

氏 名	一條 沙耶花
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医工博4甲 第189号
学 位 授 与 年 月 日	平成28年3月23日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
専 攻 名	先進医療科学専攻
学 位 論 文 題 名	Activation of RhoB Signaling Pathway by Thyroid Hormone Receptor $\beta$ in Thyroid Cancer Cells (甲状腺ホルモン受容体 $\beta$ は RhoB 経路を活性し、甲状腺癌細胞増殖を抑制する)
論 文 審 査 委 員	委員長 教 授 加藤 良平 委 員 准教授 本杉 宇太郎 委 員 講 師 奈良 政敏

## 学位論文内容の要旨

### (研究の目的)

甲状腺ホルモン受容体 (TR)  $\beta$  は甲状腺ホルモン (T3) のリガンド依存性の転写因子で、種々の細胞の成長・発達・分化に関与している。一方、癌細胞では TR の発現レベルの低下や変異が見られることを我々は報告してきた。TR と発癌のメカニズムについて、変異 TR とホスファチジルイノシトール 3 リン酸キナーゼ (PI3K) の活性化増加について検討しており、TR の低下と発癌の機序については明らかでない点も多い。本研究では TR  $\beta$  の発現低下が報告されている甲状腺癌細胞において、低分子 G 蛋白質の Rho ファミリーの 1 つである RhoB に注目し、RhoB が有する p21 の発現誘導を介した細胞周期の制御やアポトーシスの誘導に対する TR  $\beta$  の作用を検討した。

### (方法)

内因性 TR  $\beta$  の発現が消失しているヒト由来低分化型甲状腺癌細胞 (BHP18-21v、FRO、WRO 細胞) に TR  $\beta$  cDNA 発現アデノウイルスベクター (AdTR  $\beta$ ) を用い遺伝子導入を行った。

TR  $\beta$  を遺伝子導入した甲状腺癌細胞において、TR  $\beta$  が細胞増殖に与える影響を検討するにあたり細胞周期調節因子 p 2 1 に注目し、その調節経路の上流にあたる遺伝子の発現の変化を RT-PCR 法、western blot 法により検討した。

特に、RhoB についてはプロモータの転写活性にあたる TR  $\beta$  の影響を検討するために RhoB プロモータールシフェラーゼレポーター (-726/+86RhoB-Luc) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

RhoB プロモータ領域のヒストン脱アセチル化が転写活性に与える影響について、クロマチン免疫

沈降法を用いて解析した。

RhoB は翻訳後修飾を受け、その活性が調整されている。ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI) 添加によって癌細胞の増殖能、細胞周期の変化を MTT アッセイ、Cell cycle analysis を用いて検討した。

*in vivo* での TR  $\beta$  の癌細胞増殖における作用を検討するために、BHP18-21v 細胞をヌードマウスに移植し形成された腫瘍に対し AdTR  $\beta$  を直接注入し経時的な腫瘍のサイズの変化を経時的に測定し、腫瘍組織の Ki-67、cleaved-caspase3 の測定を行い、TR  $\beta$  遺伝子導入を行った甲状腺癌腫瘍組織における細胞増殖やアポトーシスの定量を行った。

#### (結果)

AdTR  $\beta$  感染ヒト甲状腺癌細胞(BHP18-21v, FRO, WRO 細胞)では、リガンド (T3) 依存性に RhoB mRNA 発現が誘導された。Western blot では、T3 依存性に RhoB 蛋白発現が誘導されていた。

AdTR  $\beta$  感染 BHP18-21v, FRO, WRO 細胞に対し、RhoB プロモータ配列を上流に有するルシフェラーゼ発現プラスミドを遺伝子導入を行い、T3 添加を行ったところ AdTR  $\beta$  感染細胞ではルシフェラーゼ活性の増加が見られた。

BHP18-21v, FRO, WRO では、クロマチン免疫沈降法によって RhoB プロモータ領域へのヒストン脱アセチル化酵素(HDAC) 1 と 3 が結合しているが、AdTR  $\beta$  感染ヒト甲状腺癌細胞では、T3 添加によって RhoB プロモータ領域の HDAC1 と 3 は遊離し、ヒストンのアセチル化が誘導されていた。

TR  $\beta$  により誘導された RhoB 蛋白は、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤添加により翻訳後修飾を受け、GTP 結合型 RhoB (生理活性を有する RhoB)へ転換され、細胞膜下への細胞内転移が見られた。

AdTR  $\beta$  感染ヒト甲状腺癌細胞は T3 添加、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI) 添加により、p21 の発現が増加し、リン酸化 Rb が減少していた。

フローサイトメトリーでは、T3 添加、FTI 添加により、AdTR  $\beta$  感染ヒト甲状腺癌細胞は G0/G1 期の細胞数が増加していた。MTT assay によって AdTR  $\beta$  感染ヒト甲状腺癌細胞は T3+FTI 添加によりコントロール細胞と比較し、BHP18-21v、FRO、WRO 細胞の細胞浸潤が阻害されていた。ヌードマウス背側に BHP18-21v 細胞の移植により形成された腫瘍は、AdTR  $\beta$  治療群では、T3 投与・非投与ともにほかのコントロール群と比較して腫瘍増大が抑制された。AdTR  $\beta$  の腫瘍内注入に加え、T3 と FTI の腹腔内投与を併用することで、Ki-67 陽性細胞が減少し、腫瘍増殖が抑制された。また AdTR  $\beta$  遺伝子導入した腫瘍組織で RhoB、p21 蛋白の発現が増加していた。

#### (考察)

TR  $\beta$  の発現が低下している低分化型甲状腺癌細胞では、RhoB プロモータ領域のヒストン脱アセチル化が見られ、RhoB の発現が低下しているが、TR  $\beta$  遺伝子導入を行うことによって、RhoB プロモータ領域のヒストンアセチル化が惹起され、転写が活性化され RNA、蛋白の発現が誘導されることが明らかになった。TR  $\beta$  によって誘導される RhoB 蛋白は翻訳後修飾をうけ p 21 の発現を介して細胞周期を抑制すると考えられた。

(結論)

内因性 TR $\beta$  の発現が消失した低分化甲状腺癌細胞では TR $\beta$  を遺伝子導入し、T3 を添加することで、生理活性を有する RhoB 蛋白の発現が誘導された。今回の結果から TR $\beta$  遺伝子導入は RhoB 経路を活性化し、癌細胞増殖の抑制効果を有することが *in vitro* および *in vivo* において明らかになった。TR $\beta$  遺伝子導入による細胞周期抑制作用の分子レベルの更なる解析は、未だ有効な治療法のない甲状腺未分化癌や低分化癌の新たな治療法の開発に寄与する可能性がある。

## 論文審査結果の要旨

甲状腺ホルモン受容体 (TR)  $\beta$  の発現低下が報告されている甲状腺癌細胞において、低分子 G タンパク質の Rho ファミリーの一つである RhoB が有する p21 蛋白の発現誘導を介した細胞周期の制御、アポトーシスの誘導に対する TR $\beta$  の作用を検討した研究である。

問 1 : この研究のモチベーションは何であったか？

答 1 : 先行研究にて、甲状腺癌で TR beta の発現が低下することがわかっていた。TR beta と発癌の関連は深く、未分化癌に関しても癌化や増殖と関連があるのではないかと思い研究を始めた

問 2 : 一般的に甲状腺未分化癌は、低分化型の乳頭癌や濾胞癌とどのような関係にあると考えられているのか？

答 2 : 甲状腺未分化癌は非常に予後の悪い腫瘍である。乳頭癌や濾胞癌の低分化型が、さらに脱分化した形との捉え方もある。

問 3 : 結果の中で FTI の添加がないと、十分な腫瘍抑制効果が期待できないとあったが、治療への応用を考えたときにはこの点がどのように関連するか。

答 3 : TR beta の発現と T3 の添加によって腫瘍増殖が抑制できることは示せたが、細胞周期を止めるという結果を得るには FTI の添加が必須であった。このことから、標的治療に進むためには TR beta の発現誘導だけでは不十分である可能性がある。

問 4 : 低分化や未分化タイプの甲状腺癌で、内因性 TR $\beta$  が低下している症例は自験 例で 3 例全例だったが、一般的 (文献的) には何%程度か？

答 4 : 文献的にも (Takano T et al. JCEM 2003 ; 88 : 3447-3449)、甲状腺乳頭癌 16 例の症例での TR $\beta$ mRNA の発現レベルは、正常甲状腺細胞と比較してすべて (16 例とも) 低下していました。

問 5 : ほとんどの癌腫では、p21 の発現に P53 が関与していると思いますが、内因性 TR $\beta$  が低下している甲状腺癌において、p21 と p53 との関係に違いがありますか？今回の実験では p53 の変異や欠失とか検討されていませんが、文献的にはどうでしょうか？

答 5 : 文献的には、p53 遺伝子異常は甲状腺未分化癌では 70-85%認められるという報告があります。そのため、今回私たちが検討した甲状腺癌細胞株でも p53 遺伝子異常があると考えています。p21 の発現誘導は、p53 と独立した状態でも起こすことができることがわかっていますので、今回私たちが検討した内因性 TR $\beta$  が低下している甲状腺癌においても、p53 とは独立して p21 の発現が誘

導されたと考えています。

問6：ヌードマウスの実験で、RhoB が活性化し p21 の発現量が増加することで甲状腺癌の細胞増殖が抑制されることは理解できるが、腫瘍が縮小するのはなぜか？

（ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤における抗腫瘍効果はなかったのか？）

答6：腫瘍が縮小するのは、先生のご指摘のとおり、ファルネシルトランスフェラーゼ 阻害剤における抗腫瘍効果もあったと考えられます。他の癌でもファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤で腫瘍抑制効果が認められている報告もありますので、RhoB とは別の経路でも抑制効果を発揮していることが考えられます。

問7：低分化や未分化タイプの甲状腺癌でも p53 の変異や欠失が多いのなら、p53 遺伝子導入でもよいのではないかと？ TR6 遺伝子導入のほうが適切な理由はありますか？

答7：p53 遺伝子導入も、もちろん治療法として有効であると考えられますし、実際に p53 を発現していない甲状腺未分化細胞株（FRO）に p53 遺伝子導入を行い、細胞周期停止を起こして細胞増殖抑制効果を見出した報告がなされています。（Jornal of Clinival Endocrinology and Metabolism 83:3668－3672、1998）ただ今回の研究では、TR6 が RhoB 経路を活性化し甲状腺癌細胞の増殖を認めたことを明らかにしましたので、TR6 遺伝子導入治療の検討も今後行われていけばと思います、発表させていただきました。

以上、審査員の質問に対して的確な回答を得た。