

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16852

研究課題名(和文) microRNAを用いた甲状腺未分化癌における上皮間葉移行リスク診断の試み

研究課題名(英文) MicroRNA 200b promotes mesenchymal to epithelial transition in anaplastic thyroid carcinoma

研究代表者

玉川 俊次 (tamagawa, shunji)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40543781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺未分化癌細胞株を用いて上皮間葉移行関連因子とmicroRNA200familyとの関係について検討した。mir-200bを細胞株に導入することで、E-Cadherinの転写抑制因子であるZEB1の発現が抑制され、間葉系マーカーであるVimentinも抑制された。また、細胞の運動能も抑制された。これらは甲状腺未分化癌における他の機序によるmiR-200bによる上皮間葉移行の制御機構の存在を示唆すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では甲状腺未分化癌がもつ高転移能、高浸潤能についての新たな核酸治療の候補としてmicroRNA200bの可能性について検討した。
in vitroの実験ではあるが、甲状腺未分化癌細胞株にmicroRNA200bを再導入することで、甲状腺未分化癌がもつ転移能をコントロールすることができた。

研究成果の概要(英文)：The current study examines the role of miR-200b in mesenchymal to epithelial transition in ATC. Total RNA and miRNA isolation were performed from ATC cell lines, and ATC cell lines were transfected with miR-200b mimic. After miR-200b mimic transfection, expression levels of E-cadherin, vimentin and ZEB1 were confirmed. We evaluated miR-200b mimic and scrambled negative transfected cells for cell migration. In ATC cell lines, mesenchymal marker ZEB1 was significantly increased and epithelial marker E-cadherin was significantly decreased. Meanwhile, mesenchymal marker vimentin was significantly higher in one ATC cell line. MiR-200b mimic transfection significantly elevated vimentin and ZEB1 expression, but E-cadherin expression remained below the measurement sensitivity. Enforced miR-200b expression slowed down cell migration. The current study suggests that miR-200b regulates mesenchymal markers vimentin and ZEB1 in ATC and promotes mesenchymal to epithelial transition.

研究分野：頭頸部悪性腫瘍

キーワード：上皮間葉移行 microRNA 甲状腺未分化癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲状腺未分化癌は極めて進行が急速であり大部分は初診時に周囲組織へ浸潤、遠隔転移を認め根治切除不能であり極めて予後不良な疾患である。一方で甲状腺未分化癌が持つ転移-浸潤能について分子生物学的機序については未だ明らかとなっていない。

我々は頭頸部扁平上皮癌において microRNA200family が E-Cadherin に代表される細胞間接着因子の発現を制御し、上皮間葉移行に深く関連することを報告してきた。甲状腺未分化癌においては microRNA200family の果たす役割は明らかでないため、甲状腺未分化癌における microRNA200family の役割について検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、甲状腺未分化癌における浸潤能・転移能と上皮間葉移行との関係を明らかにし、microRNA200family を用いた上皮間葉移行の制御、核酸治療の候補としての可能性について in vitro で検討することである。

3. 研究の方法

本研究は in vitro での甲状腺未分化癌細胞株を持ちいた検討と in vivo での甲状腺未分化癌患者から得られた免疫組織染色標本を用いた検討を行った。研究の方法は以下の通りである。

【方法】

甲状腺未分化癌細胞株を用いた甲状腺未分化癌モデルの検討

まず、甲状腺未分化癌症例から得られた免疫組織染色標本と甲状腺未分化癌細胞株との上皮間葉移行関連因子の検討を行った。甲状腺未分化癌細胞株 (8505c, ASH-3, KMH-2) と甲状腺正常濾胞上皮細胞株 (NTHY-OR3-1) を用いて、E-Cadherin、Vimentin、ZEB1 の発現について検討した。

甲状腺未分化癌細胞株における microRNA200b 発現の検討

と同様にして甲状腺未分化癌細胞株と正常濾胞上皮細胞株の間での microRNA200b の発現レベルの差について比較検討した。

甲状腺未分化癌細胞株における microRNA200b の再導入

甲状腺未分化癌細胞株 (ASH-3, KMH-2) へ miR-200b mimic をトランスフェクションし、上皮間葉移行関連因子の発現変化を検討した。

甲状腺未分化癌細胞株への microRNA200b の再導入における細胞機能の変化

甲状腺未分化癌細胞株 (ASH-3, KMH-2) へ miR200b mimic をトランスフェクションし、細胞運動能の変化を検討した。

【結果】

甲状腺未分化癌細胞株を用いた甲状腺未分化癌モデルの検討

甲状腺未分化癌細胞株では、上皮系マーカーである E-Cadherin の発現は極めて低い。一方、E-Cadherin の転写抑制因子である ZEB1 は、発現亢進していた。

甲状腺未分化癌細胞株における microRNA200b 発現の検討

甲状腺未分化癌細胞株では甲状腺正常濾胞上皮細胞株と比較して microRNA-200b の発現は低レベルであった。

甲状腺未分化癌細胞株における microRNA200b の再導入

甲状腺未分化癌細胞株 (ASH-3, KMH-2) への microRNA-200b のトランスフェクションを行うことで、転写抑制因子である ZEB1 の発現は著明に低下するとともに、間葉系マーカーである Vimentin の発現も低下した。

甲状腺未分化癌細胞株への microRNA200b の再導入における細胞機能の変化

甲状腺未分化癌細胞株に miR-200b を再導入させることで細胞の運動能を抑制することができた。

4. 研究成果

様々な癌腫において、転移機能と microRNA-200b の関係が報告されている。microRNA-200b は ZEB1 遺伝子の 3' 領域に接着することで ZEB1 の発現を調節しており、ZEB1 の発現抑制を通して、上皮間葉移行を上皮系へと誘導する。

本検討においても mir-200b を細胞株に導入することで、ZEB1 の発現は抑制され、間葉系マーカーである Vimentin は抑制された。

甲状腺未分化癌組織における報告では未分化癌においては microRNA-200family の発現は極めて低く、上皮系マーカーである E-Cadherin の発現は低下していることが報告されている。本研究で行った甲状腺未分化癌組織の検討でも同様に甲状腺未分化癌では上皮系マーカーである E-cadherin の発現は低く、間葉系マーカーである ZEB1、Vimentin の発現は低発現であった。これらの結果から甲状腺未分化癌組織は間葉系の性質が強いことが示唆される。

また、甲状腺未分化癌細胞株への microRNA-200b のトランスフェクションにて間葉系マーカー (ZEB1、Vimentin) の発現低下が引き起こされたが、細胞接着因子である E-Cadherin の発現亢進は認めなかった。しかし、microRNA-200b のトランスフェクションは細胞運動機能の低下を引き起こした。

これらは甲状腺未分化癌における microRNA200b が ZEB1 の発現を介する機序ではなく、他の機序による細胞運動能の制御機構の存在を示唆すると考えられた。

しかし、本研究で示された甲状腺未分化癌組織、細胞株は間葉系マーカーが高発現しており、高転移能、高浸潤能と関連している可能性があることが示された。さらに、microRNA-200b は E-Cadherin の転写抑制因子である ZEB1 の発現調節を介して上皮間葉移行を間葉上皮以降へと調節していることが示された。

これらは microRNA-200b の発現調節を通して甲状腺未分化癌の転移、浸潤能を調節できる可能性を示唆しており microRNA200b の核酸治療候補としての役割を示す重要な結果と考えられた。最終的に本研究において得られた結果は国内外の学会発表と英語論文に研究結果をまとめ報告した。

MicroRNA-200b promotes mesenchymal-to-epithelial transition in anaplastic thyroid carcinoma. *Oncol Lett.*2020 Oct;20(4):3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamagawa Shunji, Enomoto Keisuke, Gunduz Esra, Gunduz Mehmet, Sato Fuyuki, Uchino Shinya, Muragaki Yasuteru, Hotomi Muneki	4. 巻 20
2. 論文標題 MicroRNA 200b promotes mesenchymal to epithelial transition in anaplastic thyroid carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 玉川俊次
2. 発表標題 The Relation between microRNA and EMT in Anaplastic thyroid carcinoma cell Line
3. 学会等名 3rd congress of asia pacific society of thyroid surgery（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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