

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460653

研究課題名(和文) 甲状腺腫瘍における新規遺伝子HMGA2の制御機構

研究課題名(英文) Regulation mechanism of a new gene HMGA2 in thyroid tumors

研究代表者

菱沼 昭 (Hishinuma, Akira)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：40201727

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)：胚内の間葉系細胞に発現する HMGA2 は腫瘍細胞の分化マーカーとして注目されている。我々の多種の甲状腺腫瘍での発現の検討から、HMGA2 の悪性腫瘍での選択的な発現が示された。また、分化型甲状腺癌である濾胞癌は、しばしばその診断に困難を伴うが、術後組織のHMGA2免疫染色の結果が確定診断や予後予測に応用できる可能性が示唆された。一方、甲状腺癌培養細胞モデルを用いたトランスクリプトーム解析から、発癌を促進する変異サイログロブリンが、HMGA2 の発現を介して数種の細胞増殖関連遺伝子を誘導するという当初の仮説を裏付ける結果を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have drawn attention to a nuclear protein HMGA2, abundantly expressed in the mesenchyme, as a differentiation marker in epithelial tumor cells. In this study, we demonstrated selective expression of HMGA2 in malignant tumor tissues, among various types of thyroid tissue, by using immuno-histochemical staining (IHC). Our results raised a possibility that the IHC of HMGA2 in surgical specimens of follicular thyroid cancer brings about more reliable diagnosis, differentiated from benign follicular adenoma, as well as prediction of its prognosis. In addition, our transcriptome analysis in thyroid cancer cell lines supported our hypothesis that pathogenic variants of thyroglobulin promote tumor development through the induction of HMGA2 followed by several oncogenic gene expressions.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：HMGA2 甲状腺癌 甲状腺濾胞癌 病理診断 トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

福島原発事故後の住民検診により、甲状腺癌の発生頻度は予想以上に高いことがわかった。我々の検討により、サイログロブリン (TG) 異常症に伴う甲状腺腫に高率に甲状腺癌が合併し、High Mobility Group A (HMGA)-2 遺伝子の発現がその発癌機序に關与する可能性が示されている。

HMGA2 は細胞分化・増殖に關与する核内タンパク質で、ゲノム DNA に結合し、クロマチンの構造を変化させることにより転写因子群の働きを調節し、遺伝子発現調節に關与する。すでに甲状腺癌を含む多くの癌組織で高い発現が示されており、腫瘍組織の悪性化マーカーの候補として注目されている(1)。その mRNA には 3000 塩基を超える長い 3' -非翻訳領域があり、miR-let7 などの miRNA がその翻訳後発現制御に關わっている(2)。

日本では、世界的に見るとヨードの摂取量が多い。ヨード摂取量の違いにより、甲状腺機能低下症や甲状腺癌の組織型に違いのあることがわかっている(3)。すでにヨーロッパのグループが HMGA2 の甲状腺癌マーカーとしてのアプリケーションの可能性を報告している(4)が、アジアでの検索はなされていない。人種の違いによる遺伝的バックグラウンドの違い、あるいはヨード摂取量の違いから HMGA2 経路の発現プロファイルが異なる可能性がある。

## 2. 研究の目的

我が国において HMGA2 が甲状腺癌診断のためのターゲットとして有用かを病理組織学的・分析疫学的に検討するとともに、分子細胞生物学的手法により、HMGA2 に關わるシグナル伝達経路の検索を行うことにより、新たな甲状腺癌増殖・分化に關わる因子の発見を試みた。研究項目は(1)ヒト甲状腺腫瘍組織での HMGA2 の発現の検討、(2)ヒト甲状腺腫瘍組織及び細胞モデルを用いた miRNA による HMGA2 遺伝子発現調節の検討、(3)甲状腺癌細胞内での HMGA2 の機能の分子生物学的検索、の3つである。

## 3. 研究の方法

### (1) 甲状腺組織の HMGA2 発現量の評価

本学および共同研究機関である隈病院にストックされた病理標本について、HMGA2 モノクローナル抗体を用いて免疫染色法を行っ

た。

### (2) 甲状腺組織内および甲状腺癌細胞株における HMGA2 制御 miRNA の発現の検討

当初、HMGA2 を制御すると推定された 27 種の miRNA につき、手術検体を用いて PCR アレイで発現を検討し、その結果を細胞モデルにて確認する計画だったが、その後、同一甲状腺腫瘍組織内での HMGA2 発現の不均一性が大半の組織で確認され、結果についての再現性が強く懸念されたため、細胞モデルを利用した検討を優先することとした。細胞内輸送を阻害することが確認され、小胞内ストレスの原因になると考えられた変異サイログロブリン(エクソン 28 と 29 の欠失)の発現ベクターを作成し、2 種の甲状腺癌細胞株(TPC1, FTC133)に導入の上、それらの miRNA 発現プロファイルに及ぼす影響を本学研究支援センターの次世代シーケンサー (Ion Proton) にて解析した。

### (3) HMGA2 のターゲット遺伝子の検索と甲状腺癌におけるその発現の検討

HMGA2 はゲノムと直接結合して遺伝子発現調節を行うため、当初、ChIP アッセイによる検討を計画したが、その後本学で次世代シーケンサーが利用可能となったため、まず、HMGA2 強制発現による甲状腺癌細胞モデルの遺伝子発現プロファイルの変化を包括的に検討することとした。2 種の甲状腺癌細胞株 TPC1, FTC133 を用い、HMGA2 あるいは HMGA2 発現を誘導する変異サイログロブリンの強制発現によるトランスクリプトームの変化を Ion Proton システムにより解析した。

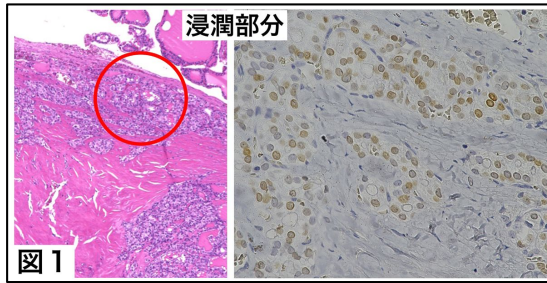
## 4. 研究成果

### (1) 甲状腺組織の HMGA2 発現量の評価

#### HMGA2 は悪性腫瘍に巣状に発現する

予備実験として、まず甲状腺組織 15 検体の免疫染色を行なったところ、分化型癌(乳頭癌、濾胞癌)の過半数(8 例中 6 例)、全ての未分化癌(3 例中 3 例)で巣状に細胞核の染色が認められた一方、良性疾患(濾胞腺腫 1 例、腺腫様甲状腺腫 3 例)ではいずれも発現を認めなかった。これらは、HMGA2 の悪性腫瘍における關与を強く示唆する所見であり、欧米での免疫染色の報告(4,5)にもおおむね一致している。

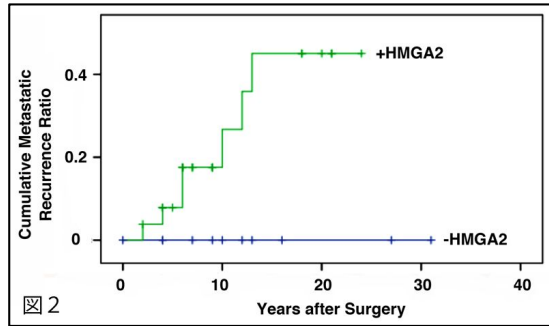
### 濾胞癌における HMGA2 の発現パターン



予備実験において、濾胞癌で被膜浸潤を伴う腫瘍辺縁部に選択的に HMGA2 の染色が認められた(図1)。濾胞癌の診断は“浸潤所見の有無”で確定されるが、従来の HE 染色法では被膜浸潤の判定にしばしば困難をとめない、良性の濾胞腺腫との鑑別に難渋するケースもあるため、予備実験で示された HMGA2 の浸潤部に選択的な染色パターンは浸潤所見の確認に有用な可能性がある。そこで当院で手術された 19 例の濾胞癌例の免疫染色を行なったところ、11 例で染色陽性が確認され、その全てで被膜浸潤を示す腫瘍辺縁部に選択的な HMGA2 の染色が認められた。一方、良性濾胞腺腫についても 11 例を検討したが、HMGA2 の染色は発色増強剤を用いても全て陰性であった。以上から、今後 HMGA2 の免疫染色が濾胞癌の診断に応用できる可能性が示唆された。なお、本研究申請後、大腸癌で同様の腫瘍辺縁に選択的な発現パターンが報告された(6)。

### HMGA2 の発現と濾胞癌の予後

前節で記述した、HMGA2 発現について検討した当院の濾胞癌 19 例について病歴を調査したところ、手術前あるいは術後 10 年以内に甲状腺外に転移をきたした例は 5 例あったが、特筆すべき事に、その原発腫瘍全てにおいて HMGA2 染色陽性で、しかもよりびまん性に染色が認められた。HMGA2 染色を転移の有無の判断に適応したと考えると、感度 100%、特異度 50%、陽性的中率 42%、陰性的中率 100% であり、術後診断に際する転移の否定への応用が示唆された。そこで、さらに当院の病理検体のアーカイブを利用し、5 年以上前の手術検体を用いて、追跡期間 5 年の後ろ向きコホート研究(エントリー数は 44 例)を行った。術後 5 年以上の経過が明らかな症例(37 例)について HMGA2 の免疫染色を施行し、染色の結果と術後再発・転移の有無の関係について検索したところ、HMGA2 陰性群で術後の再発・転移が認められなかったのに対し、HMGA2 陽性群 26 例中 7 例で術後の再発・転移が認められた(図2)。術後の再発・転移に関するリスク比は HMGA2 陽性群に対し陰性群で 0.63 (95%信頼区間 0.48-0.83) となり、HMGA2 染色が陰性だった場合の転移・再発リスクは有意に低いことが示された。



