

筑波大学

博士（医学）学位論文

分化型甲状腺癌の細胞増殖における MAP キナーゼ経路と  
cAMP 経路の関係について

2 0 1 7

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

澤 文

第1章	序論.....	4
1-1	甲状腺癌の臨床学的特徴	
1-2	甲状腺癌の遺伝子異常	
1-3	甲状腺癌の増殖シグナル	
1-4	甲状腺癌における cAMP 経路	
1-5	甲状腺癌における分子標的療法	
第2章	目的.....	9
第3章	実験方法.....	10
3-1	細胞培養	
3-2	細胞増殖分析	
3-3	ウェスタンブロット	
3-4	フローサイトメトリー	
3-5	統計学的手法	
第4章	結果.....	15
4-1	甲状腺癌細胞株に対する sorafenib と forskolin の効果	
4-2	3次元培養での sorafenib と cAMP 活性化剤の効果	
4-3	Sorafenib および cAMP 経路活性化による増殖シグナル伝達系への影響	
4-4	Sorafenib および forskolin による G1 チェックポイントへの影響	
4-5	Sorafenib および forskolin による細胞周期への影響	
第5章	考察.....	18
第6章	結論.....	20

## 謝辞

- 図 1 甲状腺癌細胞の増殖シグナル
- 図 2 3次元培養下での甲状腺癌細胞株の顕微鏡写真
- 図 3 Sorafenib および forskolin の甲状腺癌細胞に対する効果
- 図 4 3次元培養下での sorafenib、forskolin の効果
- 図 5 Sorafenib および forskolin の腫瘍増殖シグナルへの影響
- 図 6 Sorafenib および forskolin の G1 チェックポイントへの影響
- 図 7 Sorafenib および forskolin による細胞周期への影響

## 参考文献

## 略語表

MAPK: mitogen-activated protein kinase

TSH: thyroid stimulating hormone

RET: rearranged during transfection

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

AC: adenylyl cyclase

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

CDK4: cyclin-dependent kinase 4

VEGF: vascular endothelial growth factor

PDGF: platelet-derived growth factor

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS: fetal bovine serum

PBS: phosphate buffered saline

mTOR: mammalian target of rapamycin

## 第1章 序論

### 1-1 甲状腺癌の臨床学的特徴

甲状腺癌は全癌種のうち約 1%の頻度である [1]。甲状腺癌は乳頭癌、濾胞癌、髄様癌、低分化癌、未分化癌に分類される。このうち 95%以上が分化型甲状腺癌である。好発年齢は乳頭癌で 40 代～50 代、濾胞癌および髄様癌で 50 代、低分化癌および未分化癌で 60 代と報告されている。性差としては 1:2～4 で女性に多い。甲状腺癌は組織型に応じてリンパ行性あるいは血行性に転移するが、適切な外科的治療が行われれば他癌種と比較して予後は比較的良好である。2017 年の全国がんセンター協議会の集計データによると、甲状腺癌の 10 年相対生存率は前立腺癌に次いで 2 番目に良好である (表 1)。

治療方法としては、外科的治療を行い術後は thyroid stimulating hormone (TSH) 抑制療法や進行例については放射線療法を行う。また、根治切除不能な甲状腺癌については分子標的療法が用いられるようになってきた。

表 1 部位別臨床病期別 10年相対生存率

部位	ステージ別生存率 (%)			
	I	II	III	IV
食道	62.8	36.2	18.2	5
胃	93.9	55.8	38.1	7
結腸	97.8	82.7	79.8	9.8
直腸	92.1	79.9	67.3	5.3
大腸	95.3	81.5	74.3	8.3
肝	32	17.7	8.2	2.1
胆嚢胆道	52.7	20.1	4.7	1.5
膵	28.6	9.1	3.5	0.3
喉頭	89.4	60.5	48.8	52.8
肺	68.3	28.8	16	3.4
乳	95	86.2	54.7	14.5
子宮頸	89.1	65.2	50.4	16.4
子宮体	93.8	76.5	57.1	9.3
卵巣	82	58.9	18.1	15.7
前立腺	100	100	100	40.5
腎臓など	93	74.4	57.3	13.3
膀胱	83.7	80.9	42.6	15.1
甲状腺	97.2	100	93.6	56.5

※全がん協 (2000~2003 年診断症例) [http://www.zengankyo.ncc.go.jp/etc/2000-2003\\_10all.html](http://www.zengankyo.ncc.go.jp/etc/2000-2003_10all.html) より引用

## 1—2 甲状腺癌の遺伝子異常

甲状腺癌の組織型は主に乳頭癌、濾胞癌、髄様癌、低分化癌、未分化癌がある。このうち濾胞上皮由来の分化型癌は乳頭癌、濾胞癌である。この乳頭癌、濾胞癌の背景には遺伝子異常が報告されている。乳頭癌については、RET/PTC 再構成、BRAF 変異、RAS 変異が報告されており、濾胞癌については、PAX8-PPAR $\gamma$  再構成、RAS 変異が報告されている [1-3]。これらの遺伝子異常は他癌腫でもみられるものである。例としては、BRAF 変異は悪性黒色腫、大腸癌、肺癌でもみられる変異である [4-6]。これらの遺伝子異常が背景にあるこ

とによって、他癌腫と同様に細胞増殖の主要なシグナル伝達経路である Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路が活性化されている。それにも関わらず分化型甲状腺癌は他癌腫に比べて細胞増殖が遅く進行が緩徐で、比較的予後も良好である。

### 1-3 甲状腺癌の増殖シグナル

甲状腺癌の増殖シグナルとしては、腫瘍増殖シグナル経路と TSH 受容体を介する生理的な増殖経路があげられる (図 1A)。腫瘍増殖シグナル経路については、rearranged during transfection (RET) チロシンキナーゼ型受容体を介して RAS→RAF→MEK→MAPK のリン酸化が起こることによって腫瘍の増殖が起こる (図 1B)。また、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT 経路も活性化されており、他癌種と同様な腫瘍増殖経路が認められるが分化型甲状腺癌の増殖速度は極めて遅いのが特徴である。

