

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 4 月 18 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：23659478

研究課題名（和文） 甲状腺癌における癌-間質微小環境相互作用と癌幹細胞に関する研究

研究課題名（英文） Cancer stem cells and cancer microenvironment in thyroid cancer

研究代表者

安井 和明 (YASUI KAZUAKI)

長崎大学・大学病院・医員

研究者番号：30594064

研究成果の概要（和文）：癌転移は多段階の過程を経て行われるが、その過程の中で上皮間葉移行（EMT）が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。また、EMT が誘導された癌細胞は癌幹細胞（CSC）の性質を獲得するとの報告がある。甲状腺癌では、ALDH が癌幹細胞のマーカーとして知られているが、本研究により、EMT が誘導されることにより ALDH 陰性の甲状腺癌細胞が癌幹細胞の性質を獲得することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) has been thought to play a critical role in invasion and metastasis of cancer and to be associated with cancer stem cell (CSC) properties. The most reliable marker for thyroid CSCs so far identified appears to be aldehyde dehydrogenase (ALDH). Our results show that EMT seems to be associated with CSC properties in ALDH-negative human thyroid cancer cells.

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	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：甲状腺癌、癌幹細胞、微小環境

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌細胞の転移・浸潤には、上皮系細胞が間葉系細胞の形質を獲得する、上皮間葉移行（EMT：epithelial-to-mesenchymal transition）が重要であることが明らかにされてきた。EMT を誘導する因子として、様々なサイトカインや転写因子が同定されており、サイトカインでは TGF- β が最もよく知られている。TGF- β は多くの機能をもち、腫瘍の初期段階においては腫瘍抑制に働き、後期段階においては腫瘍の浸潤を促進するといわれている。また、TGF- β は単独、または Ras や Wnt シグナルと共同で EMT を誘導するとされる。

また、EMT を誘導する転写因子としては、

SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB1, ZEB2 などの転写因子が知られており、その中で、SNAIL は、放射線誘発性甲状腺癌の発達を促進することや、甲状腺癌の浸潤部に発現していることなどが知られている（Am J Pathol. 171:1037, 2007）。

(2) 近年、EMT を誘導された癌細胞が癌幹細胞の性質を獲得することが報告されている（Cell. 133:704, 2008）。癌幹細胞は自己複製能と多分化能をもち、癌の発生・維持に重要な役割を果たしていると考えられている。甲状腺癌においては、SP, CD133, aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性などによって癌幹細胞を分離することが試みられており、その中で、ALDH が現在のところ、最も有望な癌幹

細胞のマーカーと考えられている (Cancer Res. 70:8874, 2010)。

(3) 甲状腺癌の分化癌と未分化癌が同時に存在する標本において、未分化癌の部分で神経幹細胞のマーカーである nestin と EMT の指標の1つである E カドヘリンの消失を認めたとの報告が 1 編あるが (Int J Clin Exp Pathol. 3:755, 2010)、それ以外には nestin を甲状腺癌幹細胞のマーカーとする報告はなく、甲状腺癌における EMT と癌幹細胞の関係はよく分かっていない。

2. 研究の目的

甲状腺癌においても、TGF- β や SNAIL で EMT が誘導されることで癌幹細胞の形質を獲得する可能性がある。そこで、甲状腺癌における EMT 誘導と癌幹細胞の関連を調べるために本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 上皮系の形質を保っているヒト甲状腺癌細胞株に①TGF- β を作用させる、②変異 Braf 遺伝子を発現させた後に TGF- β を作用させる、③SNAIL を過剰発現させることによって EMT 誘導を試みた。

EMT 誘導の指標としては、上皮系のマーカーである E-cadherin の消失、間葉系のマーカーである vimentin の発現、敷石状から紡錘状の形態変化、遊走能の上昇を用いた。

(2) EMT が誘導された甲状腺癌細胞が癌幹細胞の形質を獲得しているかどうかを確認するために、*in vitro* では細胞増殖、抗癌剤への感受性、sphere 形成能、癌幹細胞マーカーについて検討し、*in vivo* では腫瘍形成能について検討した。

4. 研究成果

(1) 甲状腺癌細胞株である ACT-1、FRO、TPC1、KTC-2、KTC-3 がどのような形質を有しているかを検討したところ、ACT-1 のみが上皮系の形質を保持していた (図 1)。

(2) ACT-1 に EMT を誘導するために、①TGF- β を作用させたが、EMT は誘導できなかった。そこで、②ACT-1 に変異 Braf 遺伝子発現後に TGF- β を作用させると、vimentin の軽度発現がみられたものの E-cadherin は細胞間に発現しており、EMT は誘導できなかった。次に、③ SNAIL を過剰発現させたところ

(ACT-SNAIL)、multiplicity of infection (MOI) が 1:3 以上で EMT を誘導することができた (図 2)。

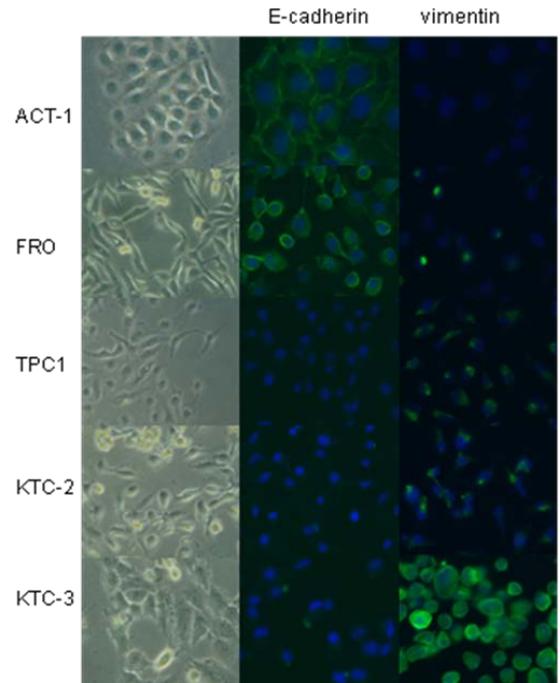


図 1. Morphology and E-cadherin/vimentin expression in five human thyroid cancer cell lines.

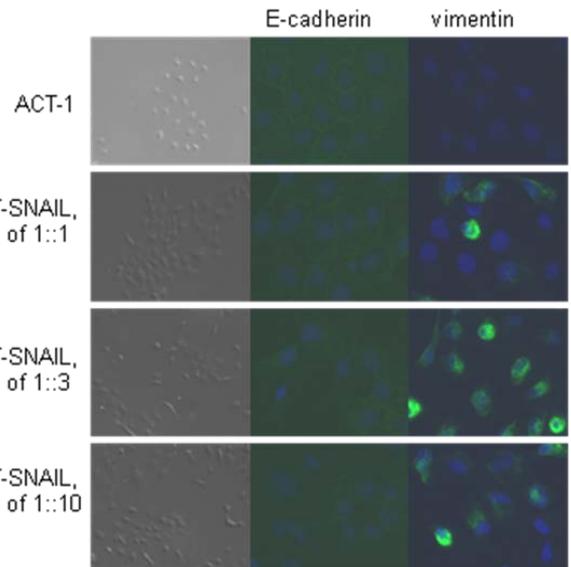


図 2. Induction of EMT by SNAIL.

(3) SNAIL を過剰発現させた ACT-SNAIL と ACT-1 とで癌幹細胞の性質を比較した。まず、細胞増殖については、倍加時間が ACT-1 で 24.2 時間、ACT-SNAIL で 28.5 時間であり ACT-SNAIL のほうが増殖は遅かったが、有意差は認めなかった。次に、抗癌剤の感受性について、5-FU、ドキソルビシンにて検討したが、有意差は認めなかった。

腫瘍形成能を比較するために、sphere 形成能を比較したところ、ACT-SNAIL は ACT-1 に比べて約 3 倍の sphere 形成能を認めたが、データのばらつきが大きかった。次に *in vivo* での腫瘍形成能をみるために、ヌードマウスに ACT-1 と ACT-SNAIL を皮下注射したが、両者に有意差は認めなかった。sphere 形成能での差が小さいために、*in vivo* で両者の差を検出するのができなかったと考えられた(表 1)。

	1x10 ⁴	3x10 ⁴	1x10 ⁵	2.5x10 ⁵
ACT-1	0/9*	5/14	6/9	3/3
ACT-SNAIL	1/9	5/14	9/9	3/3

*, numbers of tumors developed per numbers of tumor cell-injected sites.

表 1. Tumor incidence of ACT-1 and ACT-SNAIL cells injected into nude mice.

ACT-1 では、過去の報告と同様に、甲状腺癌幹細胞のマーカーである ALDH 活性が陽性 (ALDH+) の細胞がより多くの sphere を形成することができた。しかし、ACT-1 と ACT-SNAIL で ALDH 活性を調べたところ、ALDH+ の割合は、ACT-1 で 23.4%、ACT-SNAIL で 5.2% と、ACT-SNAIL で減少していることがわかった(図 3)。そこで、ALDH 陰性 (ALDH-) と陽性の細胞でそれぞれ sphere 形成能を検討したところ、ALDH+ では、ACT-1 と ACT-SNAIL に sphere 形成に差がみられなかったが、ALDH- では、ACT-SNAIL が ACT-1 に比べて約 10 倍 sphere 形成能が上昇し、ACT-SNAIL では、むしろ、ALDH- のほうが ALDH+ よりも sphere 形成能が高かった(図 4)。また、ALDH 陽性細胞と陰性細胞で SNAIL 発現に差は認めなかった(図 5)。

これらのことから、甲状腺癌では、EMT が誘導されることによって ALDH- 細胞が癌幹細胞の性質を獲得すること、また、EMT が誘導された甲状腺癌細胞では ALDH が癌幹細胞のマーカーではなくなることが示唆された。

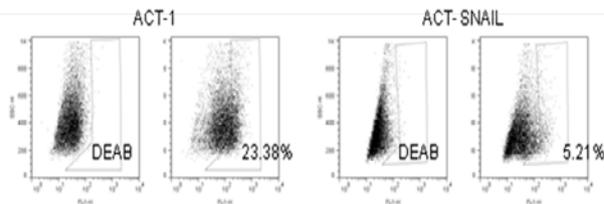


図 3. Comparisons of ALDH activities between ACT-1 and ACT-SNAIL cells.

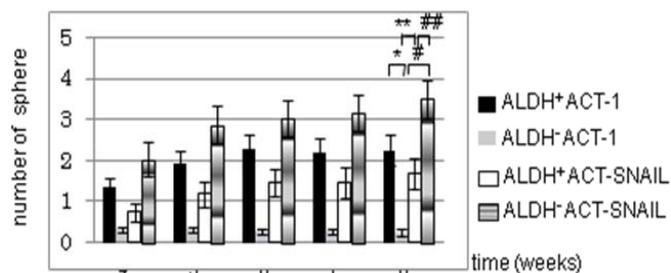


図 4. Sphere formation abilities between ALDH+ vs. ALDH- cells.

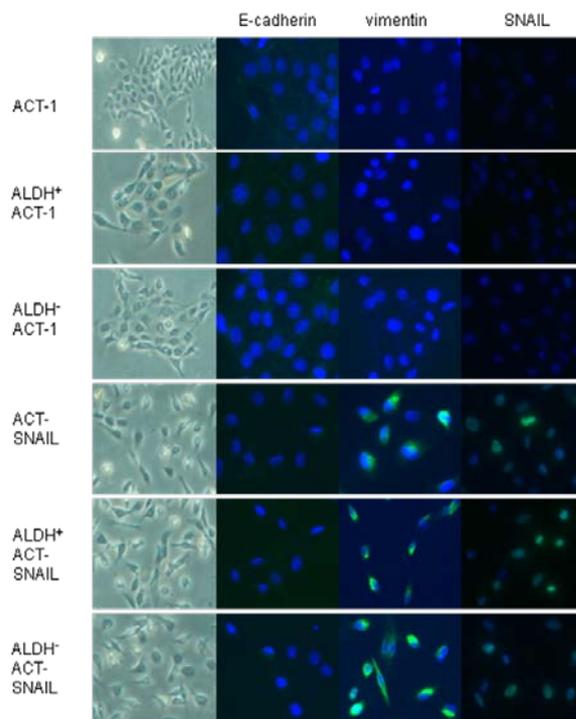


図 5. Morphology and E-cadherin/vimentin/SNAIL expression in ALDH+ and ALDH- cells.

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1件)

1. Kazuaki Yasui, Mika Shimamura, Norisato Mitsutake, and Yuji Nagayama: SNAIL Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell-like Properties in Aldehyde Dehydrogenase-Negative Thyroid Cancer Cells. *Thyroid. in press.* 2013
査読あり。doi:10.1089/thy.2012.0319.

[学会発表] (計1件)

1. 安井和明、嶋村美加、光武範史、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(口頭発表) 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日～21日(札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 和明 (YASUI KAZUAKI)
長崎大学・大学病院・医員
研究者番号：30594064

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

永山 雄二 (NAGAYAMA YUJI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30274632