

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08953

研究課題名(和文) 遺伝子変異解析と網羅的遺伝子発現解析を用いた甲状腺未分化癌発症の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of development of anaplastic thyroid cancer using gene mutation analysis and comprehensive gene expression analysis

研究代表者

伊藤 研一 (Ito, Ken-ichi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：10334905

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)：甲状腺未分化癌に対する新規治療戦略を開発するために、多標的チロシンキナーゼ阻害薬であるレンバチニブの、未分化癌細胞株FROに対する感受性を解析し、以下の結果を得た。(1)レンバチニブ投与により、FRO細胞のEGFRリン酸化が活性化する。(2)レンバチニブとEGFR阻害剤の併用は、*in vitro*でのFRO細胞の増殖を相乗的に抑制する。(3)FRO細胞移植マウスモデルで、レンバチニブとEGFR阻害剤の併用はアポトーシスを有意に増加させ、レンバチニブ単剤投与に比べ、有意に腫瘍増殖を抑制する。以上から、甲状腺未分化癌に対し、レンバチニブとEGFR阻害剤の併用が、新規治療戦略になる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、極めて予後不良な難治性悪性腫瘍である甲状腺未分化癌が、本邦で承認されている分子標的薬に対し耐性を示す機序の一部を解明した。既存の分子標的薬を用いた方法で耐性の克服が一部可能であり、臨床応用の可能性が期待できる。難治性の稀少癌である未分化癌に対する新規治療戦略を創出できたことは、意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel therapeutic strategy for anaplastic thyroid cancer (ATC), we analyzed the sensitivity of lenvatinib, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor (TKI) indicated for ATC in Japan, to the ATC-derived cell line FRO and obtained the following results. (1) Lenvatinib treatment activates EGFR phosphorylation in FRO cells. (2) The combination of lenvatinib and an EGFR inhibitor synergistically inhibits FRO cell proliferation *in vitro*. (3) In a mouse model of FRO cell transplantation, the combination of lenvatinib and an EGFR inhibitor significantly increased apoptosis of cancer cells and significantly inhibited tumor growth compared to lenvatinib alone. These results suggest that the combination of lenvatinib and an EGFR inhibitor may be a novel therapeutic strategy for ATC.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：甲状腺未分化癌 稀少癌 新規治療戦略 分子標的薬 薬剤耐性機構

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦では年間約 18000 人が甲状腺癌に罹患し、その約 1 割の約 1800 人が死亡している。甲状腺癌の多くは比較的予後の良い分化癌(乳頭癌、濾胞癌)であるが、甲状腺癌の約 2%を占めるに過ぎない未分化癌が、甲状腺癌による死亡の約 50%を占めており、その予後はきわめて不良である。未分化癌は、ヒト悪性腫瘍の中でも最も悪性度の高い腫瘍として知られており、診断確定後の平均生存期間は約 6 ヶ月である。まれに長期生存例が報告されるが、有効性が証明された化学療法剤はなく放射線感受性も低い。また、発症頻度が少ない「orphan disease」でもあるため薬剤開発もあまり進まず、いまだ治療法は確立されていない。当科の過去 25 年間の症例の解析でも、その治療成績には全く改善が認められていない(Ito et al. Head Neck, 2012)。2015 年に本邦では分子標的薬レンパチニブの使用が可能になったが、その効果は極めて限定的で生命予後の延長をもたらすものではなく、時に重篤な有害事象も引き起こすため、新規治療戦略の開発が待たれている。一方、未分化癌は緩徐に進行する分化癌が「未分化転化」して発生してくることが知られている。「未分化転化」が起こると腫瘍は短期間に増大すると同時に遠隔転移を生じることから、「未分化転化」に伴い癌細胞の分子生物学的性質が大きく変化していることが推測される。甲状腺分化癌では、ドライバー遺伝子変異として、乳頭癌では *BRAF* 変異や *RET/PTC* の再構成が、濾胞癌では *RAS* 変異や *PAX8/PPAR* の再構成が高率に認められており、さらに *TP53* や *TERT*、*CTNNB1*、*PIK3CA* などに変異が加わることで脱分化が進み、低分化癌や未分化癌に進展すると考えられている。これらの知見から、海外では既に *BRAF* 阻害剤と *MEK* 阻害剤の併用療法が臨床応用され、一部の未分化癌で奏効することが報告されている。しかし、未分化癌の多くは未だ致命的であり、生物学的におとなしく、かつドライバー遺伝子も単一ではない分化癌が、どのような機序で極めて高い悪性形質を有する未分化癌に転化していくのか、未だその詳細は解明できていない。未分化癌の新規治療戦略の開発のためには、その分子生物学的機序の解析が必須であり、そこから治療戦略の端緒が得られると考えられる。

我々はこれまでに分化癌から未分化癌への移行が認められる臨床検体から、レーザー マイクロダイセクション法を用いて異なる分化度の癌組織を採取し網羅的遺伝子発現解析を施行し、未分化転化の過程で発現が大きく変動している遺伝子を複数同定することに成功し、その中のいくつかについて解析を進めてきた。現在までに、*EpcAM* (Epithelial cell adhesion molecule) が未分化癌細胞で発現が上昇し、特に核での発現が増加すること(Okada, Ito, et al. PLoSOne 2014)、転写因子 *PATZ1* (*POZ* (*BTB*) and *AT* hook containing zinc finger 1)の発現低下が、濾胞上皮細胞の癌化および脱分化の進行に伴い認められ、分化癌細胞株で *PATZ1* を抑制すると細胞遊走能や浸潤能が増強されることから、*PATZ1* が甲状腺癌の悪性度に関与していること(Iesato, Ito, et al. Oncotarget, 2017)などを報告しているが、「未分化転化」の鍵となる分子を同定するには至っておらず、転化の引き金となる遺伝子変異の存在を推測している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、上記のように極めて悪性度が高くかつ「orphan disease」である甲状腺未分化癌の予後を改善する為に、未分化癌の新規治療戦略の開発に繋がる知見を得ることである。具体的には、臨床病理学的に未分化転化を起こしたことが確認できている臨床検体を用いて、「分化癌部」と「未分化癌に転化した部分」の遺伝子変異および遺伝子発現の変化を詳細に比較解析し、分化癌が「未分化転化」をおこす分子生物学的機序を解析し、「未分化転化」

した癌細胞に高い悪性度を誘導している分子を同定し、治療標的となる候補遺伝子を探索することを目的とした。

具体的には、臨床病理学的に分化型甲状腺癌からの未分化転化が確認できる臨床検体から、マイクロダイセクション法を用いて「分化癌部」と「未分化癌に転化した部分」を採取し、「未分化転化」の過程での「遺伝子発現変化」をマイクロアレイ法を用いて網羅的に解析し、分化型甲状腺癌が「未分化転化」をおこす過程で重要な役割を果たす遺伝子を同定し、同定された遺伝子の機能解析を *in vitro* で行い、「未分化転化」の分子生物学的機構を明らかにすることを目的とした（解析1）。

一方、近年多標的チロシンキナーゼ阻害薬(MKI)が導入され、進行再発甲状腺癌の予後は改善している。MKIの一つであるレンパチニブは、未分化癌を含む進行再発甲状腺癌の治療に広く用いられているが、最初からレンパチニブに感受性を示さない甲状腺癌もあり、また、治療中に耐性を獲得する症例も珍しくはない。そのため、レンパチニブに対する耐性を獲得した後の適切な治療選択が今後の課題である。そこで、本研究では、未分化癌を含む甲状腺癌細胞のレンパチニブ耐性機序を明らかにし、耐性を克服する新規治療法を創出することも目的とした（解析2）。

### 3．研究の方法

#### 【解析1】

当院で手術を行った4症例の甲状腺未分化癌の切除検体から、レーザー マイクロダイセクション法を用いて「分化癌部」と「未分化癌部」を切り出し、RNAを抽出し、抽出したRNAを用いてマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析を行った。「分化癌部」と「未分化癌部」で大きな発現の変動が認められた遺伝子を抽出した。

#### 【解析2】

乳頭癌由来細胞株であるTPC-1と未分化癌由来細胞株FROで、長期間レンパチニブに暴露し耐性株(TPC-1/LR、FRO/LR)を樹立した。分子標的薬の感受性をWST法で評価し、シグナル伝達経路の分子発現やリン酸化、また、各種分子標的薬投与による変化をWestern blot法で解析した。さらに、BALB/Cヌードマウスでマウス異種移植モデルを作成し、*in vivo*での薬剤の腫瘍増殖抑制効果を、腫瘍体積の変化と腫瘍組織のTUNEL法及びKi67免疫染色で解析した。他に、濾胞癌細胞株FTC、未分化癌細胞株ACT-1、OCUT-1F、OCUT-3を用いて、短時間薬剤に暴露した際の変化を解析した。

### 4．研究成果

#### 【解析1】

甲状腺未分化癌と分化癌の網羅的遺伝子発現解析の結果から、EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule)に着目し、EpCAMの機能解析を *in vitro* と *in vivo* の実験系を用いて行い、これまでに以下の結果を得た。(1)甲状腺未分化癌 (Anaplastic thyroid cancer; ATC) 細胞においてEpCAMをノックダウンすると、細胞の増殖、移動、浸潤が抑制され、マトリゲルへの細胞接着が阻害された。(2)細胞骨格をアクチン免疫染色で評価すると、EpCAMのサイレンシングにより、ATC細胞の仮足形成が著明に阻害された。EpCAMが癌細胞骨格の変化を介して浸潤に関与している可能性が推測された。(3)マウス尾静脈からATC細胞を注入したマウス肺転移モデルでの解析で、EpCAMのサイレンシングは肺転移を有意に抑制した。(4)ATC細胞でEpCAMをノックダウンすると、悪性度の高い低分化な表現型から、比較的穏やかな分化型表現型への再分化が誘

導された。以上の結果から、EpCAMが甲  
状腺未分化癌の悪性度の高い表現型と  
脱分化に關与しており、極めて悪性度  
の高い本腫瘍の治療標的分子になる可  
能性が示唆され、現在、論文発表準備  
を進めている。

【解析2】

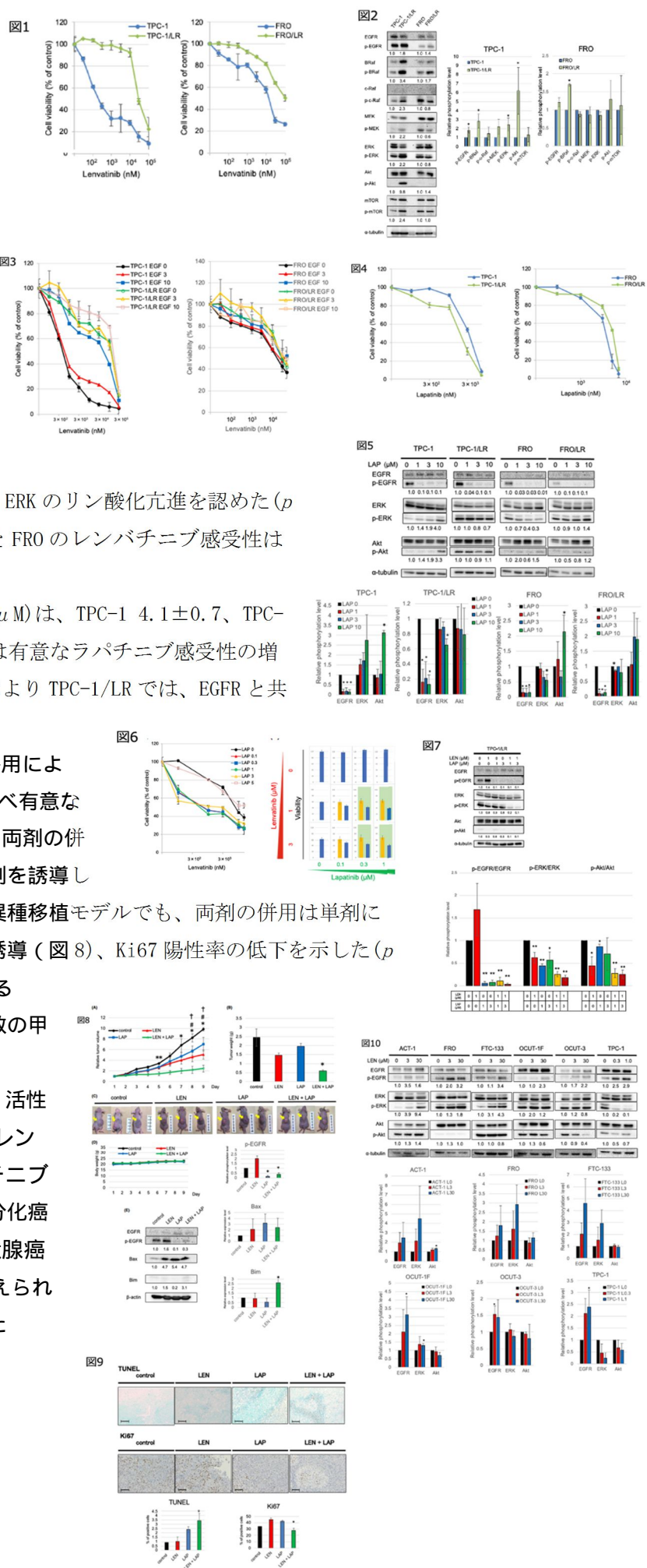
レンバチニブの各細胞株の50%阻害  
濃度(IC<sub>50</sub>, μM)は、TPC-1 0.2±0.1、  
TPC-1/LR 28±2.9、FRO 14±1.5、  
FRO/LR 74±4.3で、親株に比べ、TPC-  
1は140倍、FRO/LRは5.3倍の耐性を  
認めた(図1)

TPC-1/LRでは親株に比し有意なEGFR、ERKのリン酸化亢進を認めた( $p < 0.05$ ) (図2)。EGFの添加によりTPC-1とFROのレンバチニブ感受性は低下した(図3)

一方、EGFR阻害剤ラパチニブのIC<sub>50</sub>(μM)は、TPC-1 4.1±0.7、TPC-1/LR 1.6±0.1と、レンバチニブ耐性株は有意なラパチニブ感受性の増加を示し( $p < 0.05$ ) (図4)ラパチニブによりTPC-1/LRでは、EGFRと共にERKのリン酸化抑制を認めた(図5)

また、レンバチニブとラパチニブの併用により、TPC-1/LRではレンバチニブ単剤に比べ有意な感受性増加が認められ( $p < 0.05$ ) (図6) 両剤の併用は単剤に比しERKの有意なリン酸化抑制を誘導した( $p < 0.05$ ) (図7)。TPC-1/LRのマウス異種移植モデルでも、両剤の併用は単剤に比し有意な腫瘍縮小効果とアポトーシス誘導(図8)、Ki67陽性率の低下を示した( $p < 0.05$ )。さらに、レンバチニブ投与によるEGFRのリン酸化亢進は、TPC-1以外の複数の甲状腺癌細胞株でも認められた(図10)

以上の結果から、甲状腺癌細胞でEGFR活性化がレンバチニブ耐性に關与しており、レンバチニブとEGFR阻害剤の併用がレンバチニブ耐性克服に有用な可能性が示唆され、未分化癌を含むレンバチニブに抵抗性を示す甲状腺癌に対する新規治療戦略となる可能性が考えられた。ここまでの結果を論文として発表した(Ohno K, Shibata T, Ito K., Cancer Science. 113(9); 3193-3210, 2022)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohno Koichi, Shibata Tomohiro, Ito Ken ichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor activation confers resistance to lenvatinib in thyroid cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3193 ~ 3210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15465	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koichi Ohno, Tomohiro Shibata, Ken-ichi Ito
2. 発表標題 Epidermal growth factor receptor activation confers resistance to lenvatinib in thyroid cancer cells
3. 学会等名 2022 American Thyroid Association Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------