図 1A

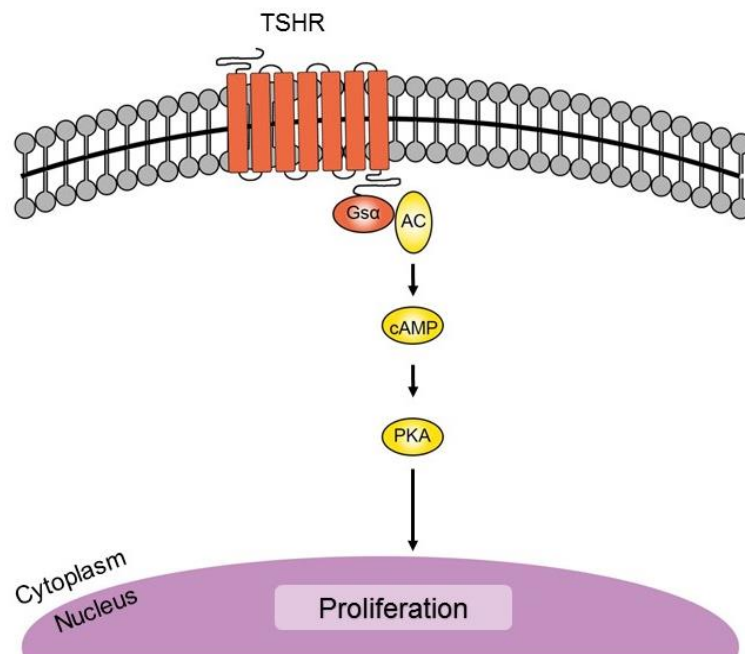
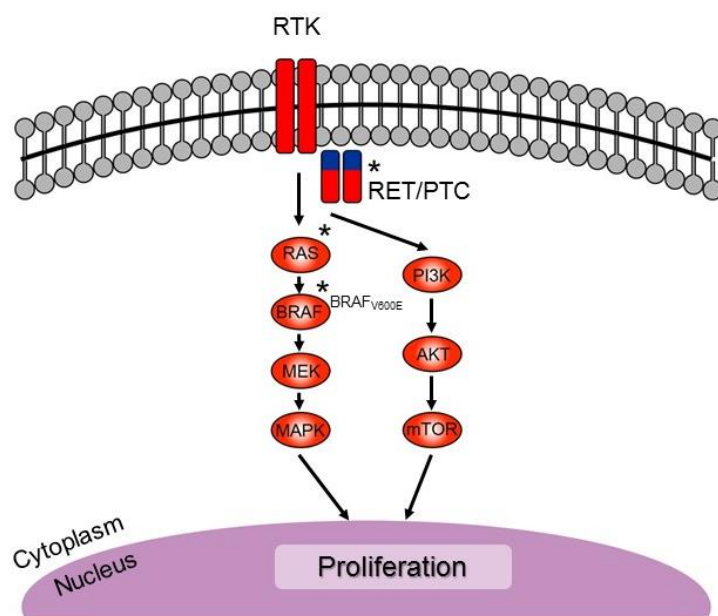




図 1B



### 甲状腺癌細胞の増殖シグナル

甲状腺癌細胞は、TSH 受容体を介した cAMP 経路の正常濾胞上皮増殖シグナル (A) と RET 受容体以下の MAP キナーゼ経路の腫瘍増殖シグナル (B) によって細胞増殖が起こる。

\*甲状腺癌においてみられる遺伝子異常

#### 1—4 甲状腺癌における cAMP 経路

TSH 受容体を介して cyclic adenosine monophosphate (cAMP) を介する経路は正常な濾胞上皮細胞においては細胞増殖やホルモン分泌が起こる (図 1 A)。TSH 受容体下流で cAMP を活性化させるアデニル酸シクラーゼは 10 種類のアイソフォームが存在しており、臓器別に発現しているアイソフォームに差がある [7]。正常な甲状腺濾胞上皮細胞については、タイプ 3、6、9 が発現していると報告されている [8]。

TSH 受容体を介するシグナルは濾胞上皮の増殖を起こすことから、甲状腺癌の治療においては、一般的に TSH 抑制療法が行われている [9, 10]。

しかし、甲状腺癌細胞株での実験では、TSH 受容体下流のアデニル酸シクラーゼの活性

化剤を用いて cAMP 経路を活性化させると、細胞増殖を抑制することが報告されている。その機序としては、cAMP 経路の活性化が MAPK 経路を阻害することや、cAMP 経路の活性化が直接核内の cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) のリン酸化阻害を介して細胞周期の進行を抑制することが示唆されているが結論は得られていない [11-14]。

#### 1-5 甲状腺癌における分子標的療法

今日、根治切除不能な甲状腺癌に対しては分子標的薬が治療として用いられている。分子標的薬としては 2014 年に sorafenib が根治切除不能な分化型甲状腺癌に対して、2015 年に lenvatinib が根治切除不能な甲状腺癌に対して本邦で承認された。両分子標的薬の作用機序としては、RET、vascular endothelial growth factor (VEGF)、platelet-derived growth factor (PDGF) などのチロシンキナーゼ型受容体と、その下流の MAPK 経路を阻害することにより、腫瘍の細胞増殖や血管新生を抑制する [15-20]。

## 第2章 目的

本研究では、分化型甲状腺癌細胞株において、sorafenib によって MAPK 経路を抑制した場合と、forskolin によって cAMP 経路の活性化した場合の細胞増殖の抑制作用と、その作用機序の違いを解析し、分化型甲状腺癌の細胞増殖における MAPK 経路と cAMP 経路の関係を明らかにすることを目的とする。

## 第3章 実験方法

### 3-1 細胞培養

本実験は、甲状腺癌について研究を行っている杏林大学医学部 病理学教室で実験を行い甲状腺細胞株の無償提供を受け実験に用いた。使用した細胞株はいずれもヒト甲状腺分化型癌由来の細胞株で、乳頭癌由来 (TPC-1、KTC1) と濾胞癌由来 (WRO) を用いた。それぞれの遺伝子背景として、TPC-1 は RET/PTC の再構成、KTC1 と WRO は BRAF<sup>V600E</sup> 変異を有している [21, 22]。細胞培養液は TPC-1、KTC1 については Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を、WRO については RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT, USA) および抗菌薬:50 U/ml penicillin と 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加したものをを用いた。培養条件は 37 °C、5 % 二酸化炭素の条件下で培養を行った。

### 3-2 細胞増殖分析

細胞増殖分析を行うために、甲状腺細胞株をそれぞれの細胞株に応じて  $1.5 \times 10^3$  個/well を 96 well プレートに播種した。細胞が培養面に接着しているのを確認できた、播種後 4 ~ 5 時間の時点で sorafenib (Chem Scene, NJ, USA) および Forskolin (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を添加し、5% FBS の状態で 24、48、72、96 時間培養した [11]。細胞増殖分析は、細胞内脱水素酵素を還元するテトラゾリウム塩 (WST-8) によって水溶性のホルマザンを生成させその吸光度を測定し分析を行った (Cell counting kit 8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) [23-25]。この WST-8 を添加した 1 時間後にマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Model 680 Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で 450 nm の吸光度を測定した。

3次元培養については、TPC-1、KTC1、WROの各細胞株を培養面にタンパク低吸着コート処理された96wellのスフェロイド形成培養皿(EZSPHERE SP microplate 96well, 4860-900SP; AGC Techno Glass, Shizuoka, Japan)に $4 \times 10^3$ 個/wellで播種し、DMEMあるいはRPMI-1640に10% FBSおよび抗菌薬:50 U/ml penicillinと100 µg/ml streptomycinを添加したもので培養を行った。しかし、TPC-1、KTC1に関しては比較的細胞増殖が緩徐であったためか96時間の時点でスフェロイドの形成が不十分であった(図2 A, B)。そのため、WROのみ3次元培養下での細胞増殖実験を行った。

WROをスフェロイド形成培養皿に播種し、6時間後に10 µM sorafenib群、10 µM forskolin群、10 µM sorafenib + 10 µM forskolin群にわけそれぞれの薬剤を添加した。96時間後にWST-8によって細胞増殖の分析を行い、DMSO群(コントロール群)と比較した。培養細胞の顕微鏡写真については、IX71(Olympus, Tokyo, Japan)を用い撮影し、画像処理はcellSens Standard 1.3(Olympus, Tokyo, Japan)で行った。

### 3-3 ウェスタンブロット

TPC-1、KTC1、WROを $200 \times 10^3$ 個/wellを6wellプレートに播種し、細胞が培養面に接着しているのを確認できた、播種後4~5時間の時点でsorafenib(Chem Scene, NJ, USA)およびforskolin(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を添加し、5% FBSの状態でもしくは24時間培養した。その後、培養細胞をPhosphate buffered saline (PBS)で洗浄し、Lysis buffer [50mM Tris/HCl (pH6.8), 150mM NaCl, 1% Triton-X100, Phos Stop (Roche, Mannheim, Germany), cOmplete ULTRA tablets EDTA-free (Roche)]を添加し、スクレーパーで細胞を剥離後、超音波破碎装置(U50 control, IKA labortechnik, Osaka, Japan)を用いて細胞のsonicationによってタンパクを抽出した。

タンパク量は5 µgとし、その6分の1量のサンプルバッファー(Sample Buffer Solution

with Reducing Reagent (6x) for S-PAGE : pH6.8, 0.375 M-Tris-HCl, 0.03 (w/v) %-BPB, glycerin, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を添加し、ホットバス (MG-1200, TOKYO RIKAKIKAI, Tokyo, Japan) で 95 °C 5 分間加熱しサンプル調整を行った。

電気泳動の分離用ゲルは 1M-Tris-HCl (pH=8.8)、30 (w/v) % acrylamide、10 (w/v) % Sodium dodecyl sulfate (SDS)、10 (w/v) % ammonium persulfate solution、N,N,N',N'-テトラメチルエタン-1,2-ジアミン (TEMED) を混合し、8%および 12 %の分離用ゲルを作成した。濃縮用ゲルは 0.5 M-Tris-HCl (pH=6.5)、30 (w/v) % acrylamide、10 (w/v) % SDS、10 (w/v) % ammonium persulfate solution、TEMED を混合し作成した。

泳動用バッファーは Running Buffer Solution (10x) for PAGE (0.25mol/l-Tris, 1.92mol/l-glycerin, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を用いて、ゲルにサンプルを添加し、電気泳動を行った。電気泳動用電源装置 (PowerPac™ Basic, Bio-Rad, CA, USA) を用いて濃縮用ゲルに対しては 50 V で約 40 分、分離用ゲルに対しては 100 V で約 90 分電気泳動を行った。

転写はセミドライブロッキング法で行った。メンブレンはニトロセルロースメンブレン (Amersham Protran 0.2 um NC, 10600001; GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) およびメタノールで親水化した polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (PALL, East Hills, NY, USA) を用いた。転写バッファーは、AquaBlot™ 10×High Efficiency Transfer Buffer (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いた。転写装置 (TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, Bio-Rad, CA, USA) に転写バッファーで振盪させた濾紙、メンブレン、ゲル、濾紙の順に重ねた。メンブレンの面積あたり 2 mA/ cm<sup>2</sup> の定電流下で 75 分間通電した。転写後、メンブレンを 5%あるいは 10 % スキムミルクで 30 分間、常温で振盪し、ブロッキングを行った。ブロッキング後に洗浄液 (1% Tween 20, Tris Buffered Saline) で 10 分間 ×3 回、常温で振盪しメンブレンの洗浄を行った。希釈した一次抗体にメンブレンを浸し、4 °Cで一晩反応させた。使用した抗体および希釈倍率は以下のとおりである。 anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)

(Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP Rabbit monoclonal antibody (1000 倍希釈; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、 anti-ERK1 (K-23) rabbit polyclonal antibodies (sc-94, 1000 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、 anti-cyclin D1 rabbit monoclonal antibodies ( 413531, 1:200, NICHIREI BIOSCIENCES, Tokyo, Japan)、 anti-phospho-AKT (Ser 473) (D9E) XP rabbit monoclonal antibodies (9271, 2000 倍希釈; Cell Signaling Technology)、 anti-AKT antibodies (9272, 1000 倍希釈; Cell Signaling Technology)、 anti-CDK4 (D9G3E) rabbit monoclonal antibodies (12790, 1000 倍希釈; Cell Signaling Technology)、 anti-phospho-human retinoblastoma protein (RB) (T826) (EPR5351) rabbit monoclonal antibody (ab133446, 2000 倍希釈; Abcam, Cambridge, MA, USA)、 anti-RB mouse monoclonal antibodies (554136, 250 倍希釈; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)、 mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (3000 倍希釈; Sigma-Aldrich) 一次抗体反応後、洗浄液で 10 分間  $\times$ 3 回、常温で振盪しメンブレンの洗浄を行い、二次抗体 (anti-rabbit IgG, HRP-linked whole Ab [from sheep] および anti-mouse IgG, HRP-linked whole Ab [from sheep] , 5000 倍希釈; GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) に 1 時間、常温で振盪させ、反応させた。メンブレンを洗浄液で 10 分間  $\times$ 3 回、常温で振盪し洗浄した後に、化学発光液 (Western Lightning Plus-ECL; Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) と反応させ、ImageQuant LAS-4000 mini imaging system (GE Healthcare Life Sciences) によってバンドを検出した。

### 3—4 フローサイトメトリー

細胞周期解析のために  $200 \times 10^3$  個/ well を 6well プレートに播種し、4 時間培養した。培養細胞に 10  $\mu$ M sorafenib (Chem Scene, NJ, USA) および 10  $\mu$ M forskolin (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を添加し、5% FBS の状態で 96 時間培養した。その後、氷冷した 70% エタノールで固定し、RNase A および propidium iodine (Muse Cell

Cycle Kit, MCH100106; Merck Millipore, Frankfurter Strabe, Darmstadt, Germany) で室温遮光化 30 分間処理した。その後、細胞周期解析を行うために Muse Cell Cycle Analyzer (Merck Millipore, Frankfurter Strabe, Darmstadt, Germany) を用いた。

### 3-5 統計学的手法

細胞増殖分析については、それぞれの薬剤処理を 3 - 4well ずつ行い、これらのデータの平均値  $\pm$  標準偏差でグラフ化した。統計学的解析手法は two-way ANOVA を用い、p 値が 0.05 未満を統計学的有意差ありとした。統計解析ソフトとして GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA, USA) を使用した。



## 第4章 結果

### 4-1 甲状腺癌細胞株に対する sorafenib と forskolin の効果

Sorafenib 単独、forskolin 単独と両者の併用による細胞増殖抑制効果を経時的に比較した。TPC-1、KTC1、WRO を 96 well プレートに播種し、10  $\mu$ M sorafenib 単独群、10  $\mu$ M forskolin 単独群、10  $\mu$ M sorafenib + 10  $\mu$ M forskolin 併用群にわけ、24、48、72、96 時間後に WST-8 によって細胞増殖の分析を行い、DMSO 群（コントロール群）と比較した（図 3）。TPC-1、WRO については 72 時間後から、KTC1 については 96 時間後には有意にコントロール群よりも薬剤処理した群の細胞増殖抑制がみられた。結果として、いずれの細胞株でも 72 時間後から 10  $\mu$ M sorafenib 群と比較して、10  $\mu$ M sorafenib + 10  $\mu$ M forskolin 群および 10  $\mu$ M forskolin 群で細胞増殖の低下がみられた。ただし、10  $\mu$ M sorafenib + 10  $\mu$ M forskolin 群と 10  $\mu$ M forskolin 群との間には有意差がみられなかった。

### 4-2 3次元培養での sorafenib と cAMP 活性化剤の効果

Sorafenib、forskolin の細胞増殖抑制効果に関して、2次元培養よりも生体内反応を反映するとされる 3次元培養プレートを用いて実験を行った [26-28]。WRO のみが 3次元培養プレートにてスフェロイド形成を示し、TPC-1 と KTC1 は増殖が遅くスフェロイド形成を示さなかった。よって、WRO のみで 2次元培養下と同様に sorafenib、forskolin の単独と両者の併用の細胞増殖抑制効果を比較検討した（図 4）。10  $\mu$ M sorafenib 単独処理はコントロールの DMSO に比較し増殖抑制がみられたが、有意差はなかった ( $P \geq 0.05$ )。コントロールと 10  $\mu$ M sorafenib 単独に比較して 10  $\mu$ M forskolin 単独と 10  $\mu$ M sorafenib + 10  $\mu$ M forskolin 併用は有意に増殖抑制がみられ、10  $\mu$ M forskolin 単独と 10  $\mu$ M sorafenib + 10  $\mu$ M forskolin 併用の順に高度であった。また、有意ではないが、併用群の抑制作用は sorafenib 単独と forskolin 単独の作用の相和相当であった。

#### 4-3 Sorafenib および cAMP 経路活性化による増殖シグナル伝達系への影響

Sorafenib および forskolin が増殖シグナル伝達系に及ぼす影響をウェスタンブロットで分析した (図 5)。TPC-1、KTC1、WRO では増殖シグナル伝達系の MAPK 経路の ERK の活性化活性化されていることが、抗リン酸化 ERK 1/2 抗体を用いて確認された。Sorafenib、forskolin による MAPK 経路への影響を分析した。Sorafenib、forskolin を各細胞株に添加し、30 分後にタンパク抽出を行い、ウェスタンブロットを行った結果、TPC-1、KTC1、WRO いずれの細胞株でも 10  $\mu$ M sorafenib 単独あるいは 10  $\mu$ M sorafenib + 10  $\mu$ M forskolin 併用では ERK のリン酸化が抑制されたが、10  $\mu$ M forskolin 単独では ERK のリン酸化の抑制は起こらなかった。

#### 4-4 Sorafenib および forskolin による G1 チェックポイントへの影響

Sorafenib および forskolin が細胞周期に及ぼす影響を検討するため、G1 チェックポイントに関わる分子のウェスタンブロットによって解析した。Sorafenib、forskolin を各細胞株に添加し、24 時間後にタンパク抽出を行い、cyclin D1、CDK4、RB の発現をウェスタンブロットで分析した (図 6)。その結果、cyclin D1 は TPC-1 と WRO では、forskolin 単独および sorafenib と forskolin の併用で低下を認めたが、sorafenib 単独では低下しなかった。

KTC-1 については、forskolin 単独では cyclin D1 の低下はみられなかったが、sorafenib と forskolin の併用では TPC-1、WRO と同様に発現低下が見られた。

一方で、p-RB (KTC1 と WRO において) および CDK4 に関しては sorafenib 単独と forskolin の併用で発現の低下がみられたが、forskolin 単独では明らかな発現低下はみられなかった。

#### 4-5 Sorafenib および forskolin による細胞周期への影響

Sorafenib および forskolin による細胞周期への影響を解析するためにフローサイトメトリーを用いた。その結果、3つの細胞株においていずれも sorafenib および forskolin による細胞周期への影響にバリエーションがみられた (図 7) が、sorafenib は S 期の割合を増加させる傾向があり、一方で forskolin は G2/M 期の割合を増加させる傾向がみられた。

## 第5章 考察

今回対象とした 3 種の細胞株 TPC-1、KTC1、WRO は、すべて分化型甲状腺癌に由来し、背景の遺伝子異常として RET/PTC 再構成もしくは、BRAF<sup>V600E</sup> 変異を有している [1, 2]。これらの遺伝子異常によって、細胞増殖に関わる主要な細胞内シグナル伝達系である MAPK 経路が常に活性化されていると考えられる。実際に 3 種の分化型甲状腺癌培養細胞の MAPK 経路が活性化されていることを、リン酸化 ERK1/2 の発現として確認した。

Sorafenib は RET などのチロシンキナーゼ型受容体と、その下流の MAPK 経路を阻害する分子標的薬で、腫瘍の細胞増殖や血管新生を抑制するとされる [15, 16]。本研究で用いた 3 種の細胞で sorafenib は、forskolin との併用の有無にかかわらず、リン酸化 ERK1/2 を減少させ、MAPK 経路を抑制した。しかし、sorafenib による細胞増殖抑制は forskolin に比較して弱かった (図 3)。このことから分化型甲状腺癌細胞株の増殖に対して MAPK 経路が主たる増殖経路ではない可能性が示唆された。

一方で、アデニル酸シクラーゼ活性化剤である forskolin は 3 つの分化型甲状腺癌細胞株で有意な増殖抑制がみられた。Forskolin はジテルペンの一種で、アデニル酸シクラーゼを活性化する [29]。それにより ATP から環状 AMP (cAMP) が作られ細胞内 cAMP 濃度が上昇、引き続き cAMP により活性化された蛋白質キナーゼ (PKA) が特定のタンパク質をリン酸化する。Sorafenib と forskolin の増殖抑制作用の経時的な比較解析により、forskolin の抑制作用は TPC-1、KTC1、WRO のいずれにも有意で、sorafenib に比べ高度であった。また、生体内は培養環境下と状況が違う可能性があるが、生体内での環境を反映する 3 次元培養が可能であった WRO で、forskolin の細胞増殖抑制は sorafenib よりも高度であった。また、有意ではないが sorafenib と forskolin の併用が forskolin 単独より高度であった。Forskolin により ERK のリン酸化はいずれの細胞株でも抑制されたことから、forskolin の細胞増殖抑制は MAPK 経路とは独立していると考えられた。以上のことから sorafenib

と forskolin が分化型甲状腺癌細胞株の増殖抑制に対して相加的に作用しており、それぞれの作用機序は違うと推測される。

本実験で、細胞周期に対しても sorafenib と forskolin は別々の機序で影響していることを示した。Forskolin は cyclin D1 の発現を抑制したが、sorafenib は CDK4 と p-RB の発現を抑制した。細胞周期解析においては、sorafenib は S 期の割合を増加させ、forskolin は G2/M 期の割合を増加させる傾向がみられた。

今回の実験から、TSH 受容体以下に存在するアデニル酸シクラーゼの活性化は分化型甲状腺癌においては、機序は明らかではないものの増殖抑制が起こることから、正常な濾胞上皮細胞に発現しているアデニル酸シクラーゼとは異なる可能性が考えられた。これは発現しているアイソフォームの違いが推測されることから今後臨床検体も含めて、甲状腺癌で発現しているアデニル酸シクラーゼのアイソフォームについて検討する必要がある。また、アデニル酸シクラーゼ活性化剤は分子標的薬との相加的な効果が期待できることから、現在行われている TSH 抑制療法の必要性に関しても今後検討していく必要があると考えられる。

## 第6章 結論

MAP キナーゼ経路が活性化されている高分化型甲状腺癌の培養細胞において、MAP キナーゼ経路を阻害する sorafenib よりアデニル酸シクラーゼを活性化する forskolin の方が、強力な細胞増殖抑制作用を示した。その作用機序には、MAP キナーゼ経路の抑制とは別の経路が関与していると考えられる。cAMP 経路の活性化は分化型甲状腺癌の細胞増殖抑制に重要であると考えられる。

## 謝辞

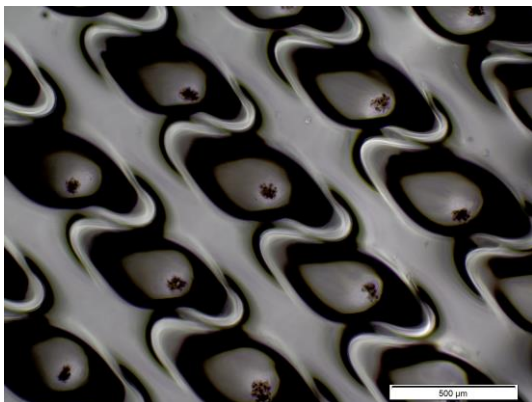
本研究は、人間総合科学疾患制御医学専攻 乳腺内分泌外科学 原尚人教授および特別研究生として受け入れてくださった杏林大学医学部病理学教室 菅間博教授のご指導のもと行わせていただき、深く感謝致しております。また、本研究を行うにあたり、ご指導およびご助言をいただいた杏林大学医学部病理学教室 千葉知宏講師、石井順助教、実験手技に関してご指導およびご助言をいただいた住石歩さん、細胞培養実験のサポートをしてくださった東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科 山本浩之先生に感謝を申し上げます。論文作成にあたり、学位論文予備審査委員会において追加実験等につきましてご指導してくださった、入江賢児教授、坂下信悟准教授、坂田麻実子准教授、鈴木浩明准教授に感謝を申し上げます。

また、本研究の遂行をご支援してくださった筑波大学附属病院乳腺甲状腺内分泌外科の皆様

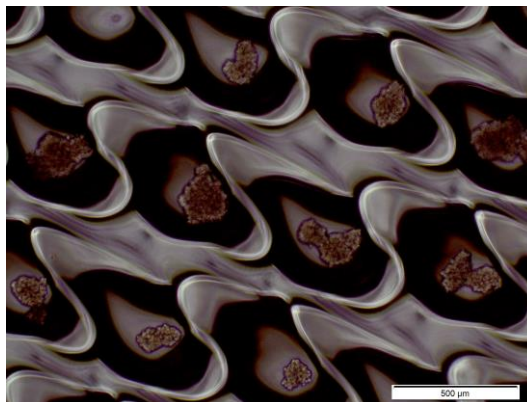
様に感謝を申し上げます。

図 2

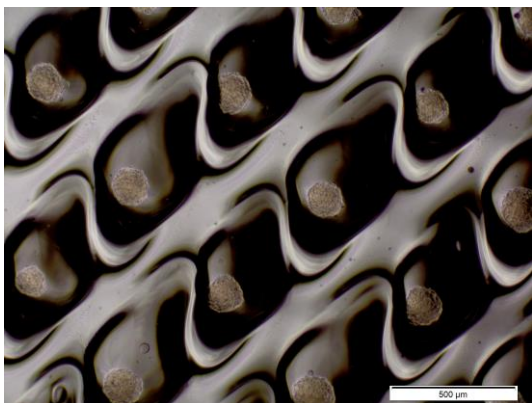
A



B



C

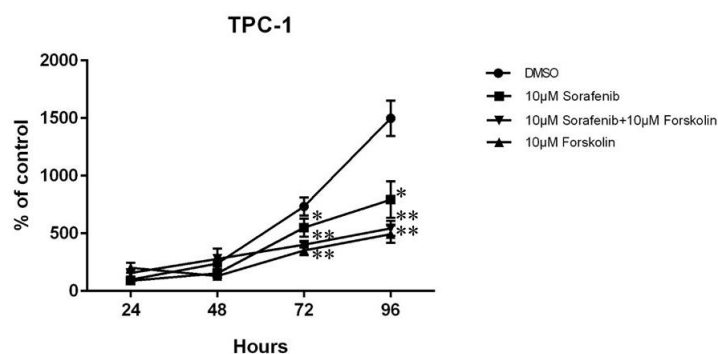


3次元培養下での甲状腺癌細胞株の顕微鏡写真

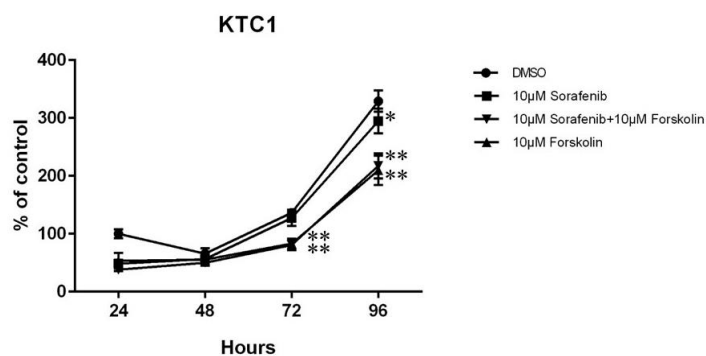
(A) TPC-1 96 時間、(B) KTC1 7 日間、(C) WRO 96 時間の 3 次元培養下での顕微鏡写真。スケールバーは 500  $\mu\text{m}$  を示す。WRO のみスフェロイド形成が良好であった。

図 3

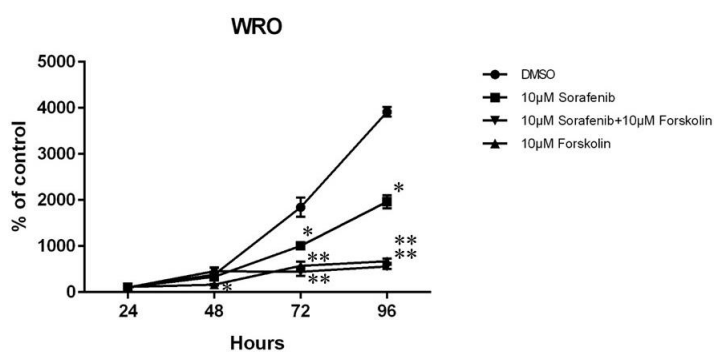
A



B



C



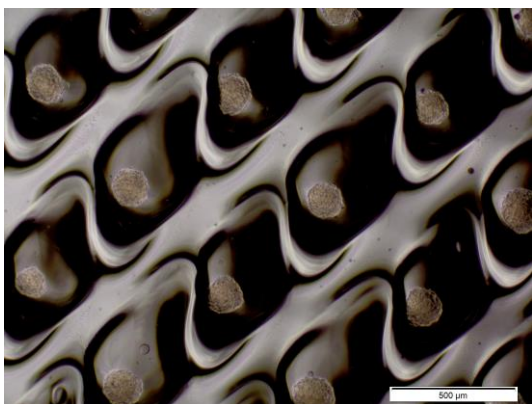
**Sorafenib、forskolin の甲状腺癌細胞に対する効果**

(A) TPC-1、(B) KTC1、(C) WRO に対して 10 µM sorafenib、10 µM forskolin および 10 µM sorafenib+10 µM forskolin で処理し、24、48、72、96 時間後に WST-8 による増殖分析を行った。\*はコントロールと、\*\*は 10 µM sorafenib と比較して有意に細胞増殖抑制が起こっていることを示している (p<0.05、Two-way ANOVA)。

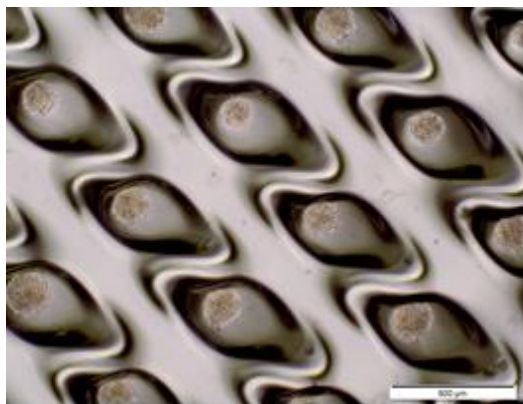


図 4

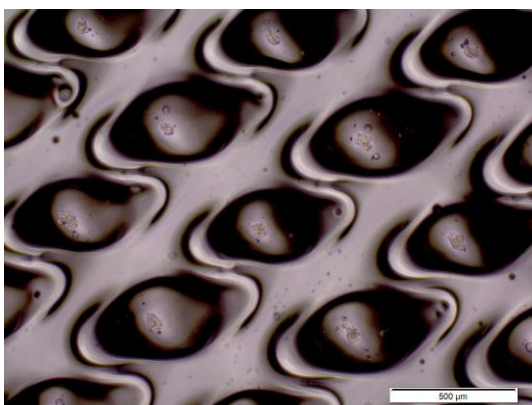
A



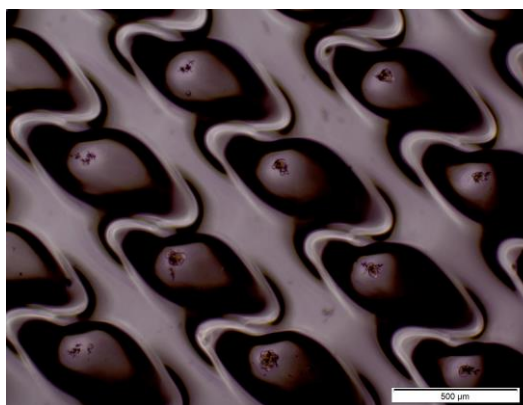
B



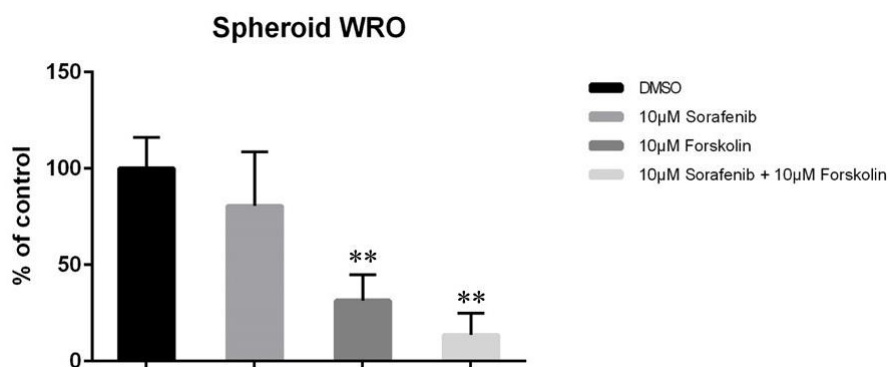
C



D



E



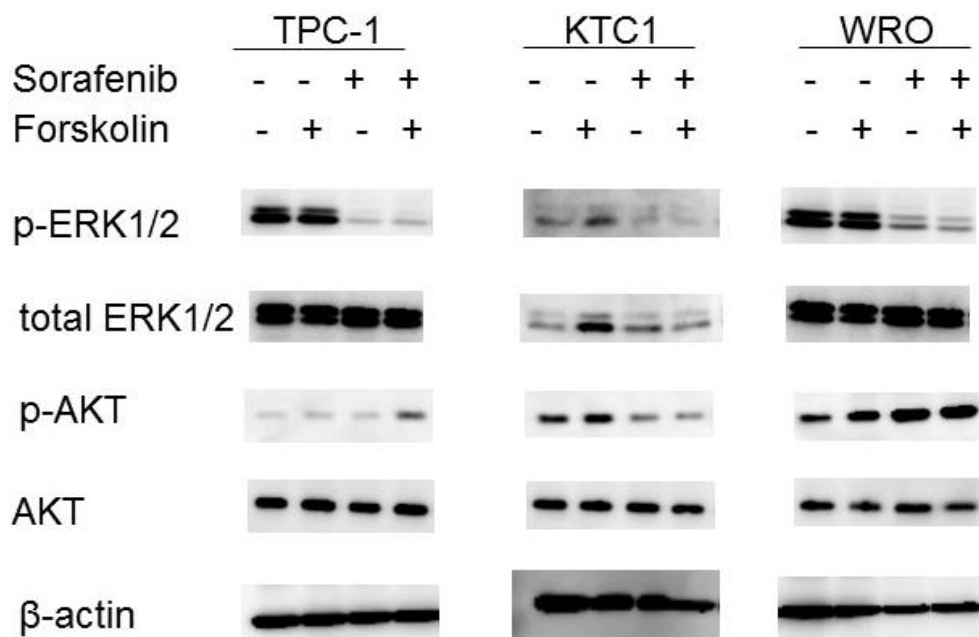
### 3次元培養下での sorafenib、forskolin の効果

(A-D) WRO 96 時間の 3 次元培養下での顕微鏡写真。スケールバーは 500  $\mu\text{m}$  を示す。

(A) DMSO、(B) 10  $\mu\text{M}$  sorafenib、(C) 10  $\mu\text{M}$  forskolin、(D) 10  $\mu\text{M}$  sorafenib + 10

$\mu\text{M}$  forskolin 処理を行い 96 時間後に WST-8 による細胞増殖分析を行った (E)。\*\*はコントロールおよび 10  $\mu\text{M}$  sorafenib と比較して有意に細胞増殖抑制が起こっていることを示している ( $p < 0.05$ 、Two-way ANOVA)。

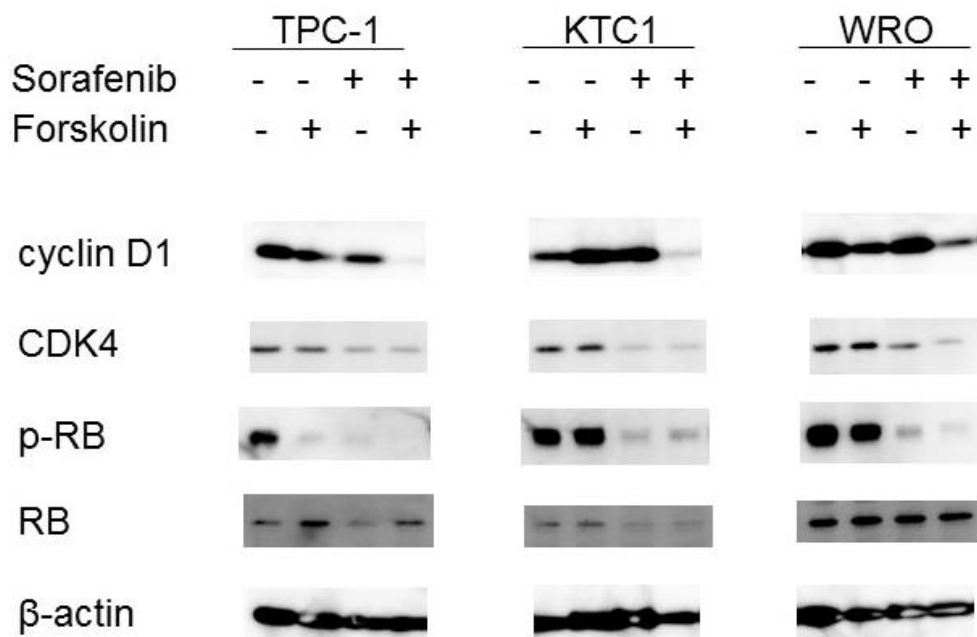
図 5



**Sorafenib および forskolin の腫瘍増殖シグナルへの影響**

TPC-1、KTC1、WRO に対して sorafenib および forskolin を処理して 30 分後にタンパク抽出を行いウェスタンブロットによる ERK1/2 および AKT のリン酸化について分析を行った。 $\beta$ -アクチンをコントロールとした。TPC-1、KTC1、WRO で sorafenib によって p-ERK の発現低下を認めた。しかし、p-AKT に関しては KTC1 を除いて sorafenib による発現抑制はみられなかった。

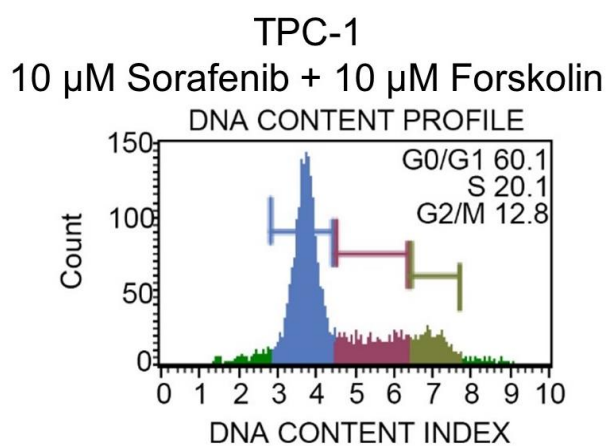
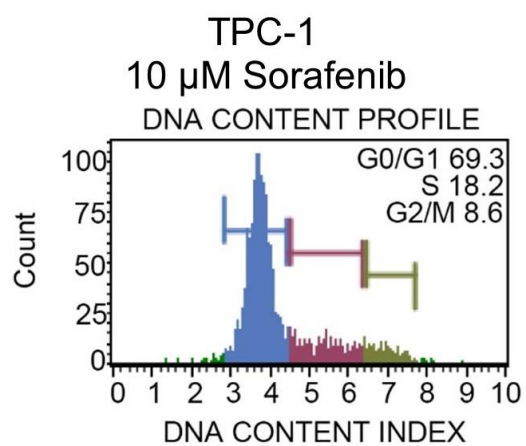
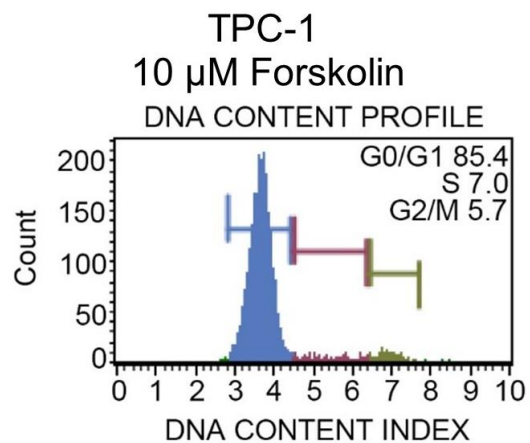
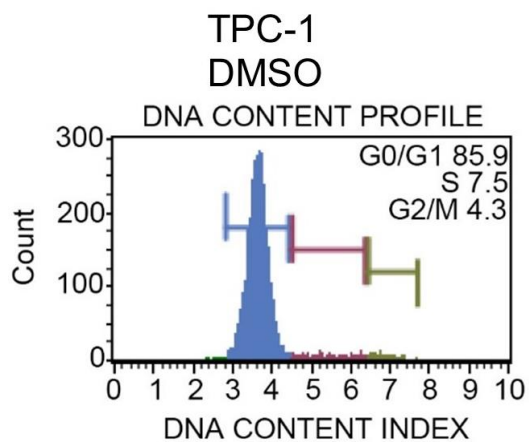
図 6



**Sorafenib および forskolin の G1 チェックポイントへの影響**

TPC-1、KTC1、WRO に対して sorafenib および forskolin を処理して 24 時間後にタンパク抽出を行いウェスタンブロットによる G1 チェックポイント分子である cyclin D1、CDK4、p-RB の発現について分析を行った。β-アクチンをコントロールとした。TPC-1、WRO で forskolin により cyclin D1 の発現低下を認めた。また、KTC1 では forskolin 単独では cyclin D1 の発現低下はなかったものの、sorafenib との併用では発現低下を認めた。一方で、sorafenib によって CDK4 および p-RB の発現低下がみられた。

☒ 7A



☒ 7B

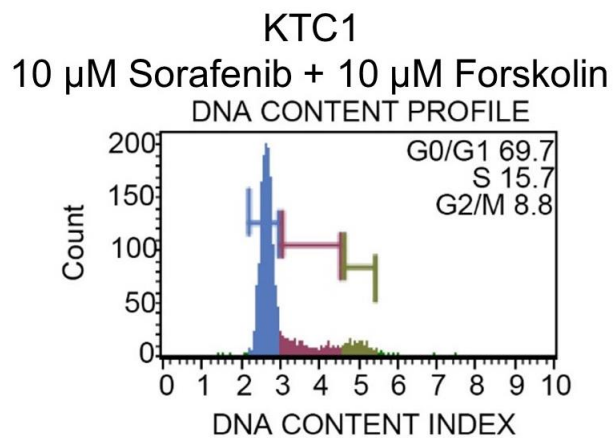
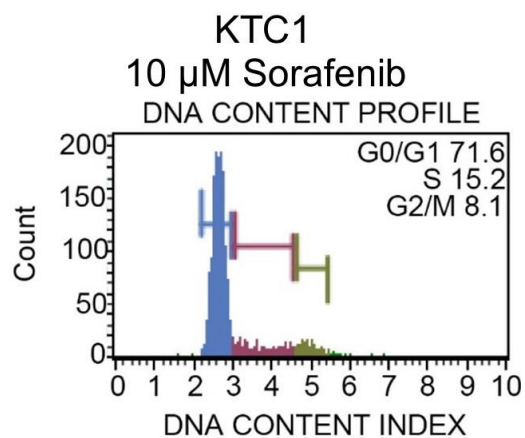
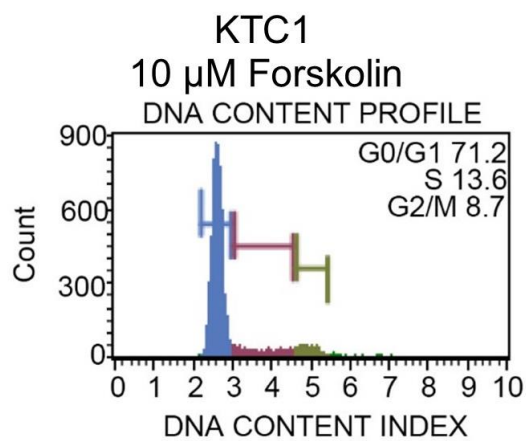
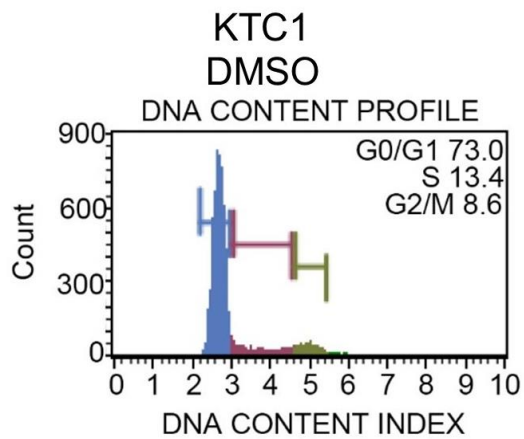
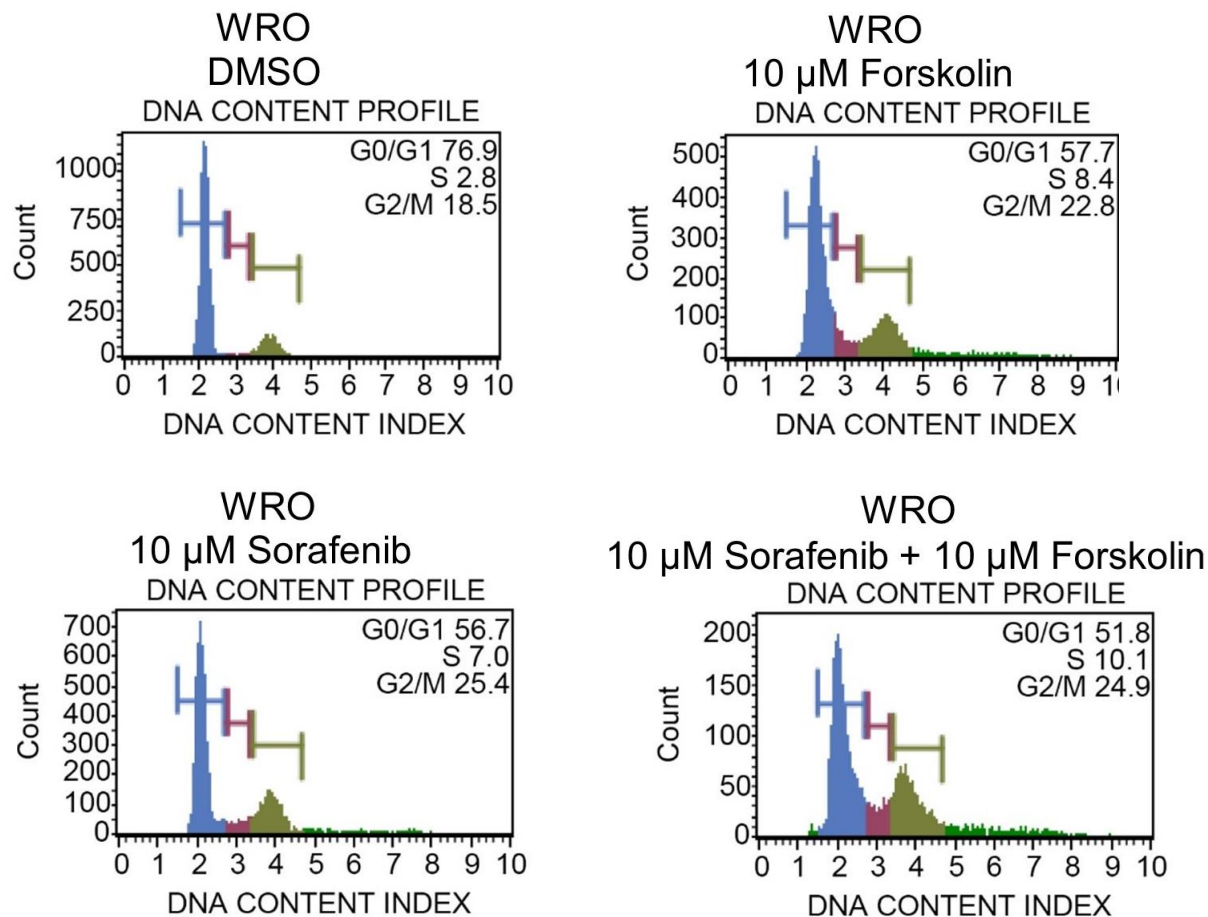


図 7C



### Sorafenib および forskolin の細胞周期への影響

TPC-1、KTC1、WRO に対して sorafenib および forskolin を処理して 96 時間後にフローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った。sorafenib によって S 期の割合が増加する傾向がみられた。また、forskolin によって G2/M 期の割合が増加する傾向がみられた。

## 参考文献

1. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Third edition 2004.
2. Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, et al. (1992) Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest* 89: 1517-1522.
3. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, et al. (2003) High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63: 1454-1457.
4. Kim SY, Kim SN, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, et al. (2015) Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermatol* 72: 1036-1046.e1032.
5. Joyce T, Oikonomou E, Kosmidou V, Makrodouli E, Bantounas I, et al. (2012) A molecular signature for oncogenic BRAF in human colon cancer cells is revealed by microarray analysis. *Curr Cancer Drug Targets* 12: 873-898.
6. (2014) Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511: 543-550.
7. Hanoune J, Defer N (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 145-174.
8. Vanvooren V, Allgeier A, Cosson E, Van Sande J, Defer N, et al. (2000) Expression of multiple adenylyl cyclase isoforms in human and dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 170: 185-196.
9. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, et al. (2016) 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 26: 1-133.
10. Yoo JY, Stang MT (2016) Current Guidelines for Postoperative Treatment and Follow-Up of Well-Differentiated Thyroid Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 25: 41-59.
11. Yano Y, Kamma H, Matsumoto H, Fujiwara M, Bando H, et al. (2007) Growth suppression of thyroid cancer cells by adenylyl cyclase activator. *Oncol Rep* 18: 441-445.
12. Matsumoto H, Sakamoto A, Fujiwara M, Yano Y, Shishido-Hara Y, et al. (2008) Cyclic AMP-mediated growth suppression and MAPK phosphorylation in thyroid papillary carcinoma cells. *Mol Med Rep* 1: 245-249.
13. Stork PJ, Schmitt JM (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in

- the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 12: 258-266.
14. Rocha AS, Paternot S, Coulonval K, Dumont JE, Soares P, et al. (2008) Cyclic AMP inhibits the proliferation of thyroid carcinoma cell lines through regulation of CDK4 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 19: 4814-4825.
  15. Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncone G, et al. (2006) BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Inst* 98: 326-334.
  16. Tohyama O, Matsui J, Kodama K, Hata-Sugi N, Kimura T, et al. (2014) Antitumor activity of lenvatinib (e7080): an angiogenesis inhibitor that targets multiple receptor tyrosine kinases in preclinical human thyroid cancer models. *J Thyroid Res* 2014: 638747.
  17. Preto A, Goncalves J, Rebocho AP, Figueiredo J, Meireles AM, et al. (2009) Proliferation and survival molecules implicated in the inhibition of BRAF pathway in thyroid cancer cells harbouring different genetic mutations. *BMC Cancer* 9: 387.
  18. Broecker-Preuss M, Muller S, Britten M, Worm K, Schmid KW, et al. (2015) Sorafenib inhibits intracellular signaling pathways and induces cell cycle arrest and cell death in thyroid carcinoma cells irrespective of histological origin or BRAF mutational status. *BMC Cancer* 15: 184.
  19. Takami H, Ito K, Sugino K (2014) Development of molecular targeted drugs for advanced thyroid cancer in Japan. *Endocr J* 61: 833-839.
  20. Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, Robinson B, Brose MS, et al. (2015) Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med* 372: 621-630.
  21. Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenti U, Benezra M, et al. (2008) Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4331-4341.
  22. Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hebrant A, et al. (2012) Thyroid cancer cell lines: an overview. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 133.
  23. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K (1997) A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44: 1299-1305.
  24. Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, et al. (1999) A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications* 36: 47-50.
  25. Chiba T, Yamada M, Hashimoto Y, Sato M, Sasabe J, et al. (2005) Development of a femtomolar-acting humanin derivative named colivelin by attaching activity-dependent neurotrophic factor to its N terminus: characterization of colivelin-



- mediated neuroprotection against Alzheimer's disease-relevant insults in vitro and in vivo. *J Neurosci* 25: 10252-10261.
26. Kimlin LC, Casagrande G Fau - Virador VM, Virador VM In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update.
  27. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R (2004) The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 9: 273-285.
  28. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, et al. (2012) Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol* 10: 29.
  29. Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981) Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 3363-3367.