

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19535

研究課題名(和文) 甲状腺癌幹細胞の研究：ALDH機能解析と可塑性について

研究課題名(英文) Studies on thyroid cancer stem cells: ALDH function analysis and plasticity

研究代表者

嶋村 美加 (SHIMAMURA, Mika)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：90736406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺癌においてALDH酵素活性は癌幹細胞の有力な候補であるが、可塑性があることが分かっている。甲状腺癌由来細胞株とALDH阻害剤を用いてスフィアアッセイを行ったが、ALDHを阻害してもスフィア形成に影響はなかった。また、ALDH酵素のうちALDH1A3の発現が高いことを確認したため、活性が高い細胞のALDHをノックダウンした細胞、また逆に活性が低い細胞に強制発現した細胞を作成し同様の検討を行った。どちらの細胞株でもスフィア形成能に変化は見られず、これらには関係性がないことが示唆された。このことからALDHはマーカーにはなるが、癌幹細胞の特性に役割をはたしていない可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our previous study has revealed that aldehyde dehydrogenase (ALDH) is a candidate marker for thyroid cancer stem cells, although its activity is flexible. In vivo sphere formation assay was used anaplastic thyroid cancer cell lines and ALDH inhibitor, It almost completely suppressed ALDH activity without affecting spherogenicity. In addition, we identified that among isozymes in human ALDH superfamily, ALDH1A3 was the main isozyme in thyroid cancer cell lines. Then We knockdown ALDH1A3 of high ALDH activity cells using shRNA, we check the effects of spherogenesis, it is no effect on spherogenicity. Furthermore, forced expression of ALDH1A3 in low ALDH activity cell, we got same result. It is no relationship between ALDH activity and spherogenicity. In conclusion, we here show no functional role for ALDH activity in thyroid thyroid cancer stem cells properties. That is, ALDH activity and spherogenicity are clearly dissociable.

研究分野：内分泌学

キーワード：癌幹細胞 甲状腺癌

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞 (Cancer stem cells, CSC) の同定とその特性の解析、さらにはそれらを標的とした治療法の開発は癌克服のための大きな研究テーマである。その戦略として、CSC の“幹”細胞としての特性を標的とした治療法を確立できれば、癌の根絶に大きく近づけると考える。申請者は以前甲状腺癌細胞株を用いた細胞表面マーカー等の網羅的解析を行なった。その結果を以下にまとめる。

- (1) 8 種類の甲状腺癌細胞株 (未分化癌由来細胞-FRO、KTC2/3、ACT1、8505C; 分化型乳頭癌由来細胞株-KTC1、TPC1; 分化型濾胞癌由来細胞株-WRO) のうち、4 つの未分化癌由来細胞株のみで、CSC の指標となる *in vitro* スフェア形成能と *in vivo* 腫瘍形成能が認められた。
 (2) このうち FRO、KTC3、ACT1 の 3 種類で ALDH 活性とスフェア形成能に高い正の相関が見られた。
 (3) ALDH 活性は可塑性を示し、ALDH 陽性 (すなわち CSC) ALDH 陰性 (non-CSC) と変化した。

以上、増殖性が高く予後が極めて悪い未分化癌でのみ、CSC の存在が確認され、全ての細胞においてではないが、CSC のマーカーとしての ALDH の有用性が示唆された。さらに、ALDH を指標とした場合、CSC non-CSC という方向の変化が特徴とされるヒエラルキーを示さず、ALDH 活性は CSC と non-CSC の間でダイナミックに変化することが明らかとなった。

2. 研究の目的

この研究計画ではそれらの研究をさらに発展・深化させて、以下の 2 点を明らかにすることを目的に研究した。

- (1) ALDH 酵素活性と CSC 機能の関連
 (2) 可塑性の分子メカニズム解明

3. 研究の方法

- (1) ALDH 酵素活性と CSC 機能の関連
 ALDH 阻害剤 (DEAB, DS) や si/shRNA による ALDH 活性抑制が CSC 形成に及ぼす影響の検討
 このための甲状腺がん発現 ALDH アイソザイムの同定
 ALDH 強制発現による CSC 特性獲得の有無の検討
 (2) 可塑性の分子メカニズム解明
 癌幹細胞を多く含む 4 つの腫瘍形成細胞株 (FRO、KTC3、ACT1、8505C) の ALDH 酵素活性 陰性/陽性の各分画をソーティングし、それぞれの分画を接着培養したときの ALDH 陽性率の変化を検討した。

4. 研究成果

- (1) ALDH 酵素活性とスフェアの関係性を検

討するため、2 つの ALDH 阻害剤

N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB)、Disulfiram (DS) を用いてスフェア形成への影響を検討することとした。まず、初めに DS には ALDH 抑制作用以外に細胞増殖抑制作用が知られているため、接着培養でそれらの影響が出ない濃度を検討した。

4 つの腫瘍形成細胞を接着培養後、両薬剤を以下の濃度で添加し 96 時間後の細胞増殖を検討した。その結果、それぞれの薬剤が接着培養で影響を与えない濃度は、DEAB はすべての細胞において 50 μ M、DS は 8505C 細胞のみ 0.2 μ M、そのほかの細胞株では 1 μ M と決定した (図 1)。

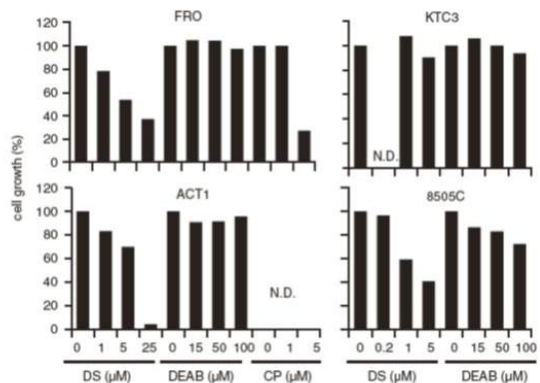


図 1: 細胞増殖アッセイ

次に、これらの薬剤が ALDH 酵素活性に及ぼす影響を検討した。DEAB は 50 μ M で完全に抑制していたのに対し、1 μ M の DS ではほぼ抑制していなかった (図 2)。

DEAB、DS がスフェア形成へ与える影響を検討した。それぞれの阻害剤を添加した状態で浮遊培養し、4 週間後に直径 100 μ m 以上のものをスフェアとしてカウントした。どの細胞においても、DEAB は ALDH を完全に抑制していたにもかかわらず、スフェア形成能に変化はなかった。また、DS は ALDH 活性はほとんど抑制しないものの、FRO、KTC3、ACT1 細胞でスフェア形成を十分に抑制していた (図 3)。

これらより、ALDH 活性とスフェア形成には関連性がない可能性が考えられた。

さらに、shRNA により ALDH をノックダウンしたときのスフェア形成への影響を検討することにした。まず、ヒトの ALDH 酵素活性には 19 種類のアイソザイムがあることが知られているため、8 種類の甲状腺癌細胞株においてどのアイソザイムの発現が高いのかを mRNA の発現量で検討した。その結果、ALDH1A3 の発現が高いことを確認した。

ALDH 活性が高く、高いスフェア形成能を持つ FRO 細胞を用いて shRNA により ALDH1A3 をノックダウンした細胞株を作製し、スフェアアッセイを行った。その結果、DEAB と同様にスフェア形成は抑制されなかった (図 3)。

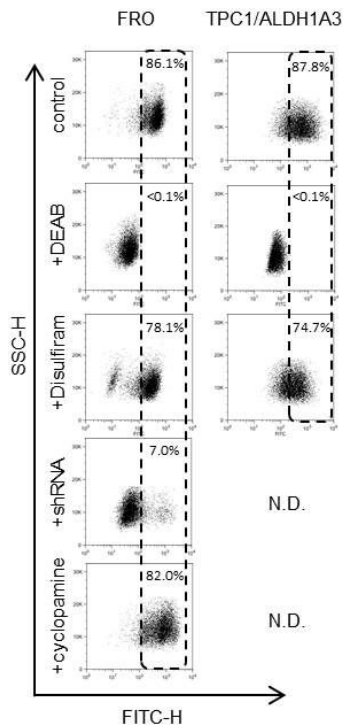


図 2: 各薬剤で処理した後の ALDH 活性の変化

また逆に ALDH 活性がなくスフィア形成もない TPC1 細胞を用いて ALDH1A3 強制発現した細胞株を作製し、同様の実験を行った。100 μ m 以下のとても小さな集合体は作っているものの、スフィアは形成されなかった。

