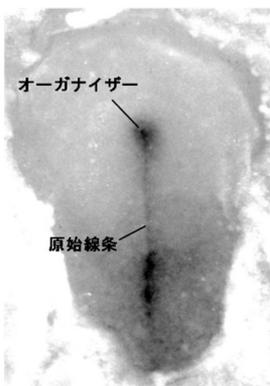
研究分野：呼吸器外科

キーワード：Tsukushi 肺癌 SLRP

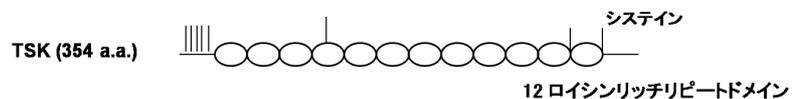
## 1. 研究開始当初の背景

**Tsukushi (TSK)** は熊本大学神経分化学教室 太田訓正 (現九州大学幹細胞生物学教授) らによってシグナルシーケンスストラップ法を用いてニワトリレンズ cDNA ライブラリーより発見された 354 個のアミノ酸からなる蛋白質である。ニワトリ初期胚における発現パターンが土筆に似ていることから Tsukushi と名づけられた【図 1】。leucine rich repeat を有する特徴から Small Leucine-Rich Proteoglycan (SLRP) の subclass IV に分類されている【図 2】。TSK は BMP4 と関連し、初期の形づくりに重要な役割を果たしている (Ohta K et al., Dev. Cell 2004)、また Wnt 阻害因子として網膜幹細胞を制御することも知られている (Ohta K et al., PNAS 2011)。このように様々な pathway に関与することは知られていたが、これまで癌に関する報告はほとんど存在しなかった。申請者らはヒト肺腺癌細胞株においてプラスミドベクターを用いた TSK 蛋白の過剰発現株と crispr cas9 システムを利用した TSK の knock out 株を作成し、TSK が肺癌の遊走と増殖に関与していることを明らかにした。

【図 1】



【図 2】



ヒト肺癌細胞株 A549 は TSK を強発現していることが知られている。A549 をヌードマウスに皮下移植したところ、マウスの血清中に TSK 蛋白の強い発現を認めた。分泌蛋白質であることから血清における TSK 濃度を ELISA 法にて測定することが可能である。肺癌の予後と血清 TSK 濃度が関連を認めれば、簡便な予後予測マーカーとしての期待が持てると我々は考えた。

## 2. 研究の目的

申請者らはこれまでの研究でヒト肺癌細胞株において TSK は増殖、浸潤に関与することを明らかにした。実際の臨床検体を用い TSK の発現レベルと予後の関係を明らかにすること、さらに血清 TSK 蛋白が予後関連マーカーとして機能しないかの可能性を模索することが目的である。

