

令和元年6月3日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16167

研究課題名(和文) 癌幹細胞の可塑性をターゲットにした甲状腺癌の新規治療法の開発

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

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞の存在が指摘されて久しい。本研究では、甲状腺癌幹細胞の機能的なマーカーとしてレドックス調節機構、主にROS(活性酸素)に着目した。ROS low/high分画、薬剤によりROSを増減した際のスフィア形成の変化を検討した。スフィア形成には細胞内ROSの量が大きく関わっており、ROSを低く保つ機序の解明は重要であると考えられた。その機序として細胞内GSH量と好氣的呼吸と嫌氣的解糖系間のバランスの違いを検討した。ROS low分画はROShigh分画に比べ、細胞内GSH量が優位に高く、基礎および最大酸化的リン酸化および解糖が減少して代謝的に静止状態にあると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CSCの同定・解析は、癌の発生原因の解明のみでなく治療開発までの幅広い領域にとって重要な研究である。本研究では、甲状腺癌CSC調節因子として初めてROS・レドックス調節に注目した。さらに甲状腺CSCの可塑性という特徴に注目した研究は他にはない。今回得た結果より癌組織の自己複製と成長の可能性を枯渇させることによって長期的な疾病根絶を達成するためのCSC標的治療の重要性を考えると、ROSは甲状腺癌におけるCSC標的治療のための良い候補であるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The existence of cancer stem cells (CSCs) has long been proposed. This project has focused on redox system, especially reactive oxygen species (ROS), as functional marker (s) for thyroid CSCs. The changes in spherogenicity was evaluated by separating the cells into ROShigh vs. ROSlow subfractions, and by altering ROS levels with chemicals. We found that intracellular ROS levels is critical for spherogenicity, indicating the importance of elucidation for mechanisms to keep low ROS levels. ROSlow subfraction had higher intracellular GSH levels and decreased levels of basic/maximum oxidative phosphorylation and glycolysis, compared with ROShigh subfraction, suggesting that ROSlow cells are in quiescent state.

研究分野：内分泌学

キーワード：甲状腺癌 癌幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌組織における CSC の存在が指摘されて久しい。CSC は癌細胞のうち正常幹細胞様の性質を持つ細胞集団で、癌の発生や転移・治療抵抗性等に大きく関わっていると考えられている。以前の報告で ALDH 活性がマーカーの有力な候補になること、また CSC⇌non-CSC という可塑性があることを見出した。また、前回の科学研究課題ではそれらを発展させ、ALDH 酵素活性と CSC 機能の関連を検討し、ALDH 酵素阻害剤である N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) や shRNA による ALDH の発現抑制はスフェア形成能を低下させないこと、さらに ALDH 強制発現もスフェア形成能を上昇させないこと、つまり ALDH 活性は、甲状腺癌 CSC の単なるマーカーであり、機能的意義はないことを見出した。

本研究では、CSC の新たな機能的なマーカーとしてレドックス調節機構、主に ROS (活性酸素) に着目した。

2. 研究の目的

先行の実験で甲状腺癌幹細胞 (cancer stem cells; CSC) 研究を行い、① aldehyde dehydrogenase (ALDH) が CSC のマーカーの 1 つであるが、機能的意義はないこと、② CSC が可塑性を示すこと (CSC⇌non-CSC) を報告した。これらは、CSC を除去しても non-CSC から CSC が生じるため、単に CSC を標的とした治療法の開発は無意味であり、新規マーカーを指標とした CSC⇌non-CSC 促進或いは non-CSC⇌CSC 抑制の治療法の確立が必要であることを示唆している。そこで我々が最近甲状腺 CSC の別のマーカーとして見出した活性酸素 (reactive oxygen species; ROS) を指標に、レドックスバランス調節による CSC 除去という甲状腺癌新規治療法開発の可能性を探る。

3. 研究の方法

ROS を指標として以下を実験する。

- (1) ROS^{low} 分画・ROS^{high} 分画細胞での CSC 形質の比較: ROS 指標とした 2 分画でのスフェア形成比較、ROS 増減によるスフェア形成の変化、抗がん剤・放射線に対する形質変化
- (2) ROS^{high} 分画・ROS^{low} 分画細胞での細胞内 ROS レベルを調節する因子の発現の網羅的検討: 好氣的呼吸と嫌氣的解糖系のバランスの変化、ROS 産生・分解に關与する酵素群の発現の変化

4. 研究成果

ROS で染色し ROS^{low}/high 細胞分画でソーティング後、スフィアアッセイを行った。図 1 に示すように、甲状腺癌細胞には少数の ROS^{low} 分画細胞が存在し、ROS^{low} 細胞は ROS^{high} 細胞と比較すると、スフィア形成能が優位に高いことを確認した。またここには図として示していないが ALDH の時と同様に可塑性がありそれぞれの分画をダイナミックに動くことを確認した。

次に、強制的な ROS レベルの増減によるスフィア形成能の変化の比較を行った。ROS 低下には抗酸化剤: NAC、ROS 増加にはグルタチオン合成阻害剤: BSO を用いて検討し、それぞれの薬剤により細胞内の ROS 量が変化していることを確認している。その時のスフィア形成能を検討したところ、NAC 添加群ではスフィア形成に変化がなかったものの、BSO 群ではスフィア形成が優位に減少した (図 2)。スフィア形成にはやはり ROS の産生量が大きく関わっていることが示唆され ROS を低く保つ機序を解明することは重要であると考えられた。

ROS^{low}/high 分画細胞間の性質の違いを放射線感受性の違いを検討した。それぞれの分画での DNA 損傷を DNA 損傷マーカーである DNA2 重鎖切断 (DNA double strand break (DSB)) で評価した。予想通り非照射時の DSB の数は ROS^{low} 細胞が ROS^{high} 細胞と比べて少なかった。しかしながら、放射線照射するとどちらの分画も同等に増加したことから、同等に DNA ダメージが起こっていることがわかった。また、抗がん剤に対する抵抗性についても検討したが、両群間で差は見られなかった。

次に細胞内 GSH の量と細胞が ATP 産生する経路である好氣的呼吸と嫌氣的解糖系間のバランスを検討した。その結果、細胞内 GSH 量は ROS^{low} 分画の方が、ROS^{high} 分画よりも優位に高く (図 3)、基礎および最大酸化的リン酸化および解糖が減少して代謝的に静止状態にあると考えられた (図 4)。より低い ROS レベルは、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の減少および GSH 含有量の増加の結果であると思われる。癌組織の自己複製と成長の可能性を枯渇させることによって長期的な疾病根絶を達成するための CSC 標的治療の重要性を考えると、ROS は甲状腺癌における CSC 標的治療のための良い候補であるかもしれない。

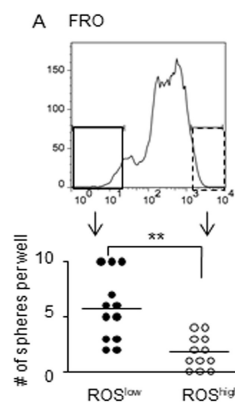


図 1

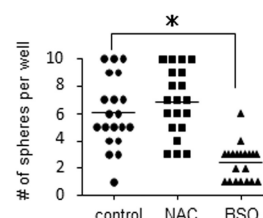


図 2

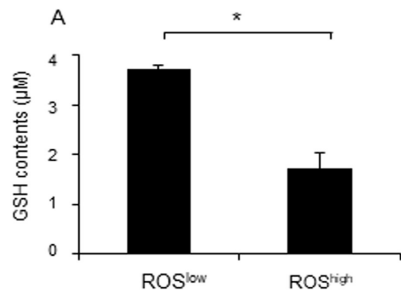


図 3

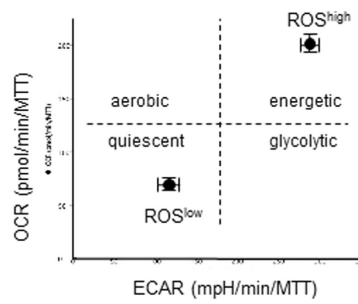


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1. Shimamura M, Shibusawa N, Kurashige T, Mussazhanova Z, Matsuzaki H, Nakashima M, Yamada M, Nagayama Y. Mouse models of sporadic thyroid cancer derived from BRAFV600E alone or in combination with PTEN haploinsufficiency under physiologic TSH levels. *PLoS One*. 13(8):e0201365. 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0201365. (査読有)
2. Shimamura M, Yamamoto K, Kurashige T, Nagayama Y. Intracellular redox status controls spherogenicity, an in vitro cancer stem cell marker, in thyroid cancer cell lines. *Exp Cell Res*. 370(2):699-707. 2018. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.07.036. (査読有)
3. Kurashige T, Shimamura M, Nagayama Y. N-Acetyl-L-cysteine protects thyroid cells against DNA damage induced by external and internal irradiation. *Radiat Environ Biophys*. 56(4):405-412. 2017. DOI: 10.1007/s00411-017-0711-8. (査読有)
4. Shimamura M, Kurashige T, Mitsutake N, Nagayama Y. Aldehyde dehydrogenase activity plays no functional role in stem cell-like properties in anaplastic thyroid cancer cell lines. *Endocrine*. 55(3):934-943. 2017. DOI: 10.1007/s12020-016-1224-y. (査読有)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. 嶋村美加・永山雄二 Intracellular redox status controls spherogenicity in thyroid cancer cells. 第二回放射線災害・医科学研究拠点国際シンポジウム 於：長崎大学坂本キャンパス、長崎県長崎市 2018/2/3
2. 嶋村美加・永山雄二 甲状腺癌幹細胞の特性の検討 (ROS を指標にして) 第 2 回 放射線災害・医科学研究拠点カンファレンス 於：広島大学霞キャンパス、広島県広島市 2017/6/3
3. 嶋村美加・蔵重智美・永山雄二 Mouse Models of Thyroid Cancer with BRAFV600E Mutation 第一回放射線災害・医科学研究拠点国際シンポジウム 於：広島大学霞キャンパス、広島県広島市 2017/2/22

〔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

長崎大学原爆後障害医療研究所ホームページ
https://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/abdi/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

研究分担氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者 なし

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。