

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790399

研究課題名(和文)甲状腺発癌過程でSNX蛋白が果たす役割の解明

研究課題名(英文)The functioning role of SNX protein in thyroid carcinogenesis

研究代表者

原 重雄(Hara, Shigeo)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10590648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：正常甲状腺組織の免疫染色では、立方～高円柱状の形状をとる濾胞上皮(活性化濾胞上皮)にSNX2陽性、扁平な濾胞上皮(非活性化濾胞上皮)の多くでSNX2陰性であり、甲状腺機能亢進状態であるバセドウ病、機能性結節症はびまん性にSNX2陽性であった。ラット正常甲状腺濾胞上皮細胞を用いた検討では、甲状腺刺激ホルモン投与により細胞が大型化し、SNX2蛋白の発現が増加することを確認した。甲状腺悪性腫瘍組織(乳頭癌)の免疫染色では、全例でSNX2陽性であった。以上より、SNX2活性は活性化甲状腺濾胞上皮細胞を示唆する新たなマーカーと考えられ、悪性腫瘍においても濾胞上皮の活性化を反映していると示唆された。

研究成果の概要(英文)：In normal thyroid tissue, SNX2 was expressed in columnar thyroid follicular cells that reflect active state of thyrocytes. Most of the flattened thyrocytes, which indicates cells in inactive state, did not show apparent SNX2 immunostaining. Sortilin, which is expressed by active thyrocytes, also exhibited similar distribution in follicular cells. Expression of SNX2 in thyrocytes is particularly marked in most hyperstimulated thyroid disorders, including Graves disease and functioning nodules. In FRTL-5 cells, cells expressed increased amount of SNX2 and sortilin protein when cells were stimulated with thyroid stimulating hormone. Morphometric analysis revealed increased cell size that corresponds to histological findings. Regarding thyroid cancer, SNX2 was diffusely positive for papillary carcinoma. In summary, increased SNX2 expression indicates active thyrocytes, and may reflect increased level of endosomal trafficking in thyroid cancer cells.

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 濾胞上皮 小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

Sorting nexin (SNX) はリン脂質結合部位である phox homology ドメインを共通にもつ細胞内小胞輸送関連蛋白であり、30 種類以上のファミリー分子が知られている。その中でも、SNX1, 2, 5, 6 は早期エンドソームからゴルジ体への輸送に重要な役割を果たしている。本研究代表者は、低分子量 G 蛋白質 Rac の活性化因子である DOCK180 が SNX5 と直接に結合することで、Rac の活性化や Crk の結合とは独立にこの輸送を制御していることを報告し、SNX 分子の新たな小胞輸送制御のメカニズムを明らかにした (Hara S Mol Biol Cell, 2008)。しかし、SNX とヒト疾患の関連はほとんど検討されておらず、大腸癌で SNX1 の発現が低下していることを示した報告があるのみであった (Nguyen LN Clin Cancer Res, 2006)。

2. 研究の目的

ヒトにおける SNX 蛋白の機能、ならびに疾患との関連を明らかにする。遺伝子発現データベース (Laboratory for System Biology and Medicine http://157.82.78.238/refexa/main_search.jsp) で検討すると、SNX1, 5, 6 mRNA はほぼ全ての臓器で発現が認められるのに対し、SNX2 は特定の臓器で発現していた (甲状腺、腎、肺、胎盤)。このうち甲状腺に着目し、甲状腺における SNX2 蛋白の生理的機能ならびに悪性腫瘍との関連を検討した。

3. 研究の方法

剖検で得られた各組織のホルマリン固定・パラフィン包埋切片から mRNA を抽出し、RT-PCR 法により SNX2 mRNA の発現分布を検討し、各臓器切片について抗 SNX2 抗体 (BD Biosciences) を用いて免疫染色を施行した。手術で得られた甲状腺癌切除症例の正常組織部分を用いて、SNX2 ならびに sortilin (Applied Biological Materials) 免疫染色を施行した。組織学的形態計測にはバーチャルスライドシステム VS-100 (オリンパス) を用いた。バセドウ病、機能性結節症例の手術検体について、SNX2・sortilin 免疫染色を施行した。ラット正常培養細胞 FRTL-5 を使用し、thyroid stimulating hormone (TSH) 刺激下での SNX2, sortilin 発現を Western blot 法で検討するとともに、細胞サイズの形態計測を行った。甲状腺悪性腫瘍 (乳頭癌 15 例) の手術切除検体を用いて、SNX2 免疫染色を施行した。

