

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16914

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析と免疫学的手法による甲状腺未分化癌の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of anaplastic thyroid carcinoma by comprehensive genetic analysis and immunological techniques.

研究代表者

伊藤 理恵 (Ito, Rie)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10778616

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)：甲状腺未分化癌は頻度は少ないが非常に悪性度が高く予後が悪い。しかし症例数も少なく研究もあまり進んでいないためなぜ悪性度が高いのかはわかっていない。それを解明するために、未分化癌にマクロファージが多く存在することに着目してそのことと悪性度が関係しているかを検討した。未分化癌ではたしかにマクロファージが多く存在するものが多かったが、症例によっては多くないものや予後の良い乳頭癌でもマクロファージが存在する症例も存在した。また甲状腺細胞株を使って未分化癌や他の甲状腺癌の遺伝子発現についてもRNAシーケンスにより解析したが組織型による特徴はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺未分化癌のマクロファージに関する報告はいくつかあったがあまり多くはなく日本の症例を使って甲状腺癌のマクロファージを確認したことに意義があったと考える。しかし、自験例では未分化癌全てでマクロファージが多く存在したわけではなく乳頭癌など他の癌でも存在していたことから悪性度との関係は不明である。また甲状腺癌の細胞株を用いた遺伝子解析の報告はなかったため細胞株8種類を使いRNAシーケンスを行ったが、組織型によって遺伝子発現に特徴はみられなかった。つまり細胞株はその癌の特徴を表していないことがわかった。今後細胞株を使わない実験方法を検討することができるため意義のある実験であった。

研究成果の概要(英文)：Anaplastic thyroid carcinoma is rare, but it is highly malignant and has a poor prognosis. However, it is not known why the malignancy is high because the number of cases is small and the research has not progressed much. In order to clarify this, we focused on the presence of many macrophages in anaplastic thyroid carcinoma, and examined whether the presence of macrophages is associated with malignancy. There were many cases in which macrophages were present in anaplastic thyroid carcinoma, but there were some cases in which macrophages were present even in papillary thyroid carcinoma with good prognosis. Gene expression in anaplastic and other thyroid cancers was also analyzed by RNA-sequence using thyroid cancer cell lines, but there were no features by histological type.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：甲状腺未分化癌 マクロファージ 遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲状腺未分化癌は、頻度は少ないものの悪性度は極めて高く、非常に予後が悪い。しかし症例数が少ないがゆえにあまり研究が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

未分化癌がなぜ悪性度が高いのかを明らかにするためには、分化癌である乳頭癌や濾胞癌と比較して未分化癌の性質を解明する必要があると考える。そのために 未分化癌に特徴的な遺伝子発現を RNA-seq により解析すること、未分化癌に特徴的に多く存在するマクロファージが悪性度に関わっているか検討すること、乳頭癌や濾胞癌から未分化転化を引き起こす因子を同定すること、に取り組む。

3. 研究の方法

(1) 未分化癌に特徴的に多く存在するマクロファージが悪性度に関わっているか検討する。

ヒトの未分化癌、乳頭癌、濾胞癌の FFP の免疫染色を行う。予備実験でも未分化癌にのみ CD68(+) 細胞すなわちマクロファージが多く存在することは確認している。症例数を増やして未分化癌に特徴的であるのか検討を続ける。

(2) cell line から甲状腺癌移植マウスを作成する。未分化癌は NOD/SCID マウス皮下移植での生着はすでに成功している。乳頭癌や濾胞癌は生着が難しいため NOG マウス (NOD/SCID マウスに IL2Rg KO 遺伝子を導入しさらに免疫不全状態としたマウス) に移植する。細胞接着や増殖を促進する Matrigel を混ぜて移植する。免疫染色や FACS (fluorescence activated cell sorting) を行う。上記マウスに移植生着した腫瘍を用いて M1、M2 マクロファージの分布や定量的測定を行う。未分化癌を用いた予備実験では、M1、M2 マクロファージとも存在したが腫瘍増殖を促進する作用のある M2 がより多かった。未分化癌に M2 マクロファージが多いことは腫瘍増殖速度が速いこと、すなわち悪性度が高いことに関係していると示唆される。個体数を増やして検討する。

(3) 未分化癌に特徴的な遺伝子発現を RNA-seq により解析する。未分化癌、乳頭癌、濾胞癌を用いて RNA-seq を行い、各々の癌の遺伝子発現について解析、比較をする。癌ゲノムのデータベースである TCGA にある乳頭癌のデータと自験例とを比較する。実際の症例の検体を用いて RNA-seq を行う。

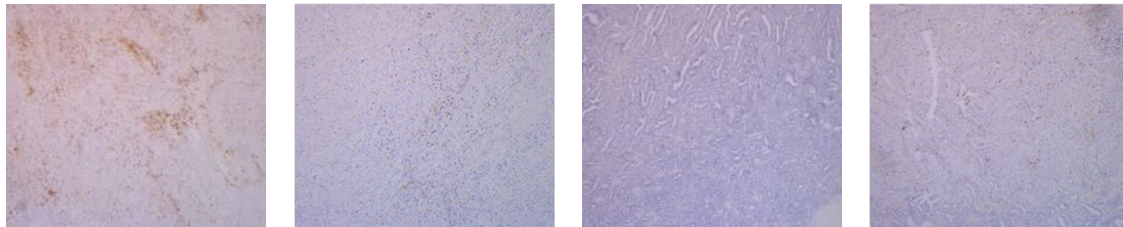
(4) 未分化癌のマクロファージの量と悪性度に相関があるか検討する。未分化癌を移植生着したマウスにクロドロン酸リポソームを投与しマクロファージを除去することで腫瘍増殖速度が低下するか確認する。マクロファージの量と腫瘍の増殖速度に相関があるか検討する。マクロファージを誘導する遺伝子を同定する。なぜ未分化癌がマクロファージを誘導するのかを明らかにすることも重要である。RNA-seq で得られた遺伝子情報からマクロファージを誘導するケモカインをいくつか同定し、CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術を用いてノックアウトすることでマクロファージが減少するか調べる。

(5) 乳頭癌や濾胞癌から未分化転化を引き起こす因子を同定する。RNA-seq で得られた遺伝子情報から未分化癌に特異的に発現している、あるいは多く発現している遺伝子を同定する。分化癌にその遺伝子を発現させることで腫瘍の増殖能や特徴が未分化癌のように変化するかを確認する。未分化癌が乳頭癌や濾胞癌から転化しているかどうかの解明につながる可能性が高い。未分化癌と他の甲状腺癌の鑑別に Thyroglobulin (Tg) をマーカーとする。我々は cell line を使った予備実験で未分化癌でのみ Tg の発現がほとんどないことを確認しており、Tg は未分化癌とそれ以外を区別するひとつのマーカーとなる。Tg 遺伝子座に GFP (Green Fluorescent Protein)

をノックインすることで、その発色の有無から Tg の発現が確認できる。分化癌から未分化癌への転化を確認するための簡便な指標となる。

4. 研究成果

(1) 未分化癌ではマクロファージが多く存在するものが多かったが中にはあまりマクロファージが多くない症例も存在した。また乳頭癌でもマクロファージが目立つ症例も存在した。



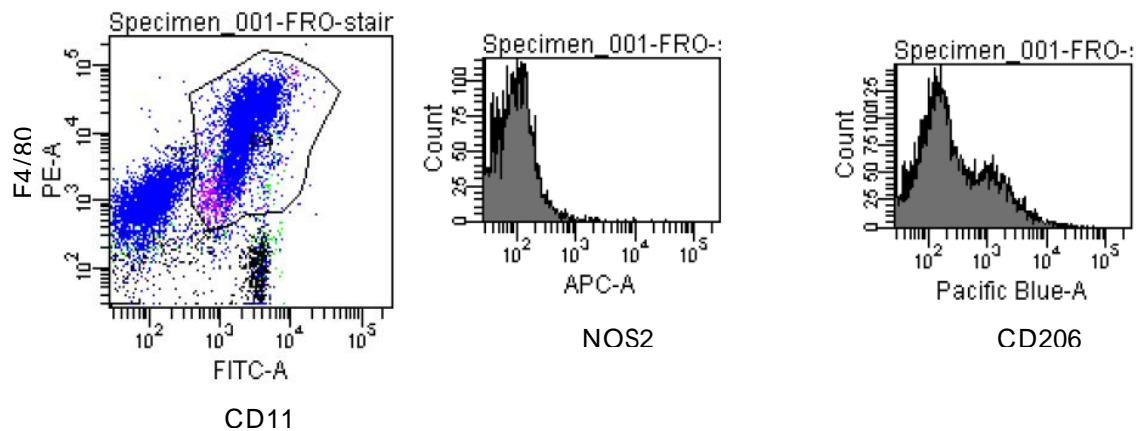
未分化癌

未分化癌

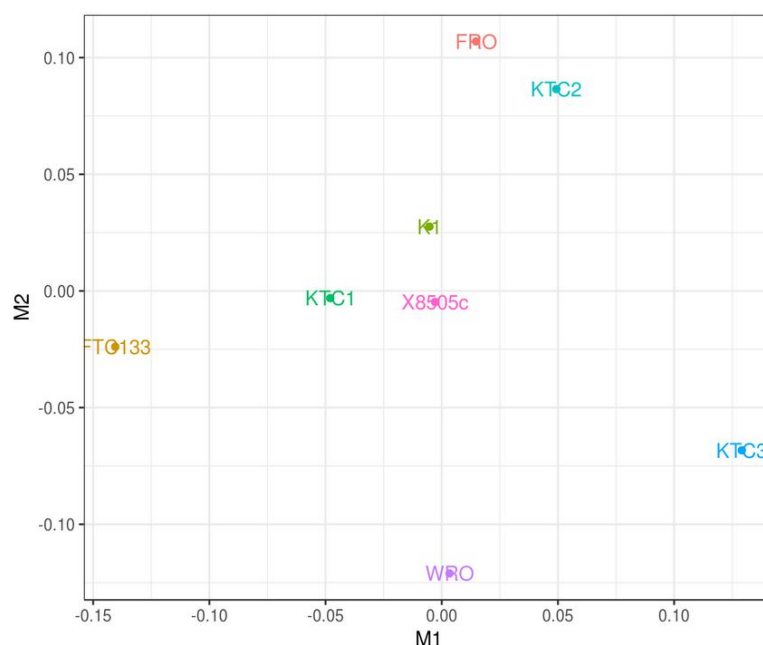
濾胞癌

乳頭癌

(2) 未分化癌の cell line 4 種 (FRO、8505C、KTC-2、KTC-3)、濾胞癌 2 種 (FTC133、WRO)、乳頭癌 2 種 (KTC-1、K1) をマウスに移植した。まずは生着した FRO、KTC-2、KTC-3、K1 の腫瘍を摘出して FACS でマクロファージの割合を解析した。FRO の平均値は 22%、KTC-2 は 26.2%、KTC-3 は 30.5%、K1 は 13.2% と未分化癌と乳頭癌では差がみられた。またマクロファージ M1 と M2 の区別には NOS2 と CD206 を採用した。未分化癌では M2 の割合が多かった。



(3) 上記 8 種類の cell line の RNA-seq を行った。未分化癌、濾胞癌、乳頭癌でそれぞれ遺伝子発現に特徴があると思われたが実際は遺伝子発現に組織型による偏りはみられなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----