

令和元年6月22日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08971

研究課題名(和文) 型アルギナーゼ遺伝子の甲状腺癌抑制効果解明による新規癌リスク評価検査の開発

研究課題名(英文) Development of novel strategy to stratify the risk of thyroid cancer with type II arginase gene which exhibits tumor suppressive effects

研究代表者

志村 浩己 (Shimura, Hiroki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40303416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：現在、世界的に甲状腺癌に対する過剰診療の憂慮が高まっており、甲状腺癌の治療方針決定のための正確なリスク評価が求められている。本研究においては、甲状腺の発生・機能に重要な転写因子 TTF-1(Nkx2-1)遺伝子の発現が低下している甲状腺癌細胞に同遺伝子を導入する事により、型アルギナーゼ(ARG2)遺伝子発現が約200倍に増加すると共に細胞死を誘導することを発見し、ARG2遺伝子がTTF-1遺伝子による甲状腺癌細胞死誘導の少なくとも一部に関与している事を明らかにした。これにより、ARG2遺伝子発現量検査が甲状腺癌の重症度・予後を評価するリスク因子となりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、早期甲状腺癌の分子生物学的なリスク評価が可能となり、甲状腺癌の治療方針決定においても、現在乳癌等において行われている遺伝子検査による治療方針決定が甲状腺癌においても実現可能となり、世界的に過剰診療が憂慮されている甲状腺癌の診療に寄与するものと考えられる。さらなる研究により、福島県における甲状腺検査において甲状腺癌と診断される県民に対し、より正確なリスク評価に基づく診療を提供することにも寄与できるのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Currently, concerns about overdiagnosis of thyroid cancer are increasing worldwide, and accurate risk assessment for determining treatment plan for thyroid cancer is required. In this study, we observed the expression of the type II arginase (ARG2) gene is dramatically increased by introducing the transcription factor TTF-1 (Nkx2-1) gene into thyroid cancer cells in which the diminished TTF-1 gene expression, which is important for thyroid development and function. We found that the ARG2 gene was involved in at least a part of thyroid cancer cell death induction by TTF-1 gene. These suggested that the assessment of ARG2 gene expression level could be one of the methods to evaluate the severity and prognosis of thyroid cancer.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：甲状腺癌 アルギナーゼ TTF-1 Nkx2-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災に引き続き発生した福島第一原子力発電所事故は、主に福島県内に放射能汚染を引き起こし、小児における甲状腺癌の発症が憂慮されている。そのため、福島県では事故時18歳以下の県民に対し、超音波検査による「県民健康調査-甲状腺検査」を実施している。この検査により、これまで100例以上の甲状腺癌が発見されているが、超音波検診により有症状となる時点より極めて早期に診断されていることに起因しているものと考えられている。

甲状腺癌の進行は非常に緩徐であることが多く、比較的予後良好な疾患である。さらに、甲状腺癌は10%前後の剖検例に潜在癌として発見されることも知られている。その一方、周囲組織への浸潤や遠隔転移により治療に難渋する症例もみられる。そのため、甲状腺癌の手術においては、遠隔転移の有無、リンパ節転移の有無、甲状腺外浸潤の有無など指標によりリスク評価を行い、手術範囲や微小癌の手術適応を決定している。しかし、超音波検診により早期に診断された甲状腺癌症例においては、転移や浸潤に至っていない例が多く、そのような場合のリスク評価は困難である。甲状腺癌では同様の分子生物学的予後予測因子は未だ同定されていない。そのため、福島県における甲状腺検査では、リスクが少ない甲状腺癌に対する過剰な治療の可能性を憂慮する意見もある。

TTF-1/Nkx2-1 遺伝子はホメオボックス型転写因子であり、甲状腺の形成に不可欠の遺伝子である。しかし、脱分化し悪性度が高くなった甲状腺癌においては TTF-1 遺伝子の発現量は低下していることが多い。これまで、脱分化して TTF-1 発現が消失した甲状腺癌細胞に対し TTF-1 遺伝子を導入した結果、癌細胞の分化を誘導し、失われていた甲状腺機能を回復させる一方^{3,4}、癌細胞の遊走の阻害と細胞死を誘導しうることを明らかにしていた。さらに、この TTF-1 の作用機序を検討するため、Gene Chip にて網羅的に遺伝子発現を検討した結果、型アルギナーゼ(ARG2)遺伝子の発現が約 200 倍に増加する事が明らかとなった。

2. 研究の目的

今回の研究においては、甲状腺癌細胞への TTF-1 遺伝子導入による ARG2 遺伝子誘導作用を詳細に明らかにすると共に、ARG2 遺伝子増加の甲状腺癌細胞に対する分子生物学的作用を明らかにする。さらに、ARG2 発現レベルと甲状腺癌の悪性度・予後と関連性について検討を加え、ARG2 遺伝子を用いた新たなリスク評価検査方法を確立を目指す。

3. 研究の方法

ARG2 遺伝子発現アデノウイルスベクターを構築し、TTF-1 遺伝子発現を欠損しているヒト甲状腺癌培養細胞 BHP18-21v 細胞に遺伝子導入を行い、ARG2 遺伝子発現の甲状腺癌細胞における作用を検討する。また、ARG2 遺伝子発現にて産生が抑制される NO の甲状腺癌細胞に対する作用を明らかとする。さらに、甲状腺癌の手術で得られた組織において、ARG2 遺伝子発現および蛋白発現を検討し、臨床像、病期分類、病理所見と比較を行い、ARG2 発現と最も相関する臨床所見を見いだす。さらに、穿刺吸引細胞診により得られた甲状腺癌細胞において ARG2 遺伝子の発現量を測定しうる検査系を確立し、甲状腺癌のリスク評価が可能な新規臨床検査の開発を目指す。

4. 研究成果

(1) 甲状腺癌細胞における Nkx2-1 強制発現による arginase 遺伝子発現誘導効果の解析

ヒト甲状腺癌培養細胞である BHP18-21v 細胞にアデノウイルスベクターにより転写因子 Nkx2-1 遺伝子を導入し、強制発現させた結果、arginase(ARG)2 遺伝子の発現が最大 178 倍に増加するのが確認された。その誘導効果は時間依存性であり、遺伝子導入後 96 時間で最大となった。一方 ARG1 遺伝子の発現誘導は認められず、ARG2 遺伝子特異的な効果であることが確認された。

(2) 甲状腺癌細胞における Nkx2-1 強制発現による甲状腺癌細胞死誘導効果の分析

Nkx2-1 遺伝子導入による BHP18-21v 細胞の細胞死誘導の詳細を分析するため、Annexin V と DNA 結合試薬を用いて apoptosis と necrosis をリアルタイムで観察した。その結果、AdTTF-1 感染細胞において apoptosis および necrosis の両者が検出された。Apoptosis は感染後 48h より認め、72h でピークを示した。Necrosis は 72h 以降に明らかとなった。一方、Control (AdLacZ 感染細胞) においては apoptosis necrosis とともに未感染細胞との差を認めなかった。

(3) ARG2 遺伝子発現の Nkx2-1 遺伝子誘導 apoptosis/necrosis における役割分析

ARG2 遺伝子に対する siRNA を導入し、ARG2 遺伝子発現に対する効果を測定した所、Nkx2-1 遺伝子による ARG2 遺伝子発現誘導は完全に抑制された。次に、ARG2-siRNA 導入により Nkx2-1 遺伝子による細胞死誘導は 20%抑制された。従って、Nkx2-1 による細胞死誘導効果の少なくとも一部は ARG2 遺伝子発現誘導が関与している事が明らかとなった。

さらに ARG2-siRNA 導入の apoptosis および necrosis 誘導への影響を検討した所、AdTTF-1 感染後の apoptosis は、control (Negative-siRNA) に対し 32%抑制され、necrosis は control に対し 42%抑制された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19件)

1. Suzuki S, Yamashita S, Fukushima T, Nakano K, Midorikawa S, Ohtsuru A, Yasumura S, Hosoya M, Kamiya K, Shimura H, Suzuki S, Nakamura I, Abe M.
The protocol and preliminary baseline survey results of the thyroid ultrasound examination in Fukushima.
Endocr J. 63:315-321, 2016
2. Suzuki S, Nakamura I, Suzuki S, Ohkouchi C, Mizunuma H, Midorikawa S, Fukushima T, Ito Y, Shimura H, Ohira T, Matsuzuka T, Ohtsuru A, Abe M, Yamashita S, Suzuki S.
Inappropriate Suppression of Thyrotropin Concentrations in Young Patients with Thyroid Nodules Including Thyroid Cancer: The Fukushima Health Management Survey.
Thyroid. 26:717-725, 2016.
3. Suzuki S, Suzuki S, Fukushima T, Midorikawa S, Shimura H, Matsuzuka T, Ishikawa T, Takahashi H, Ohtsuru A, Sakai A, Hosoya M, Yasumura S, Nollet KE, Ohira T, Ohto H, Abe M, Kamiya K, Yamashita S.
Comprehensive Survey Results of Childhood Thyroid Ultrasound Examinations in Fukushima in the First Four Years After the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident.
Thyroid 26:841-851, 2016
4. Ohira T, Takahashi H, Yasumura S, Ohtsuru A, Midorikawa S, Suzuki S, Fukushima T, Shimura H, Ishikawa T, Sakai A, Yamashita S, Tanigawa K, Ohto H, Abe M, Suzuki S; Fukushima Health Management Survey Group.
Comparison of childhood thyroid cancer prevalence among 3 areas based on external radiation dose after the Fukushima Daiichi nuclear power plant accident: The Fukushima health management survey.
Medicine (Baltimore) 95: e4472, 2016
5. Goma M, Kaneshige M, Ichijo S, Ichijo M, Shindo H, Terada N, Yokomichi H, Yamagata Z, Kitamura K, Shimura H, Kobayashi T.
Sensitive detection of hemodynamic failure during orthostatic stress in patients with diabetic polyneuropathy using a mini laser Doppler blood flowmeter.
J Am Soc Hypertens 11:28-37, 2017.
6. Sukegawa M, Wang X, Nishioka C, Pan B, Xu K, Ohkawara H, Hamasaki Y, Mita M, Nakamura K, Okamoto M, Shimura H, Ohta M, Ikezoe T.
The BCR/ABL tyrosine kinase inhibitor, nilotinib, stimulates expression of IL-1 β in vascular endothelium in association with downregulation of miR-3p.
Leuk Res 58:83-90, 2017.
7. Suzuki S, Midorikawa S, Matsuzuka T, Fukushima T, Ito Y, Shimura H, Takahashi H, Ohira T, Ohtsuru A, Abe M, Suzuki S, Yamashita S.
Prevalence and Characterization of Thyroid Hemiagenesis in Japan: The Fukushima Health Management Survey.
Thyroid 27:1011-1016., 2017.
8. Midorikawa S, Ohtsuru A, Murakami M, Takahashi H, Suzuki S, Matsuzuka T, Shimura H, Ohira T, Suzuki SI, Yasumura S, Yamashita S, Ohto H, Tanigawa K, Kamiya K.
Comparative Analysis of the Growth Pattern of Thyroid Cancer in Young Patients Screened by Ultrasonography in Japan After a Nuclear Accident: The Fukushima Health Management Survey.
JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. in press, 2017.
9. Takahashi H, Takahashi K, Shimura H, Yasumura S, Suzuki S, Ohtsuru A, Midorikawa S, Ohira T, Ohto H, Yamashita S, Kamiya K: Simulation of expected childhood and adolescent thyroid cancer cases in Japan using a cancer-progression model based on the National Cancer Registry: Application to the first-round thyroid examination of the Fukushima Health Management Survey.
Medicine (Baltimore). 96: e86312017, 2017.
10. Shimura H, Sobue T, Takahashi H, Yasumura S, Ohira T, Ohtsuru A, Midorikawa S, Suzuki S, Fukushima T, Suzuki S, Yamashita S, Ohto H; Thyroid Examination Unit of the Radiation Medical

Center for the Fukushima Health Management Survey Group.
Findings of Thyroid Ultrasound Examination Within 3 Years After the Fukushima Nuclear Power
Plant Accident: The Fukushima Health Management Survey.
J Clin Endocrinol Metab 103:861-869, 2018.

11. Ohira T, Takahashi H, Yasumura S, Ohtsuru A, Midorikawa S, Suzuki S, Matsuzuka T, Shimura H, Ishikawa T, Sakai A, Yamashita S, Tanigawa K, Ohto H, Kamiya K, Suzuki S; Fukushima Health Management Survey Group.
Associations between Childhood Thyroid Cancer and External Radiation Dose after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident.
Epidemiology 29:e32-e34, 2018.
12. Nakaya T, Takahashi K, Takahashi H, Yasumura S, Ohira T, Ohto H, Ohtsuru A, Midorikawa S, Suzuki S, Shimura H, Yamashita S, Tanigawa K, Kamiya K:
Spatial analysis of the geographical distribution of thyroid cancer cases from the first-round thyroid ultrasound examination in Fukushima Prefecture.
Sci Rep. 8(1):17661, 2018
13. Ohtsuru A, Midorikawa S, Ohira T, Suzuki S, Takahashi H, Murakami M, Shimura H, Matsuzuka T, Yasumura S, Suzuki SI, Yokoya S, Hashimoto Y, Sakai A, Ohto H, Yamashita S, Tanigawa K, Kamiya K:
Incidence of Thyroid Cancer Among Children and Young Adults in Fukushima, Japan, Screened With 2 Rounds of Ultrasonography Within 5 Years of the 2011 Fukushima Daiichi Nuclear Power Station Accident.
JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 145:4-11, 2019.
14. Nakaya T, Takahashi K, Takahashi H, Yasumura S, Ohira T, Ohto H, Ohtsuru A, Midorikawa S, Suzuki S, Shimura H, Yamashita S, Tanigawa K, Kamiya K:
Spatial analysis of the geographical distribution of thyroid cancer cases from the first-round thyroid ultrasound examination in Fukushima Prefecture.
Sci Rep. 8:17661, 2018.

その他

〔学会発表〕(計 49件)

1. 伊藤祐子, 古屋文彦, 滝克己, 志村浩己: TTF-1 非発現甲状腺癌細胞の細胞死誘導における ARG2 遺伝子の役割. 第 92 回日本内分泌学会学術集会. 仙台, 2019.

その他

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 伊藤祐子

ローマ字氏名： Yuko Ito

所属研究機関名： 福島県立医科大学

部局名： 医学部

職名： 助手

研究者番号(8桁)： 60402038

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。