

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 6 月 6 日現在

機関番号：24701
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010 年度～2011 年度
 課題番号：22790352
 研究課題名（和文） 甲状腺未分化癌における Podocalyxin の役割と EMT の役割と治療応用に関する解析
 研究課題名（英文） Role of podocalyxin and EMT in undifferentiated thyroid carcinoma.
 研究代表者
 児玉 理恵子 (RIEKO KODAMA)
 和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
 研究者番号：20336887

研究成果の概要（和文）：甲状腺乳頭癌由来培養細胞 ONCO-DG-1、および B-CPAP では、Podocalyxin 発現により約 4 倍の filopodia 細胞の増加、ezrin の 567 スレオニン残基でのリン酸化亢進、約 2 倍の細胞移動能の亢進が認められた。甲状腺乳頭癌において podocalyxin 発現は腫瘍悪性化に関与していると考えられ、高悪性度腫瘍として知られる甲状腺未分化癌の悪性度に寄与する可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：Podocalyxin overexpression in ONCO-DG-1 and B-CPAP papillary thyroid carcinoma cells results in an estimated 4-fold increase in filopodia formation, phosphorylation of ezrin, and an approximately 2-fold increase in cancer cell migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,200,000	120,000	1,320,000
23 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	270,000	1,970,000

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：癌・病理学

1. 研究開始当初の背景
 Podocalyxin (以下 PODXL)は、CD34 関連 sialomucin で、血管内皮細胞、腎 podocyte、血小板に発現し、腎 podocyte、上皮細胞においては、微絨毛形成を誘導、極性形成等に関与しており、近年、乳腺、前立腺癌等で悪性

度増大に関わることが報告されている。我々は、種々の甲状腺腫瘍多数症例を対象にした（甲状腺未分化癌 69 例を含む）解析で、甲状腺腫瘍では PODXL 発現が未分化癌症例のみにその発現が認められる事を見出し、PODXL が甲状腺未分化癌の有用な診断マ

カーになり得ることを報告した。種々の甲状腺腫瘍細胞（腺腫様甲状腺腫、濾胞腺腫、濾胞癌、通常型・濾胞型・低分化型乳頭癌、髓様癌、扁平上皮癌、未分化癌）では、未分化癌細胞のみで PODXL 発現が認められ、未分化癌のみでその発現が認められる物質はその他にはこれまで報告が無い。甲状腺未分化癌は悪性度の高い腫瘍であり、組織学的には、E-cadherin, EMA の発現低下・消失、vimentin の発現亢進等、上皮-間葉転換（Epithelial-Mesenchymal Transition : EMT）の特徴を有している。しかしながら、甲状腺未分化癌と EMT に関する報告は未だ無い。近年肺癌で thyroid transcription factor-1 (TTF-1)が EMT を制御することが報告された。甲状腺未分化癌では、TTF-1 発現がほぼ消失することが知られており、甲状腺未分化癌において、EMT が key event となっている可能性が示唆される。

2. 研究の目的

甲状腺未分化癌における Podocalyxin の役割を、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) を中心に明らかにし、Podocalyxin を標的とする甲状腺未分化癌に対する新規治療の有用性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) ヒト甲状腺未分化癌における EMT に関する解析、PODXL との関連に関する解析：外科的切除ヒト甲状腺未分化癌パラフィン包埋標本 69 例を対象に、免疫組織化学的解析を行う。比較対象として、計 200 例の種々の甲状腺腫瘍組織標本（腺腫様甲状腺腫、濾胞腺腫、濾胞癌、通常型・濾胞型・低分化型乳頭癌、髓様癌、扁平上皮癌）を対象とする。E-cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin, SMAD4, SNAIL, vimentin の免疫染色を行い、これまで我々が発表している PODXL 発現、その他臨床病理学的因子との相関性について検討する。
- (2) ヒト甲状腺癌培養細胞株を用いた PODXL による EMT 誘導機序とその阻害に関する解析：甲状腺分化癌細胞株（乳頭癌細

胞株 K1, B-CPAP, ONCO-DG-1 ; 濾胞癌 FT-133) を用いて実験を行う。レトロウイルスベクターを用いて PODXL 強制発現を行い、E-cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin, SMAD4, SNAIL, vimentin 発現の変動を、定量的 RT-PCR 法、Western Blot 法にて解析する。未分化転化の可能性を考え、増殖能について、細胞数計測、MTS Assay 法にて検討する。未分化転化の可能性につき、TTF-1、TSH 受容体、サイログロブリン、Na-I Transporter 発現の変動を、定量的 RT-PCR 法、Western Blot 法にて解析する。移動能、浸潤能についても、Migration Assay, Matrigel を用いた Invasion Assay を行う。甲状腺未分化癌細胞株(TTA-1, TTA-2)を用いて、PODXL 発現未分化癌細胞株を同定する。PODXL 発現未分化癌細胞株を同定した後、レトロウイルスベクターで作成した PODXL 強制発現甲状腺分化癌細胞株も用いて、PODXL に対する siRNA 添加による EMT 誘導阻害の可能性について検討する。siRNA 添加後、E-cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin, SMAD4, SNAIL, vimentin 発現の変動を、定量的 RT-PCR 法、Western Blot 法にて解析する。未分化転化抑制の可能性についても、TTF-1、TSH 受容体、サイログロブリン、Na-I Transporter 発現、増殖能、移動能、浸潤能の変動についても解析する。

- (3) 動物接種による PODXL の甲状腺未分化癌に対する新規治療対象としての有用性に関する解析：レトロウイルスベクターを用いて作成した PODXL 強制発現甲状腺癌細胞株を用いて、ヌードマウスの皮下移植実験を行う。細胞株を移植した腫瘍につき、E-cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin, SMAD4, SNAIL, vimentin 発現について、免疫組織化学的解析を行う。PODXL に対する

siRNA を用いて、EMT 誘導阻害実験を行う。

4. 研究成果

甲状腺乳頭癌における Podocalyxin(PODXL) と EMT との関連を検討する為、甲状腺乳頭癌由来培養細胞株 K1, ONCO-DG1, B-CPAP に、レトロウイルスベクターを用いて PODXL 強制発現細胞を作成したところ、E-cadherin 発現、vimentin 発現に変動は無く、EMT との関連は認められなかった。種々の甲状腺腫瘍で PODXL 発現を検討した結果では、甲状腺未分化癌のみで PODXL 発現が認められることより、PODXL が甲状腺腫瘍の悪性度・悪性化に関連する可能性を考え、PODXL 強制発現 K1, ONCO-DG1, B-CPAP 細胞を用いて、増殖能の変化、細胞浸潤・移動能の変化を検討した。PODXL による細胞増殖能の変動を検討するため、MTS assay を行ったところ、PODXL 強制発現細胞での増殖能変化は認められなかった。細胞浸潤能・移動能の変化を検討するため、Matrigel コートのチャンバースライド、および Fibronectin コートのチャンバースライドを用いて、fetal bovine serum を chemoattractant として、invasion assay (Matrigel)、および migration assay (Fibronectin)を行った。PODXL 強制発現 K1, B-CPAP 細胞では、細胞浸潤能、および細胞移動能のいずれも亢進が認められた。PODXL 強制発現 ONCO-DG1 細胞では、細胞移動能の亢進が認められた。細胞移動能亢進につき、ファロイジン染色を行い、filopodia 細胞数の変化を検討したところ、PODXL 強制発現 ONCO-DG1, B-CPAP 細胞では filopodia 細胞数は4倍程度増加することが示された。PODXL 強制発現 K1 細胞では、filopodia 細胞の増加傾向が認められたが、統計学的に有意な filopodia 細胞数の増加は認められなかった。PODXL 強制発現

ONCO-DG1, B-CPAP 細胞では、filopodia 細胞数の増加につき、Ezrin の 567 スレオニン残基でのリン酸化亢進が認められた。PODXL 強制発現 K1 細胞では、Ezrin の 567 スレオニン残基でのリン酸化亢進は認められなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 理恵子 (RIEKO KODAMA)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号: 20336887

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()