

審査の結果の要旨

氏名 山本 浩之

本研究は甲状腺癌の細胞増殖におけるアデニル酸シクラーゼの isoform を解析し、発現および機能を明らかにするために甲状腺癌の手術検体および細胞株（乳頭癌由来の TPC-1 および KTC-1、濾胞癌由来の WRO）を用い、増殖比較実験およびノックダウン実験を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. アデニル酸シクラーゼ(AC)の isoform のうち甲状腺に発現していると言われている AC3・6・9 について、実際の甲状腺乳頭癌および濾胞癌の標本を用いて免疫染色を行った。その結果 AC3 はほとんど発現がなく AC6 と AC9 は陽性であった。特に AC6 は強陽性であり、周囲の正常実質部位の濾胞細胞と比較し明瞭なコントラストを持っていた。AC9 ではそのような特徴は見られなかった。この染色パターンは 3 つの細胞株においても同様であることも確認した。これにより、乳頭癌や濾胞癌といった高分化型甲状腺癌では AC6 が重要な役割を担っていることが推測された。
2. AC 刺激剤としてフォルスコリン(FSK)を用い、増殖に対する影響を比較した所、FSK は AC を刺激するものでありながらも KTC-1、TPC-1、WRO いずれの細胞株も FSK 添加により増殖はむしろ抑制された。甲状腺癌細胞の増殖経路には cAMP 経路および MAPK 経路が関与しているが、MAPK 経路において抑制作用をしめす Sorafenib の添加では FSK 添加と異なり KTC-1、TPC-1、WRO いずれの細胞株でも増殖抑制効果は限定的かほとんど見られなかった。
3. TPC-1、WRO について AC6 を miRNA でノックダウンした株(miAC6)、および miRNA 導入の negative control(miNC)を作成し、同様に増殖を比較した所、いずれの株も FSK 添加による増殖抑制は、オリジナルと miNC とで差はないが、miAC6 はオリジナルおよび miNC より有意に増殖が抑制された。AC6 のノックダウンによる増殖の抑制は FSK の作用に相加的となっていた。
4. FSK 添加の有無により細胞の死亡率は正常レベルを超えて増加しなかったため増殖抑制効果は細胞死の増加ではないと考えられた。FSK による増殖抑制機序として CyclinE2 の低下が認められ、AC6 から PKA を介する経路とは独立した何らかの作用で直接的な細胞周期の抑制を起こすことが考えられた。
5. WRO およびその miNC と miAC6 について、FSK 添加の有無により分けて増殖させた後タンパク質を抽出してウェスタンブロットにより増殖関連タンパク質である AKT、ERK、CREB を比較した。その結果、WRO や miNC では、FSK 刺激による AKT・ERK・CREB のリン酸化亢進が見られたが、miAC6 ではその亢進が消失してい

た。AKT や ERK も CREB のように PKA の標的となるため、AC6 は PKA から MAPK 経路や PI3K 経路も介して細胞増殖に関わると考えられた。

以上、本論文は甲状腺癌細胞の増殖制御において AC6 が発現・機能共に重要な役割を担っていることを示した。Sorafenib のように MAPK 経路のみを抑制することの効果は限定的であり、AC6 から PKA を介する経路を抑制することにより複数の増殖関連タンパク質を同時に抑制することがより有用であることを示した。これまで甲状腺癌の増殖抑制として臨床的には TSH 抑制療法が行われていたが、さらに強力な抑制方法を示唆する重要な所見を得たと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。