

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4月23日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791204

研究課題名（和文） 甲状腺癌幹細胞の放射性ヨードに対する感受性

研究課題名（英文） The sensitivity of thyroid cancer stem cells to radioiodine

研究代表者

松瀬 美智子 (MATSUSE MICHIKO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30533905

研究成果の概要（和文）：

甲状腺癌組織には癌幹細胞と通常の癌細胞が存在し、放射性ヨードに対する感受性が異なっているという仮説のもと、甲状腺癌細胞から癌幹細胞の同定・単離を試みた。まず甲状腺癌細胞株を用いた実験から、癌幹細胞マーカーを効率よくスクリーニングできるアッセイ系を確立し、マーカー候補として、ALDH1 活性や CD326 等を同定した。しかし、すべての癌細胞に共通のマーカーは無く、各症例ごとにマーカーが異なっている可能性も示唆された。上記マーカーによって分離した細胞に放射線照射を行い比較検討したところ、放射線感受性自体にはマーカーとの関連は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to isolate thyroid cancer stem cells and examine whether the sensitivity of the cancer stem cells to radioiodine is different from non-cancer stem cells. First, we established an efficient screening system to evaluate markers for thyroid cancer stem cells. Using this system, we were able to identify candidate markers such as ALDH1 activity and CD326. However, they were not universal markers in all types of thyroid cancers. To characterize the sorted subpopulations, radiosensitivity of each fraction was evaluated. However, there was no association between these markers and radiosensitivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2011年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2012年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
年度			
年度			
総計	30,000,000	9,000,000	39,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療生物学

1. 研究開始当初の背景

進行・再発甲状腺癌に対する治療として、手術による甲状腺全摘後に、放射性ヨード ^{131}I による ablation が行われている。ヨード取り込み

のみられる小さな腫瘍に対しては、かなりの効果が期待出来るが、ヨードを取り込まない症例、特に未分化癌に対しては、治療効果は期待出来ない。また一度治療に反応したとし

ても、再び再発するといった現象がしばしば見られ、この様な症例も治療に難渋する。ヨード取込みの低下には、ヨードトランスポーターの発現や局在が大きく影響する事が分かっているが、今までは腫瘍の悪性化に伴う脱分化として説明されてきた。しかし、近年、癌の発生や進展、再発に関わるメカニズムについて、全く新しい概念である「癌幹細胞説」が提唱されている。

<癌幹細胞仮説>

癌組織中には増殖能、分裂速度が異なる様々な細胞が混在していることが知られていたが、近年、癌組織中にも血液系や神経系の幹細胞と同様に、「癌幹細胞」が存在する事が次第に明らかになってきた。癌幹細胞は必要な時に自己複製を行いながら、非対称分裂によって癌組織を構成する癌細胞を生み出していく。癌の発育や進展、転移にはこの癌幹細胞が必須であり、癌幹細胞から分化、増殖してきた癌組織中の大部分を占める癌細胞では、新たな腫瘍を形成する能力は無いとされる。従来からの化学療法、放射線療法などは大部分の癌細胞をターゲットとしたものであり、分裂速度の遅い、さらには放射線抵抗性、薬剤耐性能の高い癌幹細胞には治療効果が低いと予想される。そのため、大部分の癌細胞が治療に反応し、一旦腫瘍が縮小または消失したとしても、その後の再発、転移はこれらの治療に抵抗性の残存した癌幹細胞の関与が示唆され、癌根治の戦略として癌幹細胞の存在とその特性についての研究を押し進める必要性は極めて高い。

この仮説を甲状腺癌に当てはめると、一見ヨード取込みが良好な腫瘍でも、その腫瘍を構成している癌細胞は均一でなく、単純に評価する事は出来ない。特に難治性癌における癌幹細胞は、放射線抵抗性が高い事が予想される。どの様な細胞・メカニズムが放射線抵抗性と関連するのか、それを明らかにするのが本研究の目的である。癌幹細胞では放射線自体に抵抗性となるメカニズムが働いているのか、それとも未分化なためヨードトランスポーターが機能していないのか、またはその両方が関与しているのか、何も明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

甲状腺癌組織には、癌幹細胞と通常の癌細胞が存在し、放射性ヨードに対する感受性（治療効果）が異なっているという仮説のもと、甲状腺癌細胞から、癌幹細胞を同定・単離する。腫瘍組織中の大部分を占める通常の癌細胞と比較し、癌幹細胞の放射線に対する反応の違い、そのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 甲状腺癌細胞株を用いた実験から甲状腺癌幹細胞のマーカーを同定する。
- (2) 甲状腺癌組織（主として分化一低分化癌）からの癌細胞初代培養方法を確立する。
- (3) 癌幹細胞マーカーによって癌幹細胞と通常の癌細胞を分離・採取し、放射線感受性の比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) まず、甲状腺癌細胞株を用いた実験から、癌幹細胞マーカーの検索を開始した。癌幹細胞の腫瘍形成能を同定するための手段として現時点で最も信頼性が高く頻用されているのは、免疫不全マウスへの移植を行って腫瘍形成能力を確認することである。8種の甲状腺癌細胞株を用い、ヌードマウスでの腫瘍形成能を検討したところ、4つの細胞株(FRO、KTC3、ACT1、8505C)に腫瘍形成能を認めた。

次に、特殊な低接着培養面を持つプレートと、種々の成長因子を含む無血清培地を組み合わせる事によって、癌幹細胞に対するスフェロイド培養法を構築した。上記4種類の細胞株ではスフィア形成が観察されたが、他のヌードマウスで腫瘍を作らない細胞株では、スフィア形成は認められなかった。この培養法でのスフェロイド形成能は、ヌードマウスでの腫瘍形成能とよく相関する事から、癌幹細胞を選択的に培養できていると考えられた。少なくとも、形成されたスフィアは、癌幹細胞を含んでいる事が示唆される。さらにこの培養法とセルソーターを組み合わせる事によって、種々の癌幹細胞マーカーに対し、スフィア形成を指標として、甲状腺癌における癌幹細胞マーカーをスクリーニングできるアッセイ系を確立できた。

固形癌の癌幹細胞マーカーと言われている種々の細胞表面抗原やALDH1活性を測定するAldefluor法により、上記アッセイ系を用いて癌幹細胞マーカーの検索を行った。上記4種類の腫瘍形成能及びスフィア形成能の見られる細胞株において表面抗原の陽性及び陰性分画をソーティングし、それぞれの分画でのスフィア形成能の違いを検討した。現在までのところ、ALDH1活性、CD326等の発現がスフィア形成能と高い相関を示すことが分かった。このことより、甲状腺癌の癌幹細胞マーカーの候補を絞り込むことが出来たと考えられる。しかしながら、すべての細胞種で共通のマーカーは確認できず、また、マーカーが発見できない細胞株も存在した。このことは、甲状腺癌では、癌幹細胞マーカーは症例ごとに異なっていること、未だ未知のマーカーが存在

することも示唆された。

また、上記の低接着表面加工プレートと無血清培地での培養法は、ある程度癌幹細胞を選択的に増殖させることが出来ることが示唆され、この方法によって培養された細胞、通常の接着培養法、そしてヌードマウスで実際に形成された腫瘍から取り出した細胞を用い、これら細胞の表面抗原等の発現の変化も検討した。ヌードマウスに形成された腫瘍細胞とスフィア細胞の表面マーカー発現プロファイルは類似しており、スフィア細胞は、より生体内に近い状態を反映している可能性が示唆された。

(2) 上記マーカーによって分離した細胞に放射線照射（外照射）を行い、放射線感受性の比較検討を行った。非照射細胞におけるコロニー形成率はALDH^{pos}及びCD326^{hi}の分画の細胞では、ALDH^{neg}及びCD326^{low}の分画の細胞よりも2倍以上高かったが、放射線感受性自体の差は認められなかった。このことから、今回同定したマーカーと放射線感受性は関連していないと考えられた。未知のマーカーのさらなる検索、ヨードトランスポーターの関与等、さらなる研究が必要と考えられた。

(3) 現在まで、未分化癌以外の甲状腺癌の初代培養・増殖は困難とされ、初代培養を使った実験はほとんど報告されていない。我々は新たな培養法を試み、甲状腺癌組織より癌細胞を分離培養する事に成功した。細かく切断した甲状腺癌組織をコラゲナーゼ処理し、遊離してきた細胞を特殊培地にて培養すると、細胞が増殖を開始し、種々の実験に使用できることがわかった。この細胞を上記のスフェロイド培養法により培養するとスフィアを形成することから、甲状腺癌組織からの初代培養細胞に対しても、癌幹細胞に対するアッセイを行うことができるようになった。

以上、本研究によって癌幹細胞マーカーを効率よくスクリーニングできるアッセイ法を確立し、甲状腺癌幹細胞のマーカー候補をいくつか同定する事ができた。このスクリーニング法は、他の臓器の癌における癌幹細胞の研究にも有用なツールとなり得ると考えられた。

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 11 件)

①Identification of the first ATRIP-deficient patient and novel mutations in ATR define a

clinical spectrum for ATR-ATRIP Seckel Syndrome.

Ogi T, Walker S, Stiff T, Hobson E, Limsirichaikul S, Carpenter G, Prescott K, Suri M, Byrd PJ, Matsuse M, Mitsutake N, Nakazawa Y, Vasudevan P, Barrow M, Stewart GS, Taylor AM, O'Driscoll M, Jeggo PA. PLoS Genet. 2012;8(11):e1002945. doi: 10.1371/journal.pgen.1002945. 査読有

②Functional characterization of the novel *BRAF* complex mutation, *BRAF*^{V600delins1M}, identified in papillary thyroid carcinoma. Matsuse M, Mitsutake N, Tanimura S, Ogi T, Nishihara E, Hirokawa M, Fuziwara CS, Saenko VA, Suzuki K, Miyauchi A, Yamashita S. Int J Cancer. 2013 Feb 1;132(3):738-43. doi: 10.1002/ijc.27709. 査読有

③Imatinib enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of nuclear factor- κ B activation in anaplastic thyroid carcinoma cells.

