

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590412

研究課題名(和文) 甲状腺乳頭癌の細胞異型および組織構築の形成にはチューブリンが主役となる

研究課題名(英文) Tubulin plays important role in morphogenesis of cellular and structural atypia in papillary thyroid carcinoma tissue

研究代表者

村田 晋一 (Murata, Shin-ichi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20229991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺癌における細胞や構造の異型形成の分子病理学的背景を明らかにすることを目的とした。本研究では、甲状腺乳頭癌由来培養細胞を用いて、人工的に核溝や核内封入体を形成する培養系を確立し、 α -tubulin、 β -tubulin、核膜蛋白および細胞内骨格の発現についての解析、ヒト正常甲状腺組織および癌組織を用いて、 γ -tubulinや核膜蛋白の発現の解析を行った。その結果は、培養細胞における核溝や核内封入体の形成、およびヒト癌組織の濾胞構造や乳頭状構造の形成にnon-centrosomal microtubule organizing centerが大きく関わっていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Aim of the study was to clarify a molecular background of morphogenesis of cellular and structural atypia in thyroid cancer. We established culture system, in which cultured papillary thyroid carcinoma cells artificially formed nuclear grooves (NV) and pseudonuclear inclusion (PNI). Using the culture system, we investigated expression of α / β - and γ -tubulins, nuclear membrane proteins and cytoskeletons in the cells with NV/PNI. γ -tubulins were detected in cytoplasm near NV and in PNI. Also, we studied expression of γ -tubulin and nuclear membrane proteins in surgically resected human thyroid cancer tissue. Aberrant expression of γ -tubulin distribution and nuclear membrane proteins was found in the cancer tissue. From the results, we concluded non-centrosomal microtubule organizing center and nuclear membrane proteins played a central role in NV/PNI formation in culture cells and morphogenesis of follicular and papillary structure in human cancer tissue.

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 核内封入体 核溝 tubulin 核膜 MTOC

1. 研究開始当初の背景

癌組織は正常組織とは異なった組織構造(構造異型)および細胞形態(細胞異型)を示し、病理診断の重要な基準となっている。しかしながら、構造異型や細胞異型の発生機序に関する分子病理学的背景はまったくと言ってよいほど解明されていない。我々は、乳頭状組織構築および核溝、核内封入体、すりガラス状クロマチンといった細胞核所見など特徴的な構造異型と細胞異型を呈する甲状腺乳頭癌を対象に、これらの構造異型や細胞異型の形成機序を、さまざまな観点から癌細胞核の解析を行ってきた。近年では、核内の染色体位置(chromosome territory)を解析することによって、乳頭癌細胞特有の核形態異常やクロマチン分布異常の発生機序を解明してきた。しかしながら、核溝や核内封入体の発生や乳頭状構造の形成機序に関しては解明できていない。

近年の様々な解析の蓄積に基づき、正常細胞の形態形成には、細胞骨格、核膜蛋白、核内蛋白および染色体が複雑に関与していると考えられている。例えば、細胞骨格の1つである tubulin が核膜蛋白の1つである emerin や細胞膜表面蛋白である GCP6 や K18 と結合していることを示す2つの研究結果が発表された。さらに興味深いことに、乳腺細胞の腺管形成培養実験の中で、腺腔が形成されるに従い、培養細胞核に近接していた γ -tubulin が核から離れることが示された(Nature Reviews Cancer 2005)。Tubulin は、細胞骨格である微小管や中心体を構成し、核分裂期では紡錘体を形成する。Tubulin の機能は、細胞周期の間期では不明な点が多いが、核分裂期では詳細に解析され、癌細胞では中心体(γ -tubulin)の数的・質的異常が報告されている。

以上および我々の過去の研究結果も含めて総合的に考えると、核膜蛋白や細胞膜表面蛋白と結合する tubulin が細胞形態や組織構築において重要な役割を担っている可能性が強く示唆される。さらに、癌細胞での中心体(γ -tubulin)の数的・質的異常の存在を考えると、細胞増殖の異常に関連した γ -tubulin の異常が α - β -tubulin を介して、核膜蛋白や細胞膜蛋白に影響を与え、組織構造的あるいは細胞的異型を生じさせている可能性が高いと考えられる。

