

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461976

研究課題名(和文) 甲状腺未分化癌の分子標的開発に向けたEpCAMの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of function of EpCAM toward the development of molecular target for anaplastic thyroid cancer

研究代表者

伊藤 研一 (ITO, Ken-ichi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：10334905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺未分化癌は極めて悪性度が高い腫瘍で治療方法も確立していない。未分化癌の新しい治療戦略の開発を目指して、未分化癌の高い悪性度の要因となる分子を探索すべく、培養甲状腺癌細胞を用いた研究を行った。未分化癌細胞では、EpCAM、CD44 variant isoforms (3と6)、claudin-7の発現増加と高いALDH1活性、さらにEpCAMとALDH1の共発現を認めた。EpCAM、CD44 variant isoforms、claudin-7が複合体を形成して腫瘍の悪性度や増殖を促進することが報告されているが、今回の結果から、未分化癌の高い悪性度にこれらが関与している可能性が推測される。

研究成果の概要(英文)：Anaplastic thyroid cancer is considered to be one of the most aggressive human malignancies, and the mean survival time after diagnosis is approximately six months, regardless of treatments. To detect the molecules involved in the aggressive phenotype of anaplastic thyroid carcinoma, we performed in vitro analysis using several thyroid cancer cell lines. In our study, the anaplastic thyroid cancer cell lines demonstrated higher levels of expression of EpCAM, CD44 variant isoforms (3 and 6), claudin-7 as well as a higher ALDH1 activity than the differentiated thyroid cancer cell lines. Furthermore, co-expression of EpCAM and ALDH1 was observed in anaplastic cancer cells. Our study suggests the possibility that EpCAM, together with CD44 variant isoforms and claudin-7 as well as ALDH1, may be involved in the development of the aggressive phenotype of anaplastic thyroid carcinoma. Our findings may suggest a novel therapeutic strategy for treatment of anaplastic thyroid carcinoma.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：甲状腺癌 甲状腺未分化癌 新規治療標的の開発

## 1. 研究開始当初の背景

本邦では年間約1万8千人が甲状腺癌に罹患し、その1割の約1800人が死亡している。甲状腺癌の多くは比較的予後の良い分化癌(乳頭癌、濾胞癌)であるが、甲状腺癌の約2%を占めるに過ぎない未分化癌が、甲状腺癌による死亡の約40%を占めており、その予後は極めて不良である。

未分化癌は、ヒト悪性腫瘍の中でも最も悪性度の高い腫瘍として知られており、診断確定後の平均生存期間は約6ヶ月である。これまでに様々な化学療法剤が試みられてきたが、奏効した薬剤は少なく、また放射線感受性も高くないため、未だ有効な治療法は確立されていない。当科で治療を行った過去25年間の症例の解析でも、その治療成績には全く改善が認められていない<sup>1)</sup>。

一方、甲状腺未分化癌の多くが、緩徐に進行する分化癌(乳頭癌、濾胞癌)から「未分化転化」として発生してくることが知られている。「未分化転化」が起ると、腫瘍は極めて短期間に増大し遠隔転移を生じることから、未分化転化に伴い癌細胞の分子生物学的性質が大きく変化することが推測される。我々は臨床組織の免疫組織染色での解析で、未分化癌では糖転移酵素 GaINAcT3 やサイログロブリンやの発現が有意に低下していることを報告した<sup>2)</sup>。しかし、未分化転化および未分化癌の極めて高い増殖能と転移能の原因となる分子生物学的機序は未だ解明されていない状況であった。

## 2. 研究の目的

甲状腺未分化癌の分子生物学的特徴を明らかにし、新規治療戦略を創出するために、EpCAM やその関連分子が未分化癌の悪性度とどのように関連しているか解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞を用いた解析

未分化癌細胞株2種(ACT-1、FRO)と分化癌細胞株2種(乳頭癌:TPC-1、濾胞癌:FTC-133)を使用。フローサイトメトリー(FACS)での細胞分画の分離と採取、RT-PCR法でのmRNA発現解析、ウエスタンブロット法でのタンパク発現解析、蛍光抗体法での二重染色を用いた。

### (2) 臨床検体での解析

甲状腺癌手術切除標本を用いて、免疫組織染色でタンパク発現を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 未分化癌に特徴的な分子の抽出

未分化癌細胞株FROを、代表的な癌幹細胞マーカーCD44 standard form (CD44s)の発現でFACSを用いてCD44陽性と陰性の分画に分けて抽出した。得られた分画について、マイクロアレイ法を用いて、網羅的遺伝子発現解析を施行した。その結果、CD44陰性分画でALDH1とEpithelial cell adhesion molecule (EpCAM)、claudin-7の発現上昇を認めた。また、CD44陰性分画ではCD44 variant form 3 (CD44v3)とvariant form 6 (CD44v6)の発現増加が認められた。

### (2) 甲状腺癌細胞株でのEpCAMとCD44s、CD44v3、CD44v6の発現の解析

EpCAMは未分化癌細胞株(ACT-1、FRO)で高発現を認め、分化癌細胞株(TPC-1、FTC-133)での発現は低下していた。CD44sは分化癌細胞株で高発現を認めたが、未分化癌細胞株での発現は低く、一方、CD44v3、v6は未分化癌細胞株での発現増加を認めたが、分化癌細胞株では発現を認めなかった。さらに、FACSおよび蛍光二重染色で、分化癌および未分化細胞株ではEpCAMの発現とCD44sの発現には逆相関が認められた。

( 3 ) 甲状腺癌細胞株での EpCAM、claudin-7 の発現の解析

EpCAM およびこれと直接結合することにより Wnt シグナル伝達に關与する claudin-7 の発現を解析したところ、未分化癌細胞株 ( ACT-1、FRO ) では、EpCAM、claudin-7 とともに分化癌細胞株 ( TPC-1、FTC-133 ) に比し有意な発現の増加を認めた。

( 4 ) 甲状腺癌細胞株での ALDH1 酵素活性と mRNA 発現解析の解析

分化癌細胞株 ( TPC-1、FTC-133 ) では ALDH1 酵素活性を有する細胞は認められず、未分化癌細胞株 ( ACT-1、FRO ) では、高い ALDH1 酵素活性を有する細胞を多く認めた。また、未分化癌細胞株では、ALDH1 mRNA の有意な発現増加を認めた。

( 5 ) 甲状腺癌細胞株での ALDH1 酵素活性と CD44s の発現の比較

FACS 解析では、ALDH1 酵素活性と CD44s の発現には逆相関を認め、蛍光二重染色での観察で、CD44s 高発現の細胞で ALDH1 酵素活性が低く、逆に ALDH1 酵素活性が高い細胞では CD44s の発現が低いことが観察された。未分化癌細胞株 ( ACT-1、FRO ) では ALDH1 酵素活性は高く、CD44s は低発現を示した。

( 6 ) ALDH1 酵素活性と EpCAM の発現の比較

未分化癌細胞株 ( ACT-1、FRO ) では、ALDH1 酵素活性、EpCAM 発現ともに高く、ALDH1 酵素活性と EpCAM には強い正の相関が認められた。蛍光二重染色では、未分化癌細胞株にのみ ALDH1 酵素活性、EpCAM 発現共に高い細胞が認められ、ALDH1 酵素活性が高い細胞での EpCAM の共発現が観察された。

( 7 ) 甲状腺癌臨床検体の免疫組織染色での解析

未分化癌では、EpCAM の核での発現が分

化癌より有意に多く認められ、未分化癌で CD44s の発現が低く、CD44v6 の発現が高い傾向が認められた。また、未分化癌では CD44s 低発現かつ CD44v6 高発現を示す症例が認められたが、分化癌では認められなかった。

( 8 ) EpCAM 抑制の甲状腺癌増殖に及ぼす効果

未分化癌細胞株 ( ACT-1、FRO ) で siRNA を用いて EpCAM 発現を抑制すると、これらの細胞の増殖が抑制された。

( 9 ) まとめと考察

EpCAM、CD44 variant isoforms、claudin-7 が複合体を形成して腫瘍の悪性度や増殖を促進している可能性が他癌で報告されているが、今回の解析で、甲状腺未分化癌細胞株で、EpCAM と claudin-7 の高発現、CD44s の発現低下と variant isoforms の発現増加や高い ALDH1 酵素活性が認められた。臨床検体でも EpCAM や CD44v6 の発現に関しては同様の傾向が認められ、これらの結果から、甲状腺未分化癌では EpCAM とその関連因子、および高い ALDH1 酵素活性が、この癌の高い悪性度に關与している可能性が推測された。今後、これらの分子が甲状腺未分化癌の新規治療戦略の分子標的となり得るか、現在も研究を継続している。

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 )

Okada T, Nakamura T, Watanabe T, Onoda N, Ashida A, Okuyama R, Ito K: Coexpression of EpCAM, CD44 variant isoforms and claudin-7 in anaplastic thyroid carcinoma. PLoS One, 9: e94487, 2014 ( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

第 28 回日本内分泌外科学会総会 (2016 年 5 月 26-27 日、横浜市)

甲状腺癌の発癌、進展における転写調節因子 PATZ1 発現の意義

家里明日美, 小野真由, 大場崇旦, 福島優子, 伊藤勅子, 金井敏晴, 前野一真, 伊藤研一

第 74 回日本癌学会学術総会(2015 年 10 月 8-10 日、名古屋市)

甲状腺癌の発癌と進展における転写調節因子 PATZ1 発現の関与

家里明日美, 小野真由, 大場崇旦, 福島優子・伊藤勅子, 金井敏晴, 前野一真, 伊藤研一

第 115 回日本外科学会定期学術集会 (2015 年 4 月 16-18 日、名古屋市)

甲状腺癌における転写因子 PATZ1 発現の意義  
家里明日美, 小野真由, 大場崇旦, 花村徹, 伊藤勅子, 金井敏晴, 前野一真, 伊藤研一

第 73 回日本癌学会学術総会 (2014 年 9 月 25-27 日)

甲状腺未分化癌の分子標的開発に向けた EpCAM の機能解析

中村輝郎, 上条しのぶ, 伊藤研一

第 46 回日本甲状腺外科学会学術集会(2013 年 9 月 26-27 日、名古屋市)

甲状腺未分化癌における CD44, EpCAM の発現と ALDH1 酵素活性

岡田敏宏, 大場崇旦, 家里明日美, 花村徹, 渡邊隆之, 金井敏晴, 前野一真, 伊藤研一, 天野純, 小野田尚佳

第 113 回日本外科学会定期学術集会 (2013 年 4 月 11-13 日、福岡市)

甲状腺癌における CD44 の発現と ALDH1 酵素活性  
甲状腺未分化癌における CD44, EpCAM の発現と ALDH1 酵素活性

岡田敏宏, 家里明日美, 花村徹, 村松沙織, 村山幸一, 渡邊隆之, 金井敏晴, 前野一真, 望月靖弘, 伊藤研一, 天野純, 小野田尚佳

AACR Annual meeting 2013 (April 6-10, 2013, Washington DC, USA)

Association of CD44 expression and ALDH1 activity in thyroid cancer.

Toshihiro Okada, Ken-ichi Ito, Jun Amano, Naoyoshi Onoda

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/graduate/medicine/doctoral/m-science/nyusen.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 研一 (ITO, Ken-ichi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：10334905

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし

研究者番号：