

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25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790350

研究課題名（和文） 新たな甲状腺癌特異的バイオマーカーの生物学的意義とその臨床応用

研究課題名（英文） Biological implication and clinical application for novel thyroid cancer specific biomarker

研究代表者

菊地 智樹（KIKUCHI TOMOKI）

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50404588

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞増殖や細胞運動に関連するSNX5蛋白に対するモノクローナル抗体を樹立し、免疫組織学的解析を行ったところ、SNX5蛋白が甲状腺乳頭癌に高率に発現していることを見いだした。またSNX蛋白を強制発現させた細胞株において、腫瘍抑制、アポトーシス誘導、DNA修復などの機能が報告されているcaspase-2の増加が確認された。こうした研究結果からSNX5-Caspase2経路に基づく甲状腺癌の解析により新たな発癌機構が見出される可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Immunohistochemical analysis with an SNX5-specific mAb established in this study consistently demonstrated the preferential expression of SNX5 in Papillary thyroid carcinoma cell. More interestingly, epithelial cells expressing excess SNX5 showed high levels of Caspase-2. Collectively further investigations focusing on the unique modality of SNX5 could clarify its unidentified mechanism and improve our understanding of the tumor cell biology of thyroid gland malignancies

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：甲状腺乳頭癌,

1. 研究開始当初の背景

甲状腺乳頭癌は、甲状腺癌の90%近くを占める悪性腫瘍であり、早期にリンパ節転移を来すところから、癌の転移メカニズムを解明するのに適した腫瘍として注目されている。

Sorting nexin (SNX)ファミリーは細胞質および膜関連蛋白であり、phosphoinositideとの結合ドメインであるphox (PX)ドメインを共通ドメインとして有する。現在までに、哺乳類では28種類（SNX1～SNX28）が同定され

エンドソームからトランスゴルジネットワーク(Trans Golgi Network, TGN)への蛋白輸送に関連すると考えられている。Sorting nexinファミリー分子の一つであるSNX5は、Liuらの報告によれば、SNX5も細胞増殖に重要な役割を示すEGFRのエンドソームからTGNに至る輸送に関与するとの報告もあり、腫瘍形成に関与する可能性が示唆され、Haraらの

報告によれば、細胞運動能などに関与する DCM ファミリーの分子である Dock180 が、その構成ドメインである DHR1 と SNX ファミリー、特に SNX5 との強い会合が認められた。そのため SNX ファミリーが、エンドソームから TGN の輸送のみならず、細胞運動に関与することも示唆され、さらに腫瘍の運動能、特に転移との関連が示唆される。

以上より SNX ファミリーの解析は、エンドソームから TGN に至る輸送経路のみならず、細胞の増殖維持機構や細胞運動など腫瘍形成や転移に関与した分子である可能性があるため詳細な解析が急がれている。

2. 研究の目的

今回我々は、甲状腺ホルモンを合成、分泌するその特性上、細胞内蛋白輸送機構が特に発達していると思われる甲状腺濾胞上皮細胞と SNX ファミリーの関係に着目した。

そのため甲状腺腫瘍における、SNX ファミリー分子の発現検討を行い、その生物学的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 甲状腺腫瘍における、SNX ファミリー分子の発現検討

甲状腺腫瘍における SNX ファミリーの発現を RT-PCR について検討する。

(2) SNX5 に対する特異的なモノクローナル抗体の開発

発現が確認された SNX5 を詳細に解析するため、特異的なモノクローナル抗体を作製する。

(3) SNX5 を高発現する腫瘍の検索

甲状腺腫瘍を含む様々な腫瘍における SNX5 の発現を検討するため、パラフィンブロックを使用した免疫組織化学を行う。

(4) マウス化学発癌による甲状腺癌の SNX5 発現検討

甲状腺癌の発ガンモデルマウスを使用し腫瘍組織の SNX5 の発現の検討を RT-PCR で行う。

(5) SNX5 の分子生物学的意義

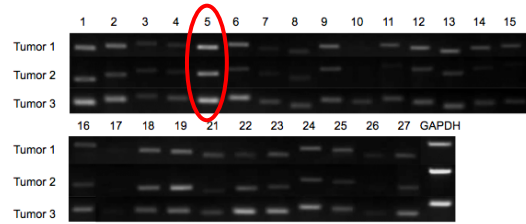
ベクターを使用して SNX5 蛋白を強制発現させた細胞において、SNX5 の生物学的意義を検討する。

4. 研究成果

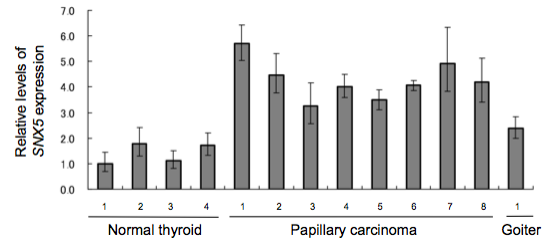
(1) 甲状腺腫瘍における SNX ファミリー分子の発現検討

ヒト甲状腺乳頭癌 3 症例の新鮮材料から RNA を抽出し RT-PCR をしたところ、SNX ファミリー 1-27 の中で最も高発現しているのは

SNX5 であった(下図)。



また正常甲状腺組織や非腫瘍性である腺腫様と比較すると、甲状腺乳頭癌は SNX5 の発現が高かった(下図)。

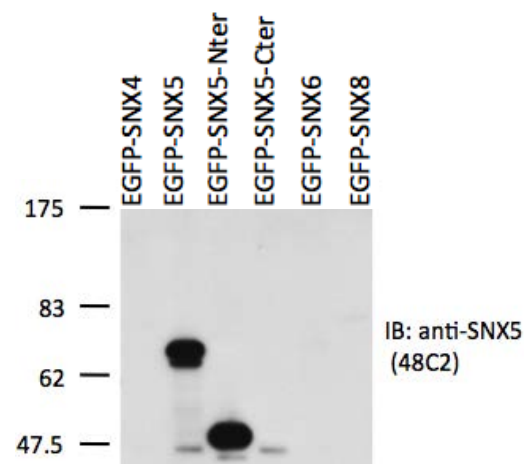


(2) SNX5 に対する特異的なモノクローナル抗体の開発

SNX5 特異的なモノクローナル抗体(48C2)を樹立した。

SNX5 と似た構造をもつ SNX4、6、8 を強制導入した細胞と、SNX5 全長と、SNX5 を半分にした N 末端側と C 末端側のみをそれぞれ導入した細胞を用いて SNX5 に対する Western blotting を行った。SNX4、6、8 ではバンドは検出されず、SNX5 は全長と N 末端のみにバンドを認め、C 末端ではバンドを認めなかった。以上より 48C2 は SNX5 に高い特異性を持ち、SNX5 の N 末端を認識する抗体であることを確認した(下図)。

□



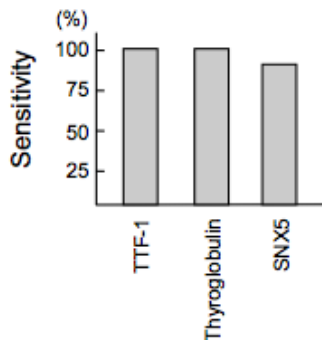
(3) SNX5 を高発現する腫瘍の検索

樹立した SNX5 に対するモノクローナル抗体 48C2 を用いて、甲状腺腫瘍 267 例の免疫組織化学を行った。その結果乳頭癌の約 90% 以上に SNX5 の発現を確認した。乳頭癌の転移巣においても、原発巣と同程度の陽性率であった(下図)。

| Organ | Tissue type | SNX5 | | | Total |
|---------------|----------------------------|-------------|-----------|------------|-------|
| | | ++ | + | - | |
| Thyroid gland | Papillary carcinoma | 107 (89.2%) | 6 (5.0%) | 7 (5.8%) | 120 |
| | L/N metastasis | 60 (85.7%) | 5 (7.1%) | 5 (7.1%) | 70 |
| | Follicular variant | 0 (0%) | 1 (50.0%) | 1 (50.0%) | 2 |
| | Follicular carcinoma | 5 (29.4%) | 2 (11.8%) | 10 (58.8%) | 17 |
| | Medullary carcinoma | 0 (0%) | 0 (0%) | 4 (100%) | 4 |
| | Undifferentiated carcinoma | 0 (0%) | 0 (0%) | 5 (100%) | 5 |
| | Follicular adenoma | 4 (19.1%) | 2 (9.5%) | 15 (71.4%) | 21 |
| | Nodular hyperplasia | 13 (46.4%) | 6 (21.4%) | 9 (32.1%) | 28 |
| 267 | | | | | |

甲状腺以外の臓器の悪性腫瘍についても 173 例の検討を行ったが陽性例はほとんどなく SNX5 は甲状腺に特異的に発現していることが確認された。

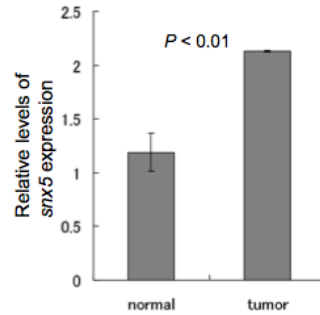
さらに甲状腺乳頭癌を用いた検討では、現在までに甲状腺由来マーカーとして汎用されている Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) や Thyroglobulin と比較してもほぼ同等の感度であることが示された(下図)。



(4) マウス化学発癌による甲状腺癌の SNX5 発現検討

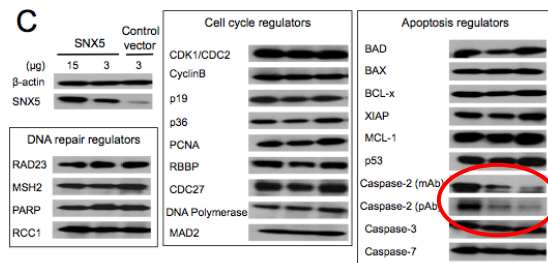
マウスに対しイニシエーターとして N-bis (2 hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) を皮下注射し、その後プロモーターとして sulfadimethoxine (SDM) を飲水に混入投与し甲状腺腫瘍を発生させた。12 週後に甲状腺組織を採取し、SNX5 の発現を RT-PCR にて検討したところ腫瘍において SNX5 の発現増加を認めた(次図)。

□



(5) SNX5 の分子生物学的意義

強制発現ベクターを使用し HEK293 細胞に SNX5 を導入し代表的な DNA 修復因子、細胞周期調節因子、アポトーシス調節因子について Western blotting で発現の変化を検討したところ SNX5 強制発現細胞において腫瘍抑制、アポトーシス誘導、DNA 修復などの機能が報告されている Caspase-2 の発現増加を認めた(下図)



(6) 総括

SNX5 は甲状腺乳頭癌に高い特異性をもって高発現しているが、甲状腺乳頭癌と同様の乳頭状増殖を示す肺癌や乳癌での発現は認められない。甲状腺乳頭癌のリンパ節・肺転移巣でも抗 SNX5 抗体の染色性が認められたことから、SNX5 は甲状腺乳頭癌の新たな診断マーカーとして有用であると考えられる

SNX5 の遺伝子導入により腫瘍抑制や DNA 修復作用をもつと報告されるカスパーゼ 2 の増加が確認された。

□ SNX5 は甲状腺濾胞上皮細胞の増殖活性を亢進させて癌化へと導くが、同時に増加するカスパーゼ 2 が腫瘍抑制に働くため、甲状腺乳頭癌は緩徐に増大する予後良好な性質となると考えられる。

□

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]

① Sorting nexin 5 of a new diagnostic marker of papillary thyroid carcinoma regulates Caspase-2. Cancer Sci. 2012 Jul;103(7):1356-62.

DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02296.x.

Ara S, Kikuchi T, Matsumiya H, Kojima T, Kubo T, Ye RC, Sato A, Kon S, Honma T, Asakura K, Hasegawa T, Himi T, Sato N, Ichimiya S.

〔学会発表〕(計4件)

- ① 荒志保子、第8回日本病理学会カンファレンス2011松本、平成23年8月6日、ホテルブエナビスタ(松本)
- ② 荒志保子、甲状腺乳頭癌におけるSNXファミリーの機能解析、第70回日本癌学会学術総会、平成23年8月3日、名古屋国際会議場
- ③ 荒志保子、甲状腺乳頭癌におけるSNXファミリー分子発現の検討、第100回日本病理学会総会、平成23年4月30日、パシフィコ横浜
- ④ 荒志保子、新たな甲状腺乳頭癌特異的バイオマーカー-SNX5の意義とその臨床応用、第99回日本病理学会総会、平成22年4月28日、京王プラザホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 智樹 (KIKUCHI TOMOKI)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50404588