

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月6日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651048

研究課題名（和文）三次元培養ヒト甲状腺未分化細胞による定量的放射線発がん系の樹立

研究課題名（英文）Establishment of radiation-carcinogenesis system using cultured thyroid follicular cells.

研究代表者

鈴木 啓司 (SUZUKI KEIJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00196809

研究成果の概要（和文）：

ヒト甲状腺組織より得られた甲状腺濾胞細胞を長期間培養して得られた無限増殖化細胞を用いて、放射線被ばくによる定量的発がん系の確立をめざした。無限増殖化細胞は、Pax8 の発現は認められるものの、幹細胞のマーカーは発現していなかった。放射線照射後、生存細胞を高密度で維持し、過増殖してくる細胞をフォーカスとして検出したところ、線量依存的なフォーカス数の増加は認められたものの、フォーカス由来細胞には悪性形質は認められず、がん細胞への転換には、さらに別のステップが必要である事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have isolated an immortalized cells derived from human thyroid follicles. These cells transcribe the PAX-8 gene but do not express any stem cell marker. After gamma-irradiation, cells were maintained at confluence to check focus formation. We observed dose-dependent foci formation, however, foci-derived cells lack transformed phenotypes, indicating that malignant conversion still requires additional genetic alterations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科、細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線、がん、甲状腺

## 1. 研究開始当初の背景

放射線が晩発影響として癌を引き起こすことは広く知られた事実であるが、ヒト上皮系組織の発がんについては、関連する分子機構はほとんど解明されないまま現在に至っている。昨今、バイスタンダー効果等の非標的効果が、とりわけ低線量放射線のリスクを考えるうえで、どのような意味を持つか激しい議論がかわされているが、これらの議論は、ヒト放射線発がんの分子機構の理解の上でなされなければ全くのナンセンスなものになってしまう。特に、放射線によって直接誘

導されたゲノム変異が、組織幹細胞において生じ、その変異が最終的には放射線発がん細胞の出現につながるという、現在の LNT 仮説の基本になっている考え方は、実際のところ化学発がんでは証明されたとされているものの、放射線発がんではその従来のモデルを適用していいのかわかどうかわかええ検討されていないのが現状である。

応募者は、広く知られた放射線発がんの標的器官である正常ヒト甲状腺に、いわゆる幹細胞が存在するか調べていく過程で、偶然にも、極めて未分化で増殖性の高い細胞が存在

することを見だし、この細胞をクローン化することに成功した。そこで、ヒト甲状腺組織では初めての、生体を模した試験管内発がん系が樹立できると考えるに至り、本研究の全体構想を計画した。特に、クローン化した甲状腺細胞が、発がん実験に応用可能なかどうかを検証するこの壮大な挑戦は、放射線発がん研究の新しい地平を切り開くものとして注目される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 甲状腺未分化細胞の性格付けのため、幹細胞ならびに組織特異的マーカーの発現、テロメラーゼ活性の発現、染色体構成、および分化形質の誘導を解析することである。また、甲状腺は、生体内で三次元的な濾泡から構成されることから、2) スフェロイド培養法を応用することにより、三次元的な細胞集塊として長期間その生理活性を保持する方法を確立し、3) 放射線照射後に一定期間の培養を行った後に、二次元培養において、がん化した細胞を定量的に解析する方法を確立する。がん化細胞の特定には、形成させたコロニーの形態で評価する方法と、単層状に成長させた細胞シート上でのフォーカス形成を評価する方法の2種類を検討する。これらの検討により、ヒト甲状腺における放射線発がんのモデル系が確立できることを証明しようとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 甲状腺未分化細胞の性格付け

クローン化された甲状腺未分化細胞は、正常ヒト甲状腺組織を長期間培養することにより得られた細胞である。そこで、得られた細胞が甲状腺由来であるかどうか、また、幹細胞としての性質を有しているか確認する必要がある。このため、蛍光免疫法により、幹細胞ならびに組織特異的マーカーの発現を確認した。幹細胞のマーカーとしては、CD34、Oct4、ABCG2 を、組織特異的マーカーとしては、甲状腺特異的に発現が認められる Thyroglobulin (TG)、Thyrotrophin receptor (TSHR)、Thyropoxidase (TPO) および甲状腺特異的転写因子である Pax8 について検討した。

クローン化された甲状腺未分化細胞が正常ヒト細胞の核型を有しているかを確認するため、コルセミド (0.1  $\mu$ g/ml) 処理により分裂中期細胞を集積させて回収後、低張処理およびカルノー液による固定を施して染色体標本を調整し、ギムザ分染法により染色体核型の解析を行った。

甲状腺細胞は、甲状腺刺激ホルモン (TSH) に反応して分化し、甲状腺ホルモンを分泌するようになる。そこで、クローン化した甲状腺未分化細胞が、TSH に応答して分化する細

胞であることを確認した。具体的には、甲状腺未分化細胞を、高密度二次元培養法、あるいは次項で確立する三次元培養法により数ヶ月間維持し、この間 TSH (10 mU/ml) を持続投与して、分化形質の発現誘導を確認した。分化形質発現は、TG 陽性のコロイド形成あるいは濾泡形成を指標とした。

### (2) 定量的放射線発がん実験系の確立

定量的放射線発がん実験系を確立するためには、がん化した細胞を客観的に定量的な指標が必要である。げっ歯類細胞を用いて確立された試験管内発がん系では、形成されるコロニーの形態変化を指標にする方法、あるいは単層状に増殖した細胞シート上でのフォーカス形成を指標にする方法が用いられてきた。これらは、がん細胞に共通した特徴である規則的細胞増殖秩序からの逸脱や細胞接触による細胞増殖抑制能の消失を評価するものであるが、チェルノブリ発電所事故後に誘発された小児甲状腺乳頭癌に由来する細胞株でも、これらの発がん形質が確認されることから、形態変化コロニーの出現とフォーカス形成の二つの指標について、放射線による甲状腺細胞のがん化の定量化にも応用できることを検証した。

具体的には、発現時間を経た甲状腺スフェロイドをアキュターゼ処理により単個細胞に分離した後、100mm 直径の培養ディッシュに、約 100 個のコロニーが形成されるように細胞を播種し、二週間培養した後にコロニーを 3%ギムザ液で染色し、コロニー形態変化を示すコロニー数を計測した。また、100mm 直径の培養ディッシュに、 $10^4$  個程度の細胞を播種し、一週間培養した後に細胞がコンフルエントになるようにし、その後、さらに四週間まで、培地交換だけを繰り返して培養を継続し、その後 3%ギムザ液で細胞を染色し、単層の正常細胞の上に形成されたフォーカス数を計測した。

## 4. 研究成果

### (1) 甲状腺未分化細胞の性格付け

クローン化された甲状腺未分化細胞は、正常ヒト甲状腺組織を長期間培養することにより得られた細胞である。そこで、得られた細胞が幹細胞としての性質を有しているかを、幹細胞のマーカーである CD34、Oct4、ABCG2 において検討した。その結果、甲状腺未分化細胞は、いずれの幹細胞マーカーも発現していないことが明らかになった。一方、甲状腺濾泡細胞はもともと甲状腺特異的に発現が認められる TG、TSHR あるいは TPO を発現していることから、これらの発現について検討したところ、いずれの分化マーカーも発現していない事もわかった。唯一、甲状腺組織にコミットする段階で最初に発現する Pax8 は発現が認められ、甲状腺未分化細胞は、

ES 細胞のような高度に未分化な細胞ではなく、また甲状腺濾胞細胞に由来する事が明らかになった。

クローン化された甲状腺未分化細胞が正常ヒト細胞の核型を有しているか確認するため、分裂中期細胞を集積させてギムザ分染法により染色体核型の解析を行った。その結果、染色体数は 43 本を中央値に持つ分布を示す事がわかり、何らかの染色体異常が生じている事が明らかになった。

さらに、甲状腺細胞は、甲状腺刺激ホルモン (TSH) に反応して分化し、甲状腺ホルモンを分泌するようになる。そこで、クローン化した甲状腺未分化細胞が、TSH に応答して分化する能力を有しているかどうか確認するため、甲状腺未分化細胞を、高密度二次元培養法、あるいは三次元培養法により数ヶ月間維持し、この間 TSH (10 mU/ml) を持続投与して、分化形質の発現誘導を確認した。生体内では、甲状腺組織は三次元的な濾胞の集合体として観察されることから、三次元培養は撥水性処理を施した培養ディッシュに細胞を播種し、細胞同士の接着によりスフェロイドを形成させた。形成された三次元的な濾胞様甲状腺スフェロイドを、長期間維持する事により細胞増殖と分化形質発現を検証した。その結果、いずれの培養法においても、細胞そのものは長期間維持できたが、甲状腺細胞の分化マーカーである TG の発現はほとんど確認されず、甲状腺機能細胞への分化には、他の条件が必要である事が示唆された。

## (2) 定量的放射線発がん実験系の確立

放射線照射後に、一定の発現時間を経た甲状腺スフェロイドをアキュターゼ処理により単個細胞に分離した後、100mm 直径の培養ディッシュに、約 100 個のコロニーが形成されるように細胞を播種した。あるいは、100mm 直径の培養ディッシュに、 $10^4$  個程度の細胞を播種し、一週間培養した後に細胞がコンフルエントになるようにし、その後、さらに四週間まで、培地交換だけを繰り返して培養を継続した。前者は、コロニー形態変化で細胞がん化を評価する手法、後者は、かつて Ha-ras 等の発がん遺伝子をクローン化する時に使われたフォーカス形成法である。

まず、形成されたコロニーを 3%ギムザ液で細胞を染色し、辺縁の不規則なコロニーの出現を観察したが、該当するようなコロニーは見つからず、少なくとも、1 Gy あたり  $10^{-4}$  の頻度で起こる可能性のある細胞がん化は認められなかった。そこで次に、単層の正常細胞の上に形成されるフォーカス数を計測したところ、高密度で静止状態にある細胞の上に、過増殖してくる細胞をフォーカスとして検出した。これらのフォーカスは、その数が線量依存的に増加する傾向が認められた

ため、放射線により誘導された減少であると結論づけた。ヒトにおける甲状腺がんでは、特に成人の甲状腺乳頭がんの場合、B-RAF の V600E が変異がよく知られている。、B-raf<sup>V600E</sup> 変異は、細胞増殖に直接関係する MAP キナーゼ経路のメンバーの 1 つである、c-RAF のファミリーである。特に甲状腺やメラノサイトで発現している事が知られているが、B-raf<sup>V600E</sup> 変異を起こすと、本来、上流からの情報を受けてなる活性型に恒常的になった状態になり、このため、MAP キナーゼ経路が常時活性化された状態になってしまう。甲状腺がんでは、この変異が必要不可欠であると考えられているため、B-raf<sup>V600E</sup> 変異を甲状腺未分化細胞に導入すると、確かに増殖が亢進した細胞になる。この細胞と、フォーカスから単離して増殖させたフォーカス由来細胞とを比較しても、B-raf<sup>V600E</sup> 変異を持つ細胞と同等の増殖活性は認められなかった。さらに、増殖状態において、非照射細胞との区別はつかず、悪性ながん細胞への転換には至っていないと判断された。フォーカス形成には、細胞接触や細胞増殖の変化が必要であるため、少なくとも発がんに関連する変化が放射線によって起こったと考えられるが、がん細胞として成立するためには、さらに別のステップが必要である事が示唆された。

## 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 2 件)

- (1) Suzuki K, Yamashita S. Low-dose Radiation Exposure and Carcinogenesis. Jpn J Clin Oncol, 査読有, 42, 2012, 563-568.
- (2) 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, 査読有, 6, 2011, e19354.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Keiji Suzuki, Molecular mechanism of radiation-induced thyroid cancer. Sugahara Memorial International Symposium, 1月25日-26日, Kyoto.
- ② 鈴木啓司, 山下俊一, DNA 損傷応答と放射線発がんメカニズム, 日本薬学会フォーラム 2012, 10月25日-26日, 名古屋

[図書] (計 2 件)

(1) 鈴木啓司、羊土社、分裂死・mitotic catastrophe、2012、186-193

(2) 鈴木啓司、羊土社、がん生物学、2012、68-72

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 啓司 (SUZUKI KEIJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
准教授

研究者番号：00196809

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし