

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462001

研究課題名(和文) 甲状腺癌における細胞外マトリックス成分の発現動態を介した癌転移浸潤機構の解明

研究課題名(英文) Differential expression of type IV collagen alpha3 (IV), alpha4 (IV), and alpha5 (IV) chains in non-medullary thyroid carcinoma.

研究代表者

高阪 絢子 (Kousaka, Junko)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：50440748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺悪性腫瘍(甲状腺髄様癌を除く)は濾胞上皮より発生するが、基底膜型IV型コラーゲンsecond network[$\alpha 3(IV)$ $\alpha 4(IV)$ $\alpha 5(IV)$]の発現動態について鎖特異的モノクローナル抗体を用いて、免疫組織学的に解析した。高分化型である乳頭癌、濾胞癌においては88%が保たれていたが、非高分化型である低分化癌、未分化癌においては25%に留まり、75%は完全に消失していた。基底膜型IV型コラーゲンsecond networkの発現動態が甲状腺癌の分化度と関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The majority of thyroid cancers except medullary carcinoma are derived from thyroid follicular epithelial cells. To evaluate the distribution of second BM network of type IV collagen consisted of $\alpha 3, 4, 5(IV)$ chains in non-medullary thyroid carcinoma, we investigated the cellular regulation of these $\alpha(IV)$ chains in 70 well differentiated thyroid carcinomas (WDTC) (58 papillary, 12 follicular), and eight poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas (PUDTC) (three poorly, five undifferentiated) by immunohistochemistry by using $\alpha(IV)$ chain-specific antibodies. In normal thyroid tissues, BMs of thyroid gland were composed of discontinuous $\alpha 3, 4, 5(IV)$ chains. Similar profiles were observed in 61 cases (88%) of WDTC. On the other hands, in 6 cases (75%) of PUDTC, the assembly of $\alpha 3, 4, 5(IV)$ chains was completely inhibited. The expression of second BM network seems to be associated with the differential potential of non-medullary thyroid carcinoma.

研究分野：内分泌外科学

キーワード：Type IV collagen Basement membrane Second network Thyroid cancer Non medullary cancer Differential potential

1. 研究開始当初の背景

基底膜は上皮、血管内皮細胞の基底部を裏打ちするシート状の構造物であり、実質細胞と間質を境する細胞外マトリックス成分の一つである。基底膜の主な構成成分であるIV型コラーゲンはアミノ酸末端にある7s領域同士が4分子で会合し、カルボキシル基末端にあるNC領域同士が2分子で結合することによりシート状のネットワークを形成している。近年、分子生物学的解析により、1(IV)鎖~6(IV)鎖の6種類の鎖subtype分子が同定された。これまでに(IV)鎖特異的モノクローナル抗体を用いた検討により、従来から知られているすべての上皮間質間に存在する[1(IV)]₂、2(IV)の分子構成よりなり基底膜に(classic network)の他に、臓器特異的に発現する3(IV) 4(IV) 5(IV)あるいは[5(IV)]₂、6(IV)の分子構成よりなる基底膜(second network)が存在することが明らかになっている。

我々はこれまでに乳腺・乳癌組織における(IV)鎖分子の動態を観察した(重井医学研究所との共同研究)。正常の乳管および小葉乳管において筋上皮細胞と間質の間を境する乳腺基底膜には従来型のclassic networkに加え、[5(IV)]₂、6(IV)よりなるsecond networkが存在していた。一方間質の小血管や筋線維芽細胞の基底膜はclassic networkのみで構成されていた。3(IV) 4(IV)

5(IV)よりなるsecond networkは存在しなかった。良性腫瘍においては正常の乳腺組織と同様の(IV)鎖の構成であった。筋上皮細胞の残存する乳癌非浸潤部においてはいずれの基底膜ネットワークも保たれており線状に発現していたが、乳癌浸潤部においてclassic networkは断片的に存在したが、second networkは完全に消失していた。すなわち、second networkの動態と乳癌浸潤能とが密接に関連していることを報告した¹⁾。これまでに皮膚癌、肺癌、膀胱癌、大腸癌、耳下腺腺様嚢胞癌、胃癌、食道癌においても、乳癌と同様間質に浸潤す

ると同時にsecond networkが完全に消失し、second networkの発現と癌浸潤能が密接に関連していることが報告されている²⁻⁸⁾。

2. 研究の目的

甲状腺癌組織(非髄様癌)におけるIV型コラーゲンsecond networkの免疫組織学的検出法を開発し、甲状腺腫瘍の組織型、悪性度と(IV)鎖分子動態との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

愛知医科大学乳腺内分泌外科で甲状腺疾患により生検・手術により採取された組織(濾胞腺腫12例、乳頭癌58例、濾胞癌12例、低分化癌3例、未分化癌5例)を使用した(平成15年2月愛知医科大学医学部倫理委員会承認第114号)。免疫組織染色法の至適条件の設定を行った後、生検・切除標本の主病巣部を10%ホルマリンにて24時間固定した後、パラフィン包埋を行い、5μmの連続切片を作製。一次抗体は重井医学研究所より提供された(IV)鎖特異的モノクローナル抗体を使用した。抗IV型コラーゲン鎖抗体を用いた免疫染色では抗原の賦活化を行った後1.0% H₂O₂加メタノールにて30分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を行った。非特異反応のブロッキングはPBS洗浄後、5%ウサギ正常血清を室温で30分反応させた。その後各一次抗体の反応は4で一晩行った。PBSにて洗浄後、ビオチン標識抗ラットIgGを反応させ、再度PBSにて洗浄し、avidin-biotin complexと反応させた。過酸化水素水加0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB)にて発色後、核染色を行った後封入し標本作製した。免疫染色の結果判定は甲状腺の基底側に沿って、鎖分子の線状かつ連続した鎖分子の陽性反応を伴うものを(+)、まだら状の陽性反応を(±)とし、完全に消失しているものを(-)とした。

