

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591897

研究課題名(和文) 上皮間葉移行(EMT) 阻害による高度悪性甲状腺癌に対する治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment for highly malignant thyroid carcinoma by inhibition of epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

菊森 豊根(Kikumori, Toyone)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90402635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺癌の悪性度に関連することが示唆されている再発促進因子としての上皮間葉移行に注目して、局所再発を来した甲状腺乳頭癌の臨床病理学的検討を行った。男性、高齢、肉眼的非治癒切除が不良な予後と関連していることを報告した。甲状腺乳頭癌におけるサイログロブリン(甲状腺特異的タンパク質)に対する抗体(抗サイログロブリン抗体)の変動と予後との関連を検討し、抗サイログロブリン抗体が術後上昇する症例は術後早期に局所・遠隔再発を来し、予後不良の傾向があることを報告した。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the epithelial-mesenchymal transition as relapse promoting factors which is suggested to be associated with the malignant potential of thyroid cancer, clinicopathological study of papillary thyroid cancer which developed local or regional recurrence was conducted. We reported that male, advanced age, and gross non-curative resection are associated with poor prognosis. Analysis for association between postoperative change of anti-thyroglobulin (thyroid-specific protein) antibody and prognosis was also conducted. The results suggested that the patients whose postoperative anti-thyroglobulin antibody was elevated rapidly had a tendency of poor prognosis.

研究分野：乳腺内分泌外科学

キーワード：甲状腺癌 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌の多くは悪性度が低く、遠隔転移の頻度もきわめて低く局所療法のみで良好な予後が期待できる乳頭癌が占めている。しかし、一方低分化癌は局所再発を繰り返し、遠隔転移を比較的来しやすい。また乳頭癌、濾胞癌を素地として発生した未分化癌はきわめて悪性であり、急速な転帰をたどることが多い。甲状腺低分化癌、未分化癌に対して有効な抗癌剤は臨床応用されておらず、治療の選択肢がきわめて限られるのが現状である。種々の治療法が検討されてきているが、**臨 transition: EMT** (図1) が癌の浸潤、転移に深く関与していることが知られている。腫瘍の悪性度増加に EMT が関与していることが種々の癌腫で報告されている。甲状腺腫瘍においても甲状腺乳頭癌から

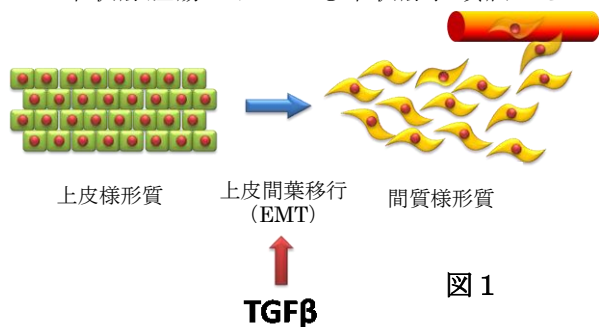


図1

未分化癌に転化することが知られ、この2つの癌が隣接して観察されることがしばしばある。未分化癌の部位においてより間葉様形質を示すマーカーである **vimentin** の発現が増強、上皮様形質を示すマーカーである **e-cadherin** が低下していることが報告されている。EMT を促進する因子は多数報告されているが代表的なものとして TGFβ が知られている。TGFβ は、TβRI と TβRII が 2 量体を形成した受容体 (TβR) (図2) に結合することにより、核内で標的遺伝子の転写を促進する。この受容体の安定化には熱ショックタンパクである HSP90 が必要とされている (HSP90 のクライアントタンパク)。

HSP90 の特異的阻害剤である 17-AAG により TβR がユビキチン化され、引き続いてプロテアソームによる分解を受けることが報告されている。(図3) 我々は乳癌細胞株において 17-AAG の作用を検討したが、HSP のクライアントタンパクである HER2 が過剰発現している細胞株において 17-AAG の添加により HER2 の

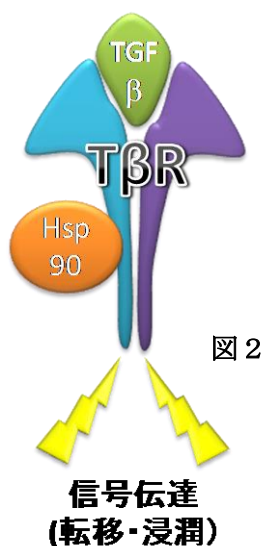


図2

分解が促進され、より細胞増殖抑制効果が高いことを見いだした。またより低温度の加温により細胞増殖が抑制されることを報告した。(論文未発表)

