

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861110

研究課題名(和文) 甲状腺癌幹細胞をターゲットとした放射線感受性関連遺伝子スクリーニング

研究課題名(英文) The high-throughput screening to identify signaling pathways that are correlated with radioresistance of thyroid cancer stem cells

研究代表者

松瀬 美智子 (MATSUSE, Michiko)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：30533905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 甲状腺癌幹細胞の維持に関連する遺伝子群・シグナル伝達経路を同定するため、siRNA Libraryを用いた遺伝子ノックダウンとスフィアアッセイ、および自動セルイメージャーによる解析を組み合わせた新たなスクリーニング法を開発した。714のプロテインキナーゼ遺伝子に対するスクリーニングの結果、PDGFR 刺激からJAK、STAT、Pimを介したNF- $\kappa$ Bの活性化までのシグナル経路が甲状腺癌幹細胞の維持に重要な役割を果たす可能性が示唆された。阻害剤を用いた検討により、この経路が甲状腺癌幹細胞の放射線抵抗性に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： There is accumulating evidence that solid tumor contain cancer stem cells (CSC), which play important roles in cancer initiation, progression, recurrence and metastasis. In thyroid cancer (TC), anaplastic thyroid cancer (ATC) is highly aggressive and resistant to conventional chemo/radio-therapy. Although it is considered that these properties are associated with CSC population in TC, little is known about their characteristics. In this study, we conducted high-throughput screening using siRNA for 714 kinases with ATC cell lines to identify signaling pathways that are correlated with their sphere-forming ability, which is one of hallmarks of CSCs. The siRNAs for PDGFR, JAK3 and PIM1/3 markedly inhibited sphere formation. We also demonstrated that siRNA for STAT3/5 and inhibitors for JAK and NF- $\kappa$ B similarly suppressed the sphere-forming ability after irradiation. These data suggest that the JAK-STAT-NF- $\kappa$ B signaling pathway is critical for survival and radioresistance of TC-CSCs.

研究分野：甲状腺癌

キーワード：甲状腺癌 放射線

## 1. 研究開始当初の背景

甲状腺低分化癌、特に未分化癌は非常に悪性度が高く、予後不良である。様々な化学療法、放射線療法の併用が試みられるが、特に局所の進展速度は極めて速く、窒息を危惧する症例も少なくない。従来治療では高い効果は期待できず、新たな治療方法の開発が急務とされている。

癌組織中には増殖能、分裂速度の異なる様々な細胞が混在していることが知られていたが、近年、癌組織中にも「癌幹細胞」と呼ばれる細胞が存在することが明らかになってきた。癌幹細胞は必要な時に自己複製を行いながら、非対称分裂によって癌組織を構成する癌細胞を生み出していく。癌の発育や進展、転移にはこの癌幹細胞が必須であり、癌幹細胞から分化増殖してきた癌組織中の大部分を占める癌細胞では、新たな腫瘍を形成する能力は無いとされる。従来からの化学療法、放射線療法などは大部分の癌細胞をターゲットとしたものであり、分裂速度の遅い、さらには放射線抵抗性、薬剤耐性能の高い癌幹細胞には治療効果が低いと予想される。そのため、大部分の癌細胞が治療に反応し、一旦腫瘍が縮小したとしても、その後の再発、転移はこれらの治療に抵抗性の残存した癌幹細胞の関与が示唆され、癌根治の戦略として癌幹細胞の存在とその特性についての研究を押し進める必要性は極めて高い。

これまでに種々の癌において、Wnt/ $\beta$ -catenin、PI3K-mTOR、Notch、JAK/STAT経路等が癌幹細胞の放射線抵抗性に関連することが報告されており (Moncharmont et al. *Cancer letters* 2012 322, 139-47)、これらの経路を標的とした治療、つまり癌幹細胞を標的とした放射線併用療法の開発が望まれている。しかしながら、甲状腺の分野では癌幹細胞に関する研究はあまり進んでいないのが現状である。

これまで我々はさまざまな甲状腺癌細胞・細胞株を用いて、他の癌において癌幹細胞マーカーと報告される表面抗原等の発現を調べてきたが、一部の細胞株において有力な候補は見つかったものの、別の細胞株ではマーカーとなっておらず、普遍的なマーカーの同定には至っていない (Shimamura et al. *Endocr J.* 2014 61 (5), 481-90)。

甲状腺低分化・未分化癌は染色体異常・遺伝子変異が高度に蓄積されており、ひとつのシグナルに対する分子標的治療では、必ずしも高い効果を得られるとは限らない。そこで、本研究では放射線感受性を高めることに着目した。また、上記の如く癌幹細胞を標的とするにあたり、様々な表面マーカーについて検討するよりも、実際に機能的に重要な細胞内シグナル伝達経路を同定する方法が、より実践的で実際の臨床応用にもつなげることができる可能性が高いと考えた。

