

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10467

研究課題名(和文) 甲状腺癌幹細胞を標的とした新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment targeting thyroid cancer stem cells

研究代表者

早瀬 傑 (Hayase, Suguru)

福島県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：00583387

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)：本研究では甲状腺未分化癌の分化誘導のメカニズムを解析するために、マウス甲状腺 Side Population (SP)細胞の細胞株であるSide Population Cell-derived thyroid cell line (SPTL)を樹立した。このSPTLと甲状腺未分化癌の遺伝子発現プロファイルを解析し、共通に発現上昇する遺伝子群と発現低下する遺伝子群をみいだした。ドキシサイクリン誘導型のNkx2-1強制発現細胞株を作成し、Nkx2-1を誘導するとAKTのリン酸化が確認でき、甲状腺分化にAKTのパスウェイが関連することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は甲状腺未分化癌を分化誘導することにより癌の浸潤および転移を制御することにある。さらに、甲状腺幹細胞との比較検討をすることにより甲状腺未分化癌は甲状腺幹細胞と似たような遺伝子発現プロファイルをもつことが確認された。甲状腺幹細胞と癌の分化のメカニズムを解析することにより、新たな癌治療の概念を生み出す大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established Side Population Cell-derived thyroid cell line (SPTL), cell line of mouse thyroid Side Population (SP) cells, to analyze the mechanism of differentiation induction of anaplastic thyroid cancer. By analyzing the gene expression profiles of this SPTL and anaplastic thyroid cancer, we found the group of genes whose expression is increased or decreased. We constructed a doxycycline-inducible Nkx2-1 expressing cell line, and confirmed that Nkx2-1 induced phosphorylation of AKT and that the pathway of AKT is essential in thyroid differentiation.

研究分野：甲状腺外科

キーワード：甲状腺癌 幹細胞 分化誘導 Nkx2-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲状腺分化癌の外科治療後の予後は良好であるが、未分化癌はきわめて予後が悪く、様々な癌の中でも非常に悪性度の高い癌として知られている。近年、ゲノムワイドの解析から甲状腺分化癌には分子標的薬剤が個別化治療の候補になりうる事が報告されている。一方、甲状腺未分化癌に関しては症例数が少なく、手術による検体採取が困難である事からも今後も大規模解析がおこなわれる可能性は少ない。このような学術的背景から甲状腺未分化癌には全く新しいアプローチにより治療戦略をおこなうことが望まれている。甲状腺未分化癌は癌幹細胞の性質を非常に多く保持しており、このことは既存の集学的治療法（抗癌剤、放射線療法、免疫療法）では癌をコントロールすることは困難であることを示唆している。本研究の目的は甲状腺癌の新たな治療法として癌幹細胞に着目し、甲状腺癌幹細胞を分化誘導することにより、転移および浸潤を制御する新たな治療法の開発である。

2. 研究の目的

甲状腺未分化癌は甲状腺幹細胞の性質を持ちあわせており、マウス甲状腺 SP 細胞株の分化誘導メカニズムを甲状腺未分化癌細胞株に応用することにより、甲状腺癌幹細胞を分化誘導する基礎技術開発が可能と考える。

3. 研究の方法

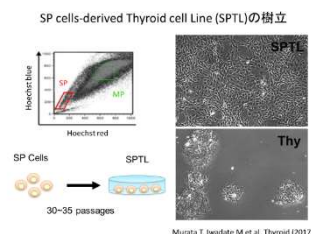
マウス甲状腺 Side Population (SP)細胞が甲状腺幹細胞の性質を持つことを明らかにし、さらにその細胞株である Side Population Cell-derived thyroid cell line (SPTL)の遺伝子発現解析をおこなう。

