

原 著

Adenylate cyclase-cyclic AMP 系からみた甲状腺腫瘍 のホルモン依存性に関する研究

千 賀 脩

信州大学医学部第二外科学教室

(主任: 降旗力男教授)

STUDIES ON HORMONE DEPENDENCY OF THYROID TUMORS BASED ON ACTIVATION OF THE ADENYLATE CYCLASE-CYCLIC AMP SYSTEM

Osamu SENGU

Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Rikio FURIHATA)

SENGU, O. *Studies on hormone dependency of thyroid tumors based on activation of the adenylate cyclase-cyclic AMP system.* Shinshu Med. J., 28: 684-701, 1980

Basal cyclic AMP (cAMP) concentrations and the effects of TSH and prostaglandin E_1 (PGE_1) on the adenylate cyclase-cAMP system in thyroid tumors were investigated to clarify their hormone dependency. Basal cAMP concentrations in thyroid tumors are higher than those in normal thyroid tissues. In thyroid adenomas, the cAMP levels and adenylate cyclase activities in response to TSH were greater than those of normal thyroid tissues. Cold nodule and hot nodule of thyroid adenomas which were shown by ^{131}I scintigram were both affected by TSH. It is suggested that defects of iodine organification and hormone synthesis in these tumor cells are not due to abnormalities of the receptors to TSH, but due to abnormalities of iodine metabolisms after cAMP production. In thyroid carcinomas, on the other hand, the responses were less than those of normal thyroid tissues. Both undifferentiated carcinoma and medullary carcinoma failed to respond to TSH. PGE_1 also affected the thyroid tumor tissue, especially hot nodules of thyroid adenoma. Other hormones such as GH, FSH, HCG, LH and calcitonin did not stimulate adenylate cyclase activity in any thyroid tumor tissues.

From these results, it is confirmed that the TSH receptors exist in plasma membrane of thyroid tumor tissues as well as in normal thyroid tissues. Therefore, it appears that TSH could activate the growth and differentiation of thyroid tumor through its receptors, except for undifferentiated and medullary carcinomas. (Received for publication; April 24, 1980)

Key words; 甲状腺腫瘍 (thyroid tumors)

ホルモン依存性 (hormone dependency)

サイクリック AMP (cAMP)

I はじめに

内分泌腺臓器に発生した腫瘍においては、その臓器を支配するホルモンは、正常細胞の増殖および機能だけでなく、その標的器官由来の腫瘍細胞の代謝にまで影響を与えていると考えられている。この関係は臨床的ならびに実験的に乳癌¹⁾および前立腺癌²⁾などでも認められており、さらに副腎腫瘍に対する ACTH³⁾、甲状腺癌に対する TSH⁴⁾ などでも認められ、これら腫瘍は古くより hormone dependent tumor または conditioned tumor⁵⁾ と呼ばれてきた。以上の概念は治療にも応用され、甲状腺では比較的分化型の腺癌においては甲状腺ホルモンの投与により TSH の分泌を抑制すると、癌の発育が抑制されたと報告されている⁴⁾。

甲状腺では TSH によりその成長、増殖、肥大、ホルモン産生および分泌などが影響をうけているが、この TSH の作用機序として、まず、甲状腺細胞膜—レセプターへの結合、次いで、adenylate cyclase の活性化および cyclic AMP (以後 cAMP) の産生などがあげられており、さらに、cAMP は cAMP dependent protein kinase を活性化し、その多彩なホルモン作用を発揮するものと考えられている。また、cAMP は phosphodiesterase (以後 PDE) により 5'AMP に分解され不活化される。これらの一連の変化、すなわち、adenylate cyclase 活性、cAMP の産生、PDE 活性などの面から甲状腺腫瘍に対する TSH の影響を観察した研究は比較的少なく、Macchia ら⁶⁾ はラットに移殖した甲状腺癌を用い、TSH に対する反応性が癌では正常甲状腺にくらべ減少しているとし、また、De Rubertis, Field ら⁷⁾⁸⁾ はヒト甲状腺腫瘍を用い、正常甲状腺にくらべ腺腫では TSH に対する反応性が高いが、癌では減少していると報告しているが、未だ一定の見解はない。一方、Prostaglandin (以後 PG) も甲状腺の adenylate cyclase を活性化し、cAMP 濃度を上昇させ、TSH と類似の作用を示すことが知られている⁹⁾¹⁰⁾。Adenylate cyclase-cAMP 系活性化の最も著明なものは PGE とされているが、一般に TSH に比較して、PGE の甲状腺に対する作用効果は弱いとされている¹¹⁾。

本論文において、著者は甲状腺腫瘍のホルモン依存性を adenylate cyclase-cAMP 系の面より解明するため、A) 甲状腺腫瘍組織中の cAMP 濃度の測定、B) 腫瘍組織切片を使用しての TSH、および PGE に

対する組織中 cAMP 濃度の変化、C) 腫瘍組織より得た crude な plasma membrane fraction の TSH, PGE ならびに他のホルモンなどに対する adenylate cyclase 活性の測定、D) 腫瘍組織内の PDE 活性の測定を行って、正常甲状腺ならびに各種甲状腺腫瘍について比較検討した。

II 対象および方法

A 対象

研究対象は、当科で手術時に摘出したヒト正常甲状腺、腺腫および癌組織を用いた。腺腫では、まず、甲状腺癌取り扱い規約¹²⁾にしたがって組織型別の検討を行い。さらに、岩浅の分類¹³⁾にしたがって ¹³¹I シンチグラムより cold nodule と hot nodule に大別し、hot nodule をさらに甲状腺中毒症状の有無および甲状腺機能検査などより、中毒型 toxic type (中毒性腺腫) と非中毒型 non-toxic type に分けて比較検討した。Hot nodule の症例はいずれも腺腫であり、術前抗甲状腺剤投与など特別な治療をせずに手術を施行した。癌は、分化型の癌、未分化癌および髄様癌に大別して比較検討した。

B 方法

1 組織中 cAMP 濃度の測定

手術により摘出された各組織は摘出後、乾燥試験管内に入れ、ドライアイスアセトンを用いて、すみやかに凍結し以後の実験に供した。組織中の cAMP の測定は、Gilman¹⁴⁾ の competitive protein binding assay に準じ、binding protein は Miyamoto ら¹⁵⁾ の方法にしたがって、ブタの心筋よりとり出し、inhibitor protein も同様にブタ心筋より Appleman ら¹⁶⁾ の方法に準じてとり出した。結合 cAMP の分離は charcoal 法を用い、分離した ³H-cAMP を triton phosphor と混じ、液体シンチレーションカウンターにて測定した。組織中の蛋白含量は Lowry 法¹⁷⁾によって測定し、standard として bovine serum albumin (BSA) をおいた。

2 TSH および PGE₁ に対する腫瘍組織中の cAMP 濃度の測定

TSH および PGE₁ に対する反応性を、組織中の cAMP 濃度の増加を指標として測定した。すなわち、摘出後直ちに Stadie-Riggs slicer にて厚さ約 1mm のヒト甲状腺スライス (約 30mg) をつくり、10⁻²M の theophylline, 1mg/ml BSA, 1mg/ml glucose を含む 1 ml の Krebs-Ringer bicarbonate (KRB)

buffer の中に入れ、TSH および PGE_1 を添加し、 37°C 、20分間 incubate し、50mM sodium acetate buffer (pH 4.0) を加え10分間煮沸し反応を止め、その上清を用いて cAMP の測定を行った。KRB は前もって 5% CO_2 —95% O_2 で処置した。cAMP の測定は 1 に述べた方法と同様に行った。

3 腫瘍組織の adenylyl cyclase 活性の測定

ヒト甲状腺組織を摘出後直ちにハサミで細切し、loose fitting なガラス homogenizer を用い、0.25 M sucrose にて homogenate し、 $800\times\text{g}$ で10分間遠心し、その上清をさらに $12,500\times\text{g}$ 20分間遠心し、その pellet を粗膜分画として測定に供した⁵⁵⁾⁻⁵⁷⁾。Incubation medium には $50\mu\text{l}/\text{tube}$ の 40mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) を用い、buffer の中には 3.5mM MgCl_2 、1mM ATP、 10^{-3}M theophylline、0.1% BSA、1.0mM EDTA、 $2\times 10^{-2}\text{M}$ PEP (phosphoenol pyruvate)、 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ の PK (pyruvate kinase) を添加した。ヒト甲状腺 plasma membrane $50\mu\text{l}$ 、基質 $50\mu\text{l}$ に、刺激物質 (TSH, PGE_1 , および NaF など) $10\mu\text{l}$ を加え総量 $110\mu\text{l}$ とし、 37°C 、10分間 incubate した後、50mM sodium acetate buffer (pH 4.0) を加え5分間煮沸し反応を止めた。その上清の cAMP 量を 1 に記した方法で測定し、10分間に ATP より生成される cAMP の量をもって adenylyl cyclase 活性とした。

4 腫瘍組織の phosphodiesterase 活性の測定
adenylyl cyclase 活性の測定で使った粗膜分画作製時の $12,500\times\text{g}$ の上清を用い、Thompson と Appleman¹⁸⁾ の方法に準じて測定した。すなわち、この fraction に hot の cAMP ($^3\text{HcAMP}$) および cold の cAMP ($1\times 10^{-4}\text{M}$, high Km と $1.25\times 10^{-7}\text{M}$, low Km の二種) を加え10分間、 30°C で incubate した後2分半煮沸した。直ちに冷水につけ、1 mg/ml の snake venom を加え、5分間 $2,000\text{rpm}$ にて遠心した。その上清 $500\mu\text{l}$ の 3H の放射活性を測定し、10分間に加水分解された cAMP の量を測定することにより PDE 活性とした。

TSH は Armour Pharmaceutical Co. の Thytropar を使用し、 PGE_1 は小野製薬より提供を受けた。 PGE_1 は 0.1ml の ethanol で溶解後、0.9ml の buffer (KRB または Tris-HCl buffer) で希釈し保存用とし、使用時適当量に希釈して用いた。3H-cyclic AMP (specific activity 26Ci/mmoles) は Radiochemical Center, Amersham から入手した。

測定値は $\text{mean}\pm\text{SE}$ で表現し、統計学的処理は student's *t* test により $P<0.05$ を有意と判定した。

III 成 績

A 甲状腺腫瘍組織中の cAMP 濃度

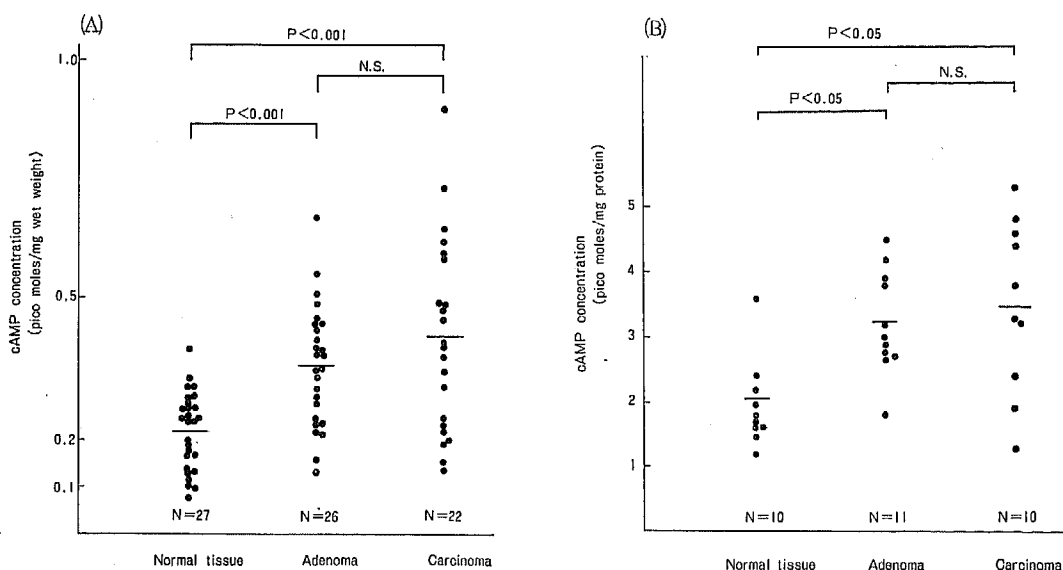


Fig. 1. cAMP concentration in normal thyroid tissues and thyroid tumor tissues.

(A): in mg wet weight of tissues

(B): in mg protein of tissues

甲状腺腫瘍組織中の cAMP 濃度を正常甲状腺組織と比較した (Fig. 1)。Fig. 1. A. は、組織の wet weight (mg) あたりの cAMP 濃度であり、正常甲状腺 (27例) では、 0.22 ± 0.02 p moles/mg wet weight (mean \pm SE) である。腺腫 (26例) では 0.36 ± 0.02 p moles/mg、癌 (22例) では 0.42 ± 0.04 p moles/mg で、腺腫および癌の組織中 cAMP 濃度は正常甲状腺組織に比べ、有意 ($P < 0.001$) の高値を示したが、腺腫と癌では差がみられなかった。Fig. 1. B. は、組織中の cAMP 濃度を wet weight のかわりに蛋白量 (mg protein) であらわしたものである。腺腫および癌組織中の蛋白濃度は正常甲状腺組織にくらべ低値であり、wet weight で測定した場合と同様、腺腫および癌組織中の cAMP 量は正常甲状腺組織より有意の高値を示した。したがって、以後の実験は wet weight 当たりの測定値で検討した。

次に腺腫を組織型別に分け、各組織中の cAMP 濃度を比較検討した (Fig. 2)。コロイド腺腫 (15例) では、 0.37 ± 0.04 p moles/mg wet weight、管状腺腫 (7例) では、 0.32 ± 0.05 p moles/mg、索状腺腫 (4例) では、 0.38 ± 0.03 p moles/mg であり、組織型による差はみられなかった。

次に腺腫を cold nodule (16例) と hot nodule (10例) に分け、おのおの組織中 cAMP 濃度を比較検討した。これら hot nodule の組織型は全例コ

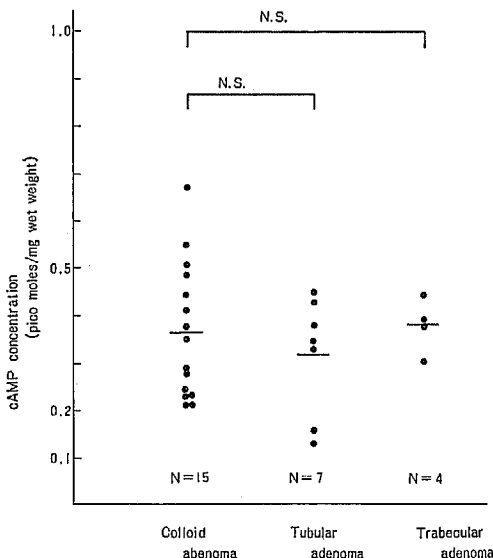


Fig. 2. cAMP concentration in various histological types of thyroid adenomas

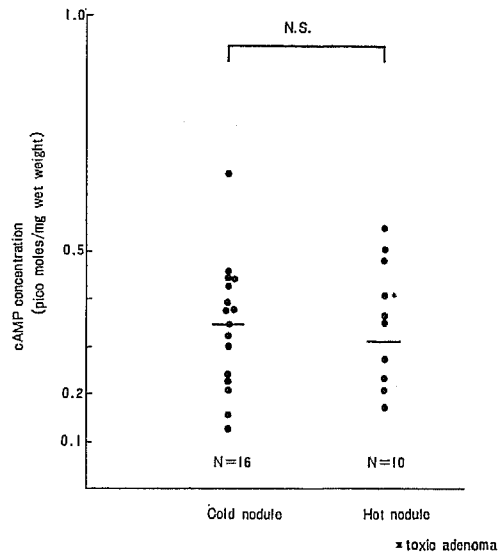


Fig. 3. cAMP concentration in cold nodule and hot nodule of thyroid adenomas

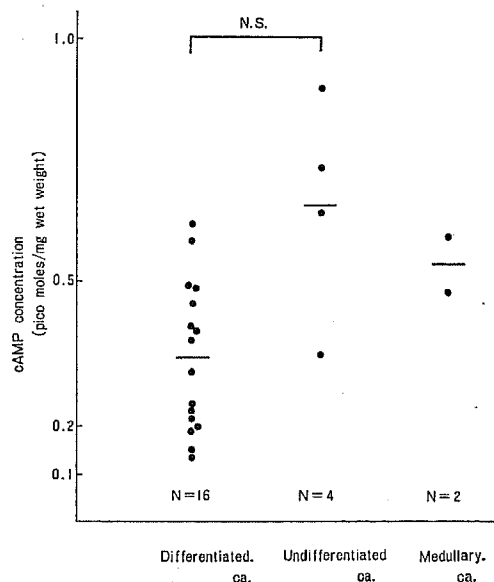


Fig. 4. cAMP concentration in various histological types of thyroid carcinomas

ロイド腺腫である。その成績は Fig. 3 に示すごとく、cold nodule で 0.35 ± 0.03 p moles/mg, hot nodule 0.31 ± 0.04 p moles/mg で cold nodule と hot nodule との間に差がみられなかった。

次に甲状腺癌を組織型別に分け、各組織中の cAMP

Table 1. Effect of TSH and PGE₁ on cAMP concentration in normal thyroid tissues

	No. of patient	Basal	TSH (10mU/ml)	PGE ₁ (5μg/ml)	TSH/Basal	PGE ₁ /Basal
Normal tissue	1.	0.13	2.89	3.47	22.2	26.7
	2.	0.26	1.05	1.67	4.0	6.4
	3.	0.45	3.59	1.35	8.0	3.0
	4.	0.19	1.83	2.30	9.6	12.1
	5.	0.41	0.98	1.42	2.4	3.5
	6.	0.30	1.10	3.26	3.7	10.9
	7.	0.29	4.64	1.54	16.0	5.3
	8.	0.66	2.59	3.50	3.9	5.3
	mean	0.34	2.33**	2.31***	8.7	9.2
	SE	0.06	0.47	0.34	2.5	2.8

p moles cAMP/mg wet weight

These values (mean±SE) were compared to basal levels : **P<0.01 ***P<0.001

Table 2. Effect of TSH and PGE₁ on cAMP concentration in cold nodule and hot nodule of thyroid adenomas

	No. of patient	Basal	TSH (10mU/ml)	PGE ₁ (5μg/ml)	TSH/Basal	PGE ₁ /Basal
Adenoma cold nodule	1.	0.39	4.14	1.29	10.6	3.3
	2.	0.29	7.30	1.48	25.2	5.1
	3.	0.76	7.78	1.40	10.2	1.8
	4.	0.38	2.75	4.08	7.2	10.7
	5.	0.19	2.27	0.57	11.9	3.0
	6.	0.20	2.80	0.53	14.0	2.7
	7.	0.36	4.66	1.15	12.9	3.2
	mean	0.37	4.53**	1.50*	13.1	4.3
	SE	0.07	0.84	0.45	2.2	1.1
hot nodule non toxic type	1.	0.06	0.38	0.56	6.3	9.3
	2.	0.24	2.15	1.04	9.0	4.3
	3.	0.24	0.45	3.67	1.9	15.3
	4.	0.21	1.42	1.66	6.8	7.9
	5.	0.38	1.70	3.98	4.5	10.5
	mean	0.23	1.22*	2.18*	5.7	9.5
	SE	0.05	0.35	0.69	1.2	1.8
toxic type	1.	0.69	0.83	11.80	1.2	17.1
	2.	0.81	0.80	6.21	1.0	7.7
	mean	0.75	0.82	9.00	1.1	12.4

p moles cAMP/mg wet weight

These values (mean±SE) were compared to basal levels : *P<0.05 **P<0.01

濃度を比較した (Fig. 4)。分化癌 (16例) では 0.34 ± 0.09 p moles/mg wet weight, 未分化癌 (4例) では 0.62 ± 0.28 p moles/mg, であり, 髄様癌 (2例) では 0.53 p moles/mg (平均値) であった。この結果, 分化癌にくらべ未分化癌で高値を示したが, 推計学的には有意差は認められなかった。

B 正常甲状腺および甲状腺腫瘍組織の TSH および PGE_1 に対する組織中 cAMP 濃度の変化

TSH 10mU/ml および PGE_1 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加に対する正常甲状腺および甲状腺腫瘍組織中の cAMP 濃度の変化を比較検討した。

1 正常甲状腺

正常甲状腺組織 8例では, basal 0.34 ± 0.06 p moles/mg wet weight であり, TSH 添加により 2.33 ± 0.47 p moles/mg と約 8.7倍 ($P < 0.01$) の増加がみられた。また, PGE_1 添加にても 2.31 ± 0.34 p moles/mg と約 9.2倍 ($P < 0.001$) の増加を示し, TSH とほぼ同程度の反応が得られた (Table 1)。

2 腺腫

腺腫は cold nodule と hot nodule に分けて検討した (Table 2)。Cold nodule を示した腺腫 7例では, basal 0.37 ± 0.07 p moles/mg wet weight であり, TSH 添加にて 4.53 ± 0.84 p moles/mg と約 13.1倍 ($P < 0.01$), PGE_1 添加にて 1.50 ± 0.45 p moles/mg と約 4.3倍 ($P < 0.05$) の反応が得られた。一方, hot nodule を示した腺腫では, 非中毒型の 5例では basal 0.23 ± 0.05 p moles/mg であり, TSH 添加にて 1.22 ± 0.35 p moles/mg と約 5.7倍に増加したが cold nodule にくらべ有意 ($P < 0.05$) に低反応であった。 PGE_1 添加では 2.18 ± 0.69 p moles/

mg と約 9.5倍に増加し, TSH とは逆に cold nodule にくらべ高反応を示した (N. S.)。中毒性腺腫の 2例では basal 0.75 p moles/mg (平均値) であり, TSH 添加で, 0.82 p moles/mg と約 1.1倍でほとんど増加を示さなかったが, PGE_1 添加では 9.00 p moles/mg と約 12.4倍と高い反応がみられた。中毒性腺腫と比較する目的で, バセドウ病甲状腺 5例の組織を用いて同様な実験を行った (Table 3)。これらの症例はすべて術前にメルカゾールを投与し, euthyroid になった時期に手術をしたが, ヨードは投与されていない。その成績は, basal 0.34 ± 0.07 p moles/mg wet weight であり, TSH 添加により 1.00 ± 0.20 p moles/mg と約 3.3倍 ($P < 0.05$), PGE_1 添加で 1.88 ± 0.25 p moles/mg と約 6.5倍 ($P < 0.01$) に増加した。

以上の成績を対照すなわち basal 値を 100% として TSH および PGE_1 に対する反応性を増加率すなわち,

$$\frac{\text{TSH または } \text{PGE}_1 \text{ 添加時の組織中 cAMP 量} \times 100}{\text{非添加時の組織中 cAMP 量}}$$

で現して比較検討すると, Fig. 5 のごとく, TSH に対する反応性は cold nodule を示す腺腫が最も高く, つぎに正常甲状腺, 非中毒型 (non toxic type) の hot nodule, およびバセドウ病甲状腺の順であった。とくに, 中毒性腺腫 (toxic type) では TSH に対しほとんど反応がみられず, バセドウ病甲状腺とも異なる成績を示した。一方, PGE_1 に対する反応性は, 中毒性腺腫で最も高く, 次いで非中毒型の hot nodule, 正常甲状腺, バセドウ病甲状腺および cold nodule の順であり, TSH に対する反応性とほぼ逆の関係を

Table 3. Effect of TSH and PGE_1 on cAMP concentration in Graves' disease

	No. of patient	Basal	TSH (10mU/ml)	PGE_1 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	TSH/Basal	$\text{PGE}_1/\text{Basal}$
Graves' disease	1.	0.36	0.61	1.76	1.7	4.9
	2.	0.59	1.17	1.57	2.0	2.7
	3.	0.24	1.51	1.23	6.3	5.1
	4.	0.21	0.48	2.67	2.3	12.7
	5.	0.31	1.24	2.15	4.0	6.9
	mean	0.34	1.00*	1.88**	3.3	6.5
	SE	0.07	0.20	0.25	0.9	1.7

p moles cAMP/mg wet weight

These values (mean \pm SE) were compared to basal levels : * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

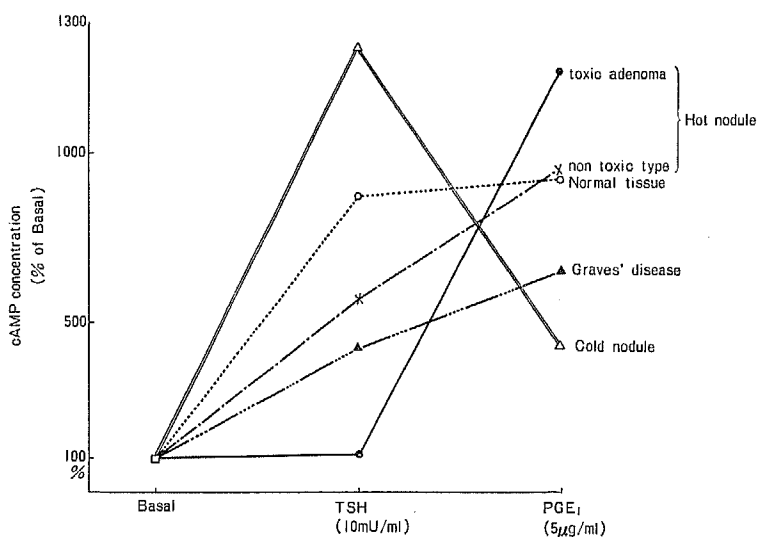


Fig. 5. Comparison of the effect of TSH and PGE_1 on cAMP concentration in various thyroid diseases

Table 4. Effect of TSH and PGE_1 on cAMP concentration in differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas and medullary carcinomas

	No. of patient	Basal	TSH (10mU/ml)	PGE_1 (5 μ g/ml)	TSH/Basal	PGE_1 /Basal
Differentiated carcinoma	1.	0.34	0.87	0.21	2.6	0.6
	2.	0.35	0.29	0.46	0.8	1.3
	3.	0.32	0.26	0.73	0.8	2.3
	4.	0.20	0.15	0.22	0.8	1.1
	5.	0.21	0.39	0.40	1.9	1.9
	6.	0.08	0.42	0.22	5.3	2.8
	mean	0.25	0.40	0.37	2.0	1.7
Undifferentiated carcinoma	1.	0.33	0.34	0.41	1.0	1.2
	2.	0.43	0.38	0.44	0.9	1.0
	mean	0.38	0.36	0.43	1.0	1.1
Medullary carcinoma	1.	0.20	0.15	0.39	0.8	2.0
	2.	0.36	0.42	0.22	1.2	0.6
	mean	0.28	0.29	0.31	1.0	1.3

p moles cAMP/mg wet weight

示す。

3 甲状腺癌

甲状腺癌の TSH および PGE_1 に対する反応性は、組織型により異なる成績を示す (Table 4)。分化癌の 6 例では、basal 0.25 ± 0.04 p moles/mg wet

weight であり、TSH 添加により 0.40 ± 0.10 p moles/mg と約 2.0 倍の増加がみられ (N. S.)、 PGE_1 添加で 0.37 ± 0.08 p moles/mg と約 1.7 倍に増加した (N. S.)。一方、未分化癌の 2 例では、basal 0.38 p moles/mg (平均値) で、TSH 添加に

Table 5. Effect of TSH, PGE₁ and NaF on adenylate cyclase activity in normal thyroid tissues

	No. of patient	Basal	TSH (10mU/ml)	PGE ₁ (5μg/ml)	NaF (10 ⁻² M)	TSH/Basal	PGE ₁ /Basal
Normal tissue	1.	0.13	0.38	0.29	0.51	2.9	2.2
	2.	0.03	0.21	0.08	0.31	7.0	2.7
	3.	0.06	0.72	0.08	1.08	12.0	1.3
	4.	0.06	0.53	0.29	0.51	8.8	4.8
	5.	0.05	0.29	0.05	0.41	5.8	1.0
	6.	0.03	0.09	0.03	0.07	3.0	1.0
	7.	0.13	0.87	0.17	1.01	6.7	1.3
	8.	0.07	0.29	0.10	0.50	4.1	1.4
	9.	0.04	0.17	0.07	0.16	4.3	1.8
	10.	0.08	0.15	0.08	0.21	1.9	1.0
	mean	0.07	0.37***	0.12	0.48*	5.7	1.9
	SE	0.01	0.08	0.03	0.11	1.0	0.4

n moles cAMP generated/mg protein/10min.

These values (mean±SE) were compared to basal levels: ***P<0.001 *P<0.05

て 0.36 p moles/mg, PGE₁ 添加で 0.43 p moles/mg とまったく反応を示さなかった。また、髄様癌の 2 例も, basal 0.28 p moles/mg, TSH 添加にて 0.29 p moles/mg, PGE₁ 添加で 0.31 p moles/mg と反応を示さなかった。

C 正常甲状腺および甲状腺腫瘍組織の adenylate cyclase 活性

1 正常甲状腺および腫瘍組織の TSH, PGE₁ および NaF に対する adenylate cyclase 活性の変化

Crude な plasma membrane を用い, これに TSH 10mU/ml, PGE₁ 5μg/ml, および NaF 10⁻² M を添加しての各種甲状腺組織の adenylate cyclase 活性を比較検討した。

(a) 正常甲状腺

正常甲状腺組織 10 例では, basal 0.07±0.01 n moles cAMP generated/mg protein/10min であり, TSH 添加にて, 0.37±0.08 n moles/mg と約 5.7 倍の増加が認められた (P<0.001)。しかし, PGE₁ 添加では 0.12±0.03 n moles/mg と約 1.9 倍 (N. S.) の上昇しかみられず, 組織切片を用いての組織中 cAMP 濃度の変化をみた時のような高反応は認められなかった。NaF はどの細胞の adenylate cyclase も非特異的に活性化するが, 正常甲状腺組織では, 0.48±0.11 n moles/mg, 約 6.9 倍 (P<0.05) の活

性がみられた (Table 5)。

(b) 腺腫

組織中 cAMP 濃度の実験と同様に cold nodule と hot nodule に分け比較検討した。cold nodule を示した腺腫 6 例では, basal 0.09±0.02 n moles cAMP generated/mg protein/10 min であり, TSH 添加により, 2.05±0.63 n moles/mg, 約 23.7 倍 (P<0.05) の高反応を示した。PGE₁ 添加では 0.12±0.03 n moles/mg と約 1.3 倍 (N. S.) の低反応であった。NaF 添加では 14.1 倍 (P<0.05) の反応が得られた。一方, hot nodule のうち非中毒型の腺腫 5 例では, basal 0.06±0.02 n moles cAMP generated/mg protein/10min であり, TSH 添加にて 0.39±0.11 n moles/mg と約 7.1 倍 (P<0.05) の上昇がみられたが, cold nodule にくらべて有意に低く (P<0.02) 組織中 cAMP 濃度の変化と同じ結果が得られた。PGE₁ 添加では 0.07±0.02 n moles/mg と約 1.4 倍であり, cold nodule と同じように低反応を示した。NaF 添加では 5.3 倍 (P<0.05) の反応が得られた。中毒性腺腫は 1 例のみであるが, basal 0.09 n moles cAMP generated/mg protein/10 min であり, TSH 添加により, 1.67 n moles/mg と約 18.6 倍と高反応が認められ, 組織切片を使用しての組織中 cAMP 濃度の変化の成績と著しく異なる結果が得られた。PGE₁ 添加では 0.19 n moles/

Table 6. Effect of TSH, PGE₁ and NaF on adenylate cyclase activity in cold nodule and hot nodule of thyroid adenomas

	No. of patient	Basal	TSH (10mU/ml)	PGE ₁ (5μg/ml)	NaF (10 ⁻³ M)	TSH/Basal	PGE ₁ /Basal
Adenoma cold nodule	1.	0.02	0.70	0.03	0.51	35.0	1.5
	2.	0.18	4.65	0.27	2.96	25.8	1.5
	3.	0.08	2.02	0.09	1.12	25.3	1.1
	4.	0.09	0.71	0.09	0.30	7.9	1.0
	5.	0.06	1.28	0.07	0.95	21.3	1.2
	6.	0.11	2.96	0.14	1.75	26.9	1.3
	mean	0.09	2.05*	0.12	1.27*	23.7	1.3
	SE	0.02	0.63	0.03	0.40	3.7	0.1
hot nodule non toxic type	1.	0.05	0.30	0.08	0.20	6.0	1.6
	2.	0.02	0.12	0.04	0.23	6.0	2.0
	3.	0.06	0.63	0.05	0.42	10.5	0.9
	4.	0.12	0.66	0.17	0.64	5.5	1.4
	5.	0.03	0.22	0.03	0.10	7.3	1.0
	mean	0.06	0.39*	0.07	0.32*	7.1	1.4
	SE	0.02	0.11	0.03	0.10	0.9	0.2
toxic type	1.	0.09	1.67	0.19	1.01	18.6	2.1

n moles cAMP generated/mg protein/10min.

These values (mean±SE) were compared to basal levels : *P<0.05

Table 7. Effect of TSH, PGE₁ and NaF on adenylate cyclase activity in differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas

	No. of patient	Basal	TSH (10mU/ml)	PGE ₁ (5μg/ml)	NaF (10 ⁻³ M)	TSH/Basal	PGE ₁ /Basal
Differentiated carcinoma	1.	0.13	0.24	0.03	0.33	1.8	0.2
	2.	0.07	0.35	0.08	0.27	5.0	1.1
	3.	0.09	0.31	0.14	0.64	3.4	1.6
	4.	0.09	0.17	0.09	0.34	1.9	1.0
	5.	0.14	0.18	0.10	0.17	1.3	0.7
	6.	0.08	0.11	0.12	0.10	1.4	1.5
	7.	0.21	0.53	0.22	0.26	2.5	1.0
	mean	0.12	0.27*	0.11	0.30*	2.5	1.0
	SE	0.02	0.05	0.02	0.07	0.5	0.2
Undifferentiated carcinoma	1.	0.15	0.16	0.14	0.33	1.1	0.9
	2.	0.07	0.07	0.07	0.23	1.0	1.0
	3.	0.04	0.04	0.03	0.13	1.0	0.8
	mean	0.09	0.09	0.08	0.23	1.0	0.9
	SE	0.03	0.04	0.03	0.06	0.1	0.1

n moles cAMP generated/mg protein/10min.

These values (mean±SE) were compared to basal levels : *P<0.05

mg と約2.1倍の上昇がみられ、NaF 添加では11.2倍であった (Table 6)。

(c) 甲状腺腫瘍

分化癌と未分化癌に分けて検討すると、分化癌の7例では basal 0.12 ± 0.02 n moles cAMP generated/mg protein/10 min であり、TSH 添加により 0.27 ± 0.05 n moles/mg と約2.5倍 ($P < 0.05$) の上昇が認められ、軽度ではあるが全症例で TSH に対する反応がみられた。PGE₁ 添加では、 0.11 ± 0.02 n moles/mg と反応がみられなかった。NaF 添加では2.5倍 ($P < 0.05$) の上昇が得られた。一方、未分化癌の3例では、basal 0.09 n moles cAMP generated/mg protein/10 min であり、TSH 添加にて 0.09 ± 0.04 n moles/mg、1.0倍とまったく反応が認められなかった。PGE₁ 添加にて 0.08 ± 0.03 n moles/mg、0.9倍と TSH と同様に無反応であった。NaF 添加では2.0倍の上昇が認められた (Table 7)。

2 正常甲状腺および甲状腺腫瘍組織における adenylate cyclase 活性と TSH 濃度との関係 adenylate cyclase 活性値の basal 値を100%と

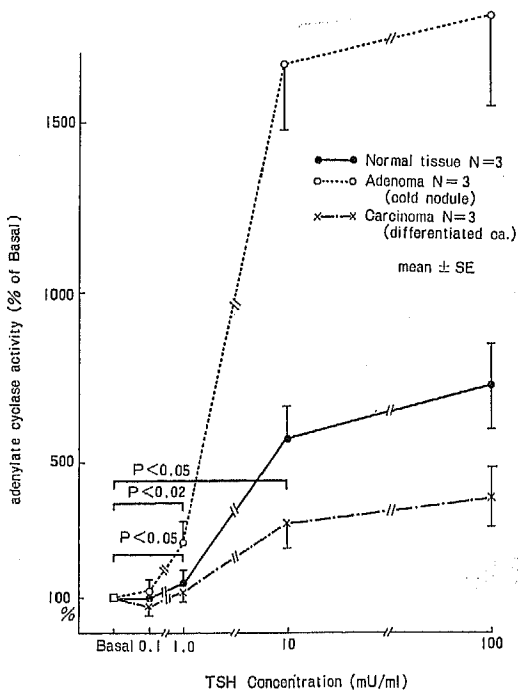


Fig. 6. TSH dose-response curve of adenylate cyclase activity in normal thyroid tissues and thyroid tumor tissues

