

機関番号:17301

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2009 ~ 2010

課題番号:21790895

研究課題名(和文)レトロウイルスマッピング法を用いた BRAF 発癌に関与する新規癌関連遺伝子の同定

研究課題名(英文)High-throughput retroviral tagging to identify genes and signaling pathways cooperating with *BRAF* in thyroid carcinogenesis

研究代表者

ログノビッチ タチアナ (Rogounovitch Tatiana)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号:30423643

研究成果の概要(和文):

通常、上皮細胞を悪性形質転換させるためには、単独の癌遺伝子活性化では不十分とされている。本研究は、甲状腺細胞の癌化に、変異 *BRAF* に加えて必要な遺伝子異常を同定するべく施行された。ドキシサイクリンで *BRAFV600E* を発現させる事の出来る正常甲状腺細胞 PCCL3 に、レトロウイルスによるランダムな遺伝子導入を行い、TSH 非依存性に増殖するクローンを単離した。その後、PCR splinkerette 法、マイクロアレイを用いた発現解析を行い、ターゲットとなった遺伝子から、いくつかの候補遺伝子 (*Trpm1*, *Nek6* など) を同定した。

研究成果の概要(英文):

Activation of oncogene alone is usually insufficient to transform epithelial cells. For PTCs driven by mutant *BRAF* we attempted to reveal the additional genetic abnormalities that are required to confer malignant phenotype on cancer cells. For this purpose, as a model, we performed retrovirus insertional mutagenesis in doxycycline-inducible *BRAFV600E*-expressing clonal lines derived from rat thyroid PCCL3 cells, and picked the clones that do not require TSH for growth. By PCR-based splinkerette procedure and microarray analysis we have successfully identified several possible candidate genes (*Trpm1*, *Nek6*, etc).

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究代表者の専門分野:甲状腺腫瘍

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・内分泌学

キーワード:甲状腺乳頭癌, 変異 BRAF, レトロウイルスマッピング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) *BRAF* 変異 (*BRAFV600E*) は、甲状腺乳頭癌 (PTC) において最も頻度の高い遺伝子変異 (約 45%) であり、特に悪性度との関連が示唆されている (Xing M.,

*Endocrine-Related Cancer* 12: 245-262)。

日本人症例においても、この *BRAF* 変異は 29-53% の PTC にみられ、やはり最も頻度の高い遺伝子変異である (Namba H. et al., J

*Clin Endocrinol Metab* 88: 4393-4397, Fukushima T. et al., *Oncogene* 22: 6455-6457)。

(2) 同一腫瘍組織内では、*BRAF*変異と他の癌遺伝子の重複を認めないため、この遺伝子変異の単独での発癌作用が示唆される。実際、変異 *BRAF* が甲状腺細胞に発現するトランスジェニックマウスでは、高頻度の PTC の発生が観察され、部分的には低分化癌への進展も見られた (Knauf J.A. et al., *Cancer Res* 65: 4238-4245)。このモデルマウスでは、サイログロブリンプロモーターという甲状腺濾胞細胞特異的プロモーターによって、すべての甲状腺細胞に変異 *BRAF* が発現する。高頻度の PTC の発生と、すべての甲状腺細胞が影響を受ける事より、血中の TSH 濃度が極めて高い値をとる (通常の 2~80 倍)。この TSH の持続的な高値は、甲状腺細胞の発癌に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

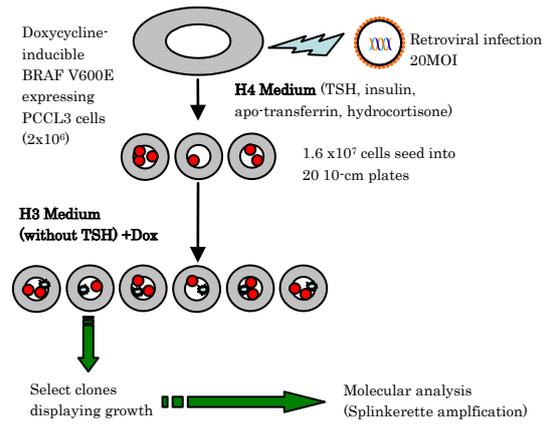
(3) 発癌の極めて初期における、この変異 *BRAF* が持つ生物学的影響を解析するために、ドキシサイクリンによって *BRAFV600E* の発現を自由に調節できるラット甲状腺細胞 PCCL3 を樹立した (Mitsutake N. et al., *Cancer Res* 65: 2465-2473)。PCCL3 は、よく分化した甲状腺細胞であり、その分裂増殖や甲状腺特異的な遺伝子発現に TSH を必要とする。このモデルにおいて、*BRAFV600E* の発現を誘導しても、細胞増殖における TSH 依存性に変化は見られなかった。おそらく、TSH 非依存性を獲得するためには、追加の遺伝子変異か、もしくは何らかのエピジェネティックな変化が必要であると考えられる。癌化は多段階のプロセスであり、いくつかのジェネティック、エピジェネティックな変化が必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

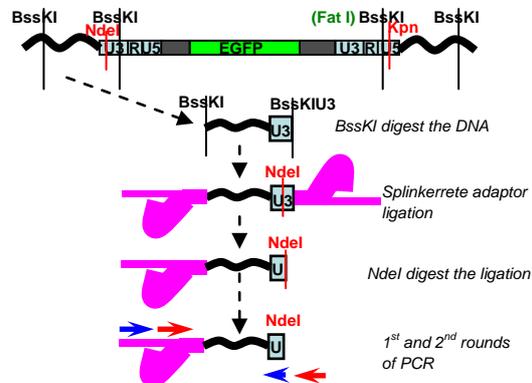
本研究の目的は、PTC 発生の際に、甲状腺細胞を癌化 (悪性形質転換) させるために、*BRAF* 変異に加えて、さらに必要な新規遺伝子変異を同定する事である。

## 3. 研究の方法

(1) 上記目的のために、ドキシサイクリン添加によって、*BRAFV600E* の発現を自由に調節できるラット正常甲状腺細胞 PCCL3 を用いた。この細胞に、シュードタイプの殻タンパク VSV-G を持つレトロウイルスを 20 MOI で感染させ、ドキシサイクリン存在下で TSH 非依存性に増殖するクローンを単離した。



(2) レトロウイルスによって遺伝子挿入が起こった部位の周辺にある遺伝子が、形質を変化させた責任遺伝子である可能性が考えられ、その部位を PCR splinkerette 法を用いて同定した。

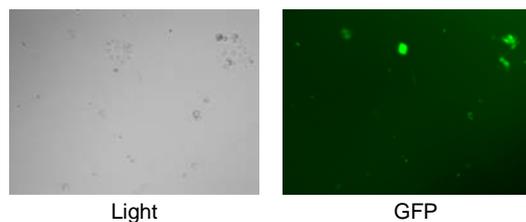


(3) すべての単離したクローンをを用い、TSH の有無、ドキシサイクリンの有無を組み合わせ、細胞増殖の変化を再検討した。

(4) TSH 非存在下、ドキシサイクリン存在下で最も速く増殖するクローンをを用い、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。

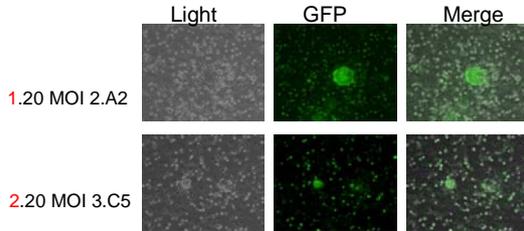
## 4. 研究成果

(1) ドキシサイクリンで *BRAFV600E* の発現を誘導できる PCCL3 細胞 (PCCL3-*BRAFV600E*) に、293 GPG/pDON-AI-EGFP より作成したシュードタイプのレトロウイルスを 20 MOI で感染させた。

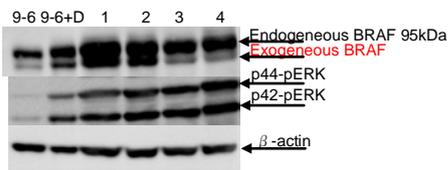


その後、細胞は TSH を添加していない H3 培地、ドキシサイクリン存在下で 2 ヶ月間培養を継続した。

(2) 600 の独立したクローンを単離し、さらに H3+ドキシサイクリン培地で培養、増殖させた。その中から、38 の最も増殖速度の速いクローンを選択し、蛍光顕微鏡下で GFP の発現を確認した。

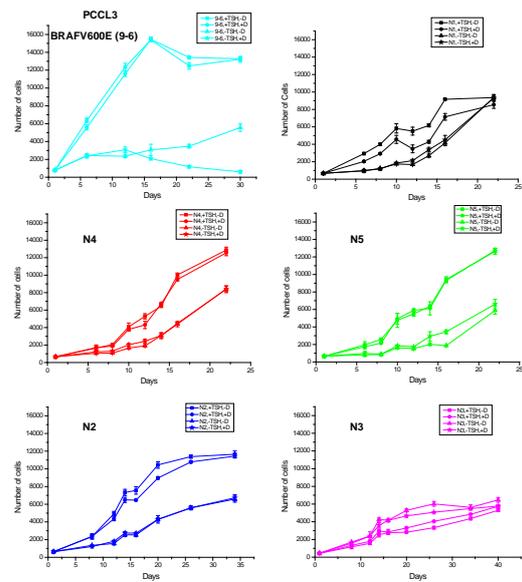


(3) これら 38 のクローンから、DNA、RNA、タンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法にて BRAF の発現とその下流の MAPK の活性化を確認した。



(4) PCR splinkerette 法を用い、38 すべてのクローンにレトロウイルスによる遺伝子挿入部位を検出する事が出来た。この遺伝子挿入部位に、責任遺伝子が位置している事が予想され、それぞれのクローンにつき、400 回のシーケンス解析を行い、46~50 箇所の挿入部位を同定できた。

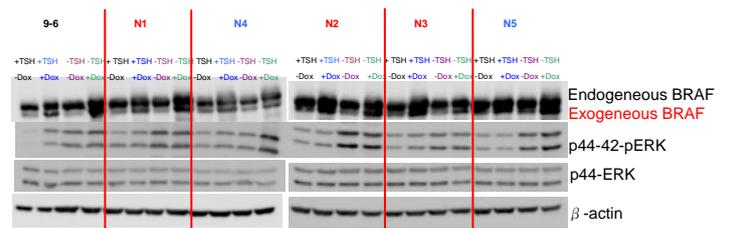
(5) 38 のクローンから、さらに増殖速度の速い 5 クローンを選別し、細胞増殖の動態を TSH の有無、ドキシサイクリンの有無別に詳しく検討した。



5 つのクローンの内、4 つは同じタイプの増殖曲線を示した。これらの細胞は、BRAFFV600E の発現にかかわらず、TSH 非存在下と比較して、TSH 存在下の方がより速く増殖した。しかしながら、クローン N3 だけは、TSH 存在下の方が TSH 非存在下と比べ、よりゆっくりと増殖した。

ただし、上記の 5 つのクローンは全て、TSH 非存在下で BRAFFV600E の発現の有無に依存せず、活発な細胞増殖を見せた。親株である PCCL3-BRAFFV600E は、使用した条件では 100% コンフルエントになるのに 30 日以上を要し、BRAFFV600E の発現下ではまったく増殖できなかったが、これらのクローンは 16-25 日で 100% コンフルエントに達した。

次に、すべてのクローンにおいて、4 つの異なるタイプの培地下 (TSH 有無とドキシサイクリン有無) で培養した後にタンパク質を抽出し、BRAFF-MAPK 経路の活性化を確認した。



すべてのクローンで、ドキシサイクリン添加後の BRAFFV600E の発現、MAPK の活性化を確認できた。ただし、MAPK は、TSH 非存在下の方がより強く活性化される様であった。

親株である PCCL3-BRAFFV600E、クローン N1、クローン N3 を 4 種類の培地で培養した後、RNA を抽出し、Agilent のマイクロアレイ発現解析に供した。

(6) PCR splinkerette 後のシークエンス解析によって得られた遺伝子の発現パターンを、マイクロアレイのデータを用いて解析した。クローン N1 における結果から、TSH-BRAF 経路に関連する可能性のある 6 つの以下の候補遺伝子を同定した。

- 1) Spred2, sprouty-related, EVH1 domain containing 2
- 2) Luc7l3, LUC7-like3 (*S. cerevisiae*)
- 3) Adcy3, adenylate cyclase 3
- 4) Cdc6, cell division cycle homolog (*S. cerevisiae*)
- 5) Efna5, ephrin A5
- 6) Trim35, tripartite motif containing 35

クローン N3 からは、TSH 依存性に関わる可能性のある 5 つの以下の候補遺伝子を同定した。

- 1) Trpm1, transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1 (Melastatin)
- 2) Col8a1, collagen, type VIII, alpha 1
- 3) LOC312831, similar to SRY (sex determining region Y)-box 5 isoform a
- 4) Ush1c, Usher syndrome 1C homolog (human)
- 5) Nek6, NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6

#### 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 6 件)

1. Rumyantsev PO, Saenko VA, Ilyin AA, Stepanenko VF, Rumyantseva UV, Abrosimov AY, Lushnikov EF, Rogounovitch TI, Shibata Y, Mitsutake N, Tsyb AF, Yamashita S. Radiation exposure does not significantly contribute to the risk of recurrence of Chernobyl thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* Vol.96, No. 2, 2011 pp. 85-93. 査読有
2. Tatiana Rogounovitch, Vladimir Saenko, Noboru Takamura, Valentina Drozd, Larisa Danilova, Norisato Mitsutake, Natallia Akulevich, Yuri Demidchik, Shunichi Yamashita. Molecular epidemiology study of radiation-induced thyroid cancer as a main research project of Representative office of Nagasaki

University in Belarus. *長崎医学会雑誌* 85 巻, 2010, pp. 179-181 査読無

3. Takahashi M, Saenko VA, Rogounovitch TI, Kawaguchi T, Drozd VM, Takigawa-Imamura H, Akulevich NM, Ratanajaraya C, Mitsutake N, Takamura N, Danilova LI, Lushchik ML, Demidchik YE, Heath S, Yamada R, Lathrop M, Matsuda F, Yamashita S. The FOXE1 locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum Mol Genet* Vol.19, No.12, 2010, pp. 2516-2523 査読有
4. Dzodic R, Stanojevic B, Saenko V, Nakashima M, Markovic I, Pupic G, Buta M, Inic M, Rogounovitch T, Yamashita S. Intraductal papilloma of ectopic breast tissue in axillary lymph node of a patient with a previous intraductal papilloma of ipsilateral breast: a case report and review of the literature. *Diagn Pathol* Vol.12, No.5, 2010, pp. 17 査読有
5. Matsuse M, Mitsutake N, Nishihara E, Rogounovitch T, Saenko V, Rumyantsev P, Lushnikov E, Suzuki K, Miyauchi A, Yamashita S. Lack of GNAQ hotspot mutation in papillary thyroid carcinomas. *Thyroid* Vol.18, No.8, 2009, pp. 921-922 査読有
6. Akulevitch N, Saenko V, Rogounovitch T, Drozd V, Lushnikov E, Ivanov V, Mitsutake N, Kominami R, Yamashita S. Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* Vol.16, No. 2, 2009, pp. 491-503 査読有

[学会発表] (計 23 件)

1. スタノエビッチ ボバン: Synergistic effect of 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin with Dehydroxymethylepoxyquinomicin on thyroid. 第53回日本甲状腺学会, 2010年11月11日-13日, 長崎