## 3. 研究の方法

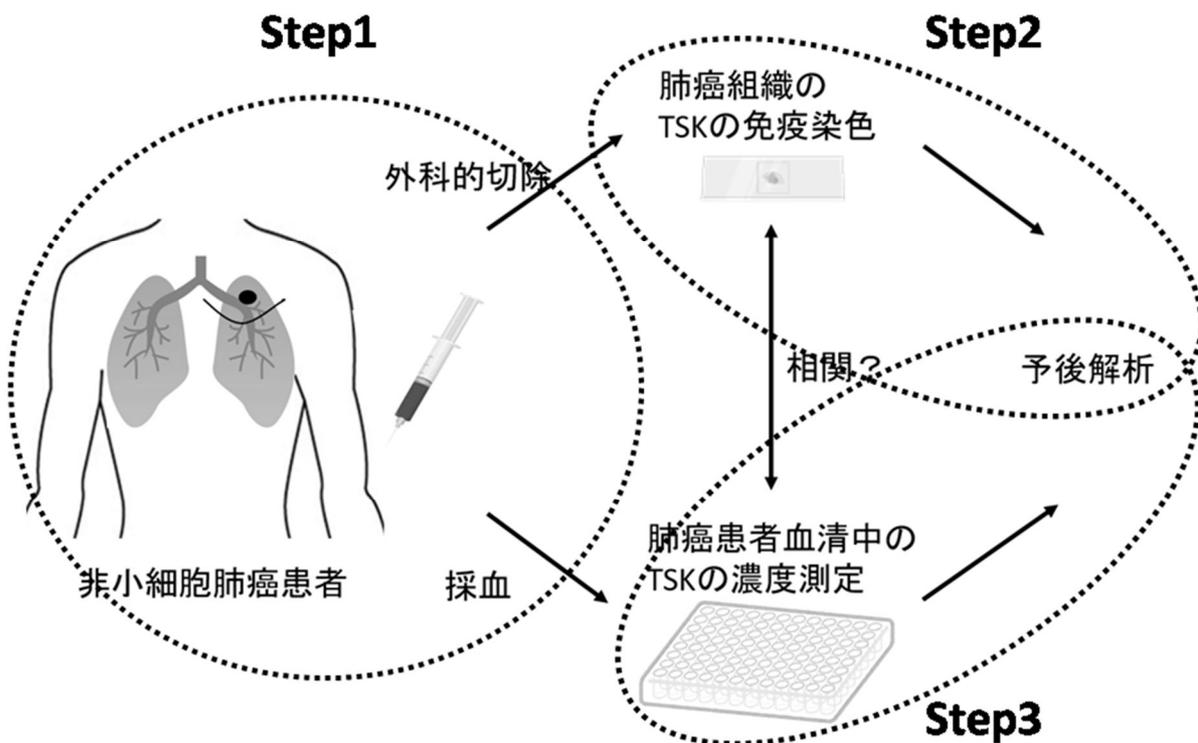
これまでは TSK の基礎研究を中心とし肺癌における TSK の役割を明らかにしてきた。今後は臨床応用へ展開するために、1. TSK の肺癌組織での発現レベルと予後の関わりを明らかにすること、2. 血清中の TSK 濃度と予後の関わりから予後マーカーとしての可能性を探ることを目的とした実験を予定した。

臨床検体はすでになんかのストックがあり、下記の実験に使用することとした。

1. 肺癌組織の TSK の免疫染色を行う。Novus 社のラビットポリクローナル抗体を用い免疫染色を行う。当院にすでにあるデータベースと合わせ、肺癌組織における TSK の発現レベルと予後の関係を明らかにする。

2. ELIZA 法を用い肺癌患者血清の TSK 濃度を測定する。先ほどと同様にデータベースと合わせることで TSK 濃度と予後の関係が明らかにする。

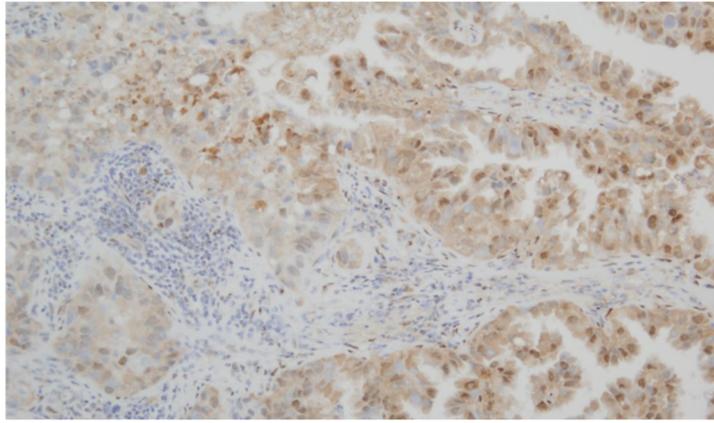
研究の流れ



#### 4. 研究成果

・ 免疫染色を行い TSK の組織中の発現レベルと確認した。1 年間の予定としていたが、当初の予定よりも研究に使用できる時間に制限があり研究はやや遅れた状態で進行した為 2 年を要した。また、以前行った際の免疫染色の条件ではうまくいかなかったことから、再度免疫染色の条件を検討する必要がある (ロット番号が変わったことで以前の条件ではうまくいかなかったのだと思われる)。症例により TSK の染色にはかなりのばらつきがあった。基本的には腫瘍細胞が染色されるが間質に強く染色される症例もあったことは新たな発見であった。しかしながら、データベースと照らし合わせてみたが免疫染色と予後との間に明らかな関連を見出すことはできなかった。

・ キットを用い血清中の TSK の濃度測定を ELIZA 法によって測定した。症例によってかなりのばらつきがあることはわかった。ELIZA 法を用いた研究でも予後との明らかな関連性を見出すことは残念ながらできなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------