

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 2 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592596

研究課題名(和文) ガレクチン - 3 の発現とプロモーター領域メチル化の解析による甲状腺発癌機構の解明

研究課題名(英文) Investigation on the Association between the Galectin-3 Promotor Methylation Status and the Carcinogenesis in thyroid neoplasms.

## 研究代表者

喜井 正士 (Yoshii, Tadashi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：10521726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺悪性腫瘍である乳頭癌9例全例でガレクチン-3遺伝子の非メチル化が、良性腫瘍である濾胞腺腫1例でメチル化が検出されたことから、ガレクチン-3プロモーター領域のメチル化状態の検索が甲状腺良悪性腫瘍の鑑別に役立つ可能性が示唆された。また良性腫瘍細胞の脱メチル化処理で、僅かながらガレクチン-3発現亢進と悪性形質化をもたらす結果が得られたことから、ガレクチン-3遺伝子プロモーター領域の脱メチル化が甲状腺発癌に関与する可能性があると思われた。しかし良性腫瘍が1例しかなく、また濾胞癌症例がなかったため、さらなる症例での結果追認が必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between the Galectin-3 DNA promotor methylation status and the carcinogenesis in thyroid neoplasms. We detected the de-methylated Galectin-3 DNA in all of the specimen from thyroid papillary carcinoma, and the methylated form in all of the specimen from thyroid adenoma. Moreover, thyroid adenoma cells treated by the de-methylating agent showed not only the increased Galectin-3 expression but also the aquired phenomena of malignant transformation. These data indicated that the de-methylation of Galectin-3 DNA promotor is related in the mechanism of the carcinogenesis of thyroid neoplasms.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：ガレクチン - 3 甲状腺癌

## 1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌のうち、乳頭癌、未分化癌、髄様癌は穿刺吸引細胞診により容易に術前診断が可能である。しかし、濾胞癌と良性腫瘍である濾胞腺腫の鑑別は現在のところ細胞診では不可能である。なぜなら、濾胞癌の診断には組織学的な被膜浸潤あるいは脈管浸潤の証明が必要だからである。したがって、細胞診で濾胞性腫瘍と診断された場合、腫瘍の急速な増大や腫瘍径が 3cm 以上といった臨床的な基準で手術の決定がなされるのが現状である。このような手術適応は、本来は不必要な良性腫瘍（濾胞腺腫）に対する手術、濾胞癌に対する治療の遅れという結果を招いている。また、甲状腺分化癌は 10 年生存率が 90%程度見込める予後良好な癌であるが、一部には転移・再発・未分化転化をきたす予後不良な高悪性群も存在する。このような高悪性癌を鑑別し濃厚な治療あるいは新たな分子標的治療といった差別化治療を行えば生命予後改善につながる可能性がある。以上の背景より、濾胞性腫瘍の術前良・悪性鑑別診断法ならびに高悪性癌の鑑別法の確立が待望されている。

ガレクチン-3 は  $\alpha$ -ガラクトシド結合タンパクであり、多くの癌で高発現し、アポトーシス抑制機能や転移・浸潤への関与が知られている。申請者らは、甲状腺正常組織と濾胞細胞由来の良性腫瘍である濾胞腺腫ではガレクチン-3 の発現をほとんど認めないのに対し、濾胞細胞由来の悪性腫瘍（乳頭癌・濾胞癌・未分化癌）において高発現していることを明らかにし、穿刺吸引細胞診検体中のガレクチン-3 の発現を指標にした術前鑑別診断法を開発した<sup>1)</sup>。しかし、相対的ガレクチン-3 の発現量を比較することで乳頭癌の術前鑑別診断は可能となったが、濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別は不可能であった<sup>2)</sup>。

また、申請者らはガレクチン-3 を高発現する甲状腺乳頭癌細胞株においてガレクチン-3 の発現を抑制させるとその悪性形質が減弱すること<sup>3)</sup>、さらにガレクチン-3 を発現しない甲状腺正常濾胞細胞株にガレクチン-3 を強発現させると悪性形質を獲得すること<sup>4)</sup>を明らかにした。以上よりガレクチン-3 が甲状腺濾胞細胞の発癌に強く関与していると思われる。

発癌においては DNA のメチル化に代表される塩基への修飾によるエピジェネティックな遺伝子異常も関与している。細胞外からの成長刺激シグナルに対する細胞の反応を調節する Ras シグナル伝達系のなかに発見された癌抑制遺伝子 RASSF1A は、そのプロモーター領域の高メチル化が甲状腺細胞の腫瘍化に関与している<sup>5)</sup>。下垂体においては、悪性度の高い神経内分泌癌に関連したプロラクチン産生腫瘍や副腎皮質刺激ホルモン産生腫瘍においてガレクチン-3 遺伝子のプロモーター領域の非メチル化がみられガレクチン-3 の発現が亢進していた。一方、非機

能性腺腫ではガレクチン-3 遺伝子のプロモーター領域のメチル化がみられガレクチン-3 の発現は認められなかった。また、乳癌や甲状腺癌細胞株においてガレクチン-3 遺伝子のプロモーター領域の非メチル化とガレクチン-3 の発現亢進が認められた<sup>6)</sup>。さらに、前立腺においては、正常に比べて早期癌でガレクチン-3 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が亢進しガレクチン-3 の発現が減少していた<sup>7)</sup>。しかし、甲状腺の良・悪性腫瘍におけるガレクチン-3 の発現とその遺伝子プロモーターのメチル化との関連を検討した報告や RASSF1A のプロモーター領域のメチル化とガレクチン-3 の発現およびそのプロモーター領域のメチル化の相関を検討した報告は未だない。

## 2. 研究の目的

これまで研究の進んでいない甲状腺におけるガレクチン-3 遺伝子プロモーターのメチル化状態と発癌との関係を明らかにすることにより、甲状腺発癌におけるガレクチン-3 の関わりを解明し、診断・治療に応用すること。

## 3. 研究の方法

### 甲状腺腫瘍の穿刺吸引細胞診検体・手術摘出標本におけるガレクチン-3 の発現、ガレクチン-3 遺伝子と癌抑制遺伝子 RASSF1A のプロモーター領域のメチル化状態の解析

大阪大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科において平成 25 年から 26 年の 2 年間に、大阪大学倫理委員会承認を受けた臨床研究「ガレクチン-3 による固形癌の診断」への協力を行い、これに則り同意を得たうえで甲状腺腫瘍の患者様よりエコーガイド下に穿刺吸引検体を、手術摘出標本より一部腫瘍組織を確保した。

手術検体に関してはパラフィン包埋標本より切片を作成して免疫組織化学染色法で、凍結検体からタンパクを抽出してイムノブロット法で、ガレクチン-3 のモノクローナル抗体を用いてこれまで行った方法<sup>1)</sup>により発現を解析した。また、過去に報告された方法に従って<sup>6)</sup>、凍結標本より DNA を抽出し、亜硫酸水素ナトリウムで処理して CpG アイランドのメチル化されていないシトシンをウラシルに変化させることにより、メチル化状態を調べるためのサンプル調整を行った。

ガレクチン-3 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態については、非メチル化用プライマー-GGGAGTGTATGGAATTTAAT (forward)/CTCCAAACAACACTACTAACAAA AA(reverse) とメチル化用プライマー-GGAGCGTTACGGAATTTAAC(forward)/TCCGAACGACTACTAACGAAAA(reverse) を作成してメチル化特異的 PCR を行い、得られた cDNA の電気泳動とシーケンスを行った<sup>6)</sup>。また癌抑制遺伝子 RASSF1A のプロモーター領域のメチル化についてもメチル化用プライマー-GCGTTGAAGTCGGGG TTC(forward)/CCCGTACTTCGCTAACTTT AAACG(reverse) を作成して過去の報告<sup>5)</sup>と同様に解析を行った。

穿刺吸引細胞診検体におけるガレクチン-3 の発現については申請者らの開発した ELISA 法<sup>1)</sup>により解析し、遺伝子プロモーター領域のメチル化検出は上記と同様に行った。

#### **濾胞腺腫細胞株を脱メチル化剤で処理した際のガレクチン-3 の発現量の変化、および脱メチル化処理された細胞の悪性形質の変化の解析**

濾胞腺腫細胞株 KAK-1 を脱メチル化剤で処理し、ガレクチン-3 の発現量がどのように変化するかイムノプロット法により解析した。発現量の定量化には ImageJ ソフト (NIH) を用いた。また脱メチル化処理された濾胞腺腫細胞と元の細胞における悪性形質を血清非依存性増殖能・足場非依存性増殖能・接触阻止現象の喪失により過去の方法<sup>3, 4)</sup>と同様に解析した。

なお、KAK-1 は 10%血清含 RPMI1640 により 37 °C 5%CO<sub>2</sub> 下で培養され、脱メチル化剤 (5-aza-2'-deoxycytidine; Sigma) 処理は 30 μmol/L で 4 日間とし、triplicate で行った。

#### 4. 研究成果

##### **検体が得られた手術症例の内訳**

検体が得られた手術症例は、良性腫瘍 (濾胞腺腫) が 1 例、悪性腫瘍 (乳頭癌) が 9 例であった。乳頭癌は cT1bN0 が 2 例、cT2N0 が 2 例、cT2N1b が 2 例、cT3N0 が 1 例、cT4aN1a が 2 例であった。

##### **手術症例におけるガレクチン-3 の発現**

術前穿刺吸引検体は ELISA 法で、手術で得られた検体は免疫組織化学法とイムノプロット法でガレクチン-3 の発現を検索したが、そのいずれにおいても、濾胞腺腫ではガレクチン-3 の発現を認めず、乳頭癌では全例でガレクチン-3 の発現を認めた。

##### **手術症例におけるガレクチン-3 遺伝子プロモーターのメチル化状態**

穿刺吸引検体と摘出組織から DNA を抽出し、ガレクチン-3 プロモーター領域のメチル化状態を調べたところ、濾胞腺腫ではメチル化が、乳頭癌では 9 例全例で非メチル化が検出された。

##### **手術症例における RASSF1A 遺伝子プロモーターのメチル化状態**

穿刺吸引検体と摘出組織から DNA を抽出し、RASSF1A プロモーター領域のメチル化状態を調べたところ、乳頭癌の 6 例中 2 例 (cT1bN0、cT3N0) で非メチル化が検出された。なお、今回の 10 例中 6 例でのみ測定が行われ、6 例とも乳頭癌症例であった。

##### **KAK-1 における脱メチル化処理の有無による悪性形質の変化**

KAK-1 の脱メチル化剤処理あり (D) となし (C) で Gal-3 発現量をイムノプロット法で調べたところ、D では C よりも発現が 1.8 倍上昇していた。D と C における血清非依存性増殖能 ( )・足場非依存性増殖能 ( )・接触阻止現象の喪失 ( ) について実験を行った結果、D は C に比べ て 1.4 倍、 で 1.6 倍の増殖能と で接触阻止現象の喪失を示した。

##### (考察)

以上の成果から、乳頭癌 9 例全例でガレクチン-3 遺伝子の非メチル化が、濾胞腺腫 1 例でメチル化が検出されたことから、ガレクチン-3 プロモーター領域のメチル化状態の検索が甲状腺良悪性腫瘍の鑑別に役立つ可能性が示唆された。また良性腫瘍細胞株の脱メチル化処理で、僅かながら Gal-3 発現亢進と悪性形質化をもたらす結果が得られたことから、ガレクチン-3 遺伝子プロモーター領域の脱メチル化が甲状腺発癌に関与すると推察され、今回の研究が甲状腺発癌メカニズムの一端を明らかにする可能性を示した。しかし濾胞腺腫が 1 例しかなく、また濾胞癌症例がなかったことから、断定的なことは以上の結果のみでは言えない。また RASSF1A プロモーター領域のメチル化状態に関しては濾胞腺腫と濾胞癌で測定できておらず、さらなるデータの蓄積が必要である。研究を継続し論文発表する予定である。

(引用文献)

- 1) Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, et al. Cancer. 85:2475-2484, 1999
- 2) Inohara H, Segawa T, Miyauchi A, Yoshii T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 376:605-10, 2008
- 3) Yoshii T, et al. Int J Oncol. 18:787-792, 2001
- 4) Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, et al. Cancer Lett. 195:111-119, 2003
- 5) Xing M. Cancer Res. 64: 1664-8, 2004
- 6) Ruebel KH, et al. Cancer Res. 65:1136-40, 2005
- 7) Ahmed H, et al. Transl Oncol. 2:146-56, 2009

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:

出願年月日:

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

喜井正士 (YOSHII Tadashi)

大阪府立成人病センター・耳鼻咽喉科・副部長

研究者番号: 10521726

(2)研究分担者

中原 晋 (NAKAHARA Susumu)

大阪大学大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20625107

(3)連携研究者

山本佳史 (YAMAMOTO Yoshifumi)

大阪大学大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 60346210