*Kim E, *Matsuse M, Saenko V, Suzuki K, Ohtsuru A, Mitsutake N, Yamashita S.

*co-first author

Thyroid. 2012 Jul;22(7):717-24. doi: 10.1089/thy.2011.0380. 査読有

④Copy number alteration and uniparental disomy analysis categorizes Japanese papillary thyroid carcinomas into distinct groups.

Matsuse M, Sasaki K, Nishihara E, Minami S, Hayashida C, Kondo H, Suzuki K, Saenko V, Yoshiura K, Mitsutake N, Yamashita S. PLoS One. 2012;7(4):e36063.

doi: 10.1371/journal.pone.0036063. 査読有

⑤Mutations in *UVSSA* cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair.

Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, Ohyama K, Ito K, Mishima H, Nomura M, Kinoshita A, Ono S, Takenaka K, Masuyama R, Kudo T, Slor H, Utani A, Tateishi S, Yamashita S, Stefanini M, Lehmann AR, Yoshiura K, Ogi T. Nat Genet. 2012 May;44(5):586-92.

doi: 10.1038/ng.2229. 査読有

⑥miR-196a downregulation increases the expression of type I and III collagens in keloid fibroblasts.

Kashiyama K, Mitsutake N, **Matsuse M**, Ogi T, Saenko VA, Ujifuku K, Utani A, Hirano A, Yamashita S.

J Invest Dermatol. 2012 Jun;132(6):1597-604.

doi: 10.1038/jid.2012.22. 査読有

⑦The *FOXE1* and *NKX2-1* loci are associated with susceptibility to papillary thyroid carcinoma in the Japanese population.

Matsuse M, Takahashi M, Mitsutake N, Nishihara E, Hirokawa M, Kawaguchi T, Rogounovitch T, Saenko V, Bychkov A, Suzuki K, Matsuo K, Tajima K, Miyauchi A, Yamada R, Matsuda F, Yamashita S.

J Med Genet. 2011 Sep;48(9):645-8.

doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100063. 査読有

⑧Absence of common activating mutations of the epidermal growth factor receptor gene in thyroid cancers from American and Japanese patients.

*Ricarte-Filho JC, ***Matsuse M**, Lau C, Ryder M, Nishihara E, Ghossein RA, Ladanyi M, Yamashita S, Mitsutake N, Fagin JA. *co-first author

Int J Cancer. 2012 May 1;130(9):2215-7;

author reply 2217-8.

doi: 10.1002/ijc.26267. 査読有

⑨Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction.

Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Suzuki M, **Matsuse M**, Ohtsuru A, Kumagai A, Uga T, Yano H, Nagayama Y, Yamashita S.

PLoS One. 2011 Apr 27;6(4):e19354.

doi: 10.1371/journal.pone.0019354. 査読有

⑩Induction of micronuclei in germinating onion seed root tip cells irradiated with high energy heavy ions.

Takatsuji T, Takayanagi H, Morishita K, Nojima K, Furusawa Y, Nakazawa Y, **Matsuse M**, Akamatsu S, Hirano N, Hirashima N, Hotokezaka S, Ijichi T, Kakimoto C, Kanemaru T, Koshitake M, Moriuchi A, Yamamoto K, Yoshikawa I.

J Radiat Res. 2010;51(3):315-23.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrr/51/3/51_09028/_article 査読有

⑪miR-195, miR-455-3p and miR-10a(*) are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells.

Ujifuku K, Mitsutake N, Takakura S, **Matsuse M**, Saenko V, Suzuki K, Hayashi K, Matsuo T, Kamada K, Nagata I, Yamashita S.

Cancer Lett. 2010 Oct 28;296(2):241-8.

doi: 10.1016/j.canlet.2010.04.013. 査読有

[学会発表] (計4件)

嶋村 美加 甲状腺癌幹細胞マーカーの網羅的解析 第55回日本甲状腺学会 2012年11月29日-12月1日 福岡

松瀬 美智子 *FOXE1*及び*NKX2-1*ローカスにおける遺伝子多型は日本人甲状腺乳頭癌に関連する遺伝的因子である 第54回日本甲状腺学会 2011年11月21-23日 大阪

松瀬 美智子 甲状腺乳頭癌症例で検出された新規*BRAF*変異 (*BRAF*^{V600Y+M601Ins})の機能解析 第54回日本甲状腺学会 2011年11月21-23日 大阪

Michiko Matsuse Imatinib, the selective tyrosine kinase inhibitor, enhances antitumor activity of docetaxel in anaplastic thyroid cancer cells 14th International Thyroid Congress 2010.9.14-15 Paris, France

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松瀬 美智子 (MICHIKO MATSUSE)

長崎大学 医歯薬学総合研究科 助教

研究者番号: 30533905

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし