

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591663

研究課題名（和文） 癌特異的変異タンパクを標的とした甲状腺乳頭癌及び未分化癌に対する治療法の開発

研究課題名（英文） Development of treatment for papillary and anaplastic thyroid carcinoma by targeting cancer-specific aberrant protein

研究代表者

菊森 豊根 (Toyone Kikumori)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90402635

研究成果の概要（和文）：

甲状腺癌の悪性化に関与する BRAF の変異を有するヒト未分化癌細胞株 NPA および乳頭癌細胞株 K1 および変異を有さない TPC1 において、BRAF の発現を抑制することにより、悪性化の指標である遺伝子群の発現が抑制された。またヒト甲状腺乳頭癌臨床検体を用い、BRAF が約 9 割で変異を有することを認めた。他のヒト癌細胞株において、BRAF を抑制することが予想されている HSP90 阻害剤により、細胞増殖が抑制された。

研究成果の概要（英文）：Suppression of BRAF expression in human anaplastic thyroid carcinoma cell line NPA, human papillary thyroid carcinoma cell line K1 those have BRAF mutation which is involved in malignant transformation and papillary thyroid carcinoma cell line TPC1 without BRAF mutation reduced expression of genes related to malignant transformation. In clinical thyroid carcinoma specimen, approximately 90% of cases have mutation in BRAF activating mutation. HSP90 inhibitor which is anticipated to reduce BRAF expression inhibits cell proliferation in other cancer cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：BRAF、甲状腺癌、温熱治療、ヒートショック蛋白

1. 研究開始当初の背景

甲状腺乳頭癌の多くは悪性度が低く、遠隔転移の頻度もきわめて低く局所療法のみで良好な予後が期待できる。しかし、一定の割合で再発を繰り返し、治療抵抗性となり最悪の転機をたどる症例がある。また、そのような症例で未分化癌に転化することがあり、きわめて不良な予後となる。現

在のところ甲状腺乳頭癌に対して有効な抗癌剤は臨床応用されておらず、治療の選択肢がきわめて限られるのが現状である。種々の治療法が検討されてきたが、臨床応用に至った例は皆無である。近年、細胞増殖、分化に関与するマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) 経路の上流に位置する BRAF の変異 (V600E：第 600

残基のパリン→グルタミン酸)が甲状腺乳頭癌に高頻度(報告によって異なるが50%程度の症例の発生しているものと考えられる。)に起こっており、悪性度が高い腫瘍においてより頻度が高いことが報告されている。(図1参照)

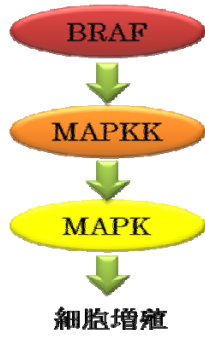


図1

ヒートショックプロテイン(HSP)は細胞内タンパクの数パーセントを占めるほどの普遍的なタンパクである。そのうち代表的なものがHSP90であり、主な働きとしてタンパクの成熟に関与していると言われている。その対象となるタンパク(クライアントタンパク)としてはHER2、ER(エストロゲンレセプター)など細胞増殖に関与するタンパクが多く含まれている。

図2に示すようにタンパクはDNA-RNAから合成されるが、翻訳された直後はまだ3次構造をとっておらず、本来の機能を発揮できない。



図2

HSP90はシャペロンタンパクとして、未熟なタンパクが正常に折りたたまれ、タンパクの成熟を促進する。一方、変異を持つタンパクは通常正常な3次構造を持つことができないが、HSP90などの働きにより3次構造を取ることができるとされている(図3)。



図3

もしHSP90の働きが阻害されると、変異タンパクは正常な3次構造をとることができず(図4)、ユビキチン化され(図5)、プロテアソームによって分解される(図6)。

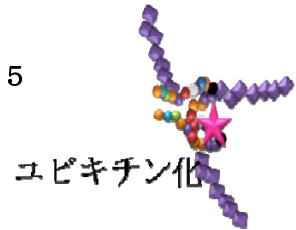
現在までに変異アンドロゲン受容体(AR)の変異によって引き起こされる神経難病である球脊髄性筋萎縮症が動物実験モデルにおいてHSP90阻害剤によって症状が緩和されたことが報告されている。

また、我々は乳癌細胞株においてHSP90の阻害剤である17-AAGの作用を検討したが、HSPのクライアントタンパクであるHER2が過剰発現している細胞株において17-AAGの添加によりHER2の分解が促進され、より細胞増殖抑制効果が高いことを見いだした。またより低温度の加温により細胞増殖が抑制されることを報告した。



misfoldされたタンパク

図5



ユビキチン化



プロテアソームによる分解

図6

2. 研究の目的

今回の研究では、より悪性度が高いと言われているBRAFのV600E変異を持つ甲状腺乳頭癌、未分化癌細胞株をモデルにしてHSP90阻害剤を用いることにより変異特異的にBRAFの機能を抑制し、細胞増殖を抑制できるかどうかを検討する。このことが可能であれば、変異特異的つまりより悪性度が高い腫瘍に対して特異的に効果を持つ治療法の開発につながると考える。

一方、中部大学で開発した陽性荷電マグネタイト内包リポソーム(MCL)(図7)は交番磁場を照射することにより発熱する素材であり、その表面電荷の特性により、局所投与時に組織残留効果が非常に高まり、高い腫瘍縮小効果を報告してきた。

我々は表面荷電の代わりに腫瘍特異的な抗体を付加したマグネトリポソームを利用して乳癌動物実験モデルにおいて腫瘍特異的温熱効果および腫瘍縮小効果を報告した。具体的には1) BRAF変異をもつ乳頭癌細胞株および未分化癌細胞株において、17-AAGの細胞増殖に対する

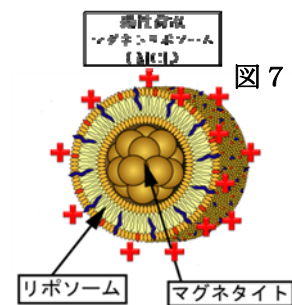


図7

効果を **BRAF** 変異のない細胞株と比較し、**17-AAG** の **HSP90** 阻害作用および細胞増殖抑制効果が **BRAF** 変異特異的に発揮されるかどうかを明らかにしたい。2) 動物実験モデルにおいて皮下腫瘍に対して **MCL** を局所投与し交番磁場を照射することにより腫瘍特異的に温熱を加えることができるが、**BRAF** 変異をもつ腫瘍の方が **17-AAG** 投与により低温、短時間で効果が得られるかを明らかにしたい。3) **HSP90** 阻害剤による **BRAF** の信号伝達経路の下流にある各種分子の発現やリン酸化を検討し、細胞増殖抑制効果のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

【培養細胞実験】ヒト甲状腺癌培養細胞における **HSP** 阻害剤 **17-AAG** の **BRAF** 変異の有無による作用の差異の検討。

- (1) ヒト甲状腺癌細胞の培養：乳頭癌 **BRAF** 変異株 **KTC-1** および変異なし株 **PTC1** を培養する。また、未分化癌 **BRAF** 変異株 **BHT101** および変異なし株 **KAT18** を培養する。
- (2) それぞれの培養細胞に **HSP** 阻害剤である **17-AAG** を加え、細胞増殖速度を検討する。
- (3) **17-AAG** 添加時の細胞内における **HSP**、**BRAF**、信号伝達系下流にある **MEK** などの増殖に関連するタンパク、アポトーシス関連タンパクの発現をウェスタン法などにより検討する。
- (4) **HSP** 阻害剤を加えた細胞と加えない細胞において、リアルタイム **RT-PCR** を用いて遺伝子発現の比較を行い、**HSP** 阻害剤によるアポトーシス関連遺伝子群の発現変動を検討する。
- (5) **BRAF** 変異細胞株における **HSP** 阻害剤の細胞増殖抑制効果を増強させる最適の条件（濃度、時間、間隔など）を検討する。
- (6) **HSP** 阻害剤を加えた細胞と加えない細胞において、**DNA** マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルの比較を行い、**17-AAG** 添加により誘導される遺伝子群、抑制される遺伝子群を抽出し、**HSP** 阻害剤の細胞増殖抑制効果におけるメカニズムを検討する
- (7) ヒト甲状腺乳頭癌臨床検体での検討で、変異 **BRAF** mRNA の発現と悪性度の関連する遺伝子の mRNA の発現に有意な正の相関を認めた。また、分化度を

反映する遺伝子の mRNA の発現との間には負の相関傾向を認めた。

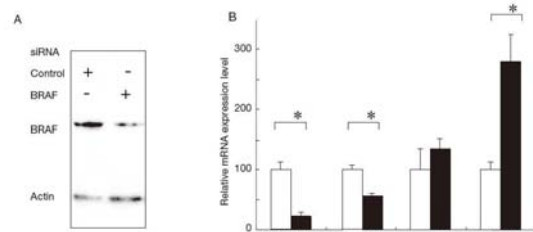
【動物実験】ヒト甲状腺癌細胞移植ヌードマウスにおける **MCL** 局所投与による温熱治療効果の検討。

- (1) ト甲状腺癌培養細胞のヌードマウスへの移植、腫瘍形成：上記の細胞株をヌードマウスの皮下に移植し腫瘍を形成させる。
- (2) 担癌マウスに対して **MCL** を局所投与し交番磁場を照射する。温熱治療効果を検討する。
- (3) 担癌動物における **HSP** 阻害剤の **MCL** を用いた温熱治療効果増強の検討。甲状腺癌担癌動物における **HSP** 阻害剤の温熱治療の効果を増強させる最適の条件（温度、時間、間隔など）を検討する。また **BRAF** 変異の有無による治療効果の差異を検討する。
- (4) **HSP** 阻害剤を用いた温熱効果増強作用における免疫系の関与の検討 **17-AAG** は **HSP90** 特異的な阻害剤であり、**HSP70** は阻害しないとされている。**HSP70** は腫瘍免疫に重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、**17-AAG** を添加し、温熱治療を施行された腫瘍および実験動物における、腫瘍免疫賦活化能を検討する。

4. 研究成果

【培養細胞実験】

- (1) ヒト癌培養細胞株である **NPA** 細胞において **PCR-RFLP** 法により **BRAF** の変異を確認した
- (2) **NPA** 細胞において **siRNA** を用いて **BRAF** の mRNA 発現を抑制することにより、悪性化の指標である遺伝子群の発現が抑制された。（下図：図 B で黒のバーで示される悪性化の指標となる遺伝子の発現が有意に抑制された。雑誌論文 3 参照）



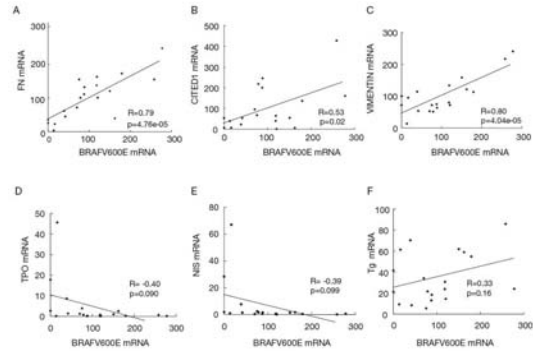
- (3) **NPA** 細胞以外の **BRAF** 変異を持つヒト甲状腺乳頭癌細胞株として **K1** 細胞、変

異を有さないヒト甲状腺乳頭癌細胞株としてTPC-1においてBRAFのmRNAの発現をreal-time RT-PCRで検討した。

- (4) ヒートショック蛋白抑制剤である17-AAGの添加により変異BRAFが抑制され、細胞増殖が抑制されることが予想されている。乳がん細胞株で17-AAGの添加によりアポトーシスが誘導され、細胞増殖が抑制された。
- (5) 17-AAG添加時のアポトーシス関連遺伝子発現の検討。17-AAG (HSP阻害剤)を加えた細胞と加えない細胞において、ウェスタンブロット法を用いてアポトーシス関連タンパク発現(p21, PARP-1)の比較を行った。17-AAGの添加により有意にp21の発現が増加し、PARP-1の分解産物の発現も上昇した。これらは17-AAGの添加により細胞周期の進行が停止し、アポトーシスが誘導されたことを示唆した。また抗アポトーシス作用のあるAktタンパクのリン酸化が17-AAGの添加により抑制され、アポトーシスの促進が示唆された。
- (6) 最適なHSP阻害剤の投与量、投与間隔、温熱療法の条件の検討。17-AAGの濃度を変化させて加えた細胞において細胞増殖に対する効果を検討した。2.5nMという非常に低濃度においても細胞増殖抑制効果を確認できた。また濃度依存性の増殖抑制効果を認めた。投与間隔については温熱を加える24時間までに薬剤を添加することにより温熱効果の増強を確認できた。温熱条件については17-AAGを加えることにより低温(摂氏43度)においても、高温(摂氏47度)と同等の細胞増殖抑制効果を得ることが確認できた。

【臨床検体をもちいた実験】

- (1) ヒト甲状腺乳頭癌臨床検体を用いてダイレクトシーケンス法によりBRAFの変異を検討し、約9割で変異を認めた。
- (2) ヒト甲状腺乳頭癌臨床検体での検討で、変異BRAF mRNAの発現と悪性度の関連する遺伝子のmRNAの発現に有意な正の相関を認めた。また、分化度を反映する遺伝子のmRNAの発現との間には負の相関傾向を認めた。(右図参照：横軸に変異BRAFの発現量、縦軸に悪性度・分化度に関与する遺伝子が示されている。)



【動物実験】

- (1) 担癌動物におけるHSP阻害剤のMCLを用いた温熱治療効果増強の検討。担癌動物モデルを作成し、MCLを局所投与し、交番磁場を照射し実際に温度が上昇することを確認した。また腫瘍縮小効果を確認した。

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3件)

1. Sassa M, Hayashi Y, Watanabe R, Kikumori T, Imai T, Kurebayashi J, Kiuchi T, Murata Y. Aberrant promoter methylation in overexpression of CITED1 in papillary thyroid cancer. *Thyroid*, 21 巻、511-517、2011 年、査読有
2. 菊森 豊根、今井 常夫【甲状腺外科の進歩】甲状腺未分化癌の治療の実際、外科治療、105 巻、353-358、2011 年、査読無
3. Watanabe R, Hayashi Y, Sassa M, Kikumori T, Imai T, Kiuchi T, Murata Y. Possible involvement of BRAFV600E in altered gene expression in papillary thyroid cancer. *Endocr J.*、56 巻、407-14、2009 年、査読有

【学会発表】(計3件)

1. 菊森 豊根、陽性荷電マグネトリポソームと交番磁場による皮下再発甲状腺癌を対象とした温熱免疫療法、第111回日本外科学会定期学術総会、平成23年5月26日、東京
2. 菊森 豊根、陽性荷電マグネトリポソームと交番磁場による皮下再発腫瘍を対象とした温熱免疫療法、第18回日本乳癌学会学術総会、平成22年6月25日、札幌
3. 菊森 豊根、ヒト乳癌細胞株におけるHeat shock protein 90阻害剤による温熱効果増強 アポトーシスの関連につ

いて、第 17 回日本乳癌学会総会，平成
21 年 7 月 4 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊森 豊根 (Toyone Kikumori)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90402635

(2) 研究分担者

林 良敬 (Yoshitaka Hayashi)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号：80420363

小林 猛 (Kobayashi Takeshi)
中部大学・生物機能開発研究所・客員教授
研究者番号：10043324

中尾 昭公 (Nakao Akimasa)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70167452 (H21-H22)

(3) 連携研究者

なし