以上より、ALDH 活性とスフィア形成能には関連性ないことが示唆され、ALDH はマーカーにはなるが、癌幹細胞の特性に役割をはたしていない可能性が考えられた。

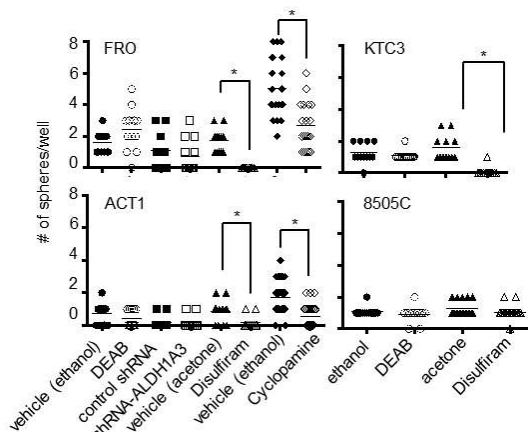


図 3: スフィアアッセイ

(2) 腫瘍形成細胞を用いて ALDH 陽性率の変化を検討した。その結果、変化の速度は細胞により異なるが接着培養後 1-3 週間程度で、ALDH 陽性細胞から陰性・陽性どちらの細胞分画も出現した。また、逆に陰性細胞分画からも両方の細胞分画が出現し、すべての細胞株

でソーティング前の陽性率まで戻れることを確認した。

以上より、ALDH 活性は CSC と non-CSC の間でフレキシブルに性質を変化させることがわかった。

ここまでの論文にまとめ、発表した。

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 5 件)

1. Shimamura M, Kurashige T, Mitsutake N, Nagayama Y. Role of aldehyde dehydrogenase 1A3 for cancer stem properties of anaplastic thyroid cancer cell lines. *Endocrine*, 157(5):2182-95. 2017. DOI: 10.1210/en.2015-2066 (査読有)

2. Nagayama Y, Shimamura M, Mitsutake N. Cancer stem cells in the thyroid. *Frontiers in Endocrinology, section Thyroid Endocrinology*. 7:20, 2016. (査読有) DOI: 10.3389/fendo.2016.00020

3. Nakashima M, Shimamura M, Yasui K, Mitsutake N, Matsuo-Matsuyama M, Matsuda K, Nagayama Y. Cancer stem cell theory and intratumor heterogeneity in thyroid carcinogenesis. *J Basic Clin Med*. 4(1): 8-12, 2015. (査読有) <http://www.sspublications.org/index.php/JBCM/index>

4. Kurashige T, Shimamura M, Yasui K, Mitsutake N, Matsuse M, Nakashima M, Minami S, Eguchi S, Nagayama Y. Studies on expression of aldehyde dehydrogenase in normal and cancerous tissues of thyroids. *Horm Metab Res*. 47 (3): 194-199, 2015. (査読有) DOI: 10.1055/s-0034-1387770

5. Shimamura M, Nagayama Y, Matsuse M, Yamashita S, Mitsutake N. Analysis of multiple markers for cancer stem-like cells in human thyroid carcinoma cell lines. *Endocrine J*. 61 (15): 481-490, 2014. (査読有) DOI: <http://doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0526>

(学会発表)(計 1 件)

1. 嶋村美加・光武範吏・永山雄二 Aldehyde Dehydrogenase Activity Plays No Role for Cancer Stem-Like properties in Anaplastic Thyroid Cancer Cell Lines. 第 75 回日本癌学会学術総会 於: パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2016/10/06~2016/10/08

〔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〕
ホームページ等

長崎大学
原爆後障害医療研究所ホームページ
<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/index-sjis.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋村 美加 (SHIMAMURA, Mika)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教
研究者番号：90736406