

平成22年 5月 18日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間： 2007 ~ 2009

課題番号： 19790257

研究課題名 (和文)

甲状腺転写因子 TTF-1 のエピジェネティクス制御と癌の分化誘導に関する研究

研究課題名 (英文)

Epigenetic regulation of TTF-1 and its differentiation-inducing properties

研究代表者

近藤 哲夫 (KONDO TETSUO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・講師

研究者番号： 30334858

研究成果の概要 (和文)：

本研究では甲状腺癌における Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) 発現にエピジェネティクス機構が関与するか検討を行った。その結果 TTF-1 プロモーターの DNA メチル化は甲状腺未分化癌の 60%に認め、TTF-1 遺伝子の発現とは逆の相関を示した。また TTF-1 遺伝子発現状態とヒストン蛋白の修飾には関連性が認められた。これらの結果は甲状腺癌における TTF-1 発現制御に DNA メチル化及びクロマチン修飾が関与することを示し、エピジェネティクス機構を介した甲状腺癌分化誘導療法への可能性を示唆した。

研究成果の概要 (英文)：

In the thyroid, Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) is essential for thyroid organogenesis and governs thyroid functions by regulating various thyroid-specific genes. However, certain subtypes of thyroid cancers have shown low or negative expression of TTF-1. The aim of our study was to investigate the function of epigenetic modification in dysregulation of TTF-1 in thyroid carcinoma cells. Our data showed that epigenetics is involved with inactivation of TTF-1 in thyroid carcinomas, and provide a possible means of using TTF-1 as a target for differentiation-inducing therapy through epigenetic modification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・人体病理学

キーワード： 甲状腺癌、遺伝子、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

TTF-1 は 1989 年にクローニングされた homeodomain を含む 38kd の DNA 結合蛋白分子で、その遺伝子発現は臓器特異性が高いことが知られ、甲状腺(濾胞上皮、C 細胞)、肺(肺胞上皮)、脳(rat embryo のみ)に発現がみられる。TTF-1 の knockout mouse model では甲状腺、肺、前頭葉の無形成となり、これら臓器の器官発生に必須の遺伝子と考えられている。また器官発生後も甲状腺濾胞上皮において TTF-1 は TTF-2、PAX-8 と協調して Thyroglobulin(Tg)、Thyroid peroxidase (TPO)、 Na^+/I^- symporter (NIS)、Pendrin (PDS)、Thyrotropin 受容体 (TSH-R) のプロモーターを活性化させ、甲状腺ホルモン合成に関して機能的にも重要な役割を果たしている。

正常甲状腺では濾胞上皮の核に TTF-1 は局在し、免疫組織化学的には良性甲状腺腫瘍、高分化甲状腺癌ではほぼ全例に TTF-1 は陽性だが、未分化癌では発現が抑制されており、陰性もしくはごく一部にわずかな陽性所見をみるのみである。甲状腺癌の脱分化に伴ってみられる TTF-1 の発現抑制のメカニズムは未だ解明されていない。さらに甲状腺癌では癌のプログレッション、脱分化に伴い TTF-1 のみでなく、Tg、TPO、NIS、PDS、TSH-R などの甲状腺特異的分子の発現も高度に抑制されている。これら甲状腺機能分子群が二次的な変化によって発現が抑制されているだけなのか、逆に癌抑制遺伝子のようにこれら甲状腺機能分子の発現抑制が癌のプログレッションを促進しているのかは甲状腺癌の病態を理解に重要であるが、これについても TTF-1 発現抑制のメカニズムとともに解っていない領域である。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに甲状腺癌の分化を司る TTF-1 遺伝子のエピジェネティクスによる発現

制御に焦点を当て、本研究では以下の3点についての解明を試みた。第一は TTF-1 プロモーターの DNA のメチル化及び Histon のアセチル化の状態を分析し TTF-1 遺伝子の発現と抑制との関連を明らかにすること、第二にはプロモーター遺伝子の人工的修飾により甲状腺癌細胞に TTF-1 遺伝子の発現を誘導する方法を確立すること、そして第三に分化誘導療法への発展性を探るべく TTF-1 遺伝子・蛋白の gain-/loss-of-function によるアプローチから TTF-1 遺伝子の甲状腺癌細胞の機能分化への影響、腫瘍に対する増殖抑制効果の有無について in vivo、in vitro のレベルで明らかにすることである。

3. 研究の方法

我々は TTF-1 遺伝子がエピジェネティクス機構により制御される可能性について注目し、TTF-1 遺伝子のプロモーター解析を行った。すると TTF-1 のプロモーター領域には CpG island が存在しており、プロモーター領域の DNA メチル化がこの遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性が示唆された(図1)。

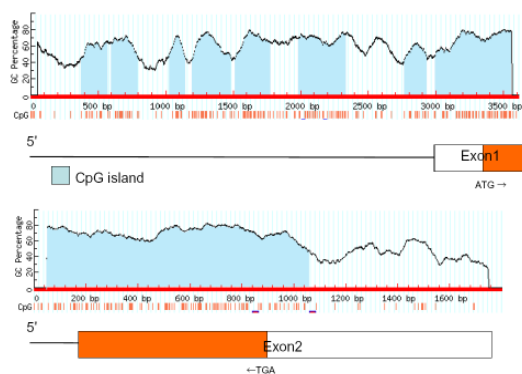


図1: TTF-1 プロモーター領域の CpG island。赤縦線は1個の CG 配列、青塗の部分 CpG 配列の集まる CpG アイランドを示す。

本研究では最初に CpG の DNA メチル化の有無を TTF-1 発現甲状腺癌と TTF-1 陰性甲状腺

癌との比較で行い、TTF-1 発現とプロモーター DNA のメチル化の相関を明らかにした。また TTF-1 発現正常組織(甲状腺、肺)と 非発現正常組織(肝臓、腎臓など)についてもプロモーター領域の DNA メチル化を調べ、TTF-1 の臓器特異的発現がプロモーターの DNA メチル化によるものかを検討した。

次にプロモーター領域の DNA・Histon の修飾による TTF-1 遺伝子の発現誘導について、DNA の脱メチル化薬剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine(AZA)及びHiston脱アセチル化阻害剤である Trichostatin A(TSA)の単独及び併用により、甲状腺癌培養細胞に TTF-1 遺伝子の発現誘導を試みた。

4. 研究成果

研究材料にはヒト甲状腺切除標本、ヒト甲状腺癌培養細胞株を用い、免疫組織化学、RT-PCR、methylation-specific PCR (MSP)、ChIP assay による解析を行った。

免疫組織化学では正常甲状腺組織、甲状腺乳頭癌に TTF-1 蛋白の発現が細胞核に認められたが、甲状腺未分化癌では TTF-1 蛋白は陰性であった(図2-A)。 mRNA レベルでも同様であり、RT-PCR では正常甲状腺組織、甲状腺乳頭癌に TTF-1 mRNA の発現が認められたが、甲状腺未分化癌では TTF-1 mRNA は陰性であった(図2-B)。

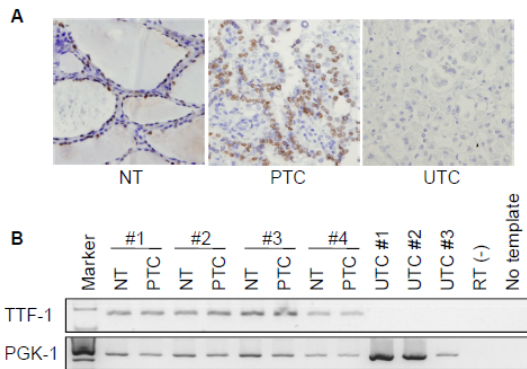


図2: 甲状腺組織における TTF-1 の発現。A、免疫組織化学。B、RT-PCR。NT = 正常甲状腺、

PTC = 乳頭癌(高分化甲状腺癌)、ATC = 未分化癌。

次に TTF-1 プロモーターのメチル化状態を、MSP によって解析した。MPS 分析では TTF-1 プロモーターの DNA メチル化は甲状腺未分化癌で60%、甲状腺癌細胞株で50%に認められ、TTF-1 遺伝子の発現とは逆の相関を示した(図3)。

