

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19056

研究課題名(和文) 内分泌顆粒形成にPROX1遺伝子が果たす役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of PROX1 gene in endocrine granule formation

研究代表者

石井 順 (Ishii, Jun)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80749599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、内分泌顆粒と呼ばれる細胞内小器官の形成が、PROX1遺伝子により制御される可能性を検討した。内分泌顆粒を有する細胞・組織の多くは、PROX1を高度に発現していた。内分泌顆粒を有する細胞株のPROX1発現を抑制(ノックダウン)すると、内分泌顆粒の数と共に、内分泌顆粒を構成する遺伝子群の発現が減少した。反対に、内分泌顆粒を持たない細胞株にPROX1遺伝子を導入すると、内分泌顆粒構成遺伝子群の発現が亢進し、これはPROX1が遺伝子の転写制御領域に直接作用した結果と考えられた。本研究により、内分泌顆粒の形成を正に制御する、内分泌細胞に特異的な転写制御因子が初めて明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated hypotheses that the formation of intracellular organelle called endocrine granule is controlled by PROX1 gene. Most cells and tissues having endocrine granules expressed high levels of PROX1. Suppression of PROX1 expression in cell lines with endocrine granules reduced the number of endocrine granules, as well as the expression of several genes constituting endocrine granule. Conversely, the PROX1 gene is introduced into a cell line not having endocrine granules, the expression of endocrine granule constituent gene group is enhanced; it was thought that which is caused by directly acting of PROX1 on the transcription regulatory region of the genes. This study revealed for the first time endocrine cell-specific transcriptional regulator that positively control the formation of endocrine granules.

研究分野：実験病理学

キーワード：PROX1 内分泌顆粒 内分泌腫瘍 神経内分泌形質 甲状腺癌 肺癌

1. 研究開始当初の背景

内分泌顆粒はホルモンをはじめとした分泌タンパクの貯蔵・分泌に機能する細胞内小器官であり、その存在は内分泌/神経内分泌系の細胞に特有であるため、内分泌系への分化を示す腫瘍の診断指標ともされる。内分泌顆粒は chromogranin や secretogranin といった様々なタンパク質が組み合わさることで構成されるが、構成タンパクの発現を誘導する内分泌系細胞に特異的な転写因子はこれまで明らかにされていなかった。

我々は遺伝子発現データベース解析から、転写因子をコードする *PROX1* 遺伝子が内分泌系の腫瘍細胞で高度に発現すること、また chromogranin をはじめとした内分泌顆粒構成遺伝子と共発現する傾向を見出した。*PROX1* が種々の内分泌顆粒構成遺伝子の発現制御に関わる形質特異的なマスター遺伝子である可能性を考え検証した。

2. 研究の目的

PROX1 遺伝子が内分泌顆粒形成に与える影響の解明を本研究の第一の目的とした。そのためにまず、内分泌系組織における *PROX1* の発現特異性を確認した。その後、内分泌系および非内分泌系の培養細胞を用い、*PROX1* 発現を変化させた際の内分泌顆粒数の変化、並びに内分泌顆粒構成遺伝子の発現変化を解析した。

PROX1 遺伝子の発現と内分泌顆粒形成の関連性が明らかにされた後、*PROX1* が癌細胞株のホルモン産性能や増殖能、移動能といった生物活性に与える影響の解析へと展開した。

3. 研究の方法

研究材料として、主に甲状腺由来の細胞・組織を用いた。甲状腺組織は内分泌顆粒を持つ傍濾胞細胞と持たない濾胞細胞から構成されるため、*PROX1* 発現の影響と内分泌顆粒の存在を比較解析する上で有用と考えた。以

下に具体的な研究方法を記した。

(1) 正常甲状腺/甲状腺腫瘍組織における *PROX1* の発現を免疫組織化学法で解析した。

(2) 内分泌顆粒を持ち、*PROX1* 発現の高い甲状腺髄様癌由来の細胞株における *PROX1* 発現を shRNA 法でノックダウンした。また内分泌顆粒を持たず、*PROX1* 発現の低い甲状腺乳頭癌、未分化癌由来の細胞株に *PROX1* 遺伝子を導入した。その後、内分泌顆粒に生じた変化を超微形態学的に解析し、内分泌顆粒の構成遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した。

(3) 転写因子 *PROX1* が内分泌顆粒構成遺伝子の転写に与える影響について、*PROX1* 遺伝子導入株を用いてプロモーターアッセイおよび ChIP-PCR 法で解析した。

(4) *PROX1* がホルモン産生に与える影響を解析するため、*PROX1* ノックダウン甲状腺髄様癌株のカルシトニン産生能を電気化学発光免疫測定法で解析した。また *PROX1* 遺伝子導入株の増殖活性を MTS アッセイ、移動能を創傷治癒アッセイ等で評価した。

4. 研究成果

(1) 内分泌系の細胞は *PROX1* を高度に発現した

甲状腺組織における *PROX1* 発現は、内分泌顆粒を有する傍濾胞細胞および甲状腺髄様癌で陽性を示した。一方、内分泌顆粒を有さない濾胞細胞および乳頭癌、濾胞癌では陰性であった。*PROX1* 発現はまた、同じく内分泌顆粒を有する下垂体腺腫や肺小細胞癌組織で陽性を示した。内分泌顆粒を有する(神経)内分泌系の細胞は、*PROX1* を高度に発現することが明らかにされた。

