

令和元年6月12日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08648

研究課題名(和文) 甲状腺がん微小環境における細胞外アデノシンの腫瘍促進作用と腫瘍免疫回避機序の研究

研究課題名(英文) Tumor promotion and tumor-immunity evasion through extracellular adenosine in the thyroid cancer microenvironment

研究代表者

近藤 哲夫 (KONDO, Tetsuo)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：30334858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外アデノシンは細胞膜に存在するENTP1/CD39及びNT5E/CD73の脱リン酸化作用によってアデノシン三リン酸(ATP)、アデノシン二リン酸(ADP)、アデノシン一リン酸(AMP)から変換され、アデノシン受容体シグナル伝達経路によって細胞機能に關与する。甲状腺がん細胞のNT5E/CD73によって産生される細胞外アデノシンは、同じくがん細胞に高発現するアデノシンA1受容体を介してがん細胞の増殖能、浸潤能を亢進し、薬剤によるシグナル阻害で抑制された。ATPをAMPに変換するENTP1/CD39の発現はがん細胞ではなく、腫瘍内に浸潤するマクロファージ、形質細胞に発現することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により甲状腺癌では炎症細胞に発現するENTP1/CD39及び甲状腺癌細胞に発現するNT5E/CD73によって細胞外アデノシンの産生を促進する微小環境を形成していることがわかった。細胞外アデノシンはアデノシンA1受容体を介してがん細胞の増殖、浸潤を促進しており、細胞外アデノシン-アデノシン受容体シグナルを標的とした薬剤、抗体医薬品の開発は甲状腺癌の有用な新規治療法となる可能性がある。また細胞外アデノシンは細胞障害性T細胞、NK細胞に対する抑制作用が知られている。本研究の結果から甲状腺がん微小環境で産生される細胞外アデノシンが甲状腺癌に対する腫瘍免疫を抑制的に制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Extracellular adenosine is converted from adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP) through dephosphorylation by ENTP1/CD39 and NT5E/CD73. In this study, we revealed extracellular adenosine, produced by NT5E of thyroid cancer cells, activates cell growth and cell invasion of thyroid cancer through adenosine A1 receptor (ADORA1) expressed in thyroid cancer cell membrane. Conversely, chemical inhibition of extracellular adenosine-ADORA1 signal pathway showed suppression of growth and invasiveness of thyroid cancer cells. Unexpectedly, we found that ENTP/CD39 is expressed in macrophages and plasmacytes but not in thyroid cancers cell.

研究分野：人体病理学

キーワード：甲状腺癌 細胞外アデノシン 腫瘍免疫回避

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌は内分泌臓器の中で最も高頻度に発生する悪性腫瘍であるが、予後良好な微小型乳頭癌から極めて侵襲性の高い未分化癌にいたるまで腫瘍の分化と悪性度は広範囲にわたる。甲状腺癌とプログレッションの過程には段階的な遺伝子異常とエピジェネティクス異常が関与している (Kondo T *et al.* *Nat Rev Cancer* 2006, Kondo T *et al.* *Cancer Res* 2007, Kondo T *et al.* *Clin Cancer Res* 2007)。RET 遺伝子再構成や BRAF 変異は甲状腺癌の初期イベントと考えられ (Kondo *et al.* *Hum Pathol* 2007)、TP53 変異や CTNBI 変異は高分化癌から未分化癌に至る後期イベントと推定されている。また甲状腺ホルモン産生能の脱分化過程には DNA メチル化、ヒストン修飾による様々な甲状腺機能分子の発現異常が生じていることもわかってきた (Kondo T *et al.* *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008, Kondo T *et al.* *Lab Invest* 2009)。発癌とプログレッションの分子機構の解明が進むなかで、甲状腺癌の浸潤や転移、腫瘍-免疫細胞相互作用については解明が遅れている。甲状腺未分化癌は高度の浸潤性と遠隔転移のために手術療法、化学療法、放射線療法の効果が乏しくほぼ致死的なため、有効な治療法の早期確立が必須の状況であるが、新規治療法開発の分子基盤として重要と推測しているのが甲状腺がん微小環境における細胞外アデノシンによる甲状腺癌細胞の増殖、浸潤の制御と腫瘍免疫回避である。

