

安井和明 論文内容の要旨

主 論 文

SNAIL Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell-Like Properties in Aldehyde Dehydrogenase-Negative Thyroid Cancer Cells

甲状腺癌細胞における SNAIL 誘導上皮間葉移行と
ALDH 陰性分画における癌幹細胞様特性

安井 和明、嶋村 美加、光武 範吏、永山 雄二

Thyroid・23 巻 8 号 989-996 2013 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(主任指導教員：永山雄二教授)

緒 言

癌転移は多段階の過程を経て行われるが、その過程の中で上皮間葉移行 epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。また、EMT が誘導された癌細胞は癌幹細胞 cancer stem cell (CSC) の性質を獲得するとの報告がある。しかし、甲状腺癌では CSC と EMT の関連はよく分かっていないため、本研究では、甲状腺癌における CSC と EMT の関連について検討した。

対象と方法

5-5種類の甲状腺癌細胞株 (ACT-1、FRO、TPC1、KTC-2、KTC-3) で EMT 誘導の有無を検討した。上皮系の形質を保っているヒト甲状腺癌細胞株に①transforming growth factor- β (TGF- β) を作用させる、②変異 Braf 遺伝子を発現させた後に TGF- β を作用させる、③SNAIL を過剰発現させることによって EMT 誘導を試みた。EMT 誘導の指標としては、上皮系のマーカーである E-cadherin の消失、間葉系のマーカーである vimentin の発現、敷石状から紡錘状の形態変化、遊走能の上昇を用いた。

また、EMT が誘導された甲状腺癌細胞が CSC の形質を獲得しているかどうかを確認するために、*in vitro* では細胞増殖、抗癌剤への感受性、sphere 形成能、癌幹細胞マーカーについて検討し、*in vivo* では腫瘍形成能について検討した。

結 果

5-5種類の甲状腺癌細胞株であるACT-1、FRO、TPC1、KTC-2、KTC-3がどのような形質を有しているかを検討したところ、ACT-1のみが上皮系の形質を保持していた。

ACT-1にEMTを誘導するために、①TGF- β を作用させたが、EMTは誘導できなかった。次に、②ACT-1に変異Braf遺伝子発現後にTGF- β を作用させると、SMAD 2/3の核への移行を認め、vimentinの軽度発現がみられたが、E-cadherinは細胞間に発現しており、EMTは誘導できなかった。そこで、③ACT-1にSNAILを過剰発現させたところ(ACT-SNAIL)、multiplicity of infection (MOI)が1:3以上でEMTを誘導することができた。

次にEMTとCSCの関係を調べるために、EMTが誘導されたACT-SNAILとACT-1とでCSCの性質を比較した。まず、細胞増殖については、倍加時間がACT-1で24.2時間、ACT-SNAILで28.5時間でありACT-SNAILのほうが増殖は遅かったが、有意差は認めなかった。次に、抗癌剤の感受性について、5-FU、ドキソルビシンを用いて検討したが、有意差は認めなかった。

腫瘍形成能を比較するために、sphere形成能を比較したところ、ACT-SNAILはACT-1に比べて約3倍のsphere形成能を認めた。次に*in vivo*での腫瘍形成能をみるために、ヌードマウスにACT-1とACT-SNAILを皮下注射したが、両者に有意差は認めなかった。sphere形成能での差が小さいために、*in vivo*では両者の差を検出できなかったと考えられた。

ACT-1では、過去の報告と同様に、甲状腺癌幹細胞のマーカーである aldehyde dehydrogenase (ALDH)活性が陽性(ALDH+)の細胞がより多くのsphereを形成することができた。しかし、ACT-1とACT-SNAILでALDH活性を調べたところ、ALDH+の割合は、ACT-1で23.4%、ACT-SNAILで5.2%と、ACT-SNAILで減少していることがわかった。そこで、ALDH陰性(ALDH-)とALDH+の細胞でそれぞれsphere形成能を検討したところ、ALDH+細胞では、ACT-1とACT-SNAILにsphere形成能に差がみられなかったが、ALDH-細胞では、ACT-SNAILがACT-1に比べて約10倍sphere形成能が上昇し、ACT-SNAILでは、むしろ、ALDH-細胞のほうがALDH+細胞よりもsphere形成能が高かった。また、ACT-SNAILでは、ALDH+細胞とALDH-細胞でSNAIL発現に差は認めなかった。

考 察

3種類の方法でACT-1にEMTの誘導を試みたが、SNAILの過剰発現でのみEMTを誘導することができた。他の方法によってEMTが誘導できなかった理由として、TGF- β によってSMAD 2/3の核への移行を認めることから、ACT-1がTGF- β 経路に、まだ知られていない、なんらかの異常を有していることが示唆された。また、ACT-1はN-ras遺伝子の変異をもつことが知られており、N-RAS経路がBRAF経路になんらかの影響を及ぼした可能性も考えられた。

EMT誘導によって、ALDH-細胞でのみsphere形成能が高くなったことから、CSCとEMTはALDH-細胞でのみ関連していると考えられ、EMTが誘導される癌の浸潤部などではALDH活性がCSCの指標でなくなることが示唆された。