

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19050

研究課題名(和文) 甲状腺癌進展におけるTERTプロモーター変異・テロメア異常の病因的意義解明

研究課題名(英文) Pathogenic significance of TERT promoter mutation in progression of thyroid cancer

研究代表者

大石 直輝(OISHI, Naoki)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：90623661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺乳頭癌が未分化癌に転化する前後の遺伝子異常、蛋白発現異常を解析し、未分化転化のリスク因子の同定を試みた。「乳頭癌に由来する未分化癌」では、BRAF、TERTプロモーターの各変異が高頻度に存在し、それらのほとんどが乳頭癌の段階で獲得されることを明らかにした。また、「未分化転化のない乳頭癌」との比較で、TERTプロモーター変異が未分化転化の独立したリスク因子であることを明らかにした。その他、PIK3CA変異、p53、TTF-1、SWI/SNF蛋白の発現異常についても検討した。これらの知見は、甲状腺乳頭癌のTERTプロモーター変異を用いたリスク分類の確立の基礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：We examined genetic alterations in coexisting thyroid papillary carcinoma (PC) and anaplastic carcinoma (AC) to elucidate risk factors for anaplastic transformation. In the series of PC-derived ACs, BRAF and TERT promoter mutations were the most frequent alternations. These two mutations occurred prior to anaplastic transformation. Furthermore, using multivariate analysis with control PCs, we identified TERT promoter mutation to be an independent risk factor for anaplastic transformation. We also demonstrated PIK3CA mutations and aberrant expression of p53, TTF-1 and SWI/SNF proteins in a subset of PC-derived AC with temporally heterogeneous pattern of acquisition. By showing that TERT is highly associated with anaplastic transformation, it opens the possibility of stratifying PC patients for therapy using TERT promoter mutations.

研究分野：病理学

キーワード：甲状腺癌 未分化癌 乳頭癌 未分化転化 TERT BRAF PIK3CA SWI/SNF

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌は内分泌臓器に発生する最も頻度の高い悪性腫瘍である。そのうち乳頭癌は甲状腺癌全体の 85% から 90% を占め、病理学的に高分化癌であり、一般的に予後良好である。しかし、乳頭癌の一部は、高悪性度かつ予後不良な未分化癌に進展する(未分化転化)。

この未分化転化の分子メカニズムには不明な点が多く、「未分化転化しやすい乳頭癌」を抽出するバイオマーカーは確立されていない。未分化転化のよい指標となるバイオマーカーを明らかにできれば、乳頭癌の診断と同時にバイオマーカーによるリスク分類をおこない、術式や術後治療を適切に選択できるようになると期待される。

研究代表者らは、甲状腺癌における *TERT* promoter 変異に注目し、その臨床病理学的意義について研究してきた。*TERT* (遺伝子) はテロメラーゼの主要構成分子である *TERT* (蛋白) をコードしている。ヒトに発生する腫瘍の一部ではこの *TERT* (遺伝子) の promoter 領域に recurrent な体細胞点突然変異が存在し、この変異によって *TERT* (遺伝子) の発現が増加することでテロメラーゼ活性が異常に亢進している (図 1)。

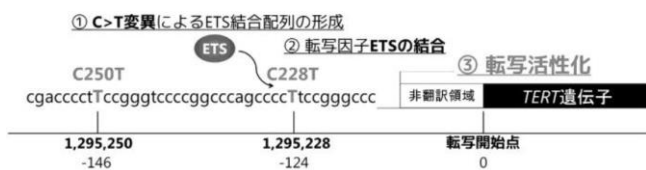


図 1 *TERT* promoter 変異の分子機構

甲状腺癌にも *TERT* promoter 変異は存在する。これまでに研究代表者らは乳頭癌の 13% に存在し *BRAF*^{V600E} 変異が併存すること、高齢で臨床病期が進行した症例に多いこと、20歳以下の若年例では変異が存在しないことを明らかにした。したがって、*TERT* promoter 変異は甲状腺乳頭癌の予後不良因子であり、腫瘍の発生・進展の後期イベントと推定される。未分化転化が高齢者に多いことを踏まえると、*TERT* promoter 変異が未分化転化のリスク因子となっている可能性がある。

また、最近の甲状腺未分化癌の次世代シーケンクス解析では、*TERT* promoter 変異が乳頭癌よりも未分化癌で高い頻度で存在すること、乳頭癌ではまれな SWI/SNF 複合体構成蛋白をコードする遺伝子や *PIK3CA*、*TP53* の変異が生じていることが明らかになった。

以上から、甲状腺乳頭癌が未分化癌に進展する分子機構を明らかにするため、乳頭癌から発生した未分化癌において、*TERT* promoter 変異を含めた包括的な遺伝子異常・蛋白発現異常の解析を行う必要があると考えた。

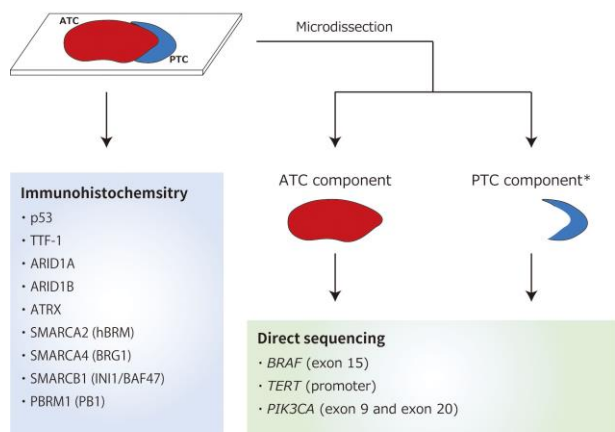
2. 研究の目的

- (1) 乳頭癌から発生した甲状腺未分化癌を特徴づける遺伝子異常、蛋白発現異常を同定し、さらに腫瘍がそれらの異常を獲得するタイミングを明らかにする。
- (2) 「未分化癌に進展した乳頭癌」に共通する遺伝子異常、蛋白発現異常を同定し、乳頭癌における未分化転化のリスク因子を明らかにする。

3. 研究の方法

研究の概要を図 2 に示す。

ATCs with PTC component (n=27)



*Data of the PTC components was compared to that of control PTCs.

図 2 研究の概要

- (1) 乳頭癌由来と推定できた甲状腺未分化癌、具体的には「乳頭癌成分が併存していた未分化癌」の手術例 27 例を収集し、そのホルマリン固定パラフィン包埋標本を解析対象とした。また、未分化転化していない乳頭癌 92 例を対照群として用いた。
- (2) 乳頭癌、未分化癌それぞれの成分から DNA を抽出し、*BRAF* (exon15)、*TERT* (promoter)、*PIK3CA* (exon 9, exon 20) の変異をダイレクトシーケンクスで解析した。
- (3) 次に、免疫組織化学で SWI/SNF 複合体構成蛋白 (ARID1A, ARID1B, ATRX, SMARCA2, SMARCA4, SMARCB1, PBRM1)、p53, TTF-1 の発現を乳頭癌成分、未分化癌成分それぞれで検討した。
- (4) 未分化転化のリスク因子を同定するため、単変量解析、多変量解析を用いて、「未分化癌に併存していた乳頭癌成分」と「未分化転化していない乳頭癌」の年齢、性別、*BRAF* 変異、*TERT* promoter 変異を比較した。

4. 研究成果

(1) 臨床病理学的因子

「乳頭癌が併存していた未分化癌」の患者平均年齢は 68.1 歳 (51 歳-84 歳) であった。乳頭癌成分の組織亜型は古典的亜型が最も多く 81%、高細胞亜型が 7%、浸潤性濾胞亜型が 7%、充実亜型が 4% であった。

(2) BRAF 変異と TERT promoter 変異

結果を図 3 に示す。

「乳頭癌が併存していた未分化癌」において BRAF^{V600E} 変異の頻度は 90% であった。いずれの BRAF 変異陽性例でも、乳頭癌成分と未分化癌成分で同じ変異が確認された。TERT promoter 変異の頻度は 95% であった。また、TERT promoter 変異陽性例のうち 95% で、乳頭癌成分と未分化癌成分で共通した変異がみられた。この結果から、BRAF、TERT promoter 変異は未分化転化に先立って、乳頭癌の段階で獲得されると推定した。

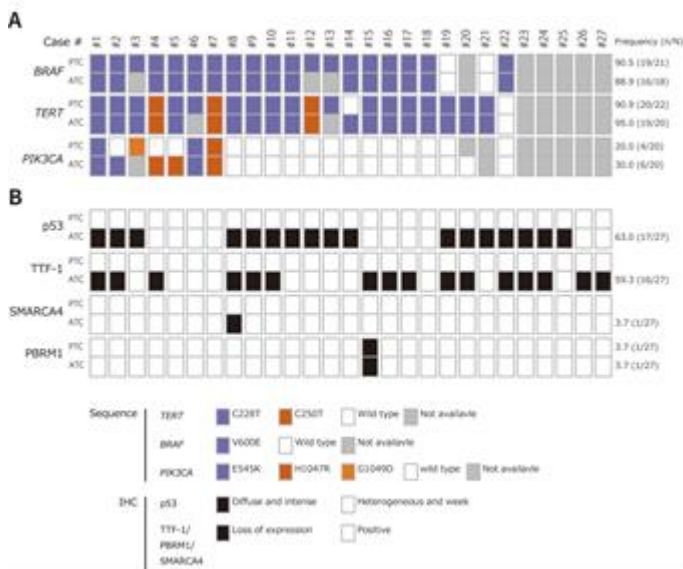


図 3 遺伝子変異、蛋白発現異常のまとめ

(3) PIK3CA 変異

「乳頭癌が併存していた未分化癌」における PIK3CA 変異の頻度は 33% であった。そのうちの 50% では、未分化癌成分のみで PIK3CA 変異が確認され、乳頭癌成分では変異陰性であった。すなわち、PIK3CA の変異は未分化転化の前後いずれでも生じることが分かった。

(4) TTF-1 と p53 の発現異常

「乳頭癌が併存していた未分化癌」における TTF-1 の発現消失は 59% の頻度でみられ、すべて未分化癌成分でのみ異常が確認された。変異を示唆する p53 蛋白の異常発現は 63% の頻度でみられ、こちらも未分化癌成分のみで異常がみられた。したがって、TTF-1 の発現消失、TP53 の変異は未分化転化と同時、もしくはその直後に生じると推定される。

(5) SWI/SNF 複合体構成分子の発現異常

「乳頭癌が併存していた未分化癌」において、SMARCA4、PBRM1 の発現消失がそれぞれ 7% の頻度で生じていた。SMARCA4 の発現異常が未分化癌成分のみに生じていたのに対し、PBRM1 の異常は乳頭癌成分、未分化癌成分の双方で生じていた。

(6) 未分化転化のリスク因子

未分化転化のリスク因子を明らかにするため、「未分化癌に併存していた乳頭癌成分」と「未分化転化していない乳頭癌」の年齢、性別、BRAF 変異、TERT promoter 変異を比較した。単変量解析では、年齢(60 歳以上)と TERT promoter 変異が有意に未分化転化と関係していた。多変量解析では、TERT promoter 変異のみが有意な因子として残り、未分化転化の独立したリスク因子として推定された(表 1)。この結果は、「未分化転化していない乳頭癌」から腫瘍径が 1cm 以下である微小乳頭癌を除外しても同様であった。

	単変量解析		多変量解析	
	オッズ比(95%信頼区間)	p値	オッズ比(95%信頼区間)	p値
年齢 (61歳以上)	8.17 (2.61-25.5)	<0.001	1.30 (0.20-8.36)	0.78
性別 (女性)	0.81 (0.33-2.01)	0.82		
BRAF ^{V600E} 変異	1.85 (0.39-8.79)	0.34		
TERT 変異	68.18 (13.97-332.79)	<0.001	58.99 (9.25-376.37)	<0.001

表 1

以上の解析から、甲状腺乳頭癌における TERT promoter 変異は、単に乳頭癌の予後不良因子であるだけでなく、未分化転化の独立したリスク因子であることを世界で初めて明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- ① Oishi N, Kondo T, Ebina A, Sato Y, Akaishi J, Hino R, Yamamoto N, Yokomichi H, Mochizuki K, Nakazawa T, Ito K, Ishikawa Y, Katoh R. Molecular Alterations of Coexisting Thyroid Papillary Carcinoma and Anaplastic Carcinoma: Identification of TERT Mutation as an Independent Risk Factor for Transformation. *Mod Pathol*. 査読あり. *in press*
- ② Vuong HG, Kondo T, Pham TQ, Oishi N, Mochizuki K, Nakazawa T, Hassell L, Katoh R. Prognostic significance of diffuse sclerosing variant papillary thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 査読あり.

