

# 甲状腺ホルモン受容体突然変異と甲状腺癌の発生

シューヤン チェン

米国 国立がん研究所

おはようございます。まず、この会議を主催し、私を招聘してくださった主催者方々と環境省にお礼を申し上げます。参加できてたいへん嬉しく思います。

このスライドに示しましたのが、本日私がお話することの概略です。簡単な序論の後に、甲状腺ホルモン受容体の変異とヒトの癌との間に密接な関係のあることを示したいいくつかの代表的な研究についてお話しします。それから、私どものところにしかない甲状腺癌発生モデルマウスについてお話しします。このマウスは、TR $\beta$ <sup>PV/PV</sup>マウスと言います。さらに続いて、甲状腺癌発生に関する既知のゲノムデータについて述べ、最後に、TR $\beta$ <sup>PV/PV</sup>マウスから得られた甲状腺癌発生の新知見について簡単にまとめます。

このスライドは、甲状腺ホルモン受容体のアイソフォームを比較した図です。私の前に講演された妹尾教授などから、すでに TR アイソフォームについての話が出ていますので、私はこのスライドについては時間を割きませんが、ひとつだけ申し上げておくと、TR $\beta$  遺伝子の変異によって甲状腺ホルモン不応症という遺伝子疾患が引き起こされることが分かっています。

しかし、TR $\beta$  遺伝子の変異によって、癌などその他の疾患がヒトに起きるかどうかはまだ分かっていません。しかし、ここ何年かの研究によって、TR $\beta$  遺伝子の変異が、ヒトの癌において重要な役割を果たしている可能性のあることが示されています。例えば、3p21-p25 のヘテロ接合体の欠失は、小細胞性肺癌の最大 100%に見られます。3p21-p25 は TR $\beta$  遺伝子が存在する場所であることを覚えておいてください。

それと同じ領域のヘテロ接合体の欠失が、非家族性の腎明細胞癌においても最大 64%に見られます。類似の領域のヘテロ接合体の欠失は、非侵襲性乳癌においても 75%で見られます。最近では、原発性乳癌 11 症例のうち 11 症例すべてに、過剰メチル化による TR $\beta$  遺伝子の不活性化が見つかっています。

こうした研究から、TR $\beta$  遺伝子が腫瘍抑制剤として働いている可能性が浮かんできました。また、私たちは他の研究者と共同研究において、TR $\beta$  変異がヒトの癌のいくつかのタイプと密接な関連性を持っていることを発見しました。この研究では、TR $\beta$  遺伝子の変異が、肝細胞癌の 76%で見られました。別の研究では、TR $\beta$  遺伝子の変異が腎の明細胞癌の 31%で見られました。最近では、TR $\beta$  遺伝子の変異が甲状腺の乳頭癌の 94%にも見られるが、腺腫には 8%しか見られないという発見がなされ、私たちは非常に興奮しました。

しかしながらこうした研究は、TR $\beta$  遺伝子の変異が体細胞変異に由来したものである点を指摘しておかなければなりません。こうした腫瘍で見られる TR $\beta$  変異遺伝子は、機能が障害されています。その多くが T3 結合能を失っており、転写機能も失っています。さらに、DNA 結合能も異常になっている場合もあり、多くがドミナントネガティブに働きます。

ただし、これらの研究のいずれにおいても、こうした腫瘍の発生の TR $\beta$  遺伝子の変異がどのように関わっているのかは謎のままです。ですから明らかに、癌発症における TR $\beta$  遺伝子の変異の意義を研究するためには、マウスのモデルを得る必要があるわけです。

そのために私たちは、甲状腺癌発生の研究に用いることが可能なマウスモデルを独自に開発しました。このマウスは、TR $\beta$  遺伝子に変異があり、私たちは、この変異を PV と呼んでいます。PV は米国の国立衛生研究所 (NIH) の患者で見つかりました。この患者は、TR $\beta$  遺伝子に変異がひとつあり、甲状腺ホルモン不応症に罹っていました。では、PV とはどのような変異なのでしょう。

PV は、TR $\beta$  の C 末端領域にある変異で、コドン 448 の位置にシトシン挿入が起こったものです。この挿入によって、C 末端の 14 個のアミノ酸にフレームシフト変異が起こります。その結果、この図に示されるように、変異型配列は野生型配列と違うものになります。

このスライドは、PV 変異による機能面での変化について示したものです。PV は T3 結合能を完全に喪失し、転写能を完全に喪失します。特に重要なのは、PV が強いドミナントネガティブ活性を示す点です。

PVの機能面でのこうした変化は、先ほどお話ししたヒトの腫瘍で見られる TR $\beta$  変異にそっくりであることに注意してください。

このスライドは、TR $\beta$ の遺伝子座をターゲットに PV 変異を導入した方法を図示したものです。PV 変異を、ポリ A テール下流にあるエクソン 10 に導入し、ネオマイシン抵抗性 (NeoR) 遺伝子の両側を 2 個の loxP 配列で挟みます。相同組換えをすると、PV 変異がエクソン 10 に導入されます。

しかし予備実験によると、スクリーニングの際に重要であるこの NeoR 遺伝子の発現が PV 遺伝子の発現に干渉することが分かりました。そこでこのマウスを、組換え前の発現をするトランスジェニックマウスと交配させて、NeoR 遺伝子を *in vivo* で消去しました。その交配で生まれた子個体は、NeoR 遺伝子は持っていませんが、PV 遺伝子は依然として持っています。これを TR $\beta$  PV マウスと名付けました。

この表現型の特徴を徹底的に調べると、ホモ接合型の TR $\beta$ <sup>PV/PV</sup> マウスは下垂体甲状腺系に重度の機能不全を示すことが分かりました。すなわち、下垂体甲状腺系の負のフィードバックが重度に障害されており、そのために、このマウスは甲状腺ホルモンの血中濃度が上昇します。ところが、甲状腺ホルモンが 10 倍から 15 倍になっても、TSH の合成や分泌を抑制することができません。

そのために、このマウスの TSH レベルは 400 から 500 倍にまで上昇します。また、甲状腺が肥大して、乳頭状の過形成を起こします。このマウスは、加齢すると生存率が低くなります。

このスライドにありますように、14 ヶ月齢では 20%のマウスしか生存しません。反対に、ヘテロ接合体の TR $\beta$  PV マウスは、同月齢で 95%以上が生存します。死亡したのはわずか 2 個体のみであり、しかもその 2 個体に甲状腺の異常はまったくありませんでした。ここにあるように、野生型のマウスには死亡例はありませんでした。

これら死亡マウスを調べてみると、甲状腺癌が発生していることが分かりました。形態学的検査によれば、これらのマウスは加齢するにつれ、5 ヶ月齢に入ると、甲状腺の乳頭状の過形成に加えて被膜浸潤が発生しました。そのすぐ後には、血管浸潤と未分化癌も認められるようになり、9 ヶ月齢に入ると肺および心臓への転移が起きました。しかし、リンパ節への転移が無かった点は注目すべきです。

これらのマウスの転移のほとんどは、濾胞状の形態を示していましたが、一部の例では、未分化癌の形態になっているものもありました。

これが、5~14 ヶ月齢の TR $\beta$ <sup>PV/P</sup> マウスにおける甲状腺新生物の組織学的変化をまとめたものです。私たちが調べたマウスの全個体に過形成が発生し、91%に被膜浸潤が、74%に血管浸潤が、35%に未分化癌が、30%に転移が起きました。

こうしたデータから分かるのは、甲状腺癌発生の過程は病理学的変化を経て進行するということです。私たちのマウスは、甲状腺癌のモデルマウスとしては高頻度に転移を示す初めてのものです。

これからの 2 枚のスライドで、これらマウスの病理学的変化の例をお見せします。これが甲状腺の被膜浸潤の例です。これが血管浸潤の例で、腫瘍細胞が脈管系に浸潤しています。これが未分化癌の例で、こちらは甲状腺癌病変が肺に転移した例で、とくに濾胞状のパターンを示しているものです。

これは、乳頭状過形成の例で、それを強拡大にすると、紡錘細胞からなる未分化癌が見られます。こちらは、別の肺の転移と未分化癌の例です。こちらは心臓への転移です。

形態学的パターンと転移像に基づき、私たちの TR $\beta$ <sup>PV/PV</sup> マウスに発生した甲状腺腫瘍は濾胞性癌であると結論しました。この変異マウスが、過形成から遠隔臓器転移に至るまでの癌発生のすべての像を示したことに、私たちはたいへん興奮しました。というのもこのマウスが、腫瘍発生と転移における遺伝子制御の変化を研究するためのこれまでにない手段になりうるからです。

私たちは、腫瘍発生の過程と転移における遺伝子の発現変化を明らかにするために、マイクロアレイを用いることにしました。私たちが用いた cDNA マイクロアレイには、22,000 個の遺伝子が含まれています。これからの何枚かのスライドでお見せするのは、6 ヶ月齢の野生型と変異型のマウスにおける mRNA 発現を比較したもので、未発表データです。

これにあるように、22,000 個の遺伝子のうち、200 個の遺伝子が 2 倍から 17 倍にアップレギュレーションされており、95 個の遺伝子が 2 分の 1 から 20 分の 1 にダウンレギュレーションされています。アップレギュレーションされた遺伝子のうち 55%は既知の遺伝子であり、45%は未知の遺伝子でした。その一例

のサイクリン D1 は、8 倍にアップレギュレーションされました。ご存知だと思いますが、サイクリン D1 は細胞周期の非常に重要な制御遺伝子であり、甲状腺癌を含む多くの種類の癌でこのサイクリン D1 遺伝子が過剰発現することが分かっています。

ダウンレギュレーションされた遺伝子のうち、64%は既知の遺伝子であり、36%は未知の遺伝子でした。さらに、生物学的機能について判明している遺伝子をグループ分けしてみると、甲状腺癌発生に関与する細胞内経路について若干の知見が得られました。

残念ながら、時間が限られていますので、いろいろな機能グループのすべての遺伝子をお見せすることはできませんが、甲状腺癌発生の際には、これらサイクリン経路が活性化されたり抑制されたりしていることが遺伝子の特性に基づいて分かりました。

ここにありますように、TSH のサイクリン経路がアップレギュレーションされており、同様に、TGF- $\beta$  経路、PKC、Notch、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ /INF $\gamma$ 、TGF $\alpha$ /EGF、Ras がアップレギュレーションされています。Bcl2 と PPAR $\gamma$  の経路はダウンレギュレーションされていることが分かりました。このように表にすると、甲状腺癌発生に関与する複雑な細胞内経路が明瞭になります。

PV の発現はこうした経路の一部もしくはすべてに対してどのように影響を及ぼすのかということが、重大な問題になります。アレイのデータに基づき私たちは、これら複雑な経路を整理して、PV の作用との関連性の解明を試みました。その手はじめとして、PPAR $\gamma$  をまず調べることにしました。PPAR とはどのようなものでしょうか？

PPAR とは、ペルオキシソーム増殖薬応答性受容体のことです。核内受容体スーパーファミリーに属しています。このスーパーファミリーに属する他の受容体と同様に、PPAR もアミノ末端の AF ドメイン、C の DNA 結合ドメイン、リガンド結合ドメインがあります。PPAR には主なサブタイプが 3 種類あります。PPAR $\alpha$  は主に脂質代謝に関わっています。PPAR $\beta$  は主に発生と、胚の着床に関わっています。PPAR $\gamma$  は主に脂肪細胞の分化にかかわっています。ところがおもしろいことに、この PPAR $\gamma$  は癌発生にも関与している可能性のあることが近頃発見されました。

私たちが PPAR $\gamma$  を調べることにした理由のひとつは、クローラの「ヒトの甲状腺癌における PAX8-PPAR $\gamma$  融合癌遺伝子」という論文がサイエンス誌に発表されて以来、甲状腺癌発生における PPAR $\gamma$  の役割の解明が近頃大きな関心の対象になっているからです。PAX8 については、すでに話しをお聴きになったと思います。

クローラは、ここに示したような PAX8 と PPAR $\gamma$  の融合遺伝子の mRNA とタンパク質は、甲状腺の濾胞状癌の 8 分の 5 で発現するが、濾胞状腺腫 20 個、乳頭癌 10 個、多結節性過形成 10 個のいずれにおいても発現しないことを明らかにしました。すなわち、濾胞状癌にきわめて特異的な現象です。

またクローラは、PAX8-PPAR $\gamma$  が発現すると、PPAR $\gamma$  によるチアゾリジネジオン誘導性転写活性化が、ドミナントネガティブの様式で抑制されることを見いだしました。チアゾリジネジオンは PPAR $\gamma$  のリガンドです。彼らは、甲状腺濾胞状癌において PPAR $\gamma$  が癌遺伝子のように振る舞っていると主張しています。

すでに示しましたように、私たちの TR $\beta$ <sup>PV/PV</sup> マウスには濾胞状癌がすでに出現しています。そこで私たちのマウスの甲状腺において PPAR $\gamma$  の発現状態が変化しているのかどうかを調べることにしました。

これが、野生型マウス 6 個体の PPAR $\gamma$  の発現の様子で、こちらは私たちの変異マウスの PPAR $\gamma$  発現が減少した様子です。このグラフは、定量化と標準化した後のコントロールです。

以上の結果は、PV が PPAR $\gamma$  の発現を抑制するように働いている可能性があることを示しています。しかし、PV は PPAR $\gamma$  の転写活性に干渉するように働いている可能性もあると、私たちは考えました。実際私たちは、PV が PPAR $\gamma$  のリガンド依存性転写活性を抑制することを見いだしました。

これは、野生型マウスの甲状腺の主細胞を用いた実験です。リガンドであるトログリタゾンが存在しない状態を初期値として、トログリタゾン存在下での PPAR $\gamma$  の転写活性を示したのがこのバーです。PV を同時に形質導入すると、PPAR $\gamma$  のリガンド依存性転写活性が無効になって初期値レベルにまで下がりました。

以上の私たちのデータを合わせると、PV は PPAR $\gamma$  に対して 2 つの機能的役割を持っていることが分かります。発現の抑制が 1 つ目で、リガンド依存性転写活性の抑制が 2 つ目です。したがって、甲状腺癌発生の際には PPAR $\gamma$  の発現と活性が低いままであることが重要なポイントだと言えるでしょう。

現時点では、甲状腺における PPAR $\gamma$  の厳密な役割はまだ明確になっていません。しかし、リガンドによる PPAR $\gamma$  活性化によって、ヒトの乳癌、結腸癌、前立腺癌において増殖の抑制とアポトーシスの誘導が起きることが、*in vitro* および *in vivo* で明らかにされています。

いくつかの種類のヒト甲状腺癌細胞培養系列においては、PPAR $\gamma$  に対するリガンドによって増殖の抑制とアポトーシスの誘導が起きることが示されています。したがって、甲状腺濾胞状癌において PPAR $\gamma$  は、腫瘍抑制遺伝子として働いている可能性があると考えられます。こうした所見と私たち自身のデータに基づけば、私たちの TR $\beta^{PV/PV}$  マウスを利用することで、甲状腺癌発生における PPAR $\gamma$  の役割をさらに解明する道が開けたこととなります。

私たちは現在、このマウスにおいて PPAR $\gamma$  の信号伝達経路が活性化することで腫瘍発生過程に変化が起こるかどうかを調べるために、このマウスを PPAR $\gamma$  アゴニストで治療できるかどうかを考えています。

これが本日の私の講演の最後のポイントです。甲状腺癌発生について TR $\beta^{PV/PV}$  マウスから分かったことは何でしょうか。

甲状腺癌は、被膜浸潤、血管浸潤、未分化型変異、最後には転移という一連の過程をもって発生することが分かりました。また、甲状腺癌発生においては、PPAR $\gamma$  と、PV が関与する信号伝達経路がともに働くことがたいへん重要であることが分かりました。甲状腺癌発生は多遺伝子的な事象であることも分かりました。

TR $\beta$  遺伝子の変異は、とても広義な意味での甲状腺攪乱因子であるとみなすことができるでしょう。そうした攪乱によって癌が引き起こされる可能性のあることを、私たちのデータが示しています。

結論です。TR $\beta^{PV/PV}$  マウスは、甲状腺癌発生が基づく分子遺伝子学を明らかにするのに有用なモデルであり、診断に使える特徴遺伝子を得るためにも利用できます。また、TR $\beta^{PV/PV}$  マウスは、薬物の試験や治療戦略の決定にも利用する道があると私たちは考えています。

ここで、私たちの研究室の共同研究者たちに謝意を述べたいと思います。本日私がお話しした仕事の大部分はスズキ・ヒデオ氏とハオ・イン氏が行いました。さらに、私たちの研究室での TR $\beta^{PV}$  マウスの作成には、カネシゲ・マサヒロ氏とカネシゲ・クミコ氏が携わってくれました。ウェーク・フォレスト大学のマーク・ウィリアム氏が組織学的分析のすべてを、国立ヒトゲノム研究所のロバート・ウォーカー氏とポール・メルツァー氏がアレイ分析の手助けをしてくれました。

ご静聴ありがとうございました。コメントをお受けしたいと思います。