

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790342

研究課題名（和文） エピジェネティクス制御による甲状腺癌の分化誘導と上皮間葉転換抑制に関する研究

研究課題名（英文） Epigenetic regulation of differentiation induction and Epithelial mesenchymal transition of thyroid cancer

研究代表者

近藤 哲夫（KONDO TETSUO）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：30334858

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的はエピジェネティクス修飾により甲状腺癌細胞にTTF-1を誘導する有効的な方法の確立、TTF-1による甲状腺機能分子の再誘導の検証、TTF-1の腫瘍抑制効の解明である。結果として一過性発現、安定発現細胞株ともにTTF-1の強制発現のみによっては甲状腺機能分子の発現や甲状腺ホルモン産生を誘導することはできなかった。一方でTTF-1発現誘導により甲状腺癌細胞の増殖抑制がおこることが確認された。cDNAマイクロアレイによってTTF-1発現誘導により有意に増加する遺伝子群と減少する遺伝子群が確認された。本研究の成果によりTTF-1には腫瘍抑制的機能が存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the thyroid, Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) is essential for thyroid organogenesis and governs thyroid functions by regulating various thyroid-specific genes. Previously, we showed that epigenetics is involved with inactivation of TTF-1 in thyroid carcinomas, and provide a possible means of using TTF-1 as a target for differentiation-inducing therapy through epigenetic modification. The aims of the current study is to investigate the effective methodology for induction of TTF-1 in thyroid carcinoma cells, the re-differentiation of thyroid carcinoma due to TTF-1 restoration, and the novel tumor-suppressive properties of TTF-1 in thyroid carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：エピジェネティクス、甲状腺癌

## 1. 研究開始当初の背景

甲状腺濾胞上皮の発癌、また未分化癌へと向かうプログレッションの過程には段階的な遺伝子異常が起こっていることが知られている (Kondo T, et al. Nat Rev Cancer 2006)。RET/PTC 遺伝子再構成や BRAF 変異による MAPK シグナル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 T, et al. Hum Pathol 2007)、p53 変異や  $\beta$  catenin 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。これらの遺伝子異常の多段階的集積と相関して甲状腺癌の脱分化も段階的に起こっている。甲状腺癌の分化は形態学的には濾胞構造と細胞異型、機能学的には甲状腺ホルモンの合成とそれを制御する様々な機能分子の発現から規定されるが、形態学的分化と機能学的分化はほぼ一致しており、濾胞上皮、甲状腺癌細胞の機能や分化を制御する上で重要な役割を担っているのが TTF-1、TTF-2、PAX-8 といった転写因子群である。TTF-1 は 1989 年にクローニングされた DNA 結合蛋白分子で、その発現には臓器特異性があり、甲状腺 (濾胞上皮、C 細胞)、肺胞上皮、脳 (ラット胎児) に発現がみられる。TTF-1 のノックアウトマウスでは甲状腺、肺、前頭葉が無形成となり、これらの器官発生に必須の遺伝子と考えられている。器官発生後も甲状腺濾胞上皮において TTF-1 は TTF-2、PAX-8 と協調しサイログロブリン、TSH 受容体、甲状腺ペルオキシダーゼ、ヨード輸送体 (NIS、PDS)

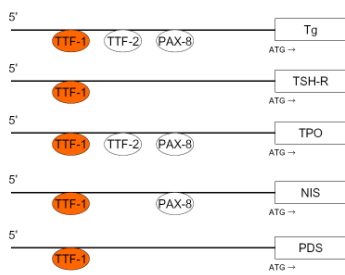


図1 甲状腺機能分子プロモーター

などの機能遺伝子を制御し、甲状腺ホルモン合成に関して重要な機能的役割を

果たしている (図1)。また腫瘍においては良性腫瘍や高分化甲状腺癌で TTF-1 発現をみるが、未分化癌では TTF-1 の発現が高度に抑制されており脱分化と TTF-1 発現に相関性があることが知られている。我々はこれまでの研究で TTF-1 のプロモーター領域を含む広い範囲に CpG island が存在しており (図2)、TTF-1 発現が抑制されている甲状腺未分化癌や癌細胞株で TTF-1 プロモーターに DNA

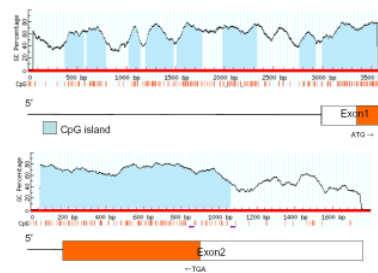


図2 TTF-1プロモーターCpGアイランド

過剰メチル化が存在すること、TTF-1 発現とヒストン H3 蛋白の修飾に相

関があることを報告してきた (Kondo T, et al. Lav Invest 2009)。これは甲状腺癌の機能的脱分化過程にエピジェネティクスが関与することを示しており、逆にエピジェネティクス機構を介して癌細胞を再分化できる可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では甲状腺濾胞上皮の機能分化を司る TTF-1 遺伝子に主な焦点を当て、相互に関連する三つの課題についての解明を試みる。第一はエピジェネティクス機構の修飾により甲状腺癌細胞に TTF-1 を誘導する有効的な方法を確立すること。第二は分化誘導への発展性を探るべく TTF-1 の gain-/loss-of-function によるアプローチから甲状腺癌細胞において TTF-1 に誘導される甲状腺機能分子の発現と甲状腺ホルモンの産生・分泌能の獲得を in vivo、in vitro のレベルで明らかにすること。第三は TTF-1 を含めた甲状腺機能分子の発現と甲状腺ホルモン産生の獲得がもたらす腫瘍抑制効果を分子物学的に検証することである。

甲状腺癌では癌遺伝子、癌抑制遺伝子のエピジェネティクス機構による遺伝子発現制御が発癌・プログレッションに重要な役割を果たしている(Kondo, T et al. Cancer Res 2007. Kondo T, et al. Endocrinol Metab Clin North Am 2008)。さらに腫瘍発生に直接に関わる遺伝子のみでなく、様々な甲状腺機能分子の発現を調節している転写因子TTF-1 がプロモーターのDNA メチル化により発現が抑制されていること、TTF-1 遺伝子領域のヒストンH3 蛋白(Lys3)のジメチル化がTTF-1 の発現抑制と相関することを我々は解明し、さらにDNA 脱メチル化薬剤である5-Aza-2-deoxycytidine (AZA)の処理により甲状腺癌細胞にTTF-1 mRNA を再誘導させることに成功した(Kondo T, et al. Lav Invest 2009)。しかしながらTTF-1 による分化誘導のためには癌細胞に機能的なTTF-1 蛋白を十分量発現させることが必要であり、本研究ではまずAZA を含むDNA 脱メチル化薬剤やTrichostatin を含むヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などのエピジェネティクス機構を修飾する薬剤を用いてTTF-1 を誘導する最も有効な方法と条件を決定する。次に甲状腺癌細胞に誘導したTTF-1 蛋白の機能解析の目的で、TTF-1 の標的遺伝子であるサイログロブリン、TSH 受容体、甲状腺ペルオキシダーゼ、ヨード輸送体などの甲状腺機能分子の発現、またヨード取り込みや甲状腺ホルモンの産生・分泌能の獲得についての検討を行う。TTF-1 遺伝子を介して甲状腺癌細胞にヨード取り込み能を亢進させる試みは未分化癌に対して放射性ヨード療法を可能にするという観点から極めて重要である。

次にTTF-1 を含めた甲状腺機能分子の誘導または甲状腺ホルモン産生の獲得が甲状腺癌細胞の生物学的特性にどのような影響を与えるかを増殖、浸潤の側面から検討を行う。特に腫瘍の浸潤、転移のメカニズムに深く関与する上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition,

EMT)は近年注目されている細胞現象の1つであるが、甲状腺癌培養細胞を用いた我々の予備実験ではEMT マーカー (TWIST、N-cadherin) と細胞移動能・浸潤能はTTF-1 発現とは負の相関を示した(表1)。実際に甲状腺未分化癌は高度の浸潤能を有し、形態的にも“sarcoma-like”となることが多い。これは浸潤・EMT 現象に直接

	Thyroid Carcinoma Cell Lines		
	KTC-1	TPC-1	WRO
Morphology	Epithelial-like	Epithelial-like	Epithelial-like
TTF-1 mRNA	+	-	-
TWIST mRNA	-	+	+
N-cadherin	ND	+	+
E-cadherin	ND	-	-
Migration	-	+	+
Invasion	-	+	+

表1 EMT マーカーの発現

または間接に甲状腺濾胞上皮の分化と関係があることを示唆している。そこで本研究では癌細胞におけるTTF-1 再誘導が細胞形態、EMT マーカー、浸潤能に与える影響について解析を行う。最後にTTF-1 を導入した甲状腺癌細胞の遺伝子発現の変化をcDNA microarray によってスクリーニングし、甲状腺ホルモン産生、増殖、浸潤に作用するTTF-1 の標的遺伝子を新たに同定し、その作用の分子メカニズムを解明したい。

