

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09028

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた甲状腺がん病態研究

研究課題名(英文) Studies on thyroid cancer pathogenesis using mouse models

研究代表者

永山 雄二 (NAGAYAMA, Yuji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：30274632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺がんは最も高頻度な内分泌系がんで近年世界的に増加傾向にある。甲状腺がんの病態理解、新規治療法開発研究の材料として動物モデルが有用である。本研究では我々が近年樹立した人甲状腺がんの病態を忠実に再現したマウスモデルを用いて、(i) 逆作動薬効果を有する抗体及び低分子化合物による治療の可能性、(ii) キナーゼ阻害剤の作用機序が主に血管新生阻害であること、(iii) オートファジーの生理学的活性が甲状腺細胞の生存・恒常性維持に重要であり、オートファジー欠損はそれ自体甲状腺がん発生促進作用はないが、変異BRAF(甲状腺がんでは最も高頻度な遺伝子異常)による甲状腺がん発生を促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、世界的に増加傾向にあり、放射線での誘発がチェルノブイリから福島まで問題となっている甲状腺がんの新規治療法として逆作動薬(抗体及び低分子化合物)が有効であること、最近導入されたキナーゼ阻害剤の作用機序が実は主に血管新生阻害であること、オートファジーが甲状腺では腫瘍抑制的に作用していることを新規に見出したもので、甲状腺がんの病態から現状の治療法の作用機序、さらには将来の新規治療薬までを幅広く網羅した研究であり、甲状腺腫瘍学の進展に貢献すること大であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Thyroid cancer is the most common endocrine cancer and has been on the increase worldwide in recent years. Animal models are useful for understanding the pathogenesis of thyroid cancer and for research on the development of new treatment methods. In this study, using the mouse model that faithfully recapitulates the pathogenesis of human thyroid cancer that we have recently established, we investigated (i) the possibility of treatment with antibodies and small molecules that have a reverse agonist effect, (ii) the mechanism of action of kinase inhibitors is mainly inhibition of angiogenesis, (iii) the physiological activity of autophagy is related to (iii) physiological activity of autophagy is important for thyroid cell survival and maintenance of homeostasis, and although autophagy deficiency itself does not promote thyroid carcinogenesis, deficiency of autophagy promotes the development of thyroid cancer caused by mutant BRAF.

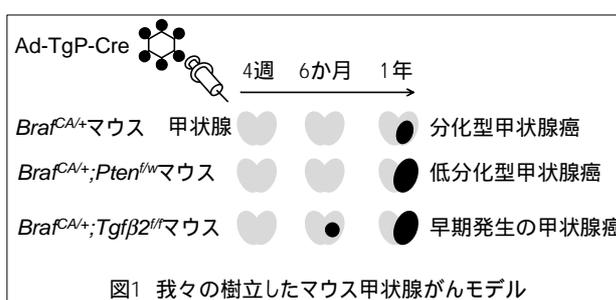
研究分野：甲状腺学

キーワード：甲状腺がん TSH受容体 オートファジー インバースアゴニスト

1. 研究開始当初の背景

甲状腺がんは最も頻度の高い内分泌系がんで、近年世界的に増加傾向にある。遺伝子レベルでは、がん原遺伝子RAS/RAFの点突然変異や染色体転座によるRET/PTC融合遺伝子等によるMAPK情報伝達経路の異常活性が原因であり、散発性甲状腺がんでは変異BRAF (BRAF^{V600E}) が最も高頻度である。治療は手術と放射性ヨウ素 (RAI) を用いた内照射療法が標準で、これらが効果的であれば非常に予後はいいが、根治切除不能例やRAI抵抗性が生じた場合は予後が悪化する。その場合、抗がん剤、TSH抑制療法、最近では治験段階も含めて各種分子標的薬 (キナーゼ阻害剤やオートファジー阻害剤等) が使用されるが、副作用や治療抵抗性が問題となっている。

甲状腺がんの病態理解、新規治療法の開発研究の材料としては、ヒト検体使用が理想ではあるが、できることには限界があり、動物モデルがどうしても必要となる。現在まで種々のマウスモデルが報告されてきたが、(i)胎生期から全ての甲状腺細胞に異常遺伝子が発現する、(ii)TSHが上昇する、等ヒトの病態から大きく外れたモデルばかりであった。そこで我々はヒト甲状腺がんの病態を忠実に再現したマウスモデルを樹立することを目指し、近年それに成功した。図1に示すように、このモデルではBraf^{CA/+}マウス (loxP配列を持ち、CreによりBRAF^{V600E}が発現)の甲状腺片葉に微量のAd-TgP-Cre (甲状腺特異的に (サイログロブリンプロモーターを用いている) Cre DNA recombinaseを発現する組換えアデノウイルス) を注入して、生後に一部の甲状腺細胞にBRAF^{V600E}を発現させ、正常なTSHレベルを保った状態で甲状腺に分化型がんを誘発できるもので、上記欠点を克服している。



に再現したマウスモデルを樹立することを目指し、近年それに成功した。図1に示すように、このモデルではBraf^{CA}マウス (loxP配列を持ち、CreによりBRAF^{V600E}が発現)の甲状腺片葉に微量のAd-TgP-Cre (甲状腺特異的に (サイログロブリンプロモーターを用いている) Cre DNA recombinaseを発現する組換えアデノウイルス) を注入して、生後に一部の甲状腺細胞にBRAF^{V600E}を発現させ、正常なTSHレベルを保った状態で甲状腺に分化型がんを誘発できるもので、上記欠点を克服している。

このモデルからさらに、腫瘍抑制遺伝子PTEN欠失併存による低分化型がんモデル、TGF-β11型受容体欠失併存による早期発症モデルも樹立した。このように、我々は真に役に立つモデル作りを長年の研究の柱の一つとしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、当研究室で樹立した上記モデルや今後さらに目的に合わせた作出する新規開発モデルを用いて;

- (1) 逆作動薬 (インバースアゴニスト inverse agonist) 効果を有する抗体及び低分子化合物による治療の可能性
- (2) キナーゼ阻害剤の作用機序の解析とバイオマーカーの検索
- (3) オートファジーの生理学的機能と標的阻害の効果、を問う。

3. 研究の方法

- (1) 逆作動薬を用いた新規治療法: TSHは正常甲状腺の機能・増殖調節ホルモンで、分化型甲状腺がん

(3) オートファジーの研究：オートファジー阻害剤の抗甲状腺がん作用の報告がある一方で、オートファジー細胞死によるがん抑制の報告、腫瘍免疫におけるオートファジーの重要性の報告もあり抗がん剤としての一定の見解が出ていない。よって免疫系が正常な我々のモデルでオートファジー阻害剤の効果・作用機序を解析する。しかし、そもそも正常甲状腺でのオートファジーの生理的役割が全く不明である。よって図3に示すように、まずオートファジーの甲状腺における生理機能解析（ ）から開始し、以後がんの研究へ進む（ ~ ）。

正常甲状腺でのオートファジーの生理的機能：(i)野生型マウス甲状腺でのホルモン（TSHと T_4 ）によるオートファジー調節と、(ii)甲状腺特異的オートファジー関連分子Atg5欠損マウスを用いて甲状腺形態・機能の変化を解析する。後者のため、 $Atg5^{flx/flx}$ マウスと甲状腺特異的Cre発現TPO-Creマウス（共に入手済）を交配して、甲状腺特異的オートファジー欠失マウス（ $Atg5^{flx/flx};TPO-Cre$ ）を作出する。

オートファジー欠失による自然がん化：Ad-TgP-Creを用いて $Atg5^{flx/flx}$ マウス甲状腺の一部にオートファジー欠失を誘発し、自然発がんを観察する（このマウスも使用可能だが、 $Atg5^{flx/flx};TPO-Cre$ マウスが甲状腺機能低下になる危険があるので、ここでは使用は避ける）。

BRAF^{V600E}による発がんに及ぼすオートファジー欠損の影響：前述のBRAF^{V600E}モデル発がんへのAtg5欠失の影響（特に癌発生早期化）を検討するため、 $Braf^{CA/+};Atg5^{flx/flx}$ マウスを作出し、Ad-TgP-Creを用いて、 $Braf^{CA/+}$ 単独マウスと発がん経過を比較検討する。

がん治療へのオートファジーの影響：オートファジー阻害剤の単独効果は勿論だが、オートファジーと腫瘍免疫の関係が最近注目され、ある種の抗がん剤や放射線が免疫原性細胞死（ICD）を誘導し腫瘍免疫を刺激する作用にオートファジーが重要な役割を果たしていると報告されている。よって、これらを免疫が正常な我々のマウスモデルで検討する。 $Braf^{CA/+}$ マウス及び $Braf^{CA/+};Atg5^{flx/flx}$ マウスでの甲状腺がん（後者はオートファジー欠失）で、オートファジー阻害剤であるクロロキンの単独効果、放射線によるICD誘導の効果を比較検討する。

4. 研究成果

(1) 逆作動薬（inverse agonist）を用いた新規治療法：

米国のRapoportらが単離した逆作動薬活性を持つ抗TSH受容体単クローン性抗体(CS-17)を入手し、ヌードマウスを用いて腹水作製、抗体精製を行った。また、米国のGershengornらから低分子化合物の逆作動薬も入手した。これらは、培養甲状腺細胞であるラットPCCL3細胞を用いた基礎検討では容量依存性にTSHの作用を抑制しただけでなく、TSH非添加細胞のcAMP基礎値も低下させ、逆作動薬作用を確認できた。

これらの抗がん作用を検討するため、 $Braf^{CA}$ マウス甲状腺にAd-TgP-Creを注入し、1年かけて甲状腺腫瘍を誘導した。 $Braf^{CA}$ マウスの甲状腺腫瘍を無処置コントロール群と逆作動性抗TSH受容体単クローン性抗体(CS-17)或いは逆作動性低分子化合物処理群に分けて、腫瘍サイズを経時的に検討したところ、後者2群で共に有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。この2群間ではCS-17の方が効果は大であった。これらの実験結果より、変異BRAFによる甲状腺がんの増殖はTSH依存性であり、この増殖刺激経路の抑制は抗ガン治療として有用であることが示唆された。

(2) キナーゼ阻害剤の作用機序の解析：

キナーゼ阻害剤ソラフェニブとレンバチニブ、血管新生阻害剤ベバシズマブの抗腫瘍効果を比較検討

するため、[1]と同様に同時に*Braf^{CA}*マウス甲状腺にAd-TgP-Creを注入し、1年かけて甲状腺腫瘍を誘導した。

変異BRAF陽性甲状腺がんを無処置コントロール群とキナーゼ阻害剤或いは血管新生阻害剤処理群に分け、経時的に腫瘍サイズの変化を超音波検査で観察したところ、治療群では有意なほど同様の抗腫瘍効果が認められた。病理学的には、無処置コントロール群に比較して処置群では著明な血管の減少が見られ、キナーゼ阻害剤の効果が主に血管新生阻害であることが示唆された。

(3) オートファジーの研究：

正常甲状腺でのオートファジーの生理的機能特にホルモンによる調節をラット甲状腺細胞株であるPCCL3を用いたin vitro実験とマウスを用いたin vivoで検討し、TSHはオートファジーを正に調節し、T4は負に調節することを明らかにした。オートファジーKOマウスの検討では甲状腺細胞での蛋白蓄積・活性酸素上昇・アポトーシス誘導が見られたことより、基礎レベルでのオートファジー活性が甲状腺細胞の生存・ホメオスタシス維持に重要であることを見出した。

次いで、オートファジー欠失による自然がん化の研究を開始した。オートファジーに關与する分子の1つであるATG5の遺伝子にloxP配列を挿入した*Atg5^{fllox/fllox}*マウス甲状腺へのAd-TgP-Creを注入し、18か月まで経過を観察したが、腫瘍形成は全く認められなかった。並行して、Atg5とは別経路でミトファジーに關与するMIEAP (mitochondria-eating protein)にも着目し、*Mieap⁰*マウスでも甲状腺腫瘍自然発生を18か月まで観察したがこのマウスでも腫瘍形成は認められなかった。

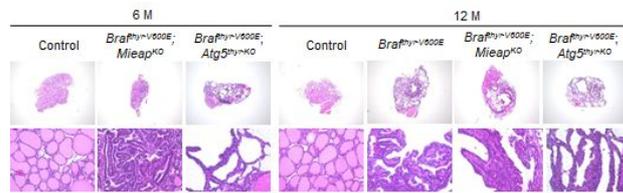


図4. 甲状腺病理像

そこで、*Braf^{CA};Atg5^{fllox/fllox}*マウスと *Braf^{CA};Mieap⁰*マウスを作成し、甲状腺腫瘍形成を比較したところ、*Braf^{CA}*マウスでは6か月で全く腫瘍形成が認められなかったのに対し、後二者では6か月で既に甲状腺腫瘍増殖が見られた(図4)。これによりオートファジー、特にミトファジーの欠損は変異BRAFによる甲状腺がんの発生を促進することが明らかとなった。

しかし3者間でサイログロブリン抗体で評価した腫瘍の分化度には差がなかった(図5)。

また、これらの腫瘍ではオンコサイトーマを思わせる病理像は観察されず、少なくとも甲状腺ではミトファジーの欠損のみではオンコサイトーマにはならないことが明らかとなった。

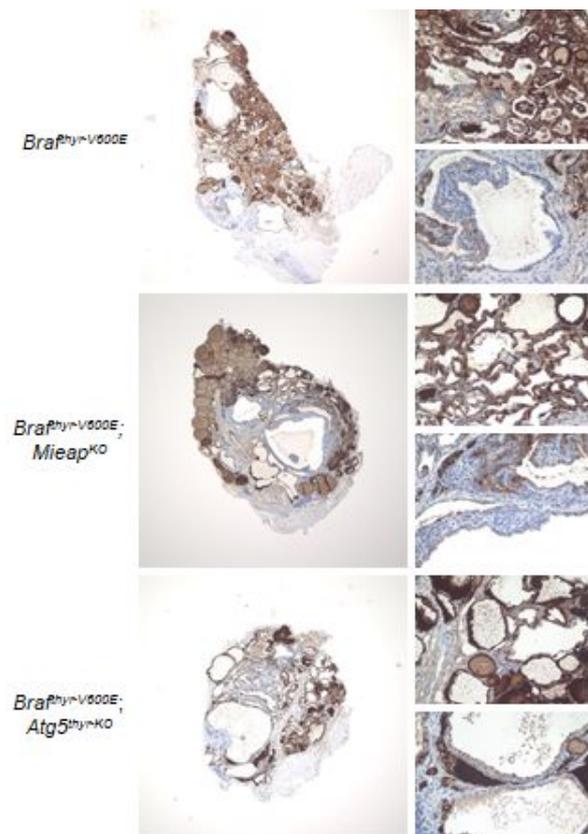


図5. サイログロブリン染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kazakova D, Shimamura M, Kurashige T, Hamada K, Nagayama Y	4. 巻 69 (7)
2. 論文標題 Re-evaluation of the role for autophagy in thyroid cancer treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 847-862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ22-0017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsuu-Matsuyama M, Shichijo K, Matsuda K, Fujimoto N, Kondo H, Miura S, Kurashige T, Nagayama Y, Nakashima M	4. 巻 11 (1)
2. 論文標題 Age-dependent effects on radiation-induced carcinogenesis in the rat thyroid.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98481-z	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 -
1. 著者名 Nagayama Y	4. 巻 7
2. 論文標題 Autophagy and thyroid cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cancer Metastasis Treat	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20517/2394-4722.2020.114	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 -
1. 著者名 Mussazhanova Z, Shimamura M, Kurashige T, Ito M, Nakashima M, Nagayama Y	4. 巻 111 (8)
2. 論文標題 Causative role for defective expression of mitochondria-eating protein in accumulation of mitochondria in thyroid oncocytic cell tumors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2814-2823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14501	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 Davies TF, Andersen S, Latif R, Nagayama Y, Barbesino G, Brito M, Eckstein AK, Green AS, Kahaly GJ.	4. 巻 6 (1)
2. 論文標題 Graves ' disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Review Disease Primers	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41572-020-0184-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ngayama Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Commentary: Excessive iodine promotes pyroptosis of thyroid follicular epithelial cells in Hashimoto's thyroiditis through the ROS-NF- B-NLRP3 pathway.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontier Endocrinology - Thyroid Endocrinology	6. 最初と最後の頁 581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2020.00581	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 -

1. 著者名 Kurashige T, Shimamura M, Nagayama Y	4. 巻 4 (11)
2. 論文標題 Re-evaluation of the effect of iodine on thyroid cell survival and function with PCCL3 and Nthy-ori 3-1 cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 bvaa146,
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvaa146	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 Kurashige T, Nakajima Y, Shimamura M, Matsuyama M, Yamada M, Nakashima M, Nagayama Y	4. 巻 160 (9)
2. 論文標題 Basal autophagy deficiency causes thyroid follicular epithelial cell death in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 2085-2092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2019-00312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagayama Y, Mishima H	4. 巻 66 (3)
2. 論文標題 Heterogenous nature of gene expression patterns in BRAF-like, classical papillary thyroid carcinomas with BRAFV600E.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine	6. 最初と最後の頁 607-613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12020-019-02063-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimamura M, Kurashige T, Kumatov R, Nagayama Y	4. 巻 69 (3)
2. 論文標題 Acceleration of BRAFV600E-mediated thyroid carcinogenesis by TGF signal deficiency.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine	6. 最初と最後の頁 571-577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12020-020-02298-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurashige T, Nakajima, Shimamura M, Yamada M, Nagayama Y	4. 巻 4
2. 論文標題 Hormonal Regulation of Autophagy in Thyroid PCCL3 Cells and the Thyroids of Male Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 bvaa054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvaa054	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 -

1. 著者名 Hamada K, Kurashige T, Shimamura M, Arakawa F, Nakamura Y, Nagayama Y	4. 巻 13
2. 論文標題 MIEAP and ATG5 are tumor suppressors in a mouse model of BRAFV600E-positive thyroid cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 932754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.932754	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 -

1. 著者名 Nagayama Y, Nishihara E	4. 巻 69 (11)
2. 論文標題 Thyrotropin receptor antagonists and inverse agonists, and their potential application to thyroid diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1285-1293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ22-0391	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagayama Y, Hamada K	4. 巻 12
2. 論文標題 Reprogramming of cellular metabolism and its therapeutic applications in thyroid cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 1214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo12121214	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 -

1. 著者名 Kurashige T, Shimamura M, Hamada K, Matsuse M, Mitsutake N, Nagayama Y	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization of metabolic reprogramming by metabolomics in the oncocyctic thyroid cancer cell line XTC.UC1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-27461-2	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 -

1. 著者名 Uchida T, Shimamura M, Taka H, Kaga N, Miura Y, Nagayama Y, Watada H	4. 巻 33 (3)
2. 論文標題 The effect of inorganic iodine on gene expression and iodothyronines contents in the thyroid of mouse with Graves' hyperthyroidism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 330-337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2022.0496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永山雄二、Mussazhanova Zhanna、嶋村美加、中島正洋
2. 発表標題 甲状腺オンコサイトーマにおけるmitochondria eating protein (MIEAP)の発現・機能
3. 学会等名 第5回放射線災害・医科学研究拠点カンファランス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永山雄二
2. 発表標題 三宅賞受賞記念講演：甲状腺オンコサイトーマの研究
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永山雄二
2. 発表標題 甲状腺癌マウスモデル研究
3. 学会等名 第32回日本内分泌外科学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagayama Y
2. 発表標題 Autophagy in the thyroid
3. 学会等名 Asia Oceania Thyroid Association（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagayama Y
2. 発表標題 Radiation-induced thyroid cancer; comparison Nagasaki/Hiroshima, Chernobyl and Fukushima.
3. 学会等名 The NASHIM seminar (招待講演)
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
研究分担者	蔵重 智美 (KURASHIGE Tomomi) (60568955)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・客員研究員 (17301)	
研究分担者	嶋村 美加 (SHIMAMURA Mika) (90736406)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------