

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591371

研究課題名(和文) 未知なる甲状腺幹細胞を探す 甲状腺は再生する臓器か？

研究課題名(英文) Search for unknown thyroid stem cells - Can the thyroid regenerate? -

研究代表者

尾崎 敬(Ozaki, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40351390

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)：甲状腺再生の有無を調査するため、再生に必要な幹細胞(もしくは癌幹細胞)存在の有無を検討した。幹細胞・癌幹細胞遺伝子としてOct4が重要な因子とされているが、この遺伝子発現を誘導する手段として我々はマイクロ波を利用した方法を確立し、甲状腺未分化癌から(癌)幹細胞を誘導する可能性を形態学的・分子生物学的に示した。

マイクロ波照射(2450MHz、47℃)後、未分化癌の細胞形態が変化し、細胞接着が低下することが示された(spheroid形成)。さらにOct4遺伝子発現が有意に増加することが示され甲状腺(癌)幹細胞である可能性を示唆した。(癌)幹細胞の存在は今後の甲状腺再生の可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：To examine thyroid regeneration, the presence or absence of stem cells (or cancer stem cells) required for the regeneration was examined. The Oct4 gene is an important stem cell/cancer stem cell factor. We established a method to induce Oct4 gene expression using microwave irradiation, demonstrating morphologically and molecularly that cancer stem cells may be induced from anaplastic thyroid cancer.

Microwave irradiation (2,450 MHz, 47℃) morphologically altered anaplastic thyroid cancer cells and reduced cell adhesion (spheroid formation). In addition, Oct4 gene expression was significantly increased, suggesting the presence of thyroid (cancer) stem cells. The presence of (cancer) stem cells suggests the future possibility of thyroid regeneration.

研究分野：甲状腺再生

キーワード：甲状腺 再生 幹細胞 癌細胞 マイクロ波

1. 研究開始当初の背景

甲状腺再生は、マウスの甲状腺を切除する動物実験で確認されている。マウス甲状腺再生部では、幼若細胞・前駆細胞が出現し、この再生部で出現する幼若細胞・前駆細胞の由来が組織幹細胞あるいは脱分化した甲状腺細胞であることが示唆されている。さらに遺伝子レベルの検索からマウス甲状腺再生には癌あるいは胎生期甲状腺発生に関連する発現遺伝子群が関与することが示唆されている。マウス甲状腺再生については過去に報告がなされているが、一方ヒト甲状腺での再生については十分な検討がなされていない。その理由としてヒト甲状腺組織内において幹細胞の存在が十分解明されていないことが主な原因とされる。甲状腺癌については癌幹細胞の存在を示す報告があり、とくに甲状腺未分化癌の発生は遺伝子異常をきたした幹細胞に由来する説がある。(癌)幹細胞の存在を明らかにすることは、今後ヒト甲状腺組織再生の可能性を意味する。今回、甲状腺未分化癌幹細胞についてその存在の有無を検討した。

2. 研究の目的

ヒト甲状腺が再生する臓器かどうかを検討するにあたり、組織再生に必要と考えられる幹細胞が組織内に存在するか検証する必要があった。マウス動物実験から甲状腺再生には癌あるいは胎生期甲状腺発生に関連する発現遺伝子群が深く関係することが示唆されており、今回のヒト甲状腺再生の研究においても癌関連遺伝子と胎生期幹細胞遺伝子について検討した。

甲状腺未分化癌の癌幹細胞は甲状腺幹細胞の遺伝子異常により発生するという説があり、甲状腺未分化癌の癌幹細胞の存在を明らかにすることが、すなわち甲状腺幹細胞の存在につながると考えた。

マウス甲状腺再生に係る発現遺伝子群を参考にして、ヒト甲状腺再生を検討する場合に癌遺伝子・幹細胞遺伝子に直接深く関係する甲状腺未分化癌を今回の主な研究材料とし、甲状腺未分化癌に癌幹細胞が存在するかを検証することを主な研究目標とした。

我々は、以前からマイクロ波を用いた甲状腺癌細胞の形態変化を研究してきた。甲状腺癌細胞株にマイクロ波照射を行い、生存する細胞が接着性に乏しい類円形細胞への変化あるいは Spheroid 形成を示すことを経験している。

今回、甲状腺未分化癌にマイクロ波処理を行い類円形細胞変化あるいは Spheroid 形成した細胞について癌幹細胞との関連性を検討した。

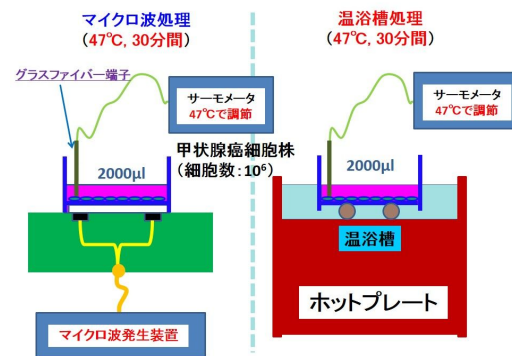
3. 研究の方法

(1) 材料と方法

甲状腺未分化癌 (8505C) を直径 30mm 培養皿で 2 週間培養後、癌細胞が培養皿床面に

十分広がった状態 (confluent) で、マイクロ波照射処理 [2450 MHz、45 あるいは 47、30 分間処理] を行った。それぞれの実験で対照 (温浴槽処理あるいは非処理) を設定し比較検討した。各処理での温度設定はガラスファイバーを使用した温度センサー (サーモメータ) で行った。

図 1. マイクロ波照射処理と温浴槽処理 (対照) の実験図 (47、30 分間で処理した場合)



(2) マイクロ波照射処理後の形態観察

マイクロ波照射処理後 (45、47、30 分間) 1 週間後、2 週間後を顕微鏡下で観察した。

対照として温浴槽処理後 (45、47、30 分間) の癌細胞を比較検討した。

(3) Brdu 染色

マイクロ波処理後 (47、30 分間) 1 週間で Brdu 染色 (染色キット使用) を行い癌細胞増殖の有無を検討した。

対照として温浴槽処理後 (47、30 分間) の癌細胞を比較検討した。

(4) Necrosis/Apoptosis 染色

マイクロ波処理後 (47、30 分間) 1 週間で Necrosis/Apoptosis 染色 (染色キット使用) を行い癌細胞生存の有無を検討した。

対照として温浴槽処理後 (47、30 分間) の癌細胞を比較検討した。

(5) 発現遺伝子検討

マイクロ波処理後 (45、47、30 分間) 1 週間で Oct4、E-cadherin 遺伝子発現を検討した。生存細胞から mRNA を抽出し、cDNA 合成キットを利用して cDNA を合成した。遺伝子発現は Real-time PCR 法にて解析した。

対照として、培養後 1 週間で培養皿床に Confluent に広がった (非処理) 未分化癌細胞を使用した。

4. 研究成果

(1) マイクロ波照射処理後の形態観察

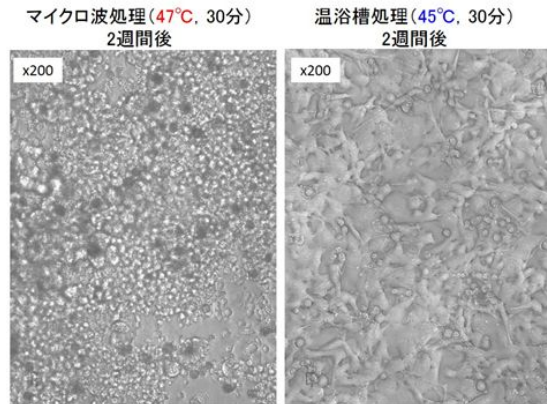
マイクロ波照射処理 (45、47) 後、1 週間で細胞集団形成 (コロニー形成) を認められた。マイクロ波照射処理をした未分化癌細胞は敷石状配列から類円形細胞に形態変化し、接着性の低下した Spheroid 形成と浮遊した細胞集団形成を認めた。この現象は 2 週間後

も確認された。45 と比較して 47 では癌細胞の数が減少したが、類円形細胞への形態変化、接着性の低下した Spheroid 形成、そして浮遊した細胞集団形成は確認された。

対照として、温浴槽処理後の形態観察では、1 週間後、2 週間後、47 で処理された大部分の未分化癌細胞は培養皿床面から剥がれ浮遊・萎縮し、その後の細胞集団形成を認めなかった。45 でも培養皿床面から剥がれ浮遊・萎縮した未分化癌細胞が目立ったが、2 週間後には一部の癌細胞は接着性を保持したまま敷石状の広がりを示した。

マイクロ波処理と温浴槽処理とを比較した場合、マイクロ波照射処理された癌細胞で類円形細胞への形態変化、Spheroid 形成、そして浮遊した細胞集団形成を認めた。

図 2 . マイクロ波照射処理後と温浴水処理後の細胞形態変化の比較



(2) Brdu 染色

マイクロ波処理後の細胞では Brdu 陽性細胞を多数認めた。

対照では Brdu 陽性細胞は確認されなかった。

マイクロ波処理と温浴槽処理とを 47 で比較した場合、マイクロ波照射処理された癌細胞で細胞増殖を示した。

(3) Necrosis/Apoptosis 染色

マイクロ波処理後では、接着性の乏しい細胞（類円形細胞あるいは spheroid 細胞）と浮遊した細胞集団で多数の生存細胞が確認された。一方対照では、壊死細胞が目立ち、生存細胞はわずかであった。

マイクロ波処理と温浴槽処理とを 47 で比較した場合、マイクロ波照射処理された癌細胞で生存細胞が目立った。

(4) 発現遺伝子検討

マイクロ波処理後（45、47）Oct4 発現は対照と比較して増加し、特に 47 では有意な発現増加を示した（p 値 < 0.01）。E-cadherin 発現はマイクロ波処理後、対照と比較して減少する傾向を示した。形態学的に観察される接着性低下に伴う類円形細胞変化あるいは Spheroid 形成と E-cadherin 遺伝子発現低下は、細胞形態変化と発現遺伝子の

関連性について矛盾しない結果と考える。ただし、有意差は認めず、E-cadherin 以外の別の接着因子が Spheroid 形成に関与している可能性も今後検討する必要がある。

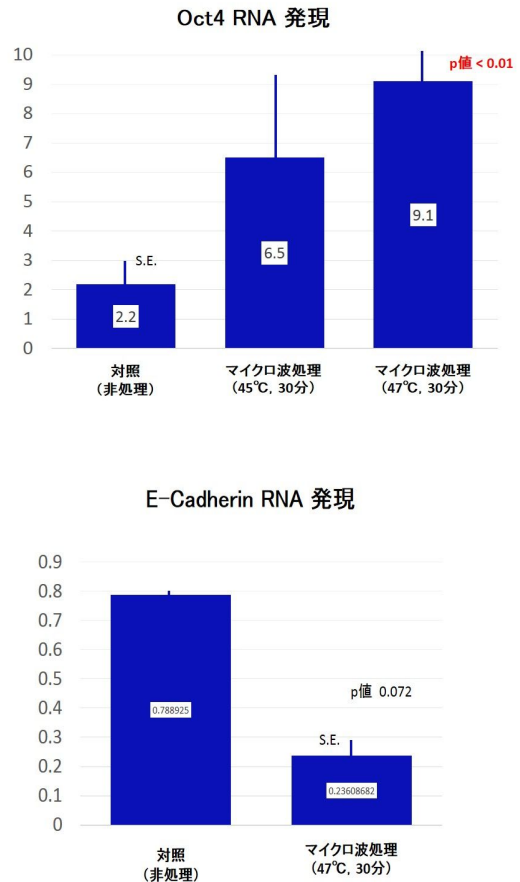


図 3 . マイクロ波照射後の Oct4、E-Cadherin 遺伝子発現。

幹細胞・癌幹細胞遺伝子として Oct4 が重要な因子とされているが、この Oct4 遺伝子発現を誘導する手段として我々はマイクロ波照射を利用した。

マイクロ波照射後、甲状腺未分化癌の細胞形態が変化し、細胞接着が低下することが示された（類円形細胞への変化あるいは spheroid 形成）。さらに Oct4 遺伝子発現が有意に増加することが示され甲状腺癌幹細胞としての可能性を示した。

今回の研究で、甲状腺未分化癌から癌幹細胞を誘導する可能性を形態学的・分子生物学的に示した。（癌）幹細胞の存在を明らかにすることは、今後の研究において甲状腺が幹細胞から再生する臓器（組織）である可能性を示すものとする。

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. Hayase S, Sasaki Y, Matsubara T, Seo D, Miyakoshi M, Murata T, Ozaki T, Kakudo K, Kumamoto K, Ylaya K, Cheng SY, Thorgeirsson SS, Hewitt SM, Ward JM, Kimura S. Expression of stanniocalcin 1 in thyroid side population cells and thyroid cancer cells. *Thyroid*. 2015 Apr;25(4):425-36.(査読 有)
 2. Wakasa T, Li Y, Bai Y, Liu Z, Ozaki T, Mori I, Miyauchi A, Kakudo K, Nakamura M. Up-regulation of urinary-type plasminogen activator correlates with high-risk papillary thyroid carcinoma with BRAFV600E mutation and its possible molecular mechanism. *Pathol Res Pract*. 2014 Jul 16. S0344-0338(14)00195-2 [Epub ahead of print].(査読 有)
 3. Kakudo K, Bai Y, Ozaki T, Homma K, Ito Y, Miyauchi A. Intrathyroid epithelial thymoma (ITET) and carcinoma showing thymus-like differentiation (CASTLE): CD5-positive neoplasms mimicking squamous cell carcinoma of the thyroid. *Histol Histopathol*. 2013 May;28(5):543-56. (査読 有)
 4. Ozaki T, Matsubara T, Seo D, Okamoto M, Nagashima K, Sasaki Y, Hayase S, Murata T, Liao XH, Hanson J, Rodriguez-Canales J, Thorgeirsson SS, Kakudo K, Refetoff S, Kimura S. Thyroid regeneration : characterization of clear cells after partial thyroidectomy. *Endocrinology*. 2012;153(5):2514-25. (査読 有)
 5. Li Y, Zhou G, Ozaki T, Nishihara E, Matsuzuka F, Bai Y, Liu Z, Taniguchi E, Miyauchi A, Kakudo K. Distinct histopathological features of Hashimoto's thyroiditis with respect to IgG4-related disease. *Mod Pathol*. 2012;25(8):1086-97. (査読 有)
 6. Nishigami K, Liu Z, Taniguchi E, Koike E, Ozaki T, Mori I, Kakudo K. Cytological features of well-differentiated tumors of uncertain malignant potential: Indeterminate cytology and WDT-UMP. *Endocr J*. 2012;59(6):483-7. (査読 有)
 7. Kakudo K, Li Y, Taniguchi E, Mori I, Ozaki T, Nishihara E, Matsuzuka F, Miyauchi A. IgG4-related disease of the thyroid glands. *Endocr J*. 2012;59(4):273-8. (査読 有)
 8. Kakudo K, Bai Y, Liu Z, Li Y, Ito Y, Ozaki T. Classification of thyroid follicular cell tumors: with special reference to borderline lesions. *Endocr J*. 2012;59(1):1-12. Review. (査読 有)
 9. Kakudo K, Bai Y, Liu Z, Ozaki T. Encapsulated papillary thyroid carcinoma, follicular variant: a misnomer. *Pathol Int*. 2012;62(3):155-60. Review. (査読 有)
- [学会発表](計 14 件)
1. 尾崎敬, 田伏克惇, 渡邊雄也, 覚道健一, 孫玉静, 下角あい子, 中西雅子, 佐藤冬樹, 及川恒輔, 村垣泰光. 甲状腺未分化癌細胞株に対する非熱的マイクロ波効果の検討. 第 33 回 Microwave Surgery 研究会 2014, 高槻市(大阪)
 2. 浅野麻実子, 田中智, 坂口実, 高岡昌徳, 平田雅彦, 山口敬子, 松村人志, 藤田芳一, 田伏克惇, 仲谷博文, 尾崎敬. マイクロ波の非熱性効果による細胞死誘導メカニズムに関する基礎的研究(2). 第 33 回 Microwave Surgery 研究会 2014, 高槻市(大阪)
 3. 尾崎敬, 田伏克惇, 渡邊雄也, 孫玉静, 下角あい子, 中西雅子, 佐藤冬樹, 及川恒輔, 覚道健一, 村垣泰光. 甲状腺未分化癌細胞株に対するマイクロ波効果の検討. 第 42 回和歌山悪性腫瘍研究会 2014 年 12 月, 和歌山市
 4. 浅野 麻実子, 田中智, 坂口実, 高岡昌徳, 平田雅彦, 仲 博文, 田浦映恵, 尾崎敬, 山口敬子, 松村人志, 藤田芳一, 田伏克惇. HL-60 の増殖にマイクロ波が及ぼす影響: The effect of microwave irradiation on the proliferation in HL-60 cells 第 7 回日本電磁波エネルギー応用学会 (JEMEA) 2014, 東京工業大学 (東京)
 5. 尾崎敬, 覚道健一, Gui Ting, Sun Yujing, 下角あい子, 伊藤俊治, 及川恒輔, 村垣泰光, Shioko Kimura. 甲状腺は再生する臓器か? - マウス動物実験から検討 - 第 86 回日本内分泌学会学術総会 (The 86th Annual Meeting of the Japan Endocrine Society) 2013.4.25-27 仙台市
 6. 尾崎敬, 覚道健一, Gui Ting, Sun Yujing, 下角あい子, 伊藤俊治, 及川恒輔, 田伏克惇, 村垣泰光. 甲状腺癌細胞株に対する非熱的マイクロ波効果の検討. 第 102 回 日本病理学会総会 2013.6.6-8 札幌市
 7. 尾崎敬, 田伏克惇, 孫玉静, 下角あい子, 伊藤俊治, 及川恒輔, 覚道健一, 村垣泰光. マイクロ波効果 - 基礎的研究 - 甲状腺癌細胞株に対する非熱的マイクロ波

- 効果の検討. 第 32 回 Microwave Surgery 研究会 2013.9.13-14 東京都
8. 浅野麻実子, 田中智, 坂口実, 高岡昌徳, 平田雅彦, 山口敬子, 松村人志, 藤田芳一, 田伏克悫, 中谷博文, 田浦映恵, **尾崎敬** マイクロ波効果 - 基礎的研究 - マイクロ波の非熱性効果による細胞死誘導メカニズムに関する基礎的検討. 第 32 回 Microwave Surgery 研究会 2013.9.13-14 東京都.
 9. 南部誠太郎, 中谷博文, 恩地實, 阿部準一, 後藤城一, 中村純子, 棟方哲, 庄野嘉治, 堀内哲也, 田浦映恵, **尾崎敬**, 浅野麻実子, 山口敬子, 藤田芳一, 田伏克悫. マイクロ波効果 - 基礎的研究 - 迅速凍結標本での半導体方式マイクロ波効果. 第 32 回 Microwave Surgery 研究会 2013.9.13-14 東京都
 10. 南部誠太郎, 中谷博文, 恩地實, 阿部準一, 後藤城一, 中村純子, 棟方哲, 庄野嘉治, 堀内哲也, 田浦映恵, **尾崎敬**, 浅野麻実子, 山口敬子, 藤田芳一, 田伏克悫. マイクロ波効果 - 基礎的研究 - 半導体方式マイクロ波凍結切片作製装置 - ペルチェ方式を用いた迅速冷凍法 - 第 32 回 Microwave Surgery 研究会 2013.9.13-14 東京都
 11. 中谷博文, 渡邊雄也, 南部誠太郎, 恩地實, 阿部準一, 後藤城一, 田中正俊, 庄野嘉治, 堀内哲也, **尾崎敬**, 浅野麻実子, 山口敬子, 藤田芳一, 田伏克悫. 半導体方式マイクロ波凝固装置を用いた肝拡大凝固法の検討 間欠照射と連続照射の比較 第 32 回 Microwave Surgery 研究会 2013.9.13-14 東京都
 12. 中谷博文, 渡邊雄也, 南部誠太郎, 恩地實, 阿部準一, 後藤城一, 田中正俊, 庄野嘉治, 堀内哲也, **尾崎敬**, 浅野麻実子, 山口敬子, 藤田芳一, 田伏克悫. 半導体方式マイクロ波凝固装置を用いた肝拡大凝固法の検討 周波数の違いによる比較 第 32 回 Microwave Surgery 研究会 2013.9.13-14 東京都
 13. **尾崎敬** マイクロ波の医療における新しい展開 - マイクロ波効果について - 第 31 回 Microwave Surgery 研究会 特別講演, 大阪市, 2012
 14. **尾崎敬** 甲状腺癌細胞株に対するマイクロ波非熱効果 (non-thermal effects) の検討 第 40 回和歌山悪性腫瘍研究会 (研究助成成果発表), 和歌山市, 2012

〔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：
出願年月日：
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

尾崎 敬 (OZAKI, Takashi)
和歌山県立医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：40351390

(2) 研究分担者

村垣 泰光 (MURAGAKI, Yasuteru)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40190904

(3) 連携研究者

()

研究者番号：