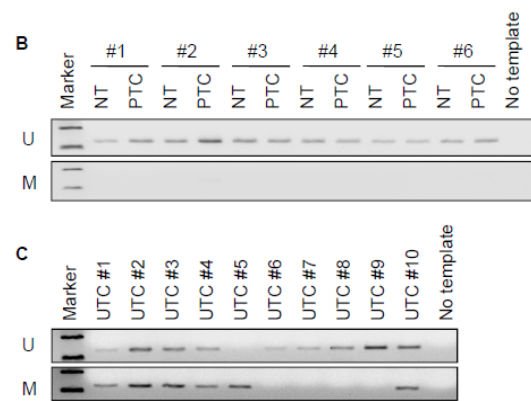


図3 メチル化特異的 PCR による TTF-1 プロモーターのメチル化分析。U = 非メチル化、M = メチル化、NT = 正常甲状腺、PTC = 乳頭癌(高分化甲状腺癌)、ATC = 未分化癌。

TTF-1 プロモーター領域の histone H3 lysine 9を ChIP assay で解析すると TTF-1 発現陽性の甲状腺癌細胞株(KTC-1、8505C)ではアセチル化が優位、TTF-1 陰性の細胞株(TPC-1、WRO、ARO)ではジメチル化が優位となり TTF-1 遺伝子発現とヒストン修飾には関連性がみられた(図4)。

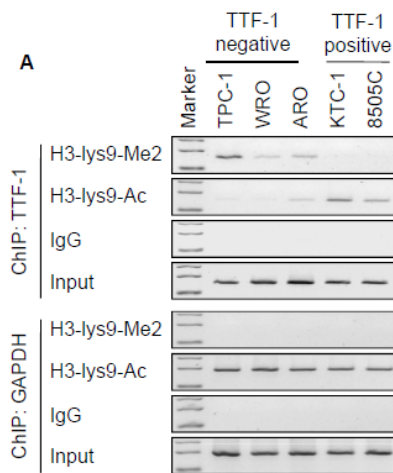


図4 ChIP アッセイによる TTF-1 プロモーター領域のヒストン修飾分析。

TTF-1 の発現とエピジェネティクス機構との関係が示されたため、エピジェネティクスを修飾する薬剤である DNA 脱メチル化剤 (AZA)、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (TSA) の細胞株への投与し、TTF-1 の発現を誘導できるか試みた。その結果、TSA では TTF-1 発現は誘導されなかったが、AZA 処理では TTF-1 陰性細胞株の一部に TTF-1 mRNA の誘導することができた (図5)。

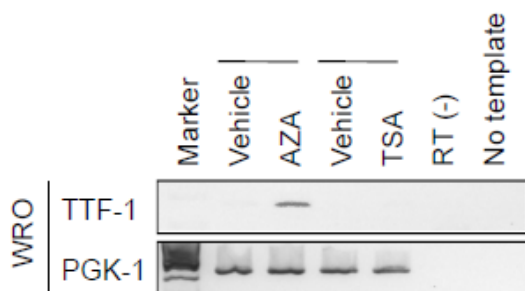


図5 エピジェネティクス TTF-1 の再誘導。

本研究の結果は甲状腺癌における TTF-1 発現制御には DNA メチル化及びクロマチン修飾が関与することを示し、エピジェネティクス機構を介した甲状腺癌分化誘導療法への可能性を示唆した。

ヒト腫瘍細胞における脱分化、再分化の分

子制御機構は未だ十分には解明されておらず、分化誘導療法への応用を含めてさらなる発展が必要とされている研究領域である。細胞分化を司る転写因子のエピジェネティクス制御と癌細胞の分化誘導に関する本研究の試みは甲状腺癌のみならず多くの癌細胞の分化制御に関する基礎データとなると思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Kondo T, Nakazawa T, Ma D, et al. Epigenetic silencing of TTF-1/NKX2-1 through DNA hypermethylation and histone H3 modulation in thyroid carcinomas. Lab Invest. 査読有、2009、89(7)、791-799

① Kondo T, Asa SL, Ezzat S. Epigenetic dysregulation in thyroid neoplasia Endocrinol Metab Clin North. 査読無、2008、37(2)、389-400

[学会発表] (計 2 件)

① 近藤 哲夫、他。転写因子 TTF-1 のエピジェネティクス制御に関する検討、第 13 回日本内分泌病理学会、2009 年 10 月 25 日、甲府

② 近藤 哲夫、他。甲状腺癌における thyroid transcription factor-1 のエピジェネティクス機構を介した遺伝子発現制御、第 98 回日本病理学会、2009 年 5 月 2 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 哲夫 (KONDO TETSUO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・講師
研究者番号：30334858

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし