

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460415

研究課題名(和文) 甲状腺癌の上皮間葉移行を司るRunx2：mTOR経路と低酸素を介した発現制御機構

研究課題名(英文) Regulation of Runx2 through hypoxia and mTOR pathway in thyroid cancer

研究代表者

近藤 哲夫 (KONDO, Tetsuo)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：30334858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Runx ファミリー (Runx1, Runx2, Runx3) は組織発生、細胞分化に関する転写因子群で、RUNX2 遺伝子は甲状腺癌においても高発現し、血管増殖因子、マトリックスメタロプロテアーゼ、上皮間葉移行調節因子を正に制御している。本研究では塩化コバルトや低酸素インキュベーターを用いて甲状腺癌細胞に低酸素刺激を加え、Runx2発現が低酸素により抑制されることを明らかにした。これは低酸素の腫瘍内部ではRunx2が減少し、逆に血流の豊富な腫瘍辺縁ではRunx2の発現が高いことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The mammalian runt-related transcription factor (Runx) genes, including RUNX1 (AML1/CBFA2), RUNX2 (AML2/CBFA1) and RUNX3 (AML3/CBFA3), encode transcription factors that are master regulators of proliferation and differentiation during embryonic development. Enhanced Runx2 is functionally linked to tumor invasion and metastasis of thyroid carcinoma by regulating EMT-related molecules, matrix metalloproteinases and angiogenic/lymphangiogenic factors. In this study, we demonstrated that hypoxic stimulation due to CoCl₂ or hypoxic incubator (O₂ 1%) induce downregulation of Runx2 mRNA in thyroid carcinoma cell lines. Our data suggested that Runx2 is upregulated in the invasive area, while down regulated in the hypoxic area of the thyroid cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：甲状腺癌 Runx2 低酸素 分子病理

1. 研究開始当初の背景

濾胞上皮由来甲状腺癌は内分泌臓器の中で最も高頻度に発生する悪性腫瘍であるが、予後良好な微小型乳頭癌から極めて侵襲性の高い未分化癌にいたるまで腫瘍の分化と悪性度は広範囲にわたっている。この甲状腺癌の発癌とプログレッションの過程には段階的な遺伝子異常やエピジェネティクス異常が関与していることがわかってきている (Kondo T et al. Nat Rev Cancer 2006, Kondo T et al. Cancer Res 2007, Kondo T et al. Clin Cancer Res 2007)。RET/PTC 遺伝子再構成や BRAF 変異による MAPK 経路の持続活性化は甲状腺発癌の初期イベントと考えられ (Kondo et al. Hum Pathol 2007)、TP53 変異や CTNNB1 変異は高分化癌から未分化癌に至る後期イベントと推定されている。またホルモン産能の脱分化過程にはエピジェネティクス機構である DNA メチル化、ヒストン修飾によって様々な甲状腺機能分子の発現異常が生じていることもわかってきた (Kondo T et al. Endocrinol Metab Clin North Am 2008, Kondo T et al. Lab Invest 2009)。発癌とプログレッションの分子メカニズムの解明が進むなかで、甲状腺癌の浸潤や転移、上皮間葉移行の分子メカニズムについては解明が遅れている。甲状腺未分化癌は高い増殖能に加えて高度の浸潤性と高頻度の遠隔転移のために手術療法、化学療法・放射線療法の効果が乏しくほぼ致死的なため、有効な治療法の早期確立が必須の状況であるが、新規治療法開発のための分子基盤として我々が重要と考えているのが RUNX2 遺伝子による甲状腺癌細胞の浸潤、上皮間葉移行の制御機構である。

Runx ファミリーは RUNX1 (AML1/CBFA2), RUNX2 (AML2), RUNX3 (AML3) の3つのアイソフォームから構成される転写因子群である。Runx 分子はコア結合因子 (CBFβ) とヘテロ二量体を形成して転写を調節し、胎児発生過程における細胞分化に関わる重要な調節を担

