

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790348

研究課題名（和文）

甲状腺癌とくに未分化癌におけるアデノシンレセプターの分子病理学的解析

研究課題名（英文）

Expression of adenosine receptor in thyroid carcinomas

研究代表者

中澤 匡男（NAKAZAWA TADAO）

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：10345704

研究成果の概要（和文）：

本研究では甲状腺癌におけるアデノシンレセプターの発現とその分子病理学的解析を行った。その結果、ヒト甲状腺癌組織では正常甲状腺組織、腺腫様甲状腺腫、良性腫瘍（濾胞腺腫）と比較して、アデノシンレセプターA1（ADRA1）の発現が増加していることが明らかとなった。更に培養細胞を用いた実験では ADRA1 の発現増加が甲状腺癌細胞の増殖能および浸潤能を増加させることが示された。この結果は将来的な ADRA1 をターゲットとした分子標的治療の可能性を示す第一歩と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Overexpression of adenosine receptors have recently been identified in several human cancers. The purpose of this study is to examine expression of adenosine receptor and its molecular analysis in thyroid tumors. Compared with normal thyroid tissues and benign tumors (follicular adenomas), expression of adenosine receptor 1 (ADRA1) was up-regulated in thyroid carcinomas. Furthermore, this observation increased tumor cell growth and invasion *in vitro*. These result may suggest the adenosinergic system as a potential pharmacological target in thyroid cancer therapeutics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：甲状腺癌、アデノシンレセプター、分子病理学的解析

### 1. 研究開始当初の背景

近年、癌細胞で特異的に認められる遺伝子の異常、蛋白の機能異常を分子レベルで解析し、それらの異常遺伝子、蛋白の機能を特異的に阻害する、分子標的治療が注目されている。近年、アデノシンレセプターはヒト腫瘍組織、腫瘍細胞の増殖、分化およびアポトーシスに関連し、その刺激により腫瘍細胞の増殖や血管増生を促進させるとの報告がある。アデノシンレセプターは4種類のサブタイプ(表1.参照)が存在しており、本研究では甲状腺腫瘍におけるそれぞれの発現とその病理学的意義に注目した。

(表1. アデノシンレセプターの亜型とそれらの特徴)

Subtype (gene symbol)	A1 (ADORA1)	A2A (ADRA2A)	A2B (ADRA2B)	A3 (ADRA3)
Receptor type	Seven-transmembrane	Seven-transmembrane	Seven-transmembrane	Seven-transmembrane
Molecular weight	37kd	45kd	36kd	38kd
Locus	1q32.1	22q11.23	17p11.2	1p13.3
Signaling pathway	cAMP ↓ PLC ↑ PI3K ↑	cAMP ↑ MAPK ↓	cAMP ↓ PLC ↑ PI3K ↑ MAPK ↓	cAMP ↓ PLC ↑ PI3K ↑
Distribution	Heart, Brain	Heart, Brain, Spleen	Heart, Gastrointestine	Brain, Testis, Adrenal gland

### 2. 研究の目的

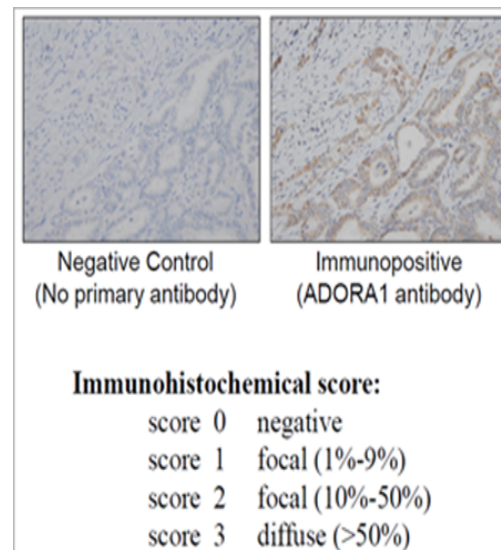
当初、我々は将来的な分子標的治療への発展を目的とした、甲状腺癌、とくに未分化癌におけるアデノシンレセプターの分子病理学的解析を研究テーマとした。

### 3. 研究の方法

(1) 培養細胞、ヒト甲状腺組織中のアデノシンレセプターの mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。正常ヒト甲状腺組織を対照とした。