甲状腺分化に重要な転写因子である Nkx2-1 の甲状腺分化の役割を解析するために、*Nkx2-1(f/f);TPO-cre* マウスを用いて解析した。

4. 研究成果

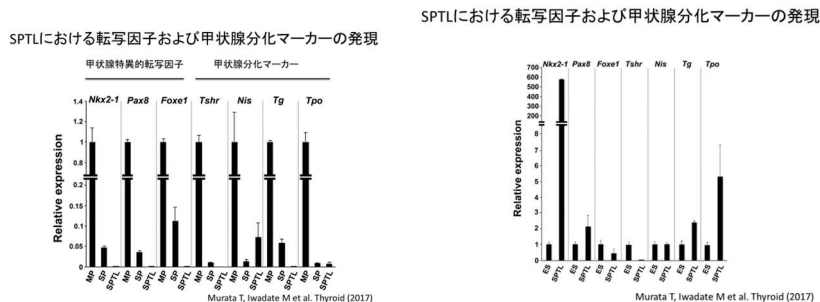
① Side Population Cell-derived thyroid cell line (SPTL)の樹立

マウス甲状腺 Side Population (SP)細胞を 30~35 回継代し、Side Population Cell-derived thyroid cell line (SPTL)を樹立した。SPTL は紡錘形の細胞形態をもち、甲状腺初代培養(Thy)とは異なった形態を持つことを明らかにした。



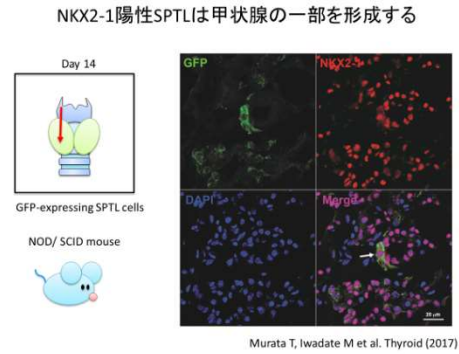
② SPTL における転写因子および甲状腺分化マーカーの発現

マウス甲状腺 Main Population (MP)細胞、SP 細胞、SPTL において MP 細胞と比較すると SP および SPTL では甲状腺特異的転写因子と甲状腺分化マーカーの発現低下がみられた。しかし、ES 細胞と比較すると Nkx2-1 のみの発現上昇がみられ、Nkx2-1 が甲状腺幹細胞の重要な因子であると推測された。



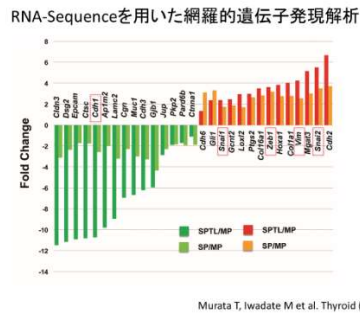
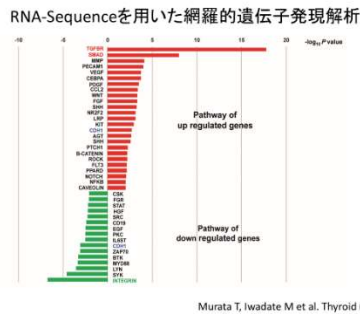
③ SPTL 細胞の甲状腺分化能の検討

GFP 発現させた SPTL を NOD/SCID マウスの甲状腺内に注入すると 14 日後に NKX2-1 を発現した GFP-SPTL 細胞が甲状腺濾胞を形成することを明らかにした。



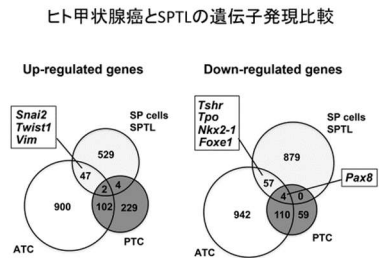
④ RNA-Sequence を用いた網羅的遺伝子発現解析

網羅的遺伝子発現解析により TGFBR や SMAD の Pathway が SPTL で重要であることを明らかにし、Snail1, Zeb1, Vim, Snai2 などの EMT に関連する遺伝子の発現上昇がみられた。