2. ワルエビッチ ビクトル: Short-term predictors of euthyroidism after radioiodine therapy for functional autonomy of the thyroid. 第53回日本甲状腺学会, 2010年11月11日-13日, 長崎
3. サエンコ ウラジミール: Molecular signatures of radiation-related thyroid cancer. 第53回日本甲状腺学会, 2010年11月11日-13日, 長崎
4. ログノビッチ タチアナ: Molecular and clinical characteristics of sporadic childhood thyroid cancers. 第53回日本甲状腺学会, 2010年11月11日-13日, 長崎
5. Maxim Lushchik: Adipocytokynes and insulin resistance parameters in individuals with and without differentiated thyroid cancer and levothyroxine suppressive therapy. 14<sup>th</sup> International Thyroid Congress, 2010年9月11日-16日, Paris, France
6. Natallia Akulevich: The impact of a unique nonsense mutation in the THRB1 gene, E457X, on resistance to thyroid hormone complexities. 14<sup>th</sup> International Thyroid Congress, 2010年9月11日-16日, Paris, France
7. Tatiana Rogounovitch: Molecular and clinico-pathological analysis of sporadic pediatric thyroid cancers in Belarus. 14<sup>th</sup> International Thyroid Congress, 2010年9月11日-16日, Paris, France
8. Tatiana Rogounovitch: Molecular epidemiology study of radiation-induced thyroid cancer as a main research project of Representative office of Nagasaki University in Belarus. 第51回原子爆弾後障害研究会, 2010年6月6日, 長崎
9. Tatiana Rogounovitch: Simultaneous determination of tumor clonality and mutant BRAF oncogene detects the molecular diversity of papillary thyroid carcinoma. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE2010), 2010年3月26日-30日, Kyoto, Japan
10. Vladimir Saenko: DNA damage response genes as a genetic factors modifying risk of radiation-related thyroid cancer. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE2010), 2010年3月26日-30日, Kyoto, Japan
11. Natallia Akulevich: A unique nonsense mutation in THRB1 gene, E457X, in a patient with resistance to thyroid hormone. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE2010), 2010年3月26日-30日, Kyoto, Japan
12. Boban Stanojevic: Mutational and clinicopathological analysis of papillary thyroid carcinoma in Serbian patients. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE2010), 2010年3月26日-30日, Kyoto, Japan
13. Larisa Danilova: Thyroid nodular pathology in patients with and without acromegaly. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE2010), 2010年3月26日-30日, Kyoto, Japan
14. Tatiana Rogounovitch: Molecular genetics features and thyroid cancer. International Scientific and Practical Conference "Early Diagnostic, Treatment and Rehabilitation of patients with thyroid cancer" 2009年12月04日-05日, Minsk, Republic of Belarus
15. Tatiana Rogounovitch: Assessment of molecular diversity of papillary thyroid carcinoma by simultaneous determination of tumor clonality and somatic oncogenic mutation. 4<sup>th</sup> GCOE International Symposium on Chernobyl Health Effect 2009, 2009年11月09日-10日, Minsk, Republic of Belarus
16. Vladimir Saenko: Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. 4<sup>th</sup> GCOE International Symposium on Chernobyl Health Effect 2009, 2009年11月09日-10日, Minsk, Republic of Belarus
17. Vladimir Saenko: Molecular diversity of papillary thyroid carcinoma assessed by simultaneous determination of tumor clonality and somatic oncogenic mutation. 9<sup>th</sup> Asia

and Oceania Thyroid Association Congress, 2009年11月01日-04日, Nagoya, Japan

18. Natallia Akulevich: A novel truncating mutation in the THRB1 gene, E457X, as a cause of resistance to thyroid hormone. 9<sup>th</sup> Asia and Oceania Thyroid Association Congress, 2009年11月01日-04日, Nagoya, Japan
19. Boban Stanojevic: Mutational and clinico-pathological analysis of papillary thyroid carcinoma in Serbian patients. 9<sup>th</sup> Asia and Oceania Thyroid Association Congress, 2009年11月01日-04日, Nagoya, Japan
20. ログノビッチ タチアナ: A mechanism of molecular diversity of monoclonal papillary thyroid carcinomas. 第52回日本甲状腺学会, 2009年11月03日-05日, 名古屋
21. 松瀬 美智子: 甲状腺乳頭癌におけるGNAQ遺伝子変異. 第52回日本甲状腺学会, 2009年11月03日-05日, 名古屋
22. Vladimir Saenko: Efficient preoperative evaluation of thyroid nodules by molecular analysis of FNAB materials. 第82回日本内分泌学会学術総会, 2009年4月23日-25日, 前橋
23. Pavel Romyantsev: Clinical course of papillary thyroid carcinoma in children and adolescent age group. 第82回日本内分泌学会学術総会, 2009年4月23日-25日, 前橋

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/adi-pphy/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

ログノビッチ タチアナ (Rogounovitch Tatiana)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 30423643