本研究は、tubulin が細胞形態や組織構築形成の Key factor であるという仮説の元に、甲状腺乳頭癌における核異型の発生および乳頭状組織構築の形成に tubulin がどのように関わるかを明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、甲状腺乳頭癌における核異型の発生および乳頭状組織構築の形成の機序に tubulin がどのように関わるかを明らかにすることにある。

具体的には、

A) 甲状腺乳頭癌における核異型の発生機序の解析を目的として：

- 甲状腺乳頭癌由来培養細胞(KTC-1)を用いて核溝や核内封入体を形成する培養系を確立する
- 上記の核溝・核内封入体形成培養系を用いて、核溝や核内封入体の形成にあたって、tubulin を中心に様々な細胞骨格や核膜蛋白の細胞内動態を解析する。
- 生きた培養細胞に GFP をラベルした α -tubulin を発現させ、培養細胞が核溝や核内封入体を形成する過程での tubulin の動態を細胞周期と関連させて、観察する。
- ヒト甲状腺乳頭癌の手術摘出組織に対して、核溝や核内封入体にあたって、tubulin を中心に様々な細胞骨格や核膜蛋白の細胞内動態を解析する。

B) 甲状腺乳頭癌における乳頭状組織構築の形成機序の解析を目的として：

- 甲状腺乳頭癌由来培養細胞(KTC-1)をコラーゲン・ゲル培地に3次元培養することによって、濾胞を形成する培養系を確立する。
- 上記の濾胞形成培養系を用いて、濾胞形成にあたって、tubulin を中心に様々な細胞骨格や核膜蛋白の細胞内動態を解析する。
- ヒト甲状腺乳頭癌および正常甲状腺の手術摘出組織に対して、 γ -tubulin を免疫組織学的に染色し、 γ -tubulin の細胞内位置を比較解析する。

上記の細胞骨格や核膜蛋白の発現の解析にあたっては、定量的解析を目的として、画像解析のコンピュータソフトウェアを自作することによって、柔軟で、他に類をみない新たな研究を行う。

3. 研究の方法

本研究は培養細胞を使った基礎的研究とヒト甲状腺癌手術材料を使った臨床病理的研究の2つを行う。

A. 培養細胞を用いた基礎的研究

1) 我々は既に甲状腺乳頭癌由来(KTC-1)を用いて核溝・核内封入体形成の培養系の作成に成功しているが、より効率に核溝・核内封入体を形成する培養細胞系を確立する。

2) 甲状腺乳頭癌由来培養細胞(KTC-1)をコラーゲン・ゲル培地に3次元培養することによって、濾胞を形成する培養系を確立する。

培養皿にコラーゲン・ゲルの層(Base Layer)を作る。

細胞を少量の培養液に入れ、コラーゲン混合溶液中にいれよく振り混ぜる。

の細胞とコラーゲン混合溶液を Base Layer 上に分注し、37 でゲル化(Top Layer)させる。

Top Layer の硬化した後に、培養液を重層する。

3) 核溝・核内封入体形成培養細胞や濾胞形成培養細胞に対して、GFP をラベルした

α -tubulin を発現させ、生きた培養細胞が、核溝や核内封入体を形成する過程での tubulin の動態を倒立型蛍光顕微鏡にて観察する。

細胞の準備(遺伝子導入時に細胞密度が 80% になるよう調整)。

融合蛋白発現ベクターの作成: Gaytewa system (Invitrogen) を用いて、GFP 発現ベクターの MCS α -tubulin DNA を挿入する。

培養細胞ヘリポフェクション法 (Superfect Transfection Reagent (QIAGEN)) を用いて遺伝子導入を行う。

4) 核溝・核内封入体形成培養細胞に対して、細胞骨格として α - β -tubulin、 γ -tubulin、keratin、actin を、核膜蛋白として emerin、LAP2、BAF (barrier-to-autointegration factor) を、多重蛍光免疫染色し、個々の発現あるいは相互作用を解析する。多重蛍光免疫染色に際しては、Zenon 法を用いる。Zenon 法では 3 重染色が限度であるが、改良し 4 重蛍光染色を行う。これにより、複数の細胞骨格や核膜蛋白の発現を同一細胞で観察することが可能であり、相互作用の研究に適している。