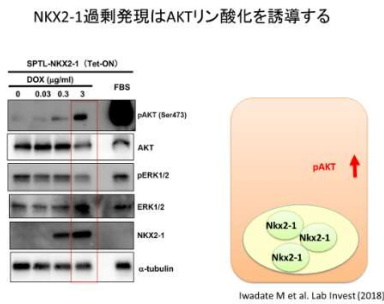
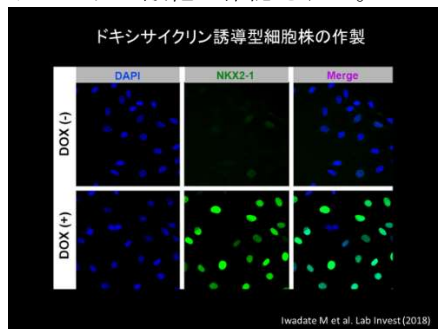
⑤ 甲状腺未分化癌と甲状腺乳頭癌の遺伝子発現比較

SPTL の遺伝子発現と甲状腺未分化癌 (ATC) および甲状腺乳頭癌 (PTC) の遺伝子発現を比較すると、Snai2, Twist1, Vim が SPTL と ATC に共通して遺伝子発現上昇がみられた。Tshr, Tpo, Nkx2-1, Foxe1 は SPTL と ATC に共通して遺伝子発現低下がみられた。



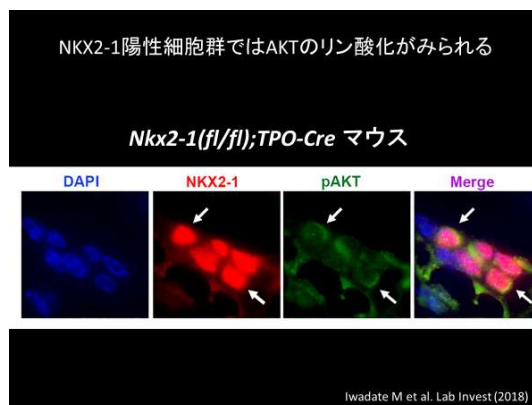
⑥ ドキシサイクリン誘導型細胞株の解析

ドキシサイクリンにより Nkx2-1 が発現誘導する SPTL を作成した。Nkx2-1 の発現誘導により AKT リン酸化が確認された。



⑦ *Nkx2-1 (fl/fl); TPO-Cre* マウスでの *Nkx2-1* 陽性細胞の解析

Nkx2-1 (fl/fl); TPO-Cre マウスでは濾胞を形成しない *Nkx2-1* 陽性、*Pax8* 陰性の細胞を確認でき、この細胞群が甲状腺幹細胞に似た発現パターンを持つことを明らかにした。さらに、この濾胞を形成しない *Nkx2-1* 陽性細胞群では *AKT* のリン酸化が確認できた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwadate Manabu, Takizawa Yoshinori, Shirai Yo-Taro, Kimura Shioko	4. 巻 98
2. 論文標題 An in vivo model for thyroid regeneration and folliculogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1126 ~ 1132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-018-0068-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murata T, Iwadate M, Takizawa Y, Miyakoshi M, Hayase S, Yang W, Cai Y, Yokoyama S, Nagashima K, Wakabayashi Y, Zhu J, Kimura S.	4. 巻 27
2. 論文標題 An Adult Mouse Thyroid Side Population Cell Line that Exhibits Enriched Epithelial-Mesenchymal Transition.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 460-474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2016.0130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩館学
2. 発表標題 甲状腺濾胞の起源となる細胞を探る
3. 学会等名 第61回日本甲状腺学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩館学
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを用いた甲状腺再生メカニズムの解明
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manabu Iwadate
2. 発表標題 NKX2-1 regulates SMAD and non-SMAD pathways in thyroid stem cells
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 早瀬 傑
2. 発表標題 Stem Cell Antigen 1陽性の間葉細胞は甲状腺再生時において濾胞細胞の起源となる
3. 学会等名 第116回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 眞一 (Suzuki Shinichi) (70235951)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	岩館 学 (Iwadate Manabu) (00381393)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	