

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15662

研究課題名(和文)ポリオーマ属ウイルス感染が甲状腺がんの進展に与える影響の研究

研究課題名(英文)Mechanisms of Thyroid Cancer Development Affected by Polyoma Virus Infection

研究代表者

山口 高志(Yamaguchi, Takashi)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：60626563

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):甲状腺に発生する濾胞がんや分化度の低いがんは予後不良で、RASシグナルの変異を特徴とする。一方で甲状腺がんとポリオーマ属ウイルス感染の関係が指摘されてきた。代表者は、oncogenic KrasG12D遺伝子とポリオーマ属ウイルスの一種であるSV40に由来するlarge T抗原(TAg)遺伝子が臓器特異的に発現する遺伝子改変マウスを作製し、TAgが活性化したRasシグナルと協働的に働いて、細胞増殖を強く促すメカニズムを検討した。その結果、同マウス甲状腺における両遺伝子の発現が、分化度の低い甲状腺がんの発生をもたらすとの直接的なエビデンスの取得に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺に発生する濾胞がんや分化度の低いがんは予後不良で、RASシグナルの変異を特徴とする。一方で甲状腺がんは、ポリオーマ属ウイルス感染との関係が指摘されてきたが、研究の開始以前、ポリオーマ属ウイルスSV40感染が、甲状腺がんの発生に寄与するとの直接的なエビデンスはなかった。また、活性化したRASシグナルとSV40ウイルスのLarge T抗原(TAg)が協働的に働いて、甲状腺上皮細胞の増殖を促すなどの背景メカニズムは不明であった。本研究では、マウス甲状腺に実際にRasの変異とTAgの発現を再現し、両現象が分化度の低い甲状腺がんの発症と進展を促進する証拠を獲得できた点で学術的・社会的に意義がある。

研究成果の概要(英文): Poorly differentiated thyroid cancer is a disease with a poor prognosis and patients often have RAS-signaling abnormality. It has been suggested that polyoma virus infection might occur in the thyroid glands. The purpose of this study was to understand whether the RAS-signaling abnormality and polyoma virus infection work together in the development of thyroid cancer.

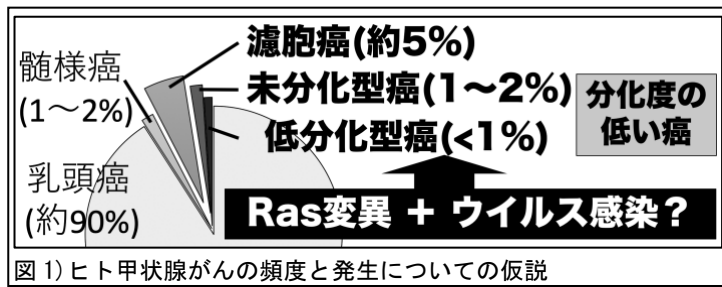
We constructed a genetically engineered mouse (GEM) model that expresses an oncogenic Kras mutation and SV40 tsA58, which is derived from a polyoma virus, large T antigen (TAg) in the thyroids of the GEM model. Forced activation of Ras-signaling and TAg expression resulted in poorly differentiated thyroid cancer in the GEM model. These results suggest that RAS-signaling abnormalities and polyoma virus infection might work together in the development of thyroid cancer.

研究分野: がん

キーワード: 甲状腺がん 疾患動物モデル

### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺がんは、低悪性度の乳頭がん・濾胞がん、高悪性度の低分化がん・未分化がんに分類できる(図1)。乳頭がん・濾胞がんには、RASカスケードの変異との相関が指摘されており、引き続いて生じるp53 遺伝子異常が、低分化がん・未分化がんへの進展に関連していると指摘されてきた(図2)。また、ポリオーマ属ウイルス感染が甲状腺に存在する関連性がある一方で、同感染が甲状腺がんの発生に関与するかどうかについての直接的な解析が不十分な状態であった。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「ポリオーマ属ウイルス感染が、甲状腺がんの進展(脱分化もしくは高悪性度形質の獲得)をプロモートする可能性について明らかにすること」である。ヒトでは、ポリオーマ属ウイルスの感染が知られている。また、ヒト甲状腺がんにはRAS 変異が見出されていることから、同遺伝子変異によってイニシエーションされた甲状腺がんが、ポリオーマ属



ウイルスに由来する large T antigen (TAg)によって進展するメカニズムが想定されるので、甲状腺特異的に oncogenic KrasG12D と TAg が発現する遺伝子改変マウスモデルを作成して解析し、甲状腺がんの発生と進展、悪性度獲得のプロセスを明らかにすることを目指した。

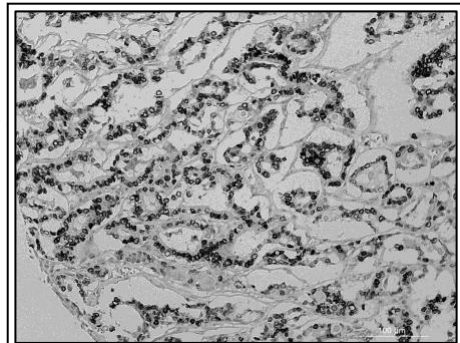
### 3. 研究の方法

- (1)ヒトの甲状腺がん組織として、組織アレイ標本を用い、抗 TAg 抗体を用いて免疫染色することで、ヒトの甲状腺がん症例におけるポリオーマ属ウイルス感染率の基本的な情報を獲得する。
- (2)Ras シグナルの活性化をもたらすための oncogenic KrasG12D 遺伝子と、ポリオーマ属ウイルス感染を再現するための(ポリオーマ属ウイルスの一種である)SV40 tsA58 株に由来する TAg を、甲状腺特異的に同時に発現させる遺伝子改変マウスを作製する。
- (3)上記(2)のマウスおよび TAg のみが甲状腺で発現するコントロールマウスより、それぞれ、甲状腺がん細胞株と不死化甲状腺濾胞上皮細胞株を樹立し、*in vitro* で病態の解析が可能となるような三次元(3D)培養モデルを作成する。

### 4. 研究成果

#### 甲状腺がん研究の状況

甲状腺に発生する分化度の低い甲状腺がんは予後不良であること、それらの多くに、RAS 遺伝子(および当該カスケード下流の BRAF)の変異が関与することが知られている。これらの甲状腺がんでは、RAS と p53 の機能異常によって増殖シグナルが活性化しているため、マルチキナーゼ阻害剤のレンバチニブ(VEGFR、FGFR 阻害)やソラフェニブ(VEGFR、PDGFR、RAF-MEK シグナル阻害)などの分子標的治療薬が使用されるが、その効果は限定的で、予後不良となる傾向は改善されていない。申請代表者は、膵臓がんモデルにおいて TAg が活性化した Ras シグナルと協働的に働き、細胞増殖を強く促すことを見出した(文献1)ことを契機に、SV40 ウイルス感染が指摘されてきた甲状腺がんの発生に着目した。すなわち、甲状腺がんの発生・進展メカニズムの一つとして、Ras シグナルの変異と SV40 を含むポリオーマ属ウイルス感染が協働的に働き、当該甲状腺がんの悪化をもたらしている可能性を本研究で解析した。



#### ヒトの甲状腺組織アレイ解析における TAg タンパク質の検出

ヒト甲状腺がん組織アレイ標本に対して、独自に開発した TAg を検出する抗体によって免疫組織化学解析を行なったところ、その一部に陽性となる症例を確認できた(図3)。この結果は、ヒトの甲状腺がんにおいても、一定程度のポリオーマ属

図3) ヒトの甲状腺がん組織で検出された TAg

ウイルス感染が成立している可能性を示唆するものであった。

### 変異型 Ras 遺伝子と TAg 遺伝子の同時発現による、分化度の低い甲状腺がんの発生

次に、甲状腺特異的に Ras シグナルの活性化と TAg が同時発現する遺伝子改変マウスの作製を試みた。Cre/loxP 遺伝子組換え依存的に TAg を発現する遺伝子改変マウス (A)、同じく Cre/loxP 遺伝子組み換え依存的に変異型 Ras 遺伝子としての oncogenic KrasG12D 遺伝子を発現するマウス (B)、さらに甲状腺特異的に Cre/loxP 遺伝子組換えを誘導することのできる甲状腺特異的 Cre 発現ドライバーマウス (C) の準備を整えた。そして、これらのマウス (A~C) を交配することでそれぞれの改変遺伝子座をすべて保有する遺伝子改変マウスを作成した。

当該マウスにおいて、甲状腺特異的に KrasG12D および TAg の発現を誘導させた後、数週間~1ヶ月程度で甲状腺を採取し、病理組織学的解析を行なった。その結果、一部の当該マウスにおいて、悪性度が高く、分化度の低いヒト甲状腺がんの病理学的組織象によく似た、甲状腺がんが発生していることが確認された (図 4)。この結果は、甲状腺濾胞上皮に Ras シグナルの変異とポリオーマ属ウイルス感染が成立すると、悪性度が高く、分化度の低い甲状腺がんが発生する可能性を示唆するものであった。

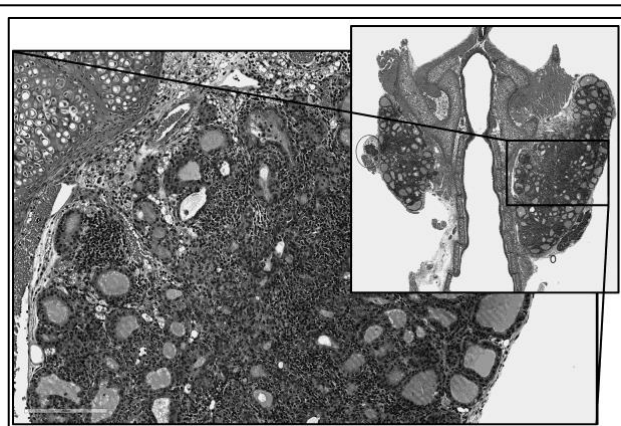


図 4) マウスの *KrasG12D* 陽性細胞に TAg を発現させたことよって発生した分化度の低い甲状腺がん

### 甲状腺由来細胞株の 3D 培養モデルの作成

当該研究代表者はこれまでに、膵がん細胞と不死化膵管上皮細胞を使用した 3D 培養の技術を確認し、シグナル活性化をとまなう tube forming growth による 3D 形態の変化について、RNA-seq 解析およびメカニズム解析を行った (文献 2)。この技術を当該甲状腺がん研究に応用した。具体的には、甲状腺がん研究材料として不足している、甲状腺がん細胞および比較対象としての正常濾胞上皮細胞の *in vitro* 3D 培養モデルの構築を試みた。

上記甲状腺がんマウスおよび TAg のみが甲状腺で発現するコントロールマウスの甲状腺より、それぞれ、組織を採取した。次に、当該組織をコラーゲナーゼ処理することで、構成細胞を分散させた。当該細胞を洗浄したのち、コラーゲンコート処理済み培養皿で培養し、継代と長期培養を行うことで、当該遺伝子改変マウスに由来する甲状腺がん細胞株および不死化甲状腺濾胞上皮細胞株の樹立に成功した。その後、当該細胞株をコラーゲン内で 3D 培養することで、甲状腺濾胞構造を模したと思われる立体構築物が形成される現象を確認することができた (図 5)。

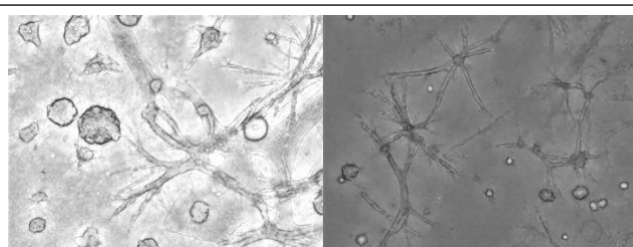


図 5) 本研究で樹立されたマウス甲状腺がん細胞株 (左) とマウス不死化甲状腺濾胞上皮細胞株 (右) の 3D 培養実験で作成に成功した *in vitro* 立体組織像

### 【結語】

■本研究において、当該研究代表者は以下の成果を得た。

(1) ヒトの組織標本において、ポリオーマ属ウイルス感染を示唆する TAg タンパク質の存在を免疫組織化学レベルで検出した。

(2) Ras シグナルの異常をもたらす KrasG12D 発現と、ポリオーマ属ウイルス感染を模した TAg の発現を同時に甲状腺で発現する遺伝子改変マウスを作成した。当該マウスでは、分化度の低い甲状腺がんが発生した。

(3) 上記の甲状腺発がんマウスおよび、TAg のみが甲状腺で発現するコントロールマウスから、それぞれ、甲状腺がん細胞株および不死化甲状腺濾胞上皮細胞株の樹立に成功した。また、当該細胞株を用いた 3D 培養による立体組織再構築手法を確立した。

■これらの成果をもとに、今後、以下の研究の実施を目指す。

①ヒト臨床検体における TAg タンパク質とゲノムの検出。

②予後不良となる甲状腺がんの治療標的分子の検索と治療法の開発。

**【文献】**

1) J Pathol. 2014 Oct;234(2):228-38. doi: 10.1002/path.4402. Epub 2014 Aug 4.  
A genetically engineered mouse model developing rapid progressive pancreatic ductal adenocarcinoma.

Yamaguchi T, Ikehara S, Nakanishi H, Ikehara Y.

2) Sci Rep. 2019 Aug 2;9(1):11247. doi: 10.1038/s41598-019-47101-y.  
TGF- $\beta$  signaling promotes tube-structure-forming growth in pancreatic duct adenocarcinoma.

Yamaguchi T, Ikehara S, Akimoto Y, Nakanishi H, Kume M, Yamamoto K, Ohara O, Ikehara Y.

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