甲状腺癌細胞株において HSP90 の作用を強く受けると考えられる BRAF 変異を有する細胞株の方がより HSP90 特異的阻害剤の増殖抑制効果を受けるかどうかを検討する必要がある。

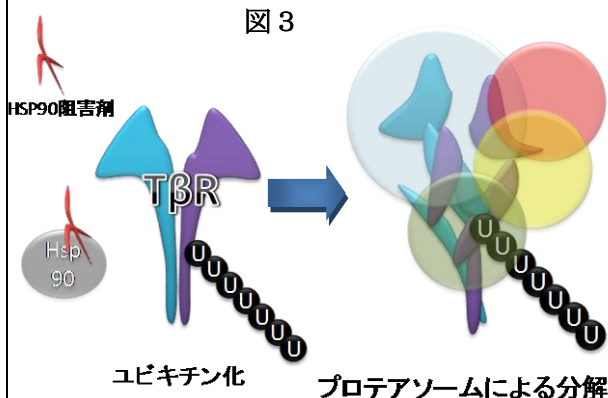


図3

2. 研究の目的

今回の研究では、甲状腺乳頭癌、未分化癌細胞株をモデルにして HSP90 阻害剤を用いることにより TGFβ の作用を抑制できるかどうかを検討、さらに EMT を抑制できるかを検討する。このことが可能であれば、高度悪性度の甲状腺低分化癌、未分化癌の局所浸潤、遠隔転移の抑制効果をもつ治療法の開発につながると思われる。

一方、中部大学で開発した陽性荷電マグネタイト内包リポソーム (MCL) (図4) は交番磁場を照射することにより発熱する素材であり、その表面電荷の特性により、局所投与時に組織残留効果が非常に高まり、高い腫瘍縮小効果を報告してきた。

我々は表面荷電の代わりに腫瘍特異的な抗体を付加したマグネトリポソームを利用して乳癌動物実験モデルにおいて腫瘍特異的温熱効果および腫瘍縮小効果を報告した。この MCL を用いることにより腫瘍のみを加温

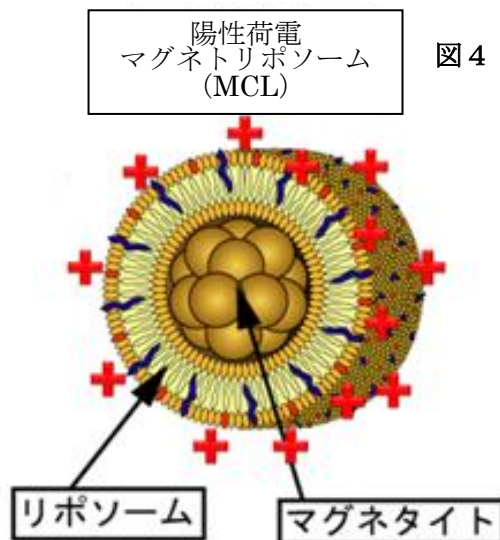


図4

することが可能となり、17-AAG と温熱の相加/相乗効果を検証することができる。

3. 研究の方法

【培養細胞実験】

ヒト甲状腺癌培養細胞において HSP 阻害剤 17-AAG の TGF β 信号伝達経路抑制により EMT を阻害できるかどうかを検討。

- (1) ヒト甲状腺癌細胞の培養:乳頭癌 KTC-1、PTC1 を培養する。また、未分化癌 BHT101 および、KAT18 を培養する。
- (2) それぞれの培養細胞に HSP 阻害剤である 17-AAG を加え、T β R の分解促進をウェスタン法により検討する。また、EMT の指標である、e-cadherin、vimentin などの発現をウェスタン法などにより検討する。
- (3) 上記ヒト甲状腺癌細胞に 17-AAG および温熱を作用させ、EMT 阻害作用に対して相加/相乗効果があるかどうかを検討する。
- (4) 17-AAG および温熱の至適条件を検討する。具体的には濃度、温度、加温時間、加温間隔などを変化させて、EMT 阻害作用を検討する。
- (5) HSP90 阻害剤である 17-AAG は発癌、癌の伸展に関与すると考えられている種々のタンパク質 (HER2、FAK、AKT など) の安定性を低下させ、抗癌作用を発揮すると考えられている。甲状腺癌細胞株において、これらの因子に対する影響を検討する。
- (6) 甲状腺癌細胞株における HSP90 阻害剤による TGF β の信号伝達経路の下流にある各種分子の発現やリン酸化の変化をウェスタン法や RT-PCR 法により検討する。

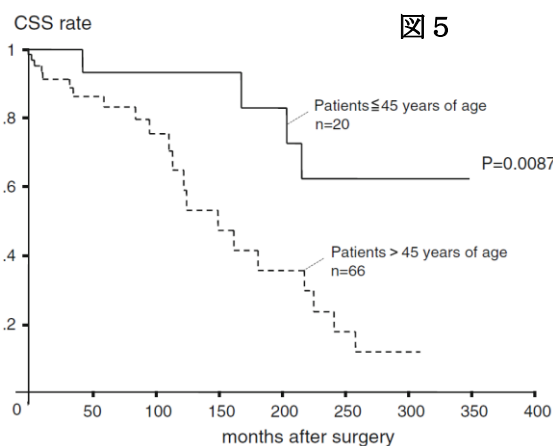
【動物実験】

ヒト甲状腺癌細胞移植ヌードマウスにおける HSP90 阻害剤 17-AAG の EMT に対する効果を検討する。

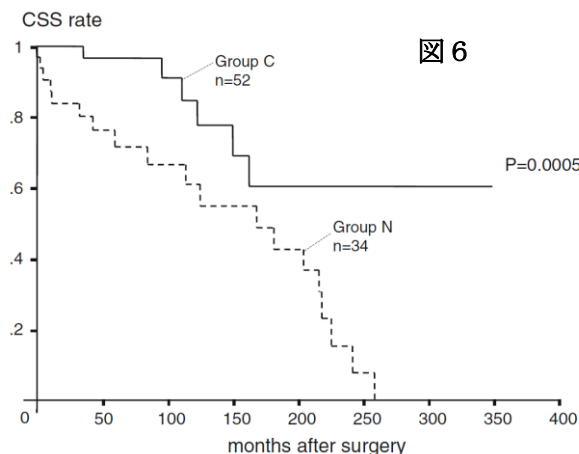
- (1) ヒト甲状腺癌培養細胞のヌードマウスへの移植、腫瘍形成:上記の細胞株をヌードマウスの皮下に移植し腫瘍を形成させる。
- (2) 担癌マウスに対して 17-AAG を投与し、移植腫瘍の浸潤能、遠隔転移能の変化を検討する。
- (3) 担癌マウスに対して 17-AAG を投与し MCL および交番磁場照射により腫瘍特異的に加温し、EMT 阻害作用に対して相加/相乗効果があるかどうか、また浸潤、遠隔転移を抑制できるかどうかを検討する。

4. 研究成果

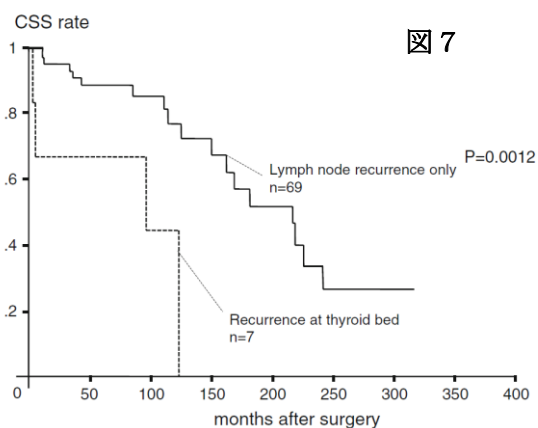
甲状腺癌の悪性度に関連することが示唆されている再発促進因子としての上皮間葉移行に注目して、再発を来した甲状腺乳頭癌の臨床病理学的検討を行った。男性、高齢、肉眼的非治癒切除が不良な予後と関連していることを報告した。(論文発表1) (図5:高齢者(45歳より高齢:点線)は若年者(45歳以下:実線)よりも有意に疾患特異的生存率が低いことを示している。)



(図6:肉眼的非治癒切除群(N)は肉眼的治癒切除群(C)と比較して、疾患特異的生存率が低いことを示している。)

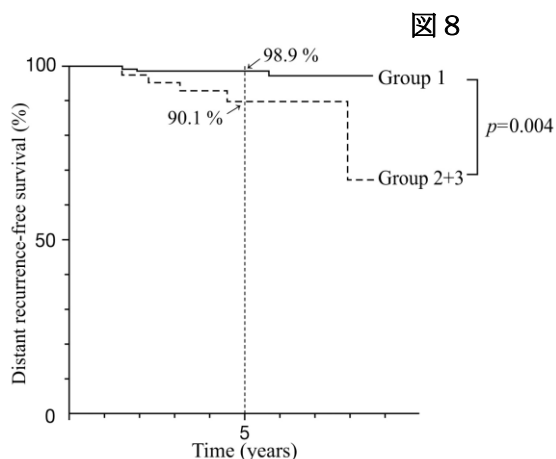


また、より EMT と関連すると考えられる局所浸潤傾向の指標となる甲状腺床における局所再発を来した群の方が、リンパ節再発のみの群よりも予後が悪いことを報告した。(図7:甲状腺床局再発群(点線)はリンパ節再発のみの群(実線)と比較して、疾患特異的生存率が低いことを示している。)



甲状腺乳頭癌におけるサイログロブリン（甲状腺特異的タンパク質）に対する抗体（抗サイログロブリン抗体）の変動と予後との関連を検討し、抗サイログロブリン抗体が術後上昇する症例は術後早期に局所・遠隔再発を来し、予後不良の傾向があることを報告した。（論文発表2）

（図8：術後抗サイログロブリン抗体が上昇または軽度低下した群（2+3）は術後有意に低下した群（1）と比較して遠隔再発率が高いことを示している。）



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

- (1) Uchida, H. Imai, T. Kikumori, T. Hayashi, H. Sato, S. Noda, S. Idota, A. Kiuchi, T. Long-term results of surgery for papillary thyroid carcinoma with local recurrence Surg Today、査読有、43巻、2013、848-53 DOI: 10.1007/s00595-012-0353-z
- (2) Tsushima, Y. Miyauchi, A. Ito, Y. Kudo, T. Masuoka, H. Yabuta, T. Fukushima, M. Kihara, M. Higashiyama, T. Takamura, Y. Kobayashi, K. Miya, A. Kikumori, T. Imai, T. Kiuchi, T.

Prognostic significance of changes in serum thyroglobulin antibody levels of pre- and post-total thyroidectomy in thyroglobulin antibody-positive papillary thyroid carcinoma patients Endocr J、査読有、60巻、2013年、871-6

https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/60/7/60_EJ12-0410/_pdf

〔学会発表〕（計5件）

- (1) 菊森 豊根 甲状腺乳頭癌に対する基本術式としての甲状腺全摘および両側D1郭清の中長期成績、第47回日本甲状腺外科学会総会 平成26年10月30日 アクロス福岡（福岡県・福岡市）
- (2) 五十嵐 健人, 菊森 豊根 甲状腺未分化癌の発生由来と予後に関する検討 第26回日本内分泌外科学会総会 平成26年5月22日 名古屋マリオットホテル（愛知県・名古屋市）
- (3) Yukiko Tsushima, Toyone Kikumori CHANGES IN SERUM TG AND THYROGLOBULIN ANTIBODY LEVELS OF PRE-AND POST-TOTAL THYROIDECTOMY IN THYROGRLOBULIN ANTIBODY-POSITIVE PAPPILARY THYROID CARCINOMA PATIENTS 14th Biennial Congress of the Asian Association of Endocrine Surgeons 平成26年3月13日 Jet blue hotel ネゴンボ（スリランカ）
- (4) 菊森 豊根、甲状腺分化癌 どこまで全摘するの—手術手技の観点から 第46回日本甲状腺外科学会総会 平成25年9月26日 愛知県産業労働会館（愛知県・名古屋市）
- (5) 菊森 豊根、甲状腺乳頭癌に対する外科治療の個別化における切除範囲の検討、第113回日本外科学会定期学術総会、平成25年4月13日 福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊森 豊根 (Toyone Kikumori)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90402635

(2) 研究分担者

小林 猛 (Kobayashi Takeshi)
中部大学・生物機能開発研究所・客員教授
研究者番号：10043324