アデノシンはプリン代謝物の1つである。細胞内アデノシンはATPを介して細胞内エネルギー代謝に関与し、細胞外アデノシンはアデノシン受容体に結合し多様な細胞機能を制御している。細胞外アデノシンは ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (ENTPI/CD39) と ecto-5'-nucleosidase (NT5E/CD73) による ATP/ADP/AMP の脱リン酸化により産生される。アデノシン受容体は7回膜貫通型細胞膜受容体で A1 (ADORA1)、A2a (ADORA2A)、A2b (ADORA2B)、A3 (ADORA3) の4つのサブタイプが存在する。アデノシン受容体の各サブタイプは組織、細胞によってその発現分布が異なり、中枢神経、心臓、血管、気管支において多様な生理的機能を司っている。近年、細胞外アデノシン-アデノシン受容体シグナル伝達に抗炎症作用や移植片に対する免疫抑制機構が存在することが報告された。また我々はヒト大腸癌においてアデノシン受容体が高発現していること、低酸素刺激によりアデノシン受容体の発現が増加すること、アデノシン受容体の阻害によって腫瘍増殖の抑制が起こることを報告した (Ma DF, Kondo T *et al.* *Hum Pathol* 2010)。さらにヒト甲状腺乳頭癌では腫瘍の細胞表面に NT5E/CD73 の蛋白発現と酵素活性の増加を確認している (Kondo T *et al.* *Histopathology* 2006)。以上の知見を基に CD39/CD73 による細胞外アデノシンの産生、細胞外アデノシン-アデノシン受容体シグナルが腫瘍増殖に関与し、さらに細胞外アデノシンが T 細胞、NK 細胞、腫瘍関連マクロファージによる腫瘍免疫を抑制していると推測した。

2. 研究の目的

細胞外アデノシンは細胞膜に存在する ENTPI/CD39 及び NT5E/CD73 の脱リン酸化作用によってアデノシン三リン酸 (ATP)、アデノシン二リン酸 (ADP)、アデノシン一リン酸 (AMP) から産生され、アデノシン受容体を介したシグナル伝達経路によって多様な細胞機能に関与している。我々はこれまでに甲状腺癌細胞において NT5E/CD73 の蛋白発現と酵素活性の増加があることを見出し、さらにアデノシン A1 受容体 (ADORA1) の高発現を確認した。本研究計画ではこれまでの基礎データを展開し、甲状腺がん微小環境を新規治療法に展開するトランスレーショナルリサーチとして、アデノシン受容体シグナル経路の機能的意義、細胞外アデノシンによる腫瘍-免疫細胞相互作用、細胞外アデノシン関連分子の発現制御機構を病理学の側面から解明することを目指す。

3. 研究の方法

研究では甲状腺癌の増殖・浸潤、抗腫瘍免疫に関わると推定される細胞外アデノシン及びアデノシン受容体シグナルに焦点を当て、相互に関連する三つの課題についての解明を試みる。第一は細胞外アデノシンの産生に関わる *ENTPI/CD39* 及び *NT5E/CD73* の発現制御メカニズム。第二は甲状腺癌細胞におけるアデノシン受容体ファミリーの発現プロファイルと細胞外アデノシン-アデノシン受容体シグナルの機能的役割の解明。第三は細胞外アデノシンを介した腫瘍-免疫細胞相互作用による腫瘍免疫回避の検証である。

1) *ENTPI/CD39* 及び *NT5E/CD73* の発現制御: CD39 と CD73 は ATP/ADP/AMP を脱リン酸化し細胞外アデノシンを産生する。予備実験において乳頭癌、未分化癌に CD73 の高発現、腫瘍内マクロファージに CD39 の高発現があることは確認した。また乳頭癌における CD73 の ecto-5'-nucleosidase 活性の増加は酵素組織化学 (Wachstein-Meisel 変法) により証明し (図 1)、報告している (Kondo T et al. Histopathology 2006)。CD39 と CD73 の発現量と分布は腫瘍組織中の細胞外アデノシン濃度に関与すると考えられることから、本研究では様々な甲状腺腫瘍組織、ヒト甲状腺培養細胞株における CD39 と CD73 の発現を解析し、発癌、プログレッションへの関わり、腫瘍組織型における発現変化について検討を行う。また CD39、CD73 の発現制御に対する MAPK 経路、PI3K/AKT/mTOR 経路、低酸素刺激/HIF-1 の関与について分析する。

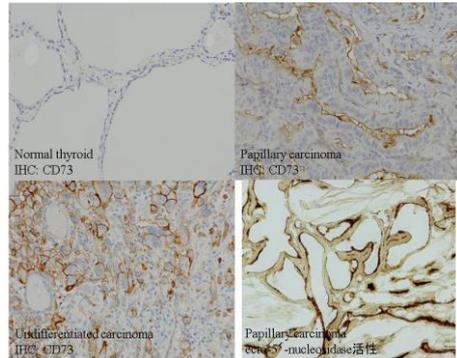


図 1: T5E/CD73 の蛋白局在と酵素活性

2) アデノシン受容体シグナルの機能的役割: 甲状腺乳頭癌、甲状腺癌培養細胞株においてアデノシン受容体 A1 (ADORA1) の高発現を RT-PCR、Western blot、免疫組織化学で確認しており

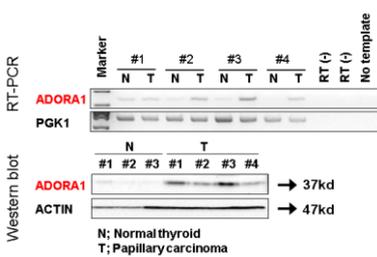


図 2: アデノシン受容体の発現

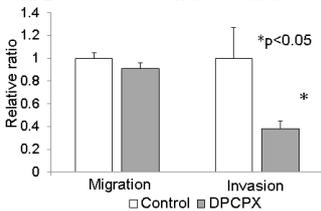


図 3: Invasion アッセイ

(図 2)、本研究ではサブタイプも含めたアデノシン受容体ファミリーの発現プロファイルを調べる。細胞外アデノシン-アデノシン受容体シグナルの機能的役割については ADORA1 の選択的 antagonist (DPCPX) の投与により甲状腺癌細胞の浸潤が有意に抑制される結果を得ている (invasion アッセイ、図 3)。我々はさらに siRNA による遺伝子ノックダウン、Tet on/off システムによる遺伝子導入、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術を用いた gain-/loss-of-function のアプローチから ADORA1 の腫瘍増殖、アポトーシス、浸潤能、上皮間葉転換への作用について分析を行う。研究計画が予測通りに進んだ場合には cDNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現スクリーニングも行いアデノシン受容体シグナルに誘導される

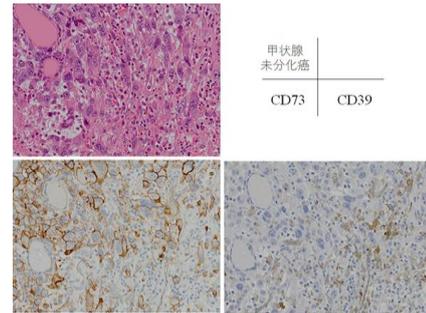
標的遺伝子の同定を行う。

3) 腫瘍-免疫細胞相互作用による腫瘍免疫回避: 我々は甲状腺癌細胞が産生する細胞外アデノシンによって腫瘍免疫が局所で抑制されるという仮説を立てている。CD39 や CD73 に対する酵素阻害剤、siRNA ノックダウンを行ない培養液中の細胞外アデノシン濃度を測定することで甲状腺癌細胞が CD39/CD73 を介して直接的に細胞外アデノシン産生することを証明する。甲状腺癌細胞と免疫細胞との共培養、移植腫瘍マウスモデルによって、細胞外アデノシンが腫瘍組織中の T 細胞、NK 細胞、腫瘍関連マクロファージに対して腫瘍免疫抑制的に作用することを明

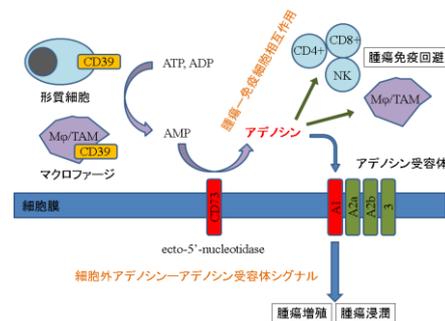
らかにする。

4. 研究成果

甲状腺がん細胞の NT5E/CD73 によって産生される細胞外アデノシンは、同じくがん細胞に高発現するアデノシン A1 受容体を介してがん細胞の増殖能、浸潤能を亢進し、薬剤によるシグナル阻害で抑制された。ATP を AMP に変換する ENTP1/CD39 の発現はがん細胞ではなく、腫瘍内に浸潤するマクロファージ、形質細胞に発現することが明らかとなった（右図）。



本研究により甲状腺癌では炎症細胞に発現する ENTP1/CD39 及び甲状腺癌細胞に発現する NT5E/CD73 によって細胞外アデノシンの産生を促進する微小環境を形成していることがわかった。細胞外アデノシンはアデノシン A1 受容体を介してがん細胞の増殖、浸潤を促進しており、細胞外アデノシン-アデノシン受容体シグナルを標的とした薬剤、抗体医薬院の開発は甲状腺癌の有用な新規治療法となる可能性がある。また細胞外アデノシンは細胞障害性 T 細胞、NK 細胞に対する抑制作用が知られている。本研究の結果から甲状腺がん微小環境で産生される細胞外アデノシンが甲状腺癌に対する腫瘍免疫を抑制的に制御している可能性が示唆された（右図）。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 14 件）

- (1) Vuong HG, Long NP, Anh NH, Nghi TD, Hieu MV, Hung LP, [Nakazawa T](#), [Katoh R](#), [Kondo T](#). Papillary thyroid carcinoma with tall cell features is as aggressive as tall cell variant: a meta-analysis. *Endocr Connect*. 2018;7(12):R286-R293. doi: 10.1111/ene.13826. 査読有
- (2) [Nakazawa T](#), [Kondo T](#), Vuong HG, Odate T, Kawai M, Tahara I, Kasai K, Inoue T, [Oishi N](#), Mochizuki K, Ito K, [Katoh R](#). High expression of CD10 in anaplastic thyroid carcinomas. *Histopathology*. 2018;73(3):492-499. doi: 10.1111/his.13657. 査読有
- (3) Akaishi J, [Kondo T](#), Sugino K, Ogimi Y, Masaki C, Hames KY, Yabuta T, Tomoda C, Suzuki A, Matsuzu K, Uruno T, Ohkuwa K, Kitagawa W, Nagahama M, [Katoh R](#), Ito K. Cribriform-Morular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: Clinical and Pathological Features of 30 Cases. *World J Surg*. 2018;42(11):3616-3623. doi: 10.1007/s00268-018-4644-4. 査読有
- (4) Vuong HG, Odate T, Ngo HTT, Pham TQ, Tran TTK, Mochizuki K, [Nakazawa T](#), [Katoh R](#), [Kondo T](#). Clinical significance of RET and RAS mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma: a meta-analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2018;25(6):633-641. doi: 10.1530/ERC-18-0056. 査読有
- (5) Vuong HG, Odate T, Duong UNP, Mochizuki K, [Nakazawa T](#), [Katoh R](#), [Kondo T](#). Prognostic importance of solid variant papillary thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2018;40(7):1588-1597. doi: 10.1002/hed.25123. 査読有
- (6) Vuong HG, Altibi AM, Duong UN, Ngo HT, Pham TQ, Tran HM, [Oishi N](#), Mochizuki K, [Nakazawa T](#), Hassell L, [Katoh R](#), [Kondo T](#). Role of molecular markers to predict distant metastasis in papillary thyroid carcinoma: Promising value of TERT promoter mutations and insignificant role of BRAF mutations-a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2017;39(10):1010428317713913. doi: 10.1177/1010428317713913. 査読有
- (7) Vuong HG, Duong UNP, Pham TQ, Tran HM, [Oishi N](#), Mochizuki K, [Nakazawa T](#), Hassell L, [Katoh R](#), [Kondo T](#). Clinicopathological Risk Factors for Distant Metastasis in Differentiated Thyroid Carcinoma: A Meta-analysis. *World J Surg*. 2018;42(4):1005-1017. doi: 10.1007/s00268-017-4206-1. 査読有
- (8) [Oishi N](#), [Kondo T](#), Ebina A, Sato Y, Akaishi J, Hino R, Yamamoto N, Mochizuki K, [Nakazawa T](#), Yokomichi H, Ito K, Ishikawa Y, [Katoh R](#). Molecular alterations of coexisting thyroid papillary carcinoma and anaplastic carcinoma: identification of TERT mutation as an independent risk factor for transformation. *Mod Pathol*. 2017;30(11):1527-1537. doi:

10. 1038/modpathol. 2017. 75. 査読有

(9) Vuong HG, Kondo T, Oishi N, Nakazawa T, Mochizuki K, Miyauchi A, Hirokawa M, Katoh R. Paediatric follicular thyroid carcinoma - indolent cancer with low prevalence of RAS mutations and absence of PAX8-PPARG fusion in a Japanese population. *Histopathology*. 2017;71(5):760-768. doi: 10.1111/his.13285. 査読有

