

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09632

研究課題名（和文）甲状腺高分化癌の未分化形質獲得機構の解明及び新規バイオマーカーの検討

研究課題名（英文）Elucidation of the acquisition mechanism of undifferentiated traits in well-differentiated thyroid cancer and search for new biomarkers

研究代表者

稲瀬 安希（Inase, AKi）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：90596181

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）：本研究では、甲状腺高分化癌が未分化形質を獲得する機序を解明することを目的とした。まず、高分化癌から未分化転化した患者検体を用いた高分化部位と未分化部位の遺伝子発現比較から、未分化転化には上皮間葉転換(EMT)が関与していることがわかり、未分化形質獲得の関連候補因子として、FOXD1に着目した。甲状腺癌細胞株を用いた実験から、FOXD1のEMT関与と、EMT転写因子SNAI1/2との相関関係を明らかにした。また、FOXD1の発現調節にはプロモーター領域の脱メチル化が関与している可能性を見出した。さらに、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術によるFOXD1ノックアウト細胞株を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、甲状腺高分化癌が未分化形質を獲得する機序に関連する候補遺伝子としてFOXD1を見出した。FOXD1の発現調節により、EMTを制御できる可能性があることが示唆された。このことは治療法が確定しておらず、極めて予後不良である甲状腺未分化癌の新規治療法のターゲットとなる可能性がある。また、未分化癌の早期発見マーカーとして利用できる可能性もあり、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the mechanism by which well-differentiated thyroid cancer acquires undifferentiated traits. First, by comparing gene expression between well-differentiated and undifferentiated sites using patient specimens that had undergone anaplastic transformation from well-differentiated cancer, I found that epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is involved in undifferentiated transformation; I focused on FOXD1 as a candidate factor related to the acquisition of undifferentiation traits. Experiments using thyroid cancer cell lines revealed the involvement of FOXD1 in EMT and the correlation with EMT transcription factors SNAI1/2. I also found that demethylation of the promoter region may be involved in regulating FOXD1 expression. Furthermore, I established a FOXD1 knockout cell line using CRISPR/Cas9 genome editing technology.

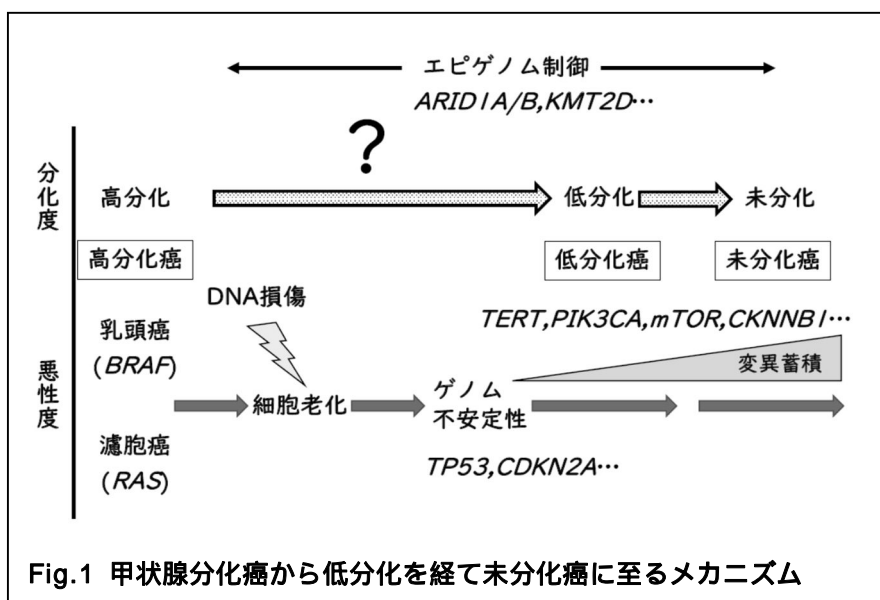
研究分野：腫瘍生物学

キーワード：甲状腺癌 未分化癌 脱分化 上皮間葉転換

### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺高分化癌は非常に予後良好であるのに対し、未分化癌は罹患率が2%未満、1年生存率は5-20%以下の極めて予後不良な orphan disease である。診断時に根治的切除不能のケースが多く、緩和的化学療法が主な治療法となる。近年、分子標的薬であるレンパチニブが未分化癌の治療薬として承認されたが、依然として予後不良のままである。

未分化癌は高分化癌である乳頭癌や濾胞癌が低分化癌を経て、未分化転化すると考えられている。遺伝子変異解析から TP53 や TERT、PIK3CA などの変異頻度が増加することが報告されており、未分化癌の悪性化に対するメカニズムは少しずつ明らかになってきた。これまでの報告から、BRAF や RAS の変異により細胞老化が誘導される酸化ストレスなどの DNA 損傷により P53/ARF のシグナル経路に変異が生じ、ゲノム不安定性が誘導される細胞増殖やアポトーシスなど悪性化に関わる様々な遺伝子に変異が誘導される、という機序が考えられる (Fig1)。しかし、どのような遺伝子異常により、高分化癌が未分化の形質を獲得するのか、その詳細なメカニズムは不明のままである。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、甲状腺高分化癌が未分化形質を獲得する機序について明らかにし、未分化転化を引き起こす遺伝子を同定することである。さらに、その遺伝子の発現異常がどの段階で獲得されるのかを明確にし、その遺伝子の発現異常が低分化・未分化癌の特定マーカーになりうるかを検討する。

### 3. 研究の方法

#### (方法 1) RNA-seq 解析による甲状腺未分化癌における特異的遺伝子の同定

当大学でこれまでに保存されている甲状腺未分化癌の腫瘍組織の FFPE 検体を用い、切片を HE 染色後高分化部位と未分化部位を確認し、高分化部位と未分化部位を切り出す。抽出した RNA を RNA-seq 解析し、未分化癌に特異的に発現が上昇する遺伝子を同定し、その中でも転写関連遺伝子を選択する。

#### (方法 2) 同定した特異的遺伝子の甲状腺癌におけるメカニズム解析

同定した特異的遺伝子の発現を siRNA を用いて抑制し、甲状腺未分化癌細胞株 (OCUT-1F、OCUT-1C) に対する影響を調べ、同定した特異的遺伝子の機能について検討する。

(方法3) CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いた特異的遺伝子のノックアウト細胞株の樹立と解析  
同定した特異的遺伝子について CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いてノックアウト細胞株を樹立し、(方法2) で得られた知見について再現性等を調べる。

#### 4. 研究成果

##### (1) RNA-seq 解析による甲状腺未分化癌における特異的遺伝子の同定

当大学でこれまでに保存されている6症例の甲状腺未分化癌の腫瘍組織のFFPE検体を用い、切片をHE染色により高分化部位と未分化部位を確認し、それらを別々に切り出してRNAを抽出した。抽出したRNAを用いてRNA-seq解析を行い、各症例での高分化部位と未分化部位で遺伝子発現比較解析を行ったところ、どの症例においても上皮間葉転換(EMT)が生じていることが明らかとなった。また、どの症例でも未分化部位で特異的に発現が上昇する転写因子としてFOXD1を同定した。FOXD1の発現は、高分化癌細胞株(KTC-1)での発現は低く、未分化癌細胞株(OCUT-1F、OCUT-1C)では発現が上昇していることも確認した。さらに、GEOに登録されているマイクロアレイデータをGEO2Rで解析すると既存のデータでも未分化癌でFOXD1の発現上昇が認められた。

##### (2) 同定した特異的遺伝子の甲状腺癌におけるメカニズム解析

FOXD1の高発現が認められた未分化癌細胞株(OCUT-1F、OCUT-1C)を用いてsiRNAによりFOXD1の発現を抑制したところ、細胞の形態変化が認められ、増殖速度が抑制されることがわかった。また発現抑制した細胞株を時間経過とともにリアルタイムPCRによりEMT関連遺伝子の発現を調べたところ、FOXD1の発現抑制とともにCDH1やCLDN1等の発現の回復やCDH2の発現抑制が認められ、細胞の形態変化と一致してEMTを逆に動かす可能性が示唆された。さらにEMT関連転写因子であるSNAI1の発現抑制とSNAI2の発現上昇が認められた。

FOXD1の発現がEMTと関わっていることを調べるため、FOXD1の発現が低いKTC-1細胞株を用いてTGFβでEMTを誘導し、FOXD1の発現変化についてリアルタイムPCRにより解析した。その結果、時間経過とともに細胞の携帯が変化し、それに伴ってFOXD1の発現が上昇してくることがわかった。またその変化とともにSNAI1が顕著に上昇してくることもわかった。そこでSNAI1やSNAI2をsiRNAにより発現抑制するとSNAI1とSNAI2は相互排他的な関係であるがFOXD1の発現にはそれほど影響しないこともわかった。これらの知見から、FOXD1は主にSNAI1の発現を調節していることが示唆された。

FOXD1の発現調節についてプロモーターのメチル化解析を行った。発現抑制されているKTC-1細胞株と発現上昇が認められているOCUT-1C、OCUT-1F細胞株のゲノムを抽出し、バイサルファイト処理後にリアルタイムPCRを用いてプロモーター領域のメチル化を調べた。その結果、KTC-1細胞株ではプロモーター領域は主にメチル化されているが、OCUT-1CやOCUT-1Fでは非メチル化されている可能性が高いことが示唆された。

FOXD1の発現と薬剤感受性について検討を行ったところ、OCUT-1F細胞株においてFOXD1の発現を抑制するとパクリタキセルやドキソルビシンに対する感受性が高まることがわかった。

##### (3) CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いた特異的遺伝子のノックアウト細胞株の樹立と解析

OCUT-1C、OCUT-1F細胞株を用いて、CRISPR/Cas9遺伝子編集技術によりFOXD1ノックアウト細胞株の樹立を試みた。FOXD1のサイトと入れ替えるベクターとしてHR700PA-1を用い、Cas9やgRNAと共にエレクトロポレーションによりトランスフェクションした。GFPの発現を顕微鏡で確認後、

puromycin と Fialuridine でセレクション後、クローンを獲得した。解析は今後行っていく予定である。

以上の結果より、甲状腺高分化癌から未分化転化する際には EMT が重要で、FOXD1 がその鍵を握る可能性が示唆された。FOXD1 の発現により抗がん剤感受性も変化することから、FOXD1 が甲状腺未分化癌の治療標的となる可能性があり、今後はより詳細に研究を進めていく必要がある。

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

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