

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07191

研究課題名(和文) 臨床応用を指向した大腸がん進展における甲状腺ホルモンの役割の解明

研究課題名(英文) Roles of Dio2 (deiodinase, iodothyronine, type II) in colorectal tumorigenesis

研究代表者

小島 康 (Kojima, Yasushi)

愛知県がんセンター(研究所)・がん病態生理学分野・主任研究員

研究者番号：30464217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺ホルモンの活性化に重要な役割を果たす2型脱ヨウ素酵素 iodothyronine deiodinase 2 (DIO2) の発現が、マウス腫瘍組織の間質細胞で上昇することを見出した。ヒト臨床検体でも、腫瘍細胞ではなく、腫瘍間質に高発現することを確認した。Apc変異マウスにDIO2阻害剤のイオパン酸を投与したところ、腫瘍血管増生の抑止、および腫瘍成長の抑制、生存期間の延長を観察した。TCGAの大腸がんデータセット(COADREAD)を解析したところ、予後不良症例が多いCMS4においてDIO2の高発現症例が多いことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、甲状腺ホルモンの局所組織での活性化に重要な役割を果たすDIO2が腫瘍組織の間質で高発現して、腫瘍血管増生、腫瘍成長を促進することを見出した。欧米を中心とした疫学調査では、甲状腺疾患と大腸がん発生には、なんらかの関係があることが示唆されている。しかしながら、なぜ、甲状腺と大腸がんに関連性が発生するのかについては、謎とされている。本研究の成果は、その謎の解明に資する可能性がある。また今後のより詳しい解析が必要であるが、さまざまな腫瘍組織でDIO2が腫瘍血管の増生に重要な役割を果たしている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The prohormone thyroxine (T4) in circulation is converted to bioactive T3 in peripheral organs by the enzyme DIO2 (deiodinase, iodothyronine, type II), a major regulator of local thyroid hormone levels. Expression of Dio2 is upregulated in intestinal polyps of Apc mice, a mouse model of familial adenomatous polyposis and early-stage sporadic CRC. Treatment with iopanoic acid, a deiodinase inhibitor, or chemical thyroidectomy suppresses tumor formation in Apc mice, accompanied by reduced tumor cell proliferation and angiogenesis. The Cancer Genome Atlas (TCGA) data indicates up-regulation of DIO2 in CRC clinical samples and a close association of its expression pattern with the stromal component, consistently with almost exclusive expression of DIO2 in the stroma of human CRC as revealed by in situ hybridization. Collectively, these data highlight biological roles of DIO2 in the CRC tumor microenvironment.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん 甲状腺 DIO2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、大腸がんは、日本で最も罹患数の多いがんであるが、進行大腸がんは既存の治療法に抵抗性を示すことが多く、大腸がんの新機軸の予防・治療法の開発は急務である。疫学研究により、甲状腺ホルモン異常と大腸がんとの間に因果関係がある可能性が浮上している。イスラエルの疫学研究によれば、甲状腺機能低下症に対する甲状腺ホルモン補充療法は、大腸がん発生リスクを軽減することが示唆されている (Rennert G. et al., 2010, JNCI)。米国と英国のそれぞれの大規模な疫学研究でも、甲状腺ホルモン補充療法により大腸がん発生が減少することは確認されている (Friedman GD. et al., 2011, JNCI; Boursi B. et al., 2015, JNCI)。英国の研究では、甲状腺機能亢進症および未治療の甲状腺機能低下症が、それぞれ大腸がん発生リスクを増加させることも示されている (Boursi B. et al., 2015, JNCI)。

消化器系は、発生、成長段階において甲状腺ホルモンの強い制御を受けていることが知られている。しかしながら、大腸がんの進展における甲状腺ホルモンの役割については、様々な研究が行われているものの、現在に至るまで体系的な知見は得られていない。甲状腺ホルモンは、細胞の代謝、成長、増殖の基本的制御に関与する。甲状腺ホルモン分子の特徴は、ヨウ素分子を含むことであり (図 1)、甲状腺ホルモンの活性は、脱ヨウ素酵素による脱ヨード反応により制御されている。1型および2型脱ヨウ素酵素 (DIO1、DIO2) は、甲状腺から放出さ

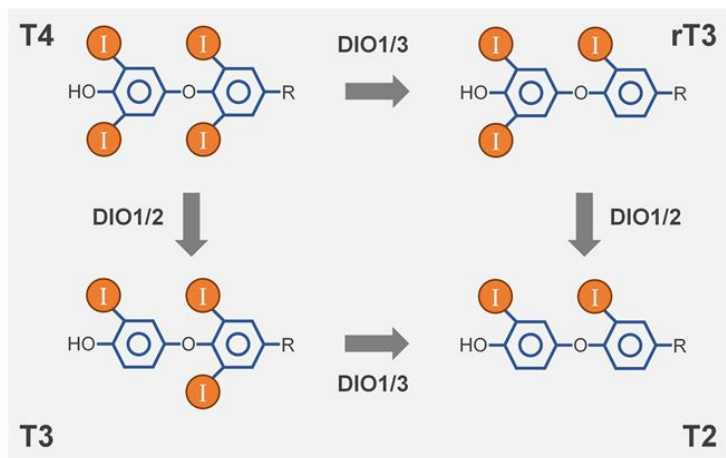


図1 甲状腺ホルモン代謝の模式図 脱ヨード反応により甲状腺ホルモンはサイロキシン (T4)からトリヨードサイロニン (T3)、リバースT3 (rT3)、ジヨードサイロニン (T2)に変換。

れた低活性型である thyroxine(T4)を、末梢組織において高活性型である triiodothyronine(T3)に変換する。T3 は、核内ホルモン受容体である THRA および THRB と結合して、その作用を発揮する。活性化された T3 は、3型脱ヨウ素酵素 (DIO3) により不活化される。DIO1 は、肝臓および腎臓に特異的に発現し、DIO2 および DIO3 は、さまざまな臓器で発現していることが報告されている。

2. 研究の目的

研究代表者らは、大腸がんモデルマウスの *Apc* 変異マウスを用いて、甲状腺ホルモンを活性化する2型脱ヨウ素酵素 (DIO2) が腸管腫瘍の間質で高発現し、そして腫瘍形成を促進している可能性を見出した。本研究では、大腸がん組織で DIO2 を発現する細胞の系譜および DIO2 阻害が新規大腸がん治療薬としての可能性を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸がんモデルマウス解析

Apc 716 変異マウス (以下、*Apc* 変異マウス) の腸管では、良性の腫瘍 (腺腫性ポリープ) が多数発生する (Oshima M. et al., 1995, PNAS)。DIO 阻害剤であるイオパン酸 (CAS-96-83-2) は、0.02% (w/v) を調製して飲水により投与した。Potassium perchlorate (PP) および 2-mercapto-1-methyl-imidazole (MMI) による化学的甲状腺切除も飲水投与により実施した。COX 阻害剤である Meloxicam は、経口投与した。マウスの飼育・管理およびそれらを用いた実験は全て愛知県がんセンター研究所動物実験規程に基づいて、愛知県がんセンター研究所動物実験委員会の承認を得て実施された。

(2) 組織染色

パラフィン切片を使用した。免疫染色に関しては以下の抗体を使用した。Anti vimentin 抗体 (clone D21H3; Cell Signaling Technology)、anti COX 2 抗体 (clone D5H5; Cell Signaling Technology)。検出および発色は、VECTASTAIN Elite ABC kit と ImmPACT DAB system (Vector Laboratories) を組み合わせた。

(3) in situ hybridization

パラフィン切片を使用した。米国 Advanced Cell Diagnostics 社の RNAscope システムを用いて DIO2 発現を in situ hybridization により検出した。

(4) リアルタイム RT-PCR 解析

新鮮凍結切片を使用した。LMD7000 レーザーマイクロダイセクション顕微鏡により腫瘍上皮成分と間質成分を区分して取得して RNA を抽出して cDNA を合成した。リアルタイム PCR に関しては、TaqMan プローブを使用した。

(5) データおよび統計解析

統計ソフト R を用いて解析を実施した。UC Santa Cruz Genomics Institute が運営している GDC Xena Hub より TCGA データを取得した。

4. 研究成果

(1) 大腸がんモデルマウスの Apc 変異マウス腫瘍の DNA マイクロアレイデータを検討したところ、甲状腺ホルモンの活性化に重要な役割を果たす 2 型脱ヨウ素酵素 iodothyronine deiodinase 2 (Dio2) の発現が、腫瘍組織で上昇することを見出した。レーザーマイクロダイセクションにより、腫瘍上皮成分と間質成分を分画して Dio2 の発現を調べたところ、腫瘍間質において高発現していることが明らかとなった (図 2)。

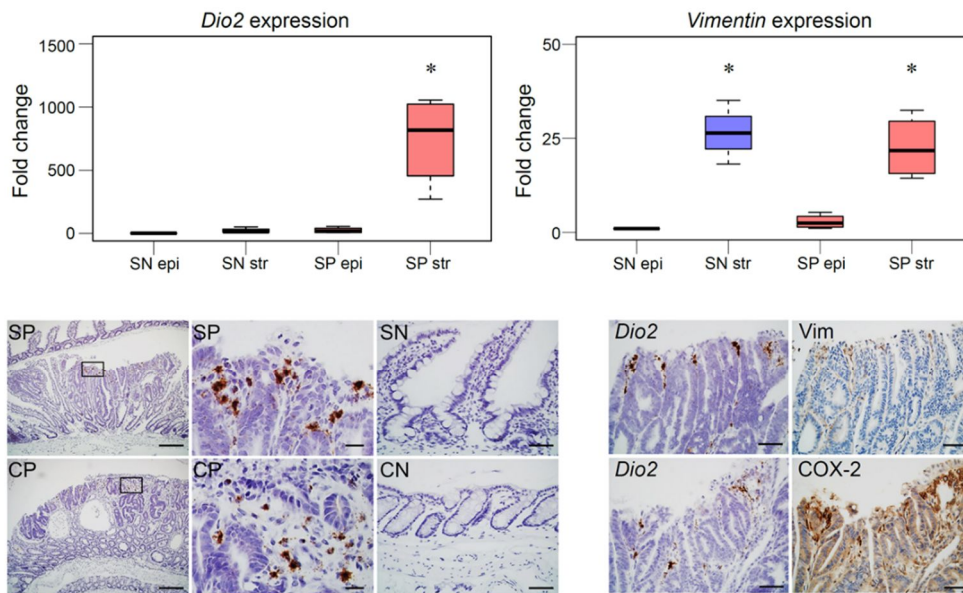


図2 腫瘍間質で高発現するDio2

SN、正常腸管 SP、腸管ポリープ、CN、正常大腸、CP、大腸ポリープ
epi、上皮成分、str、間質成分、Vimentin(Vim)、間質マーカー

(2) 胆道造影剤イオパン酸は、ヨウ素分子を含有して DIO 阻害作用を有することが知られている。イオパン酸を Apc 変異マウスに対して飲水投与したところ、腫瘍血管増生の抑止、および腫瘍成長の抑制が観察された (図 3)。結果的に生存期間中央値で約 6 週の延長が認められた。

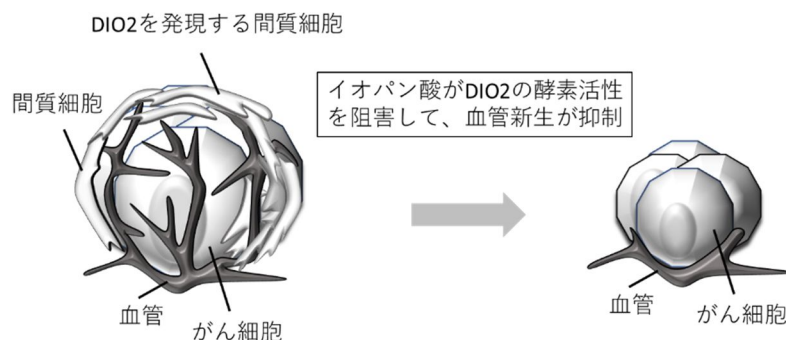


図3 腫瘍間質細胞の発現するDIO2：新規腫瘍血管関連因子

(3) 大腸がんは、遺伝子発現パターンに基づいて4つのサブタイプに分類できる (Guinney J. et al., 2015, Nature Medicine)。応募者は、TCGAの大腸がんデータセット (COADREAD) を解析したところ、予後不良症例が多いCMS4においてDIO2の高発現症例が多いことを見出した(図4)。クラスタリング解析では、DIO2は線維芽細胞 (Fibro)・血管内皮細胞 (Endo) クラスタに含まれた。

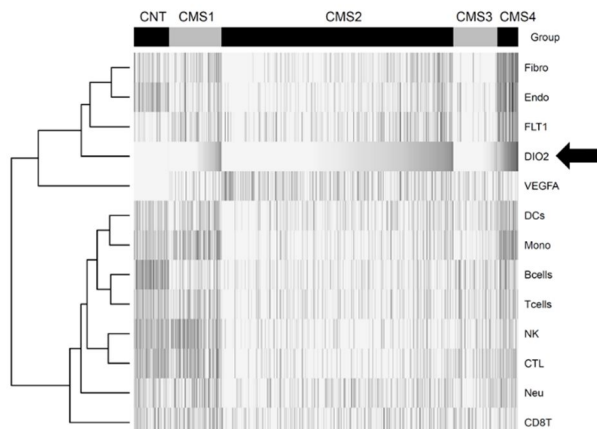


図4 TCGA大腸がん RNA-Seq ヒートマップ
 正常大腸組織 (CNT)、腫瘍組織 (CMS1~4)。線維芽細胞 (Fibro)、血管内皮細胞 (Endo) と FLT1 (VEGFR1)、DIO2 (矢印)、VEGFA は同一クラスターに含まれている。濃いほど高発現を示す。N = 557

(4) ヒト大腸がん病理標本を用いて in situ hybridization により DIO2 の発現領域を検討したところ上皮領域でなくて間質領域で発現することを確認した。

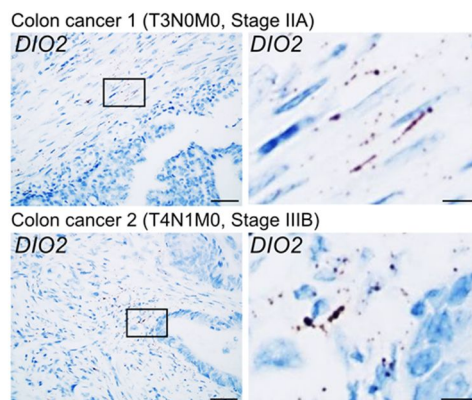


図5 ヒト大腸がんにおけるDIO2発現

(5) VEGF シグナル経路遮断による抗腫瘍血管療法が、我が国に導入されてから10年以上経過して、多くの腫瘍に対する標準療法に組み込まれている。ベバシズマブは、大腸がん、非小細胞肺癌、乳がん、卵巣がん、子宮頸がん、悪性神経膠腫に対して保険適用されている。ラムシルマブは、胃癌、非小細胞肺癌、肝がんに対して保険適用されている。しかしながら、その治療効果は、限定的であり、数ヶ月程度の生存期間の延長効果しか認めない (Kuczynski EA., et al., 2019, Nat. Rev. Clin. Oncol.)。現行の抗腫瘍血管療法の効果が限定的である理由として、VEGFシグナル遮断に偏重していることが挙げられる。本研究からDIO阻害剤は、VEGF遮断とは異なる新規腫瘍血管制御方法の開発につながる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kojima Yasushi, Kondo Yuriko, Fujishita Teruaki, Mishiro Sato Emi, Kajino Sakamoto Rie, Taketo Makoto Mark, Aoki Masahiro	4. 巻 110
2. 論文標題 Stromal iodothyronine deiodinase 2 (DIO 2) promotes the growth of intestinal tumors in Apc 716 mutant mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2520-2528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14100	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kojima, Y., Fujishita T., Mishiro E., Kajino R., Taketo, M.M. & Aoki M.
2. 発表標題 Role of Dio2 (deiodinase, Iodothyronine, Type II) in colon tumorigenesis.
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kojima, Y., Fujishita T., Kajino R., Mishiro E., Taketo, M.M. & Aoki M
2. 発表標題 The biological roles of Dio2 (deiodinase, Iodothyronine, Type II) in intestinal tumorigenesis.
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Kyoto, Sep. 2019
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----