

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 25 年 5 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591439

研究課題名（和文） 甲状腺未分化癌細胞株の樹立と分子標的薬剤併用による抗癌剤耐性克服の基礎検討

研究課題名（英文） A basic study to establish anaplastic thyroid cancer cell lines in an aim to conquer its chemo-resistance by molecular targeted agents.

研究代表者

小野田 尚佳 (ONODA NAOYOSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30295703

研究成果の概要（和文）：本研究では治療抵抗性の甲状腺未分化癌の手術標本から癌細胞株7株を樹立し得た。これらの遺伝子変異、遺伝子発現の異常、抗癌剤感受性の検討から、臨床所見に合致する抗癌剤耐性を有していることが示された。抗癌剤耐性克服法の1つとしてmTOR阻害剤の一種であるeverolimusが、PI3K遺伝子の変異をもつgefitinib耐性のOCUT-2に特異的奏功することを確認した。さらに6株を樹立中であり、これらを含め今後甲状腺未分化癌研究に有用な細胞株として期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we could establish 7 anaplastic thyroid cancer cell lines from surgically obtained clinical samples. These cell lines were revealed to have maintained the features of the original tumors by investigating genetic alterations and sensitivity to the chemotherapeutic agents. An inhibitor for mTOR (everolimus) showed cell growth inhibition to OCUT-2, a cell line showing resistance to gefitinib for its mutation at PI3K gene. We continued establishing 6 more cell lines. These cell lines might contribute investigating the nature and the management of anaplastic thyroid cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：①内分泌外科学、②甲状腺癌、③細胞株樹立、④分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 甲状腺未分化癌(ATC)は、甲状腺癌の1-3%と発生頻度こそ低いものの、悪性度が高く、生存率の中央値は2~9ヶ月と極めて致死率の高い疾患である。分化癌から未分化転化の過程を経て発生すると考えられている。既存の各種治療法に抵抗性で、有効な治療手

段が発見されていない難治性疾患である。

(2) これまでの研究ではATCの新たな治療アプローチを模索するため、細胞株を樹立し、ATCでの細胞不死化にかかわるテロメラーゼの強発現や、核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) に対するリガンド thiazoline 誘導体

troglitazone による刺激や、上皮増殖因子受容体(Epidermal growth factor receptor: EGFR)のチロシンキナーゼ活性を阻害する分子標的薬剤 gefitinib の抗腫瘍効果を確認してきた。

現在、分子標的薬剤の開発、臨床応用は急速に進行しており、その中で細胞株を使用した基礎的研究は重要な役割を果たしているが、臨床的背景や基本的性質が明確な細胞株は少ないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では6株のATC細胞株を樹立、細胞の性質を明らかにするとともに、抗癌剤耐性機構の解析、分子標的薬剤併用による耐性克服の可能性について研究する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株の樹立

凍結保存されている4株(男性2例、女性2例)の癌細胞のクローニングを行い、実験動物での造腫瘍性、染色体確認などで細胞株として樹立する。

(2) 標的分子の検討

細胞表面に存在する増殖因子受容体や、細胞自身が産生する血管増殖因子の解析を行い、各細胞の性質を明確にすることで、標的とする分子決定の方向性を探る。

(3) 薬剤感受性の検討

各細胞の薬剤に対する反応性と薬剤耐性を克服できる治療法の検索を進める。

4. 研究成果

(1) 細胞株の樹立

①細胞株の樹立

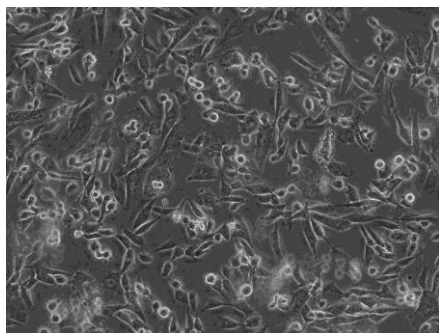


図1. OCUT-6の顕微鏡画像

すべての細胞は我々の施設で治療した症例のサンプルから、初代培養、限外希釈法をもちいたクローニングを経て安定した培養状態が得られた。OCUT-6の顕微鏡画像を図1に示す。

表1に示すように各々の細胞株について、その起源や臨床的背景が明確である。とくに細胞を採取するまでの治療経過や、採取後の治療に対する反応が記録できており、このような細胞株は貴重である。

表1. 樹立された細胞株の臨床的背景

細胞株	Pt	起源	治療*
OCUT-1	74F	手術	S,R,C >原病死 12 m
C, F			
OCUT-2	81F	胸水	気管切開 C,R >原病死 7m
OCUT-3	68M	化療後 手術	C, S, R, C >原病死 16m
OCUT-4	78M	手術	気管切開 >原病死 4m
OCUT-5	83F	手術	S, R >原病死 4m
OCUT-6	68F	手術	S,R,C >原病死 4m

* 治療法. S: Surgery, R: External beam radiation, C: Chemotherapy

②細胞株の特性の検討

染色体分析では、ヒト由来であることが証明され、性染色体も症例の性別と一致した。一部の細胞ではきわめて多彩な染色体異常が認められ、ATC細胞株での染色体の不安定性を示唆する結果であった。(表2)

遺伝子DNA変異検索の結果では、甲状腺癌に高頻度に見られるB-raf遺伝子の点突然変異1799T>A(V600E)が多くみられた。OCUT-2では、B-raf遺伝子の点突然変異に加えてPI3KCA遺伝子3140A>G(H1047R)の異常が認められた。また、OCUT-6では、濾胞癌で認められる頻度が高いN-ras182A>G(Q61R)の突然変異が認められた。いずれの変異も、甲状腺癌に特徴的に認められる変異と考えられているもので、悪性化に関わっていると推測されている。このような遺伝子変異からも細胞株は、進行甲状腺癌の遺伝子的性格を継承しているものと考え

られる。未分化転化に重要な役割を果たすとされている p53 遺伝子の突然変異はいずれの細胞株でも認められなかったものの、以前の検討でも p53 蛋白の発現異常が認められており、さらに検索が必要と考えられる。

また、これらの細胞ではサイログロブリンやナトリウム・ヨード・シンポーターなど正常甲状腺濾胞細胞や分化癌でも認められる分化マーカーの発現が認められず、TTF-1 や Pax8 などの よりプリミティブな甲状腺由来を示す RNA の発現が認められ、遺伝子発現プロファイルからもこれらの細胞が脱分化したヒト甲状腺癌の性格を有した細胞であることが示された。

表 2. 細胞株の染色体、DNA 変異

細胞株	染色体	B-raf	others
OCUT-1C	49, XX	mt	
OCUT-1F	50, XX	mt	
OCUT-2	65 X, -X	mt	PI3KCA 3140A>G (H1047R)
OCUT-3	45, XY	mt	
OCUT-4	45~51, X, -Y	mt	
OCUT-5	82, XXX, -X.	mt	
OCUT-6	58~ 61 XX+1	wt	N-ras 182A>G (Q61R)

wt: wild type, 1799T>A (V600E)

各細胞の培養上清中への分泌能を測定したところ、分化した甲状腺細胞の指標となるサイログロブリンの分泌は、全く認められなかった。一方で、表 3 に示すように種々のサイトカインが異なる濃度で測定された。とくに、顆粒球刺激因子 (G-CSF) と血管上皮増殖因子 (VEGF) の濃度が高い細胞が認められた。ATC では白血球の増多が認められることが多く、予後不良の指標とされる。G-CSF はこのような臨床的特徴の原因となっている可能性がある。また、VEGF は血管の新生を引き起こし遠隔転移の温床となることが知られているが、同時に VEGF を標的とした治療の可能性も追及されてきており興味深い。

表 3. 細胞株上清中のサイトカイン濃度

細胞株	G-CSF	VEGF
基準	<4.69 pg/ml	<15.6 pg/ml
OCUT-1C	10000	6160
OCUT-1F	< 4.69	1160
OCUT-2	157	2390
OCUT-3	< 4.69	8760
OCUT-4	94.2	825
OCUT-5	263	2200
OCUT-6	16.8	3260

③OCUT-1 の 2 つの亜株

OCUT-1 からは、ビメンチン陽性の紡錘形細胞(OCUT-1F 図 3a)と、E-cadherin 陽性の多形上皮様細胞(OCUT-1C 図 3b)の 2 つのクローンが得られた。

前述のように、遺伝子学的背景はほぼ同じであるが、サイトカイン産生能に大きな差異があり、ヌードマウスでの腫瘍産生能、増殖速度、さらには抗癌剤感受性についても異なる結果が得られた。同一の腫瘍から 2 つの性質の異なった細胞クローンが得られた報告は少なく、その意義については現在さらに検索中である。

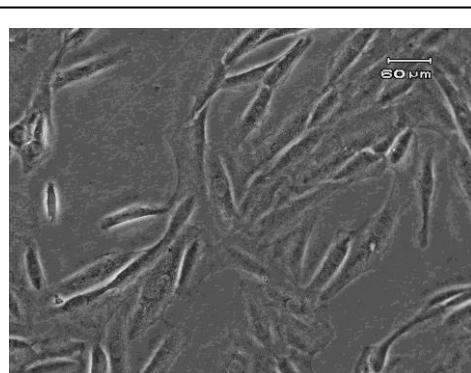


図 3a OCUT1-F の顕微鏡像

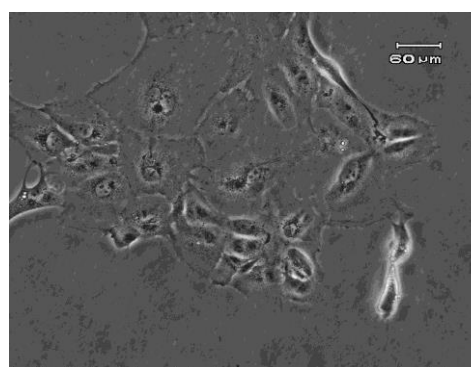


図 3b OCUT1-C の顕微鏡像

(2) 標的分子の検討

各細胞株について標的となる分子の発現状況を免疫組織学的に検討した (表 4)。

表 4. 細胞株での各タンパクの発現

	E-C	Vim	NES	FNC	c-kit
OCUT-1F	-	++	++	+/-	++
OCUT-1C	++	+		++	++
OCUT-2	-	++	-	-	++
OCUT-6	-	+++	+++	-	+++

各細胞において、Vimentin (Vim), Nestin (NES), Fibronectin (FNC) といった間葉系マーカーの発現が陽性であり、一方、OCUT-1C 以外では、E-Cadherin (E-C) の発現が認められなかった。また、c-Kit の発現が各細胞で認められ、標的分子になる可能性が示されたが、通常の状態とは異なり、細胞質に陽性所見が認められており、さらなる検討が必要であると考えられる。

(3) 薬剤感受性の検討

① 抗癌剤感受性の検討

各細胞株について、ATC で臨床的に使用される頻度の高い抗癌剤に対する感受性を検討した。MTT 法を用いて、各薬剤に対する暴露後の細胞の viability を測定し、測定結果の曲線から 50% の細胞が viable な状態である濃度 (IC50) を割り出した。各薬剤に対する IC50 を表 5 に示す。

表 5 各細胞株の抗癌剤感受性

	CDDP (μ M)	DXR (nM)	PTX (nM)	DOC (nM)	GEM (nM)
1F	26.3	290.0	14.1	6.1	103.8
1C	13.4	116.6	7.5	2.6	10.0
2	2.9	24.2	5.7	3.4	11.8
3	29.4	505.4	11.7	15.0	14.1
4	8.5	23.3	8.2	2.9	1.2
5	4.7	84.3	5.4	2.2	15.0
6	8.8	120.0	4.8	3.6	5.8

CDDP, Doxorubicin (DXR) に対する感受性は低い傾向を示した。Paclitaxel (PTX) や

Docetaxel (DOC) のタキサン系に対する感受性が強い傾向にあった。Gemcitabine (GEM) は、他の薬剤と異なった感受性を示した。同一腫瘍から樹立した OCUT-1C と F で、抗癌剤感受性に差を認めた。上皮様細胞の-1C は、紡錘形細胞の-1F より抗癌剤感受性が高かった。また、PI3CK の変異を持つ OCUT-2 は、いずれの薬剤に対しても、比較的感受性が高かった。OCUT-3 は EAP 療法後に採取された手術標本から樹立された細胞であり、多剤に対する抗癌剤耐性を認めた。N-ras の変異を持つ OCUT-6 は、B-raf 変異を持つ他の細胞株と比較して、感受性の profile が異なっていた。

