

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08888

研究課題名(和文) 甲状腺におけるオートファジーの調節機構及び発癌過程における意義

研究課題名(英文) Autophagy regulatory mechanisms in thyroid and significance for carcinogenesis

研究代表者

蔵重 智美 (Kurashige, Tomomi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・客員研究員

研究者番号：60568955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：1)甲状腺刺激ホルモンTSHはERKおよびPKCシグナル伝達経路を介してオートファジー活性を正に調節するのに対し、甲状腺ホルモンはオートファジー活性を阻害した。オートファジーにより生成される代謝物はTSHによって刺激されるタンパク質合成に必要とされる可能性がある。
2)BrafCA/wtマウスは、Creを発現するアデノウイルスの甲状腺内注射の1年後に甲状腺がんを発症したが、アデノウイルスを注入したBrafCA/wt;Atg5flox/floxマウスでは6か月で癌の発症が観察された。この結果はオートファジーの欠損が甲状腺発癌に関与することを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーの詳細な機構が国内を中心として解明され、以降種々の臓器でのその生理学的意義、各種病態での役割が報告されてきた。一方、甲状腺生理でのオートファジーの意義、甲状腺でのオートファジー活性の調節などは全く検討されないままオートファジーと各種甲状腺疾患との関わりが検討されてきたのが現状であったが、本研究がそのさきがけになったと考える。本研究では甲状腺におけるオートファジー調節機構についてや甲状腺発癌過程におけるオートファジーの役割が明らかになった。これらの結果はオートファジーが癌治療の標的となるか否かの検討研究として一定の成果を収めた。

研究成果の概要(英文)：1) Thyroid stimulating hormone TSH positively regulates autophagy activity through ERK and PKC signaling pathways, whereas thyroid hormone inhibited autophagy activity. Metabolites generated by autophagy may be required for TSH-stimulated protein synthesis.
2) BrafCA/wt mice developed thyroid cancer 1year after intrathyroidal injection of Cre-expressing adenovirus, whereas adenovirus-injected BrafCA/wt;Atg5flox/flox mice developed cancer at 6 months. This result indicates that Autophagy deficiency is involved in thyroid carcinogenesis.

研究分野：内分泌学

キーワード：オートファジー 甲状腺 アポトーシス TSH 甲状腺ホルモン 酸化ストレス DNA二重鎖切断 PKCシグナル伝達回路

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーの詳細な機構が解明され、以後種々の臓器でのその生理学的意義、各種病態での役割が報告されてきたが、甲状腺での本格的な研究はあまりない。そこで甲状腺でのオートファジーの生理的意義を明らかにするため、我々はオートファゴゾームの構成成分の1つであるATG5 (autophagy-related gene-5) の発現を Cre 存在下で消失する *Atg5^{fllox/fllox}* マウスと甲状腺のみで DNA 組換え酵素 Cre を発現する *TPO-Cre* マウスを交配して、甲状腺特異的 ATG5 ノックアウトマウス *Atg5^{fllox/fllox}; TPO-Cre (Atg5^{thyr-KO/KO})* を作出した。このマウスの解析から、(1)12 か月までの観察で甲状腺重量・甲状腺機能には有意な変化が認められないこと、(2)しかし生後4か月で既に、変性・凝集タンパクの蓄積が見られ、活性酸素が軽度上昇していること、(3)8~12 か月になると甲状腺濾胞上皮細胞がアポトーシスにより細胞死に至り、甲状腺濾胞あたりの上皮細胞数が減少して、かつ扁平化すること、(4)同時に瓢箪型の変形濾胞が出現してくること、(5)活性酸素上昇程度が増すことを見出して、報告した (Endocrinology.160(9):2085-2092, 2019)。これらのデータは、オートファジーの基礎活性が甲状腺濾胞上皮細胞の生存に必須であることを示している。