4. 研究成果

各臓器で SNX2 mRNA 発現を検討したところ、検討したいずれの組織でも SNX2 の発現が認められた (図 1)。

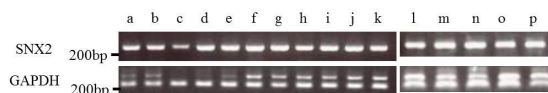


図 1 各臓器における SNX2 mRNA 発現。a, 肝臓; b, 腎臓; c, 心臓; d, 食道; e, 結腸; f, 甲状腺;

g, 膀胱; h, 骨髄; i, 子宮; j, 卵巣; k, 肺; l, 胃; m, 副腎; n, 精巣; o, 脾臓; p, 大脳;

ホルマリン固定パラフィン包埋切片で SNX2 免疫染色を施行したところ、肺泡マクロファージ、肝類洞の Kupffer 細胞や脾ラ氏島、副腎皮質細胞、胃・結腸上皮、腎尿管上皮、甲状腺濾胞上皮において陽性像が認められた (図 2)。この他間質の炎症細胞にも陽性像が認められ、RT-PCR で観察された SNX2 mRNA の広範な発現分布は間質の炎症細胞を反映している可能性があると考えられた。

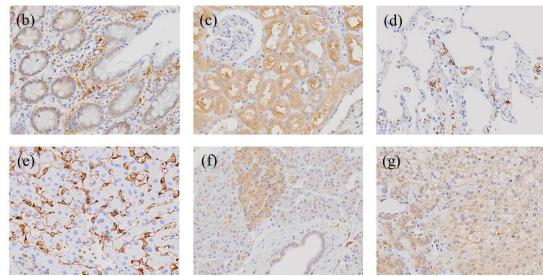


図 2 SNX2 免疫染色像 (a) 結腸 (b) 腎 (c) 肺泡 (d) 肝類洞 (f) 脾臓ラ氏島 (g) 副腎皮質細胞

剖検で得られた甲状腺組織で免疫染色を施行したところ、SNX2 は濾胞上皮細胞に部分的に陽性であった (図 3A)。強拡大で観察すると、高円柱状~立方状濾胞上皮に SNX2 陽性、扁平濾胞上皮に陰性となる傾向にあった (図 3B-D)。甲状腺濾胞上皮細胞は活性化状態である高円柱状~立方状上皮 (active follicle) と、活性の低い状態である扁平上皮 (inactive follicle) に分けられることから、SNX2 陽性・陰性細胞でみられた形態の違いは、濾胞上皮細胞活性の違いを反映している可能性があると考えられた。

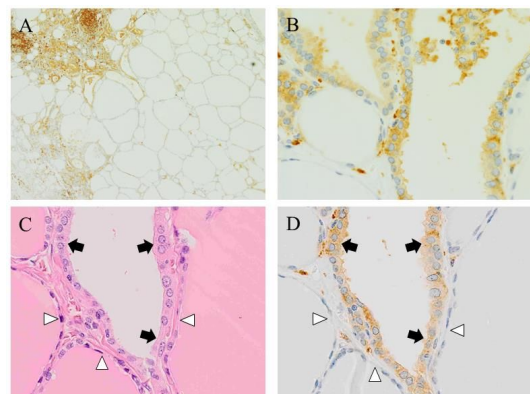


図 3 正常甲状腺組織における SNX2 免疫染色 (A) SNX2 陽性濾胞は巣状に分布する。(B)-(D) SNX2 は高円柱状濾胞上皮に陽性となる。

濾胞上皮細胞の高さと SNX2 陽性、陰性所見の関連を組織学的形態計測法により検討したところ、濾胞上皮細胞の高さが 4um までのものは SNX2 陰性が大半であったが、5um を超えると SNX2 陽性となる細胞の割合が高くなり、7um 以上では全例が SNX2 陽性であった (図 4; $r_s = 0.79$; $p < 0.01$)。以上より、形

態計測の結果からも、SNX2 陽性・陰性所見と細胞形態像の相関が示された。

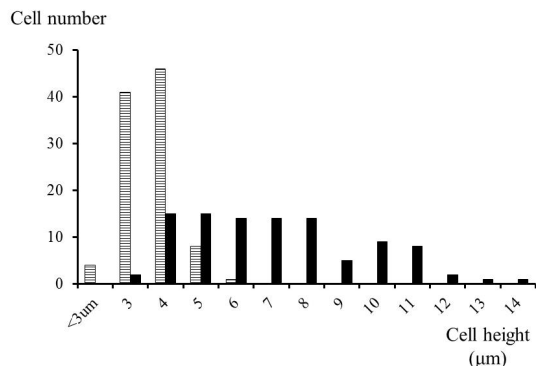


図4 濾胞上皮細胞高とSNX2 陽性・陰性所見
X軸：細胞の高さ Y軸：細胞の個数
黒：SNX2 陽性細胞 横線：SNX2 陰性細胞

Active follicle に発現することが知られている蛋白の一つに sortilin がある (Botta R, et al Sortilin is a putative postendocytic receptor of thyroglobulin. *Endocrinology* 150:509-518, 2009)。連続免疫染色で SNX2 および sortilin の分布を検討したところ、いずれも active follicle に分布することを確認した (図5)。

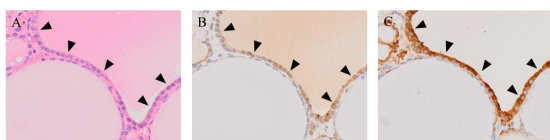


図5 連続切片における SNX2, sortilin の分布 (a)HE 染色 (b)Sortilin (c) SNX2

甲状腺機能亢進状態の代表的な疾患であるバセドウ病および機能性結節について SNX2 染色を施行したところ、いずれもびまん性に SNX2 陽性であった (図 6a,b)。バセドウ病の一部では、SNX2 陽性細胞は巢状に分布し、正常甲状腺組織とほぼ同様であった (図 6c)。

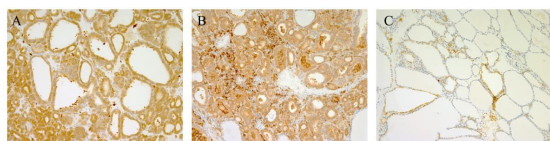


図6 (a)機能性結節 (b,c)バセドウ病の SNX2 免疫染色。

バセドウ病 15 例、機能性結節 16 例を用いた免疫組織学的検討では機能性結節の 93.8% (15/16 例) バセドウ病の 73.3% (11/15 例) で SNX2 びまん性陽性の結果であり、いずれも正常甲状腺組織と比較して SNX2 陽性細胞は有意に多かった ($p < 0.05$)。SNX2 陽性像と臨床的背景 (年齢、性別、甲状腺重量、術前治療法の種類) に有意差は認められなかった。

SNX2 と構造的に類似している SNX1, 5, 6 についても免疫組織学的に検討した。このうち、SNX1 は陰性であり、SNX5, SNX6 は陽性細胞が散在性に分布するのみであった。機能性結

節を用いた検討でも、SNX2 はびまん性陽性であったのに対し、SNX5, SNX6 は陰性であった (図7)。

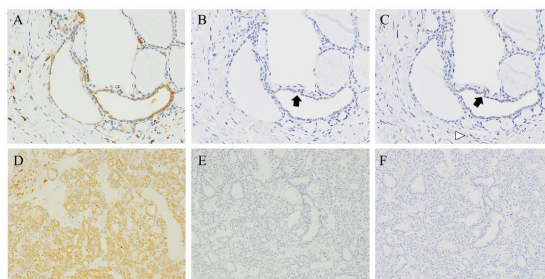


図7 SNX2, 5, 6 の免疫染色。(A, D)SNX2; (B, E)SNX5; (C, F) SNX6。(A-C) 正常甲状腺組織、(D-F) 機能性結節。SNX5, SNX6 は正常甲状腺濾胞上皮の一部 (矢印) に陽性。機能性結節では陰性。