(10) Vuong HG, Kondo T, Duong UNP, Pham TQ, Oishi N, Mochizuki K, Nakazawa T, Hassell L, Katoh R. Prognostic impact of vascular invasion in differentiated thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2017;177(2):207-216. 査読有

(11) Vuong HG, Kondo T, Pham TQ, Oishi N, Mochizuki K, Nakazawa T, Hassell L, Katoh R. Prognostic significance of diffuse sclerosing variant papillary thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2017;176(4):433-441. doi: 10.1530/EJE-17-0260. 査読有

(12) Oishi N, Kondo T, Nakazawa T, Mochizuki K, Inoue T, Kasai K, Tahara I, Yabuta T, Hirokawa M, Miyauchi A, Katoh R. Frequent BRAF (V600E) and Absence of TERT Promoter Mutations Characterize Sporadic Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas in Japan. *Endocr Pathol*. 2017;28(2):103-111. doi: 10.1007/s12022-017-9470-y. 査読有

(13) Vuong HG, Altibi AM, Abdelhamid AH, Ngoc PU, Quan VD, Tantawi MY, Elfil M, Vu TL, Elgebaly A, Oishi N, Nakazawa T, Hirayama K, Katoh R, Huy NT, Kondo T. The changing characteristics and molecular profiles of papillary thyroid carcinoma over time: a systematic review. *Oncotarget*. 2017;8(6):10637-10649. doi: 10.18632/oncotarget. 査読有

(14) Vuong HG, Kondo T, Oishi N, Nakazawa T, Mochizuki K, Inoue T, Tahara I, Kasai K, Hirokawa M, Tran TM, Katoh R. Genetic alterations of differentiated thyroid carcinoma in iodine-rich and iodine-deficient countries. *Cancer Med*. 2016;5(8):1883-9. doi: 10.1002/cam4.781. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

(1) Kondo T, Akaishi J, Nakazawa T, Ito K, Katoh R. Problems in thyroid pathology. Clinical impact of poorly differentiated component in thyroid carcinoma. The 19th International Congress of Cytology (ICC). 2016

[図書] (計 6 件)

(1) 近藤 哲夫. 癌診療指針のための病理診断プラクティス 内分泌疾患 (笹野公伸, 長沼廣編・中山書店). 第 3 章 甲状腺・副甲状腺の概要と鑑別疾患: 甲状腺悪性腫瘍, 低分化癌. 2018

(2) Livolsi, Kondo T et al. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th edition (Lloyd RV, Osamura RY, and Klöppel G and Rosai J eds • IARC press), 2 Tumours of the thyroid gland. Follicular thyroid carcinoma. 92-95. 2017

(3) El-Naggar AK, Kondo T et al. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th edition (Lloyd RV, Osamura RY, and Klöppel G and Rosai J eds • IARC press), 2 Tumours of the thyroid gland. Anaplastic thyroid carcinoma. 104-106. 2017

(4) Sobrinho-Simoes M, Cameselle-Teijeiro M, Kondo T. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th edition (Lloyd RV, Osamura RY, and Klöppel G and Rosai J eds • IARC press), 2 Tumours of the thyroid gland. Mucinous carcinoma. 121-121. 2017

(5) Nakazawa T, Kondo T. Endocrine lesions in the mammary gland (Ozgur Mete and Sylvia L. Asa eds • Cambridge University Press). 858-867. 2016

(6) 近藤 哲夫. 臨床頭頸部癌学, 第 1 版 (田原信, 林隆一, 秋元哲夫編・南江堂). 第 II 章 診断 2 病理診断, C 甲状腺癌. 第 II 章 診断 2 病理診断, C 甲状腺癌. 2016

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

(1) 研究者情報 (researchmap):

<https://researchmap.jp/read0109021>

(2) 山梨大学教員情報:

<http://nerdb-re.yamanashi.ac.jp/Profiles/318/0031760/profile.html>

(3) 山梨大学総合研究部 人体病理学講座:

https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pathol02/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中澤 匡男

ローマ字氏名：NAKAZAWA Tadao

所属研究機関名：山梨大学

部局名：総合研究部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10345704

研究分担者氏名：加藤 良平

ローマ字氏名：KATOH Ryohei

所属研究機関名：山梨大学

部局名：総合研究部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30152755

研究分担者氏名：大石 直輝

ローマ字氏名：OISHI Naoki

所属研究機関名：山梨大学

部局名：総合研究部

職名：助教

研究者番号（8桁）：10345704

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。