### (2) 甲状腺組織内および甲状腺癌細胞株における HMGA2 制御 miRNA の発現の検討

当初の計画では甲状腺腫瘍組織で HMGA2 を過剰発現している検体を用いて、HMGA2 を制御する可能性のある miRNA の発現検討を行う予定であったが、免疫組織染色法により、組織内での HMGA2 の発現の不均一性が確認された。そこで検討結果の再現性を上げるためマイクロダイセクション法の施行が検討されたが、設備、コストの点から現時点では困難と判断された。加えて、本研究計画申請後、本学に次世代シーケンサー (NGS) が導入され、想定される HMGA2 の発現調節因子について網羅的に発現解析を行うことが可能となったため、培養細胞モデルを用いた包括的な RNA 発現検索を優先することとした。HMGA2 の強発現がすでに報告されている甲状腺乳頭癌細胞株 TPC1、および当初の計画にはなかった濾胞癌細胞株 FTC-133 を利用したが、miRNA に関しては、RNA 抽出の段階での技術的問題から、本研究実施期間中に再現性のある結果を得ることができなかった。

### (3) HMGA2 のターゲット遺伝子の検索と甲状腺癌におけるその発現の検討

当初 ChIP アッセイが計画され、解析の外注も考慮されていたが、本研究計画申請後、本学に次世代シーケンサーが導入され、想定される HMGA2 の発現調節因子や HMGA2 のターゲット遺伝子の発現の検討を網羅的に行うことが可能となった。そこで HMGA2 強制発現による甲状腺癌細胞のトランスクリプトームの変動について解析したところ、2 種の甲状腺癌細胞株でそれぞれ 335 種、324 種の遺伝子(細胞増殖に関連のある ATF3、Rho-Family GTPase, Cyclin-D1, CRKL, MDM2 など含まれる)の有意な増加を確認することができた。ATF3, MDM2 など一部の遺伝子は 変異サイログロブリンの強制発現でも同様に発現が増強され、変異サイログロブリンが HMGA2 発現増強を介してそれらの細胞増殖関連遺伝子の発現を誘導している可能性が示唆された。これは、発癌を促進する変異サイログロブリンが、HMGA2 の発現を介して

数種の細胞増殖関連遺伝子を誘導するという当初の仮説を裏付ける結果である。一方、HMGA2 強制発現により発現抑制された遺伝子は2種の細胞株でそれぞれ 403 種、429 種であり、甲状腺分化因子の1つ PAX8 や、細胞増殖を制御する5種のPPP(セリン・スレオニンホスファターゼ)サブユニットなどが含まれた。なお、サイログロブリン異常症に伴う甲状腺腫に合併するゲノム異常についての検索も行い、数種の新規変異を同定した。

#### (4) まとめ

甲状腺腫瘍において、HMGA2 は悪性腫瘍に選択的に発現しており、その組織型の一つである濾胞癌では、組織の免疫染色の結果が確定診断や予後予測に応用できる可能性が示唆された。今後、臨床的有用性の評価のために、さらに多数の検体による検討が必要と考えられる。一方、甲状腺癌培養細胞モデルを用いて、HMGA2 のトランスクリプトームに及ぼす影響を確認するとともに、発癌を促進する変異サイログロブリンが、HMGA2 の発現を介して数種の細胞増殖関連遺伝子を誘導するという当初の仮説を裏付ける結果を得ることが出来た。ただし、その経路を仲介すると想定された miRNA の検索については技術的な問題から再現性のあるデータを得られず、変異サイログロブリンや HMGA2 で誘導される遺伝子の病理組織内での発現検討とともに今後の課題となった。

#### (引用文献)

1. Fusco A, Fedele M (2007) *Nat Rev Cancer* **7**, 899-910
2. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP (2007) *Science* **315**, 1576-1579
3. Lind P, Langsteger W, Molnar M, Gallowitsch HJ, Mikosch P, Gomez I (1998) *Thyroid* **8**, 1179-1183
4. Chiappetta G, Ferraro A, Vuttariello E, Monaco M, Galdiero F, De Simone V, Califano D, Pallante P, Botti G, Pezzullo L, Pierantoni GM, Santoro M, Fusco A (2008) *Eur J Cancer* **44**, 1015-1021
5. Prasad NB, Kowalski J, Tsai HL, Talbot K, Somervell H, Kouniavsky G, Wang Y, Dackiw AP, Westra WH, Clark DP, Libutti SK, Umbricht CB, Zeiger MA (2012) *Thyroid* **22**, 275-284
6. Morishita A, Zaidi MR, Mitoro A, Sankarasharma D, Szabolcs M, Okada Y, D'Armiento J, Chada K (2013) *Cancer Res* **73**, 4289-4299