5) 核溝・核内封入体形成培養細胞に対して、Emerin 等の核膜蛋白を siRNA を用いて、発現抑制し、核溝・核内封入体形成がどのように変化するかを観察する。siRNA に関しては細胞の準備(導入時に細胞密度が 30 ~ 50% になるよう調整)。

siRNA は終濃度 25nM になるように調製する (siRNAs dilution)。

Transfection Reagent の調製 Oligofectamine (Invitrogen)

siRNAs dilution を Transfection Reagent に加え、培養細胞に加える。

40 ~ 45 時間後に観察および固定し、Emerin 等の核膜蛋白の抑制の確認と、核溝・核内封入体の変化を観察する。

B. 臨床検体を用いた臨床病理的研究

1) 手術材料組織標本の作製

出来る限り、細胞が生きている段階での細胞・組織構造を保つため、ヒト甲状腺腫瘍の手術材料から得た組織片を凍結置換法(発表論文: J Histochem Cytochem. 2005) によって固定した後、パラフィン包埋材料とする。

* 凍結置換法による組織固定:

組織小片を -170 に冷やしたイソペントタンとプロパンの混合液中に入れる。

-80 冷却した 2%パラホルム・アセトンで 48 時間固定する。

漸次、温度を上げ、室温にする。

通常の手順で、パラフィン包埋材料とする。

2) 甲状腺癌組織に対して、細胞骨格として α - β -tubulin、 γ -tubulin、keratin、actin を、核膜蛋白として emerin、LAP2、BAF を、多重蛍光免疫染色し、個々の発現あるいは

相互作用を解析する。上述した Zenon 変法を用いことにより、4 重蛍光染色を行う。

3) 画像化および解析

多重染色標本は、蛍光顕微鏡下に視覚化され、高感度白黒 CCD カメラを使って、核膜蛋白あるいは細胞膜蛋白ごとに別々の白黒デジタル画像とされる。さらに、擬似カラー画像とした後、重ね合わせ、1つの画像とする。画像化された核染色体領域を客観的に評価するためのコンピュータソフトを、C 言語を用いて自作・開発する。

4. 研究成果

A. 基礎的研究

1) 甲状腺乳頭癌由来培養細胞(KTC-1)を用いて、従来よりも確実に核溝・核内封入体形成培養細胞を形成する系を確立した。培養細胞における核溝・核内封入体形成には、培養細胞をより密度高く培養することがポイントであった。この結果から、細胞間の接着が細胞骨格を通じて核形態に影響している可能性が示唆された。

2) 甲状腺乳頭癌由来培養細胞(KTC-1)をコラーゲン・ゲル培地に 3 次元培養することによって、濾胞を形成する培養系の確立を試みたが、濾胞形成には至らなかった。

3) 核溝・核内封入体形成培養細胞に対して、GFP をラベルした α -tubulin を発現させ、生きた培養細胞が、核溝や核内封入体を形成する過程での tubulin の動態を倒立型蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、間期を通じて、細胞の動きに関わらず、 γ -tubulin が存在する α -tubulin の密集部は常に核溝形成部位に近接していた。

4) 核溝・核内封入体形成培養細胞に対して、細胞骨格として α / β -tubulin、keratin、actin を、核膜蛋白として emerin、LAP2、BA

F (barrier-to-autointegration factor) を多重蛍光免疫染色した。keratin や actin は核溝形成部位の核膜蛋白との結合性は伺えなかった。一方、 α / β -tubulin は核溝形成部位の核膜蛋白の結合が示唆された。

5) 核溝・核内封入体形成培養細胞に対して、Emerin 等の核膜蛋白を siRNA を用いて、発現抑制し、核溝・核内封入体形成がどのように変化するかを観察した結果、核膜蛋白の中で、Emerin の抑制が核溝・核内封入体の形成を抑制した。よって、KTC-1 の培養細胞では、核溝や核内封入体の形成に、 γ -tubulin - α / β tubulin - Emerin の接合性が関係することが示唆された。

B. 臨床検体を用いた臨床病理的研究

1) 凍結置換法によって手術材料組織標本作製した結果、自家蛍光がほとんどなく、かつ免疫組織化学や FISH 法に極め良好が標本の作製が可能となった。

2) ヒト甲状腺癌組織において、細胞骨格として α - β -tubulin および γ -tubulin を多重蛍光免疫染色し、個々の発現あるいは相互作用

用を解析した結果、 α/β tubulin は、細胞質内にびまん性に染色され、線維構造を観察することが出来なかった。一方、 γ -tubulin は核膜からやや離れた細胞質内に以下のごとく1つのドット(点)構造物として観察することができた。

正常濾胞では管腔側細胞膜に近接する細胞質内に γ -tubulin の発現を認めた。

コロイドを含まない小型濾胞においても同様の γ -tubulin の所見を認めた。

濾胞腺腫や濾胞癌では正常濾胞と同様の γ -tubulin の所見を示した。

乳頭癌では、 γ -tubulin は管腔側に発現するものの、基底側や側方に発現する細胞が混在した。

低分化な乳頭癌では、 γ -tubulin は不規則に発現したり、あるいは発現しない細胞が増加した。

乳頭癌組織から得た単離細胞の一部には核内封入体内に γ -tubulin を認めた。

3) 甲状腺乳頭癌組織に対して、核膜蛋白として emerin、LAP2、BAF を、多重蛍光免疫染色し、個々の発現あるいは相互作用を解析した結果、Emerin、Lamina-associated polypeptide 2 (LAP2)、Barrier-to-autointegration factor (BAF)の核膜上での不均等発現や一部の細胞で発現の消失が認められた。

4) 画像化および解析

画像化された核染色体領域を客観的に評価するためのコンピュータソフトを、C言語を用いて自作・開発した。その結果、核膜上で核膜蛋白の不均等発現を定量的に解析することが可能となった。

以上の結果を総括すると、甲状腺乳頭癌における核溝や核内封入体といった特異的核異型の形成、および濾胞構造や乳頭状構造の形成、言い換えると細胞核極性の形成に α/β -および γ -tubulin が大きく関わっていることを示す。 γ -tubulin は pericentrin と共存することから、間期細胞における non-centrosomal MTOC (microtubule organizing center)に相当すると考えられる。non-centrosomal MTOC の機能は不明な点が多いが、MTOC から放射状に広がる α/β -tubulin が核膜蛋白と結合し、linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex を形成し、核形態の変化や核極性の形成に関わると推定される。

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](計17件)

- 1) Shuto M, Warigaya K, Watanabe H, Shimizu M, Fukuda T, Murata S. : Correlation analysis of nuclear morphology, cytokeratin and Ki-67 expression of urothelial carcinoma cells. Pathol Int. 査読有, 63(6):311-7 2013.
- 2) Watanabe S, Naganuma H, Shimizu M,

Ota S, Murata S, Nihei N, Matsushima J, Mikami S, Kuroda N, Nagashima Y, Nakatani Y. : Adult nephroblastoma with predominant epithelial component: a differential diagnostic candidate of papillary renal cell carcinoma and metanephric adenoma-report of three cases. Case Rep Pathol. 査読有, doi: 10.1155/2013/675875. Epub 2013.

- 3) Nakahira M, Saito N, Murata SI, Sugasawa M, Shimamura Y, Morita K, Takajyo F, Omura G, Matsumura S: Quantitative diffusion-weighted magnetic resonance imaging as a powerful adjunct to fine needle aspiration cytology for assessment of thyroid nodules. Am J Otolaryngol 査読有, 45:25-33. 2012.
- 4) Shuto M, Seyama A, Gotoh Y, Kamada K, Nakamura M, Warigaya K, Watanabe H, Ueno M, Shimizu M, Fukuda T, Murata S: Significant Correlation between Chromosomal Aberration and Nuclear Morphology in Urothelial Carcinoma. Acta Histochem Cytochem 査読有, 45:25-33 2012.
- 5) Kawasaki T, Kondo T, Nakazawa T, Mochizuki K, Yamane T, Murata S, Inoue S, Tsunoda H, Katoh R: Is CD56 a specific and reliable neuroendocrine marker for discriminating between endocrine/neuroendocrine ductal carcinoma in situ and intraductal papilloma of the breast? Pathol Int 査読有, 61:49-51 2011.
- 6) Shimamura Y, Abe T, Nakahira M, Yoda T, Murata S, Sugasawa M: Immunohistochemical analysis of oral dysplasia: diagnostic assessment by fascin and podoplanin expression. Acta Histochem Cytochem 査読有, 44:239-245 2011.
- 7) Uehara K, Yasuda M, Ichimura T, Yamaguchi H, Nagata K, Kayano H, Sasaki A, Murata S, Shimizu M: Peritoneal keratin granuloma associated with endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus. Diagn Pathol 査読有, 6:104 2011.
- 8) 清水 道生, 村田 晋二. 知っている役立つ泌尿器病. 臨床泌尿器科 68(5) 査読無, 283-286 2014.
- 9) 村田 晋二, 松崎生笛, 割栢健史. : 病理診断におけるクロマチン構造の意義. 和歌山医学. 査読無, 64(1) 2-6. 2013
- 10) 村田 晋二, 松崎生笛, 割栢健史. : 改訂された腎盂・尿管・膀胱癌取扱い規約と細胞診. 日本臨床細胞学会九州連合会雑誌. 査読無, 44:13-20. 2013.
- 11) 望野 唯明, 清水 禎彦, 村田 晋二, 安田 政実, 茅野 秀一, 佐々木 惇, 清水 道生: 肺の末梢領域に発生した扁平上皮腺上皮性混合型乳頭腫2例の細胞像. 日本臨床細胞学会雑誌 査読有, 52(5) : 466-472, 2013.

- 12) 政岡 秀彦, 佐々木 惇, 村田 晋一, 安田 政実, 清水 道生: 尿細胞診中に出現した前立腺導管腺癌の1例, 日本臨床細胞学会雑誌 査読有, 52(3): 273-274, 2013.
- 13) 割栢健史, 村田晋一: 尿路上皮癌の病理学的予後因子. 病理と臨床 査読無, 30(10) 1061-1066. 2012
- 14) 上原 慶一郎, 市村 隆也, 金 玲, 新井 栄一, 村田 晋一, 安田 政実, 佐々木 惇, 清水 道生: 色素性類上皮黒色腫 (pigmented epithelioid melanocytoma) の1症例, 診断病理 査読有, 29(2): 105-107, 2012.
- 15) 森村 敏哉, 林 信一, 米川 浩伸, 大野 康治, 里見 昭, 森野 正明, 村田 晋一, 佐竹 亮介, 谷水 長丸, 池袋 賢一: Alport-leiomyomatosis 症候群の1小児例, 日本小児外科学会雑誌 査読有, 48(1): 43-49, 2012.
- 16) 村田 晋一. 甲状腺細胞診に際して知っておくべき甲状腺疾患の病理形態像. 日本臨床細胞学会埼玉県支部会誌 査読無, 3: 57-60, 2012.
- 17) 渡谷 岳行, 西 直子, 小澤 栄人, 水越 和歌, 小山 勇, 村田 晋一, 松尾 有香, 岡田 吉隆: 遺伝子異常との関連が推測される後腹膜類上皮血管筋脂肪腫の1例, 臨床放射線 査読有, 56(12): 1726-1731, 2011

〔学会発表〕(計15件)

- 1) 村田晋一, 松崎 生笛, 割栢 健史. 尿細胞診にあたって知っておきたい病理組織像と細胞像. 和歌山市 2013. 1. 20.
- 2) 村田晋一, 松崎 生笛, 割栢 健史. 甲状腺細胞診のためのパターンの細胞診断. 大阪市 2013. 1. 26.
- 3) 村田晋一, 周東 真代. 尿路上皮癌における染色体・遺伝子異常と細胞核異型の関係. 東京都. 2013. 6. 2.
- 4) 村田晋一, 松崎 生笛, 割栢 健史. 低異型度尿路上皮癌の診断と鑑別. 砺波. 2013. 10. 5.
- 5) 村田 晋一, 松崎 生笛, 割栢 健史. 尿細胞診に際して知っておきたい泌尿器疾患の病理肉眼・組織像. 大阪市. 2013. 11. 2.
- 6) 周東 真代, 瀬山 敦, 後藤 義也, 中村 勝, 鎌田 孝一, 鎌倉 靖夫, 佐々木 直美, 渡辺 宏志, 清水 道生, 村田 晋一. 尿路上皮癌における核極性形成と中心体の関係. 大阪市. 2013. 11. 3.
- 7) 村田晋一, 松崎 生笛, 割栢 健史. 改訂癌取り扱い規約に基づいた膀胱癌の病理診断の実際. 沖縄市. 2013. 11. 29.
- 8) 村田晋一. 改訂された腎盂・尿管・膀胱癌取り扱い規約と細胞診. 大阪市. 2012.

4. 7.

- 9) 村田晋一. 筋層非浸潤性膀胱癌の病理. 千葉市. 2012. 6.
- 10) 村田 晋一, 松崎 生笛, 割栢 健史. 改訂された腎盂・尿管・膀胱癌取り扱い規約と細胞診. 熊本市. 2012. 9. 1.
- 11) 村田晋一. 甲状腺細胞診に際して知っておくべき甲状腺疾患の病理形態像. 甲府市. 2012. 10. 22.
- 12) 周東 真代, 村田 晋一, 瀬山 敦, 後藤 義也, 中村 勝, 鎌倉 靖夫, 鎌田 孝一, 清水 道生, 渡辺 宏志, 福田 利夫. 尿路上皮癌細胞におけるサイトケラチン発現と核形態および細胞増殖能の解析. 新潟市. 2012. 11. 9.
- 13) 村田晋一, 松崎 生笛, 割栢 健史. 平坦状尿路上皮癌の病理. 堺市. 2012. 12. 15
- 14) 村田晋一. 新しい腎盂・尿管・膀胱癌取り扱い規約と尿細胞診. 日本臨床細胞学会石川県支部総会. 金沢. 2011. 1. 30.
- 15) 村田晋一. 新しい腎盂・尿管・膀胱癌取り扱い規約 - 病理の立場から -. 泌尿器病理勉強会. 東京. 2011. 1. 23.

〔図書〕(計6件)

- 1) 村田晋一: 病理標本の取扱い方, 都築豊徳, 森永正二郎 (編): 腫瘍病理鑑別診断アトラス 腎盂尿管膀胱癌. 東京, 文光堂, 29-34, 2012.
- 2) 村田晋一: 非浸潤性平坦状尿路上皮腫瘍, 都築豊徳, 森永正二郎 (編): 腫瘍病理鑑別診断アトラス 腎盂尿管膀胱癌. 東京, 文光堂, 36-41, 2012.
- 3) 村田晋一: 病理診断報告書の記載, 都築豊徳, 森永正二郎 (編): 腫瘍病理鑑別診断アトラス 腎盂尿管膀胱癌. 東京, 文光堂, 211-222, 2012.
- 4) 村田晋一: 病理診断報告書の記載, in 坂本 穆彦, 廣川 満良 (編): 腫瘍病理鑑別診断アトラス 甲状腺癌. 東京, 文光堂, pp 243, 2011.
- 5) 瀬山敦, 村田晋一: DNA-FISH 法 ~ プロトタイプ作製から染色, 応用まで ~: 組織細胞化学 2011. 東京, 日本組織細胞化学会, p 83-92, 2011.
- 6) 日本泌尿器学会・日本病理学会: 腎盂・尿管・膀胱癌取り扱い規約: 第1版. 東京, 金原出版, 2011.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)
取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 晋一 (MURATA SHIN-ICHI)

研究者番号：20229991

(2)研究分担者 (3)連携研究者
なし