2017 Apr;176(4):431-439.
doi: 10.1530/EJE-16-0863.

- ③ **Oishi N**, Kondo T, Nakazawa T, Mochizuki K, Inoue T, Kasai K, Tahara I, Yabuta T, Hirokawa M, Miyauchi A, Katoh R. Frequent BRAF (V600E) and Absence of TERT Promoter Mutations Characterize Sporadic Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas in Japan. *Endocr Pathol*. 査読あり. 2017 Jun;28(2):103-111.
doi: 10.1007/s12022-017-9470-y.
- ④ Vuong HG, Altibi AM, Abdelhamid AH, Ngoc PU, Quan VD, Tantawi MY, Elfil M, Vu TL, Elgebaly A, **Oishi N**, Nakazawa T, Hirayama K, Katoh R, Huy NT, Kondo T. The changing characteristics and molecular profiles of papillary thyroid carcinoma over time: a systematic review. *Oncotarget*. 査読あり. 2017 Feb 7;8(6):10637-10649.
doi:10.18632/oncotarget.12885.
- ⑤ Vuong HG, Kondo T, **Oishi N**, Nakazawa T, Mochizuki K, Inoue T, Tahara I, Kasai K, Hirokawa M, Tran TM, Katoh R. Genetic alterations of differentiated thyroid carcinoma in iodine-rich and iodine-deficient countries. *Cancer Med*. 査読あり. 2016 Aug;5(8):1883-9. doi: 10.1002/cam4.781.
- ⑥ **Oishi N**, Kondo T, Vuong HG, Nakazawa T, Mochizuki K, Kasai K, Inoue T, Tahara I, Hirokawa M, Miyauchi A, Katoh R. Immunohistochemical detection of NRAS(Q61R) protein in follicular-patterned thyroid tumors. *Hum Pathol*. 査読あり. 2016 Jul;53:51-7.
doi: 10.1016/j.humpath.2016.02.008.
- ⑦ **大石直輝**, 近藤哲夫. 【第7版の甲状腺癌取扱い規約における変更点について】 甲状腺乳頭癌の特殊型. 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌. 査読なし. 2016;33:73-77.
- ⑧ Nakazawa T, Kondo T, **Oishi N**, Tahara I, Kasai K, Inoue T, Mochizuki K, Katoh R. Branchial Cleft-Like Cysts Involving 3 Different Organs: Thyroid Gland, Thymus, and Parotid Gland. *Medicine*. 査読あり. 2015 Oct;94(42):e1758.
doi: 10.1097/MD.0000000000001758.
- ⑨ Nakazawa T, Kondo T, Tahara I, Kasai K, Inoue T, **Oishi N**, Mochizuki K, Kubota T, Katoh R. Multicentric occurrence of multiple papillary thyroid carcinomas--HUMARA and BRAF mutation analysis. *Cancer Med*. 査読あり. 2015 Aug;4(8):1272-80. doi: 10.1002/cam4.466.
- ⑩ Mochizuki K, Kondo T, **Oishi N**, Tahara I, Inoue T, Kasai K, Nakazawa T, Okamoto T, Shibata N, Katoh R. Low frequency of PAX8-PPAR γ rearrangement in follicular

thyroid carcinomas in Japanese patients. *Pathol Int*. 査読あり. 2015 May;65(5):250-3.
doi: 10.1111/pin.12270.

[学会発表] (計4件)

- ① **大石直輝** ほか. 乳頭癌における *TERT* 変異は未分化転化のリスクである -未分化転化をきたした乳頭癌の分子病理学的解析-. 第20回日本内分泌病理学会. 2016年9月16日~9月17日. 帝京大学 (東京都・板橋区).
- ② **大石直輝** ほか. Immunohistochemical Detection of NRAS^{Q61R} Protein in Follicular-patterned Thyroid Tumors. 第105回日本病理学会総会. 2016年5月12日~5月14日. 仙台国際センター (宮城県・仙台市).
- ③ **Oishi N** et al. Immunohistochemical Detection of NRAS^{Q61R} Protein in Follicular-Patterned Thyroid Tumors. United States & Canadian Academy of Pathology 105th Annual Meeting. 2016年3月12日~18日. シアトル (アメリカ合衆国).
- ④ **大石直輝** ほか. 小児・若年甲状腺乳頭癌における *BRAF*^{V600E} 変異と *TERT* プロモーター変異の解析. 第104回日本病理学会総会. 2015年4月30日~2015年5月2日. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
研究 山梨大学人体病理学講座
http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pathol02/research.html

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
大石 直輝 (OISHI, Naoki)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号: 90623661
- (2) 研究協力者
近藤 哲夫 (KONDO, Tetsuo)
蛭名 彩 (EBINA, Aya)
佐藤 由紀子 (SATO, Yukiko)
赤石 純子 (AKAISHI, Junko)
日野 るみ (HINO, Rumi)
山本 智理子 (YAMAMOTO, Noriko)

横道	洋司	(YOKOMICHI, Hiroshi)
望月	邦夫	(MOCHIZUKI, Kunio)
中澤	匡男	(NAKAZAWA, Tadao)
伊藤	公一	(ITO, Koichi)
藪田	智範	(YABUTA, Tomonori)
廣川	満良	(HIROKAWA, Mitsuyoshi)
宮内	昭	(MIYAUCHI, Akira)
石川	雄一	(ISHIKAWA, Yuichi)
加藤	良平	(KATOH, Ryohei)