

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09748

研究課題名（和文）予後不良となるヒト甲状腺癌のモデルマウス作製と治療標的の探索

研究課題名（英文）Generation of a Mouse Model of Human Thyroid Cancer with Poor Prognosis and Exploration of Therapeutic Targets

研究代表者

山口 高志（Yamaguchi, Takashi）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：60626563

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）：本研究の目的は、予後不良となる甲状腺がんの発生と進展において、RAS遺伝子変異とポリオマ属ウイルスの感染の関与することを明らかにすることである。このため、ポリオマ属のSV40ウイルスに由来する tsA58 large T抗原を変異のあるKRAS遺伝子(KrasG12D)を、甲状腺特異的に発現するマウスを作成して解析した。甲状腺での発癌が病理組織学的に確認され、回収して培養した細胞はヌードマウスへの接種で腫瘍形成が確認された。これらのことより、予後不良となる甲状腺がんの発生にはKRAS遺伝子の変異とウイルス感染の関与が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義や社会的意義は、第一に遺伝子改変マウスモデルを用いることで、甲状腺におけるRasシグナル異常な活性化とSVLTの発現が共に引き起こされる状況が甲状腺がんを引き起こす可能性を明らかにしたこと、第二に同甲状腺マウスモデルからの安定的な甲状腺がん細胞株の樹立方法を確立したことである。当該甲状腺発がんマウスモデルからの甲状腺がん細胞株の培養化システムは、これまでに作成されたさまざまな甲状腺発がんマウスモデルに応用することが可能であることから、当該システムが甲状腺がんにおける新たな早期発見バイオマーカーおよび治療標的分子の探索研究に応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the involvement of RAS gene mutations and infection with poliomyelitis virus in the development and progression of thyroid cancer, which is associated with a poor prognosis. To this end, we generated and analyzed mice that specifically express thyroid-specific expression of the KRAS gene (KrasG12D) with a mutation in the tsA58 large T antigen derived from the SV40 virus of the genus Poliomyelitis. Carcinogenesis in the thyroid gland was confirmed histopathologically, and cells collected and cultured showed mass formation upon inoculation into nude mice. These findings indicate that KRAS mutations and viral infection are involved in the development of thyroid carcinoma with poor prognosis.

研究分野：実験病理学

キーワード：甲状腺がん

### 1. 研究開始当初の背景

日本において甲状腺がんは、**1975**年に**2000**人程度の発生であったが、その後は増加し続け、研究開始の前年**2019**年では**18,780**人の発生が確認されている。国立がん研究センター・がん情報サービス公開データによると、女性に多く発症して症例の7割に達すること、そして甲状腺がんの5年生存率は**94.7%**(**2009**年～**2011**年)でがん患者全体よりも良い値になっている。

遺伝子変異	形成されるがんの特徴	論文
<i>Braf</i> <sup>V600E</sup> 発現	乳頭癌が発生。	Knauf 2005, Chakravarty 2011, Charles 2011
<i>Nras</i> <sup>Q61K</sup> 発現	乳頭癌 + 濾胞癌	Vitagliano 2006
<i>Hras</i> <sup>G12V</sup> 発現	癌は発生せず。	Chen 2009, Rochefer 1996
<i>Kras</i> <sup>G12D</sup> 発現	濾胞組織の過形成が発生。	Charles 2011, Millar 2009, Santelli 1993
<i>Braf</i> <sup>V600E</sup> 発現 + <i>p53</i> 変異	低～未分化型癌が発生。	Untch 2018
<i>Hras</i> <sup>G12D</sup> 発現 + <i>P53</i> 変異	低～未分化型癌が発生。	McFadden 2014
SVLT発現	高齢期で中～低分化癌が発生。ただし、Hypothyroidism発生のためヒト甲状腺癌病態と異なる。	Ledent 1991, Zhu 2012
<i>Kras</i> <sup>G12D</sup> 発現 + SVLT発現	早期に濾胞型および低～未分化型癌が発生(ヒトでの病態に酷似)	本研究計画

図1)過去の甲状腺発がんマウスモデルのまとめ

甲状腺がんは、組織型から乳頭癌、濾胞癌そして分化度の低い甲状腺癌に分類されており、約**90%**が乳頭癌で、治療後の経過は良い。しかしながら、濾胞癌や分化度の低い甲状腺癌は予後不良で、**RAS** 遺伝子の変異あるいは **RAF** を含むその下流シグナルの異常が関係する可能性が指摘されていた(図1)。このため、マルチキナーゼ阻害剤のレンバチニブ(**VEGFR**、**FGFR** 阻害剤)やソラフェニブ(**VEGFR**、**PDGFR**、**RAF-MEK** シグナル阻害剤)などの分子標的治療薬が使用されているが、治療効果は限定的で、濾胞癌や分化度の低い甲状腺癌の予後を改善するまでに至っていない (**Kondo 2006 Nat. Rev. Cancer**)。特筆すべきは、予後不良の甲状腺がん組織において、**RAS** シグナルの異常に **p53** 等の腫瘍抑制遺伝子の機能異常が重なる病理メカニズムが指摘されるようになっていたことで、甲状腺癌の発生と進展の研究には、これら遺伝子異常により甲状腺に腫瘍が発生するかどうか、そして、マウスそのものに発生した甲状腺がん組織から生きた細胞を取り出して培養し、**in vitro** で詳細な分子生物学的解析を行う方法の確立が必要な状況であった。一方で申請代表者らは、臍臓において **Ras** シグナルの活性化を惹起するとともに、**SV40 tsA58 large T** 抗原(**SVLT**)を発現させて **p53** の機能を不活性化させたマウスを作製して解析しており、**SV40** ウイルス感染の指摘されてきた甲状腺がん と **Ras** カスケード異常の関係性を着想するようになった。ヒト甲状腺がん組織アレイ標本を用いた免疫染色で **SVLT** の発現を検討したところ、陽性となる症例が散見されたことから本研究計画を作成し実施した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、**RAS** 遺伝子変異と **SVLT** の共存が、予後不良となる甲状腺がんの出現に関与する可能性を明らかにすること、および、有効な治療標的分子の同定を可能にする技術基盤を確立することに設定した。具体的な到達目標は、マウス甲状腺に **SVLT** と共に **Ras** 遺伝子の一つである **Kras** の常時活性化型変異体 **oncogenic Kras (Kras<sup>G12D</sup>)**を発現する遺伝子改変マウスを作製すること、そして当該マウスから **in vitro** 実験に利用可能な細胞株を簡便に樹立して、**in vitro** で解析するための手法を確立することである。

### 3. 研究の方法

遺伝子改変マウスの作成は、Cre/loxP 遺伝子組換え依存的に oncogenic Kras である **Kras<sup>G12D</sup>** を

発現させることのできるマウスと、Cre/loxP 遺伝子組換え依存的に SVLT を強力に発現させることのできるマウス、そして Tamoxifen 投与後に甲状腺濾胞上皮細胞で Cre/loxP 遺伝子組換えを誘導することのできる甲状腺特異的に CreER を発現するマウスを交配し、これら 3 つの遺伝子を持つマウスを生産して解析した。マウスが、アダルト(8 週齢以降)に達したのちに、Tamoxifen を投与して、甲状腺において Cre/loxP 遺伝子組換えを惹起させて、甲状腺上皮における SVLT と Kras<sup>G12D</sup> が共発現を確認するとともに、甲状腺の発癌過程を病理組織学的に解析した。さらに、当該マウスから採取された甲状腺をコラーゲナーゼで分散処理後、培養化を施したのち、ヌードマウス皮下に移植することで、腫瘍形成能が当該細胞にあるかどうかを評価した。

#### 4. 研究成果

##### 【甲状腺特異的 Kras<sup>G12D</sup> & SVLT 発現遺伝子改変マウスの作製および甲状腺組織の病理組織学的解析】

三重遺伝子改変マウスの作製は、次の各単独遺伝子改変マウスを順次交配する形で実施された。具体的には、はじめに Cre/loxP 遺伝子組換え依存的に oncogenic Kras である Kras<sup>G12D</sup> を発現させることのできるマウスと、同じく Cre/loxP 遺伝子組換え依存的に SVLT を強力に発現させることのできるマウスを交配することで二重遺伝子改変マウスを作製した。次に甲状腺特異的 CreER 発現マウスをこれに交配することで三重遺伝子改変マウスを作製することができた。当該三重遺伝子改変マウスは正常に成長し、アダルトになった後の生存性にも問題は認められなかった。

次に、当該三重遺伝子改変マウスの甲状腺濾胞上皮細胞特異的に発現している CreER の Cre/loxP 遺伝子組換え能力を活性化させるため、Tamoxifen をマウスに投与した。当該マウスでは甲状腺濾胞上皮細胞特異的に Cre/loxP 遺伝子組換えが発生することで、SVLT と Kras<sup>G12D</sup> の甲状腺特異的発現が誘導されたものと推定されたので、当該マウスを、その後 6 ~ 8 週間通常飼育し、経過観察した。その間、当該マウスは行動の異常や喉の部分を含む外観の異常は確認されなかった。また同期間に当該マウスの死亡は確認されなかった。次に、当該マウスより回収された甲状腺を回収し、ホルマリン固定後、パラフィンブロック標本作製、病理組織学的に解析(HE 染色)したところ、異形度は低いながら、がん病変と判断される病的組織が形成されることが確認できた(図 2)。

