

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791775

研究課題名(和文) 甲状腺におけるガレクチン 3の過剰発現は甲状腺癌を誘発するのか？

研究課題名(英文) Can overexpression of galectin-3 in the thyroid induce thyroid carcinoma with the transgenic mouse model?

研究代表者

中原 晋(Nakahara, Susumu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20625107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺癌におけるガレクチン-3の強発現の意義を解明するために甲状腺でガレクチン-3を過剰発現するトランスジェニックマウスを開発した。マウスが3カ月齢になった時点で甲状腺を取り出し、顕微鏡下で観察したが明らかな形態学的異常や甲状腺癌の発癌は認められなかった。観察期間が短いため結論付けられないが、甲状腺癌におけるガレクチン-3の強発現は発癌因子ではなく、発癌した結果、何らかの要因で発現誘導されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed the transgenic mice that overexpressed galectin-3 in the thyroid tissue, so that the role of galectin-3 overexpression in the thyroid carcinoma would be elucidated. We removed the thyroids of the transgenic mice at the age of 3-month and observed them under a microscope. There were no carcinomas or abnormalities in the thyroid tissue. This result indicates that overexpression of galectin-3 would not be the important factor for carcinogenesis but arise on the result after thyroid carcinoma is occurred, whereas we cannot conclude it with relatively short observation period.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：ガレクチン-3 トランスジェニックマウス 甲状腺癌

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌は頭頸部腫瘍の中で頻度が高い悪性腫瘍の一つであり、若年者でも発症するのが特徴といえる。特に、東日本大震災原子力発電所事故に伴う放射性物質の漏洩、将来的に近隣住民の甲状腺癌の増加が危惧されている中で、甲状腺癌の予防や早期発見、より多くの治療方法の開発などは我々の責務であり、そのためには甲状腺癌の発癌メカニズムを含めた病態の解明が必要である。

ガレクチンは、ガラクトースを含む糖鎖に特異的に結合するタンパク質であり、様々な生物学的反応を調節することで多くの病態に関与することが知られている。研究代表者らのグループにより、その中の一つガレクチン - 3 が正常甲状腺組織にはほとんど発現を認めず、癌組織においてのみ過剰に発現していることを発見し、主に腫瘍マーカーとしての有用性について報告してきた(Inohara H, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 376:605-10, 2008)。特に、甲状腺癌に関して、4 種類の組織型(乳頭癌、濾胞癌、髄様癌、未分化癌)のうち、乳頭癌ではほぼ 100% に過剰発現を認めることが判明しており、少なくとも甲状腺乳頭癌に関しては発癌に関して何らかの重要な役割を果たしていると推測されているが、その詳細については未解明のままである。

2. 研究の目的

研究代表者らは、ガレクチン - 3 が正常甲状腺組織にはほとんど発現を認めず、甲状腺癌組織においてのみ過剰に発現していることを示してきたが、この癌組織にのみ過剰に発現するメカニズムや意義に関しては未解明のままであるため、本研究の目的は、甲状腺にガレクチン - 3 を強発現するトランスジェニックマウスを開発し、その強発現により生体内で甲状腺癌の発癌が誘発されるのかどうかを解明することである。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックマウス作成のために必要なトランスジーン構築および甲状腺由来細胞株における過剰発現の確認

トランスジェニックマウスにおいて過剰発現させたガレクチン - 3 が内因性のガレクチン - 3 と判別できるように、His タグおよび Xpress タグを融合したガレクチン - 3 を発現するプラスミドを作成する。この作成過程において、発現を調節するプロモーターは、甲状腺特異的に発現を誘導するサイログロプリンプロモーターをまず優先的に採用し、何らかの不具合があれば全身に強力に発現することが知られている CAG プロモーターを選択する。

作成したプラスミドを甲状腺由来細胞株に遺伝子導入したあと、その細胞からタンパク質を抽出し、His タグおよびガレクチン - 3 を認識する抗体でイムノプロットを行い、ま

ず in vitro で強制発現系がうまくいくかどうか確認する。

(2) トランスジェニックマウスの作成

(1) で得られたプラスミドを最適な長さに制限酵素を用いて切断し、それをトランスジーンとしてマウス受精卵の前核中にマイクロインジェクションを行う。

得られた F0 マウスにおいて、遺伝子導入されている系統を PCR を利用してスクリーニングする。遺伝子導入されている系統を抽出し、さらに F1 マウスおよび F2 マウスを作成して継代飼育する。

(3) トランスジェニックマウスの解析

F0 マウスの甲状腺組織からタンパク質を抽出したあとガレクチン - 3 の発現をイムノプロット法および免疫染色法を用いてチェックし、各系統における発現量の違いやパターンを検討する。

発現量の異なる 3 系統を抽出し、3 ヶ月齢、12 ヶ月齢の時点で以下の項目を中心に解析する。

ガレクチン - 3 の強発現により甲状腺機能に変化が起こるかどうかをマウスの血液を採取し、甲状腺ホルモン数値を測定する。

ガレクチン - 3 の強発現により甲状腺の形態学的な変化(発癌しているかどうかの検討含む)が起こるかどうかをマウスの甲状腺を摘出し、大きさおよび重量を測定後、組織標本作製し顕微鏡下で観察する。

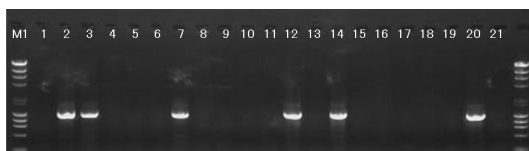
4. 研究成果

まず、甲状腺特異的にガレクチン - 3 を発現するトランスジェニックマウスを作成するために、サイログロプリンプロモーターを含んでいる pSKTg ベクターを基にしてガレクチン - 3 を組み込んだプラスミドを作成した。このプラスミドが甲状腺由来細胞において強発現することを in vitro で確認するために、ガレクチン - 3 を発現しないラット甲状腺正常濾胞細胞株 FRTL-5 にリポフェクション法を用いて遺伝子導入を行ったが、抽出したタンパク質からは十分量のガレクチン - 3 が検出されなかった。

次に、マウス甲状腺において任意のタンパク質発現を誘導することが知られている CAG プロモーターを含んだ pCAGGS ベクターを基にしてガレクチン - 3 を組み込んだプラスミドを作成した。この際に、His タグと Xpress タグを任意のタンパク質に融合することが可能な pcDNA3.1/His ベクターも利用してプラスミドを作成した。このプラスミドが甲状腺由来細胞において強発現することを in vitro で確認するために、甲状腺癌細胞株である NPA にリポフェクション法を用いて遺伝子導入を行い、タンパク抽出して検討したところ、His タグを融合したガレクチン - 3 が発現されていることを確認した。

上記の結果より、後者のプラスミドを用い

て C57BL/6 系統のトランスジェニックマウスを作成することにした。合計 240 個の受精卵にマイクロインジェクションを行い、2 細胞期まで生存していた 179 個 (74.6%) を 8 匹のレシピエントマウスに移植した。そのうち 7 匹で妊娠が確認され、合計 22 匹の F0 マウスが得られたが、そのうち 3 匹は離乳後すぐに死亡した。ある程度成長した 19 匹の F0 マウス尾から DNA を抽出してガレクチン - 3 cDNA が含まれた配列を認識する PCR を行ったところ、5 匹 (雄 4 匹、雌 1 匹) のマウスでトランスジーンが組み込まれていることを確認できた (下図)。



(レーン 20 : ポジティブコントロール、
レーン 21 : ネガティブコントロール)

この 5 クローンのトランスジェニックマウスを各々野性型の C57BL/6 マウスと交配して F1 マウスを作成したところ、3 クローンからしか F1 マウスが得られなかったため、必然的にこの 3 クローンを選択してさらに F2 マウスを作成することにした。

クローンが維持できなかったトランスジーンが組み込まれている F0 マウスから 3 カ月齢の時点で甲状腺を取り出して顕微鏡下で観察したが明らかな形態学的異常や甲状腺癌の発癌は認められなかった。

途中の実験過程で遅延を認めたため、得られたトランスジェニックマウスを長期間飼育した状態で検討はできていないが、上記の結果より、ガレクチン - 3 の甲状腺癌における強発現は発癌原因になっているわけではなく、発癌した結果、何らかの要因で誘導されることが示唆された。

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 4 件)

中原 晋, 足立 加那, 鈴木 修, 山本 佳史, 竹中 幸則, 安井 俊道, 花本 敦, 福角 隆仁, 道場 隆博, 瀬尾 雄二, 磯橋 文明, 吉岡 靖生, 小川 和彦, 猪原 秀典
頭頸部扁平上皮癌ルビエールリンパ節転移症例の臨床検討 特にサイバーナイフの効果について
頭頸部癌 41 巻 4 号, 452-457, 2015.12