ホルモン刺激存在下における活性化甲状腺濾胞上皮細胞からの SNX2 産生を検討するため、ラット正常甲状腺細胞 (FRTL-5) を用いた in vitro での検討を行った。FRTL-5 細胞を TSH で刺激し、細胞回収後、Western blot 法により検討したところ、TSH 刺激により SNX2, sortilin いずれも発現が増加していることが示された (図8)。微分干渉像観察では、TSH 刺激後で細胞が大型化していることが示唆され (図9)、形態計測でも、細胞面積ならびに細胞周囲長いずれも有意に増加していた (図10)。これらの所見は組織での形態計測結果および SNX2 免疫染色結果に一致していると考えられた。

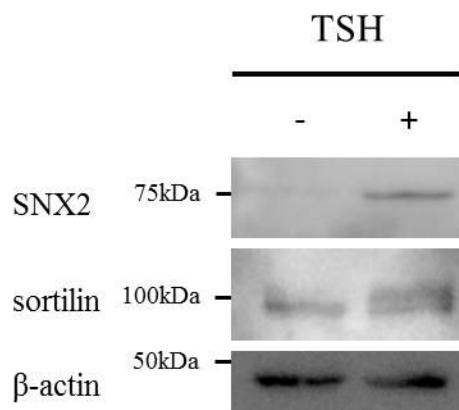


図8 TSH 刺激前後の SNX2 ならびに sortilin 発現 (FRTL-5 細胞)。

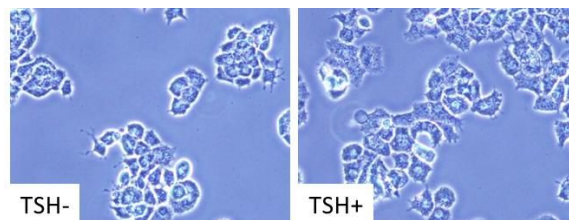


図9 TSH 刺激の有無による細胞形態の比較 (a) TSH 刺激なし (b) TSH 刺激あり (ともに FRTL-5 細胞)

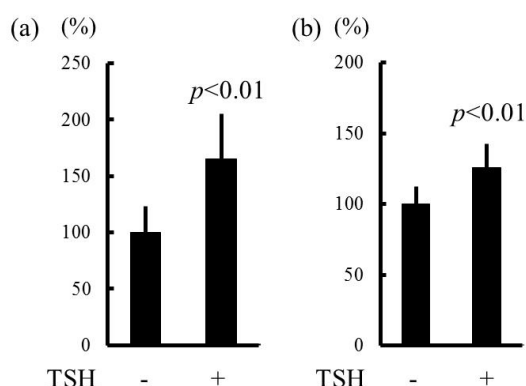


図 10(a)細胞面積比率(b)細胞周囲長比率
(FRTL-5細胞)

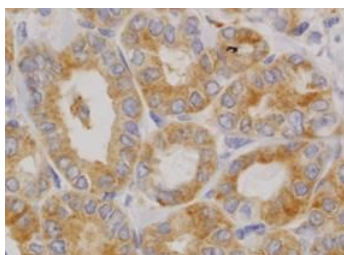


図 11 甲状腺乳頭癌における SNX2 染色

甲状腺乳頭癌 15 例を用いた検討ではいずれも SNX2 はびまん性に陽性であり、正常甲状腺組織と比較して有意であった ($p < 0.05$, 図 11)。これらの腫瘍細胞は正常濾胞上皮に対して大型であることから、腫瘍細胞での SNX2 陽性像は、甲状腺機能が亢進した状態と同様に、小胞輸送系の活性化を反映していることが示唆された。

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 1 件)

Kanzawa M, Hara S, Semba S, Yokozaki H, Hirokawa M, Itoh T. Sorting Nexin 2 (SNX2): A Potential Marker of Active Thyrocytes in Normal and Hyperfunctioning Thyroid Disorders. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2014 Apr;22(4):302-7. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

神澤 真紀、原 重雄、柳田 絵美衣、廣川 満良、仙波 秀峰、横崎 宏、伊藤 智雄
小胞輸送関連蛋白 SNX2 は甲状腺 active follicle を識別する新たなマーカーである
第 101 回日本病理学会総会 (2012 年 4 月、東京)

6. 研究組織

研究代表者

原 重雄 (Hara Shigeo)

神戸大学医学部・附属病院病理診断科・
講師