4. 研究成果

(1) 免疫組織染色法至適条件の検討

予備実験を行い、抗体の希釈倍数を[1(IV); 400倍、2(IV); 300倍、3(IV); 200倍、4(IV); 7倍、5(IV); 200倍、6(IV); 50倍]および抗原の

賦活化法をオートクレーブ法(30分)とした。

(2) 正常甲状腺における IV 型コラーゲンの発現

正常甲状腺(非腫瘍部)34例の基底膜には線状かつ連続した classic network を認めた。間質成分との cross reaction のない 3(IV) 4(IV) 5(IV) よりなる second network が線状もしくはまだら状に存在していた。6(IV) に対する染色性を認めず、[5(IV)]₂ 6(IV) よりなる second network は存在していなかった。

(3) 良性腫瘍における IV 型コラーゲンの発現

濾胞腺腫 12 例を対象とした。濾胞腺腫基底膜には線状かつ連続した classic network を認めた。second network は 84% に線状もしくはまだら状に認めたが、16%は消失していた。

(4) 非髄様癌以外の甲状腺癌の主病巣における IV 型コラーゲンの発現

乳頭癌 58 例、濾胞癌 11 例、低分化癌 3 例、未分化癌 5 例を対象とした。Classic network においては、未分化癌の 1 例を除き、いずれにおいても線状もしくはまだら状に認めた。Second network においては乳頭癌の 88%が線状もしくはまだら状に発現、12%が消失していた。濾胞癌においては 91%が線状もしくはまだら状に発現、9%が消失していた。甲状腺分化癌である両者を合計すると 88%が線状もしくはまだら状に発現、12%が消失していた。一方、低分化癌においては 67%が線状もしくはまだら状に発現、33%が消失していた。未分化癌においては、全例消失していた。

甲状腺非分化癌である両者を合計すると 25%が線状もしくはまだら状に発現、75%が消失していた。甲状腺分化癌に比

べ、甲状腺非分化癌において有意差をもって second network の発現の消失が見られた ($p < 0.001$)。

考察

今回、甲状腺組織における IV 型コラーゲン second network の発現を明らかにした。これまで IV 型コラーゲン classic network の免疫組織学的検討にて、甲状腺癌においては濾胞癌微小浸潤型に比べ、濾胞癌広範浸潤型において、又乳頭癌に比べ濾胞癌において IV 型コラーゲンの発現量が減少していると報告されている⁹⁻¹⁰⁾。基底膜型 IV コラーゲン second network の動態が甲状腺癌の分化度と関連しており、分化度の客観的な評価に有用となる可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) Nakano, et al. Lab Invest 1999 79:281-92
- 2) Tanaka, et al. Histochem J 1997 29:563-70
- 3) Nakano, et al. J Pathol 2001 194: 420-7
- 4) Kiyofuji, et al. Histochem J 2002 34: 479-86
- 5) Ikeda, et al. Am J Pathol 2006 168:856-65
- 6) Misumi, et al. Virchow Arch 2004 445:54-62
- 7) Baba, et al. J Gastroenterol 2007 42:874-80
- 8) Baba, et al. Ann Surg Oncol 2008 15: 555-65
- 9) Kendall, et al. J Clin Pathol 1985 38: 1100-5
- 10) Katoh, et al. Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol, 1993 423:417-24

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5件)

2013年5月24日 第25回 日本内分泌外科学会(山形) 甲状腺濾胞癌における基底膜型IV型コラーゲン subtype の発現
中野正吾、藤井公人、高阪絢子、塩見有佳子、安藤孝人

2014年5月22日 第26回 日本内分泌外科学会(名古屋) 甲状腺乳頭癌、濾胞癌、髄様癌、未分化癌における基底膜型IV型コラーゲン subtype の発現 中野正吾、藤井公人、高阪絢子、塩見有佳子、安藤孝人、

2014年10月30日 第47回 日本甲状腺外科学会(福岡) 甲状腺未分化癌における基底膜型IV型コラーゲン subtype の発現 中野正吾、藤井公人、高阪絢子、塩見有佳子、安藤孝人、

2016年5月27日 第28回日本内分泌外科学会(横浜) Non-medullary thyroid carcinoma における基底膜型IV型コラーゲン subtype の発現と分化度との相関
中野正吾、藤井公人、高阪絢子、毛利有佳子、安藤孝人

April 9, 2016, 15th Congress of the Asian Association of Endocrine Surgeons, (Seoul, Korea), Differential expression of type IV collagen alpha3 (IV), alpha4 (IV), and alpha5 (IV) chains in non-medullary thyroid carcinoma. Shogo Nakano, Kimihito Fujii, Junko Kousaka, Yukako Mouri, Takahito Ando,

[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]
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高阪絢子 (KOUSAKA Junko)
愛知医科大学乳腺・内分泌外科・助教
研究者番号：50440748

(2)研究分担者

中野正吾 (NAKANO Shogo)
愛知医科大学乳腺・内分泌外科・教授
研究者番号：20351108

藤井公人 (FUJII Kimihito)
愛知医科大学乳腺・内分泌外科・准教授
研究者番号：00524331

塩見(毛利)有佳子 (SHIOMI-MOURI Yukako)
愛知医科大学乳腺・内分泌外科・助教
研究者番号：90465576

安藤孝人 (ANDO Takahito)
愛知医科大学乳腺・内分泌外科・助教
研究者番号：40634134

(3)連携研究者
なし