(2) *PROX1* 発現は内分泌顆粒形成に影響を与えた

PROX1 発現をノックダウンした甲状腺髄様癌株 TT では、内分泌顆粒の数的減少がみられた(図1)。またこの際、内分泌顆粒構成遺

伝子である chromogranin や secretogranin、carboxypeptidase 発現等がいずれも減少した(図2)。反対に、内分泌顆粒を持たない甲状腺癌株に *PROX1* 遺伝子を導入すると、内分泌顆粒構成遺伝子の発現は亢進した。しかしながら、*PROX1* 発現が特に高度な遺伝子導入株をシングルセルクローニングにより分離しても、内分泌顆粒の存在を示唆する Chromogranin A 陽性シグナルは免疫組織化学的に確認されなかった。*PROX1* は種々の内分泌顆粒構成遺伝子発現を一様に誘導したことから、内分泌顆粒形成において重要な役割を担うが、*PROX1* のみの強制発現では、非神経内分泌系細胞に内分泌顆粒の形成を誘導するには十分ではない可能性が推察された。とはいえ、内分泌顆粒の形成を正に制御する形質特異的な転写制御因子が初めて明らかにされた。

図1. *PROX1*をノックダウンした甲状腺髄様癌細胞の超微形態学的解析

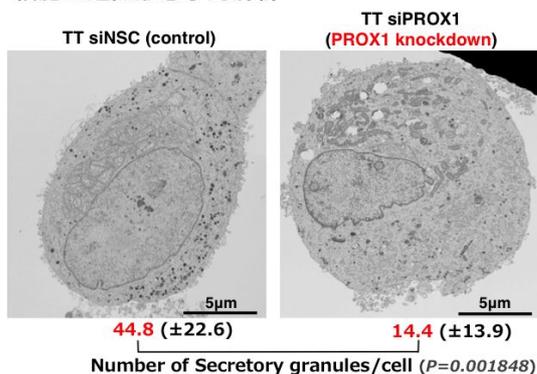
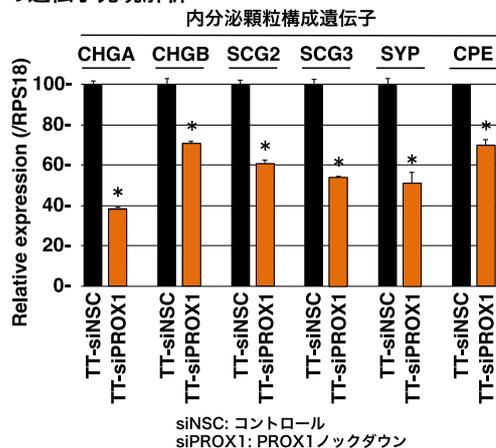


図2. *PROX1*をノックダウンした甲状腺髄様癌細胞の遺伝子発現解析



(3) *PROX1* は内分泌顆粒遺伝子の転写を誘導した

PROX1 を導入した甲状腺癌株では、内分泌顆粒遺伝子の代表格である *chromogranin A* (*CHGA*) 遺伝子のプロモーター活性が亢進していたが、*CHGA* 遺伝子の転写を活性化ないしは抑制する因子として知られていた CREB および REST の発現に著変はみられなかった。また、内分泌顆粒遺伝子である *CHGA*、*SCG2*、*SYP* 遺伝子近傍の推定上の *PROX1* 結合配列に *PROX1* が結合し得ることが ChIP-PCR 法から示された。こうした結果から、*PROX1* は既知の転写因子を介さない新しい機序で、内分泌顆粒遺伝子を直接的に誘導することが示唆された。

(4) *PROX1* は細胞の移動能に影響を与えた

PROX1 をノックダウンした甲状腺髄様癌株 TT は、培養上清中へのカルシトニン分泌量が減少していた。しかしカルシトニン遺伝子自体の発現は減少していなかったことから、内分泌顆粒の形成抑制が原因となって分泌量が減少したと推測された。さらに、*PROX1* を導入した甲状腺乳頭癌株 KTC1 および肺大細胞癌株 TKB5 では、細胞の増殖活性に著変はみられなかった。以上から、*PROX1* がホルモン遺伝子自体の発現や、細胞増殖に与える直接的な影響は少ないと考えられた。

PROX1 を導入した甲状腺乳頭癌株 KTC1 は、創傷治癒アッセイでの細胞移動速度が亢進しており、また上皮間葉転換の誘導遺伝子として知られる *SNAI1* および *SNAI2* 発現が亢進していた。反対に、*PROX1* をノックダウンした肺小細胞癌株 TKB15 では *SNAI1* および *SNAI2* 発現が減少していた。*PROX1* 発現は肝癌細胞や腎癌細胞の移動能・転移能に亢進させることが先行研究より報告されていたが (Liu Y. Hepatology. 2013; Lv T. PLoSOne. 2014) 甲状腺髄様癌や肺小細胞癌といった特に転移能の高い他の癌腫においても、その

浸潤・転移能に影響を与えている可能性が考えられ、治療標的として有用な可能性が考えられた。

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 1 件)

Ishii J, Yazawa T, Chiba T, Shishido-Hara Y, Arimasu Y, Sato H, Kamma H. PROX1 promotes secretory granule formation in medullary thyroid cancer cells. *Endocrinology*. 157(3):1289-1298, 2016.

[学会発表](計 2 件)

石井 順、矢澤 卓也、千葉 知宏、有益 優、菅間 博. PROX1 は甲状腺髄様癌の内分泌顆粒形成に關与する. 第 19 回 日本内分泌病理学会学術総会. 佐賀. 2015 年 10 月 24 日.

石井 順、小島 薫子、千葉 知宏、住石 歩、有益 優、穴戸-原 由紀子、佐藤 華子、矢澤 卓也、菅間 博. 甲状腺髄様癌の内分泌顆粒形成における PROX1 の役割について. 第 104 回 日本病理学会総会. 名古屋. 2015 年 4 月 30 日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.dokkyomed.ac.jp/dep-m/pathology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 順 (Ishii, Jun)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80749599