

ヒト甲状腺腫瘍の組織培養による研究

II. TSH の影響

村山 恒幸

信州大学医学部第1解剖学教室

(主任: 永田 哲士教授)

Tissue Culture of Human Thyroid Cancer Cells

II. Effect of TSH

Tsuneyuki MURAYAMA

Department of Anatomy and Cell Biology, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Tetsuji NAGATA)

The effect of TSH on the growth of primary cultured thyroid cancer tissues was examined using the culture system which we developed and discussed in the preceding paper. Human thyroid cancer tissues surgically obtained from thyroid cancer patients were used as materials. The outgrowth from the explants in the media containing various concentrations of thyroid stimulating hormone (TSH) was observed continuously, by phase-contrast microscopy.

The growth activity of the explant was expressed as the number of explants with outgrowth per the total number of explants subjected to the primary culture. The addition of TSH to the culture media inhibited the growth activity of the explants of thyroid cancer tissues. Higher concentrations of TSH showed effects at lesser magnitudes than lower concentrations. TSH was also shown to have inhibiting effects on the growth of normal control thyroid explants. *Shinshu Med. J.*, 39: 267-274, 1991

(Received for publication November 14, 1990)

Key words: human thyroid cancer, tissue culture, TSH

ヒト甲状腺癌, 組織培養, TSH

I はじめに

前論文「甲状腺腫瘍の組織培養による研究 I 培養細胞の形態学的研究」において甲状腺癌組織を簡便に初代培養できる方法を開発したことを報告した¹⁾。TSH の培養甲状腺細胞に及ぼす影響については近年広範な研究が行われている²⁾。それらの研究はおもに培養正常甲状腺細胞について行われ、TSH の投与により蛋白合成および細胞内の cAMP に変化がみられることが報告されている³⁾。培養甲状腺癌細胞についても同様の研究が行われている⁴⁾⁻⁵⁾。しかし、癌細胞

で最も問題となる細胞の増殖性については明らかにされていない。この点については我々の報告⁶⁾⁷⁾まで明らかかな記載はみられなかった。本論文においては外科的手術によって得られたヒト甲状腺癌を組織培養し、培養液に濃度を変えた甲状腺刺激ホルモン (TSH) を添加し、その培養甲状腺癌細胞の増殖に与える影響を観察した。

II 材料と方法

A 材料

信州大学医学部附属病院第2外科において甲状腺癌

表1 組織培養甲状腺癌患者一覧表

症例番号	性別	年齢	病理診断	培養期間	培養条件 (TSH 濃度)
1	♀	45	乳頭腺癌	33週間	10mU/ml
2	♂	59	髓様癌	28週間	100mU/ml
3	♀	52	乳頭腺癌	17週間	10 μ U/ml,10mU/ml,100mU/ml
4	♀	51	乳頭腺癌	10週間	10 μ U/ml,10mU/ml,100mU/ml
5	♀	29	乳頭腺癌	10週間	10 μ U/ml,10mU/ml,100mU/ml
6	♀	63	乳頭腺癌	12週間	10 μ U/ml,10mU/ml,100mU/ml
7	♀	50	濾胞腺癌	10週間	10 μ U/ml,10mU/ml,100mU/ml
8	♀	49	乳頭腺癌	12週間	10 μ U/ml,10mU/ml,100mU/ml
9	♀	67	未分化癌	19週間	

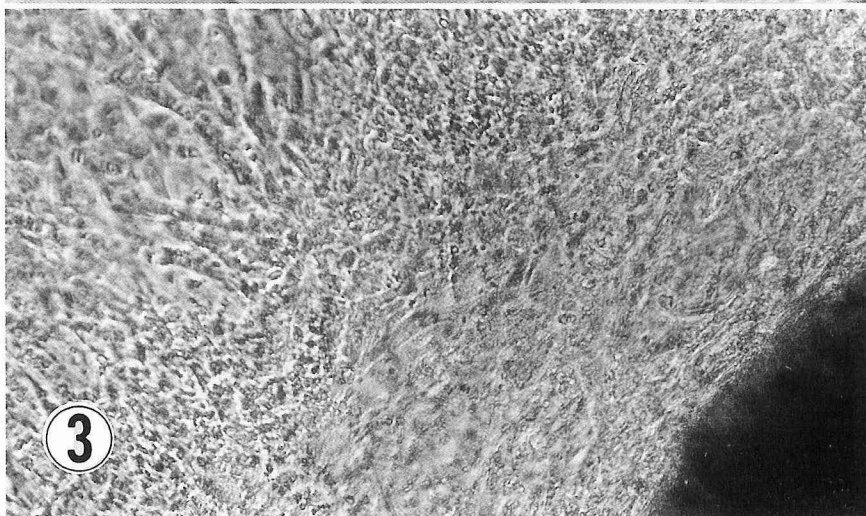
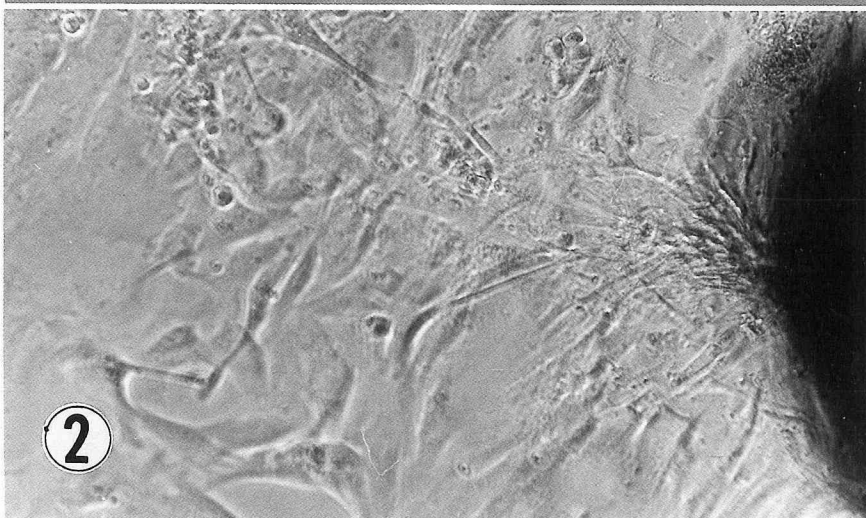
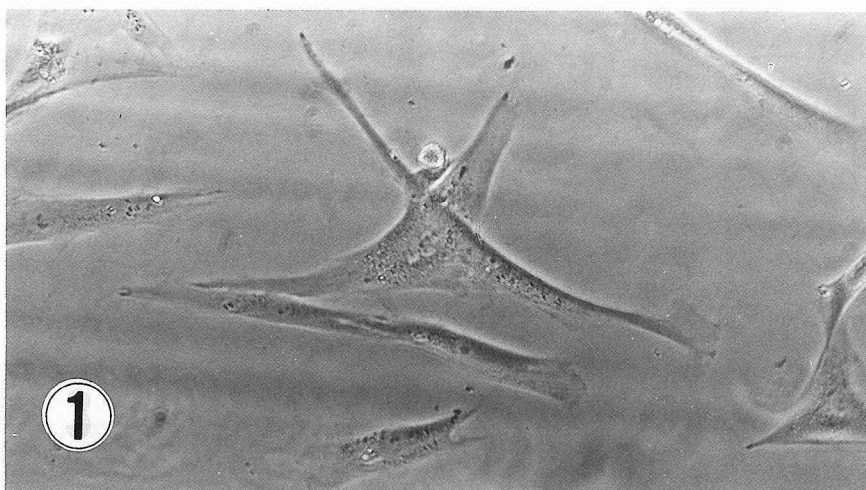
として手術され、病理組織学的に甲状腺乳頭腺癌、髓様癌、濾胞腺癌および未分化癌と診断された計9症例からの組織を研究対象とした(表1)。外科手術時、無菌的に得られた甲状腺癌組織と、同一患者の正常甲状腺組織とを別々に採取し、Hanks液に浸漬して組織培養室に運搬した。無菌室において2本の替刃メス

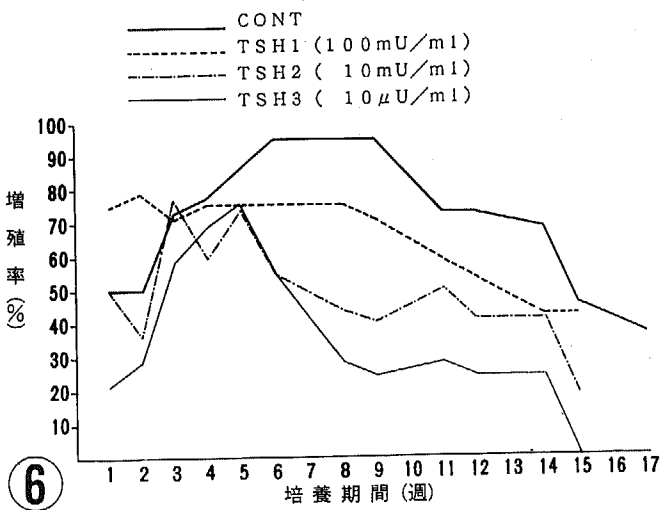
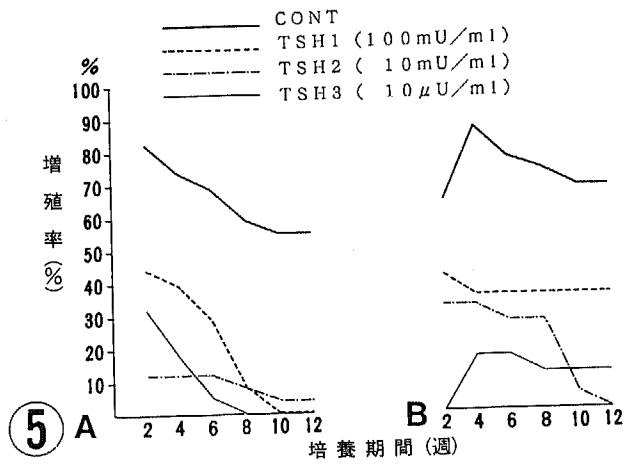
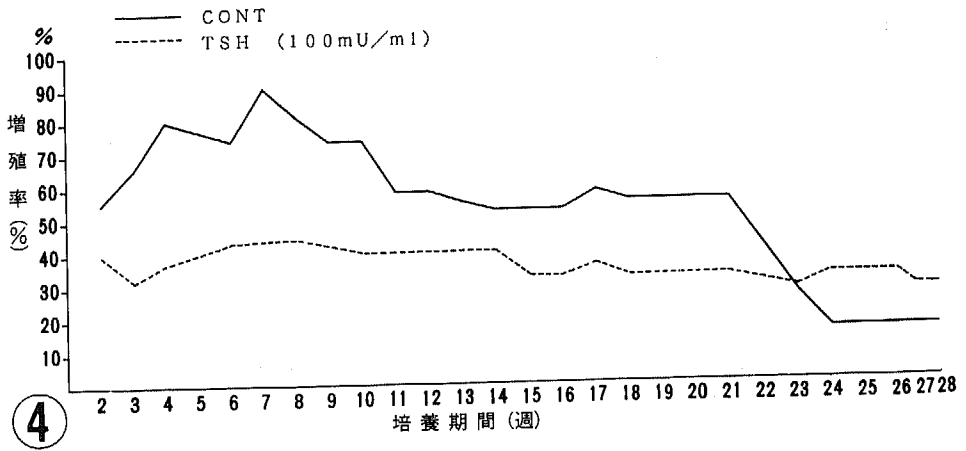
により細切し、1mm×1mm×1mmの小さな組織片とし、短冊型カバーガラス上で組織片培養(explant culture)を行った。

B 培養法

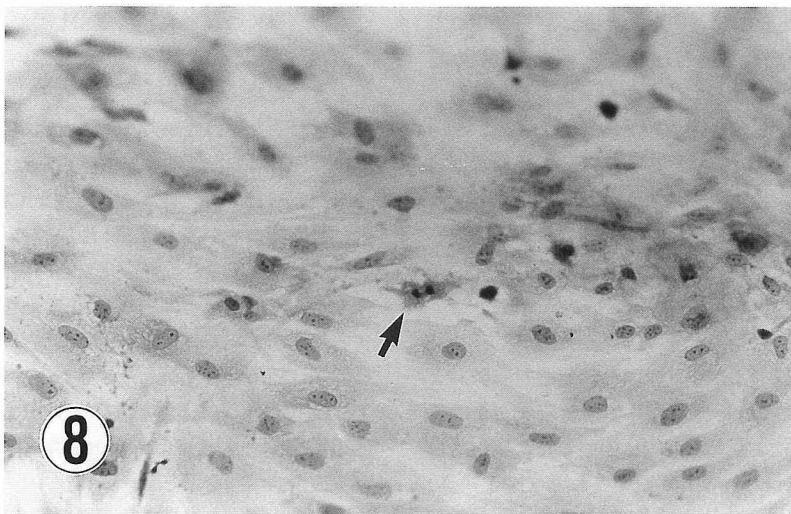
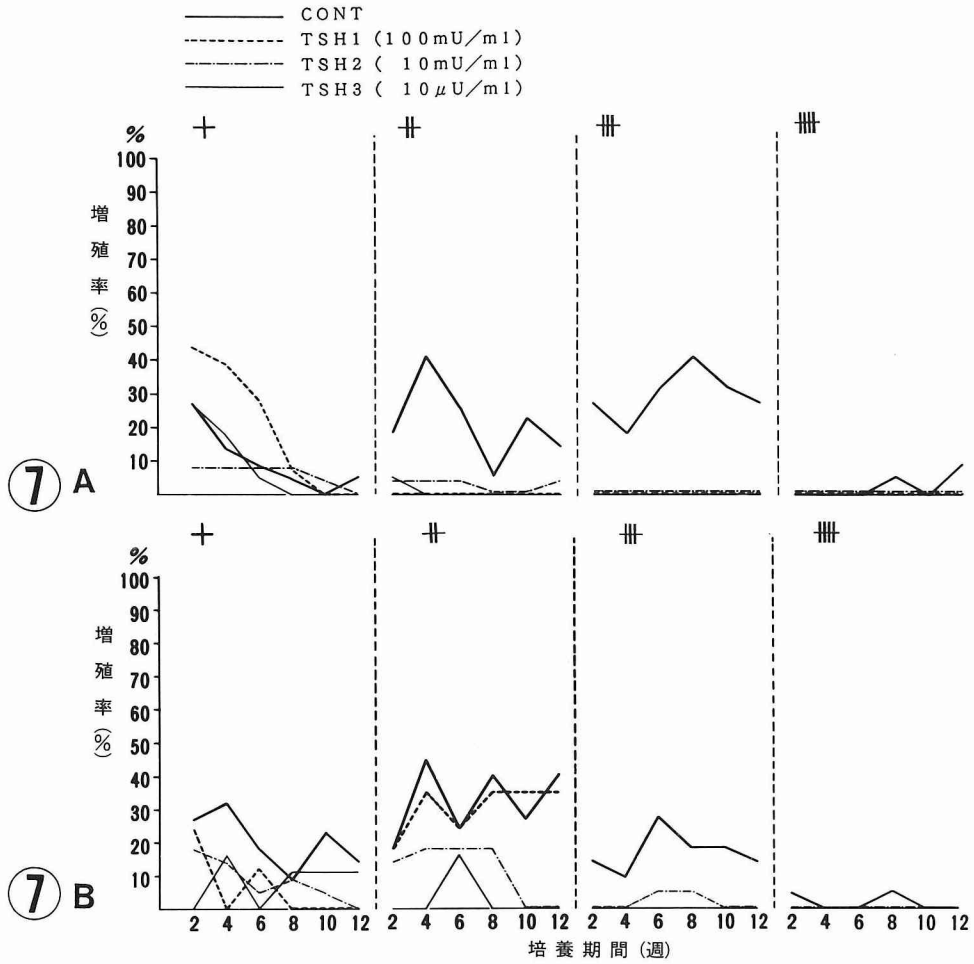
前論文¹⁾のとおり培養を行った。すなわち、1症例について、TD-15型培養瓶を癌組織20個、正常組織

- 図1 培養甲状腺癌細胞位相差顕微鏡写真
培養16週目の TSH10 μ U/ml 添加の乳頭腺癌組織(症例8)。×150
- 図2 培養甲状腺癌細胞位相差顕微鏡写真
培養16週目の TSH10mU/ml 添加の乳頭腺癌組織(症例8)。×150
- 図3 培養甲状腺癌細胞位相差顕微鏡写真
培養16週目の TSH100mU/ml 添加の乳頭腺癌組織(症例8)。×400
- 図4 培養正常甲状腺組織の増殖率の経時的変化
正常組織(症例2)における TSH (100mU/ml) 添加群と無添加群の比較。培養23週までは TSH 添加群で増殖率が抑えられている。また、培養23週以降では無添加群の増殖率が急に低下するが、添加群は維持されている。
- 図5 同一症例の正常組織および癌組織の増殖率の経時的変化(症例6)
A 正常組織および B 癌組織における TSH 添加群と無添加群の比較。両者とも TSH 添加群は増殖率が抑えられている。
- 図6 培養甲状腺癌組織の増殖率の経時的変化
癌組織(症例3)における TSH 添加群と無添加群の比較。培養3週から TSH 添加群で細胞増殖が抑えられている。
- 図7 同一症例の正常組織および癌組織からの outgrowth の大きさによる分類と増殖率との関係(症例6)
A 正常組織および B 癌組織における TSH 添加群と無添加群における細胞の増殖傾向を示す。
A 卍, 卍に TSH 添加群と無添加群に差が著明に認められる。
B 卍, 卍ともに TSH 添加群で増殖が抑えられている。
- 図8 培養甲状腺癌細胞の Jacobson 染色標本の光顕写真
培養2週目の TSH 無添加の未分化甲状腺癌組織。有糸分裂像(矢印)が観察される(症例9)。×200





ヒト甲状腺腫瘍の組織培養による研究



20個の計40個使用した。培養液としてEagle MEM (日水粉末) / 10%新生子牛血清 (GIBCO, Inc., Grand Island, New York, USA) とペニシリンG (100U/ml), ストレプトマイシン (100 μ g/ml) (明治製菓, 東京) を加えて使用した。実験群には, 10 μ U/ml, 10mU/ml, 100mU/ml の3種の濃度のTSH (Armour, Arizona, USA) を加えて培養を行った。一部の材料については0.1 μ U/ml, 1 μ U/ml, 10 μ U/ml, 10mU/ml, 100mU/ml の5種の濃度を加えて培養を行った。培養方法は短冊型カバーグラス (8mm \times 50mm, 松浪硝子, 大阪) に細切した組織片5~6個をのせてTD15型培養瓶 (池本理化工業, 東京) に入れ, 37°C恒温器中で静置培養を行った。培養液は1日から1週間ごとに交換した。

C 観察法

培養細胞の定期的形態学的観察には, 倒立位相差顕微鏡 (オリンパスCK型位相差, dark contrast) を使用した。培養組織の記録には毎週1回定期的に写真撮影をした。写真撮影にはニコンMD型倒立顕微鏡にニコン顕微鏡写真撮影装置を接続し, 対物鏡としてDLL contrastを用い, 富士ネオパンF35mmフィルムで撮影し, 引伸した写真を用いて計測した。各実験群において, explantの総数に対してoutgrowthが認められたものの割合をパーセントで示して増殖率とした。また一部の症例においては, outgrowthの大きさを程度によって4段階に分類し, explantから一方向のみにoutgrowthが観察されたものを(+), explantから360°の方向にexplantの直径以内のoutgrowthを生じたものを(++) , explantから360°の方向に直径程度の成長を示したものを(+++) , 360°の方向に直径以上の成長を示したものを(####)と判定して, 全explantに対する割合を求めた。

全ての症例において, 試料の一部は, 短冊型カバーグラスのまま, メタノール固定, May-Grünwald-Giemsa (Jacobson) 染色を行い, 永久標本を作成して, 透過型光学顕微鏡により観察した。

III 結 果

正常甲状腺組織および甲状腺癌の無処置対照群およびTSH添加群のexplantをTD型培養瓶のまま倒立位相差顕微鏡により, 定期的に観察した。早いものでは数日後からoutgrowthが観察された (図1-3)。固定染色標本でoutgrowthを観察すると, 多数の有糸分裂が認められ, outgrowthはexplantから外側へ

成長しつつ分裂増殖していることが確認された。癌組織のTSH添加群では無処置対照群に比べると一般に成長が遅い。TSHの濃度を10 μ U/ml, 10mU/ml, 100mU/mlの3段階に変え, 培養液中に加えたものでは, 正常組織および癌組織ともに無処置対照群に比してoutgrowthがおさえられた (図4-6)。また変性および剥離も対照群に比して早い傾向にあった。すべての症例においてこの傾向は一定していた。培養正常甲状腺組織にTSHを高濃度 (100mU/ml) に加え, 無添加対照群と比較すると, 増殖率は抑制され, 培養20週までその効果は著明であったが, 培養期間が長期にわたり23週を過ぎると, 無添加対照群では増殖率が急に低下したが, 添加群では維持された (図4)。TSHを中濃度 (10mU/ml), 低濃度 (10 μ U/ml) に加えても増殖率の抑制が認められ, 濃度が低いほど増殖率がより抑制される傾向が示された (図5)。

培養甲状腺癌細胞にTSHを添加すると, 高濃度でも低濃度でも, 癌組織は無処置対照群に比して増殖率が抑えられ, しかも濃度が低いほど抑制が強い傾向が示された。10 μ U/ml, 10mU/ml, 100mU/mlのTSHを加えたexplantおよびoutgrowthの位相差顕微鏡像 (図1-3) では, 低濃度TSH添加群は高濃度TSH添加群に比べて細胞の増殖が抑えられた。

一部の症例において, explantから成長したoutgrowthの程度を4段階に分類して, 増殖率のTSHによる変化を調べた結果 (図7), outgrowthの程度がexplantから360°の方向に直径以内のもの(++)およびexplantから360°の方向に直径程度の成長を示したもの(+++)の群においてTSHによる抑制効果が著しかった。しかし, (+)の群においてはoutgrowthが小さいため, 正常組織においては対照群とTSH添加群に著明な差はなかった。また癌組織においては軽度のTSHによる抑制効果がみられたが著明な差はなかった。一方(####)群は培養12週まで経過を観察しても, 対照群においてもTSH添加群においてもそれ以上の成長は認められなかったため, 両群間の著明な差はなかった。(++)群において正常細胞では, TSHによる効果が著明であったが, 癌細胞では正常細胞ほどの抑制は認められなかった。また, ここでも高濃度のTSHを加えると低濃度添加群に比べて正常組織細胞, 癌組織細胞ともにoutgrowthの増殖抑制がおさえられる逆説的傾向を示した。