2. 研究の目的

(1)甲状腺細胞におけるオートファジー活性はホルモン (TSH、甲状腺ホルモン) によりどう調節されているかを解明する。

(2)オートファジーは甲状腺の自然発癌と放射線発癌にどう関与しているのかを解明する。

3. 研究の方法

(1)甲状腺細胞におけるオートファジー活性の調節

以下の実験をラット正常甲状腺細胞株 PCC13 と、野生型マウスを用いて行う。

既知のオートファジー調節剤による変化の確認：オートファジー促進剤 rapamycin、阻害剤 chloroquine を用いる。

ホルモン (TSH、甲状腺ホルモン) による調節：甲状腺において、TSH は主に cAMP/protein kinase A (PKA) を介して、多くの下流刺激伝達経路を刺激することが分かっているが、今までのオートファジー調節に関する報告を参考にすると、ERK と CERB を介してオートファジーを促進、mTOR を介してオートファジーを抑制することが考えられる。それぞれの経路によるオートファジーの調節、net effect としての TSH の作用を、各種阻害剤・膜貫通型 cAMP 誘導体を用いて明らかにする。

(2)癌化への影響

我々が最近確立したマウス甲状腺癌モデルを利用し我々は最近甲状腺癌で最も高頻度に見られる変異遺伝子である BRAF^{V600E} による甲状腺発癌マウスモデルを樹立した。このモデルでは、

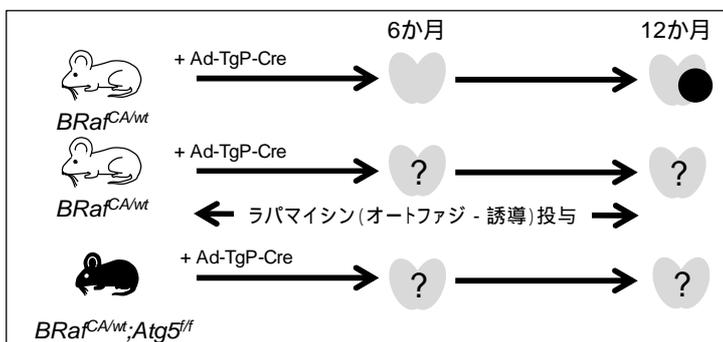


図1 甲状腺発癌モデルでの実験。(最上段)我々のモデル(腫瘍)(2段目)オートファジー亢進の影響を検討、(3段目)オートファジー欠損の影響を検討

図 1 上段に示すように、甲状腺特異的 Cre 発現アデノウイルスをマウス甲状腺に微量注入すると、6 か月後には変化ないが、1 年後にはほぼ全例に甲状腺癌の発生が見られる。このモデルにおいて、ラパマイシンを長期投与してオートファジー亢進の影響を（図 1 中段）ノックアウトと組み合わせてオートファジー欠損の影響を（図 1 下段）を検討する。

放射線発癌実験モデル：
野生型マウス甲状腺に放射線外照射しても発癌率は低い。そこで、オートファジー欠損の甲状腺放射線発癌促進効果の有無を図 2 に示すような実験計画で検討する。

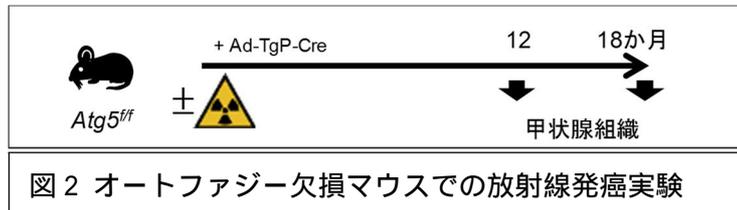


図 2 オートファジー欠損マウスでの放射線発癌実験

4. 研究成果

(1) PCC13 細胞におけるオートファジー活性のホルモン調節

ラット正常甲状腺細胞株 PCC13 を用いて、甲状腺細胞におけるオートファジーの制御について検討した。

細胞をさまざまな用量の rapamycin または chloroquine で 24 時間インキュベートすると rapamycin は LC3 puncta の数を増加させ、p62 発現レベルを減少させた。一方 chloroquine は LC3 puncta および p62 レベルの両方を用量依存的に増加させた。これらのデータは、それぞれ rapamycin および chloroquine によるオートファジー活性の増強および阻害を確認し、PCC13 細胞が機能的なオートファジーを有することを示している。

オートファジーに対する T4 および TSH の効果を評価した。ホルモン添加なしで 3 日間培養後、細胞を異なる用量の T4 または TSH とともに 24 時間インキュベートした。T4 は LC3 puncta を減少させ、用量依存的に p62 レベルを増加させ、T4 がオートファジー活性を抑制する結果となった。一方、TSH は LC3 puncta と p62 発現の両方を増加させた。このような結果となった原因はオートファジーフラックスの後期段階におけるオートファジーの阻害、または TSH がオートファジーや p62 増加を刺激しているのではないかと考え、次の検討を行った。細胞は、rapamycin(陽性コントロール)または TSH を chloroquine で同時に処理され rapamycin または TSH による LC3 puncta の増加は chloroquine によってさらに増加した。これらのデータは、TSH がオートファジー刺激物質であり、また TSH はオートファジーに対する作用とは無関係に p62 レベルを増加させる可能性が高いことを示している。その後の検討で TSH は PCR で p62 mRNA レベルを増加させず、翻訳後レベルで p62 の量を増加させたことが考えられたが cycloheximide(タンパク質合成阻害剤)処理実験により TSH は p62 タンパク質を安定化させることがわかった。これらのデータは、T4 がオートファジー活性を抑制、TSH はオートファジー活性を刺激し、さらに TSH が翻訳後レベルで p62 タンパク質を安定化することを示している。さらに TSH で刺激した細胞で p62 と LAMP1 の共局在を認め(chloroquine により抑制) TSH 刺激によりオートファジーフラックスを形成することを確認した。

次に PCC13 細胞のオートファジー活性を制御するための TSH 下流シグナル経路を特定することとした。細胞膜透過性 cAMP アナログ 8-Br-cAMP は用量依存的に LC3 puncta を増加させた。TSH または 8-Br-cAMP は LC3 puncta の増加を仲介し、protein kinase A(PKA)阻害剤である KT5720 により用量依存的にこれを阻害した。また protein kinase C(PKC)阻害剤である staurosporine についてもわずかに阻害効果は小さいが同様の結果となった。このこ

とから Gs-cAMP-PKA と Gq-PKC の両方がオートファジーの刺激経路であることを示している。さらに下流の経路も、cAMP 応答要素結合タンパク質(CREB)、ERK、および mTOR 阻害剤を用いて検討した。CREB 阻害剤 666-15 は 8-Br-cAMP による LC3 puncta の増加を減少させ、ERK 阻害剤 U0126 においても程度は低いものの LC3 puncta を減少させた。rapamycin (mTOR 阻害剤) に関しては、rapamycin 自体は明らかに LC3 puncta を増加させたが、LC3 puncta の増加に対する cAMP の効果は有意ではあったが小さかった。これらのデータは、基礎レベルでは mTOR が活性を維持し、オートファジーの誘導をチェックしていることを示す以前の報告と一致する(参 1)。これらのことから TSH-Gs-cAMP-PKA-CREB/ERK と TSH-Gq-PKC はどちらもオートファジー活性を正に制御するシグナル伝達経路であり、TSH の刺激により mTOR 経路を通じたオートファジーの阻害は最小限であると考えられる。

(2) マウスにおけるホルモンによるオートファジー活性の調節

in vivo でもオートファジーのホルモン調節について検討した。

マウスを飲料水中の rapamycin または chloroquine で 2 週間処理した。どちらも甲状腺組織学、甲状腺の体重、T4 および TSH レベルはこれらの処理によって変化したが、rapamycin 処理マウスでは LC3 puncta の増加および p62 レベルの低下が観察され、chloroquine 処理マウスでは LC3 puncta および p62 レベルの増加が観察され PCC13 細胞のデータと同様の結果となった。

次に、マウスを methimazole/過塩素酸塩または T4 のいずれかを飲料水中で 2 週間処理した。methimazole/過塩素酸塩は甲状腺組織学を劇的に変化させ、甲状腺の体重の増加、TSH の上昇を誘発し、T4 を抑制した。また LC3 puncta と p62 レベルの上昇が観察された。これは、オートファジー活性および p62 安定化における TSH 増加の増強、ならび T4 によるオートファジー活性の抑制が低下した正味の効果である可能性が高い。対照的に T4 による処理では T4 レベルを増加させたが、TSH は変化しなかった。(TSH が抑制されなかった理由は不明であるが TSH 解析は TSH 測定値が低いほど感度が低くなる可能性がある。) 代わりに、T4 処理マウスの甲状腺上皮の高さは、コントロールマウスよりも低く、これは TSH レベルの低下を強く示している。TSH が抑制されると仮定すると、T4 処理マウスにおける LC3 puncta および p62 の減少は、オートファジー活性の TSH による増強と T4 による低下の複合効果に起因する可能性が高い。よって、methimazole/過塩素酸塩または T4 のいずれかで処理されたマウスによるこれらの in vivo 実験は、前述の in vitro のデータと一致する。

(3) オートファジー-K0 マウスの甲状腺恒常性に対する methimazole/過塩素酸塩の影響

4 ヶ月齢の K0 マウスで検出された生化学的变化を増強し、8~12 ヶ月齢の K0 マウスで観察された形態学的変化の出現を加速するために、オートファジー-K0 マウスに methimazole/過塩素酸塩を 2 ヶ月間(生後 2~4 ヶ月)与えることによってオートファジー活性の増強が誘導された。methimazole/過塩素酸塩は、WT マウスと K0 マウスでユビキチン化タンパク質、ROS を介した DNA 損傷(8-OHdG および 53BP1)、および上皮の高さを同等に増強し有意差はなかった。一方、K0 マウスでは濾胞サイズが小さく、濾胞内腔ではなく濾胞細胞内の TG 含有量が低いことがわかった。methimazole/過塩素酸塩処理 K0 マウスでは、処理された WT マウスよりも、methimazole/過塩素酸塩処理オートファジー-K0 マウスの TG 産生が低いことを意味する。これらの違いは、methimazole/過塩素酸塩で短期間(2 週間)処理されたマウスでは観察されなかった。したがって、TSH の上昇による TG(およびおそらく他のタンパク質)の産

生の増強には、オートファジーによって生成およびリサイクルされる代謝産物がビルディングブロックとして必要であることが示唆された。

(4) オートファジー欠損がもたらす癌化への影響および放射線発癌モデルの作製

Braf^{CA/WT} マウスは Cre を発現するアデノウイルスの甲状腺内注射から 1 年後に甲状腺癌を発症したが、*Braf*^{CA/WT};*Atg5*^{fllox/fllox} マウスでは注射後 6 ヶ月後に癌の発生が観察された。しかし ATG5K0 だけでは注射後 12 か月後でも発がんせず、形態学的な変化も認められなかった。これらのデータは ATG5 K0 が甲状腺がんの発症を加速させたことを示しており ATG5 が甲状腺発がんにおける腫瘍抑制因子であることを示している。

Atg5^{fllox/fllox} マウスへ Cre を発現するアデノウイルスの甲状腺内注射後、8Gy の X 線照射を行った。12 か月、18 か月後に組織変化を観察したが、非照射群と同様に組織変化はなく、オートファジーの欠損のみでは放射線発癌を起こすことができなかった。

<引用文献>

参1 Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem.* 1998;273(7):3963-3966.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazakova D, Shimamura M, Kurashige T, Hamada K, Nagayama Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Re-evaluation of the role of autophagy in thyroid cancer treatment.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endorcj.EJ22-0017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 永山 雄二, 葺重 智美, 中島 康代, 嶋村 美加, 松山 睦美, 中島 正洋, 山田 正信	4. 巻 95
2. 論文標題 甲状腺特異的オートファジーノックアウトマウスでは、濾胞上皮細胞死が誘導される	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本内分泌学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1335-1335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永山 雄二 (Nagayama Yuji) (30274632)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授 (17301)	
研究分担者	嶋村 美加 (Shimamura Mika) (90736406)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------