以上のように、抗癌剤感受性は細胞が採取された患者の臨床的プロファイルをよく反映する結果であった。

② 分子標的薬剤の効果の検討

以前の検討で、EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤 (Gefitinib) による化学療法感受性の克服の可能性が示唆されたが、この際に OCUT-2 は Gefitinib に対して抵抗性を示した。この理由として、OCUT-2 細胞が PI3KCA 遺伝子の変異を持つことが重要であると考え、PI3KCA 遺伝子からのシグナルの下流での mTOR 発現の阻害を試みた。mTOR 阻害剤の 1 種である everolimus に対する感受性は、図 4 に示す如く、OCUT-2 について顕著であった。

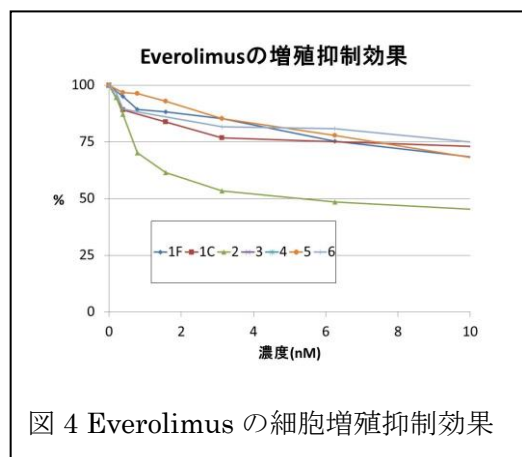
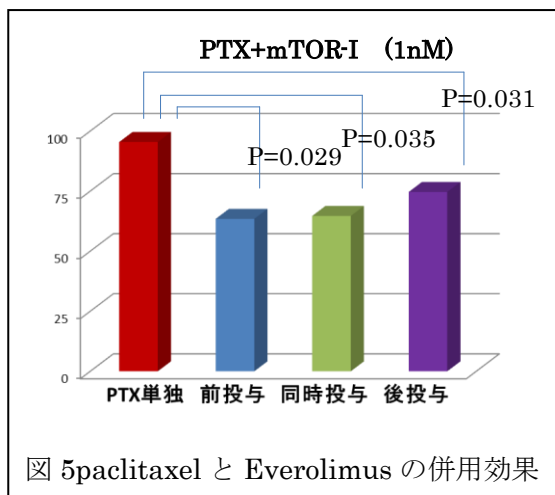


図 4 Everolimus の細胞増殖抑制効果

さらに、この現象のメカニズムを検討したところ、everolimus は細胞周期を G2M 期で停止させていることが明らかとなった。さらに、mTOR より下流のシグナルを抑制していることが示されたが、その効果は部分的にとどまっており、EGF による刺激を完全には阻害できないことが明らかとなった。

また、タキサン系抗癌剤 PTX との併用でさらに強い効果が認められた (図 5)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① 小野田尚佳ほか. 甲状腺未分化癌の治療経験から見た臨床試験の重要性. 内分泌・甲状腺外科会誌、査読無、(in press)
- ② Onoda N, Ishikawa T, et al. Focused approach to ectopic mediastinal parathyroid surgery assisted by radio-guided navigation. Surg Today、査読有、2013 Mar 15. [Epub ahead of print]
- ③ Onoda N, Ishikawa T, et al. Complete eradication of de-differentiated skin recurrence of papillary thyroid carcinoma with weekly docetaxel. International Cancer Conference Journal、査読有、2012 ;2)97-100 DOI: 10.1007/s13691-012-0070-x
- ④ Onoda N, Ishikawa T, et al. Successful surgical treatment of advanced follicular thyroid carcinoma with tumor thrombus infiltrating the superior vena cava: report of a case. Surg Today、査読有、2012;42(2)185-190. doi: 10.1007/s00595-011-0033-4.
- ⑤ 小野田尚佳、石川哲郎ほか. 培養癌細胞を用いた甲状腺未分化癌の基礎研究. 内分泌外科、査読無、2012 ; 28 (4) : 238-243

[学会発表] (計 24 件)

- ① 中村雅憲、小野田尚佳、石川哲郎ほか. 臨床経過が明らかな甲状腺未分化癌細胞株の樹立と抗癌剤感受性の検討. 第50回日本癌治療学会学術集会2012.10.25横浜
- ② 小野田尚佳、石川哲郎ほか. 甲状腺未分化癌細胞株に対する mTOR 阻害剤 everolimus の効果. 第50回日本癌治療学会学術集会2012.10.25.横浜

- ③ 小野田尚佳、石川哲郎ほか. 皮膚転移再発に対するドセタキセル投与で脱分化成分が消失した進行甲状腺癌の1例. 第45回日本甲状腺外科学会学術集会2012.10.4.横浜
- ④ 岡田敏弘、小野田尚佳ほか. 甲状腺癌におけるCD44の発現とALDH1酵素活性. 第45回日本甲状腺外科学会学術集会2012.10.4.横浜
- ⑤ 柏木伸一郎、小野田尚佳、石川哲郎ほか. 甲状腺未分化癌細胞株OCUT-1F/OCUT-1Cにおける網羅的遺伝子解析. 第45回日本甲状腺外科学会学術集会2012.10.4.横浜
- ⑥ 小野田尚佳、石川哲郎ほか. 局所進行甲状腺癌に対する複数科で行う頸部縦隔手術. 第37回日本外科系連合学会学術集会2012.6.29福岡
- ⑦ 小野田尚佳、石川哲郎ほか. Paclitaxel 毎週投与による未分化癌化学療法 of 全国試験-ATCCJ における前向き臨床試験に向けての準備報告-. 第24回日本内分泌外科学会総会2012.6.9名古屋
- ⑧ 小野田尚佳、石川哲郎ほか. ドセタキセルを中心とした化学療法を行った甲状腺未分化癌症例の検討. 第24回日本内分泌外科学会総会2012.6.9名古屋
- ⑨ 中村雅憲、小野田尚佳、石川哲郎ほか. 甲状腺微小乳頭癌におけるE-cadherinの発現と増殖因子の検討. 第24回日本内分泌外科学会総会2012.6.9名古屋
- ⑩ 小野田尚佳、石川哲郎ほか. 進行甲状腺癌に対する段階別・個別の集学的治療選択. 第112回日本外科学会定期学術集会2012.04.14千葉
- ⑪ Onoda N, Ishikawa T, et al. Focused approach for the ectopic mediastinal parathyroid with radio-isotope navigation第13回 アジア内分泌外科学会2012.3.28シンガポール
- ⑫ Nakamura M, Onoda N, Ishikawa T, et al. No correlation was found between E-cadherin expression and the prognostic factor of the papillary micro carcinoma of the thyroid. 第13回 アジア内分泌外科学会2012.3.28シンガポール
- ⑬ 小野田尚佳、石川哲郎ほか. 局所進行甲状腺癌の治療 新たなるストラテジー 局所進行甲状腺癌に対する他科との連携で行う拡大手術第73回日本臨床外科学会2011.11.19東京
- ⑭ 小野田尚佳、石川哲郎ほか. 甲状腺癌細胞株OCUT-1の再樹立により得られた2つの亜株第44回日本甲状腺外科学会201

1.10.6米子

- ⑮ 中村雅憲、小野田尚佳、石川哲郎ほか。
性質の異なる甲状腺未分化癌細胞株 (OCUT-1,2,6) に対する抗癌剤感受性の検討
第44回日本甲状腺外科学会2011.10.6米子
- ⑯ 小野田尚佳、石川哲郎ほか。特別企画世界に発信する内分泌外科の臨床と基礎研究 (基礎) 培養癌細胞を用いた甲状腺未分化癌の基礎研究 第23回日本内分泌外科学会2011.7.8東京
- ⑰ 青松直撥、小野田尚佳、石川哲郎ほか。
N-ras変異VEGF分泌能をもつ甲状腺未分化癌細胞株 (OCUT-6) の樹立 第23回日本内分泌外科学会2011.7.8東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野田 尚佳 (ONODA NAOYOSHI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30295703

(2) 研究分担者

石川 哲郎 (ISHIKAWA TETSURO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：50193280

(3) 連携研究者

なし