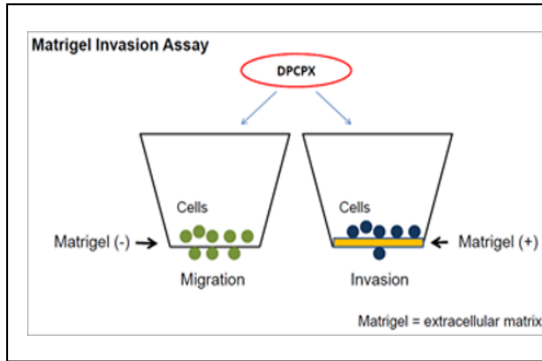
(2) ヒト甲状腺癌組織中のアデノシンレセプターの蛋白の発現を Western blotting 法を用いて検討した正常ヒト甲状腺組織を対照とした。

(3) 3種類(乳頭癌、濾胞癌、未分化癌)の濾胞上皮由来のヒト甲状腺癌組織中のアデノシンレセプターの発現を免疫組織化学法を用いて検討した。正常甲状腺組織、腺腫様甲状腺腫、濾胞腺腫を対照とした。免疫組織化学法の評価は図1のように行った。

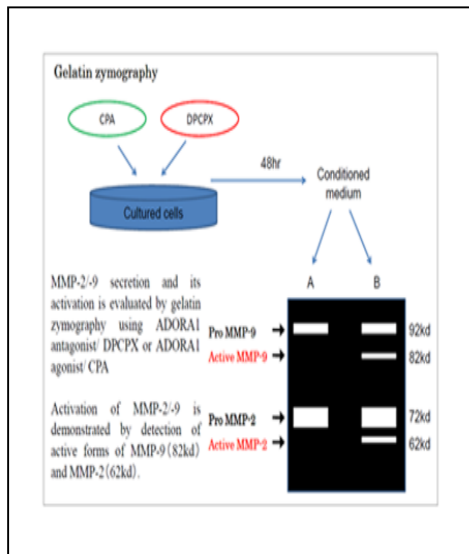


<図1. 免疫組織化学法を用いた評価法>

(4) 甲状腺培養細胞に選択的阻害剤 (DPCPX) を用いた MMT cell growth assay、matrigel invasion assay (図 2)、選択的作用剤 (CPA) と阻害剤 (DPCPX) を用いた gelatin zymography (図 3) を行い、それぞれ増殖能、遊走浸能、浸潤能を検討した。



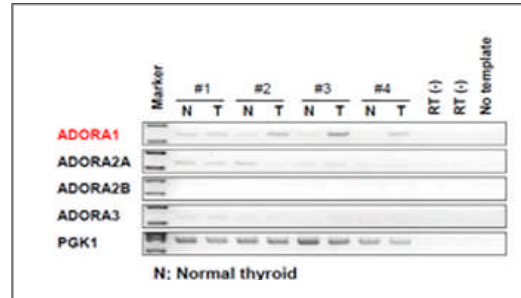
<図 2. 甲状腺癌培養細胞に選択的阻害剤 (DPCPX) を作用させた MMT cell growth assay と matrigel invasion assay のシエーマ>



<図 3. 甲状腺癌培養細胞に選択的作用剤 (CPA) と阻害剤 (DPCPX) を作用させた gelatin zymography のシエーマ >

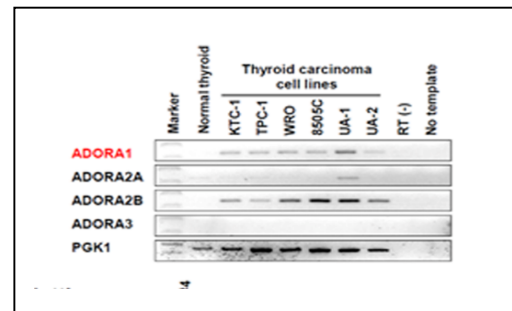
#### 4. 研究成果

(1) 正常甲状腺組織と比較して、甲状腺癌組織中でアデノシンレセプター1 (ADORA1) の発現の増加がみられた (図 4)。他のアデノシンレセプターの isoform (ADORA2A, 2B, ADORA3) の発現に差はみられなかった。



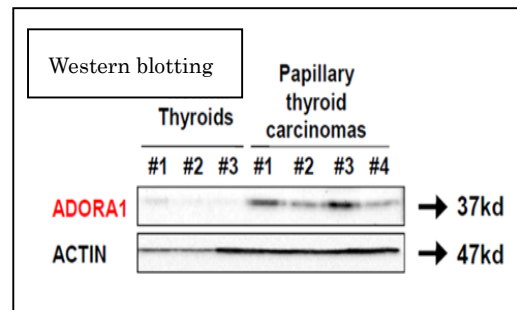
<図 4. RT-PCR 法の代表的結果: ヒト甲状腺癌組織 (人体材料) と正常甲状腺組織を比較>

複数の甲状腺培養細胞においても ADORA1 の mRNA 発現増加が認められた (図 5)。



<図 5. RT-PCR 法結果: 甲状腺癌培養細胞と正常甲状腺組織を比較>

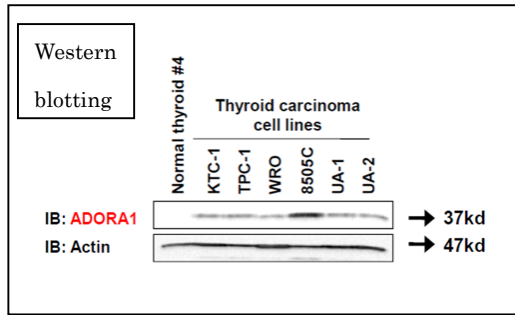
(2) Western blotting 法では正常甲状腺組織と比較してヒト甲状腺癌組織 (乳頭癌) 中で ADORA1 蛋白の増加が認められた (図 6)。



<図 6. Western blotting 法の結果: 人体材料>

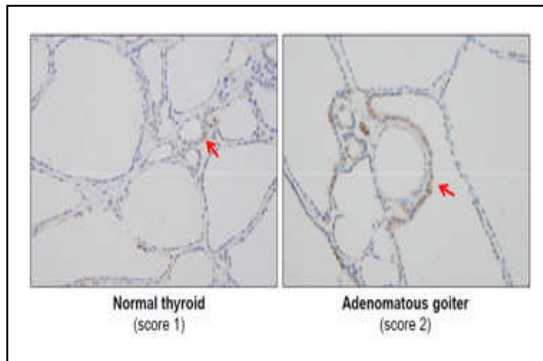
複数の甲状腺培養細胞においても ADORA1 蛋白

の発現増加が認められた (図 7)。

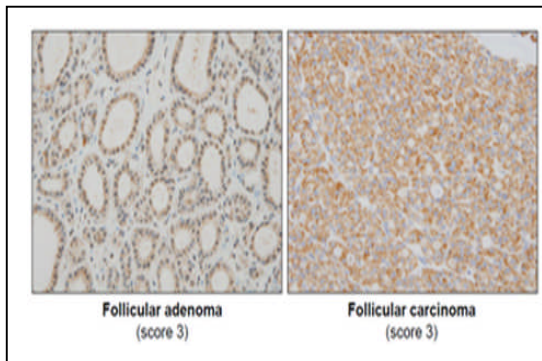


〈図 7. Western blotting 法の結果：培養細胞〉

(3) 免疫組織化学法で、3 種類 (乳頭癌、濾胞癌、未分化癌) の濾胞上皮由来のヒト甲状腺癌組織中のアデノシンレセプター 1 (ADORA1) の発現は正常甲状腺組織、腺腫様甲状腺腫、濾胞腺腫と比較して明らかな染色強度の増加がみられた (図 8、図 9、表 2)。



〈図 8. 免疫組織化学法の代表的結果：(左) 正常甲状腺組織、(右) 腺腫様甲状腺腫〉

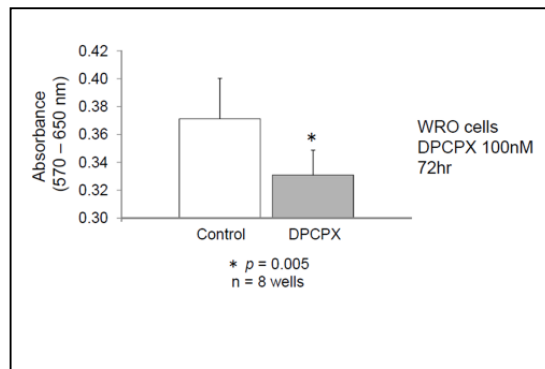


〈図 9. 免疫組織化学法の代表的結果：(左) 濾胞腺腫、(右) 濾胞癌〉

(表 2. 免疫組織化学法の結果のまとめ)

