

甲状腺腫瘍組織における転写抑制因子PLZFの 発現パターンについての検討

鳥取大学医学部統合内科医学講座病態情報内科学分野（主任 山本一博教授）

松澤和彦

Transcriptional repressor PLZF is differentially expressed in thyroid neoplasm, reflecting the impairment of follicular formation

Kazuhiko MATSUZAWA

Division of Endocrinology and Metabolism

*Department of Molecular Medicine and Therapeutics Faculty of Medicine,
Tottori University 36-1 Nishi-machi, Yonago, Tottori, 683-8504, Japan*

ABSTRACT

PLZF (Promyelocytic Leukemia Zn Finger) is a transcriptional repressor which is originally isolated from a patient with promyelocytic leukemia. Moreover, PLZF affects the key element of cell cycle progression such as cyclinA. So far, the functional role of PLZF in thyroid cells remains unclear. In this study, we analyzed the expression profile of PLZF in thyroid neoplasms. We estimated PLZF expression in normal thyroid (n=6), multinodular goiter (n=4), follicular adenoma (n=3), follicular carcinoma (n=1), papillary carcinoma (n=18) and anaplastic carcinoma (n=3). PLZF expression was estimated by immunohistochemical staining and western blotting. In all of papillary carcinoma, PLZF is expressed in cytosol with high intensity. In contrast, in normal thyroid, follicular adenoma and follicular carcinoma, PLZF is localized in nucleus. We speculate that the intracellular translocation of PLZF reflects the differentiation between benign and malignancy. Although follicular carcinoma is malignant tissue, its PLZF expression pattern was same as benign thyroid tissues. Then differentiation of PLZF expression in follicular carcinoma from papillary carcinoma and anaplastic carcinoma is due to retaining follicular structure. We presume that PLZF expression in nucleus could be related to the maintenance of follicular structure.

(Accepted on December 14, 2011)

Key words : PLZF, thyroid neoplasm, tumorigenesis, folliculogenesis

はじめに

甲状腺癌は内分泌癌の中で最も多い癌であり、急速に患者数が増えている癌の一つである^{1,2)}。高

分化癌とされる乳頭癌や濾胞癌では患者の大多数は適切な治療を受け良好な経過を経る。しかし、高分化癌とされる一部の癌ではヨード取り込みの活性を失い、甲状腺特異的機能の脱分化をきたし

再発、死亡に至る。そのため、甲状腺の癌化に対するより深い病態解明と予後不良な症例に対する治療の改善が求められている。

甲状腺癌の新たな治療として活性型ビタミンA (ATRA) が候補として考えられている。ATRA投与により分化を失ったtype1 5'deiodinase⁹⁾, NISmRNA, ヨード取り込み¹⁰⁾, ICAM-1 の再分化⁹⁾ が得られている。ヨード取り込みの改善が得られれば放射性ヨード治療の適応に結びつく。実際の臨床試験でも効果が確認されている⁹⁾。しかし、ATRAに反応の得られない症例も数多く存在している。ATRAは前骨髄性白血病 (APL) で90%以上の寛解が得られる治療として確立しているがAPLでもATRA治療抵抗性の症例がみられ、それらの症例ではAPLで多くみられるPML-RAR (retinoic acid receptor alpha) 融合遺伝子ではなく、PLZF-RAR融合遺伝子が確認されている⁷⁾。PLZF-RARではATRA療法への反応性が全く見られない。甲状腺癌でもATRA療法への反応性の違いがみられていることから、甲状腺癌におけるPLZFの発現に注目した。

APLにおいてPLZFはRARと融合遺伝子を作ることで治療抵抗性を獲得する⁸⁾、一方でwild type PLZFはBTB/POZ familyの一員であり、CyclinAやIL3Rを標的因子とした転写抑制因子とされ、近年c-mycなど癌遺伝子に抑制的に働くことや核に発現しアポトーシスを促進することが報告されている^{9,10)}。

これらの知見はPLZFが癌化と密接に関連した蛋白であることを示したものであるが、今まで甲状腺癌に関しては、PLZFの発現、機能についての報告は無い。我々は甲状腺組織においてPLZFが核で発現することにより癌化を抑制している可能性を考え、甲状腺各組織におけるPLZFの発現、局在の違いを調べた。

材料および方法

ヒト組織

すべての患者組織はヘルシンキ宣言を遵守した鳥取大学医学部倫理委員会に則り得たものである。甲状腺組織は外科治療を受けた患者検体を用いている。疾患は以下のとおりである。正常甲状腺6例、腺腫様甲状腺腫4例、濾胞腺腫3例、濾胞癌1例、乳頭癌18例、未分化癌3例。これら症例のうち、正常甲状腺2例 (症例1, 2)、腺腫様甲状腺

腫3例 (症例3~5)、乳頭癌6例 (症例6~11) でウエスタンブロットを行い、正常甲状腺4例 (症例12~15)、腺腫様甲状腺腫1例 (症例16)、濾胞腺腫3例 (症例17~19)、濾胞癌1例 (症例20)、乳頭癌12例 (症例21~32)、未分化癌3例 (症例33~35) で免疫染色を行った。対象患者背景を表1に示す。年齢は55.2±16.1歳、男性9例、女性26例、濾胞癌症例では椎骨への転移があり、乳頭癌症例ではリンパ節転移4例、遠隔転移症例は無く、未分化癌では3例ともにリンパ節転移を認めたが遠隔転移は見られなかった。

ウエスタンブロット

甲状腺組織を300μlのRIPA buffer (1%Nodient P-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% Sodium dodecyl sulfate in PBS with protease inhibitor cocktail) で均質にし、4℃, 15000rpm, 20分で遠心分離を行った。上澄み液を細胞抽出液として使用した。各細胞抽出液10μgを10%SDS-PAGEにロードしメンブレン上にブロットした。メンブレン上にブロットされた蛋白は0.05% Tween20, 5% nonfat dried milkを加えたトリス緩衝液でブロックされたニトロセルロース膜へtransferした。200倍希釈の抗PLZF抗体 (rabbit) で反応した。これらの膜をPLZFに対して抗ウサギ抗体を2次抗体として使用した。2次抗体反応後enhanced chemiluminescenceを用いて蛋白の検出を行った。

発現強度を比較するために症例1を基準としPLZF/ β -actin比をデンスitomーターを用いて数値化した。

免疫染色

パラフィン包埋組織を4μmの厚さに切断し、キシレンで脱パラフィンし、アルコールで脱水化を行った。電磁波により抗原賦活化し、内因性ペルオキシダーゼ活性を過酸化水素でブロックした。抗PLZF抗体による反応を4℃ 12時間行い、続いてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体を常温で30分反応した。各標本を3, 3'-diaminobenzidineで発色反応させた。対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。各標本は100倍率の光学顕微鏡で観察した。すべての標本に対して2名の共同研究者により核、細胞質それぞれの染色の強度、拡がりを主観的に4段階 (0,

表1 対象患者背景

A. ウェスタンブロット施行症例一覧

症例	年齢	性別	組織型	リンパ節転移	遠隔転移
1	49	男性	正常甲状腺	なし	なし
2	57	女性	正常甲状腺	なし	なし
3	47	女性	腺腫様甲状腺腫	なし	なし
4	20	女性	腺腫様甲状腺腫	なし	なし
5	48	女性	腺腫様甲状腺腫	なし	なし
6	67	女性	乳頭癌	あり	なし
7	35	女性	乳頭癌	あり	なし
8	73	男性	乳頭癌	なし	なし
9	34	女性	乳頭癌	あり	なし
10	56	女性	乳頭癌	なし	なし
11	54	男性	乳頭癌	あり	なし

B. 免疫染色施行症例一覧

症例	年齢	性別	組織型	リンパ節転移	遠隔転移
12	67	女性	正常甲状腺	なし	なし
13	73	男性	正常甲状腺	なし	なし
14	34	女性	正常甲状腺	なし	なし
15	56	女性	正常甲状腺	なし	なし
16	47	女性	腺腫様甲状腺腫	なし	なし
17	41	女性	濾胞腺腫	なし	なし
18	45	男性	濾胞腺腫	なし	なし
19	65	女性	濾胞腺腫	なし	なし
20	73	男性	濾胞癌	なし	あり
21	37	女性	乳頭癌	なし	なし
22	68	女性	乳頭癌	なし	なし
23	56	女性	乳頭癌	なし	なし
24	53	女性	乳頭癌	なし	なし
25	56	男性	乳頭癌	なし	なし
26	64	女性	乳頭癌	なし	なし
27	80	女性	乳頭癌	なし	なし
28	58	男性	乳頭癌	あり	なし
29	90	女性	乳頭癌	あり	なし
30	41	女性	乳頭癌	なし	なし
31	62	女性	乳頭癌	なし	なし
32	23	女性	乳頭癌	なし	なし
33	71	女性	未分化癌	あり	なし
34	56	男性	未分化癌	あり	なし
35	77	女性	未分化癌	あり	なし

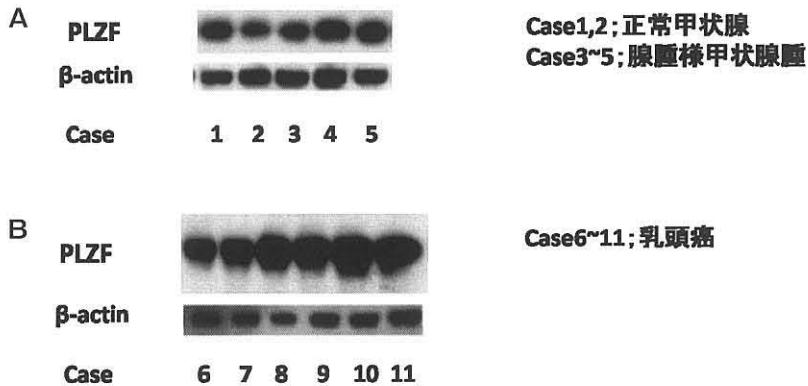


図1 甲状腺組織におけるPLZFの発現.

正常甲状腺, 腺腫様甲状腺腫 (A), 乳頭癌 (B) におけるPLZFの発現. 各組織抽出液より10 μ g蛋白をロードし, 抗PLZF抗体を用いてウエスタンブロットを施行.

1+, 2+, 3+) に分けて評価を行った. 免疫反応の広がりか25%以下の細胞で見られないものを1+, 25%~75%の細胞で見られるものを2+, 75%以上の細胞で見られるものを3+とした. 最終評価は各標本の2名の共同研究者の点数を合計し5段階に分類した. 0あるいは1+のものを0, 2+のものを1, 3+のものを2, 4+のものを3, 5+以上のものを4とした.

有意差検定

デンストメーターによるPLZF/ β -actin比発現量の比較はTukey一元配置分散分析により比較した. 免疫染色による各組織における, 細胞質, 核でのPLZF発現強度の違いをSpearman t検定により比較した. 分析には統計パッケージSPSS ver.18.0を用い, 有意水準は $p < 0.05$ とした.

結 果

甲状腺組織でのPLZFの発現

正常甲状腺と比較して乳頭癌は全例でPLZFの強い発現がみられた (図1B). 腺腫様甲状腺腫でもPLZFの発現を認めたが正常甲状腺と比較して同程度の発現量であり, 乳頭癌と比較して発現は弱かった (図1A). デンストメーターでの数値は正常甲状腺 0.85 ± 0.247 , 腺腫様甲状腺腫 0.83 ± 0.157 , 乳頭癌 1.816 ± 0.197 であり, 乳頭癌では正常甲状腺, 腺腫様甲状腺腫と比較して有意にPLZF発現量が増強していた. 正常甲状腺と腺腫様甲状腺腫の間に有意な差は認めなかった. 乳頭

癌において転移の有無とPLZFの発現量の間に関連は見られなかった.

甲状腺組織におけるPLZFの局在

免疫染色を施行し, PLZFの細胞内発現について検討を行った.

正常甲状腺では核, 細胞質ともに染色される細胞が大部分であり, 染色強度は核でより強く見られた (図2A). 染色スコアは核 3.25 ± 0.5 , 細胞質 0.5 ± 0.57 と有意に核での染色強度の増強が確認された.

腺腫様甲状腺腫 (図2B), 濾胞腺腫 (図2C), 濾胞癌 (図2D) では, 染色スコアは核 3.6 ± 0.54 , 細胞質 1.2 ± 0.83 であり, 正常甲状腺と比較して全体的に染色強度は強く, 細胞質での発現も強かったが, 核に有意に発現する染色パターンとしては正常甲状腺と同様であった.

乳頭癌では核での染色は大部分の細胞で染色は確認されず, 細胞質で強い染色を示した. 染色スコアは核 0.25 ± 0.45 , 細胞質 3.66 ± 0.49 と細胞質の染色強度の増強が明らかであった.

未分化癌では, 核で染色される細胞は見られず, 細胞質に強い染色を示した. 染色スコアは核0, 細胞質 3.66 ± 0.57 と細胞質の染色強度の増強が明らかであった. 染色パターンとしては乳頭癌と同様であった.

以上の結果より正常甲状腺, 腺腫様甲状腺腫, 濾胞腺腫, 濾胞癌では核に強く発現し, 乳頭癌, 未分化癌では細胞質に強く発現しており, 組織の

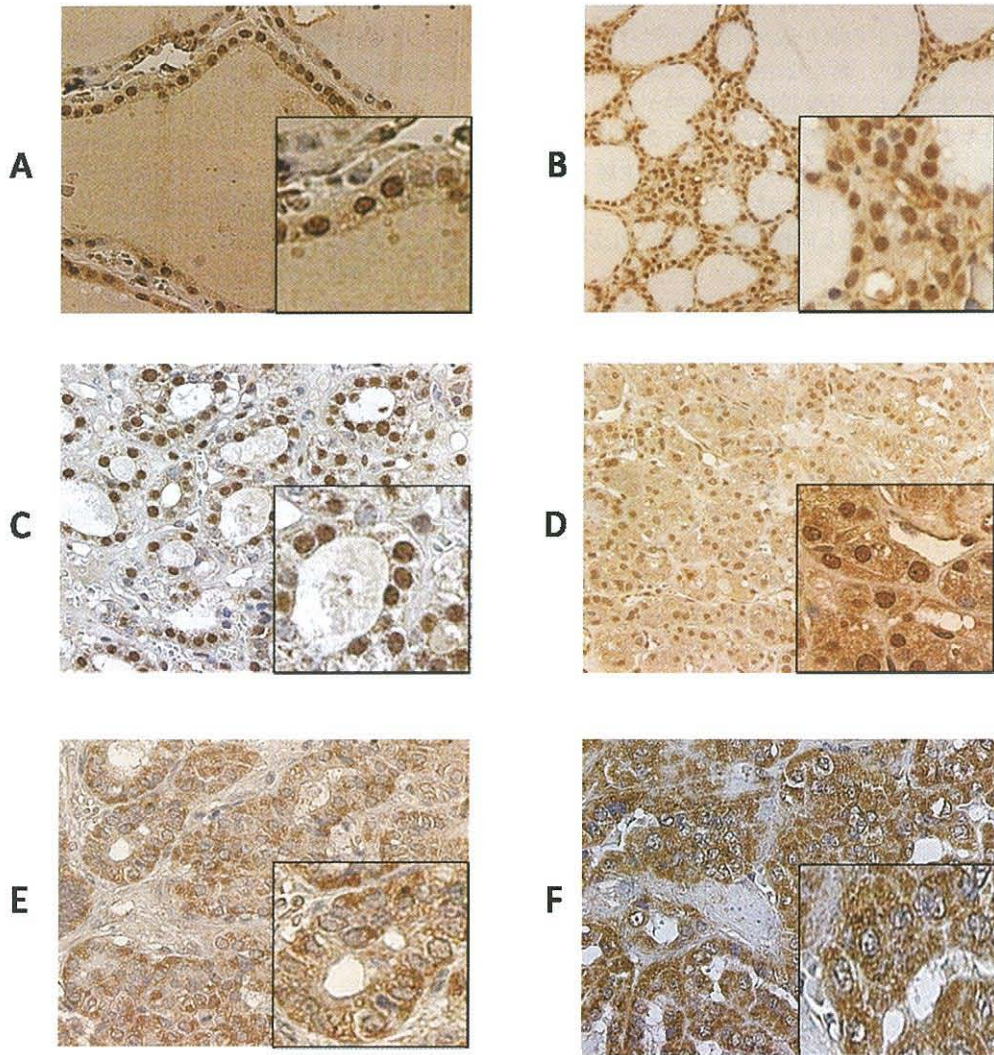


図2 甲状腺各組織におけるPLZFの発現局在の違い。

甲状腺各組織におけるPLZFの細胞内局在の違いを検討するため抗PLZF抗体を用いて免疫染色を施行。400倍で観察標本を提示する。A：正常甲状腺，B：腺腫様甲状腺腫，C：濾胞腺腫，D：濾胞癌，E：乳頭癌，F：未分化癌

違いによりPLZFの細胞内発現の違いが明らかとなった。

考 察

通常、甲状腺癌は比較的前後良好な疾患である。しかし一部の症例では高悪性度へ進展することが知られている。また、それらの症例では甲状腺特異的な機能を喪失しているため放射性ヨード

治療やTSH抑制療法などによる通常の治療法で効果が得られず、新たな治療法が必要とされている。甲状腺癌の新たな治療としてATRAがある。ATRAによりtype1 5'deiodinase³⁾、NISmRNA、ヨード取り込みの再分化を誘導し⁴⁾、甲状腺特異的機能の改善が得られている。臨床試験でも切除不能、ヨード取り込み低下・消失した低分化・未分化癌を含む75例での使用において11%の症例で

腫瘍の縮小, 31%の症例で腫瘍増大の抑制, 40%の症例でヨードの取り込みの改善が得られたと報告されている⁹⁾. 新たな治療として脚光を浴びる一方で依然として治療抵抗性の症例がある. APLに対するATRA治療は90%の症例で寛解が得られるが, 治療抵抗性の症例ではPLZF-RAR融合遺伝子が治療抵抗性の原因と同定されている. 甲状腺癌においてもAPLと同様の機序を疑いPLZFに着目した.

ヒトの様々な組織においてPLZFの発現は報告されているが¹⁰⁾, 甲状腺組織における発現は今まで報告されていない. 我々は調べ得たすべての組織においてPLZFの発現が確認できたが, PLZFは転写抑制因子として知られており, 我々は正常甲状腺, 良性腫瘍でより発現が強いものと予想していたが, 結果は予想に反したものであった.

そこでPLZFの細胞内発現について検討した. PLZFの核への局在と安定性については翻訳後修飾であるSUMO化 (small ubiquitin-related modifier) とubiquitin化により調節されている. PLZFはK242がSUMO化されることにより核に局在し, その機能が発現される¹⁰⁾. 他にもレニンをligandとするレニン/プロレニンレセプターの刺激によりPLZFが細胞質から核へ局在を変え, 転写機能を発現するとの報告がある¹²⁾. このようにPLZFは細胞内局在の変化が多数報告された転写因子であり, 各組織においてPLZFの細胞内局在が変化している可能性があると考えられた. つまり, 蛋白の発現量以上に転写因子としての機能を発揮するためPLZFが核に存在することが重要と考えられた. 各組織におけるPLZFの局在を調べるため免疫染色を行い, 図2に示すように乳頭癌・未分化癌においてPLZFは細胞質に有意に発現する明確な傾向を示した. 対照的に正常甲状腺, 腺腫様甲状腺腫, 濾胞腺腫, 濾胞癌においてPLZFは核に発現していた. これらの結果より乳頭癌・未分化癌と他の組織間でPLZFの局在に違いがあることが明らかになった.

PLZFは元々主に血液癌との関連が確認されていたが, 近年の研究で固形癌においても新たな関与の報告がされている. Mitchellsらは悪性中皮腫 (MM) でPLZF欠乏細胞にPLZFの発現を導入するとアポトーシスを誘導し, コロニー形成が減少すると報告している¹³⁾. 悪性黒色腫においても同様の結果が得られている¹⁴⁾. これらの結果は

PLZF導入により悪性度の改善を示唆したものである. 近年の研究で野生型PLZFがc-mycの転写活性を抑制することにより直接癌化の抑制に関与し, さらにはPLZFにより抑制されたc-mycがPLZFを除去することによりc-mycの抑制が解除されると報告されている¹⁰⁾. このようにPLZFは様々な機序により癌化抑制に関与している可能性がある. 我々の得た結果はPLZFが良性組織において核に, 悪性組織においては細胞質に発現することを示している. これは核から細胞質への局在変化がPLZFの転写抑制因子としての機能を喪失し, 癌化の進展に関与している可能性を示唆する. しかし, 濾胞癌は悪性組織であり, PLZFの発現パターンは良性組織と同様であった. 濾胞癌と乳頭癌・未分化癌の大きな違いの一つは濾胞構造の有無であり, PLZFの核での発現が濾胞構造の保持に関与している可能性も考えられた.

今回の研究で甲状腺の様々な組織においてPLZFの発現をウエスタンブロットにて確認し, さらに正常甲状腺, 腺腫様甲状腺腫, 濾胞腺腫, 濾胞癌など濾胞構造を保持した組織で核に発現していること, 対照的に乳頭癌・未分化癌でPLZFは細胞質で強発現していることを免疫染色を用いて明らかにした. PLZFの乳頭癌, 未分化癌における細胞質での発現の理由や甲状腺組織におけるPLZFの癌化抑制, 濾胞構造保持と関連した機序について実証できないが, この研究は甲状腺組織でのPLZF発現と組織間での局在の相違についての初めての報告である. 今後局在が変化する機序, 濾胞構造維持, 癌化におけるPLZFの役割について更なる研究が必要である.

本研究をまとめるにあたり, 適切にご指導・ご助力を頂いた鳥取大学医学部地域医療学講座教授谷口晋一先生, ならびに, ご校閲いただいた鳥取大学医学部統合内科医学講座病態情報内科学教授山本一博先生, 鳥取大学医学部統合内科医学講座分子制御内科学教授清水英治先生に深謝いたします.

引用文献

- 1) L. Davis, H.G. Welch. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002, *JAMA* 2006; 18: 2164-2167.
- 2) L. Leenhardt, P. Grosclaude, L. Cherie-Challine. Increased incidence of thyroid

- carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effect? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid* 2004; **14**: 1056-1060.
- 3) Scheck R, Schnieders F, Schmutzler C, Kohrle J. Retinoids stimulate type 1 iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1994; **79**: 791-798.
 - 4) van Herle AJ, Agatep ML, Padua DN3, Totanes TL, Canlapan DV, van Herle HML et al. Effect of 13 cis-retinoic acid on growth and differentiation of human follicular carcinoma cells (UCLA RO 82 W-1) in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990; **71**: 755-763.
 - 5) Bassi V, Vitale M, Felicciello A, De Riu S, Fenzi G. Retinoic acid induces intercellular adhesion molecule-1 hyperexpression in human thyroid carcinoma cell lines. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995; **80**: 1129-1135.
 - 6) Simon D, Kohrle J, Reiners C, Groth P, Boerner A, Schmutzler C, Mainz K et al. Redifferentiation therapy with retinoids - a therapeutic option in advanced follicular and papillary thyroid carcinoma? *World Journal of surgery* 1998; **22**: 569-574.
 - 7) Lin. RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukemia. *Nature* 1998; **391**: 811-814.
 - 8) Z. Chen, N. J. Brand, A. Chen, S. J. Chen, J.H. Tong, Z. Y. Wang, S. Waxman, A. Zelent. Fusion between a novel Krüppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t (11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J* 1993; **12**: 1161-1167.
 - 9) McConnell MJ, Chevallier N, Berkofsky-Fessler W, Giltneane JM, Malani RB, Staudt LM, Licht JD. Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 9375-88.
 - 10) Kang SI, Choi HW, Kim IY. Redox-mediated modification of PLZF by SUMO-1 and ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **369**: 1209-14.
 - 11) Zhang T, Xiong H, Kan LX, Zhang CK, Jiao XF, Fu G, Zhang QH, Lu L, Tong JH, Gu BW, Yu M, Liu JX, Licht J, Waxman S, Zelent A, Chen E, Chen SJ. Genomic sequence, structural organization, molecular evolution, and aberrant rearrangement of promyelocytic leukemia zinc finger gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 11422-7.
 - 12) Schefe JH, Menk M, Reinemund J, Effertz K, Hobbs RM, Pandolfi PP, Ruiz P, Unger T, Funke-Kaiser H. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circ Res* 2006; **99**: 1355-66.
 - 13) Cheung M, Pei J, Pei Y, Jhanwar SC, Pass HI, Testa JR. The promyelocytic leukemia zinc-finger gene, PLZF, is frequently downregulated in malignant mesothelioma cells and contributes to cell survival. *Oncogene* 2010; **29**: 1633-40.
 - 14) Felicetti F, Bottero L, Felli N, Mattia G, Labbaye C, Alvino E, Peschle C, Colombo MP, Carè A. Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene* 2004; **23**: 4567-76.