### 3. 研究の方法

平成22年度は人体外科手術材料、ヒト甲状腺癌培養細胞を用いて、甲状腺癌における TTF-1、TTF-2、PAX-8 の転写群や甲状腺機能分子の発現とその相互関係の分析、またこれら遺伝子プロモーターの DNA メチル化状態及びヒストンのアセチル状態の解析、薬剤を用いた DNA・ヒストンの人工的修飾による TTF-1 発現の誘導についての実験をおこなった。また平成 22 年度には TTF-1 遺伝子の甲状腺癌細胞に対するホルモン産生機能と腫瘍増殖への作用を調べ、TTF-1 cDNA 発現ベクターの構築と、細胞株へのトランスフェクションを行い TTF-1 発現または安定細胞株の樹立をおこなった。

平成 23 年度は TTF-1 強制発現/TTF-1 ノックダウン安定細胞株を用い、1) 甲状腺機能分子の誘導と甲状腺ホルモン再生の獲得能、2) 癌細胞の増殖、浸潤、上皮間葉転換(EMT)に対

する作用を *in vitro*、*in vivo* で検討した。

平成 24 年度は平成 22-23 年度に引き続き追加実験と TTF-1 強制発現安定細胞株を用いて cDNA マイクロアレイで遺伝子発現の変化を網羅的にスクリーニングし TTF-1 に誘導される新規標的遺伝子の同定、甲状腺癌細胞に対する TTF-1 の作用メカニズムを検討した。

成果発表(学会報告、専門誌投稿)と研究展開:本研究の研究成果はその専門的な内容を考慮して国際専門誌に投稿を予定している。また本研究によって得られた研究データや新知見に基づき、甲状腺未分化癌治療の実用化に向けたさらなるトランスレーショナルリサーチを行うため平成 25 年度以降の計画・立案を行った。

#### 4. 研究成果

TTF-1 の全長 cDNA をインサートした発現ベクター(図3)を TTF-1 発現陰性の甲状腺癌培養細胞株にトランスフェクションし、TTF-1 の一過性

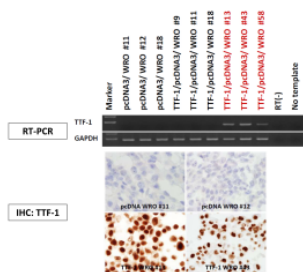


図3 TTF-1 発現細胞株の樹立

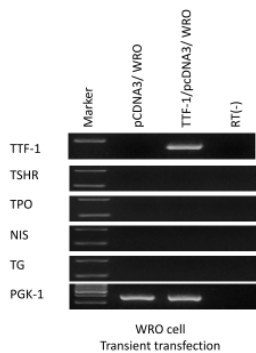


図4 甲状腺機能分子の誘導

甲状腺機能分子の発現や甲状腺ホルモン産生を誘導することはできなかった(図4)。

TTF-1 の発現誘導による上皮間葉移行

発現細胞及び薬剤選択による TTF-1 の安定発現細胞株を樹立した。一過性

発現、安定発現細胞株ともに TTF-1 の強制発現のみによってはサイログロブリン、TSH 受容体、ヨード輸送体 NIS、サイロイドペルオキシダーゼなどの

(EMT)、浸潤能への影響について EMT 関連転写因子 TWIST、SNAI1、MMP2 の遺伝子発現を分析したが TTF-1 強制発現細胞株と TTF-1 陰性コントロール細胞株で有意な差は認められなかった。

MTT 細胞増殖アッセイでは TTF-1 発現誘導

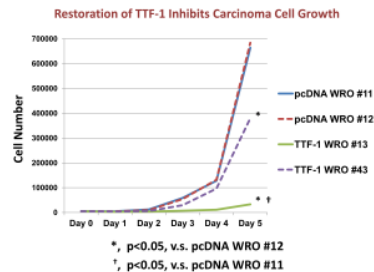


図5 MTT 増殖アッセイ

により甲状腺癌細胞の増殖抑制が有意に起こることが確認された(図5)。TTF-1 による増殖抑制のメカニズムをさらに探るため TTF-1 強制発現細胞株と TTF-1 陰性コントロール細胞株の mRNA 発現の差異を cDNA マイクロアレイによって網羅的分析を行い TTF-1 発現誘導により有意に増加する遺伝子群と減少する遺伝子群が確認された(図6)。

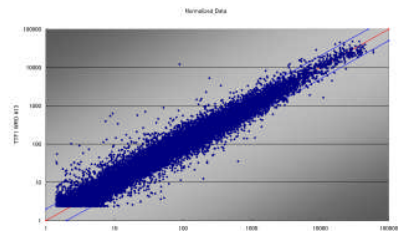


図6 cDNA マイクロアレイ

#### 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 1 件)

- 1) 近藤哲夫, 加藤良平. 甲状腺癌の遺伝子異常と分子病理診断. 最新医学 67:419-427, 2012. 査読無

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) Tetsuo Kondo, Dongfeng Niu, Tadao Nakazawa, Tomonori Kawasaki, Naoki Oishi, Kunio Mochizuki, Tetsu Yamane, Ryohei Katoh. Aberrant Expression of the Runx Family Genes in Thyroid Carcinomas. The 101st Annual meeting of United States

- and Canadian Academy of Pathology (USCAP), Vancouver, Canada, 2012 (一般演題)
- 2) **近藤哲夫**. 甲状腺乳頭癌充実型. 第45回甲状腺外科学術集会. 横浜, 2012 (シンポジウム)
  - 3) **近藤哲夫**. 甲状腺癌におけるエピジェネティクス異常と癌の分化誘導に関する研究. 第100回日本病理学会総会. 横浜, 2011 (学術奨励賞受賞発表)
  - 4) **Tetsuo Kondo**, Tadao Nakazawa, Tomonori Kawasaki, Kunio Mochizuki, Dong-Feng Niu, Tetsu Yamane and Ryohei Katoh. A Genome-wide Screening of Promoter DNA Methylation Reveals Differential Profiles of Follicular-cell Derived Thyroid Neoplasms. The 100th Annual meeting of United States and Canadian Academy of Pathology (USCAP), San Antonio, USA, 2011 (一般演題)
  - 5) **Tetsuo Kondo**, Tadao Nakazawa, Tomonori Kawasaki, Kunio Mochizuki, Dong-Feng Niu, Tetsu Yamane, Ryohei Katoh. Expression of Adenosine Receptors in Thyroid Carcinoma. The 100th Annual meeting of United States and Canadian Academy of Pathology (USCAP), San Antonio, USA, 2011 (一般演題)
  - 6) **Kondo T.** Epigenetic Dysregulation in Thyroid cancer. Symposium, the annual meeting of the Korean Endocrine Society, Daegu, Korea, 2010 (招待講演)
  - 7) **Tetsuo Kondo**, DeFu Ma, DongFeng Niu, Tadao Nakazawa, Tomonori Kawasaki, Kunio Mochizuki, Tetsu Yamane, Ryohei Katoh. Overexpression of Adenosine Receptor A1 (ADORA1) Regulates Thyroid Cancer Cell Invasion. The 14th International Congress of Endocrinology (ICE 2010), Kyoto, Japan, 2010 (一般演題)
  - 8) **近藤哲夫**. 甲状腺転写因子TTF-1のエピジェネティクス制御. 第51回日本組織細胞学会, 東京, 2010 (若手研究者学術奨励賞受賞講演)
  - 9) **近藤哲夫**. 甲状腺転写因子TTF-1のエピジェネティクス制御と癌の分化誘導に関する研究. 第15回山梨科学アカデミー総会, 山梨, 2010 (山梨科学アカデミー奨励賞受賞講演)
  - 10) **近藤哲夫**. 病理診断のための免疫組織化学法. 第35回組織細胞化学講習会, 山梨, 2010 (講演)
  - 11) **近藤哲夫**, 中澤匡男, 望月邦夫, 川崎朋範, 山根徹, 加藤良平. 甲状腺濾胞癌の病理. 第14回日本内分泌病理学会学術総会, 京都, 2010 (シンポジウム)
- [図書] (計 3件)
1. **近藤哲夫**, 加藤良平. 遺伝性甲状腺癌. 坂本穆彦、廣川満良編. 腫瘍病理鑑別アトラス甲状腺癌, 第1版. 東京: 分光堂. 2011: 209-216.
  2. **近藤哲夫**, 中澤匡男, 加藤良平. 内分泌の疾患-甲状腺. 日本臨床分子形態学会編. 病気の分子形態学. 東京: 学際企画. 2011: 334-337.
  3. **近藤哲夫**, 中澤匡男, 川崎朋範, 望月邦夫, 山根徹, 加藤良平. 病理診断のための免疫組織化学. 日本組織細胞化学編. 組織細胞化学2010. 京都市: 中西印刷. 2010: 185-195
- [その他]
- ホームページ等  
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](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・大学院医学工学総合研究部・准教授  
研究者番号: 30334858
    - (2) 研究分担者  
なし
    - (3) 連携研究者  
なし