

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461992

研究課題名(和文) 甲状腺未分化癌と上皮間葉転換の関連に関する研究

研究課題名(英文) Involvement of EMT in anaplastic thyroid carcinoma

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・准教授

研究者番号：30295703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：OCUT-1CとOCUT-1Fは、同一の腫瘍を起源に持つヒト甲状腺未分化癌細胞株で、同様の遺伝子変異をもつ。OCUT-1CはE-cadherinの発現など上皮様の性質を持つが、OCUT-1Fは間葉様の性質を持ち原因は不明であるがE-cadherinの発現が消失している。OCUT-1CにTGF-betaを添加すると、E-Cadherinは減弱したが、形態の変化は認められなかった。手術標本を用いた検討でも未分化癌組織で間葉系マーカーの高率な発現が認められ、Nestinの発現は臨床所見とは独立した予後不良因子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Both OCUT-1C and OCUT-1F was the human anaplastic thyroid cancer cell lines derived from a single original tumor, and demonstrated same DNA profile. OCUT-1C showed epithelial phenotype with E-cadherin expression, whereas OCUT-1F displayed mesenchymal phenotype by losing E-cadherin expression for unknown reason. E-cadherin expression was inhibited in OCUT-1C by the exposure to TGF-beta. Still, no morphological change was recognized at the same time. Markers indicating the mesenchymal phenotype were commonly found in the clinical samples of anaplastic thyroid cancer. Nestin, one of these markers, expression was suggested to be a poor prognostic indicator, independent of the clinical features of the patients

研究分野：内分泌外科学

キーワード：甲状腺癌 未分化癌 培養細胞株 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

甲状腺未分化癌は、ヒト癌のうちで最も悪性度が高い難治性の悪性疾患である。一般的に各種抗癌療法には抵抗性で、極めて予後が悪く、標準的治療法は確立されていない。ガイドラインでも、有効な治療法や指針を示すことが困難である。甲状腺癌全体の1%程度を占めるにすぎない希少な疾患であることや、進行が極めて早いことなどが、これまで本疾患の現状把握や治療法の確立の妨げとなってきた。全国的研究組織「甲状腺未分化癌コンソーシアム」によって疾患の全体像を解析し、化学療法の前向き臨床試験を開始し、27年にも成果が発表される予定である。甲状腺未分化癌の独自性を解明し、標準的治療法の確立に向けてのオールジャパンによる研究体制が整備されている¹⁾。

一方で、甲状腺未分化癌の発生機序についての理解は進んでいない。臨床病理学的観察研究から、分化型の甲状腺癌が長期間を経て未分化癌が形成されると考えられており、これまで細胞増殖能や浸潤能、転移能に大差があることや、遺伝子変異が蓄積されていること、メチル化などのエピジェネティックな異常や細胞の不死化を担うテロメラーゼの発現が認められることを示してきた。

最近の研究では、癌の進展に上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition; EMT) のメカニズムが関与していることが次第に明らかとなっている。癌化の段階では上皮様の性格を持つ癌細胞が、間葉系細胞の性格を獲得することで浸潤、転移を来すようになるという仮説であり、甲状腺分化癌から、未分化転化によって未分化癌が発生する段階においても大きく関与していると考えられている。甲状腺未分化癌への EMT の関与を検討することは、未分化転化の分子機構を解明することにとどまらず、癌の分化や浸潤転移の機構解明につながる可能性があるが、現在まで良い研究モデルが見つかっていない。

これまで、臨床的背景の明らかな甲状腺未分化癌細胞株 7 株を樹立しえた²⁾。それらのうち、OCUT-1C と F は、同一個体の同一腫瘍を起源としており、限外希釈によって選別された異なったクローンである。すでに 2 年以上安定して培養維持されており、細胞株として樹立されている。

基礎的性質の検討から、この 2 種の細胞株はヒト甲状腺癌由来であり、染色体および遺伝子的には極めて似通った性質を持ちながら、OCUT-1C は、細胞同士が接触して増殖し、一方 OCUT-1F は、紡錘形の形態のまま広がって増殖するという全く異なった表現型を示すことが示された。OCUT-1C と F のこのような表現型はすなわち、上皮および間葉系細胞の性格を示すと想起され、EMT の基礎的モデルとして確立される可能性が十分に期待できると考えた。

2. 研究の目的

同一患者の同一腫瘍から分離樹立したヒト甲状腺未分化癌細胞株 OCUT-1C と F は、同一の起源を有しながら、異なった表現型を持つ。その原因となる因子を同定し、互いに形態や性質について変換し得るための方法を開発することで、甲状腺未分化癌発生機序の解明を期する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株を用いた検討

細胞学的性格

増殖能、浸潤能、培養上清中に分泌されているサイトカインを定量化する。

分子生物学的性格

EMT マーカーとされる分子について免疫染色などで確認する。

E-Cadherin 遺伝子のプロモーター領域 CpG island の異常メチル化をメチル化特異的 PCR (methylation specific PCR) 法で検討し、メチル化陽性の場合には direct sequence で確認する。

培養環境による細胞形態の変化

a. 培養環境の変化：無血清培地、共培養による形態、増殖能、浸潤能の変化を観察する。

b. TGF- β の添加：EMT に大きく関与している TGF- β の添加による形態の変化などを観察する。

c. 脱メチル化剤の添加：OCUT-1C と F の E-Cadherin の発現の差が、promoter 領域 CpG island の異常メチル化によるものであれば、脱メチル化剤の投与による形態や接着性の変化を観察する。

網羅的解析

網羅的メチル化解析、プロテオーム解析から両細胞の相違を検討する。

新規細胞株の樹立

培養中の細胞株について、動物での造腫瘍性や遺伝子解析を適宜すすめ、細胞株として樹立を目指す。亜クローンが得られた場合には、OCUT-1C と F で得られた結果の普遍性を確認する。

(2) 臨床検体を用いた検討

集積されている甲状腺未分化癌の手術標本約 30 例を用いて、EMT に関連する分子の発現状態を免疫組織学的に検索する。さらに、分子標的治療の治療標的とされている分子や増殖能に関連する因子、他の癌腫で癌幹細胞のマーカーとして有用とされている因子についても同様に検索し、組織学的脱分化や EMT 関連因子の発現との相関関係を検討する。

4. 研究成果

(1) 細胞株を用いた検討 細胞学的性格

OCUT-1C は、比較的大型の多型性の細胞で敷石状に配列し、細胞同士が接着して増殖する。OCUT-1F は長い紡錘形の細胞で、単層に渦巻き状の配列を示し増殖する。実験動物に細胞を摂取して作成した腫瘍は、各々の細胞形態を反映しており、手術標本と類似した形態を示した。

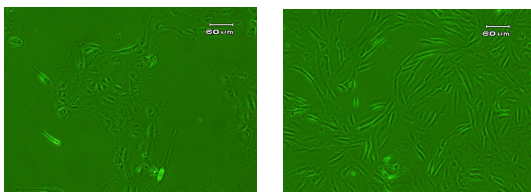


図1 OCUT-1CとOCUT-1Fの形態の違いを示す。左：OCUT-1C，右OCUT-1F

細胞の倍化時間は、OCUT-1Cで22時間、OCUT-1Fで15時間であった。浸潤能は、OCUT-1CとOCUT-1Fで差が無かった。OCUT-1Cを培養した上清をOCUT-1Fに添加したところ、OCUT-1Fの増殖が有意に刺激され、浸潤能も高くなった。逆にOCUT-1Fを培養した上清をOCUT-1Cに添加したところ、増殖能の変化は認められなかったが、浸潤能は高くなった。培養上清中のVEGFはOCUT-1Cで1160、OCUT-1Fで6160 (<15.6) pg/ml、G-CSFはOCUT-1Cで<4.69、OCUT-1Fで10000 (< 4.69) pg/mlと明らかな差が認められた。

分子生物学的性格

10か所のDNA分析(Short Tandem Repeat解析)で2つの細胞を検討し、同一のヒト個体から得られた細胞であることが確認できた。染色体分析でOCUT-1Cは49, XX, +7, ? add (8)(q13), del (9)(p22), add (10)(p13), +11, add (11)(q23)x2, +20 [2] / 49, idem, ?del (8)(q24) [6]。OCUT-1Fは50, XX, +7, del (9)(p22), +11, add (11)(q23)x2, +20, +mar [11]と、ほぼ同一ではあるが多彩な異常が認められ、第8と第10染色体を中心に若干の相違が認められた。甲状腺癌に認められることが多い遺伝子異常を確認したところOCUT-1CとF双方で同様のBRAFV600E, hTERTのプロモーター領域の変異が認められた。NRAS, p53, PI3KCAの変異は認められなかった。幹細胞マーカーの検索では、snail2 (slug)およびzeb1 mRNAの発現がOCUT-1Fで高く観察された。

OCUT-1CではE-cadherinの発現が認められたが、OCUT-1Fでは確認できなかった。

E-Cadherin発現を抑制する遺伝子プロモーター部分の異常メチル化を探索したが、認められなかった。したがって、脱メチル化剤転化による形態の変化は検討しなかった。

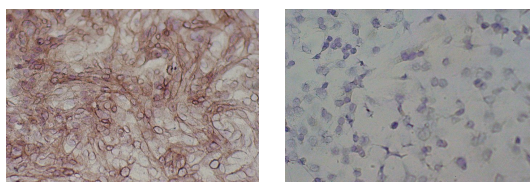


図2 細胞におけるE-cadherinの発現の違いを示す。左：OCUT-1C，右OCUT-1F

培養環境による細胞形態の変化

無血清培地で培養したところOCUT-1Cの形態が一部紡錘形に変化した。増殖速度は非常に遅くなり、継続培養できなかった。

OCUT-1CにTGF-βを添加すると、明らかな形態の変化は認められなかったが、E-Cadherinの発現は明らかに減弱した。

殺細胞性抗癌薬に対する感受性を確認したところ、paclitaxelとEribulinについては2つの細胞には明らかな差が認められ、OCUT-1Cに比べてOCUT-1Fは感受性が低く、これらに薬剤に耐性を獲得していると考えられた。

殺細胞性抗癌剤の一つであるEribulinは、癌細胞にEMTと逆の形態変化すなわち、間葉上皮転換(MET: Mesenchymal Epithelial Transition)を起こすことが知られている。OCUT-1FにEribulinを添加したところ、3日間の観察で細胞の形態に明らかな変化は認められなかった。

以上の様に、OCUT-1Cは上皮様の性質を持ち、OCUT-1Fは間葉様の性質を持つことが示されたが、両者を人為的に転換することは成功しなかった。

網羅的解析

遺伝子メチル化の網羅的解析の結果、多くの部位でメチル化に差を認めたが、既知のEMT関連あるいは幹細胞関連の遺伝子発現変化につながるものは同定できなかった。

蛋白発現についても網羅的に解析した、87種の蛋白が発現増加、73種の蛋白が発現低下していた。抗酸化作用や細胞骨格に関わる蛋白の発現に差が認められた。

新規細胞株の樹立

手術組織から初代培養中の細胞について5つのクローンを作成することができた。これらについてDNA解析を行い、ヒト由来の独特な細胞であることが示された。しかしながら、実験動物における造腫瘍性は確認することができず、新規細胞株の樹立には至らなかった。

(2) 臨床検体を用いた検討

手術標本を用いた検討では、間葉系マーカーの高率な発現が認められた。同一標本上に存在する分化癌部分では、間葉系マーカーの発現は低率であった。間葉系マーカーのうちnestinの発現は、26%の未分化癌で確認された。Nestinを発現する腫瘍をもつ患者の予後

は有意に不良で臨床所見とは独立した予後不良因子と考えられた³⁾。

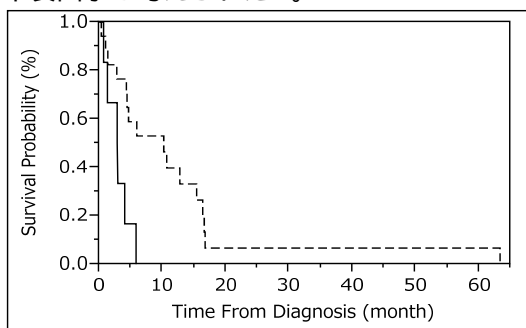


図3 Nestin発現の有無による全生存期間を示す。実線：Nestin発現陽性、破線：Nestin発現陰性（Kaplan-Meier法で作成）

<引用文献>

1. 小野田 尚佳,ほか.【わが国における甲状腺疾患登録とその利活用】甲状腺未分化癌研究コンソーシアム.日甲状腺会誌 4(2): 114-116, 2013.
2. Onoda N, et al. Establishment, characterization and comparison of seven authentic anaplastic thyroid cancer cell lines retaining clinical features of the original tumors. World J Surg 2014 38(3):688-95.
3. Kurata K, Onoda N, et al. Nestin expression as an independent indicator of poor prognosis for patients with anaplastic thyroid cancer. Oncol Lett 2015 10(2):850-856.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計23件)

