

平成 22 年 4 月 19 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20790662
 研究課題名（和文） 甲状腺癌幹細胞説の証明：甲状腺幹細胞は癌の起源となりうるのか？
 研究課題名（英文） Cancer stem cell theory in thyroid carcinogenesis
 研究代表者
 光武 範吏 (MITSUTAKE NORISATO)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号： 50404215

研究成果の概要（和文）：

本研究により、ヒト甲状腺初代培養細胞から幹細胞様細胞を単離する事に成功した。得られた細胞は、甲状腺細胞のみならず、神経や脂肪細胞への分化も確認され、複数の系統の細胞に分化できる細胞である事が示唆された。細胞の単離段階を詳しく検討したところ、甲状腺細胞からのリプログラミングによって幹細胞様性質を獲得したのではないかと考えられた。これらのリプログラミングが、癌幹細胞の発生に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We have successfully developed a novel culture system to isolate stem-like cells from human normal thyroid tissues. These cells had differentiation potentials not only into thyroid follicular cells but also into neuron or adipocytes. The isolated cells may be directly reprogrammed from thyroid follicular cells, and this reprogramming might be involved in generating cancer stem cells during carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：甲状腺、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 甲状腺乳頭癌には、RET/PTC、RAS、BRAF 遺伝子等に変異が見られ、実際これらの変異遺伝子を甲状腺細胞に発現させるトランスジェニックマウスでは、甲状腺に発癌

が観察される。ところが、よく分化した正常甲状腺細胞にこれら癌遺伝子を発現させても、細胞の形質転換、癌化、ホルモン非依存性などは観察されない。これらの動物と細胞のモデルの間には乖離が存在する。この乖離

を説明するためには、甲状腺幹細胞に関する理解が必要であると考えられた。

(2) これまで、我々の報告も含め、甲状腺癌細胞、正常甲状腺組織などから幹細胞を単離培養したという報告は数報あるものの、どれも制限があり、確立された方法はない。

2. 研究の目的

(1) ヒト正常甲状腺組織の初代培養から甲状腺幹細胞を同定、単離し、その性質を詳しく解析する。

(2) 甲状腺幹細胞が発癌の起源となりうるのかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 様々な正常細胞、幹細胞の培養に用いる無血清培地（通常、種々の成長因子を含む）を使って、初代培養甲状腺細胞を培養し、幹細胞様細胞の単離を試みた。

(2) 単離した細胞集団を、Side population 法で解析した。

(3) 単離した細胞の性質、起源を明らかにするため、甲状腺特異的遺伝子の発現、中間径フィラメントの発現を確認した。

(4) 単離した細胞の分化能を検討するため、血清、TSH をはじめ、様々な分化誘導刺激を加え、多能性を検討した。

(5) マイクロアレイにより、発現遺伝子の網羅的な解析を行った。

(6) 細胞の形質転換のため、hTERT から、BRAFV600E、RET/PTC1 等の遺伝子導入を行うためのレンチウイルスの構築、生成を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト甲状腺初代培養細胞から、ある特殊な培地（無血清、種々の成長因子を含む）を用い、大部分の分化した細胞は増殖出来ないかアポトーシスを起こしてしまうものの、ごく一部の細胞だけを増殖させる事が出来る系を確立した。この培地を用いると、初代培養甲状腺細胞 10,000 個あたり、約 50-70 個のコロニーを形成する事が出来る細胞を増殖、単離する事が出来た。

(2) この細胞集団は、甲状腺の分化したマーカーであるサイログロブリンの発現等は見られず、未分化な状態の幹細胞、もしくはそれに近い細胞である事が予想された。

(3) これらの細胞の side population 分画の存在を調べたが、明らかな side population 分画は確認されなかった。

(4) これらの細胞はまた、上皮系のマーカーであるサイトケラチンの発現も陰性であるため、これらの細胞が甲状腺組織に存在した間葉系幹細胞である可能性を考え、間葉系細胞のマーカーで染色したが、これも陰性であった。

(5) これらの細胞を血清と TSH 存在下で培養し、甲状腺細胞への分化を試みた。約 1 ヶ月間の刺激で、細胞はサイトケラチンとサイログロブリンを発現する様になり、確かに甲状腺細胞へ分化していると考えられた。さらに、適切な分化誘導刺激下で、神経細胞や脂肪細胞への分化も観察された。このことから、増殖してきた細胞集団は、甲状腺濾胞細胞への分化能を含む多分化能を持つ幹細胞、もしくはそれに近い細胞集団である事が示唆された。

(6) 甲状腺初代培養細胞と、そこから単離した幹細胞様細胞について、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて、発現遺伝子の網羅的な解析を行った。3 ペアで確認したが、初代培養細胞と幹細胞様細胞のプロファイルには明確な差異が見られるものの、それぞれの種類では同じような発現パターンとなり、幹細胞様細胞の単離には再現性が見られる事が分かった。幹細胞様細胞では、サイログロブリン、TSH レセプター、PAX8、TTF1 等の甲状腺特異的遺伝子の発現はほとんど見られず、CD106、CD105、CD90 等いくつか間葉系幹細胞様の遺伝子発現亢進が見られ、未分化な細胞集団ではないかと思われた。

(7) これらの細胞を不死化、または癌化を誘導するために、hTERT、Bmi-1、BRAFV600E、RET/PTC1 等の遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを構築した。

(8) 我々が施行した特殊な培養法では、甲状腺濾胞細胞にリプログラミングを引き起こした事を示唆する。我々の方法では遺伝子導入は行わず、薬剤や成長因子のみでリプログラムを誘導した事になり、応用の幅が広がる可能性がある。今後は、ウイルスベクターを用いた機能解析実験、さらにより効果の高い培養法、分化誘導方法を検討していく予定である。

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 9 件)

1. Saitoh O, Mitsutake N, Nakayama T, Nagayama Y 2009 Fibroblast-mediated in vivo and in vitro growth promotion of tumorigenic rat thyroid carcinoma cells but not normal Fisher rat thyroid follicular cells. *Thyroid* 19:735-742. (査読あり)

2. Matsuse M, Mitsutake N, Nishihara E, Rogounovitch T, Saenko V, Romyantsev P, Lushnikov E, Suzuki K, Miyauchi A, Yamashita S 2009 Lack of GNAQ hotspot mutation in papillary thyroid carcinomas. *Thyroid* 19:921-922. (査読あり)

3. 光武範吏, 山下俊一 2009 甲状腺癌における癌遺伝子の役割と分子標的治療 日本内科学会雑誌 98:1999-2005. (査読なし)

4. Matsuse M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko V, Nakazawa Y, Romyantsev P, Lushnikov E, Suzuki K, Yamashita S 2009 Mutation analysis of RAP1 gene in papillary thyroid carcinomas. *Endocr J* 56:161-164. (査読あり)

5. *Chen X, *Mitsutake N, LaPerle K, Akeno N, Zanzonico P, Longo VA, Mitsutake S, Kimura ET, Geiger H, Santos E, Wendel HG, Franco A, Knauf JA, Fagin JA 2009 Endogenous expression of Hras(G12V) induces developmental defects and neoplasms with copy number imbalances of the oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7979-7984. (査読あり)

*These authors contributed equally.

6. Akulevich NM, Saenko VA, Rogounovitch TI, Drozd VM, Lushnikov EF, Ivanov VK, Mitsutake N, Kominami R, Yamashita S 2009 Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 16:491-503. (査読あり)

7. Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, Namba H, Saenko VA, Rogounovitch TI, Nakazawa Y, Hayashi T, Ohtsuru A, Yamashita S 2008 Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci* 99:1147-1154. (査読あり)

8. Nakazawa Y, Saenko V, Rogounovitch T, Suzuki K, Mitsutake N, Matsuse M,

Yamashita S 2008 Reciprocal paracrine interactions between normal human epithelial and mesenchymal cells protect cellular DNA from radiation-induced damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71:567-577. (査読あり)

9. Meng Z, Mitsutake N, Nakashima M, Starenki D, Matsuse M, Takakura S, Namba H, Saenko V, Umezawa K, Ohtsuru A, Yamashita S 2008 Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear Factor-kappaB inhibitor, enhances antitumor activity of taxanes in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology* 149:5357-5365. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 14 件)

1. Rogounovitch T A mechanism of molecular diversity of monoclonal papillary thyroid carcinomas 日本甲状腺学会 2009/11/3-5, 名古屋

2. 松瀬 美智子 甲状腺乳頭癌における GNAQ 遺伝子変異 日本甲状腺学会 2009/11/3-5, 名古屋

3. 光武 範吏 ヒト甲状腺正常幹細胞単離培養の試み 日本甲状腺学会 2009/11/3-5, 名古屋

4. Stanojevic B Mutational and clinico-pathological analysis of papillary thyroid carcinoma in Serbian patients Asia and Oceania Thyroid Association Congress 2009/11/1-4, Nagoya

5. Saenko V Molecular diversity of papillary thyroid carcinoma assessed by simultaneous determination of tumor clonality and somatic oncogenic mutation Asia and Oceania Thyroid Association Congress 2009/11/1-4, Nagoya

6. Saenko V Efficient preoperative evaluation of thyroid nodules by molecular analysis of FNAB materials 日本内分泌学会 2009/4/23-25, 前橋

7. Romyantsev P Clinical course of papillary thyroid carcinoma in children and adolescent age groups 日本内分泌学会 2009/4/23-25, 前橋

8. 熊谷 敦史 難治性甲状腺癌に対する分子標的治療・放射線併用療法 日本内分泌学会 2009/4/23-25, 前橋

9. 光武 範吏 甲状腺細胞における BRAF の機能 日本内分泌学会 2009/4/23-25, 前橋

10. 松瀬 美智子 甲状腺乳頭癌における RAP1 遺伝子変異 日本甲状腺学会 2008/11/21-23, 宇都宮

11. Mitsutake N DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, enhances anti-tumor activity of taxanes in anaplastic thyroid cancer cells International Congress of Endocrinology 2008/11/8-12, Rio de Janeiro, Brazil

12. 光武 範吏 甲状腺未分化癌細胞に対する NF-kappaB 阻害剤 DHMEQ とタキサンの併用効果の検討 日本癌学会 2008/10/28-30, 名古屋

13. Rogounovitch T, Mitsutake N Molecular and clinico-pathological analysis of pediatric thyroid cancers in Belarus Endocrine Society Meeting 2008/6/15-18, San Francisco, USA

14. 光武 範吏 甲状腺未分化癌に対する抗癌剤と分子標的治療の併用効果 日本内分泌学会 2008/5/16-18, 青森

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光武 範吏 (MITSUTAKE NORISATO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50404215