

# Florence Orim 論文内容の要旨

## 主論文

### Thyrotropin signaling confers more aggressive features with higher genomic instability on BRAF<sup>V600E</sup>-induced thyroid tumors in a mouse model

(甲状腺刺激ホルモンシグナルは、BRAF<sup>V600E</sup> 甲状腺癌マウスモデルにおけるゲノム不安定性を伴った高度悪性化に関与している)

Florence Orim、Andrey Bychkov、嶋村 美加、中島 正洋、伊東 正博、松瀬 美智子、  
蔵重 智美、鈴木 啓司、Vladimir Saenko、永山 雄二、山下 俊一、光武 範吏

(Thyroid • Aug 7 Epub in press 2013 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻

(主任指導教員：山下 俊一 教授)

## 緒言

甲状腺癌は最も頻度の高い内分泌系癌であり、その中での主たる組織型は甲状腺乳頭癌 (PTC) である。PTC では、BRAF<sup>V600E</sup> 変異をはじめとする MAPK シグナルの恒常的な活性化がその重要な病因の一つとされている。これまで、BRAF<sup>V600E</sup> による甲状腺癌の発癌、病態の解析、治療法の開発のために、甲状腺細胞特異的発現プロモーター等を使用した遺伝子改変マウスモデルが作製され、悪性度の高いヒト PTC 様腫瘍の発生が確認されていた。ところがこれらマウスは、全甲状腺細胞に癌遺伝子が発現するために、正常甲状腺組織が消失し、そのため甲状腺のホルモン産生能が阻害、フィードバックによって TSH が極めて高値となるという通常のヒトでは見られない状態となっていた。TSH には甲状腺細胞増殖作用があり、またマウスやラットでは、TSH 高値の状態が持続するだけで腫瘍を発生するという報告もあり、TSH 高値がこれら腫瘍に与える影響は無視できず、適切なモデルとは言えない可能性がある。そこで本研究では、BRAF<sup>V600E</sup> 甲状腺癌モデルマウスと Tsh レセプターノックアウトマウス (TshRKO) とを交配することによって、TSH シグナルがモデルマウスにおける腫瘍に与える影響を検討することとした。

## 対象と方法

サイログロブリンプロモーター-BRAF<sup>V600E</sup> マウス (Tg-BRAF2) と TshRKO を交配し、以下の 4 グループのマウス群を作製した：グループ 1 (BRAF<sup>wt</sup>/TshR<sup>+/+</sup>)、グループ 2 (BRAF<sup>wt</sup>/TshR<sup>-/-</sup>)、グループ 3 (Tg-BRAF2/TshR<sup>+/+</sup>)、グループ 4 (Tg-BRAF2/TshR<sup>-/-</sup>)。12 週、24 週で甲状腺組織を

摘出し、定量 RT-PCR 法、H&E 染色における病理組織学的検査、cleaved caspase-3、F4/80、53BP1、 $\gamma$ H2AX、Ki67 に対する抗体を用いた免疫組織学的検査を行った。また、ドキシサイクリン誘導 BRAF<sup>V600E</sup> 細胞株を用いたマトリゲル浸潤アッセイ、 $\gamma$ H2AX 染色も行った。

## 結果

以前の文献での結果と同様、グループ 3 の甲状腺は著明に腫大し、正常な甲状腺濾胞構造はほぼ消失していた。グループ 4 の甲状腺も正常な濾胞構造はほぼ消失していたが、甲状腺の大きさ・重量はグループ 3 より有意に小さかった。両グループ共にヒトの PTC によく似た組織像を示したが、被膜浸潤はグループ 3 のみに観察され、solid なパターンもグループ 3 により多く見られた。両者を加えたスコアは、グループ 3 の方が有意に高かった。TSH シグナルをブロックしたグループ 4 では、アポトーシス細胞が有意に多く、上記の所見の差には、アポトーシスの関与が示唆された。両グループで、マクロファージ浸潤の差は見られなかった。

また我々はさらにドキシサイクリン誘導 BRAF<sup>V600E</sup> 細胞株を用いたが、BRAF<sup>V600E</sup> による細胞浸潤能亢進は、TSH 非存在下よりも TSH 存在下の方が有意に高かった。

次に我々は、細胞のゲノム不安定性を 53BP1、 $\gamma$ H2AX、増殖能を Ki67 に対する免疫染色で評価した。グループ 3 ではグループ 4 と比較し、上記タンパクのフォーカス形成数が多く、ゲノム不安定性が高かったが、細胞増殖性にはあまり差はなかった。ドキシサイクリン誘導 BRAF<sup>V600E</sup> 細胞株でも TSH 存在下での $\gamma$ H2AX フォーカスの数は有意に高かった。

## 考察

今回の実験により、TSH シグナルが Tg-BRAF2 マウスの甲状腺腫瘍に与える影響を検討した。本研究に用いたグループ 3 のマウスは、オリジナルの Tg-BRAF2 よりも悪性度が低い傾向であったが、これはグループ 3 マウスの TshR が、すでに片アレルのみであった (TshR<sup>+/+</sup>) からである可能性が考えられた。

別のグループにより、LoxP-stop-loxP-Braf<sup>V600E</sup>; TPO-Cre; TshRKO というモデルが既に発表されており、これらのマウスでは TSH シグナルのブロック下ではヒトの PTC の核所見等はみられず、良性腫瘍が確認されるのみであったが、本研究のマウスでは、TSH シグナルの有無にかかわらず、ヒトの PTC 様の腫瘍を発生した。これは、本研究のマウスの方が胎生期のより早い時期より BRAF<sup>V600E</sup> の発現が始まり、さらに長期間に及ぶことがその理由である可能性が考えられた。

53BP1、 $\gamma$ H2AX の染色結果より、BRAF<sup>V600E</sup> と TSH シグナルは、共にゲノム不安定性を亢進させることが示唆され、これが腫瘍の高度悪性化に関与している可能性が考えられた。

以上より、TSH シグナルは、これらマウスの甲状腺腫瘍の悪性度をより高める作用があると考えられる。近年の疫学調査の結果から、血清 TSH 値と甲状腺癌のリスクが論じられているが、本研究により、これに新たな知見が加えられ、予防医学の面からもさらなる研究を進める必要があると考えられた。