1. Kurata K, Onoda N, Noda S, Kashiwagi S, et al. Growth arrest by activated BRAF and MEK inhibition in human anaplastic thyroid cancer cells. Int J Oncol 2016 49(6): 2303-2308. doi: 10.3892/ijo.2016.3723. (査読あり)
2. Onoda N, et al. The Safety and Efficacy of Weekly Paclitaxel Administration for Anaplastic Thyroid Cancer Patients: A Nationwide Prospective Study. Thyroid 2016 26(9):1293-9. doi: 10.1089/thy.2016.0072. (査読あり)
3. 小野田 尚佳,ほか.甲状腺乳頭癌全摘術後の放射性ヨウ素内用療法の現状に関する後ろ向きコホート調査研究.日内分泌・甲状腺外会誌 33(2): 110-114(2016.06) (査読なし)
4. 小野田 尚佳.甲状腺未分化癌の治療ストラテジー 手術による根治は困難と考えられ、術後の補助療法が必要.日本医事新報 4806: 64-65(2016.06) (査読なし)
5. 小野田 尚佳, 徳本 真央, 野田 諭, 柏木 伸一郎, ほか. Lenvatinib を投与した治療抵抗性再発甲状腺未分化癌の 1 例. 日臨外会誌 77(2): 291-295(2016). DOI :

10.3919/jjsa.77.291 (査読あり)

6. Kurata K, Onoda N, Noda S, Kashiwagi S, et al. Nestin expression as an independent indicator of poor prognosis for patients with anaplastic thyroid cancer. Oncol Lett 2015 10(2):850-856. (査読あり)
7. Onoda N, Nakamura M, Noda S, Kashiwagi S, et al. Significant cytostatic effect of everolimus on a gefitinib-resistant anaplastic thyroid cancer cell line harboring PI3KCA gene mutation. Mol Clin Oncol 2015 3(3):522-526. (査読あり)
8. Onoda N, et al. Concept and design of a nationwide prospective feasibility/efficacy/safety study of weekly paclitaxel for patients with pathologically confirmed anaplastic thyroid cancer. BMC Cancer 2015 15:475. doi: 10.1186/s12885-015-1490-8. (査読あり)
9. Okada T, Onoda N, et al. Coexpression of EpCAM, CD44 variant isoforms and claudin-7 in anaplastic thyroid carcinoma. PLoS One 2014 9(4):e94487. doi: 10.1371/journal.pone.0094487. (査読あり)
10. Nakamura M, Onoda N, Noda S, Kashiwagi S, et al. E-cadherin expression and cell proliferation in the primary tumor and metastatic lymph nodes of papillary thyroid microcarcinoma. Mol Clin Oncol 2014 2(2):226-232. (査読あり)
11. Onoda N, Noda S, Kashiwagi S, et al. Establishment, characterization and comparison of seven authentic anaplastic thyroid cancer cell lines retaining clinical features of the original tumors. World J Surg 2014 38(3):688-95. doi: 10.1007/s00268-013-2409-7. (査読あり)
12. Onoda N, Kashiwagi S, Noda S, et al. High efficacy of chemoradiation therapy sensitized by weekly docetaxel for anaplastic thyroid cancer. Anticancer Res 2013 33(8):3445-8. (査読あり)
13. Sugishita Y, Onoda N, et al. Amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 gene in differentiated thyroid cancer correlates with telomere shortening. Int J Oncol. 2013 42(5):1589-96. doi: 10.3892/ijo.2013.1848. (査読あり)
14. 小野田 尚佳,ほか.【わが国における甲状腺疾患登録とその利活用】甲状腺未分化癌研究コンソーシアム.日甲状腺会誌 4(2): 114-116(2013.10) (査読なし)

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 小野田尚佳, ほか. 甲状腺未分化癌に対する Weekly paclitaxel による化学療法の認容性、安全性に関する前向き研究, 第 48 回日本甲状腺外科学会総会, 2015/10/29, 青山ダイヤモンドホール (東京都港区)
2. 倉田研人, 小野田尚佳, 野田 諭, 柏木 伸一郎, ほか. 甲状腺未分化癌に対する新規 B-Raf 阻害剤, MEK 阻害剤の抗腫瘍効果の検討. 第 48 回日本甲状腺外科学会, 2015/10/29, 青山ダイヤモンドホール (東京都港区)
3. 倉田研人, 小野田尚佳, 野田 諭, 柏木 伸一郎, ほか. 甲状腺未分化癌に対する B-Raf 阻害剤の抗腫瘍効果. 第 53 回日本癌治療学会学術集会, 2015/10/31, 京都国際会議場 (京都府京都市)
4. Onoda N, et al. Weekly paclitaxel administration in patients with anaplastic thyroid carcinoma. A nationwide prospective clinical study. 15th International Thyroid Congress and 85th Annual Meeting of the American Thyroid Association. 2015/10/21-22, Orland (USA).
5. 倉田研人, 小野田尚佳, 野田 諭, 柏木 伸一郎, ほか. 甲状腺未分化癌に対する新規 MEK 阻害剤 trametinib の抗腫瘍効果. 第 74 回日本癌学会総会, 2015/10/10, 名古屋国際会議場 (名古屋市).
6. 小野田尚佳, 野田 諭, 柏木 伸一郎, ほか. 甲状腺未分化癌治療の最前線. 第 40 回日本外科系連合学会学術集会, 2015/6/19, 京王プラザホテル(東京都新宿区).
7. Onoda N, Noda S, Kashiwagi S, et al. Cytostatic effect of everolimus on a gefitinib-resistant anaplastic thyroid cancer cell line with PI3KCA mutation. International Association of Endocrine Surgeons in WCS 2015. 2015/8/23-27, Bangkok (Thailand)
8. 小野田尚佳, 野田 諭, 柏木 伸一郎, ほか. 甲状腺未分化癌細胞株を用いた分子標的治療の基礎的検討. 第 27 回日本内分泌外科学会総会, 2015/5/28, コラッセ福島 (福島県福島市).
9. 小野田尚佳, 野田 諭, 柏木 伸一郎, ほか. 甲状腺未分化癌での間葉系マーカーの発現と臨床的意義. 第 76 回日本臨床外科学会総会, 2015/11/20, ホテルハマツ (福島県郡山市)
10. 小野田尚佳, ほか. 甲状腺未分化癌に対する医師主導前向き臨床研究の開始経緯と進捗状況報告. 第 52 回日本癌治療学会総会, 2014/8/28, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
11. Onoda N, Noda S, Kashiwagi S, et al. Nestin is an independent molecular

prognostic factor in patients with anaplastic thyroid carcinoma. American Association for Cancer Research 2014 Annual meeting, 2014/4/6, San Diego (USA)

12. Onoda N, Noda S, Kashiwagi S, et al. Establishment, characterization and comparison of seven authentic anaplastic thyroid cell lines retaining clinical features of the original tumors. International Association of Endocrine Surgeons in WCS 2013, 2013/8/27 Helsinki (Sweden).
13. 小野田尚佳, 野田 諭, 柏木 伸一郎, ほか. 甲状腺未分化癌に対する治療戦略. 第 75 回日本臨床外科学会総会, 2013/11/23, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
14. 小野田尚佳, 野田 諭, 柏木 伸一郎, ほか. 甲状腺未分化癌に対する個別化した治療戦略. 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 2013/4/13, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
15. 小野田尚佳. 甲状腺未分化癌研究コンソーシアム. 第 46 回日本甲状腺外科学会学術総会, 2013/11/15, 愛知県産業労働センター (愛知県名古屋市)

〔その他〕
該当なし

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・准教授
研究者番号: 30295703

(2) 研究分担者

柏木伸一郎 (KASHIWAGI, Shinichiro)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 80637017

野田諭 (NODA, Satoru)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 20382103