っている。Runx ドメインにおいて90%以上の高い相同性を有しているが、各アイソフォームの発現は組織特異性があり、機能的役割も大きく異なっている。RUNX1 は赤芽球、顆粒球、巨核球、リンパ球を含む造血系分化に関わり、その遺伝子異常は急性骨髄性白血病の原因となっている。RUNX2 は骨芽細胞・軟骨細胞の分化を誘導し、その異常は鎖骨・頭蓋骨の先天的形成異常をもたらす。RUNX3 は胃上皮の増生や神経発生に関わり、がん抑制遺伝子として胃癌では DNA 過剰メチル化による不活化がおきている。我々はこれまでの研究で甲状腺癌における RUNX2 mRNA の高発現を明らかにし、免疫組織化学では甲状腺癌細胞の核への局在とびまん性強発現を確認した。さらに MAPK 経路の活性化が RUNX2 発現を正に制御していることも我々は報告している。機能的な側面では RUNX2 遺伝子ノックダウンによって血管増殖因子、マトリックスメタロプロテアーゼ、上皮間葉移行調節因子 (Snails, Twist) の発現が抑制され、マトリゲル浸潤アッセイでは甲状腺癌細胞の浸潤能が有意に抑制されることも明らかにした (Niu D, Kondo T et al. Lab Invest 2012)。甲状腺癌において Runx2 が癌細胞の浸潤、上皮間葉移行を制御しているということは、Runx2 とその関連分子が甲状腺癌転移の抑制の治療標的となる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

Runx ファミリー (Runx1, Runx2, Runx3) は組織発生、細胞分化に関与する転写因子群で、我々はこれまでに骨芽細胞・軟骨芽細胞の分化を調節する RUNX2 遺伝子が甲状腺癌においても高発現していることを見出し、さらに Runx2 発現が血管増殖因子、マトリックスメタロプロテアーゼ、上皮間葉移行調節因子を正に制御していることを明らかにした。本研究計画では我々の基礎的成果をさらに発展させ、甲状腺癌の新規治療法に応用させるトラ

ンスレーショナルリサーチとして、Runx2 の発現制御メカニズム、Runx2の新規標的遺伝子の同定、甲状腺癌細胞の浸潤と上皮間葉移行に及ぼすRunx2 の作用を分子生物学的に解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) Runx2 の発現制御メカニズム： MAPK 経路による Runx2 発現制御については既に実験を行っている (Niu D, Kondo T et al. Lab Invest 2012)。この実験では MEK 阻害剤 U0126 による ERK1/2 のリン酸化の阻害では *RUNX2* mRNA の発現抑制がみられるものの mRNA レベルで 30%~50%の低下にとどまり、他のシグナル伝達経路の関与が示唆された。これらの予備データを基にして本研究では PI3K/AKT/mTOR 経路、低酸素、低酸素誘導因子 (HIF) を介する Runx2 発現制御について検討をおこなった。

(2) Runx2 の標的遺伝子： 甲状腺癌細胞で高発現する Runx2 分子が機能的な転写因子であるかどうかをまず検証する。Runx2 結合配列である osteoblastic specific element-2 (OSE2)を組み込んだルシフェラーゼベクターを内因性 Runx2 陽性甲状腺癌細胞と Runx2 陰性甲状腺癌細胞に導入し、甲状腺癌細胞の

内因性 Runx2 に転写活性があるかどうかをルシフェラーゼアッセイによって確認する。これまでの我々の研究によって Runx2 が血管増殖因子 (*VEGFA*, *VEGFC*)、マトリックスメタロプロテアーゼ (*MMP2*)、上皮間葉移行調節因子 (*SNAI2*, *SNAI3*, *TWIST1*) の発現を制御することが明らかとなっている。また骨芽細胞の研究からオステオポンチン (*SPPI*)、オステオカルシン (*BGLAP*)、MMP-13 はプロモーター領域に Runx2 結合配列が存在し Runx2 の直接的な転写制御下にあることもわかっている。甲状腺癌細胞においてこれらの遺伝子が Runx2 の直接的な転写作用に

よるものか、間接的に誘導されているのかを明らかにするため、これら遺伝子のプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイ及びクロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイによって確認する。cDNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現スクリーニングも行い Runx2 に誘導される新規標的遺伝子の同定も行う。

(3) 浸潤、上皮間葉移行への Runx2 の作用機序： 甲状腺癌における Runx2 の機能的役割、特に浸潤、上皮間葉移行への作用機序については *RUNX2* cDNA ベクターの導入による強制発現及び siRNA による *RUNX2* ノックダウンによる gain-/loss-of-function のアプローチで *in vitro*、*in vitro* の実験によって証明する。

4. 研究成果

(1) 甲状腺癌培養細胞における Runx2 及び低酸素誘導分子の発現：

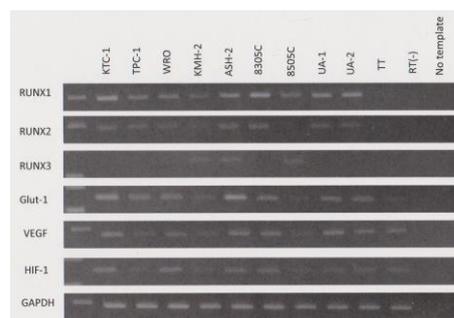


図1 RT-PCR

本研究ではヒト甲状腺癌培養細胞株として乳頭癌由来株 (KTC-1、TPC-1)、濾胞癌由来株 (WRO)、未分化癌由来株 (KMH-2、ASH-2、8305C、8505C)、髄様癌細胞株 (TT) を用いた。Runx ファミリーと低酸素誘導因子の mRNA 発現プロファイルは RT-PCR により確認した (図1)。Runx1 は C 細胞由来の TT 細胞を除く、すべての濾胞上皮由来甲状腺癌に陽性となり、Runx2 も 8505C 細胞、TT 細胞以外の甲状腺癌細胞に陽性であった。Runx3 の mRNA は KMH-2、ASH-2、8505C 細胞に発現を認めた。低酸素誘導分子として Glut-1、VEGF、HIF-1 の発現を検討したが

Runx ファミリーの発現パターンに関連なく、すべての培養細胞株で mRNA 発現を認めた。以下の実験では Runx2 陽性細胞株を用いた。

(2) 塩化コバルトによる Runx2 発現の制御:

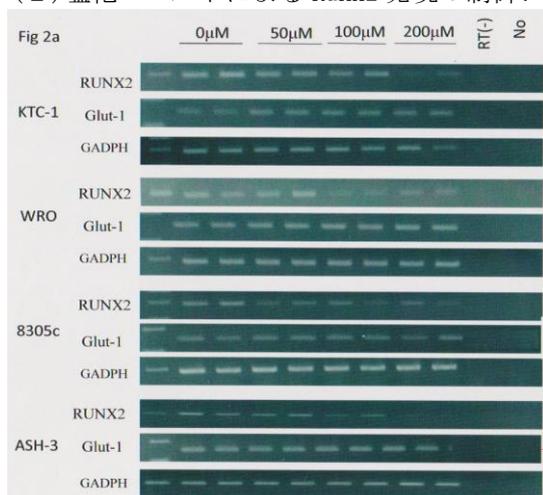


図 2 RT-PCR

低酸素応答系と Runx2 発現の関連を調べるために、塩化コバルトの培地添加を行った。塩化コバルトは分解阻害により低酸素誘導因子 HIF-1 を増加させることから擬似低酸素環境として用いた。KTC-1、WRO、8305C、ASH-3 いずれでも塩化コバルトの添加 (100-200nM) により Runx2 mRNA の発現低下を認めた (図 2)。Runx2 の発現低下はあっても HIF-1 の標的遺伝子の Glu-1 の mRNA には変化を認めなかった。

(3) 低酸素刺激による Runx2 の発現制御:

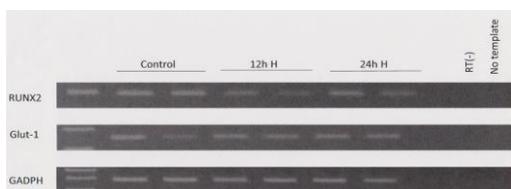


図 3 RT-PCR

次に低酸素インキュベーターを用いて、培養機内を低酸素 (O₂ 1%) 環境にし、Runx2 発現の検討を行った。コントロールの酸素濃度は通常大気 (約 O₂ 約 20%) とした。8305C 細胞では低酸素 12h 刺激、24h 刺激において Runx2 の発現低下が認められた (図 3)。他の甲状腺癌細胞株においても同様に低酸素

刺激により Runx2 の発現は抑制された。塩化コバルト添加と同じく、Glut-1 の mRNA 発現には変化がみられなかった。

(4) まとめ

低酸素環境が Runx2 の発現を誘導すると仮説を行ったが、実験結果からは低酸素刺激は甲状腺癌細胞の Runx2 の発現を抑制することが示された。甲状腺癌の内部と辺縁で血流量と酸素濃度条件が異なることを踏まえると、より低酸素の腫瘍内部では Runx2 が減少し、逆に血流のより豊富な腫瘍辺縁では Runx2 の発現が高いことを示しているものと予測される。我々がこれまでに明らかにした MAPK 経路の活性化による RUNX2 発現増加、Runx2 による血管増殖因子、マトリックスメタロプロテアーゼ、上皮間葉移行調節因子の発現制御は腫瘍辺縁の非低酸素状況下で生じる現象であると推測する。

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 9 件)

① 近藤哲夫、甲状腺癌の病理診断 新たな展開・低分化癌、日本甲状腺学会雑誌、査読無、6 巻、2015、113-118

② 近藤哲夫、次世代シーケンサーによる甲状腺癌ゲノム解析のインパクト、Thyroid Cancer Explorer、査読無、1 巻、2015、95-99

③ Oishi N, Kondo T, Nakazawa T, Mochizuki K, Tanioka F, Oyama T, Yamamoto T, Iizuka J, Tanabe K, Shibata N, Kirito K, Katoh R: High prevalence of the MYD88 mutation in testicular lymphoma: Immunohisto-chemical and genetic analyses. Pathol Int 65(10):528-535, 2015, 査読有 doi: 10.1111/pin.12336.

④ Wang J, Kondo T, Yamane T, Nakazawa T, Oishi N, Mochizuki K, Katoh R: Expression of nuclear membrane proteins in normal, hyperplastic, and neoplastic

thyroid epithelial cells. Virchows Arch 467(4):427-436, 2015, 査読有 doi: 10.1007/s00428-015-1816-6.

⑤ Nakazawa T, Kondo T, Tahara I, Kasai K, Inoue T, Oishi N, Mochizuki K, Kubota T, Katoh R: Multicentric occurrence of multiple papillary thyroid carcinomas - HUMARA and BRAF mutation analysis. Cancer Med 4(8):1272-1280, 2015 査読有 doi: 10.1002/cam4.466.

⑥ Mochizuki K, Kondo T, Oishi N, Tahara I, Inoue T, Kasai K, Nakazawa T, Okamoto T, Shibata N, Katoh R: Low frequency of PAX8-PPARγ rearrangement in follicular thyroid carcinoma in Japanese patients. Pathol Int 65(5):250-253, 2015 査読有 doi: 10.1111/pin.12270

⑦ 近藤哲夫、小児・若年者甲状腺癌の病理学的特徴と遺伝子異常について、日本臨床細胞学会雑誌、査読無、53 巻、2014、508-514

⑧ Wang J, Kondo T, Yamane T, Nakazawa T, Oishi N, Kawasaki T, Mochizuki K, Dongfeng N, Katoh R: Heterogeneous Immunoreactivity of Emerin, a Nuclear Envelope LEM-domain Protein, in Normal Thyroid Follicles. Acta Histochem Cytochem 47(6):289-294, 2014 査読有 doi: 10.1267/ahc.14041.

⑨ Oishi N, Kondo T, Mochizuki K, Inoue T, Kasai K, Nakazawa T, Mitsumori T, Katoh R: Localized Langerhans cell histiocytosis of the thymus with BRAF V600E mutation: a case report with immunohistochemical and genetic analyses. Hum Pathol 45(6):1302-1305, 2014 査読有 doi: 10.1016/j.humpath.2013.12.018

[学会発表] (計 4 件)

① 近藤哲夫、多段階発癌モデルからみた鑑別困難・濾胞性腫瘍、第 54 回日本臨床細胞学会秋期大会、2015 年 11 月 22 日、名古屋

国際会議場 (愛知県、名古屋市)

② Tetsuo Kondo, Ryohei Katoh.

Cytopathologic and genetic features of pediatric thyroid carcinoma. 39th European Congress of Cytology, 2015 年 9 月 20 日 (Millan, Italy)

③ 近藤哲夫、中澤匡男、加藤良平 他、甲状腺癌における低分化成分の臨床的意義、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 5 月 2 日、名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

④ 近藤哲夫、中澤匡男、加藤良平 他、低分化 (充実、索状、島状構造) 成分を伴う甲状腺癌の臨床病理学的検討、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 25 日、広島国際会議場 (広島県、広島市)

[図書] (計 1 件)

近藤哲夫 (北川昌伸・仁木利郎編)、医学書院、標準病理学第 5 版・第 18 章内分泌、2015、pp591-623

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究成果に関する web ページ:

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DisInfo.Scholar/3_58/47EAB2789A01B6A4.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 哲夫 (KONDO Tetsuo)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号: 30334858

(2) 研究分担者

加藤 良平 (KATOH Ryohei)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 30152755

(3) 研究分担者

中澤 匡男 (NAKAZAWA Tadao)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号: 10345704