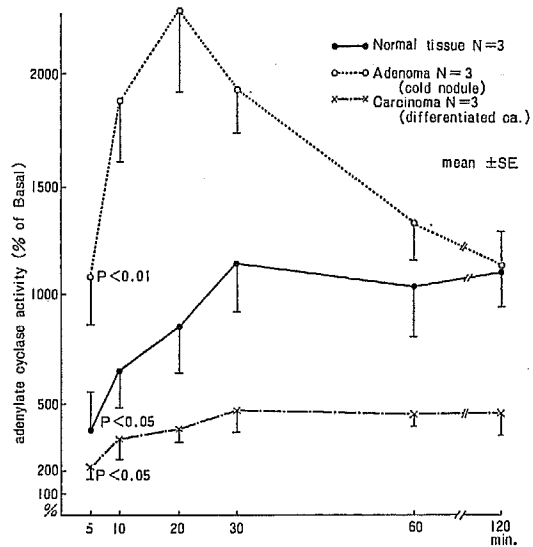


Fig. 7. Time course of adenylate cyclase activity in normal thyroid tissues and thyroid tumor tissues after addition of 10mU/ml of TSH

し、

$$\frac{\text{TSH 添加時の adenylate cyclase 活性}}{\text{Basal な adenylate cyclase 活性}} \times 100$$

として表すと (Fig. 6), 正常甲状腺では、TSH 1mU/ml 添加ですでに adenylate cyclase 活性の有意 ($P < 0.05$) の上昇が認められ、TSH 100mU/ml の範囲で良好な dose response curve が得られた。腺腫では、正常甲状腺より TSH に対する adenylate cyclase 活性の上昇が著しく、TSH 1mU/ml で有意 ($P < 0.02$) の上昇が認められ、TSH 100mU/ml の範囲で正常甲状腺以上の反応を示した。一方、甲状腺癌 (乳頭癌) では、TSH に対する反応が低く、TSH 10mU/ml ではじめて有意 ($P < 0.05$) の上昇が認められた。

3 正常甲状腺および甲状腺腫瘍組織における TSH 10mU/ml 添加に対する adenylate cyclase 活性変動の時間的経過

TSH 10mU/ml 添加に対する adenylate cyclase 活性変動の incubation 時間との関係を見ると (Fig. 7), 正常甲状腺では TSH 添加後5分ですでに adenylate cyclase 活性の有意 ($P < 0.05$) の上昇を認め、30分でほぼ maximum に達した。腺腫では5分ですでに高い反応 ($P < 0.01$) が認められ、20分で maximum に達し、以後徐々に減少する傾向を示し

Table 8. Effect of various hormones on adenylate cyclase activity in normal thyroid tissues and thyroid tumor tissues

Addition	Concentration	Adenylate cyclase activity		
		Normal tissue N=3	Adenoma N=3 (cold nodule)	Carcinoma N=3 (differentiated ca.)
Basal		0.07 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.14 ± 0.04
TSH	10mU/ml	0.56 ± 0.18	1.74 ± 0.64	0.38 ± 0.12
PGE ₁	5ug/ml	0.13 ± 0.04	0.12 ± 0.04	0.13 ± 0.02
GH	200mμg/ml	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.01
FSH	100mIU/ml	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.02
HCG	50IU/ml	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.14 ± 0.05
LH	100mIU/ml	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.12 ± 0.04
Calcitonin	3MRC IU/ml	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.10 ± 0.04
NaF	10 ⁻² M	0.48 ± 0.18	1.27 ± 0.36	0.27 ± 0.08

n moles cAMP generated/mg protein/10min, mean ± SE

Table 9. Phosphodiesterase activity of various thyroid diseases

	phosphodiesterase activity	
	cyclicAMP 1×10^{-4} M (n moles hydrolysed/mg/5min.)	cyclicAMP 1.25×10^{-7} M (p moles hydrolysed/mg/5min.)
Normal tissue N=5	2.15±0.06	11.11±0.65
Adenoma cold nodule N=4	2.68±0.12* (125%)	26.80±5.76 (241%)
Hot nodule non toxic type N=4	2.54±0.20 (118%)	32.55±5.73* (293%)
toxic type N=2	3.26 (152%)	47.31 (426%)
Carcinoma (differentiated ca.) N=3	2.12±0.13 (99%)	13.11±3.05 (118%)
Graves' disease N=4	2.78±0.48 (129%)	34.90±7.88* (314%)

() shows % increase to normal tissue mean ± SE

These values (mean + SE) were compared to normal tissues : *P<0.05

た。また、癌（乳頭癌）でも5分で有意（ $P<0.05$ ）の上昇が認められ、約30分で maximum に達するが、その反応は正常甲状腺および腺腫に比較し最も低い。

4 正常甲状腺および甲状腺腫瘍組織の adenylate cyclase 活性に及ぼすその他のホルモンの影響

TSH, PGE₁ 以外のホルモンとして, growth hormone (GH), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), human chorionic gonadotropin (HCG), および calcitonin などを添加した時の adenylate cyclase 活性の変化を検討した (Table 8)。正常甲状腺では, HCG に対し軽度の活性を示す傾向が認められたが (N. S.), その他のホルモンに対しすべて反応がみられなかった。ま

た, 腺腫 (cold nodule), 癌 (分化癌) とともに, いずれのホルモンに対してもまったく無反応であった。

D 正常甲状腺および甲状腺腫瘍組織の phosphodiesterase 活性 (Table 9)。

正常甲状腺では, cAMP 濃度 1×10^{-4} M (high Km) で 2.15 n moles hydrolysed/mg tissue/5min, 1.25×10^{-7} M (low Km) で 11.11 p moles hydrolysed/mg tissue/5min. の活性を示した。腺腫においては, cold nodule では正常甲状腺のそれぞれ125%, 241%であり, 非中毒型の hot nodule では118%, 293%と高値を示し, 特に中毒性腺腫では, 正常甲状腺の152%, 426%と最も PDE 活性が高かった。中毒性腺腫と比較する意味でバセドウ病甲状腺の

PDE 活性を測定したが³, 正常甲状腺の129%, 314%でやはり高値を示した。癌(乳頭癌)ではいずれも正常甲状腺と同じ PDE 活性を示した。

IV 考 察

cAMP は、1958年 Sutherland と Rall¹⁹⁾²⁰⁾によって発見されて以来、多くの peptide hormone、小分子の catecholamine, indoleamine などの second messenger として細胞内でホルモン作用をあらわすものとして研究がすすめられてきた²¹⁾。cAMP は ATP から Mg^{+} の存在下に adenylylase cyclase により生成され、phosphodiesterase により分解され、5'AMP となり不活化される。したがって、細胞内の cAMP 濃度は両酵素の活性と、ATP の供給により規定される。上記のホルモン作用はそのレセプターが adenylylase cyclase と直結しているので現在のところ、adenylylase cyclase の活性化が細胞内 cAMP 濃度を高め、作用を出現せしめる主要な機構とされている。

腫瘍組織の cAMP 濃度に関しては、未だ一定の見解がえられていない。Otten ら²²⁾は培養系の fibroblast を用い、細胞の増殖の速さを細胞数の増加時間(doubling time)としてあらわすと、増加時間の長いもの(増殖のおそいもの)ほど cAMP 濃度が高いという相関性を見出し、細胞の増殖率と cAMP 濃度は逆の関係を示すと報告している。しかし、このような *in vitro* の成績に反し、多くの研究者により、腫瘍組織中の cAMP 濃度が正常組織にくらべ高値を示すことが指摘された。すなわち、Butcher ら²³⁾は、Morris の肝癌を用い、Ney ら²⁴⁾は副腎腫瘍で、Chayoth ら²⁵⁾は ethionine によるラット肝癌を用い、いずれも正常組織にくらべ腫瘍組織中の cAMP 濃度が高値を示したと報告し、*in vivo* では Otten ら²²⁾の説に矛盾していることが指摘された。

ヒト甲状腺腫瘍組織の basal な cAMP 濃度に関しては、多くの研究者によりすでに報告されているが、それぞれ測定条件ならびに測定値が多少異なっている。すなわち、Knox ら²⁶⁾、Valenta²⁷⁾はヒト甲状腺の組織中 cAMP 濃度を摘出後すみやかに凍結した組織を用いて測定しているし、De Rubertis ら⁷⁾は 20分 incubate した後のものを測定している。Thomas-Morvan²⁸⁾によると、30~60分の preincubation により、cAMP 濃度は摘出後数分以内で凍結した組織にくらべ20~50%減少しているとし、Van

Sande と Dumont²⁹⁾も同様な報告をしている。D'Armiento と Monako³⁰⁾はラットに移植した甲状腺腫瘍では、組織中 cAMP 濃度が低いとしているが、Valenta²⁷⁾、Field ら⁸⁾はヒト甲状腺では腫瘍中の cAMP 濃度が正常甲状腺にくらべ高いと報告している。Thomas-Morvan²⁸⁾もヒト甲状腺では、著腫では正常甲状腺とほとんど差がないが、癌では明らかに正常甲状腺より高値を示したと報告している。著者の研究では、測定条件を一定にするためドライアイスアセトンを用い、すべて摘出後1分以内に凍結した組織を用いた。この結果、甲状腺腫瘍の組織中 cAMP 濃度は正常甲状腺にくらべ有意に高値を示したが、腺腫と癌では差がみられなかった。腺腫ではさらに各組織型に分けて比較したが差はみられず、また cold nodule と hot nodule に分けて比較したがやはり両者の差は認められなかった。Hot nodule を示す腺腫の組織中 cAMP 濃度についての報告は少なく、Larsen ら³¹⁾は1例の中毒性腺腫で cold nodule の腺腫にくらべ低値を示したと報告している。さらに、癌も組織型に分け比較したが、未分化なもののほど組織中 cAMP 濃度が高値を示す傾向であったが少数例であるため有意差はみられなかった。

TSH 添加により甲状腺組織内の cAMP 濃度が増加することは、Gilman と Rall³²⁾、Kaneko ら³³⁾によって、ウシならびにイヌの甲状腺切片を用いた実験で認められた。また Klainer ら³⁴⁾および Pastan と Katzen³⁵⁾は、TSH がヒツジならびにウシ甲状腺 homogenate の adenylylase cyclase 活性を上昇させることを明らかにし、同時に甲状腺内の PDE に対しては影響をおよぼさないことを報告した。また宮井ら³⁶⁾によりヒト甲状腺においても同様な成績が報告された。ヒト甲状腺腫瘍の adenylylase cyclase-cAMP 系に対する TSH の影響をみたものは比較的少なく、特に組織中 cAMP 濃度および adenylylase cyclase 活性の変化の両方を検討したものはわずかである。使用した TSH 濃度は、諸家により多小異なり、Field ら⁸⁾は 1mU/ml と 10mU/ml、De Rubertis ら⁷⁾は 5mU/ml と 50mU/ml を用い、また Thomas-Morvan²⁸⁾は 50mU/ml と高濃度の TSH を用いている。著者の TSH 濃度は 10mU/ml を使用したが、adenylylase cyclase 活性と TSH 濃度との関係を検討した成績で、TSH 10mU/ml 添加にて、正常甲状腺および甲状腺腫瘍組織のいずれも無添加にくらべ有意の上昇がみられた。また TSH 濃度が 1mU/ml~100

mU/ml の範囲でいずれの組織も良好な dose response curve が得られた。また、TSH 10mU/ml 添加に対する各組織の時間的経過の比較では、いずれも 5 分の incubation で有意に上昇し、20~30 分で最高値に達し、以後は減少する傾向を示し、TSH の作用は非常に早期より発揮されるものと思われた。

TSH 10mU/ml 添加にて正常甲状腺では、cAMP 濃度および adenylate cyclase 活性がそれぞれ、basal の 8.7 倍、5.7 倍に上昇した。一方、腺腫では、特に¹³¹I シンテグラムで cold nodule を示した例で、TSH 添加に対し cAMP 濃度ならびに adenylate cyclase 活性が高値を示し、正常甲状腺にくらべ有意 ($P < 0.05$) の上昇を示した。しかし、De Rubertis ら⁷⁾はヒト正常甲状腺と腺腫を比較し、おのおの basal に対し有意な上昇がみられ、腺腫では正常甲状腺にくらべ TSH に対する反応が大きい傾向を示したが、両者の間に有意の差が見られなかったとし、また、Thomas-Morvan²⁸⁾は正常甲状腺と腺腫ではほぼ同じ反応を示したと報告し、著者の成績と異なった。これにくらべ、hot nodule を示した腺腫では、TSH に対する反応が低く、非中毒型では cAMP 濃度、adenylate cyclase 活性とも cold nodule にくらべ低反応であった ($P < 0.05$)。また、中毒性腺腫では組織中 cAMP 濃度は TSH 添加にてほとんど上昇せず、一見 TSH に非依存性の腫瘍を思わせたが、adenylate cyclase 活性では TSH に対し高反応を示し、TSH に対するレセプターの存在を唆させ、やはり cold nodule と同様に TSH 依存性の腫瘍であろうと考えられた。Larsen ら³¹⁾は 2 例の hot nodule (中毒型、非中毒型各 1 例) の TSH に対する cAMP 濃度ならびに adenylate cyclase 活性を測定し、いずれも cold nodule と同じ程度の上昇が見られたとし、また Sand ら³⁷⁾は 5 例の hot nodule を検討し、TSH に対する adenylate cyclase 活性は、正常甲状腺、癌とほぼ同程度の上昇が得られたと報告している。以上より TSH による adenylate cyclase~cAMP 系の活性化は、程度の差はあるが cold nodule および hot nodule のいずれでもみられ、ヨードの取り込み、甲状腺ホルモンの産生の有無は TSH に対するレセプターの異常ではなく、cAMP 産生以後のヨード代謝の異常によるものと考えられた。

甲状腺癌では、組織型により TSH に対する反応が異なる成績を得た。すなわち、組織中 cAMP 濃度の

変動をみた成績では、分化癌の 6 例で basal の 2.0 倍の上昇を認めた。しかし、このうち 3 例 (50%) で TSH に対し全く反応がみられず、また未分化癌 (2 例)、髄様癌 (2 例) でも全く無反応であった。このことは Thomas-Morvan²⁸⁾も同様な報告をしており、彼らは 10 例の甲状腺癌を検討し、TSH (50mU/ml) 添加で basal にくらべ有意の差が認められたが、このうち 2 例の未分化癌と、8 例の分化癌のうち 4 例 (50%) に TSH に対する反応が認められなかったと報告している。一方、adenylate cyclase 活性よりみた TSH の甲状腺癌に対する著者の成績は、組織中 cAMP 濃度の変動の成績と多少異なり、分化癌ではすべて TSH 10mU/ml 添加により、adenylate cyclase 活性の軽度上昇がみられ、basal と有意の差が認められた。しかし、正常甲状腺にくらべその反応性は有意に低下している ($P < 0.05$)。未分化癌の 3 例ではいずれも無反応であり、TSH に対する依存性はなく、その増殖などは TSH の影響を受けないものと考えられる。このように、TSH が甲状腺癌の adenylate cyclase 活性に影響を及ぼすことは Field ら⁸⁾によっても報告され、彼らは甲状腺癌と隣接正常甲状腺を比較し、TSH (1mU/ml) 添加に対する adenylate cyclase 活性ではほとんど同じ活性が得られたとし、Sand ら³⁷⁾も同様な成績を報告している。また Orgiazzi ら³⁸⁾も分化癌では TSH により adenylate cyclase 活性の上昇が認められるが、未分化癌 (2 例) では無反応であると報告し、著者の成績と一致した。

In vitro において、このように甲状腺腫瘍、特に腺腫で TSH に対し著明な反応が認められたことは、これら腫瘍が甲状腺濾胞細胞起源であり、そしてホルモン産生能を有していると考えられ、さらに濾胞細胞起源の甲状腺悪性腫瘍の増殖も、TSH に対し依存性を残していると考えられた。Thomas⁴⁵⁾、Dobyns³⁹⁾らは乳頭癌、濾胞癌などの比較的分化した型の甲状腺癌においては、甲状腺ホルモンの投与により、TSH の分泌を抑制すれば転移の発育抑制に効果を示すが、未分化癌においては効果を期待することはできないと述べており、このような臨床的成績は、著者の行った *in vitro* の実験結果と同一の傾向を示すものである。甲状腺髄様癌は parafollicular cell 起源でありカルシトニンを分泌し、TSH とは無関係と推測されるが、著者の行った 2 例の髄様癌症例でも、TSH 依存性は認められなかった。

TSH 以外のホルモンで甲状腺の adenylate cy-

clase を活性化して、cAMP 濃度を上昇させるものとして Prostaglandin (PG) が知られている。これは甲状腺スライスまたは甲状腺 homogenate で adenylate cyclase-cAMP 系の活性化⁹⁾、Glucose oxidation の促進⁹⁾¹⁰⁾⁴⁰⁾、形態学的には colloid droplet 形成の促進作用を示し⁴¹⁾、また、Ahn と Rosenberg⁴²⁾は PG が *in vitro* で甲状腺ホルモンの合成、特にヨードの有機化、ヨード化サイロニン合成を促進すると報告し、TSH と類似の作用を示すことが知られているが、一般に TSH と比較してその作用効果は弱いとされている。PG の種々の compounds 中、作用効果の程度は PGE が最も強いとされている⁴³⁾。PG の甲状腺に対する生理的役割は未だ明らかにされておらず、TSH との関係についてみても、未だ統一の見解はない。Burke ら⁴³⁾は PG が TSH 様作用を示すことから、PG は TSH とその second messenger である adenylate cyclase-cAMP 系の間をさらに intermediate する細胞内因子であると考えた推論を報告した。しかし、この説に対する反論は多く⁴⁴⁾⁴⁵⁾、Sato ら⁴⁶⁾も TSH の adenylate cyclase 活性化には PG は必ずしも必要としないと報告し、また高須と山田⁴⁷⁾は、両者は主として異なるレセプターを通じて、しかも異なる compartment の adenylate cyclase-cAMP 系を促進する可能性を推論している。

ヒト甲状腺腫瘍を用いて、PGE₁ の影響を報告したものは少ない。Sand ら³⁷⁾は、正常甲状腺、hot nodule および癌に PGE₁ 5 μ g/ml を添加して adenylate cyclase 活性を検討し、特に hot nodule の adenylate cyclase 活性が非常に高い値を示し、PGE₁ がこの hot nodule の病因に何らかの役割を演じているのではないかと示唆している。著者の成績では、正常甲状腺で PGE₁ 5 μ g/ml 添加にて組織中 cAMP 濃度は約9.2倍と TSH とほぼ同程度の上昇を認めた。しかし、plasma membrane を使用しての adenylate cyclase 活性は組織切片を用いての実験のような反応はみられなかった。腺腫では、cold nodule で組織中 cAMP 濃度は正常甲状腺にくらべ低反応であったが、hot nodule では高く、特に中毒性腺腫では高値を示した。さらに、バセドウ病甲状腺でも PGE₁ により高い反応が得られたことより、hot nodule やバセドウ病の病因に PGE₁ が何らかの関係をもつものと推測される。しかし、adenylate cyclase 活性に対しては正常甲状腺の場合と同じようには

とんど反応がみられなかった。甲状腺癌では PGE₁ 添加にて組織中 cAMP 濃度、adenylate cyclase 活性のいずれに対しても basal と有意の上昇を認めなかった。Plasma membrane を使用しての PGE₁ 添加に対する adenylate cyclase 活性が各組織でほとんど無反応であったことに関して、佐藤と山田⁴⁸⁾も牛甲状腺の plasma membrane を使用した実験で、PGE₂ により adenylate cyclase 活性を認めず、PGE₂ は intact な cell の adenylate cyclase 活性は刺激するが、broken cell の adenylate cyclase 活性はほとんど刺激しなかったと報告し、その原因として plasma membrane の分離過程で、PGE₂ の receptor site が失活した可能性があるとしている。Homogenate では adenylate cyclase 活性が保たれていることなどから、homogenate 中では存在するなんらかの cofactor が plasma membrane の分離中に除去されるので、plasma membrane を用いた際には PGE₂ の adenylate cyclase 活性がおこらなかったと述べている。これらのことより、甲状腺腫瘍においても、PGE の receptor が存在するが、TSH の receptor とは異なっていると考えられる。

以上のような TSH、PGE₁ などのペプチドホルモンは膜レセプターに結合し、cAMP を介してそのホルモン作用を発揮するのであるが、この場合膜レセプターは、ある組織ではある特定のホルモンを識別し、そのホルモンのみを選択的に結合するという特異性を有している。しかし、Ney ら²⁴⁾は内分泌腺腫瘍、なかでも機能性内分泌腺腫では、この膜面レセプターの特異性が失われている事実を観察し、これが腫瘍の自律性ホルモン分泌の原因ではないかと推論している。Schorr ら⁴⁹⁾は濾胞癌で TSH 以外に正常組織と異なり、LH によっても腫瘍の adenylate cyclase が活性化されることを報告している。阿部ら⁵⁰⁾は、甲状腺癌において HCG、FSH、ACTH、insulin および epinephrine を添加しての adenylate cyclase 活性について検討したが、いずれも活性をみなかったと報告している。著者も GH、FSH、HCG、LH、calcitonin などを添加しての adenylate cyclase 活性を測定したが、正常甲状腺で HCG に対し軽度活性が認められた程度で、腫瘍組織ではいずれのホルモンに対しても adenylate cyclase 活性の上昇はみられず今回検討したホルモンでは TSH と PGE₁ のみであった。

腫瘍における PDE 活性をみたものとして、Rhoads ら⁵¹⁾は Morris の肝癌の 7 例で測定し、腫瘍中の PDE 活性は、正常組織にくらべ 60% 以下に減少していると報告している。また Clark ら⁵²⁾は、肝癌では high Km の PDE は、正常組織にくらべ減少し、low Km の PDE 活性は上昇していると報告している。Scharm⁵³⁾はラットの正常副腎と副腎腫瘍を比較し、副腎腫瘍では PDE 活性が明らかに低いとしている。ヒト甲状腺腫瘍を用いて PDE 活性を検討した報告は少ないが、日高と長坂⁵⁴⁾は、10% 甲状腺 homogenate 中の cAMP-PDE 活性は、低濃度の基質 (0.4 μ M) を用いた場合、甲状腺機能亢進症、甲状腺腺腫および甲状腺癌とも正常甲状腺にくらべ高値を示し、甲状腺癌でもっとも高く、高濃度の基質 (1.0 mM) を用いた場合では、甲状腺機能亢進症で高値がみられた。また、ヒト甲状腺 105,000 \times g 上清を用いて甲状腺疾患の PDE 活性の変動をみても、甲状腺 homogenate と同じ傾向を認めたと報告している。著者の成績では、正常甲状腺にくらべ PDE 活性は腺腫で高く、癌ではほとんど同程度であった。腺腫の中では特に中毒性腺腫で high Km, low Km, とともに高く、またバセドウ病甲状腺でも高いことなどから、これら疾患では細胞内の代謝がさかんであることが考えられた。この成績は、組織切片を用いての TSH に対する組織中 cAMP 濃度の反応性の成績で、中毒性腺腫が TSH に対しほとんど反応がみられなかった事実と関連があるものごとく、PDE 阻害剤であるテオフィリンが入っているにもかかわらず、高い PDE 活性により、産生された cAMP の分解も高まり、一見 TSH に対し無反応のごとくみえるのではないかと考えられ、また adenylate cyclase の実験では、broken cell のためテオフィリンの効果も十分であり、また incubation time が短いことなどより TSH に対し高反応がみられたのではないかと推測された。

V 結 語

著者は甲状腺腫瘍におけるホルモン依存性の研究を、主に adenylate cyclase-cAMP 系より検討し次の結論を得た。

1 甲状腺腫瘍の細胞膜においても、正常甲状腺と同様に TSH レセプターの存在が示唆され、甲状腺腫瘍の増殖および分化に TSH がレセプターを介して作用していると考えられた。

2 Hot nodule および cold nodule を示した腺

腫のいずれも TSH に対し反応がみられ、ヨードの取り込みおよび甲状腺ホルモン産生の有無などは、TSH に対するレセプターの異常ではなく、cAMP 産生以後のヨード代謝の異常によるものと考えられた。

3 腺腫では、正常甲状腺にくらべ、組織中 cAMP 濃度が高値を示し、TSH に対する反応性、また PDE 活性も高く、また hot nodule を示す腺腫では、特に PDE 活性が高く、これら腫瘍の細胞内代謝は非常にすみやかに行われていると考えられた。

4 PDE_i も TSH と同様に甲状腺腫瘍に対し影響を及ぼすと考えられたが、その作用機序は未だはっきりしない。特に hot nodule を示す腺腫やバセドウ病の病因などに何らかの影響を与えるものと推測された。

5 癌では、分化癌において腺腫よりは低いが、TSH 依存性が認められた。しかし、未分化癌および髓様癌では TSH に対する依存性がなく、その増殖および分化などは TSH の影響をうけないものと考えられた。

本論文の要旨は第50回 (1977年 5 月)、第51回 (1978年 6 月)、および第52回 (1979年 6 月) 日本内分泌学会総会において発表した。

稿を終わるに臨み、本研究に対して懇篤な御指導をいただいた信州大学医学部附属順応医学研究施設内分沁内科学教室山田隆司教授ならびに同教室の御指導をいただいた諸先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kirschner, M. A. : The role of hormones in the etiology of human breast cancer. *Cancer*, 39: 2716-2726, 1977
- 2) 竹内弘幸 : 進行性前立腺癌の抗男性ホルモン療法、とくにその延命効果。癌の臨, 19: 456-462, 1973
- 3) Gallagher, T. F., Kappas, A., Spencer, H. and Lazzio, D. : Influence of invasiveness, hormones and amphenone on steroids in adrenal carcinoma. *Science*, 124: 487-489, 1956
- 4) Thomas, C. G. : Hormonal treatment of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 17: 232-237, 1957
- 5) Thomas, C. G. : The dependency of thyroid cancer. *Ann Surg*, 146: 879-891, 1957

- 6) Macchia, V., Meldolesi, M. F. and Chiarriello, M. : Adenyl-cyclase in a transplantable thyroid tumor, loss of ability to respond to TSH. *Endocrinology*, 90 : 1483-1491, 1972
- 7) De Rubertis, F. R., Yamashita, K., Dekker, A., Larsen, P. R. and Field, J.B. : Effects of thyroid-stimulating hormone on adenyl cyclase activity and intermediary metabolism of cold thyroid nodules and normal human thyroid tissue. *J Clin Invest*, 51 : 1109-1117, 1972
- 8) Field, J. B., Bloom, G., Chou, C. Y., Kerins, M. E., Larsen, P. R., Kotani, M., Kariya, T. and Dekker, A. : Effects of thyroid-stimulating hormone on human thyroid carcinoma and adjacent normal tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, 47 : 1052-1058, 1978
- 9) Zor, U., Kaneko, T., Lowe, I. P., Bloom, G. and Field, J. B. : Effect of thyroid-stimulating hormone and prostaglandins on thyroid adenyl cyclase activation and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *J Biol Chem*, 244 : 5189-5195, 1969
- 10) Burke, G., : Effects of prostaglandins on basal and stimulated thyroid function. *Am J Physiol*, 218 : 1445-1452, 1970
- 11) 佐藤和雄, 坂元正一 : Cyclic AMP とプロスタグランジン, 医学のあゆみ, 81 : 269-278, 1972
- 12) 甲状腺外科検討会編 : 外科・病理甲状腺癌取扱い規約, 金原出版第1版 : 12-16, 1977
- 13) 岩浅武彦 : 過機能性甲状腺結節に関する臨床的, 内分泌学的ならびに形態学的研究. 信州医誌, 28 : 390-411, 1980
- 14) Gilman, A. G. : A protein binding assay for Adenosine 3', 5'-Cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 67 : 305-312, 1970
- 15) Miyamoto, E., Kuo, J. F. and Greengard, P. : Cyclic nucleotide dependent protein kinases 111 Purification and properties of adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine brain. *J Biol Chem*, 244 : 6395-6402, 1969
- 16) Appleman, M. M., Birnbaumer, L. and Torres, H. N. : Factors affecting the activity of muscle glycogen synthetase 111. The reaction with adenosine triphosphate, Mg^{++} , and cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate. *Arch Biochem Biophys*, 116 : 39-43, 1966
- 17) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 : 265-275, 1951
- 18) Thompson, W. J. and Appleman, M. M. : Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry*, 10 : 311-316, 1971
- 19) Sutherland, E. W. and Rall, T. W. : Fractionation and characterization of a cyclic adenosine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem*, 232 : 1077-1091, 1958
- 20) Rall, T. W. and Sutherland, E. W. : Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem*, 232 : 1065-1076, 1958
- 21) Sutherland, E. W., Oye, I. and Butcher, R. W. : The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase system in hormone action. *Recent Prog Horm Res*, 21 : 623-647, 1965
- 22) Otten, J., Johnson, G. S. and Pastan, I. : Cyclic AMP levels in fibroblasts : Relationship to growth rate and contact inhibition of growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 44 : 1192-1198, 1971
- 23) Butcher, F. R., Scott, D. F., Potter, V. R. and Morris, H. P. : Endocrine control of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels in several Morris hepatomas. *Cancer Res*, 32 : 2135-2140, 1972
- 24) Ney, R. L., Hochella, N. J., Grahame-Smith, D. G., Dexter, R. N. and Butcher, R. W. : Abnormal regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate and corticosterone formation in an adrenocortical carcinoma. *J Clin Invest*, 48 : 1733-1739, 1969

- 25) Chayoth, R., Epstein, S. and Field, J.B. : Increased cyclic AMP levels in malignant hepatic nodules of ethionine treated rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 49 : 1663-1670, 1972
- 26) Knox, A., J. S., Von Westarp, C., Row V. V. and Volpe, R. : Demonstration of the production of human thyroid-stimulating immunoglobulins (HTSI) by Graves' lymphocytes cultured *in vitro* with with phytohaemagglutinin (PHA). *Metabolism*, 25 : 1217-1223, 1976
- 27) Valenta, L. J. : Thyroid peroxidase, thyroglobulin, cAMP and DNA in human thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*, 43 : 466-469, 1976
- 28) Thomas-Morvan, C. : Effect of TSH on cAMP and cGMP levels in thyroid cancers, adenomas and normal thyroid tissue. *Acta Endocrinol (Kbh)*, 87 : 106-113, 1978
- 29) Van Sande, J. and Dumont, J.E. : Effects of thyrotropin, prostaglandin E_1 and iodine on cyclic 3', 5'-AMP concentration in dog thyroid slices. *Biochim Biophys Acta*, 313 : 320-328, 1973
- 30) D' Armiento, M. and Monako, F. : Cyclic AMP and thyroglobulin biosynthesis in the experimental rat thyroid tumor. *Biochim Biophys Acta*, 372 : 176-182, 1974
- 31) Larsen, P. R., Yamashita, K., Dekker, A. and Field, J. B. : Biochemical observations in functioning human thyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 36 : 1009-1018, 1973
- 32) Gilman, A.G. and Rall, T. W. : Factors influencing adenocine 3', 5'-phosphate accumulation in bovine thyroid slices. *J Biol Chem*, 243 : 5867-5871, 1968
- 33) Kaneko, R., Zor, U. and Field, J. B. : Thyroid-stimulating hormone and prostaglandin E_1 stimulation of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in thyroid slices. *Science*, 163 : 1062-1063, 1968
- 34) Klainer, L. M., Chi, Y. M., Freidberg, S. L., Rall, T.W. and Sutherland Sutherland, E. W. : Adenyl cyclase IV. The effects of neurohormones on the formation of adenosine 3', 5'-phosphate by preparations from brain and other tissues. *J Biol Chem*, 237 : 1239-1243, 1962
- 35) Pastan, I. and Katzen, R. : Activation of adenyl cyclase in thyroid homogenates by thyroid-stimulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun*, 29 : 792-798, 1967
- 36) 宮井 潔, 熊原 雄一, 網野信行, 小豆沢瑞夫 : LATS, TSH の作用機序に関する研究—Cell Free 系における甲状腺 Adenyl Cyclase, Phosphodiesterase 活性に及ぼす影響—. *日本内分泌会誌*, 45 : 1406-1407 (抄録), 1970
- 37) Sand, G., Jortay, A., Pochet, R. and Dumont, J. E. : Adenylate cyclase and protein phosphokinase activities in human thyroid. Comparison of normal glands, hyperfunctional nodules and carcinomas. *Eur J Cancer*, 12 : 447-453, 1976
- 38) Orgiazzi, J., Munari, Y., Rostagnat, A., Dutrieux, N. and Mornex, R. : Adenyl cyclase activity in thyroid carcinomas. *Ann Radiol (Paris)*, 20 : 757-759, 1977
- 39) Dobyns, B. M. : Cancer of the thyroid : Radical surgery, radiation or hormonal suppression therapy. *Surg Clin North Am*, 42 : 481-492, 1962
- 40) Zor, U., Bloom, G., Lowe, I. P. and Field, J. B. : Effects of theophyllin, prostaglandin E_1 and adrenergic blocking agents on TSH stimulation of thyroid intermediary metabolism. *Endocrinology*, 84 : 1082-1088, 1969
- 41) Onaya, T. and Solomon, D. H. : Stimulation by prostaglandin E_1 of endocytosis and glucose oxidation in canine thyroid slices. *Endocrinology*, 86 : 423-426, 1970
- 42) Ahn, C. S. and Rosenberg, I. N. : Iodine metabolism in thyroid slices : Effects of TSH, Dibutyl cyclic 3', 5'-AMP, NaF and prostaglandin E_1 . *Endocrinology*, 86 : 396-405, 1970

- 43) Su, S. C., Chang, L. and Burke, G. : Thyrotropin increases prostaglandins levels in isolated thyroid cells. *J Clin Invest*, 51 : 1038-1042, 1972
- 44) Moore, W. V. and Wolff, J. : Binding of prostaglandin E_1 to beef thyroid membranes. *J Biol Chem*, 248 : 5705-5711, 1973
- 45) Wolff, J. and Moore, W. V. : The effect of indomethacin on the response of thyroid tissue to thyrotropin. *Biochem Biophys Res Commun*, 51 : 34-39, 1973
- 46) Sato, S., Yamada, T., Furihata, R. and Makiuchi, M. : Effect of guanyl nucleotides on the stimulation of adenylyl cyclase activity in human thyroid plasma membranes by thyroid-stimulating hormone and prostaglandin E_2 . *Biochim Biophys Acta*, 332 : 166-174, 1974
- 47) 高須信行, 山田隆司 : 甲状腺刺激物質 (TSH, LATS, PGE $_1$) の作用機序—Adenylate cyclase-cyclic AMP 系からみた一. *臨科学*, 11 : 206-213, 1975
- 48) 佐藤誠也, 山田隆司 : TSH, LATS, Prostaglandin E_2 による牛甲状腺 plasma membrane 中 Adenyl cyclase の活性化. *ホと臨床*, 21 : 725-729, 1973
- 49) Schorr, I., Hinshaw, H. T., Cooper, M. A., Mahaffee, D. and Ney, R. L. : Adenyl cyclase hormone responses of certain human endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 34 : 447-451, 1972
- 50) 阿部好文, 斉藤榮造, 川越光博, 市川陽一, 本間光夫, 村木 篁, 有川一美, 吉田幸一郎, 伊藤国彦 : ヒト甲状腺腫瘍の adenylate cyclase に関する研究, 第49回日本内分泌学会総会, 東京
- 51) Rhoads, A. R., Morris, H. P. and West, W. L. : Cyclic 3', 5'-nucleotide monophosphate phosphodiesterase activity in hepatomas of different growth rates. *Cancer Res*, 32 : 2651-2655, 1972
- 52) Clark, J. F., Morris, H. P. and Weber, G. : Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate phosphodiesterase activity in normal, differentiating, regenerating, and neoplastic liver. *Cancer Res*, 33 : 356-361, 1973
- 53) Sharma, R. K. : Studies on adrenocortical carcinoma of rat cyclic nucleotide phosphodiesterase activities. *Cancer Res*, 32 : 1734-1736, 1972
- 54) 日高弘義, 長坂顯雄 : 甲状腺ホルモンの合成・分泌とその調節, 第11回河口湖カンファレンス, 甲状腺, 81-89, 1978
- 55) Orgiazzi, J. : Human thyroid adenyl cyclase stimulating activity in immunoglobulin G of patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 42 : 341-354, 1976
- 56) Wolff, J. and Jones, A. B. : The purification of bovine thyroid plasma membranes and the properties of membrane-bound adenyl cyclase, *J Biol Chem*, 246 : 3939-3947, 1971
- 57) De Duve, C., Pressman, B. C. : Tissue fractionation Studies, 6 intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue, *Biochem, J* 60 : 604-617, 1955

(55. 4. 24 受稿)