固定染色標本の光学顕微鏡像を図8に示す。有糸分裂像が認められ, outgrowthが細胞増殖によることが

確認された。

IV 考 察

組織培養下におけるヒト甲状腺癌由来細胞の甲状腺刺激ホルモンによる影響を観察し、癌細胞はTSH添加によって増殖が抑えられることが明らかにされた。癌組織における組織培養では、正常組織に比して一般にexplantからの細胞のoutgrowthが遅く、特にTSH添加群においてそれが著しい。

体内でTSHが甲状腺濾胞上皮細胞膜に作用し、その受容体を介してadenylate cyclase—cyclic AMPを活性化し、甲状腺ホルモン分泌を促進する事実が知られているが²⁾、*in vitro*においてはヒト甲状腺培養細胞の細胞分裂にTSHが生長因子とならないという報告⁹⁾もあり、TSHと甲状腺癌細胞の増殖については関係が明らかでない。

近年TSHの培養正常甲状腺細胞の代謝に関する影響が広く調べられ、DNA合成との関係が検索されたが、種によって増加あるいは減少というように逆の結果が得られている⁹⁾。ヒトの正常および種々の培養甲状腺細胞においてTSH添加のDNA合成に及ぼす影響についてが調べられている¹⁰⁾。それによればTSH添加によりDNA合成が抑制される場合と促進される場合とがあり一定した結果が得られないとされている。一方、FRTL-5という培養株細胞を用いた研究でもTSH投与と細胞増殖に明らかな関係が見られないことが示されている⁹⁾。

最近、腫瘍プロモーターであるフォルボールエステル(TPA)の培養甲状腺細胞に与える影響が注目されている。細胞内のTPAの受容体はプロテインキナーゼCであり、ヒト乳頭腺癌においてはそのアイソザイムタイプIIが特徴的に増加していることが知られている¹¹⁾。TPAは培養正常甲状腺細胞の成長を促進することが知られている¹²⁾¹³⁾。ただしその影響は高濃度のTPAよりむしろ低濃度でより著しいといわれる。プロテインキナーゼCは細胞内のcAMP濃度の変化

をとおして細胞に影響を与えることが推定されている¹²⁾¹³⁾。*In situ* hybridization法でTPAおよびcAMPの培養甲状腺細胞におけるサイログロブリン遺伝子発現に与える影響を調べた実験¹⁴⁾では、それらの影響は細胞ごとに大きな差があることがわかっている。我々の研究においては、TSHの培養甲状腺癌細胞における影響が、高濃度TSH添加が低濃度TSH添加に比べて成長抑制作用が小さいというような2面的な結果が得られた。このことは、以上の考察において細胞外から与えた代謝関連物質がやはり2面的な影響を与えることと関連があると考えられる。

もっとも、最近ではc-fosおよびc-myc癌遺伝子とTSH投与の影響がいわれはじめており¹⁵⁾、我々の確立した実験系はこのような研究領域でも有用になると思われる。

V 結 語

本研究においては初代培養甲状腺癌細胞に対するTSHの影響が前出論文にて発表した培養系を用いて調べられた。種々の濃度のTSHを含む培養液中のexplantからのoutgrowthが位相差顕微鏡を用いて継続的に観察され次の結果が得られた。

- 1) explantの増殖能は初代培養を行った全explant総数にたいしてoutgrowthを生じたexplantの数の割合で表現した。TSHの培養液への添加により甲状腺癌組織の増殖能は阻害された。
- 2) 甲状腺癌組織においては高濃度TSH添加が低濃度TSHに比べて影響がより少なかった。
- 3) 対照として用いた正常甲状腺組織においてもTSHは生長に阻害的な影響を与えた。

なお、本研究の要旨は第39回日本癌学会総会(1980年11月、東京)において発表した。

協同研究を行って下さった第1解剖学教室の白田信光講師、藤井靖久助手、またご指導を賜った永田哲士教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 村山恒幸：ヒト甲状腺腫瘍の組織培養による研究 I. 培養細胞の形態学的研究。信州医誌，39：123—134，1991
- 2) 高須信行：培養甲状腺。臨床病理，臨増：140—149，1981
- 3) Miller, R. C., Hiraoka, T., Nakamura, N., Tenou, H., Kopeccky, K. J., Jones, M. P. and Gould, M. N.: *In vitro* culture of human thyroid cells; Methods and application to radiation biology. J Radiat Res (Tokyo), 26: 269—282, 1985

- 4) Komlos, L., Shimberg, R., Halbrecht, I., Zohar, Y., Strauss, M., Laurian, L. and Laurian, N.: Primary tissue cultures of benign and malignant human thyroid tumors: Effect of TSH. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 99: 10-15, 1988
- 5) Davies, T. F., Platzer, M., Schwartz, A. E. and Friedman, E. W.: Short- and long- term evaluation of normal and abnormal human thyroid cells in monolayer culture. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 23: 469-479, 1985
- 6) 村山恒幸, 牧内正夫, 宮川 信, 藤井靖久, 永田哲士: 組織培養された甲状腺癌に TSH が及ぼす影響. 第39回日本癌学会総会記事, p275, 1980
- 7) 村山恒幸, 白田信光, 永田哲士: 培養甲状腺癌への甲状腺刺激ホルモン (TSH) の影響. *組織培養*, 12: 258-263, 1986
- 8) Westermark, B., Karlsson, F. A. and Walinder, O.: Thyrotropin is not a growth factor for human thyroid cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 2022-2026, 1979
- 9) Tsushima, T.: Growth factors that modulate growth and functions of thyroid cells in culture. *Gunma Symp Endocrinol*, 25: 149-165, 1988
- 10) Goretzki, P. E., Koob, R., Koller, B. A., Simon, R., Branscheid, D., Clark, O. H. and Roehrer, H. D.: The effect of thyrotropin and cAMP on DNA synthesis and cell growth of human thyrocytes in monolayer culture. *Surg*, 100: 1053-1061, 1986
- 11) Hagiwara, M., Hachiya, T., Watanabe, M., Usuda, N., Nagata, T. and Hidaka, H.: Protein kinase C isozymes in normal and cancer tissues quantitatively assessable by immunoenzymetric assay. *Cancer Res*, 50: 5515-5519, 1990
- 12) Roger, P. P., Reuse, S., Servais, P., van Heuverswyn, B. and Dumont, J. E.: Stimulation of cell proliferation and inhibition of differentiation expression by tumor-promoting phorbol esters in dog thyroid cells in primary culture. *Cancer Res*, 46: 898-906, 1986
- 13) Wegrowski, J., Bellon, G., Heye, B. and Borel, P.: Effects of thyroid-stimulating hormone and phorbol ester on glycosaminoglycan synthesis in porcine thyroid epithelial cells in primary culture. *Cell Biol Int Rep*, 13: 881-890, 1989
- 14) Pohl, V., Roger, P. P., Christophe, D., Pattyn, G., Vassart, G. and Dumont, J. E.: Differentiation expression during proliferative activity induced through different pathways: In situ hybridization study of thyroglobulin gene expression in thyroid epithelial cells. *J Cell Biol*, 111: 663-672, 1990
- 15) Colletta, G., Cirafici, A. M. and Vecchio, G.: Induction of the c-fos oncogene by thyrotropic hormone in rat thyroid cells in culture. *Science*, 233: 458-460, 1986

(2. 11. 14 受稿)