

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591357

研究課題名(和文) 甲状腺癌幹細胞の高精度新規マーカー群の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of novel markers for thyroid cancer stem cells

研究代表者

光武 範史 (MITSUTAKE, Norisato)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：50404215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 癌幹細胞は、癌細胞の中でも癌の根本的な原因であり、癌の再発や転移にも深く関わっているとされている。今回、多数の培養甲状腺癌細胞株と腫瘍形成能力を検討できる実験系を用い、これまでに他の種類の固形癌で報告のある癌幹細胞マーカーを候補とし、甲状腺癌における幹細胞マーカーの同定を試みた。その結果、細胞におけるアセトアルデヒド脱水素酵素の活性が最も有力な候補であることが明らかになったが、同時に、細胞の種類によってはCD326やCD44もマーカーとなることが示唆された。このことは、甲状腺癌においては、普遍的なマーカーはなく、癌のタイプや症例によってマーカーが異なっている可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)： Cancer stem-like cells (CSCs) play important roles in cancer initiation, recurrence, and metastasis. In the present study, we conducted a comprehensive search for thyroid CSC markers. Expression of cell surface markers and ALDH activity, which are CSC markers in various solid cancers, and the ability to form spheres in vitro as an indicator of tumor-initiating ability were investigated using thyroid cancer cell lines. As a result, ALDH activity seems to be a major candidate marker for thyroid CSCs but not universal. Other markers such as CD326 and CD44 may be important depending on individual cases.

研究分野：内分泌腫瘍学

キーワード：甲状腺 癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌には、予後良好な分化癌と極めて悪性度が高い未分化癌が存在する。分化癌の治療成績は、手術療法と放射性ヨードによる放射線治療により概ね良好であるものの、10-15%に再発が見られ、さらにその1/4は遠隔転移を来すとされている。また、そのような分化癌からの未分化転化も無視できない。未分化癌は急速に進行し、治癒例はほとんど無い。これらの症例に対しては、未だ有効な治療法が確立されていないのが現状である。甲状腺癌の症例数自体は年々増加してきており、上記の治療困難な症例に対する新たな戦略のためにも、甲状腺癌の「癌幹細胞」についての研究を推し進める必要がある。

現在までのところ、種々の癌幹細胞マーカーが同定・報告されてきた。しかしながら、これらのマーカーは、癌幹細胞だけを特異的・排他的に認識できる訳ではなく、「相対的に濃縮」するものがほとんどである。さらに同じ種類の腫瘍であっても、異なったマーカーが報告されることもしばしばである。このような場合、それぞれのマーカーの相関は調べられていない。つまり、それらマーカーを同時に使用し、より厳密に分離・同定を試みた報告はほとんど無い。

甲状腺癌の癌幹細胞の分野に関しては、研究代表者らが、Side population 法というフローサイトメトリーを用いた方法を用い、世界で初めて甲状腺癌細胞における癌幹細胞様細胞の存在を報告した (Mitsutake et al. *Endocrinology* 2007 148 1797-803)。しかしながら、この Side population 法でも、癌幹細胞をある程度濃縮できるものの、完全に分離できる方法ではないと考えられた。「比較的濃縮」だけでもある程度の特徴を掴むことができたが、やはり単離された細胞群には無視できないノイズが含まれており、より高精度な分離法を確立する必要性を痛感した。

その後、別のグループが甲状腺癌の癌幹細胞マーカーとして CD133 を報告したが (Friedman et al. *PLoS One* 2008 4 e5395)、このとき使用された細胞株が実は大腸癌細胞株のコンタミネーションであることが発表され (Schweppe et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 93 4331-41) 甲状腺癌の結果であるとは言えない状況となってしまった。よって今までのところ、甲状腺癌の分野では、他の腫瘍よりも癌幹細胞の研究は大きく遅れ、その第一歩として必須の癌幹細胞マーカーさえ同定されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、甲状腺癌の癌幹細胞マーカーを同定して癌幹細胞を単離し、それらの機能を解析することである。ただし、従来までの単発のマーカー検索や、機能解析を伴わ

ないマーカーの発現だけを見るような研究とは一線を画し、これまで報告されている固形癌の癌幹細胞マーカーを対象とした網羅的なスクリーニングを行い、甲状腺癌における最適な癌幹細胞マーカー、またはその組み合わせを同定する。

## 3. 研究の方法

研究代表者らが確立したスフィアアッセイ法は、ヌードマウスでの移植実験を高い精度で再現性良く代替できる。つまりこの方法によって、癌細胞の tumor-initiating ability を機能的に調べることが出来る。この方法にフローサイトメトリー法を用いたセルソーティングを組み合わせることによって、多種類の甲状腺癌細胞株を用い、これまで同定・報告された固形癌での癌幹細胞マーカーをほぼすべて網羅する形でスクリーニングを行う。また逆に、形成されたスフィア細胞の検討も行い、すべてを複合的に解析し、新規癌幹細胞マーカー群の同定を行う。

## 4. 研究成果

甲状腺癌研究で頻用されている癌細胞株 FRO、WRO、TPC1、KTC1、KTC2、KTC3、ACT1、8505C を入手し、ヌードマウスでの腫瘍形成能を確認したところ、FRO、KTC3、ACT1、8505C で腫瘍の形成が確認された。マトリゲルを追加してさらに検討したところ、必要な細胞数は少なくなるものの、細胞種に変化はなく、マトリゲルが新たに腫瘍形成能を付与する訳ではないことが示唆された。

次に、現時点で固形癌の癌幹細胞マーカーと言われている表面抗原:CD13、CD24、CD44、CD90、CD133、CD166、CD326、c-kit、SSEA-1 の発現と ALDH1 活性を、すべての細胞株で検討した。マウスでの腫瘍形成能と相関した表面抗原の発現パターンは確認できなかった。

また、すべての細胞株で、特殊な表面処理をした細胞培養プレートと無血清培地を組み合わせたスフィア形成アッセイを、ヌードマウスでの腫瘍形成能と比較検討したところ、非常に高い相関を示すことが分かった。

そこで、腫瘍を形成する細胞株 FRO、KTC3、ACT1、8505C を用い、表面抗原の発現量によって細胞をソートし、それら細胞をそのまま直接上記スフィアアッセイに利用するという実験系を確立した。

セルソーターから直接細胞を低接着培養プレートにソートし、特殊な無血清培地で培養する方法を組み合わせ、甲状腺癌細胞株を用いて癌幹細胞マーカーの検索を行った。その結果、マーカー候補として ALDH1 活性、CD326 を同定したが、ALDH1 活性はいくつかの細胞腫でマーカー候補であること

が確認されたものの、全ての細胞腫における共通のマーカーとはならなかった。また、CD326 は FRO 細胞でのみマーカーとして利用できた。このことは、ALDH1 活性は、甲状腺癌幹細胞の重要なマーカー候補であるものの、他にもマーカーが存在すること、また各症例ごとにマーカーが異なっている可能性を示唆している。甲状腺癌においては、癌幹細胞をターゲットとした治療を考える場合、腫瘍ごとに対応を変える必要があるのかもしれない。今後は、臨床検体を用いた詳細な研究の継続が必要であると考えられた。

また、ヌードマウスに細胞株で作らせた腫瘍、さらにスフェロイド培養にて作らせたスフィアから細胞を調製し、マーカー発現の変化をフローサイトメトリーで確認したところ、通常の接着培養系と比較し、両者には高い類似性が見られた。このことは、スフェロイド培養法は、より生体内での腫瘍の状態を反映していることが示唆された。ただし同時に、スフェロイド培養法では、癌幹細胞をそのままの状態で分裂増殖させているとは考えにくく、その状態へヘテロな細胞集団を生み出している可能性も考えられた。

これまで固形癌で同定されている癌幹細胞マーカーによって細胞を染色し、セルソーターで細胞を分取後、細胞の機能解析を行った。まず FRO 細胞においては、ALDH 活性、CD326 発現の両方がマーカー候補として挙げられたため、両マーカーに対する同時染色を行い、より細かい細胞分画のスフィア形成能を検討した。その結果、FRO 細胞においては、CD326 の方が非癌幹細胞をより厳密に除外できる精度の高いマーカーであることが示唆された。しかし濃縮するという目的では、両マーカーを併用しても残念ながらあまり効果の上昇は見られなかった。

次に、癌幹細胞の特性の一つとされている細胞分取後のそれぞれの分画における細胞自己複製能、分化能を検証した。こちらは、分取後は通常の接着培養にてしばらく細胞を培養後、再びフローサイトメトリーによるマーカーの発現を検討した。予想通り、癌幹細胞が濃縮された分画からは自己複製能、分化能を示す細胞が確認されたが、逆に癌幹細胞をあまり含んでいない分画からも癌幹細胞マーカーを発現する細胞が出現し、非常に複雑な結果となった。これは、未だ癌幹細胞マーカーが不確実である、さらには非癌幹細胞から癌幹細胞への転換が起こるといった可能性が考えられた。二つ目の可能性は臨床的にも重要で、癌幹細胞のみをターゲットとする治療では不十分である可能性を示唆する。

さらに細胞分取後、両分画細胞の抗癌剤感受性、放射線感受性も検討したが、明らかな差は認められなかった。

*in vitro* で作らせたスフィア状態の癌細胞は、*in vivo* (生体内)での癌細胞の状態をよりよく反映しているとの結果であり、またこれを支持する論文が出版されていることから、一度 *in vitro* でスフィアを形成させ、そこから細胞を回収し、フローサイトメトリー、セルソーターによる解析を行った。ただし、径が小さいスフィアからの細胞は、ソーティング後にほとんど生着しなかったため、これら径の小さなスフィアを除外し、ある程度の大きさのスフィアを回収後、それを分解して得られる細胞を対象として解析を行った。FRO 細胞において、スフィア状態の細胞では CD44 の発現が出現し、このマーカーに従って細胞を分取したところ、CD44 高発現分画でスフィア形成能が上昇していることが確認された。つまりこのことは、生体内では CD44 も癌幹細胞のマーカー候補となる可能性を示唆している。しかし ALDH 活性での細胞分取と比較したところ、ALDH 活性がよりスフィア形成能を反映しており、スフィア状態の細胞でも ALDH 活性が有力なマーカー候補であることがわかった。

H26 年度にはさらに追加で 12 種類の新たな甲状腺未分化癌細胞株を取得し、ALDH 活性、スフィア形成能を中心にこれまでと同様の解析を行った。これらすべての細胞株で ALDH 活性やスフィア形成能が見られた訳ではなく、解析に使用できたのは数種類であったが、その結果はこれまでの結果を支持するものであった。

以上より、甲状腺癌の癌幹細胞のマーカーとしては、ALDH 活性が有力ではあるが、それ以外にも細胞の種類によっては CD326、CD44 もマーカーとなり得ることが示唆され、マーカーの生物学的な意義を含めたより詳細な解析が必要であると考えられた。

## 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 13 件)すべて査読有り

1. Rogounovitch TI, Bychkov A, Takahashi M, Mitsutake N, Nakashima M, Nikitski AV, Hayashi T, Hirokawa M, Ishigaki K, Shigematsu K, Bogdanova T, Matsuse M, Nishihara E, Minami S, Yamanouchi K, Ito M, Kawaguchi T, Kondo H, Takamura N, Ito Y, Miyauchi A, Matsuda F, Yamashita S, Saenko VA. The common genetic variant rs944289 on chromosome 14q13.3 associates with risk of both malignant and benign thyroid tumors in the Japanese population. *Thyroid*. 2015 Mar;25(3):333-40. doi: 10.1089/thy.2014.0431.

2. Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Yamashita S.

Radiation signatures in childhood thyroid cancers after the Chernobyl accident: possible roles of radiation in carcinogenesis. *Cancer Sci.* 2015 Feb;106(2):127-33. doi: 10.1111/cas.12583.

3. Shimamura M, Nagayama Y, Matsuse M, Yamashita S, Mitsutake N. Analysis of multiple markers for cancer stem-like cells in human thyroid carcinoma cell lines. *Endocr J.* 2014;61(5):481-90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24531915>

4. Orim F, Bychkov A, Shimamura M, Nakashima M, Ito M, Matsuse M, Kurashige T, Suzuki K, Saenko V, Nagayama Y, Yamashita S, Mitsutake N. Thyrotropin signaling confers more aggressive features with higher genomic instability on BRAF(V600E)-induced thyroid tumors in a mouse model. *Thyroid.* 2014 Mar;24(3):502-10. doi: 10.1089/thy.2013.0038.

5. Shimamura M, Nakahara M, Orim F, Kurashige T, Mitsutake N, Nakashima M, Kondo S, Yamada M, Taguchi R, Kimura S, Nagayama Y. Postnatal expression of BRAFV600E does not induce thyroid cancer in mouse models of thyroid papillary carcinoma. *Endocrinology.* 2013 Nov;154(11):4423-30. doi: 10.1210/en.2013-1174.

6. Mussazhanova Z, Matsuda K, Naruke Y, Mitsutake N, Stanojevic B, Rougounovitch T, Saenko V, Suzuki K, Nishihara E, Hirokawa M, Ito M, Nakashima M. Significance of p53-binding protein 1 (53BP1) expression in thyroid papillary microcarcinoma: association with BRAFV600E mutation status. *Histopathology.* 2013 Nov;63(5):726-34. doi: 10.1111/his.12233.

7. Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, Matsuse M, Ibrahimipasic T, Ghossein RA, Fagin JA. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Sep;98(9):E1562-6. doi: 10.1210/jc.2013-2383.

8. Yasui K, Shimamura M, Mitsutake N, Nagayama Y. SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in aldehyde dehydrogenase-negative thyroid cancer cells. *Thyroid.* 2013 Aug;23(8):989-96. doi: 10.1089/thy.2012.0319.

9. Bychkov A, Saenko V, Nakashima M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Nikitski A, Orim F, Yamashita S. Patterns of FOXE1 expression in papillary thyroid carcinoma by

immunohistochemistry. *Thyroid.* 2013 Jul;23(7):817-28. doi: 10.1089/thy.2012.0466.

10. Matsuse M, Mitsutake N, Tanimura S, Ogi T, Nishihara E, Hirokawa M, Fuziwara CS, Saenko VA, Suzuki K, Miyauchi A, Yamashita S. Functional characterization of the novel BRAF complex mutation, BRAF(V600delinsYM), identified in papillary thyroid carcinoma. *Int J Cancer.* 2013 Feb 1;132(3):738-43. doi: 10.1002/ijc.27709.

11. Kim E, Matsuse M, Saenko V, Suzuki K, Ohtsuru A, Mitsutake N, Yamashita S. Imatinib enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation in anaplastic thyroid carcinoma cells. *Thyroid.* 2012 Jul;22(7):717-24. doi: 10.1089/thy.2011.0380.

12. Matsuse M, Sasaki K, Nishihara E, Minami S, Hayashida C, Kondo H, Suzuki K, Saenko V, Yoshiura K, Mitsutake N, Yamashita S. Copy number alteration and uniparental disomy analysis categorizes Japanese papillary thyroid carcinomas into distinct groups. *PLoS One.* 2012;7(4):e36063. doi: 10.1371/journal.pone.0036063.

13. Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Suzuki M, Matsuse M, Ohtsuru A, Kumagai A, Uga T, Yano H, Nagayama Y, Yamashita S. Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction. *PLoS One.* 2011 Apr 27;6(4):e19354. doi: 10.1371/journal.pone.0019354.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Mitsutake N, Genetic alterations in thyroid cancer and their clinical implications, 11th Asia and Oceania Thyroid Association Congress(招待講演), 2014年09月25日~2014年09月28日, Kochi, India

2. 光武範吏, 甲状腺癌幹細胞, 第52回日本臨床細胞学会秋期大会(招待講演), 2013年11月02日~2013年11月03日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

3. Kurashige T, Shimamura M, Mitsutake N, Nagayama Y, Expression of aldehyde dehydrogenase in normal and cancerous tissues of the thyroid, 第72回日本癌学会, 2013年10月03日~2013年10月05日, パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)

4. Shimamura M, Mitsutake N, Nagayama Y, Expression and function of aldehyde dehydrogenase in thyroid cancer, 第72回日本

癌学会, 2013年10月03日~2013年10月05日, パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)

5. 鈴木啓司、光武範吏、山下俊一、甲状腺発がんプロセスに關与する甲状腺生物学, 第72回日本癌学会, 2013年10月03日~2013年10月05日, パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)

6. 光武範吏, 放射線と甲状腺癌, 第30回内分泌代謝学サマーセミナー(招待講演), 2012年07月12日~2012年07月14日, 福一(群馬県・渋川市)

7. 安井和明、嶋村美加、光武範吏、永山雄二、ヒト甲状腺癌における癌幹細胞誘導機序としての上皮間葉移行, 第71回日本癌学会, 2012年09月19日~2012年09月21日, ロイトン札幌(北海道・札幌市)

8. 嶋村美加、光武範吏、永山雄二、甲状腺癌幹細胞単離の試み, 第71回日本癌学会, 2012年09月19日~2012年09月21日, ロイトン札幌(北海道・札幌市)

9. 嶋村美加、永山雄二、山下俊一、光武範吏, 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~2012年12月01日, アクロス福岡(福岡県・福岡市)

10. Mitsutake N, Radiation exposure and thyroid carcinogenesis, Korean Thyroid Association Meeting, 2011/8/19, Deagu, Korea

〔図書〕(計0件)

〔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

<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/drms/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

光武 範吏 (MITSUTAKE, Norisato)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授  
研究者番号: 50404215