## 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8件)

Nyuzuki H, Kogai T, Hishinuma A, Ogawa Y, Saitoh A, Nagasaki K (2017) PTEN mutation in a Japanese boy with autonomously functioning thyroid nodule. *Pediatrics International* **59**: 1223-1224. DOI: 10.1111/ped.13427

De Grande LAC, Van Uytfganghe K, Reynders D, Das B, Faix JD, MacKenzie F, Decallonne B, Hishinuma A, Lapauw B, Taelman P, Van Crombrugge P, Van den Bruel A, Velkeniers B, Williams P, Thienpont LM (2016) Standardization of Free Thyroxine Measurements Allows the Adoption of a More Uniform Reference Interval. *Clin Chem* **63**: 1642-52. DOI:10.1373/clinchem.2016.269456

Thienpont LM, Van Uytfganghe K, De Grande LAC, Reynders D, Das B, Faix JD, MacKenzie F, Decallonne B, Hishinuma A, Lapauw B, Taelman P, Van Crombrugge P, Van den Bruel A, Velkeniers B, Williams P (2016) Harmonization of Serum Thyroid-Stimulating Hormone Measurements Paves the Way for the Adoption of a More Uniform Reference Interval. *Clin Chem* **63**: 1248-60. DOI:10.1373/clinchem.2016.269456

Nishihara E, Hishinuma A, Kogai T, Takada N, Hirokawa M, Fukata S, Ito M, Yabuta T, Nishikawa M, Nakamura H, Amino N, Miyauchi A (2016) A Novel Germline Mutation of KEAP1 (R483H) Associated with a Non-Toxic Multinodular Goiter. *Front Endocrinol* **2016 Sep 20**; **7**: 131. DOI:10.3389/fendo.2016.00131

Mizokami T, Fukata S, Hishinuma A, Kogai T, Hamada K, Maruta T, Higashi K, Tajiri J: Iodide Transport Defect and Breast Milk Iodine (2016) *Eur Thyroid J* **5**: 145-8. DOI:10.1159/000446496

Taki K, Kogai T, Sakumoto J, Namatame T, Hishinuma A (2015) Familial hypocalciuric hypercalcemia with a de novo heterozygous mutation of calcium-sensing receptor. *Endocrinol*

*Diabetes Metab Case Rep.* 2015:150016.  
DOI:10.1530/EDM-15-0016.

小飼貴彦, 廣川満良, 福島光浩, 作本順子, 小林 薫, 深田修司, 宮内 昭, 菱沼 昭, 甲状腺癌における細胞分化マーカー - HMGA2 の発現の検討。 (2015)

*Thyroid Cancer Explore* (査読なし) 1: 139-141

Nishihara E, Fukata S, Hishinuma A, Amino N, Miyauchi A (2014) Prevalence of thyrotropin receptor germline mutations and clinical courses in 89 hyperthyroid patients with diffuse goiter and negative anti-thyrotropin receptor antibodies. *Thyroid* 24:789-95.

DOI:10.1089/thy.2013.0431.

〔学会発表〕(計3件)

Takahiko Kogai, Mitsuyoshi Hirokawa, Mitsuhiro Fukushima, Junko Sakumoto, Kaoru Kobayashi, Shuji Fukata, Akira Miyauchi, Hideki Hirabayashi, Akira Hishinuma (2017) Expression of a cell differentiation marker HMGA2 in thyroid cancer tissues in Japan. Asia Oceania Thyroid Association (AOTA) Congress, Busan, Korea.

Takahiko Kogai, Junko Sakumoto, Wataru Konno, Hiroaki Kanaya, Hideki Hirabayashi, Akira Hishinuma (2017) Potential of HMGA2 Immuno-histochemical Staining as a Prognostic Marker of Metastatic Recurrence in Follicular Thyroid Cancer. Annual Meeting of the American Thyroid Association, Victoria, Canada.

小飼貴彦, 廣川満良, 福島光浩, 作本順子, 小林 薫, 深田修司, 宮内 昭, 菱沼 昭 (2014) 甲状腺癌における細胞分化マーカー HMGA2 の発現の検討. 第 57 回日本甲状腺学会学術集会, 大阪。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ:

(獨協医科大学・教育研究業績書)  
<http://www.dokkyomed.ac.jp/dmu/info/968.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

菱沼 昭 (Hishinuma, Akira)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40201727

(2)研究分担者

小飼 貴彦 (Kogai, Takahiko)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40711693

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし