

氏名	澤文		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第	8417	号
学位授与年月	平成	29年	12月 31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	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		
主査	筑波大学教授	博士(理学)	入江 賢児
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	坂下 信悟
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	坂田 麻実子
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	鈴木 浩明

論文の内容の要旨

澤文氏の博士学位論文は、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検討したものである。その要旨は以下の通りである。

(目的)

分化型甲状腺癌には、他臓器癌で一般的にみられる癌遺伝子の異常があり、細胞増殖の主要なシグナル伝達経路である MAP キナーゼ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、他臓器癌に比べ細胞増殖が遅く進行が緩徐である。最近、甲状腺癌に対する分子標的薬として sorafenib や lenvatinib が本邦で承認された。両分子標的薬の作用機序は、RET、VEGF、PDGF などのチロシンキナーゼ型受容体と、その下流の MAP キナーゼ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ことにある。生理的に甲状腺濾胞細胞は、Thyroid stimulating hormone (TSH) 受容体の刺激により cAMP を介するシグナル伝達経 (cAMP 経路) が活性化され、細胞増殖とホルモン分泌亢進が起こる。そのため甲状腺癌の治療では、一般的に TSH の抑制が行われる。しかし、甲状腺癌培養細胞を用いた実験では、cAMP 経路の活性化は、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 MAP キナーゼ経路の阻害するためであるという報告がある。

本研究で著者は、分化型甲状腺癌の培養細胞において、sorafenib で MAP キナーゼ経路を抑制した場合と、forskolin で cAMP 経路を活性化した場合の細胞増殖の抑制作用を解析し、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 経路の関係を検討した。

(対象と方法)

著者は、分化型甲状腺癌細胞として、乳頭癌由来の TPC-1(RET/PTC 再構成)、KTC1(BRAF V600E 変異)および甲状腺濾胞癌由来の WRO(BRAF V600E 変異)を用いた。sorafenib と forskolin の両者の作用

を WST-8 法で経時的 (24、48、72、96 時間) に比較解析した。WRO については 3 次元培養用下においても sorafenib および forskolin の細胞増殖に対する作用を WST-8 法による解析を行った。さらに sorafenib と forskolin の MAP キナーゼ経路への影響について、リン酸化 ERK の発現をウェスタンブロットにて解析した。また、細胞周期への影響について、ウェスタンブロットによるリン酸化 RB、CDK4、cyclin D1 の発現解析およびフローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った。

(結果)

いずれの細胞株でも 72 時間後から sorafenib 単独と比較して、sorafenib と forskolin 併用および forskolin 単独で細胞増殖の低下がみられた。ただし、sorafenib と forskolin 併用と forskolin 単独との間には有意差がみられなかった。3 次元培養下での WRO の細胞増殖は sorafenib 単独では低下しなかったが、forskolin 単独で 1/3 程度に低下し、さらに forskolin と sorafenib の併用で低下する傾向がみられた。ウェスタンブロットの結果、TPC-1、KTC1、WRO いずれの細胞株でも sorafenib 単独あるいは sorafenib と forskolin 併用では ERK のリン酸化が抑制された。しかしながら、forskolin 単独では ERK のリン酸化の抑制は起こらなかった。一方、forskolin 単独では、いずれの細胞株においても ERK のリン酸化に影響は及ぼさなかった。細胞周期への影響としては、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、リン酸化 RB および CDK4 に関しては sorafenib 単独、sorafenib 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。フローサイトメトリーの結果、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。

(考察)

以上の結果から、著者は、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。ウェスタンブロットの結果から、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すると考えた。cAMP 経路の活性化が分化型甲状腺癌の細胞増殖抑制に重要であることが示された。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究では、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検討され、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すことが示された。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、cAMP 経路の活性化が分化型甲状腺癌の細胞増殖抑制に重要であることが示された。これらの本研究成果は、分化型甲状腺癌の細胞増殖の制御機構、治療法を明らかにする上で重要な知見であり、高く評価される。

平成 29 年 10 月 31 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。