

博士論文

甲状腺癌細胞増殖における
アデニル酸シクラーゼ 6 の役割

山本 浩之

目次

目次	1
略語一覧	4
要旨	5
第 1 章 序論	6
1-1 甲状腺癌の臨床的特徴	
1-2 甲状腺癌の遺伝子変異	
1-3 甲状腺における増殖シグナル	
1-4 AC 活性化剤 Forskolin (FSK) と甲状腺癌細胞	
1-5 甲状腺濾胞細胞に発現する AC の isoform	
1-6 本研究の目的	
第 2 章 実験方法	13
2-1 免疫組織化学および免疫細胞化学	
2-2 細胞培養	
2-3 RNA 抽出および半定量 PCR	
2-4 miRNA ノックダウン	
2-5 細胞増殖分析	

- 2-6 死細胞率測定
- 2-7 ウェスタンブロット
- 2-8 マイクロアレイ解析
- 2-9 フローサイトメトリー
- 2-10 統計解析

第3章 結果

24

- 3-1 甲状腺癌パラフィン包埋切片および細胞株を用いたIHCによるAC発現の検討
- 3-2 甲状腺癌細胞株に対するFSKおよびSORの効果
- 3-3 WRO細胞におけるAC6ノックダウン株の樹立
- 3-4 細胞免疫染色でみるAC6ノックダウンの影響
- 3-5 増殖率に対するFSK濃度の影響
- 3-6 FSK添加による増殖率および死細胞率の変化
- 3-7 半定量PCRおよびマイクロアレイによるAC3・6・9の発現量の相対比較
- 3-8 AC6ノックダウンによるシグナル伝達の変化
- 3-9 FSK添加による細胞周期への影響
- 3-10 WROにおける*BRAF*^{V600E}変異の有無の確認

3-11 甲状腺癌細胞株におけるTSH受容体発現量の比較

第4章 考察	31
謝辞	40
図1.甲状腺癌の年齢分布	
表1.甲状腺癌の組織型と遺伝子変異の頻度	
図2.TSHによる細胞増殖のメカニズム	
図3.正常濾胞増殖シグナルと腫瘍増殖シグナル	
図4.ACの構造および isoform の特徴	
表2.本研究で使用した oligonucleotide	
表3.本研究において使用した乳頭癌・濾胞癌症例	
図5.乳頭癌・濾胞癌における AC 染色結果	
図6.FSK 濃度と分化型甲状腺癌細胞の増殖との関係	
図7.甲状腺癌細胞に対する FSK および SOR の効果	
図8.AC6 ノックダウンの確認	
図9.ICC でみた AC6 のノックダウン	
図10.FSK による増殖率への影響	
図11.FSK 添加による死細胞率および増殖率の変化	
図12.AC 発現量の検討	
図13.AC6 ノックダウンによるシグナル伝達の変化	
図14.WRO における <i>BRAF</i> ^{V600E} 変異の有無の確認	
図15.甲状腺癌細胞株における TSH 受容体 mRNA の発現量	
参考文献	64

略語一覽

AC	adenylyl cyclase
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CDK4	cyclin-dependent kinase 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FBS	fetal bovine serum
FSK	forskolin
HRP	horseradish peroxidase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKA	protein kinase A
PVDF	polyvinylidene difluoride
RET	rearranged during transfection
RPMI	Rosewll Park Memorial Institute
SOR	sorafenib
TSH	thyroid stimulating hormone

「甲状腺癌細胞増殖におけるアデニル酸シクラーゼ 6 の役割」

所属：内科学専攻生体防御腫瘍内科学講座内分泌病態学

指導教員：南学 正臣

申請者：山本 浩之

要旨

アデニル酸シクラーゼ (AC) はホルモンの情報伝達物質である cAMP を合成する酵素で、10 種の isoform が知られているが甲状腺癌における AC の発現や機能は報告されていない。本研究は甲状腺癌の細胞増殖における AC の isoform とその役割を明らかにすることを目的とした。免疫組織細胞化学的な検討から、甲状腺癌では AC6 が高度に発現していることを明らかにした。AC 活性化剤や AC6 ノックダウンによる実験の結果、AC6 は高分化型甲状腺癌において複数の経路に關与して細胞増殖促進的に働いており、AC6 のノックダウンで *BRAF*^{V600E} 変異がなく MAPK 経路の阻害剤が無効な癌細胞でも増殖を抑制できる可能性が示唆された。

第 1 章 序論

1-1 甲状腺癌の臨床的特徴

甲状腺癌の分類は、本邦では甲状腺癌取扱い規約 (2017 年改訂) により、濾胞上皮由来の①乳頭癌、②濾胞癌、③低分化癌、④未分化癌、C 細胞由来の⑤髓様癌に分類されている。これは WHO 分類とほぼ共通である。現在と組織型の定義が異なるものの、本邦における頻度は 2004 年度の統計では乳頭癌が 92.5%、濾胞癌が 4.8%程度であり、高分化癌である乳頭癌と濾胞癌の両者が大半を占めている[1]。1997～2005 年に日本での手術施行例を集計したものにおいても、乳頭癌が 87.7%、濾胞癌が 9.4%、髓様癌が 1.4%、未分化癌が 1.5%と、やはり乳頭癌と濾胞癌がほとんどを占めていた[2]。

国立がん研究センターがん情報サービスのデータによると、日本の甲状腺癌の罹患数は男女とも増加傾向であり、2013 年時点で人口 10 万人あたり約 12.277 人であるが、死亡数は人口 10 万人あたり 1～1.4 人程度で大きな変化は見られない。罹患数の増加は超音波診断装置や細胞診の普及と向上による発見および診断精度の上昇と手術数の増加によるものと考えられる[3]。

甲状腺癌は他の癌と比べ、次の 2 点で特徴的である。まず、年齢分布が図 1 のように女性では 55～60 歳頃、男性は 60～64 歳頃にピークがあり、それ以降は減少する。多くの癌では、高齢になるほど発症頻度が増加するパターンが一

般的であり、この年齢分布は甲状腺癌に特有のものである (図 1)。

次に、2017 年の全国がんセンター協議会の集計データによれば、癌の部位別臨床病期別 10 年相対生存率は、甲状腺癌はステージ I ~ III で 90% 以上、ステージ IV でも 56.5% と、ステージ III までで見れば前立腺癌に続き 2 番目に高い。Bai らは乳頭癌を組織学的所見から高リスク群と低リスク群に分けた比較を行い、高リスク群は 10 年無病生存率 78.7%・癌死 8.5%、低リスク群は 10 年無病生存率 91.3%・癌死 0% と報告している[4]。若年者ほどステージが進んでいることが多いが、若年者の方が適切な手術後の予後は良好で、若年者の乳頭癌に限れば 20 年生存率は 100% に近いと考えられており[5]、その予後の良さは特徴的である。

1-2 甲状腺癌の遺伝子変異

甲状腺癌においても細胞増殖を促す遺伝子変異が知られている。多くは、塩基単位の変化による配列異常と DNA の二重鎖切断・再結合による遺伝子再構成であり、各組織型により特徴的な分布を示す (表 1)。

乳頭癌では主に *BRAF*^{V600E} の点突然変異と *RET/PTC* の遺伝子再構成が、濾胞癌では主に *RAS* の点突然変異と *PAX8/PPAR γ* の遺伝子再構成が排他的に認められる[6,7]。

これらの遺伝子変異は、例えば *BRAF*^{V600E} 変異は肺癌・大腸癌・悪性黒色腫といった、他癌種でも認めるものである[8,9,10]。これらの遺伝子変異は MAPK 経路を恒常的に活性化させ、癌細胞の増殖・腫瘍の増大を引き起こすと考えられているが、他の癌と異なり、甲状腺乳頭癌および濾胞癌の増殖は緩徐である。病理組織標本では細胞分裂像はほとんど認められず、細胞増殖の指標である Ki-67 のラベル率は他臓器癌では通常 10%以上であるが、甲状腺癌では 1%以下でありこの点でも甲状腺癌は他臓器癌と比べ特徴的である[11]。

1-3 甲状腺における増殖シグナル

正常甲状腺濾胞細胞の増殖シグナルは、TSH 受容体から G 蛋白を介し、アデニル酸シクラーゼ (AC) を活性化する経路が知られている。AC 以降の増殖機構として、AC により産生された cAMP が細胞内メッセンジャーとして PKA・PI3K を活性化させ、PKA は RhoA を活性化して p27 発現を低下させ、PI3K は cyclinE の発現を促進させ、これらの作用により Cdk2/CyclinE 複合体が誘導され、Rb のリン酸化を介して細胞増殖を促すモデルが考えられている[12] (図 2)。

一方、乳頭癌や濾胞癌といった高分化癌細胞においては TSH 受容体を介する前述の経路の他に、1-2 で述べた遺伝子変異により rearranged during transfection (RET) チロシンキナーゼ型受容体を介した RAS→RAF→MEK→MAPK

と続く MAPK 経路が恒常的に活性化されて生じる腫瘍増殖経路も存在すると考えられている (図 3)。甲状腺機能性結節では *GNAS1* や *TSHR* の機能獲得変異が生じており、cAMP 経路が活性化されている。しかしそのような変異をもつ機能性結節で悪性のものはほとんど報告されておらず、*GNAS1* 変異をもつ McCune-Albright 症候群においても甲状腺癌の発生率は低い。乳頭癌・濾胞癌といった高分化癌の約 70%に *RET*、*NTRK1*、*BRAF*、*RAS* といった MAPK 経路を活性化する遺伝子変異が認められており、悪性化には cAMP 経路の活性化のみでは不十分であり、MAPK 経路の活性化が必要であると考えられている[6, 13]。

一方で、*BRAF*^{V600E} 変異を持たない細胞株では MEK 阻害薬による直接的な MAPK 経路の阻害ではほとんど増殖抑制効果が得られないことも報告されている[14]。

1-4 AC 活性化剤 Forskolin (FSK) と甲状腺癌細胞

Forskolin (FSK) は、*Coleus Forskohlii* から抽出された diterpene であり、非特異的に AC を活性化し cAMP 作用を強力に活性化する試薬として用いられている [15]。FSK は甲状腺細胞に対して、TSH よりも強力に cAMP を増加させること、その効果は即効性があること、作用の発現に外因的な受容体の活性化を必要とせず G タンパク-Ac のレベルで生じること、cAMP を介する作用のみを生じる

ことが報告されている[16,17]。

TSH 受容体刺激は 1-3 で述べたように、AC を活性化し cAMP の濃度上昇を生じ細胞増殖を促すと考えられているため、臨床においては甲状腺良性結節や甲状腺癌術後症例に増殖抑制を目的とした TSH 抑制療法が行われることがある[18]。

しかし、FSK は *BRAF*^{V600E} 変異または *RET* 再構成をもつ乳頭癌細胞株については細胞の増殖をむしろ抑制することが報告されている[19,20]。また、濾胞癌細胞株に対しても同様に細胞増殖抑制が生じることが報告されている[21]。

甲状腺癌細胞においては、外因的な TSH 添加により細胞内 cAMP は上昇しないが、FSK による AC 刺激やコレラ毒素による持続的な G タンパクの活性化、およびカテコラミンの添加では cAMP 上昇が認められる。つまり、AC 以下のシグナル伝達経路、および cAMP 経路以外の経路は保たれており、TSH 受容体～G タンパクにおいてシグナルが伝達されなくなっている可能性が報告されている。また、TSH 受容体数も減少している可能性が報告されている[22]。

1-5 甲状腺濾胞細胞に発現する AC の isoform

AC は、N 末端に続き、2 つの 6 回膜貫通ドメインである transmembrane cluster(TM1, TM2)があり、その間を cytoplasmic loop(C1a, C1b)がつないでいる。TM2 の以後は cytoplasmic loop(C2a, C2b)と続き、C 末端となって終わる(図 4A)。

C1a と C2a が dimerize して catalytic site となり、ATP-binding site となる他、後述する Forskolin もこの部位に結合する。AC には膜結合型 9 種(AC1-9)と可溶型 1 種(soluble AC; sAC)を含め全部で 10 種類の isoform が知られており、isoform ごとに regulatory properties が異なることが知られており、その特徴から Group I ~IV に分けられている。特に AC5 と AC6 は GroupIIIに属し、PKA による抑制を受けることが特徴である。C1a および C2a が形成する catalytic site は isoform によらずほぼ保存された構造となっている。(図 4B) [15,23,24,25]。

甲状腺濾胞細胞における isoform の発現を解析した研究は少なく、Vanvooren らが甲状腺においては AC3・6・9 が主に発現している可能性を報告している[26]。Wicker らは AC6>5>4 の順で甲状腺に重要である可能性を報告し、AC6 を cloning した[27]。Celano らは機能性甲状腺結節と正常組織との比較で、AC3 の発現量は変化がないが、機能性結節の部位において AC6 の発現が低下していることを報告している[28]。

一方で、TSH 受容体から G タンパクを介して活性化される isoform が何であるのか、正常甲状腺ではない甲状腺癌細胞における AC6 の発現や機能を解析した研究はほとんど報告されていない。

1-6 本研究の目的

本研究では、乳頭癌・濾胞癌由来の実際の手術標本および癌細胞株を用いて AC の isoform 発現を解析すること、および AC6 の機能に着目し、ノックダウンおよび AC 刺激を通して増殖における役割を解析することを目的とした。

第2章 実験方法

2-1 免疫組織化学 (immunohistochemistry:IHC) および免疫細胞化学

(immunocytochemistry:ICC)

杏林大学医学部附属病院において2012年から2017年の間に治療された、10例の乳頭癌および9例の濾胞癌の症例について、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いてIHCを施行した。これらの研究は杏林大学医学部研究倫理委員会承認を得て行った (杏林大学医学部倫理委員会承認課題 No.257 「内分泌腫瘍に関する分子病理学的研究」)。また、培養細胞株に対してICCを施行した。

IHCについては、4 μ M厚の連続切片に対しヘマトキシリン・エオジン(HE)染色または抗体を用いた免疫染色を行った。使用した抗体は、Adenylyl cyclase3 (1:100 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、Adenylyl cyclase6 (1:1000 dilution; OriGene, Rockville, MD, USA)、Adenylyl cyclase9 (ab110159,1:200 dilution; abcam Abcam plc, Cambridge, UK) である。内因性ペルオキシダーゼ活性は0.3%過酸化水素/メタノール溶液と室温で15分間反応させることで阻害した。抗原賦活化を施行後、一次抗体は4 $^{\circ}$ C、overnightで反応させ、Envision FLEX detection system (Agilent, Dako, Santa Clara, CA, USA)の指示書に従い、3,3'-diaminobenzidine (DAB)により発色させた。

ICCについて、各培養細胞を15mmol/L Phosphate Buffer Saline (PBS)(pH7.4)で2

度洗淨した後、10%ホルマリンに室温で60分間浸し固定した。アルギン酸Na法でセルブロックにパラフィン包埋後、前述の組織と同様に免疫染色を行った。

2-2 細胞培養

本実験は杏林大学医学部病理学教室の細胞株を用いて行われた。使用した細胞株はヒト分化型甲状腺癌由来のもので、乳頭癌由来 (KTC-1、TPC-1) と濾胞癌由来 (WRO) の3種類を用いた。KTC-1は紅林淳一教授 (川崎医科大学) から、TPC-1およびWROは加藤良平教授 (山梨大学) から提供された。KTC-1は *BRAF*^{V600E}変異を、TPC-1は*RET/PTC*再構成をもつ。WROには明らかな変異は知られていない。

細胞培養液はTPC-1とKTC-1についてはDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) に、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:50U/ml penicillinと100μg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) を添加したものをを用いた。37°C、5%二酸化炭素の条件下で培養を行った。

2-3 RNA 抽出および半定量 PCR

(semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR))

ISOGEN II (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を用いて凍結標本からtotal RNAを抽出した後にRevertra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan) を指示書の方法に従って用い、total RNA 200ngからcDNAを合成した。反応液のうちcDNA 1.0 μ lをテンプレートとしてqRT-PCRを施行した。試薬はFAST SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用い、反応はStepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で行った。mRNA発現レベル比較のために使用したプライマーは表2に記載した(表2)。発現レベルはGAPDHでnormalizeし、相対比較はLivak Method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) で算出して行った。

2-4 miRNAノックダウン

Block-iTTM RNAi Designer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) によりAC6に対するmiRNAを設計した。The BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kits (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に含まれるpcDNATM6.2-GW/EmGFP-miRを使用しretrovirus vectorを作製した。ノックダウンする細胞としてWRO・TPC-1を使用した。また、ノックダウンのNegative control

にはkit同封のものを用いた。各vectorをE.coli competent cellに導入して選別・増殖させ、plasmid DNAを抽出した。各細胞を 200×10^3 個/wellの密度で6wellプレートに播種し、接着後にplasmid DNA 2.0 μ gに対しViaFect™ Transfection Reagent (Promega Corporation, Madison, WI, USA) を使用しトランスフェクションを施行した。BlasticidinSで選別後、3週間の限界希釈を行い、ノックダウン株を樹立した。ノックダウンに使用したinsertは表2に記載した (表2)。本insertは、AC6のmRNAの993番目からの21塩基を標的としており相補性は100%、blastによるサーチにより特異性を確認した。

2-5 細胞増殖分析

甲状腺癌細胞株を 2.0×10^3 個/wellの密度で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した播種後4時間を目安に、対照群にはdimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) を、その他の群には適宜設定した濃度のForskolin (FSK) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) またはSorafenib (SOR) (ChemScene, Monmouth Junction, NJ, USA)を添加し、10%FBSの状態²⁴で24~96時間培養を行った[18,20]。

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 (Cell counting kit8)(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用い、水溶性ホルマ

ザンの吸光度測定により行った。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 Mode1 680 Microplate Reader)(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用し450 nmの吸光度を測定した[29]。

2-6 死細胞率測定

甲状腺癌細胞株およびそのノックダウン細胞株を 5.0×10^3 個/wellの密度で6wellプレートに播種し、細胞の接着が確認された播種後4時間を目安に、各細胞株にDMSOまたはFSK (10 μ M)を添加した。添加後24時間後および96時間後にtrypsinを用いて細胞を剥がし、遠心して上清を除き、再度培地を加えてサスペンドした。0.4% (w/v)トリパンプルー溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を1:1~1:3の割合で適宜混合し、血球計算盤で全細胞数および死細胞数をカウントした。

2-7 ウェスタンブロット

WROおよびmiRNAを導入した細胞株を適宜プレートに播種し、細胞の接着が確認された播種後4時間の時点でDMSOまたは濃度調整したFSKを添加し、10%FBSの状態です30分間もしくは24時間培養した[18,19,20]。

まず蛋白質抽出を以下の方法で行った。培養液を吸引し、Phosphate buffered

saline (PBS) で洗浄後、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、液体窒素中に入れて凍結した。自然融解を待つて、スクレーパーで細胞を剥離しtubeに集めた。超音波破碎装置 (U50 control, IKA labortechnik, Osaka, Japan) を用いて細胞のsonicationを十分に行い、タンパク質を抽出した。

泳動タンパク量は1回につき1サンプル10 μ gとした。サンプルバッファー (Sample Buffer Solution with Reducing Reagent(6 \times) for SDS-PAGE:pH6.8,0.375M-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 $^{\circ}$ Cにて5分間加熱した。

8%または12%の分離用ゲルを、1M-Tris-HCl(pH=9.1) および40% (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) を混合して作製した。濃縮用ゲルは0.5M-Tris-HCl (pH=6.5)および40% (w/v) acrylamide、10% (w/v) SDS、10% (w/v) ammonium persulfate solution、TEMEDを混合して作製した。

泳動用バッファーはトリス塩基(0.25M)、グリシン(1.92M)、SDS(1% (w/v))とな

るように混合し作製した。電気泳動は、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50Vで約30分、分離用ゲルに対しては100Vで約90分電気泳動を行った。

転写はセミドライブロットィング法で行った。メンブレンはメタノールで親水化したpolyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (PALL, East Hills, NY, USA) を使用した。転写バッファーは、トリス塩基(25mM)、グリシン(192mM)、15%(w/v)メタノールとなるよう混合し作製した。転写装置 (TRANS-BLOT SD SEMI - DRY TRANSFER CELL, Bio-Rad, CA, USA) に転写バッファーに浸した濾紙を2枚、PVDFメンブレン、ゲル、濾紙2枚の順に重ね、2 mA/cm²の定電流下で60～75分間通電した。転写後、PVDFメンブレンを5%スキムミルクに常温下で30分間浸し、振盪させブロッキングを行った。ブロッキング後に洗浄液 (0.1% Tween 20, Tris Buffered Saline) にPVDFメンブレンを10分間浸して振盪させて洗浄することを3回繰り返した。希釈した一次抗体の溶液にPVDFメンブレンを浸し、4℃ 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-ADCY6 rabbit polyclonal antibody (1:1000 dilution; Origene Technologies, Rockville, MD, USA)

- anti-phospho-p44/42 ERK1/2 (MAPK)(Thr202/Tyr204) rabbit monoclonal antibody

(1:1,000 dilution; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)

- anti-p44/42 MAPK(ERK1/2) rabbit monoclonal antibodies (1:1,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
- anti-phospho-AKT (Ser 473) (D9E) XP rabbit monoclonal antibodies (1:1,000 dilution; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
- anti-AKT1/2/3 mouse monoclonal antibodies (1:1,000 dilution; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
- anti-phospho-CREB rabbit monoclonal antibodies (1:1,000 dilution; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
- anti-CREB rabbit monoclonal antibodies (1:1,000 dilution; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
- anti-CyclinE2 rabbit monoclonal antibodies (1:1,000 dilution; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
- anti-p27 mouse monoclonal antibodies (1:1,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
- anti- β -actin mouse monoclonal antibodies (1:3,000 dilution; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA);

一次抗体反応後、前述と同様に洗浄液で10分間×3回のメンブレンの洗浄を行い、二次抗体を加えて1時間、常温で振盪のうえ反応させた。使用した二次抗体は以下の通りである。

- anti-rabbit IgG, HRP-linked whole Ab from goat (1:5000 dilution; abcam, Rockville, MD, USA)

●anti-mouse IgG,HRP-linked whole Ab from sheep (1:5000 dilution; GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)

メンブレンを洗浄液で10分間×3回、常温で振盪・洗浄した。その後、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) を用いてバンドを検出した。バンドはImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Insitutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/> , 1997-2018.) を用いて定量化・グラフ化した。

2-8 マイクロアレイ解析

濾胞癌由来であるWRO株について、WROとWRO-miAC6をノックダウンした株それぞれについて、DMSO群とFSK (10 μ M)群を用意し、計4群についてマイクロアレイ解析を行った。解析はFilgen株式会社に委託し以下に述べるAffymetrix protocolに従って行われた。

各群の細胞から抽出したtotal RNAはAgilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)により品質チェックが行われ、いずれもRNA integrity number(RIN)値は7.0以上を達成していた。GeneChip® 3' IVT Express kit(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)でcDNAを合成・精製し、In vitro transcription

とT7RNA増幅およびラベリングを行い、GeneChip® Hybridization, Wash, and Strain KitでaRNA合成のフラグメント処理を行った。GeneChip® Scanner 3000 7G system(Affymetrix)でハイブリダイゼーションを行い、信号強度を数値データに変換した。データ解析はMicroarray Data Analysis tool(Filgen, Inc., Aichi, Japan)を用いて行った。

2-9 フローサイトメトリー

細胞周期解析のため、WRO と TPC-1、およびそれぞれの miNC と miAC6 を用いた。6つの細胞を 2.0×10^3 個/well の密度で 6well プレートに播種し、4時間培養した。DMSO または FSK (10 μ M)を添加し、96h の培養を行った。細胞は trypsin を用いて剥がし、遠心して上清を除き、ThinPrep® (Hologic Inc., Marlborough, MA, USA) 1ml で洗浄したのち、同溶液 3ml で固定した。細胞周期解析は剥離細胞分析装置 LC-1000(Sysmex, Hyogo, Japan)を用いた。

2-10 統計解析

細胞増殖分析については原則各添加群につき 3~6well ずつで行い、結果は mean \pm S.E.M.で表記した。各群間の比較は t-test または Tukey-Kramer 法を使用し p<0.05 を有意差ありと判断した。統計解析は R version 3.2.1 (R Core Team

(2015). R: A language and environment for statistical computing. R
Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria,
<http://www.R-project.org/>)を用いて行った。

第3章 結果

3-1 甲状腺癌パラフィン包埋切片および細胞株を用いたIHCによるAC発現の検討

杏林大学医学部附属病院において2012年から2017年の間に治療された、10例の乳頭癌および9例の濾胞癌の症例のパラフィン包埋切片を使用した(表3)。手術標本において腫瘍細胞および正常濾胞細胞におけるAC3・6・9各isoformの発現状況を免疫染色で評価した。手術標本染色の代表例を図4に示した(図5A, B)。また、3つの甲状腺癌細胞株についてもAC3・AC6・AC9を染色した(図5C)。

AC3は細胞質・核・細胞膜ともに染まるものは皆無であった。

AC6は細胞膜に強く集積する傾向が見られ、一部は細胞質内に顆粒状に染色された。正常濾胞細胞での細胞内の染色はほとんどないかごく軽度であり、腫瘍部位ほどの染色性の強さはいずれの標本にも見られなかった。正常濾胞細胞・腫瘍細胞を問わず核内への染色は見られなかった。染色された細胞においては乳頭癌症例でも濾胞癌症例でも染色パターンに差異は見られなかった。

AC9も正常濾胞細胞での細胞内の染色はほとんどないかごく軽度であり、腫瘍細胞で軽度に濃染する傾向が見られたが、AC6ほどの強いコントラストが生じることはなかった。細胞質の染色はほぼ均一で細胞内の局在はほとんど見られなかった。KTC-1・TPC-1・WROの細胞における染色パターンは手術標本と同様

であった。

3-2 甲状腺癌細胞株に対するFSKおよびSORの効果

まずFSKが各分化型甲状腺癌の細胞株の増殖に与える影響を評価した。KTC-1・TPC-1・WROの各細胞を96wellプレートに播種し、対照群としてDMSOのみの群とFSKを0.1~20 μ Mまでの各濃度を添加した群にわけ、96時間の培養を行いWST-8で増殖分析を行った。結果は図5のように、いずれの群もFSK濃度依存性に増殖が低下し、10 μ M以上の濃度でDMSO群と比較し有意に低下することが確認された (図6)。

次に、同様の条件でDMSO群、FSK (10 μ M) 群、SOR (10 μ M) 群、FSK (10 μ M) +SOR (10 μ M) 群の4つに分け、各細胞を24時間ごとに96時間まで増殖分析を行い時系列でFSKおよびSORの影響を比較した。WROとTPC-1については澤文氏が施行した。

DMSO群とFSK群との比較ではいずれの細胞も72h時点から増殖に差が生じはじめ、96h時点で有意にDMSO群より増殖が低下することが確認された (図7)。SOR群を含めた比較ではTPC-1群において、DMSO群に対しSOR (10 μ M) 群で有意な低下が見られたが、その他においてはDMSO群とSOR (10 μ M) 群、FSK (10 μ M) 群とFSK (10 μ M) +SOR (10 μ M) 群との間で有意差はみられず、SOR

(10 μ M)の追加投与の効果は認められなかった(図7)。

3-3 WRO細胞におけるAC6ノックダウン株の樹立

AC6の機能解析を行うため、ノックダウン株の樹立を試みた。WROおよびWROのノックダウン株のnegative control (WRO-miNC)、AC6のノックダウン株(WRO-miAC6)について、ウェスタンブロットを施行し、AC6のバンドを比較した。WRO-miAC6においてAC6のバンドの著明な低下を確認した (図8)。

3-4 細胞免疫染色でみるAC6ノックダウンの影響

WRO・TPC-1およびそれぞれのmiNC・miAC6について、各群のセルブロックを作製し、ICCでAC6を免疫染色した。WRO、TPC-1とそれぞれのmiNCについては手術標本の所見と同様、細胞の周囲に強く染色性が見られたが、それぞれのmiAC6においてはその染色性が明らかに低下しており、ノックダウンによる発現の低下と考えられる所見であった (図9)。

3-5 増殖率に対するFSK濃度の影響

WRO・TPC-1およびそれぞれのmiNC・miAC6について、FSKの濃度を変更し増殖率を測定し、WRO・TPC-1と同様に濃度依存的に増殖率が低下することを

確認した。WRO・TPC-1とそれぞれのmiNCとで差は生じなかったが、miAC6においてFSK \geq 10 μ Mで他の2群に比べて有意な低下がみられた(図10)。

3-6 FSK添加による増殖率および死細胞率の変化

WRO・TPC-1およびそれぞれのmiNC・miAC6について、前述の結果をもとに、DMSO群とFSK (10 μ M) 群に分け、添加後96hまで培養しWST-8により時系列で増殖率を評価した。WROとWRO-miNCの比較ではDMSO群同士・FSK (10 μ M) 群同士いずれも有意差は見られなかった。WRO-miAC6は、DMSO群同士の比較でWROとWRO-miNCのDMSO群より有意に増殖率が低下していた。また、いずれの細胞においてもFSK (10 μ M) 群は同細胞のDMSO群より有意に増殖率が低下していた (図11A)。96h時点での増殖率についてmiAC6-FはWRO-Fとは有意差をもって低下していた。miNC-Fとはわずかに有意差が付かなかったが同様の傾向と考えられた。

TPC-1についても基本的にWROと同様の傾向であった。ただし、TPC-1にFSKを添加した群 (T-F)については、96hにおいても、miAC6-Fよりは増殖していたものの、miNC-Fよりは有意に抑制される傾向がありWROとは異なっていた。

同様の条件にてトリパンブルーにより死細胞率を測定した。96h時点での死細胞率は、WROやWRO-miNCよりもWRO-miAC6で高く、またFSK群の方が多くな

る傾向は見られたものの、96時間後の死細胞率は多くても6%程度であった。

TPC-1群でもmiAC6-Dで有意に死細胞が増加していたが、WRO・TPC-1の各細胞いずれにおいても、WRO-miAC6を除き正常で見られうる5%を超えるものはなかった。(図11B)。

3-7 半定量PCRおよびマイクロアレイによるAC3・6・9の発現量の相対比較

WRO および WRO-miNC、WRO-miAC6 のそれぞれに対し、DMSO または FSK(10 μ M)を添加し AC の mRNA レベルでの発現量を検討した。添加後 24 時間で total RNA を抽出し、AC3・6・9 の発現レベルを qRT-PCR にて比較した。各細胞において DMSO 群を基準に相対的発現量を算出した。FSK 添加により AC3 と AC6 は発現が低下し、AC9 は発現が上昇する傾向がみられた (図 12A)。

WRO と WRO-miAC6 の DMSO 群と FSK (10 μ M) 群について、マイクロアレイによる AC isoform の発現量の比較も行った。AC1 の発現が多かったものの、AC3・6・9 の間の比較では AC6 が最も多く、次に AC9 が多く、AC3 が著明に少ないという結果が得られた(図 12B)。

3-8 AC6ノックダウンによるシグナル伝達の変化

WROおよびWRO-miNC、WRO-miAC6の3群について、DMSO群・FSK (10 μ M)

群に分けてプレートに播種した。試薬を添加した30分後に蛋白質を抽出し、ウェスタンブロットで評価した。

FSK添加により、AKT・ERK・CREBのリン酸化の亢進が生じたが、AC6をノックダウンしたWRO-miAC6ではこの亢進は消失していた (図13A)

3-9 FSK添加による細胞周期への影響

WROおよびWRO-miNC、WRO-miAC6の3群について、DMSO群・FSK (10 μ M) 群に分け、試薬添加後24時間まで培養してから蛋白質を抽出し、細胞周期関連蛋白の変動をウェスタンブロットで評価した。CyclinE2について、細胞の種類によらずFSKでの低下がウェスタンブロットで確認された。一方で、p27については明らかな変化は見られなかった (図13B)。

WRO・TPC-1およびそれぞれのmiNC・miAC6について、フローサイトメトリーによる細胞周期の解析を行ったが、特定の細胞周期に有意に集積している所見は認めなかった (図13C)

3-10 WROにおける*BRAF*^{V600E}変異の有無の確認

本研究に用いたWROについて*BRAF*^{V600E}変異の有無を確認した。sequencingの結果、今回用いたWRO細胞株に*BRAF*^{V600E}変異は存在しなかった (図14)。

3-11 甲状腺癌細胞株におけるTSH受容体発現量の比較

甲状腺癌細胞株におけるTSH受容体の発現量をqRT-PCRにて比較した。対照として正常甲状腺不死化細胞Nthy-ori 3-1 (Nthy) を用いた。NthyはEuropean Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) より購入した。WRO・TPC-1・KTC-1のいずれもNthyに比較し著明に発現が低下していた(図15)。

第4章 考察

本研究では、甲状腺癌手術検体および細胞株を用い、AC6のノックダウンを通して機能解析を試みた。

甲状腺癌組織の免疫組織化学染色でAC6・9がそれぞれ特徴的染色パターンを示したのに対し、AC3は乳頭癌・濾胞癌いずれでも染色性が皆無であった。AC3については抗体を変更しても染色性は改善されなかった。ただし、Vanvoorenらの論文では正常濾胞細胞におけるAC3の発現が確認されている[26]。AC9は、免疫組織化学染色のパターンは乳頭癌と濾胞癌とでほぼ同様であったが、いずれも正常濾胞細胞に対する腫瘍細胞の染色性の強さはAC6に比べて弱かった。AC6は乳頭癌・濾胞癌のいずれについてもAC9以上に正常濾胞細胞と明らかなコントラストをもって腫瘍部位が染色されていた。マイクロアレイの結果からも発現量の傾向としてやはりAC6が最も高く、次にAC9となっており、AC3の発現量は他のAC1を除く isoform と同等程度にごく少量であると考えられた(図12B)。以上のことから、AC6が重要な役割を担っていることが推測されたため、AC6の機能を検討するためにAC6のノックダウンを行うこととした。

甲状腺癌細胞株として *BRAF*^{V600E} 変異陽性の KTC-1、*BRAF*^{V600E} 変異陰性で *RET/PTC* 再構成を持つ TPC-1、*BRAF*^{V600E} 変異陰性で濾胞癌細胞由来の WRO を用いたが、ノックダウンする細胞としては、後述するように *BRAF*^{V600E} 変異を持た

ない細胞ほど直接的なMAPK経路の阻害が奏功しないこと、増殖速度がWROはTPC-1より比較的速いこと、いずれも高分化癌であり基本的な増殖メカニズムは共通と考えられることを考慮し濾胞癌細胞株であるWROを優先的に、次にTPC-1を用いた。

AC刺激剤としては、isoform特異的な刺激剤は存在しないこと、非cAMP効果に乏しい性質をもつFSKを用いた。前述のようにAC3の発現は乏しく、後述のようにAC9はFSKによる刺激を受けないことから、AC6を刺激する効果のある程度検証できると考えた。

miRNAはsiRNAと発現抑制のメカニズムが異なるものではあるが、相補性の程度によりその作用は互換性があり、効果に顕著な差はないと考えられている[30]。siRNAにもoff-target effectは存在すること、100%ノックダウンすると細胞死を招く可能性があることを考慮し、本研究ではノックダウンにmiRNAを用いた。今回用いたmiRNAはtargetと100%相補的で、blastの結果からもほぼ特異的と考えられた。

miRNAによるAC6のノックダウンにより、図8のようにウェスタンブロットによる発現低下を認め、また図8のように、免疫細胞染色においても発現低下を確認することができた。TPC-1に対しても同様にAC6のノックダウンを施行した。TPC-1については技術的問題によりウェスタンブロットではバンド低下を検証

できなかったが免疫細胞染色でWROと同様に染色性が低下していたため、同様にノックダウンされていたことが推測された。WRO・TPC-1いずれも、miNCまたはmiAC6との比較で10 μ M以上の濃度のFSK添加で増殖に有意差が生じることを確認したため以後の実験では10 μ Mを基本濃度とした。

qRT-PCRの結果では、AC3やAC6はFSK10 μ M添加によりmRNA発現量が低下し、逆にAC9は上昇していた(図12)。この点についてマイクロアレイの結果と相違が見られるが、マイクロアレイはqRT-PCRに比し定量性に劣るため、qRT-PCRによる確認結果が優先される。FSK刺激で結果的に細胞増殖は全体として抑制されることから、AC3とAC6はFSKによる持続的活性化の結果として、negative feedbackが生じていたことが考えられる。特にAC6はAC5と共に、PKAによるリン酸化を受けて抑制を受けて、negative feedback loopを形成する可能性が知られている[15,31]。また、甲状腺機能性結節においてAC6の発現量が低下していたというCelanoらの結果とも矛盾しないと考えられる[28]。FSKは非特異的にACを活性化させるとされているが、AC9はbinding siteのアミノ酸の一部の違いによりFSKによる活性化を受けないため[23,25,32]、FSK添加による全体として細胞増殖抑制に対し、AC9は代償的に上昇したものと考えられる。

WRO-miAC6は対照であるDMSO群間の比較でWROやWRO-miNCに比べ増殖が低下していた。そしてFSK(10 μ M)の添加によりいずれの細胞においても増

殖は更に抑制された。WRO-miAC6ではFSK添加後のAKT・ERK・CREBのリン酸化の亢進が図13Aのようにほぼ完全に消失していた。PKAはB-Raf陽性の細胞においてRap1を介してB-Rafを活性化させてERKを活性化させること、AKTもPKAの標的になるメカニズムが考えられている[33]。CREBはPKAの代表的な標的の1つである。よって、AC6からPKAを介してAKT・ERK・CREBを活性化させ、細胞増殖促進的に働くという経路が甲状腺癌細胞にも存在することが推測された。

FSKによる増殖低下の機序は、既存のシグナル伝達経路のモデルだけでは説明できず、その候補として、FSKによる直接的な細胞周期の停止が挙げられている。例えばRochaらはCDK4のリン酸化抑制の可能性を提唱している [34]。SawaらはTPC-1およびWROにおいてはFSKによりCyclinD1が抑制されることを報告している[21]。今回の実験で、WROにおいてはFSK添加によりCyclinE2も低下していた。FSKによる増殖抑制はAC6のノックダウンの有無によらず生じたことから、主にはAC6による経路とは異なる経路で独立したmechanismが存在すると推測される。FSKによるmRNAの発現量低下がAC6ノックダウンの有無によらず同程度に生じたこともそれを支持すると考える。この細胞周期抑制の効果がAKT・ERK・CREBといった増殖シグナルの効果を大きく凌駕するため全体としては増殖が抑制され、WRO-miAC6ではそれらの増殖シグナルも低下するため結果的に

最も増殖が抑制されたと考える。なお、FSK添加後の死細胞率は少数かつ正常所見の5%をほぼ超えないレベルにあり、増殖の抑制はFSKによる細胞死の増加とは考えにくい結果であった。

Ohtaらは新たに樹立した細胞株を含む乳頭癌細胞株に対する検証で、 $[H^3]$ thymidineの取り込み阻害の作用がイソプロテレノール>エピネフリン>ノルエピネフリンの順に強いことを示しているが、FSKによる作用はそれらのいずれよりも強力であり、cAMPアナログである8-Bromo-cAMPの添加はFSKと同様な傾向を示していたことを報告している[17]。WROについても、Kimuraらが同様に8-Bromo-cAMPにより $[H^3]$ thymidineの取り込みが低下することを報告している[22]。しかしこういった作用はラットの細胞株に対しては見られず、逆に $[H^3]$ thymidineの取り込みが上昇することから、cAMPによる甲状腺細胞の増殖抑制はヒト甲状腺に特有である可能性も考えられている[17]。cAMPは癌細胞の増殖に対して促進・抑制いずれにも作用し得ること、その違いは癌種や組織ごとに異なることが知られているが、その機序は今なお不明である[33]。例えばFSKを使った検証でcAMPが肝細胞癌の増殖抑制に働くといった報告もある[35]。FSKはACを非特異的に活性化するため、いずれのisoformによるACから産生されるcAMPが増殖抑制的に働くのかどうかという点は未知であり、さらなる解析が必要である。

甲状腺癌は、*BRAF*^{V600E}変異を持つ他の癌よりも明らかに予後が良いことや、高齢になるほど増殖が遅いといった特徴があり、何らかの増殖抑制メカニズムが内在する可能性が推測される。例えばTSH受容体はGs α 作用による増殖促進作用を持つとされているが、少なくとも実験的にはTSH受容体はGs α のみならずGiを刺激する作用も有していることが示されており、前者が作用の強さにおいて大きく凌駕するため全体として増殖促進的になると考えられている[36]。

BRAF^{V600E}変異について、SaiseletらはWRO細胞に*BRAF*^{V600E}のヘテロの変異があることを報告していたが[37]、本研究に用いたWROについてはsequencingの結果、*BRAF*^{V600E}変異は見られなかった(図14)。また、Nambaらの解析によってもWROは*BRAF*^{V600E}変異を持っていなかった[14]。SaiseletらはWROについて2種類の細胞株が流布している可能性を指摘しており、本研究の結果もそれを支持しうると考える。

Nambaらは*BRAF*^{V600E}変異がヘテロまたはホモである乳頭癌細胞株とRET再構成をのみをもつTPC-1、およびいずれの変異もないWROを含めた解析を行っている。増殖速度は*BRAF*^{V600E}変異ホモの細胞株>*BRAF*^{V600E}変異ヘテロの細胞株>TPC-1>WROの順に速く、これがMAPK経路の亢進の程度と相関しており、MEK阻害薬であるU0126添加により*BRAF*^{V600E}変異のないWROとTPC-1はほぼ全く増殖が抑制されなかったと報告している[14]。今回行ったFSKとSORを用いた実験

でも、SOR単剤によるMAPK経路の阻害の効果はFSKに比較し限定的であり、併用による追加効果も認められなかった(図7B)。従って、*BRAF*^{V600E}変異を持たない乳頭癌や濾胞癌に対しては直接的なMAPK経路の阻害による効果は限定的である可能性がある。一方でAC6のノックダウンによる抑制は*BRAF*^{V600E}変異のないTPC-1やWROに対しても奏功し、FSKによる抑制と相加的な傾向も見られたことから、AC6からPKAに至る経路を抑制しAKT・ERK・CREBといった増殖促進的に働く複数の蛋白質のリン酸化を同時に抑制することがより有効である可能性が考えられた。

TSH受容体について、高分化型甲状腺癌細胞では、TSHの投与はcAMPの上昇を生じないが、FSKによるACの直接刺激ではcAMPが上昇し反応がみられることから、TSHに対するcAMPの反応はGsやACではなく受容体レベルで消失しているがACレベル以下のシグナル伝達は保持されていると考えられている。また、TSH受容体の発現が認められなかったことも報告されている[22]。本研究で使用した乳頭癌および濾胞癌の細胞株においても正常甲状腺不死化細胞Nthyに比し、qRT-PCRによる比較でTSH受容体の発現量は著明に低下していた(図15)。パラフィン包埋切片に対する染色は、抗体の感度の問題もあり手術標本では検討不能であった。細胞株化した際に形質転換した可能性も考えられるため、*in vivo*での検証は別に必要であるが、機能および発現量の観点からTSHと

TSH 受容体による作用は甲状腺癌細胞においては限定的である可能性が考えられた。甲状腺良性結節や甲状腺癌術後症例にホルモン製剤の投与による TSH 抑制療法が行われていることがあるが、AC6 の機能抑制により甲状腺腫瘍細胞特異的に増殖抑制が可能となれば過剰な手術や投薬を減らすことにつながることで期待される。

特に濾胞癌は、乳頭癌のように細胞や核の異型が診断の根拠にならず、組織学的な被膜侵襲や脈管侵襲の有無により最終的に癌か腺腫かが判定される。細胞診や超音波検査等でも基本的に鑑別困難であるため、手術以外の確定診断および治療が困難である。これまでの診断基準で細胞診によって indeterminate と診断された症例で、手術がなされても実際に癌であった症例は少なく、過剰な手術がなされてきたとの報告もある[38,39]。過剰な侵襲的治療を避けるためにも、こういった腫瘍をどう取り扱うのかは現在でも困難な課題である。

本研究の限界について、まずACのisoformの成す経路は複雑に絡み合っており、それぞれのisoformが単独に独立して機能しているわけではないことが挙げられる。AC6のみをノックダウンしてもそれが他のisoformの発現等に影響する可能性は否定できない。AC3やAC9のノックダウンも同様の手法で試みたが、十分な感度をもつ抗体に乏しく、ウェスタンブロットによる発現低下の確証が得られなかったため本研究では追及していない。miRNAでは完全な機能喪失は達成で

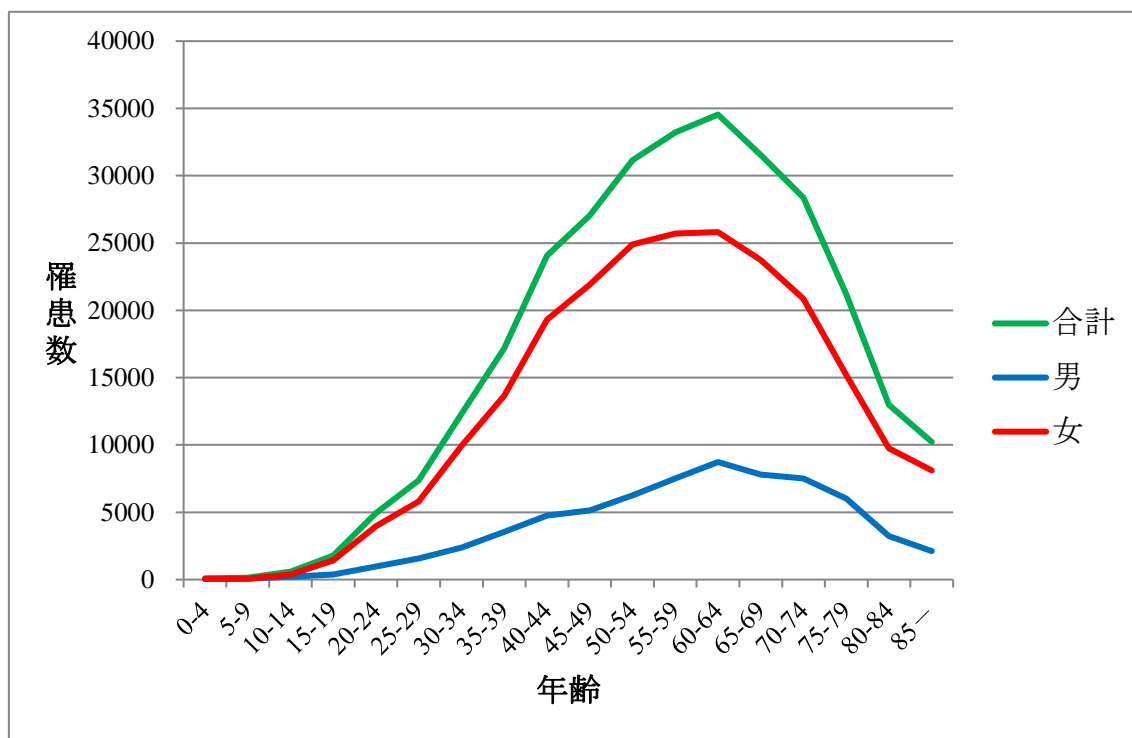
きずoff-target効果にも注意が必要である。乳頭癌についても、免疫染色におけるAC6の染色性の強さから、濾胞癌と同様にAC6は重要な役割を担っていると推測されたが、*BRAF*^{V600E}変異をもつ細胞においてAC6のノックダウンがどの程度の効果を持つかも更なる検討が必要である。AC6に特異的な刺激剤または阻害剤は存在せず、AC5/6を阻害する薬剤(SQ22536、NKY80)の添加では長期生存できず死滅した。また、AC6の強制発現も試みたがこの場合も細胞は程なくして死滅してしまい、ベクターの種類も含む技術的問題がある可能性も考えられた。

本研究により AC6 は甲状腺乳頭癌および濾胞癌細胞において高度に発現していること、AC6 のノックダウンは *BRAF*^{V600E} 変異を持たない細胞株でも増殖を抑制すること、AC6 のノックダウンで AKT・ERK・CREB のリン酸化亢進が消失することから AC6 は PKA から PI3K 経路や MAPK 経路といった他の経路も介して細胞増殖促進的な役割を担う可能性が示された。

謝辞

本研究は、杏林大学医学部病理学教室にて行われました。杏林大学へ特別研究生・共同研究者としての国内留学を許可および受け入れて下さった東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科 南学正臣教授と、杏林大学医学部病理学教室 菅間博教授に心より感謝いたします。本研究を遂行するあたり多大なご助言・ご指導を頂いた菅間博教授をはじめ、実験のサポートを頂いた筑波大学附属病院乳腺甲状腺内分泌外科 澤文先生、獨協医科大学医学部病理学講座 石井順助教、杏林大学医学部病理学教室の有益優先生・吉池信哉助教・住石歩さん・近藤凡子さんに感謝申し上げます。

図 1.甲状腺癌の年齢分布



(国立がん研究センターがん情報サービスより改変)

1975年～2014年の甲状腺癌罹患数を年齢別に集計した。

甲状腺癌の分布は、女性では55～60歳頃、男性は60～64歳頃にピークがあり、それ以降は減少する。

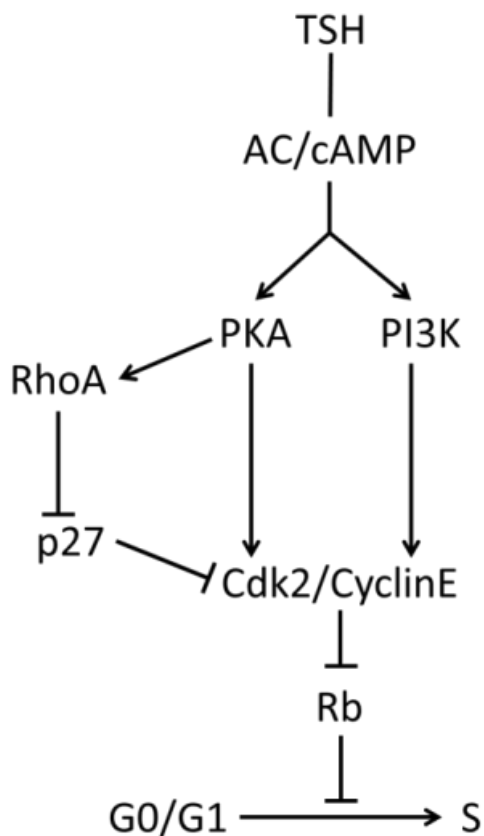
表 1. 甲状腺癌の組織型と遺伝子変異の頻度

	乳頭癌	濾胞癌	低分化癌	未分化癌
RET 再構成(RET/PTC)	13 – 43 %	0%	0 – 13 %	0%
BRAF 点突然変異 (BRAF V600E)	29 – 69 %	0%	0 – 13 %	10 – 35 %
RAS 点突然変異	0 – 21 %	40- 53%	18 – 27 %	20 – 60 %
PPARγ 再構成 (PAX8/PPARγ)	0%	25 - 63%	0%	0%
TP53 点突然変異	0 – 5 %	0 - 9 %	17 – 38 %	67 – 88 %
CTNBI 点突然変異	0%	0%	0 – 25 %	66%

(文献[6]より改変)

甲状腺癌の組織型と代表的遺伝子変異の頻度を示した。黄色で示した部分は基本的に排他的に認められる。

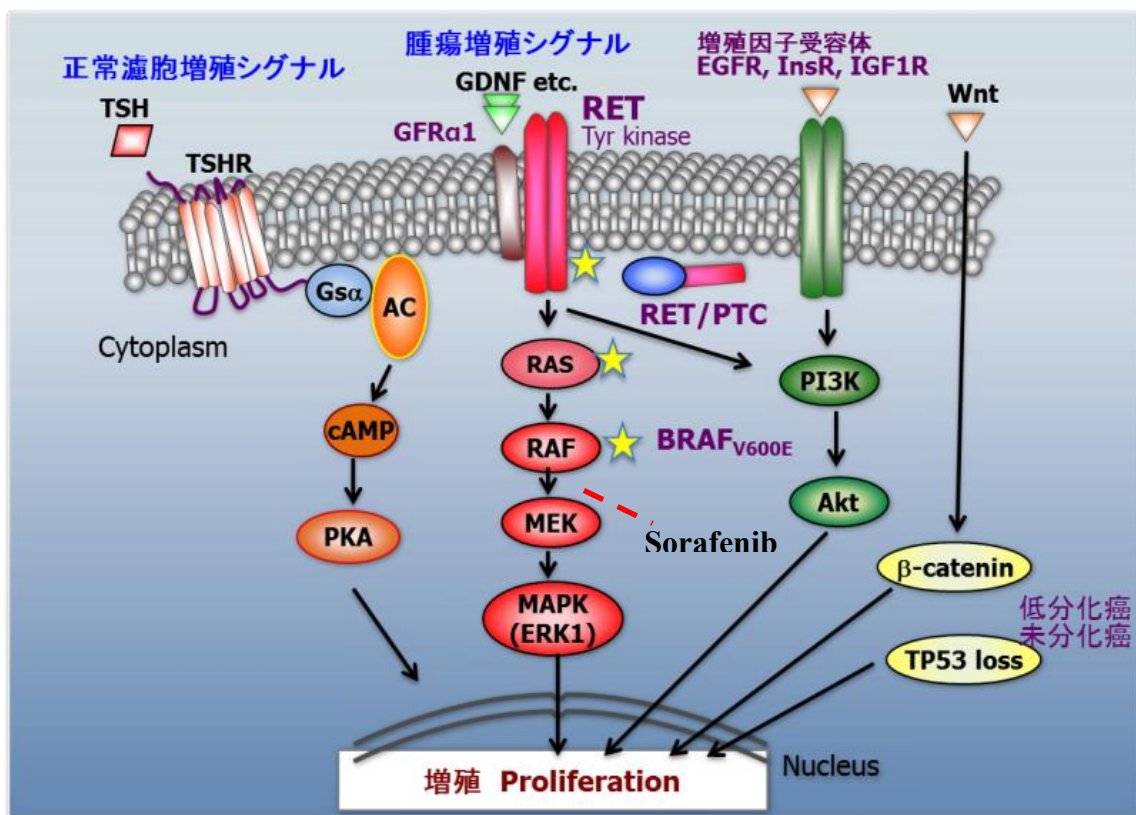
図 2.TSH による細胞増殖のメカニズム



(文献[12]より改変)

ACにより産生された cAMP は PKA および PI3K を活性化し、それぞれ Cdk2・CyclinE を活性化する。いずれも Rb の抑制を介して細胞周期を S 期へ進める。また、PKA は RhoA を活性化し、p27 を抑制する。この機序も Cdk2 の活性化へつながると考えられている。

図 3.正常濾胞増殖シグナルと腫瘍増殖シグナル

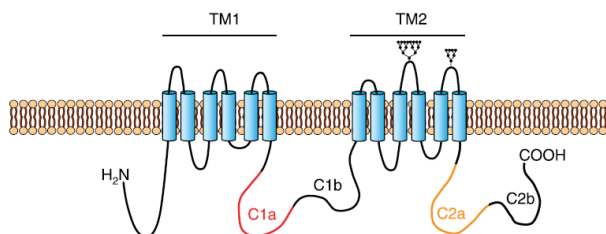


(文献[11]より引用・改変)

正常濾胞細胞における増殖シグナルは TSH から G 蛋白・AC・PKA を介する経路によると考えられている(cAMP 経路)。甲状腺癌細胞においては、主に遺伝子変異により RAS 以下の経路が亢進しており増殖につながると考えられている(MAPK 経路)。☆は甲状腺癌においてみられる主な遺伝子変異である。Sorafenib は multikinase inhibitor であり、MAPK 経路を抑制する。

図 4.AC の構造および isoform の特徴

(A) AC の基本的構造



(文献[30]より引用)

AC は 6 回膜貫通ドメインを 2 つ持ち、cytoplasmic loop である C1a、C2a が dimerize して ATP-binding site となる。

(B) AC isoform の分類および分布

	Isoform	Nt	TM1	C1a	C1b	TM2	C2a	C2b	aa	局在	分布
Group I	AC1								1134	7p12	脳・副腎
	AC3								1144	2p22-24	脳・嗅上皮・♂生殖細胞・睪臓
	AC8								1251	8q24	脳・肺
Group II	AC2								1090	5p15	脳・骨格筋・肺
	AC4								1064	14q11.2	脳
	AC7								1080	16q12-13	脳・血小板など 広範囲
Group III	AC5								1223	3q13.2-21	心臓・脳
	AC6								1166	12q12-13	広範囲
Group IV	AC9								1353	16p13.3	脳・骨格筋など 広範囲

(文献[22・30]より引用・改変)

AC1-9 の isoform は制御機構により I ~IV の group に分かれ、それぞれ特徴的な分布を示す。

表2.本研究で使用したoligonucleotide

oligonucleotide name	Sequence
Adenylyl cyclase3 for qRT-PCR	F: 5'-CTACATGGCTGACCGCAAGC-3'
	R: 5'-CTTTCAGCATCTCGTCAGCCAC-3'
Adenylyl cyclase6 for qRT-PCR	F: 5'-TTAACCGTGGTGATGCCTTCCT-3'
	R: 5'-ATGTAACCGCGGGTCTCCTG-3'
Adenylyl cyclase9 for qRT-PCR	F: 5'-AAGTTATTGAACGGCTGGGCC-3'
	R: 5'-CCTGTGAGCCGTCAATGACC-3'
GAPDH for qRT-PCR	F: 5'-GAGTCAACGGATTGGTCGT-3'
	R: 5'-TTGATTTGGAGGGATCTCG-3'
TSH receptor for qRT-PCR	F: 5'-GCCATTTCAGTCCACGGTA-3'
	R: 5'-AGGGGGCTATCATCACAGGT-3'
Adenylyl cyclase6 for miRNA knockdown	top: 5'- TGCTGATCAAATGCAAGGTGGAGAGGGT TTTGGCCACTGACTGACCCTCTCCATTGC ATTTGAT-3'
	bottom: 5'- CCTGATCAAATGCAATGGAGAGGGTCAG TCAGTGGCCAAAACCTCTCCACCTTGC ATTTGATC-3'

表 3.本研究において使用した乳頭癌・濾胞癌症例

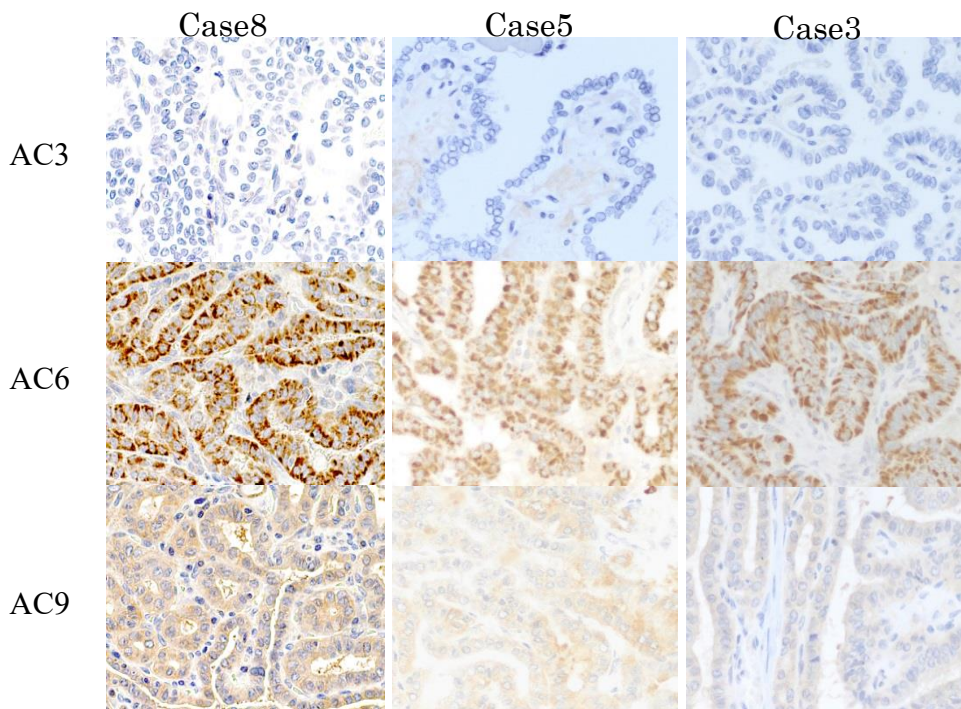
Case	Histological Type	Age	Gender	max diameter	Immunohistochemistry		
					AC3	AC6	AC9
1	Papillary Carinoma	55	M	13 mm	—	++	+
2	Papillary Carinoma	18	F	30 mm	—	+	+
3	Papillary Carinoma	50	F	11 mm	—	+	+
4	Papillary Carinoma	41	F	38 mm	—	+	+
5	Papillary Carinoma	36	F	33 mm	—	+	+
6	Papillary Carinoma	29	F	11 mm	—	+	+
7	Papillary Carinoma	51	F	14 mm	—	±	+
8	Papillary Carinoma	23	F	7 mm	—	++	+
9	Papillary Carinoma	70	F	20 mm	—	+	+
10	Papillary Carinoma	31	F	20 mm	—	+	+
11	Follicular Carcinoma, widely invasive	37	M	40 mm	—	±	+
12	Follicular Carcinoma, widely invasive	70	F	30 mm	—	±	+
13	Follicular Carcinoma, widely invasive	82	M	31 mm	—	+	±
14	Follicular Carcinoma, widely invasive	82	F	45 mm	—	+	+
15	Follicular Carcinoma, widely invasive	87	F	36 mm	—	+	+
16	Follicular Carcinoma, widely invasive	70	M	25 mm	—	+	+
17	Follicular Carcinoma, widely invasive	65	F	77 mm	—	+	+
18	Follicular Carcinoma, minimally invasive	71	M	38 mm	—	++	+
19	Follicular Carcinoma, minimally invasive	77	F	42 mm	—	+	+

M, male; F, female; +, positive; -, negative.

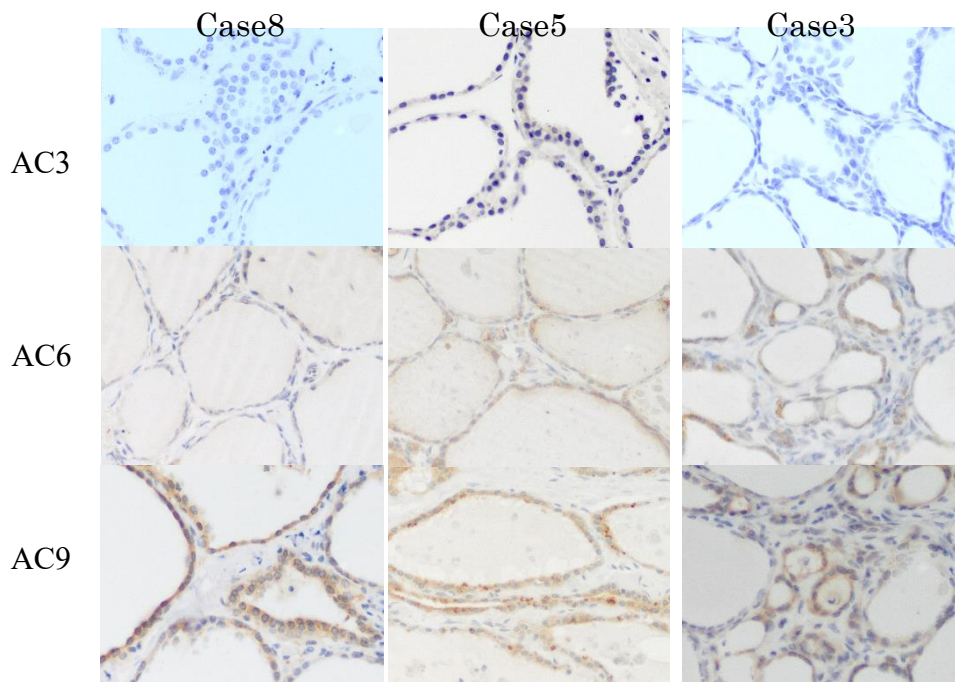
乳頭癌・濾胞癌を問わず AC3 の染色性は皆無であった。AC6 と AC9 はいずれにも染色性が見られた。

図 5. 乳頭癌・濾胞癌における AC 染色結果

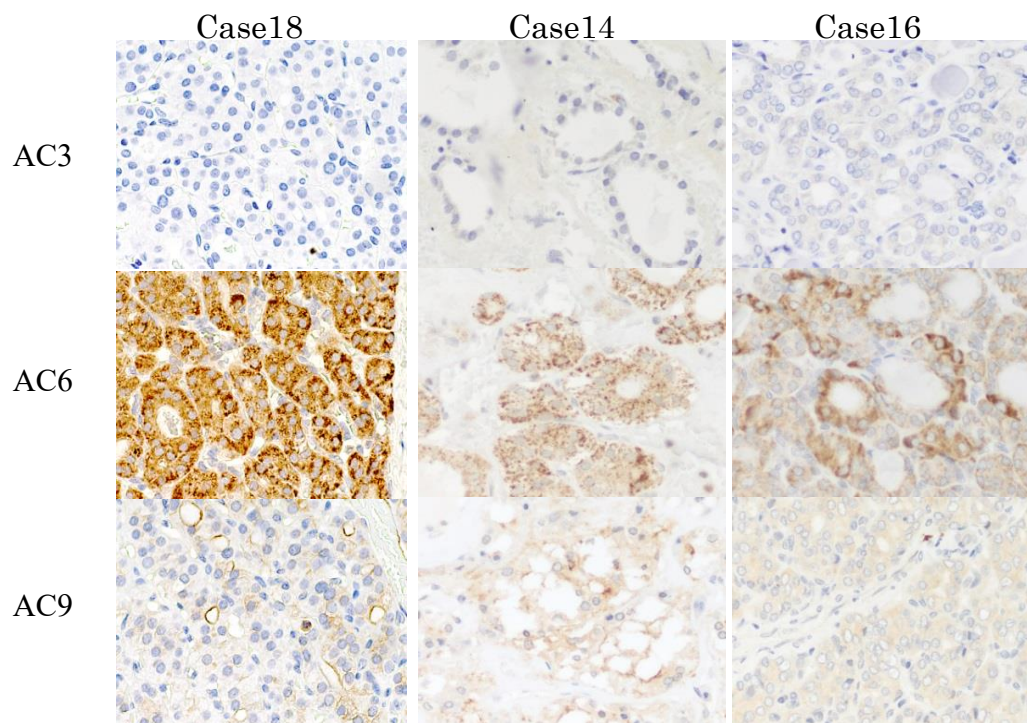
(A) 乳頭癌症例



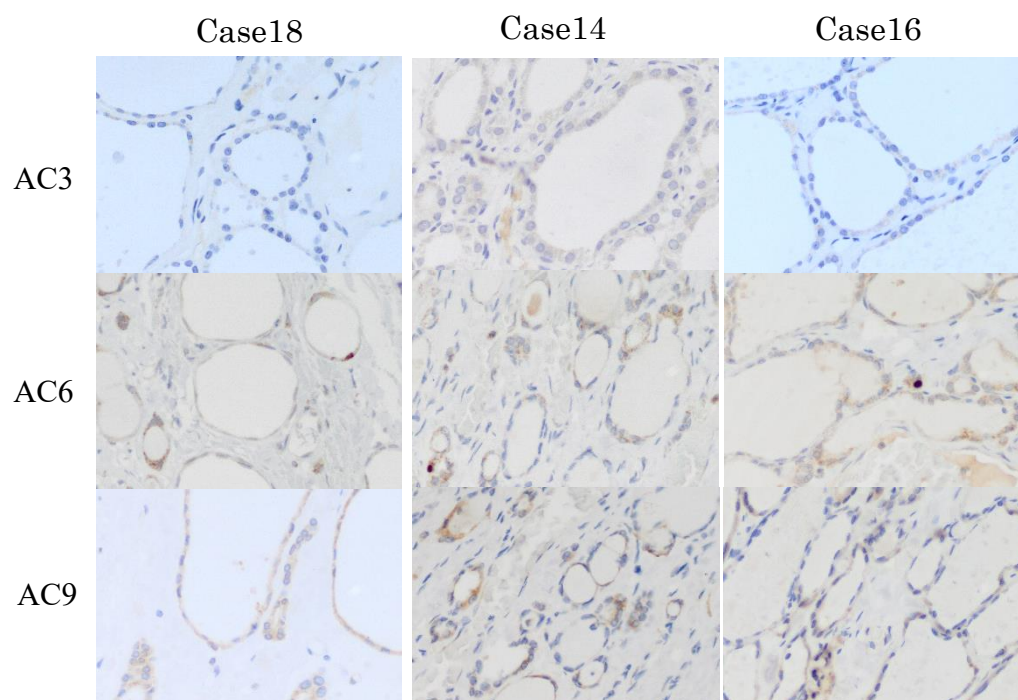
正常濾胞細胞の染色



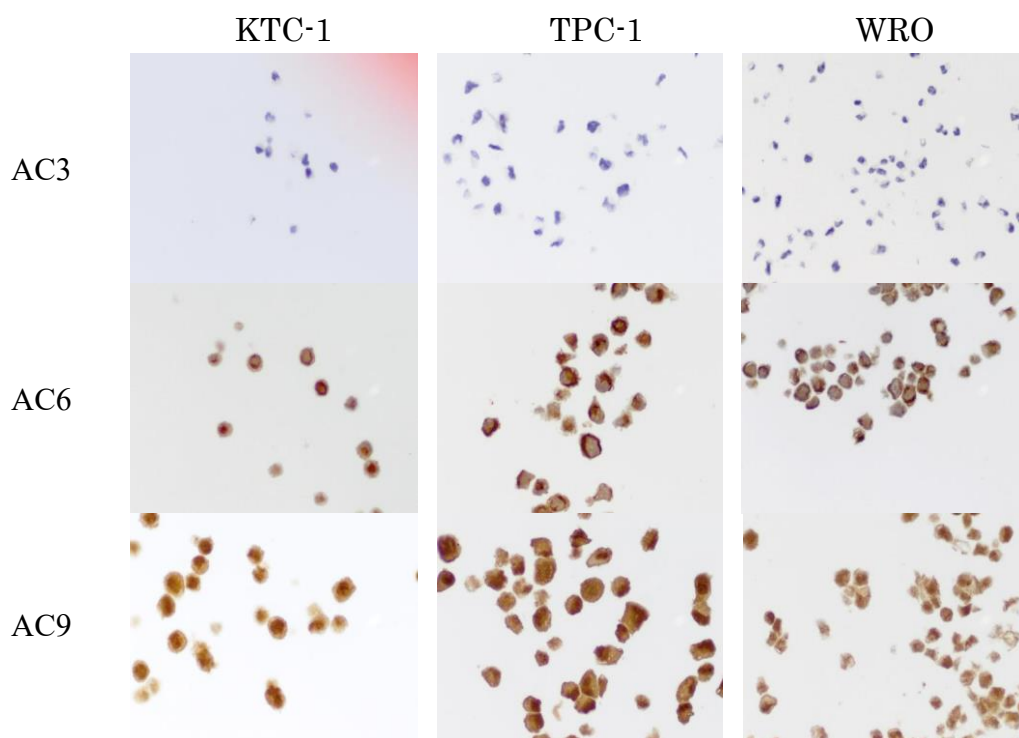
(B) 濾胞癌症例



正常濾胞細胞の染色



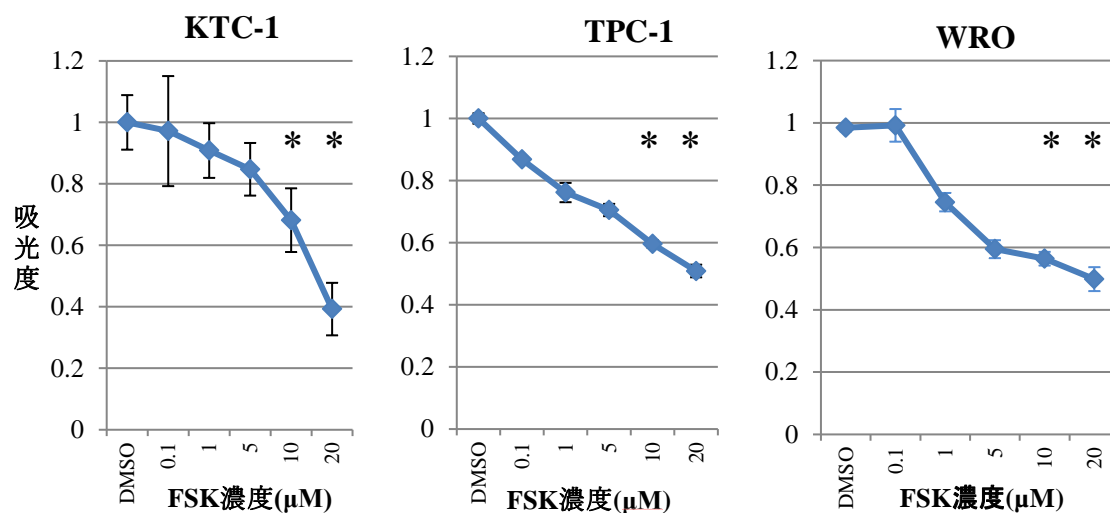
(C) 細胞株の染色



(A)(B)乳頭癌症例・濾胞癌症例いずれにおいても AC3 の染色は皆無であり、AC6 と AC9 は染色性が見られた。正常濾胞細胞と比較し、AC6 は AC9 よりも強いコントラストを示した。

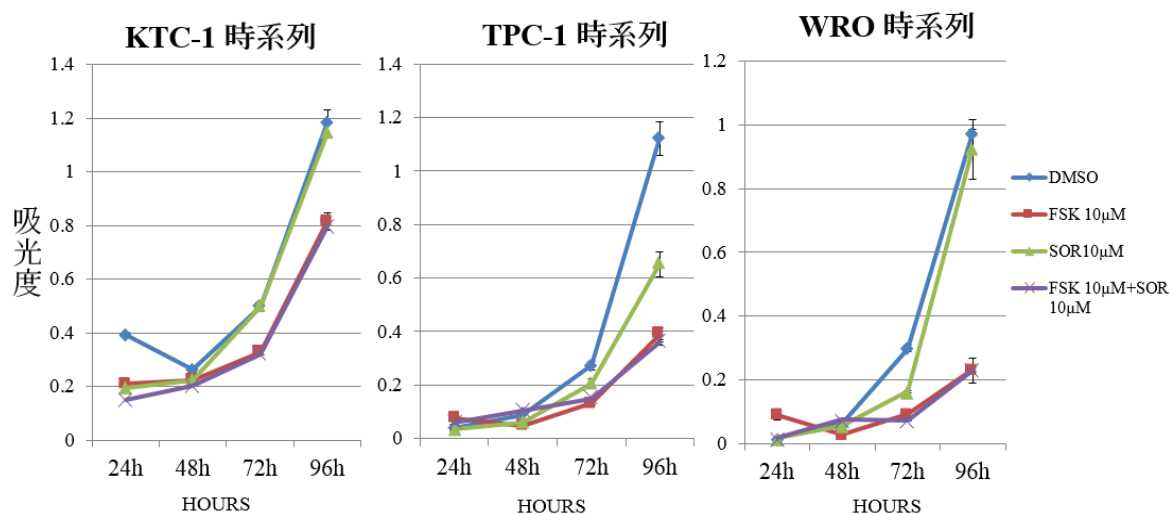
(C)乳頭癌・濾胞癌由来の細胞株における免疫染色でも、AC3 の染色性は皆無であった。AC6 は細胞周囲を主として強い染色が見られた。AC9 は細胞質内に一様に染まる傾向があり、時に核への染色も見られた。

図 6.FSK 濃度と分化型甲状腺癌細胞の増殖との関係



乳頭癌細胞株である KTC-1・TPC-1 および濾胞癌細胞株である WRO に DMSO または適宜設定した濃度の FSK を添加し 96h まで培養し、DMSO 群を基準(1.0) として増殖度を比較した。いずれも FSK 濃度依存的に増殖が低下し、FSK 10μM 以上の濃度で対照の DMSO 群と比較し有意に低下していた。* $p < 0.05$ 。

図 7. 甲状腺癌細胞に対する FSK および SOR の効果

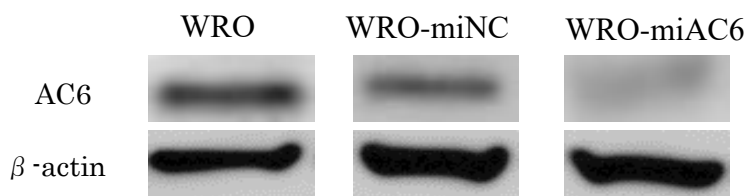


KTC-1・TPC-1・WRO を DMSO 群、FSK (10µM) 群、SOR (10µM) 群、FSK (10µM) +SOR (10µM) 群に分け 96h まで培養し増殖を比較した。いずれの細胞も DMSO 群と FSK 群の比較では 72h 後から差がつき、96h 時点で有意に FSK 群は増殖が低下していた。TPC-1 の DMSO 群 vs SOR (10µM) 群を除き、DMSO に対する SOR 追加投与、FSK に対する SOR 追加投与による有意な増殖率の低下は認められなかった。* $p < 0.05$ 。

(WRO・TPC-1 は澤文氏が施行)

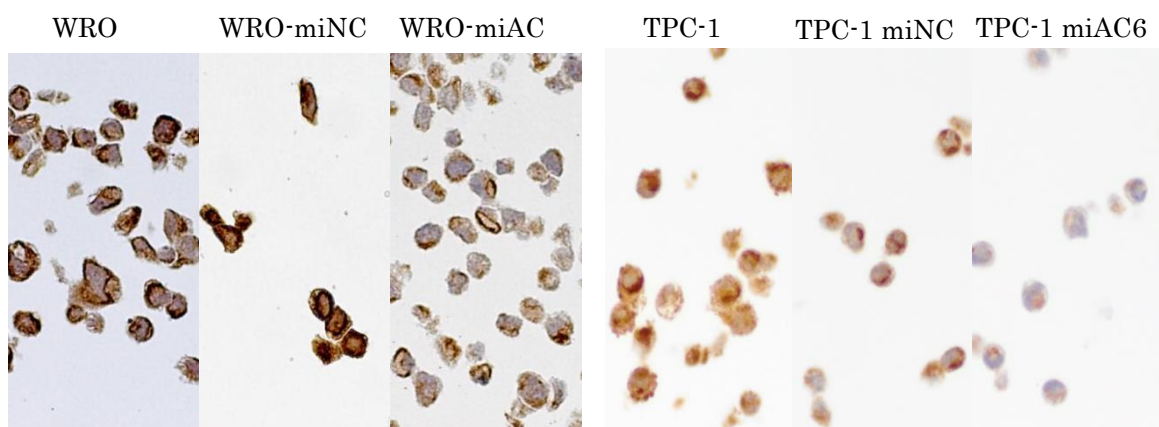
KTC-1群			p adj	有意差	TPC-1群			p adj	有意差
DMSO群	vs	SOR群	0.9678900		DMSO群	vs	SOR群	0.0000197	*
DMSO群	vs	FSK群	0.0160960	*	DMSO群	vs	FSK群	0.0000002	*
DMSO群	vs	FSK群+SOR群	0.0070798	*	DMSO群	vs	FSK群+SOR群	0.0000001	*
SOR群	vs	FSK群	0.0324056	*	SOR群	vs	FSK群	0.0037046	*
SOR群	vs	FSK+SOR群	0.0149246	*	SOR群	vs	FSK+SOR群	0.0016028	*
FSK群	vs	FSK+SOR群	0.9975464		FSK群	vs	FSK+SOR群	0.9572872	
WRO群			p adj						
DMSO群	vs	SOR群	0.8086271						
DMSO群	vs	FSK群	0.0000002	*					
DMSO群	vs	FSK群+SOR群	0.0000002	*					
SOR群	vs	FSK群	0.0000004	*					
SOR群	vs	FSK+SOR群	0.0000004	*					
FSK群	vs	FSK+SOR群	0.9998868						

図 8.AC6 ノックダウンの確認



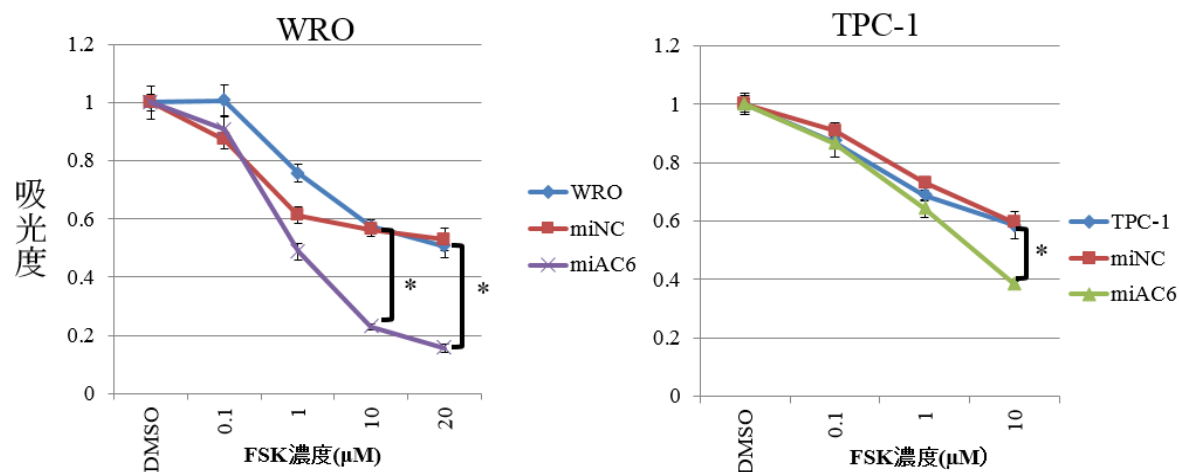
ウェスタンブロットにより、AC6 の miRNA を導入した WRO-miAC6 において AC6 のバンドが強く低下していることを確認した。Negative control の miRNA を導入した WRO-miNC ではバンドの低下は生じなかった。

図 9. ICC でみた AC6 のノックダウン



WRO・TPC-1のいずれにおいてもmiAC6群において、染色性の強い低下が見られた。

図 10.FSK による増殖率への影響

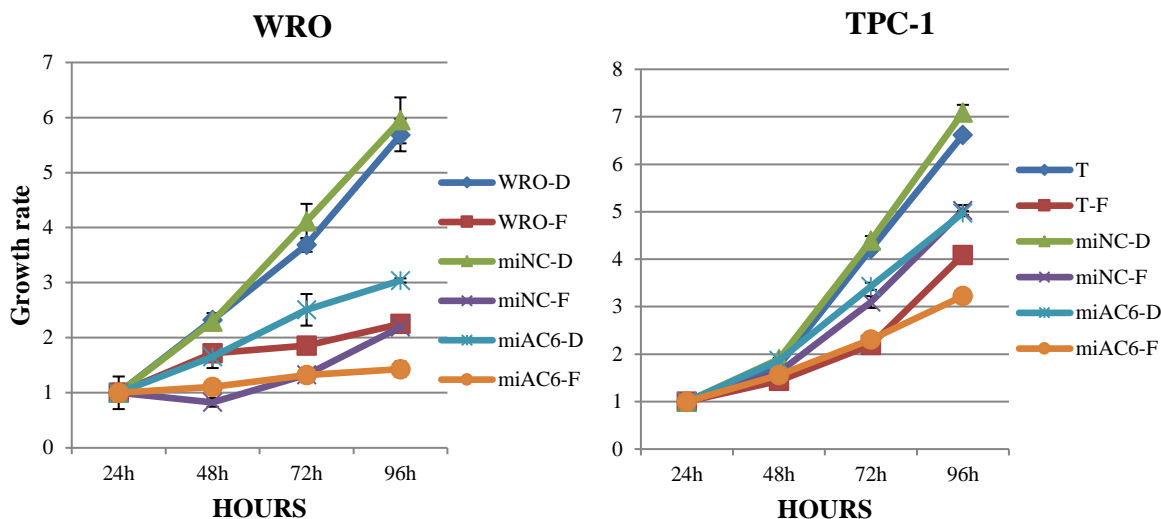


WRO・TPC-1 およびそれぞれの miNC・miAC6 について、FSK の濃度と増殖率への影響を比較した。DMSO または各濃度の FSK を添加後 96h まで培養し、各細胞の DMSO 群を基準として増殖率を比較した。WRO または TPC-1 とそれぞれの miNC とに有意差は見られなかったが、FSK10 μ M 以上の濃度において、それぞれの miAC6 群の増殖率は他の 2 群に比較し有意に低下していた。* $p < 0.05$ 。

WRO群 FSK:10 μ M			p adj	有意差	TPC-1群 FSK:10 μ M			p adj	有意差
WRO	vs	miNC	0.9145390		TPC-1	vs	miNC	0.9819741	
WRO	vs	miAC6	0.0000000	*	TPC-1	vs	miAC6	0.000461	*
miNC	vs	miAC6	0.0000000	*	miNC	vs	miAC6	0.0003257	*
WRO群 FSK:20 μ M									
WRO	vs	miNC	0.8837847						
WRO	vs	miAC6	0.0000149	*					
miNC	vs	miAC6	0.0000074	*					

図11.FSK添加による増殖率および死細胞率の変化

(A) FSK添加による増殖率の時系列変化

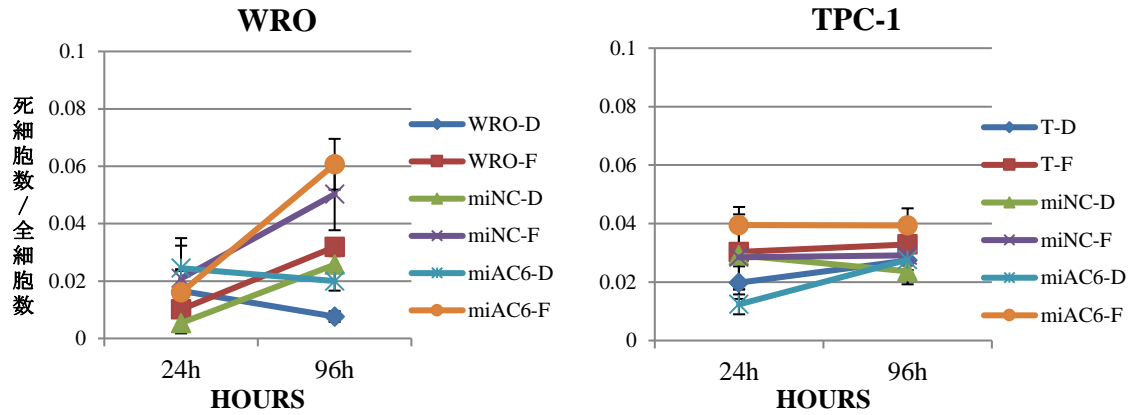


(T : TPC-1)

WRO・TPC-1およびそれぞれのmiNC・miAC6について、24時間毎の測定で96hまで時系列で24h値を基準に増殖率を評価した。96h時点で、WROとWRO-miNC間の比較ではDMSO群 (D)・FSK (10 μ M) 群 (F)とも増殖に差は見られなかった。各細胞のmiAC6-Dの増殖率は他の2つのDMSO群より有意に低下していた。各群ともにFSK添加により有意に増殖率は低下した。WROについて、miAC6-FはWRO-Fとは有意差あり、miNC-Fとはわずかに有意差が見られなかったが、ほぼ同様の傾向と考えられた。TPC-1については、T-DよりmiNC-Dがより増殖していた点と、T-FがmiNC-Fより抑制された点が異なっていたが、全体としてはほぼWROと同様の傾向であった。miAC6-FはWRO・TPC-1いずれにおいても最も抑制されていた。* $p < 0.05$ 。

WRO群		p adj	有意差	TPC-1群		p adj	有意差
WRO-D	vs WRO-F	0.0000000	*	T-D	vs T-F	0.0000000	*
WRO-D	vs miNC-D	0.9286117		T-D	vs miNC-D	0.0052194	*
WRO-D	vs miNC-F	0.0000000	*	T-D	vs miNC-F	0.0000000	*
WRO-D	vs miAC6-D	0.0000005	*	T-D	vs miAC6-D	0.0000000	*
WRO-D	vs miAC6-F	0.0000000	*	T-D	vs miAC6-F	0.0000000	*
WRO-F	vs miNC-D	0.0000000	*	T-F	vs miNC-D	0.0000000	*
WRO-F	vs miNC-F	0.9997948		T-F	vs miNC-F	0.0000002	*
WRO-F	vs miAC6-D	0.0480598	*	T-F	vs miAC6-D	0.0000005	*
WRO-F	vs miAC6-F	0.0192737	*	T-F	vs miAC6-F	0.0000007	*
miNC-D	vs miNC-F	0.0000000	*	miNC-D	vs miNC-F	0.0000000	*
miNC-D	vs miAC6-D	0.0000001	*	miNC-D	vs miAC6-D	0.0000000	*
miNC-D	vs miAC6-F	0.0000000	*	miNC-D	vs miAC6-F	0.0000000	*
miNC-F	vs miAC6-D	0.0496382	*	miNC-F	vs miAC6-D	0.9975255	
miNC-F	vs miAC6-F	0.0583532	*	miNC-F	vs miAC6-F	0.0000003	*
miAC6-D	vs miAC6-F	0.0001493	*	miAC6-D	vs miAC6-F	0.0000000	*

(B) FSK添加による死細胞率の変化



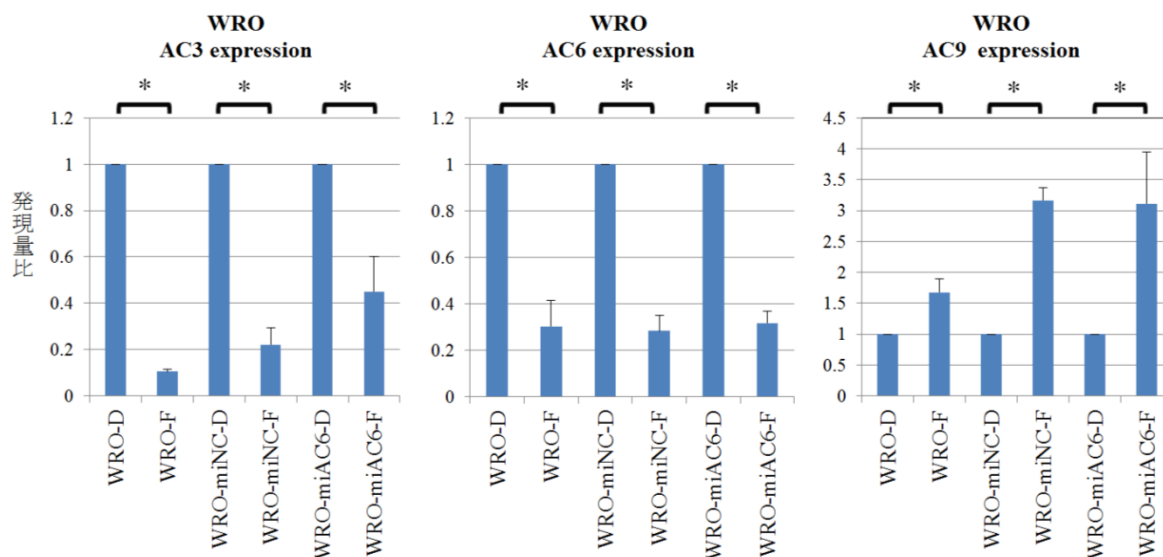
(T : TPC-1)

WRO・TPC-1およびそれぞれのmiNC・miAC6について、DMSO群 (D)・FSK (10 μ M) 群 (F) にわけ96hまで培養した。培養後24hと96hとの比較で、WROやWRO-miAC6においてDMSO群よりFSK群で死細胞率が多くなる傾向が見られた。TPC-1の各細胞にはmiAC6-Dを除きそのような傾向が見られなかった。但しいずれにおいても死細胞率は高く6%程度でありいずれも低値であった。* $p < 0.05$ 。

WRO群	p値	有意差	TPC-1群	p値	有意差
WRO-D	0.23335		T-D	0.33299	
WRO-F	0.002917	*	T-F	0.864989	
miNC-D	0.000284	*	miNC-D	0.666492	
miNC-F	0.097695		miNC-F	0.955765	
miAC6-D	0.690629		miAC6-D	0.005189	*
miAC6-F	0.001196	*	miAC6-F	0.985603	

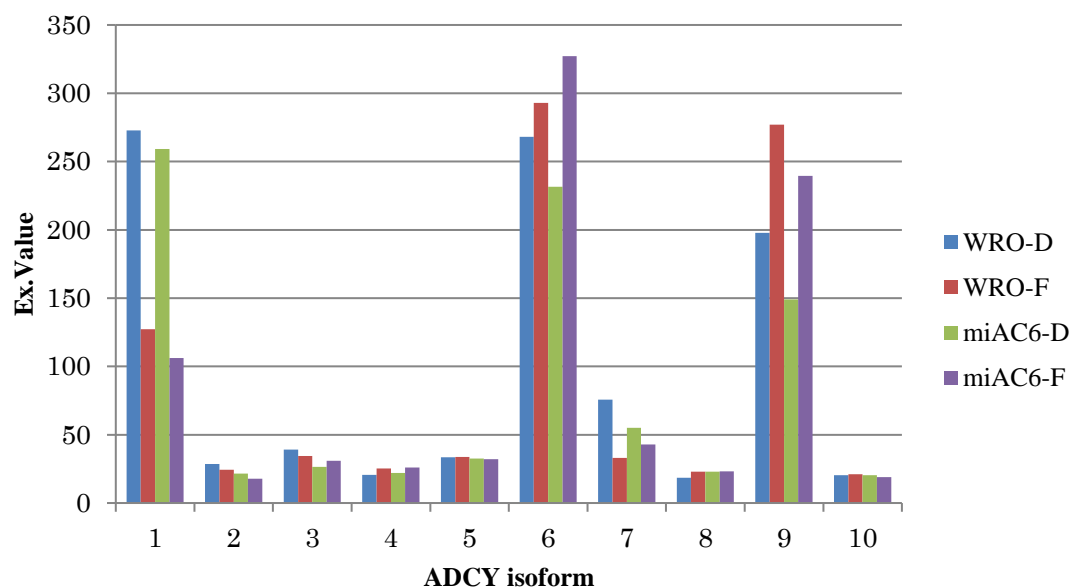
図 12.AC 発現量の検討

(A) qRT-PCR による AC3・6・9 の発現量の相対比較



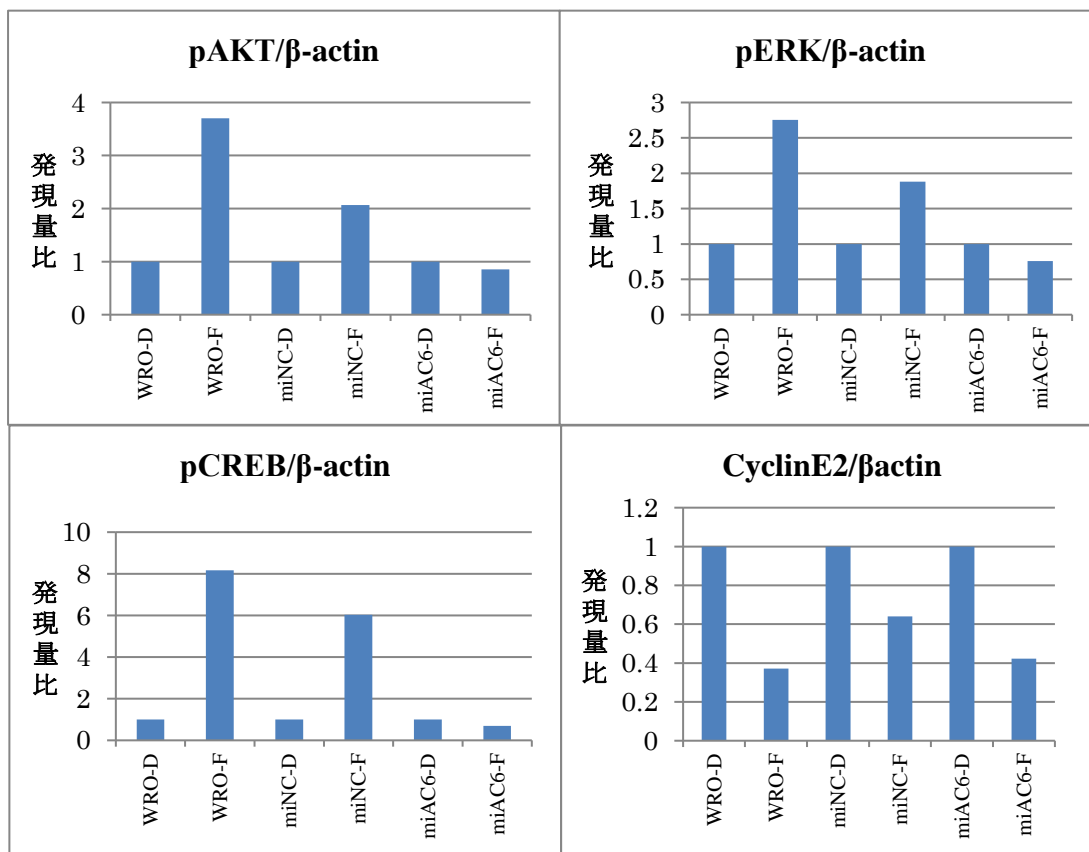
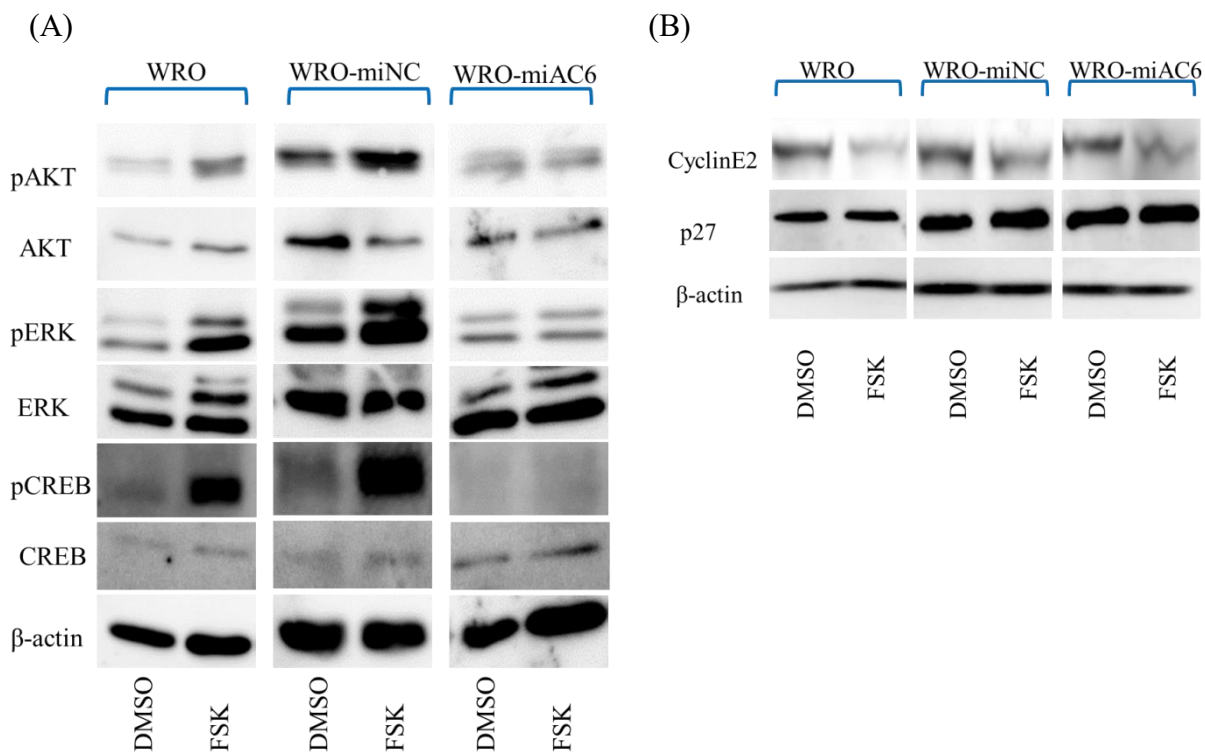
WRO・WRO-miNC・WRO-miAC6の細胞群について、それぞれの細胞群をDMSO群(D)とFSK(10 μ M)群(F)に分け、24h培養し、RNAを抽出し、qRT-PCRにより各ACの発現量を比較した。全ての発現量はGAPDHでnormalizeし、各細胞におけるDMSO群のAC発現量を基準に補正した。FSK添加によりAC3とAC6はmRNAの発現が低下するが、AC9は発現が上昇する傾向がみられた。*p<0.05。

(B) microarray による AC isoform 発現量の比較



WRO と WRO-miAC6 の DMSO 群と FSK (10 μ M) 群について、マイクロアレイによる AC isoform の発現量の比較も行った。AC3・6・9 の間の比較では AC6 が最も多く、次に AC9 が多く、AC3 が著明に少ないという結果であった。

図 13.AC6 ノックダウンによるシグナル伝達の変化



(C) フローサイトメトリーによる比較

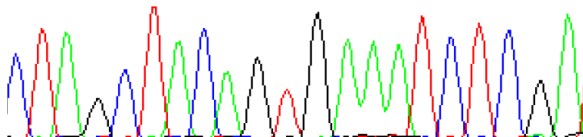
ヒストグラム	細胞培養株	処理	G0/G1	S	G2/M	ヒストグラム	細胞培養株	処理	G0/G1	S	G2/M
			R3 割合	R4 割合	R5 割合				R3 割合	R4 割合	R5 割合
	WRO	DMSO	90.0%	5.5%	4.5%		TPC-1	DMSO	67.3%	13.9%	18.8%
	WRO	FSK	91.0%	4.0%	5.0%		TPC-1	FSK	72.2%	10.2%	17.6%
	WRO-miNC	DMSO	91.4%	5.2%	3.4%		TPC-1miNC	DMSO	92.6%	2.5%	4.9%
	WRO-miNC	FSK	93.1%	3.4%	3.5%		TPC-1miNC	FSK	89.9%	3.7%	6.4%
	WRO-miAC6	DMSO	91.7%	4.6%	3.7%		TPC-1miAC6	DMSO	93.3%	3.2%	3.5%
	WRO-miAC6	FSK	93.3%	3.1%	3.6%		TPC-1miAC6	FSK	91.4%	2.2%	6.3%

(A)(B)WRO・WRO-miNC・WRO-miAC6の3群についてDMSO群、FSK(10 μ M)群群にそれぞれ分けて細胞増殖シグナル蛋白をウェスタンブロットで評価した。ImageJによる定量化では各細胞のDMSO群を基準とした。(A)は試薬添加後30分で、(B)は24時間で蛋白質を抽出した。WROおよびWRO-miNCではFSK添加にて、pAKT、pERK、pCREBのリン酸化の亢進が見られたが、WRO-miAC6ではすべて亢進は認めなかった。FSK添加によるCyclin2の活性低下はすべての細胞で生じていたが、p27に明らかな変化は見られなかった。

(C) WRO・TPC-1およびそれぞれのmiNC・miAC6について施行したフローサイトメトリーでは明らかな細胞周期の変化は見られなかった。

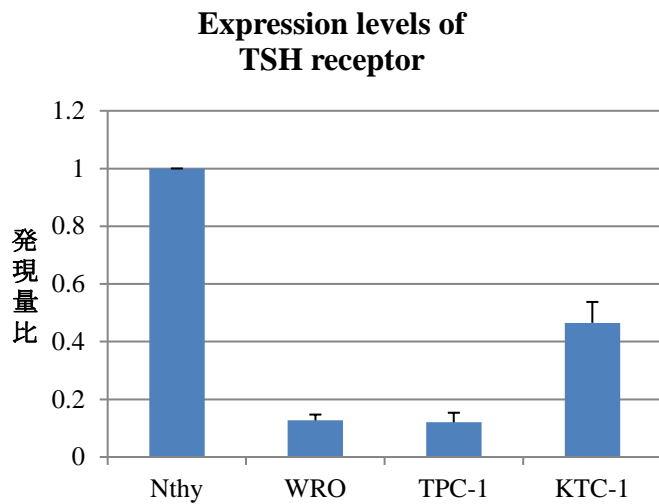
図 14.WRO における *BRAF*^{V600E} 変異の有無の確認

↓
CTAGCTACAGTGAATCTCGA



WRO 細胞について、cDNA による塩基配列 sequencing を行ったところ、*BRAF* c.1799T>A に相当する変異は見られず (矢印)、野生型と同一であった。

図 15.甲状腺癌細胞株における TSH 受容体 mRNA の発現量



正常甲状腺不死化細胞 Nthy-ori 3-1 (Nthy)・WRO・TPC-1・KTC-1 の細胞株について qRT-PCR を施行し、Nthy を基準に TSH 受容体の mRNA の発現量を比較した。いずれも Nthy に比較し著明に発現量が低下していた。

参考文献

1. 岩崎博幸. 甲状腺癌の疫学に関する最新のデータ. 臨外 62(11) :39-46. (2007)
2. Kakudo K, Bai Y, Katayama S, Hirokawa M, Ito Y, et al. Classification of follicular cell tumors of the thyroid gland: analysis involving Japanese patients from one institute. *Pathol Int* 59(6):359-67 (2009)
3. Suehiro F. Thyroid cancer detected by mass screening over a period of 16 years at a health care center in Japan. *Surg Today* 36(11):947-53.(2006)
4. Bai Y, Kakudo K, Li Y, Liu Z, Ozaki T, Ito Y, et al. Subclassification of non-solid-type papillary thyroid carcinoma identification of high-risk group in common type. *Cancer Sci* 99(10):1908-15 (2008)
5. 松本佳子, 内野眞也, 渡邊紳, 菊池勝一, 大野毅, 野口志郎. 小児甲状腺がんの疫学, 診断と治療. 小児外科 48(10):1035-39. (2016)
6. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6(4):292-306. (2006)
7. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumour of Endocrine organs. IARC Press, Lyon:49-72. (2004).

8. Kim SY, Kim SN, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, et al. Metaanalysis of *BRAF* mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermal* 72(6):1036-46. (2015)
9. Joyce T, Oikonomou E, Kosmidou V, Makrodouli E, Bantounas I, et al. A molecular signature for oncogenic BRAF in human colon cancer cells is revealed by microarray analysis. *Curr Cancer Drug Targets* 12(7):873-98. (2012)
10. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511(7511):543-50. (2014)
11. 岡部直太, 菅間博. 予後不良な高分化癌(乳頭癌, 濾胞癌)とは? 日内甲外誌 34(2):93-96. (2017)
12. Medina DL, Toro MJ, Santisteban P. Somatostatin interferes with thyrotropin-induced G1-S transition mediated by cAMP-dependent protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Involvement of RhoA and cyclin E x cyclin-dependent kinase 2 complexes. *J Biol Chem* 275(20):15549-56. (2000)
13. Xing M. *BRAF* mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 12(2):245-262 (2005)

14. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, et al. Clinical implication of hot spot *BRAF* mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J clin Endocrinol Metab* 88(9):4393-4397 (2003)
15. Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:145-74. (2001)
16. Van Sande J, Cochaux P, Mockel J, Dumont JE. Stimulation by forskolin of the thyroid adenylate cyclase, cyclic AMP accumulation and iodine metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 29(1):109-119 (1983)
17. Ohta K, Pang XP, Berg L, Hershman JM. Growth inhibition of new human thyroid carcinoma cell lines by activation of adenylate cyclase through the beta-adrenergic receptor. *J clin Endocrinol Metab* 82(8):2633-2638 (1997)
18. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, et al. 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):1-133. (2016)
19. Yano Y, Kamma H, Matsumoto H, Fujiwara M, Bando H, et al. Growth

- suppression of thyroid cancer cells by adenylyl cyclase activator. *Oncol Rep* 18(2):441-5. (2007)
20. Matsumoto H, Sakamoto A, Fujiwara M, Yano Y, Shishido-Hara Y, et al. Cyclic AMP-mediated growth suppression and MAPK phosphorylation in thyroid papillary carcinoma cells. *Mol Med Rep* 1(2):245-9. (2008)
21. Sawa A, Chiba T, Ishii J, Yamamoto H, Hara H, et al. Effects of sorafenib and an adenylyl cyclase activator on in vitro growth of well-differentiated thyroid cancer cells. *Endocr J* 64(11):1115-1123. (2017)
22. Kimura H, Yamashita S, Namba H, Usa T, Fujiyama K, et al. Impairment of the TSH signal transduction system in human thyroid carcinoma cells. *Exp Cell Res* 203(2):402-6 (1992)
23. Sadana R, Dessauer CW. Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neurosignals* 17(1):5-22. (2009)
24. Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279(3):F400-16. (2000)

25. Willoughby D, Cooper DM. Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev* 87(3):965-1010. (2007)
26. Vanvooren V, Allgeier A, Cosson E, Van Sande J, Defer N, et al. Expression of multiple adenylyl cyclase isoforms in human and dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 170(1-2):185-96. (2000)
27. Wicker R, Catalan AG, Cailleux A, Starenki D, Stengel D, et al. Cloning and expression of human adenylyl cyclase type VI in normal thyroid tissues. *Biochim Biophys Acta* 1493(1-2):279-83. (2000)
28. Celano M, Arturi F, Presta I, Bruno R, Scarpelli D, et al. Expression of adenylyl cyclase types III and VI in human hyperfunctioning thyroid nodules. *Mol Cell Endocrinol* 203(1-2):129-35. (2003)
29. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44(7):1299-305. (1997)
30. Zen Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(17):9799-84 (2003)

31. Chen Y, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, et al. Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in G α s stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(25):14100-4 (1997)
32. Hacker BM, Tomlinson JE, Wayman GA, Sultana R, Chan G, et al. Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). *Genomics* 50(1):97-104. (1998)
33. Stork PJ, Schmitt JM. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 12(6):258-66. (2002)
34. Rocha AS, Paternot S, Coulonval K, Dumont JE, Soares P, et al. Cyclic AMP Inhibits the Proliferation of Thyroid Carcinoma Cell Lines through Regulation of CDK4 Phosphorylation. *Mol Biol Cell* 19(11):4814-25. (2008)
35. Liu L, Xie Y, Lou L. Cyclic AMP inhibition of proliferation of hepatocellular carcinoma cells is mediated by Akt. *Cancer Biol Ther* 4(11):1240-7. (2005)
36. Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(1):116-20. (1996)

37. Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hebrant A, et al. Thyroid cancer cell lines: an overview. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 133. (2012)
38. Alexander EK. Approach to the patient with a cytologically indeterminate thyroid nodule. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11):4175-82. (2008)
39. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med* 367(8):705-15. (2012)