

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461954

研究課題名(和文) 甲状腺未分化癌の抗癌剤効果予測とヒストン修飾に対する治療法確立を目指した発現解析

研究課題名(英文) Exploratory study to determine predictive factors of effectiveness of paclitaxel and to establish new therapy for histone modification in anaplastic thyroid cancer.

研究代表者

菅沼 伸康 (SUGANUMA, Nobuyasu)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40724927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、甲状腺癌に対するパクリタキセルの効果予測因子を確立することと、エピジェネティクス分野における予後予測ならびに治療標的の確立を目的とした。パクリタキセルの効果予測因子の確立は困難であったが、ヒストン修飾酵素EZH2は甲状腺癌の悪性度やKi67の発現と相関しており、甲状腺低分化癌では遠隔転移とともに独立した予後予測因子であることが判明した。現在、EZH2をターゲットとした新たな治療法の確立を目指している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish predictive factors of effectiveness of paclitaxel in thyroid cancer and to establish prognostic and therapeutic targets in the epigenetic field. Unfortunately, we could not find predictive factors for paclitaxel in anaplastic thyroid cancer, but the histone modifying enzyme EZH2 overexpression may be associated with the malignancy of thyroid cancer and the expression of Ki67. It turned out that EZH2 is an independent prognostic factor as well as distant metastasis in poorly differentiated thyroid cancer. Currently, we are aiming to establish a new therapy targeting EZH2.

研究分野：乳腺内分泌外科学

キーワード：甲状腺未分化癌 ヒストン修飾 EZH2 効果予測因子

## 1. 研究開始当初の背景

甲状腺未分化癌は全甲状腺癌の約 1%と少ないが、その予後は 1 年生存率 18%と非常に厳しく、甲状腺癌関連死の 14-39%を占める。治療成績向上のために、拡大手術や放射線外照射、多剤併用化学療法が試みられてきたが、治療成績の改善には至らなかった。近年、タキサン系抗癌剤の使用により治療成績が改善したという報告が散見されるようになって来たが、その奏効率は高くても 30%程度であり、増殖速度が速く効果が得られなかった場合には致命的となる未分化癌において、薬剤感受性の予測は非常に重要である。我々の Preliminary data では、紡錘体チェックポイント構成因子の Mad2 が、甲状腺未分化癌組織で高発現していることを証明した (Wada et al, Anticancer Res, 2007)。さらに、甲状腺未分化癌の Paclitaxel (PTX) 治療症例を用いて上記因子の発現と治療効果を検討したところ、Mad2 高発現群では低発現群と比較して有意に奏効率が高いことを報告した (Suganuma et al, ETA 2012 Abstract# P-153)。

一方、細胞の発癌過程や、その後の更なる悪性形質 (浸潤能、転移能) の獲得過程には様々な遺伝子変化の蓄積が関与しており、甲状腺未分化癌でも多くの遺伝子異常が指摘されているが、予後予測因子や治療標的として確立されたものはない。こうした中、遺伝子の構造自体には変化を伴わないエピジェネティクスによる発現調節機構が、癌の悪性度や予後と相関するデータが報告されるようになってきた。エピジェネティクスによる発現調節機構には、DNA のメチル化や microRNA とともにクロマチン構造のリモデリングを介して遺伝子発現の on/off や発現強度の調節に関与するヒストン蛋白のメチル化、アセチル化による修飾が知られており、多くの癌種においてその変化が報告されているとともに、それらの修飾に関与する JARID、EZH、MLL 等のヒストン修飾酵素の発現と悪性度、予後との関連についても多数報告されている。しかし、甲状腺癌におけるこれらのデータはほとんど報告されていない。我々の Preliminary data では、H3K27 のメチル化酵素でその領域の遺伝子転写を抑制するたんぱく質複合体である EZH2 の発現は、甲状腺未分化癌で高度に発現する傾向にあったが、多数例での解析やその他の因子、甲状腺癌の他の組織型における解析を要すると考えている。

## 2. 研究の目的

これらの背景をもとに、1) 甲状腺未分化癌の PTX 治療症例数を増やし、紡錘体チェックポイント構成因子 Mad2 が PTX の予後予測因子となりうるかどうかを検証する、2) 甲状腺未分化癌を中心に、甲状腺癌におけるヒストン修飾やその修飾遺伝子の変化を明らかにし、予後予測ならびに治療標的を確立す

ることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

横浜市立大学附属病院、横浜市立大学附属市民総合医療センター、神奈川県立がんセンターで診断された甲状腺未分化癌症例を対象として、それぞれの検体でヘマトキシリン-エオジン染色を施行し、病理学的所見を確認の上で組織マイクロアレイを作成した。続いて免疫染色を用いて前述の紡錘体チェックポイント構成因子 (BUB1, BUBR1, BUB3, MAD1, MAD2, beta-tubulin III など)、ヒストン修飾 (H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2, H3K9ac, H3K27me3, H3K36me2 など) 及びヒストン修飾酵素 (JARID1A, JARID1B, EZH2, MLL2, MMSET など) を染色し、患者背景をブラインド化した上で病理医とともに染色状態を判定した。染色濃度、染色面積からカットオフ値を設定し、臨床病理学的所見とともに紡錘体チェックポイント構成因子の発現と PTX の効果予測、エピジェネティックな因子と予後について解析した。

## 4. 研究成果

甲状腺未分化癌の PTX 治療症例を用いて Mad2 の発現と治療効果を検討した Preliminary data では、高発現群では低発現群と比較して有意に奏効率が高かった (Figure 1)。稀少疾患であることに加え、単一施設で集積できる症例数には限界があったため、甲状腺未分化癌に対する weekly paclitaxel による化学療法の認容性、安全性に関する前向き研究

(UMIN000008574) の付随研究として、PTX 奏功例と非奏功例を用いた Mad2 の発現解析を行った。その結果、奏功例 8 例中 Mad2 高発現群は 4 例 (50%)、非奏功例 7 例中 Mad2 高発現群は 5 例 (71%) となり、Preliminary data との統合解析では、Mad2 高発現群の奏効率は 53% で低発現群 29% と比較して高いものの有意な差は認められなかった ( $p=0.173$ )。依然 Under power ではあるものの、稀少疾患である本疾患でのさらなる症例数の追加は困難であることが予想され、現時点では Mad2 の発現は PTX の予後予測因子とはならないという結論とした。

続いて、甲状腺未分化癌を中心に甲状腺癌におけるヒストン修飾やその修飾遺伝子の発現解析を行った。初年度は、甲状腺未分化癌におけるヒストンの代表的なメチル化・アセチル化について検討した。その結果 H3K4me, H3K9me, H3K9ac, H3K27me, H3K36me については正常組織と腫瘍組織の間に一定の傾向は得られなかった。次に脱メチル化酵素として EZH2, MLL2, JARID1A, JARID1B を選択してその発現と悪性度・予後について検討したところ、陽性率はそれぞれ 40/46 (87.0%)、1/46 (2.2%)、4/46 (8.7%)、19/46 (41.3%) であった。MLL2, JARID1A, JARID1B に関しては一定の傾向が認められ

なかったが、EZH2 は Stage が上昇すると陽性率が高くなり (stageIVA; 40.0%, stageVIB; 91.3%, stageVIC; 94.4%)、高発現群では低発現群に比べて予後が悪い傾向にあった (p=0.158)。また、未分化癌組織で高発現しているものも正常濾胞細胞や同一組織内の乳頭癌細胞には発現が見られないという特徴が認められた。

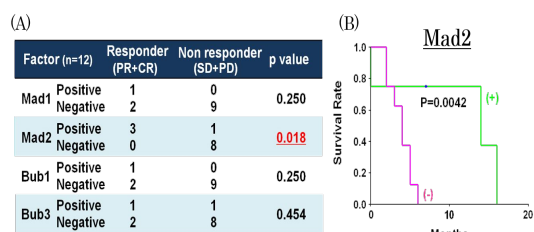
この結果をもとに、EZH2 をターゲットとして従来ある予後因子を含め、EZH2 の予後因子としての有用性について検討した。年齢、性別、腫瘍径、リンパ節転移、遠隔転移に EZH2 を加えて解析したところ、単変量・多変量解析ともに腫瘍径と遠隔転移は、自験例でも従来の報告にあるように予後因子となったが、EZH2 は予後因子とはならなかった (p=0.185)。ただし、ほとんどの未分化癌では EZH2 が高発現していたのに対して、正常濾胞細胞や未分化癌に付随した分化癌では発現がみられなかったことから、EZH2 の発現は甲状腺癌の悪性度と関連していることが予想された。このため、分化癌と未分化癌の中間の悪性度を持つ甲状腺低分化癌をターゲットとして、EZH2 の発現並びに予後因子としての有用性を解析した。甲状腺低分化癌には、日本甲状腺癌取り扱い規約第 6 版まで採用されていた坂本分類と、WHO 分類、Turin 分類の 3 つが存在し、後者になるにしたがって悪性度は高く、予後は悪くなることが知られている。そこで各分類における EZH2 の陽性率を調べてみると、17.9%、23.7%、30.8% となり、臨床的悪性度にしたがって陽性率が上昇してゆくことが判明した。またその発現率は、当初の予想通り分化癌 (0%) と未分化癌 (87.5%) の中間の値となった (Figure2)。続いて、未分化癌で解析したように、低分化癌でも従来報告されている予後因子に EZH2 を加えて解析したところ、遠隔転移と EZH2 の発現は単変量・多変量ともに有意な予後因子となった (Figure3)。

既存の予後因子と EZH2 との相関についての検討では、性別・年齢・腫瘍径・甲状腺被膜外浸潤・リンパ節転移・遠隔転移各因子と EZH2 発現との間には、甲状腺低分化癌・未分化癌ともに強い相関は認められず、甲状腺低分化癌では EZH2 の発現は独立した予後予測因子であった。さらに、細胞分裂や腫瘍増殖の指標となる Ki67 と EZH2 との間には甲状腺低分化癌、未分化癌ともに強い相関が認められた (低分化癌; 0.540、未分化癌; 0.676)。現在各症例の臨床データの追跡調査を行い、論文作成中である。また、上記検討から得られた結果をもとに、乳癌をはじめとする他癌種において同様の検討を行ったところ、EZH2 の発現と予後との間に関連があることが明らかとなりその一部を報告した。

上記実験内容から、ヒストンメチル化酵素 EZH2 は正常甲状腺組織や甲状腺高分化癌では発現していないのに対して、甲状腺低分化癌では 17.9%、甲状腺未分化癌では 87.5%と

癌の悪性度に比例して発現が高くなること、低分化癌では遠隔転移と EZH2 高発現が独立した予後予測因子であること、EZH2 の発現が Ki67 の発現と相関していることが明らかになった。現在複数の EZH2 阻害剤が開発されており、その一部はすでに血液がんを中心に臨床試験が開始されているが、固形がんでの臨床応用はされていない。今後は、甲状腺未分化癌細胞株を用いて EZH2 阻害剤による未分化癌細胞株の増殖抑制効果を XTT assay で検討するほか、培養細胞のマウス移植 Xenograft モデルを用いた薬剤の有効性の検討を行い、甲状腺癌の新たな治療法を検討していくとともに、乳がんなどの他の固形癌についても応用していく予定である。

(Figure1) 紡錘体チェックポイント因子の発現とパクリタキセル投与時の抗腫瘍効果・予後 (Preliminary data)



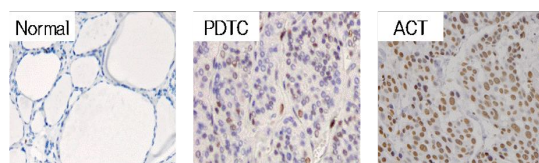
(A) 各因子と抗腫瘍効果

Mad2 高発現症例は低発現症例に比べ有意に奏効率が高かった。

(B) PTX 使用症例における Mad2 発現と未分化癌の予後

Mad2 高発現群 (+) では低発現群 (-) に比べ生存期間が延長した。

(Figure2) 各組織型における EZH2 の発現



Histological subtype	Negative	Positive
Normal	100% (30/30)	0.0% ( 0/30)
DTC	100% (30/30)	0.0% ( 0/30)
PDCT		
Japan	82.1% (55/67)	17.9% (12/67)
WHO	76.3% (29/38)	23.7% ( 9/38)
Turin	69.2% ( 9/13)	30.8% ( 4/13)
UTC	13.5% ( 6/48)	87.5% (42/48)

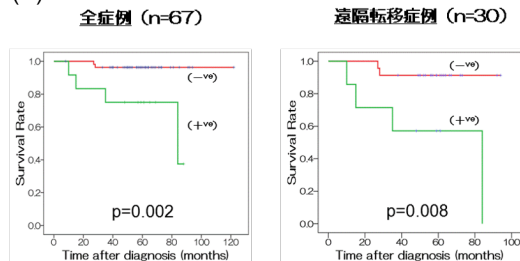
EZH2 の発現は 10%以上を陽性と定義した。EZH2 陽性率は悪性度に比例して上昇することが判明した。

(Figure3) 甲状腺低分化癌の予後予測因子

(A)

Factor	n	Univariate			Multivariate		
		HR	95% CI	p values	HR	95% CI	p values
Age(≥45)	52/67 (77.6%)	29.0	0.1-1424.16	0.437			
Gender(male)	26/67 (38.8%)	1.7	0.3-8.5	0.518			
T(≥4cm)	44/67 (65.7%)	5.2	0.5-56.8	0.179			
Ex2	2/67 (3.0%)	7.7	0.9-69.1	0.068	0.2	0.1-4.0	0.308
N1b	8/67 (11.9%)	1.2	0.1-10.9	0.858			
M1	17/67 (25.4%)	18.4	2.1-159.5	0.008	48.8	1.7-1379.7	0.023
EZH2(+)	12/67 (17.9%)	9.1	1.6-50.1	0.011	7.5	1.1-54.7	0.048
Ki-67	13/57 (22.8%)	12.6	1.4-114.6	0.024	excluded* <sup>1)</sup>		

(B)



(A)甲状腺低分化癌の予後予測因子

EZH2 の発現は遠隔転移(M)とともに有意な予後予測因子であった。

(B)EZH2 の発現と予後

全症例、遠隔転移症例のいずれも、EZH2 の発現は予後不良因子であった。

## 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2件)

1. Inari H, Suganuma N, Kawachi K, Yoshida T, Yamanaka T, Nakamura Y, Yoshihara M, Nakayama H, Yamanaka A, Masudo K, Oshima T, Yokose T, Rino Y, Shimizu S, Miyagi Y, Masuda M: Expression of enhancer of zeste homolog 2 correlates with survival outcome in patients with metastatic breast cancer: exploratory study using primary and paired metastatic lesions. BMC Cancer, 17(1):160, 2017. 査読有り

2. Onoda N, Sugino K, Higashiyama T, Kammori M, Toda K, Ito K, Yoshida A, Suganuma N, Nakashima N, Suzuki S, Tsukahara K, Noguchi H, Koizumi M, Nemoto T, Hara H, Miyauchi A, Sugitani I: The Safety and Efficacy of Weekly Paclitaxel Administration for Anaplastic Thyroid Cancer Patients: A Nationwide Prospective Study. Thyroid. 26(9):1293-1299, 2016. 査読有り

[学会発表](計4件)

1. Suganuma N, Yoshida A, Iwasaki H, Yoshida T, Yamanaka T, Miyagi Y, Ito K, Sugino K, Matsuzu K, Yamanaka A, Inari

H, Nakayama H, Rino Y, Masuda M: Enhancer of zeste homolog 2 expression and correlation with Ki-67 in thyroid carcinoma. 46th World Congress of Surgery Annual Meeting, Bangkok, Thailand, 2015,8.

2. Suganuma N, Yoshida A, Yoshida T, Nakayama H, Yamanaka T, Miyagi Y, Ito K, Sugino K, Matsuzu K, Yamanaka A, Inari H, Rino Y, Masuda M: Enhancer of zeste homolog 2 overexpression may correlate with outcomes in thyroid cancer. 38th European Thyroid Association (ETA) Annual Meeting, Santiago de Compostela, Spain, 2014,9.

3. 菅沼伸康, 吉田 明, 宮城洋平, 中村圭靖, 伊藤公一, 杉野公則, 赤石純子, 近藤哲夫, 嶋田裕子, 山中 歩, 益戸功彦, 利野 靖, 益田宗孝: 甲状腺低分化癌におけるヒストン修飾酵素 (EZH2) の発現と悪性度・予後に関する検討. 第 26 回日本内分泌外科学会総会, 名古屋マリオットアソシアホテル (名古屋市), 2014.5.

4. 菅沼伸康, 岩崎博幸, 清水 哲, 稲葉将陽, 吉田達也, 山中隆司, 小島いずみ, 岡本浩直, 宮城洋平, 吉田 明, 利野 靖, 益田宗孝: 甲状腺癌におけるヒストン修飾酵素発現検討. 第 13 回日本臨床腫瘍学会総会, ロイトン札幌・ホテルさっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館 (札幌市), 2015,7.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

菅沼 伸康 (SUGANUMA, Nobuyasu)  
横浜市立大学・医学系研究科・客員研究員  
研究者番号: 40724927

(2)研究分担者

益田 宗孝 (MASUDA, Munetaka)  
横浜市立大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 10190365

利野 靖 (RINO, Yasushi)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50254206

益戸 功彦 (MASUDO, Katsuhiko)  
横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教  
研究者番号: 10404972

山中 歩 (YAMANAKA, Ayumi)  
横浜市立大学・附属病院・指導診療医  
研究者番号: 00728339

宮城 洋平 (MIYAGI, Youhei)  
地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈  
川県立がんセンター (臨床研究所)・がん分  
子病態学部  
研究者番号 : 00254194