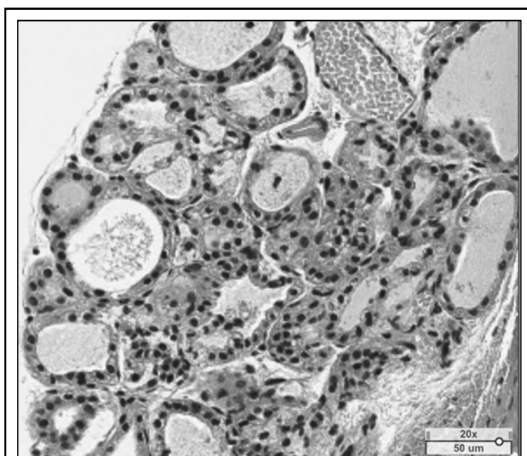


図 2) Kras<sup>G12D</sup> と SVLT が共発現するマウス甲状腺の病理組織像

##### 【甲状腺特異的 SVLT & Kras<sup>G12D</sup> 発現遺伝子改変マウスの甲状腺由来細胞の培養化】

次に、当該三重遺伝子改変マウスの甲状腺組織から in vitro 実験に利用可能な細胞株の樹立を試みた。具体的には、当該マウスの甲状腺を回収後、コラーゲナーゼによって構成細胞を分散した後、培地[high glucose-type DMEM(富士フィルム和光潤薬工業製)、10%v/v FCS, 100 Unit/mL ペニシリン、100 μg/mL ストレプトマイシン(Thermo Fisher Scientific 製)、1× MITO+ serum extender (Corning 製)]および コラーゲンコート済み培養皿(AGC テクノグラス製)を用いて培養を施した。約 1 ヶ月程度、継代培養することで、非 SVLT 発現細胞を淘汰し、不死化された三

重遺伝子改変マウス甲状腺組織由来培養化細胞を獲得した。

#### 【甲状腺由来細胞の腫瘍形成能力の確認】

当該培養化細胞が、確かにがんの性質を持っているかどうかを確かめるため、ヌードマウス皮下に移植し、3週間継続飼育したところ、移植部位に1cm程度の腫瘍塊が形成された(図3)。当該腫瘍塊を回収し、病理組織学的解析を施したところ、分化度の低いがん組織像を呈していることが明らかとなった(図4)。以上のことから、Kras<sup>G12D</sup>とSVLTの発現が一定期間継続された当該マウス甲状腺組織に現れた病変部位には確かにがん細胞が含まれ、その組織からは甲状腺がん細胞の培養化が可能であり、その培養化細胞は、がんの定義の一つである腫瘍形成能を有していた。

#### 【まとめと考察】

本研究において、甲状腺特異的 Oncogenic Kras<sup>G12D</sup>およびSVLTを甲状腺特異的に発現する甲状腺発がんマウスモデルを確立した。また当該マウスに由来する不死化甲状腺がん培養化細胞の獲得法も確立した。当該マウスモデルおよびそれに由来する細胞の培養化システムは、今後の甲状腺がんの早期発見につながる新たなバイオマーカーおよび治療のターゲットなる分子の探索研究に用いることが期待される。

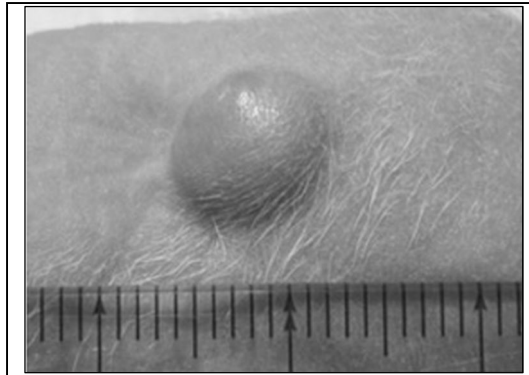


図 3) Kras<sup>G12D</sup> と SVLT が共発現する甲状腺組織から培養化した細胞株のヌードマウス皮下移植実験(形成された腫瘍の外観)

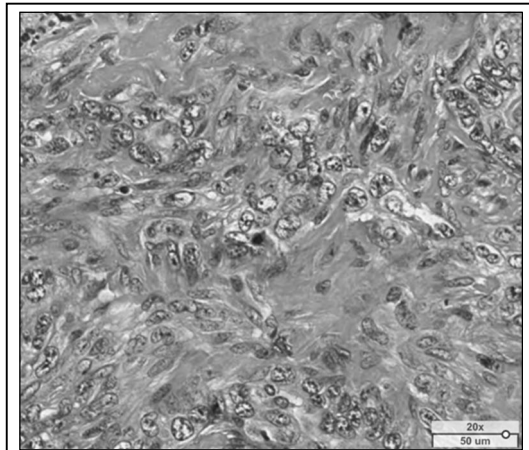


図 4) 培養化された甲状腺がん細胞をヌードマウス皮下移植することで形成された腫瘍の病理組織像

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
研究分担者	東 和彦  (Azuma Kazuhiko)  (80422260)	千葉大学・大学院医学研究院・技術専門職員    (12501)	

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