中原 晋, 北村 公二, 本間 圭一郎, 山本 佳史, 竹中 幸則, 安井 俊道, 花本 敦, 森井 英一, 猪原 秀典
補助化学療法による発熱性好中球減少症を契機として死亡に至った上咽頭癌の 1 例

日本耳鼻咽喉科学会会報 118 巻 6 号, 763-769, 2015.06

Nakahara S, Yasui T, Takenaka Y, Yamamoto Y, Yoshii T, Morii E, Inohara H.
Synchronous bilateral tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus.
Auris Nasus Larynx. 2014 Feb;41(1):109-12.

Nakahara S, Uemura H, Kurita T, Suzuki M, Fujii T, Tomita Y, Yoshino K.
A case of myxofibrosarcoma of the maxilla with difficulty in preoperative diagnosis.
Int J Clin Oncol. 2012 Aug;17(4):390-4.

〔学会発表〕(計 10 件)

中原 晋, 安井俊道, 竹中幸則, 喜井正士, 山本佳史, 猪原秀典
両側同時性 HPV 陽性扁桃癌の 1 例
第 113 回 日本耳鼻咽喉科学会、平成 24 年 5 月、新潟

中原 晋, 竹中幸則, 喜井正士, 山本佳史, 猪原秀典
放射線治療により 2 年以上喉頭温存された喉頭・下咽頭癌症例における喉頭機能の評価
第 36 回 日本頭頸部癌学会、平成 24 年 6 月、島根

中原 晋, 宮口真一, 竹中幸則, 山本佳史, 猪原秀典
化学放射線同時併用療法を初回治療として施行した上咽頭癌の治療成績
第 50 回 日本癌治療学会、平成 24 年 10 月、横浜

中原 晋, 竹中幸則, 山本佳史, 安井俊道, 花本 敦, 猪原秀典
化学放射線療法後における遺残リンパ節転移の評価 ~CT vs PET/CT~
第 23 回 日本頭頸部外科学会、平成 25 年 1 月、鹿児島

Susumu Nakahara, Yukinori Takenaka, Yoshifumi Yamamoto, Toshimichi Yasui, Atsushi Hanamoto, Hidenori Inohara.
Clinical utility of CT and FDG PET/CT in assessing the neck in node-positive head and neck cancer after chemoradiotherapy.
2013 ASCO Annual Meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago, U.S.A.

中原 晋, 竹中幸則, 山本佳史, 安井俊道, 猪原秀典
当科における片側頸部郭清術の検討

第 24 回 日本頭頸部外科学会、平成 26 年 1 月、香川

中原 晋、北村公二、竹中幸則、安井俊道、猪原秀典
TPF 療法中に急変し不幸な転帰をとった上咽頭癌の 1 例
耳鼻咽喉科臨床学会、平成 26 年 6 月、岩手

Sususmu Nakahara
A phase study of concurrent chemoradiotherapy with weekly low-dose cisplatin and docetaxel in locally advanced unresectable head and neck carcinoma.
ESMO 2014 Congress, Sep.26-30, Madrid, Spain.

中原 晋、竹中幸則、山本佳史、安井俊道、花本 敦、足立加那、大久保裕史、瀬尾雄二、吉岡靖生、小川和彦、猪原秀典
頭頸部扁平上皮癌ルビエールリンパ節転移症例の臨床検討 特にサイバーナイフの効果について
第 39 回 日本頭頸部癌学会、平成 27 年 6 月、神戸

中原 晋
再発・転移頭頸部扁平上皮癌に対する DTX・CDDP・Cetuximab 併用療法の実施可能性試験
第 53 回 日本癌治療学会、平成 27 年 10 月、京都

〔図書〕(計 3 件)

中原 晋、猪原秀典
喉頭癌と EBM - 特に原発巣に対する治療方針について
JOHNS, 28(2): 213-216, 2012

中原 晋、猪原秀典
Topics 咽頭癌に関する最近の話題
のどの異常とプライマリケア (ENT 臨床フォーラム):
149-151, 2013

中原 晋、猪原秀典
【耳鼻咽喉科医が見落としてはいけない中枢疾患】頭頸部癌による脳神経障害(解説/特集)
ENTONI, 166 号: 169-174, 2014

〔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
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