癌幹細胞の腫瘍形成能を同定するための手段として現時点で最も信頼性が高く頻用

されているのは、マーカーを使った細胞ソーティング後に免疫不全マウスへの移植を行うことで腫瘍形成能力を確認することである。これに対し、我々は特殊な低接着培養面を持つプレートと、特殊な無血清培地を組み合わせることにより、スフィア形成能を調べるアッセイ方法を確立した。この方法を用いると、免疫不全マウスに腫瘍形成能を示す細胞(癌幹細胞を高い確率で含んでいると考えられる細胞)のみがスフィアを形成し、免疫不全マウスでの移植実験を高い精度で再現良く代替できることが分かった。免疫不全マウスを用いた移植実験では数多くの幅広いターゲットに対するスクリーニングは容易ではないが、スフィアアッセイを 96 穴プレートで行うことによりスクリーニングが比較的短時間に施行可能となった。

## 2. 研究の目的

甲状腺癌組織には少数の癌幹細胞が存在し、抗癌剤や放射線治療に対する抵抗性が高く、再発・転移の原因とも考えられている。本研究の目的は、癌幹細胞を選択的に培養増殖させることができるスフィアアッセイ法と siRNA ライブラリーによる遺伝子ノックダウン法にハイスループットを可能とするセルイメージャーシステムを組み合わせたスクリーニングを行い、癌幹細胞に特異的な放射線感受性に関わる遺伝子・シグナル伝達経路を同定することである。

## 3. 研究の方法

(1) スフィアアッセイ法と siRNA ライブラリーによる遺伝子ノックダウン法にハイスループットを可能とするセルイメージャーシステムを組み合わせたスクリーニングシステムを開発する。

(2) このスクリーニングシステムを用いてプロテインキナーゼ遺伝子に対するスクリーニングを行い、甲状腺癌幹細胞の維持に関わる遺伝子のスクリーニングを行う。

(3) 得られた遺伝子群について、データベースを応用したコンピュータ上でのパスウェイ解析を施行し、重要なシグナル伝達経路を同定する。

(4) この経路に対する siRNA や阻害剤等を用いた検証実験を行う。

(5) 上記阻害剤を投与した細胞に放射線照射を行い、この経路が甲状腺癌幹細胞の放射線抵抗性に関連するか検討する。

## 4. 研究成果

(1) まずスクリーニングシステムの開発を行った。通常、スフィア形成能の検討は直径 100 $\mu$ m 以上の大きさのスフィアを顕微鏡下でカウントすることで行ってきたが、我々は多数のターゲットに対するスクリーニングを、スフィア形成能・増殖能の両方に対応させるため、Thermo の ArrayScan VTI HCS

Reader (96-well フォーマットの自動セルイメージャー)を用いて、今回のアッセイ用に新しくマクロファイルを開発し、スフィアの定量をより簡便に行うことを可能にした。

(2) スフィアを形成することがわかっている甲状腺癌細胞株 FRO をスフィアアッセイ用の低接着表面加工された 96 穴プレートに播種し、siRNA ライブラリーを用いて遺伝子ノックダウンを行い、コントロール siRNA を導入した well のスフィア数・径と比較することでスフィア形成能の検討を行った。よりスフィア形成能特異的な分子を同定するため、スフィアアッセイに加えて通常の単層培養を用いた細胞毒性試験も平行して行った。通常の単層培養ではあまり細胞増殖抑制効果が見られないが、癌幹細胞の指標とされるスフィア形成能を高度に抑制する siRNA は、それだけ癌幹細胞の機能に特異的な役割を持つものと考えられる。

714 のプロテインキナーゼ遺伝子に対するスクリーニングの結果、およそ 100 の候補遺伝子が、スフィア形成、おそらくは癌幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることを示唆するデータが得られた。この 100 の遺伝子に対して他の甲状腺癌細胞株 KTC3 を用いた二次スクリーニングを行い、スフィア形成能の抑制効果を確認した。

(3) 候補遺伝子のアノテーションから甲状腺癌幹細胞の維持に関与しているシグナル伝達経路をいくつか特定した中で PDGFR $\beta$ /JAK/STAT 経路に対する siRNA が最も効果的にスフィア形成能を抑制していた。また、候補遺伝子のひとつである Pim はこの経路の下流に存在し、NF- $\kappa$ B の活性化に関与することが報告されている。我々はこれまで甲状腺未分化癌細胞は NF- $\kappa$ B 活性が極めて高く、アポトーシスを強力に阻害することで抗癌剤耐性に寄与していることを明らかにしてきた。今回の結果と総合すると、PDGFR $\beta$  刺激から JAK、STAT、Pim を介した NF- $\kappa$ B の活性化までのシグナル経路が甲状腺癌幹細胞の維持に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

(4) この経路に対する siRNA や阻害剤等を用いた検証実験を行った。NF- $\kappa$ B 特異的阻害剤である DHMEQ、JAK inhibitor、STAT に対する siRNA を用いた検証実験の結果、この遺伝子の阻害によるスフィア形成能、軟寒天コロニー形成能の抑制効果を確認した。

(5) 上記阻害剤を投与した細胞に放射線照射(外照射)を行い、この経路が癌幹細胞の放射線抵抗性に関連するか検討した。DHMEQ、JAK inhibitor はそれぞれコントロールと比較して放射線照射後のスフィア形成能を有意に抑制した。このことから、PDGFR $\beta$  刺激から JAK、STAT、Pim を介した NF- $\kappa$ B の活

性化までのシグナル経路が甲状腺癌幹細胞の放射線抵抗性に関連することが示唆された。

予後不良な甲状腺未分化癌に対しては未だ有効な治療法が確立されておらず、治療抵抗性と考えられる癌幹細胞を標的とした新たな治療法の開発は、癌の治癒のみならず再発・転移を防ぐうえでも大きな意義がある。また、このスクリーニング法は甲状腺癌以外の癌幹細胞にも応用可能であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7 件) 全て査読有

1. Nikitski A, Saenko V, Shimamura M, Nakashima M, Matsuse M, Suzuki K, Rogounovitch T, Bogdanova T, Shibusawa N, Yamada M, Nagayama Y, Yamashita S, Mitsutake N. Targeted Foxe1 Overexpression in Mouse Thyroid Causes the Development of Multinodular Goiter But Does Not Promote Carcinogenesis. *Endocrinology*, 157(5), 2182-95, 2016. doi: 10.1210/en.2015-2066.
2. Mitsutake N (co-first author), Fukushima T (co-first author), Matsuse M (co-first author), Rogounovitch T, Saenko V, Uchino S, Ito M, Suzuki K, Suzuki S, Yamashita S. BRAF<sup>V600E</sup> mutation is highly prevalent in thyroid carcinomas in the young population in Fukushima: a different oncogenic profile from Chernobyl. *Scientific Reports*, 20(5), 16976. doi: 10.1038/srep16976.
3. Sahasrabudhe R, Estrada A, Lott P, Martin L, Polanco Echeverry G, Velez A, Neta G, Takahashi M, Saenko V, Mitsutake N; JTCMS Consortium (Matsuse M), Jaeger E, Duque CS, Rios A, Bohorquez M, Prieto R, Criollo A, Echeverry M, Tomlinson I; CORGI Consortiums; TCUKIN Consortiums, Carmona LG. The 8q24 rs6983267G variant is associated with increased thyroid cancer risk. *Endocr Relat Cancer*, 22(5), 841-9, 2015. doi: 10.1530/ERC-15-0081.
4. Rogounovitch TI, Bychkov A, Takahashi M, Mitsutake N, Nakashima M, Nikitski AV, Hayashi T, Hirokawa M, Ishigaki K, Shigematsu K, Bogdanova T, Matsuse M, Nishihara E, Minami S, Yamanouchi K, Ito M, Kawaguchi T, Kondo H, Takamura N, Ito Y, Miyauchi A, Matsuda F, Yamashita S, Saenko VA. The common genetic variant rs944289 on chromosome 14q13.3 associates with risk of both malignant and benign thyroid tumors in the Japanese population. *Thyroid* 25(3), 333-40, 2015. doi: 10.1089/thy.2014.0431.
5. Shimamura M, Nagayama Y, Matsuse M,

- Yamashita S, Mitsutake N. Analysis of multiple markers for cancer stem-like cells in human thyroid carcinoma cell lines. *Endocr J.* 61(5) 481-90, 2014. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/61/5/61\\_EJ13-0526/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/61/5/61_EJ13-0526/_pdf)
6. Orim F, Bychkov A, Shimamura M, Nakashima M, Ito M, **Matsuse M**, Kurashige T, Suzuki K, Saenko V, Nagayama Y, Yamashita S, Mitsutake N. Thyrotropin Signaling Confers More Aggressive Features with Higher Genomic Instability on BRAF(V600E)-Induced Thyroid Tumors in a Mouse Model. *Thyroid.* 24(3), 502-10, 2014. doi: 10.1089/thy.2013.0038.
  7. Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, **Matsuse M**, Ibrahimasic T, Ghossein RA, Fagin JA. Frequent somatic *TERT* promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 98(9), E1562-6, 2013. doi: 10.1210/jc.2013-2383.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. **松瀬 美智子** BRAF 及び TERT プロモーター変異と甲状腺乳頭癌の悪性度との関連 第 58 回日本甲状腺学会学術集会 2015 年 11 月 06 日 「福島県文化センター(福島県・福島市)」
2. 白岩 健 甲状腺癌幹細胞における JAK-STAT 経路の役割 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日 「名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)」
3. **松瀬 美智子** 三次元培養法を用いた新たな甲状腺初代培養法の開発 第 57 回日本甲状腺学会学術集会 2014 年 11 月 14 日 「ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松瀬 美智子 (MATSUSE, Michiko)  
 長崎大学 原爆後障害医療研究所 助教  
 研究者番号: 30533905