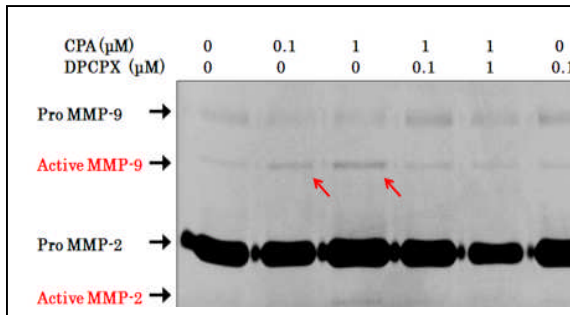
Histological type	n	Immunopositivity for ADORA1			
		0	1+	2+	3+
Normal tissue	25	8	13	4	0
Adenomatous goiter	18	1	6	9	3
Follicular adenoma	10	0	0	0	10
Follicular carcinoma	17	0	0	0	17
Papillary carcinoma	27	0	1	1	25
Undifferentiated carcinoma	21	0	2	3	16

(4) MMT cell growth assay ではアデノシンレセプター 1 の選択的阻害剤 (DPCPX) により甲状腺癌培養細胞の増殖が抑制された (図 10)。



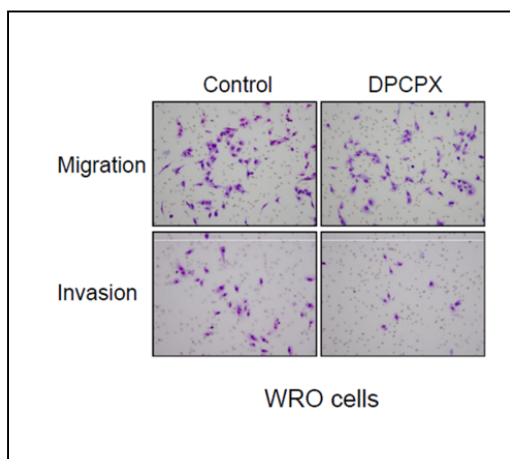
〈図 10. 選択的阻害剤を用いた MMT cell growth assay の結果：(左) 正常対照、(右) 阻害剤を使用した培養細胞〉

培養細胞を用いた gelatin zymography では選択的阻害剤 (DPCPX) の作用で濃度依存性に活性型 matrix metalloproteinase (MMP) -2、-9 の分泌が抑制され、一方作用剤の使用ではそれらの作用が促進された (図 11)。

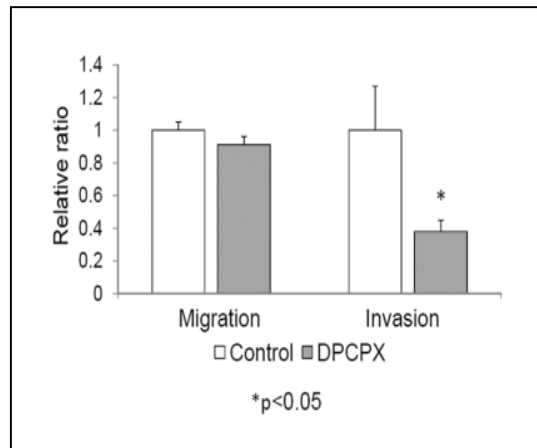


<図 11. Gelatin zymography の結果：(上段矢印)活性型 MMP-9、(下段矢印)活性型 MMP-2>

培養細胞を用いた matrigel invasion assay では、選択的阻害剤 (DPCPX) の作用により甲状腺癌細胞の遊走能、浸潤能が抑制され、一方阻害剤の使用でそれらの作用が促進された (図 12、図 13)。



<図 12. Matrigel invasion assay の結果：(左上下段)正常対照、(右上段)阻害剤使用後の細胞数、(右下段)阻害剤使用後の細胞数 >



<図 13. Matrigel invasion assay の結果：(白バー)正常対照、(黒バー)阻害剤使用後>

### 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 3 件)

① Tadao NAKAZAWA, et al. Fine-needle aspiration biopsy of low-grade cribriform cystadenocarcinoma of the salivary gland. DIAGNOSTIC CYTOPATHOLOGY, 査読有, 39(3), 39(3), 2011

② Tadao NAKAZAWA, et al. Global histone modification of histone H3 in colorectal cancer and its precursor lesions. HUMAN PATHOLOGY, 査読有, In Press, 2011

③ Tadao NAKAZAWA, et al. Giant oesophageal liposarcoma mimicking spindle cell liposarcoma and containing eosinophilic cells with rhabdomyoblastic differentiation. JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, 査読有, 63(5), 469-469, 2010

[学会発表] (計 1 件)

① 中澤 匡男他, 甲状腺、胸腺、耳下腺に鯉溝性嚢胞様病変を認めた 1 例. 第 100 回日本病理学会総会, 2011 年 4 月 28 日、パシフィコ横浜、横浜市

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 匡男 (NAKAZAWA TADAO)  
山梨大学・医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：10345704

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし