

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16951

研究課題名(和文) 甲状腺の結節性病変に対する細胞診による分子生物学的診断法の開発

研究課題名(英文) Clinical impact of a cytological screening system using cyclin D1 immunostaining and genomic analysis for the diagnosis of thyroid nodules.

研究代表者

手島 直則 (Masanori, Teshima)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10749146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺腫瘍切除症例の腫瘍検体から102例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから組織マイクロアレイを作成してcyclin D1免疫染色を実施し、染色性を確認後、液状保存細胞診検体におけるcyclin D1免疫染色についても検討を行った。細胞診検体におけるcyclinD1核染色率は感度85%、特異度100%で悪性腫瘍の診断が可能であった。またNGSを行い、BRAF V600変異、TP53変異などの変異も特定可能であった。細胞診検体を用いてcyclin D1免疫染色の陽性率とNGSで遺伝子変異を特定することで、腫瘍の術前スクリーニングシステムとして使用可能であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特に甲状腺細胞診診断が困難な施設において、良性、悪性の鑑別困難な甲状腺結節の術前診断を行う際には、Cyclin D1免疫染色を用いた細胞診を行うことが腫瘍性病変スクリーニングの手段の一つとなる。特に陰性の結節であった場合は腺腫様結節の診断であり、経過観察とすることができるため、診断目的の手術を減らす一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：One hundred two patients with thyroidal nodule were enrolled in this prospective study. Expression of cyclin D1 in thyroid nodules was determined by immunohistochemistry using both surgical specimens and their cytological specimens. In FNA samples, a threshold of 46% of immunolabelled cells allows to discriminate malignant lesions from benign ones ($P<0.0001$), with 81% sensitivity and 100% specificity. A 46% cutoff value for positive cyclin D1 immunostaining in thyroid cells demonstrated 81% sensitivity and 100% specificity. Finally, three tested clinico-pathological variables (extra thyroidal extension, intraglandular metastasis, and lymph node metastasis) were significant predictors of cyclin D1 immunostaining ($P<0.001$). Our cytological cyclin D1 screening system provides a simple, accurate, and convenient diagnostic method in precision medicine enabling ready determination of personalized treatment strategies for patients by next generation sequencing using cytological sample.

研究分野：頭頸部外科 内分泌外科

キーワード：甲状腺結節 スクリーニング 細胞診 cyclin D1 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

甲状腺結節は甲状腺に関連のない症状、偶発の検査や甲状腺疾患を疑う患者に同定された結節と定義されている。現在、穿刺吸引細胞診 (FNA) が最も信頼できる甲状腺結節の診断方法であるが、超音波検査で同定される内部充実性で低エコー域を伴う腫瘤は FNA で約 80%の感度と約 70%の特異度で悪性腫瘍であると診断される。細胞診で意義不明な異型あるいは意義不明な濾胞性病変の悪性率は 26.6-37.8%であると報告されている。特に、悪性度不明の高分化腫瘍や濾胞性腺腫のような非浸潤性型濾胞性腫瘍の術前診断については確立していないのが現状である。Cyclin D1 は細胞転写 G1/S 期の調節遺伝子として知られており、G1 期の早期に分裂促進を刺激した後の細胞合成に関わる。Cyclin D1 や一部の Cyclin D は腫瘍においては制御されておらず、癌や疾患の進行を表すバイオマーカーとなっている。Cyclin D1 は、細胞周期の進行に対するその正の効果と一致して、多くの癌において過剰発現される癌遺伝子である。その上、Cyclin D1 は悪性黒色腫などにおいて BRAF 阻害薬への抵抗性に寄与しているとの報告や甲状腺乳頭癌で Cyclin D1 が過剰発現しているとの報告も散見される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、甲状腺結節の組織学的サブタイプの同定において Cyclin D1 免疫染色を評価し、腫瘍の悪性度および疾患予後のバイオマーカーとしての潜在的役割を決定することとした。また FNA サンプルからの遺伝子発現プロファイルを分析することで Cyclin D1 免疫染色と遺伝子配列解析の組み合わせを用いて甲状腺結節の検出のための新しい術前細胞学的戦略の可能性についても併せて検討することとした。

3. 研究の方法

2008 年から 2015 年に国立がん研究センター中央病院で甲状腺腫瘍手術や他の頭頸部悪性腫瘍手術によって得られた 102 例の甲状腺切片を対象とした。また 2015 年から 2017 年までの 31 例ではホルマリン固定の前に液状検体細胞診 Liquid based cytology (LBC) を行った。102 例の対象症例は乳頭癌 59 例、濾胞癌 9 例、低分化癌 7 例、髄様癌 1 例、未分化癌 5 例、Well differentiated tumor-uncertain malignant potential 2 例、濾胞腺腫 7 例の甲状腺腫瘍検体と下咽頭癌や喉頭癌手術で摘出した腺腫様甲状腺腫 1 例と正常甲状腺 11 例の 12 例を Background とした。組織診断では、ホルマリン固定後のパラフィン包埋切片 (FFPE) を 10 μm 厚で切り出し、HE 染色、Cyclin D1 免疫染色、Ki67 免疫染色をそれぞれ行った。染色後のスライドをスキャン・デジタル化し、Gunma-LI, Image J を用いて染色細胞の自動定量化を行うことで cyclin D1 染色率のカットオフを設定した。細胞診では、最も強い Cyclin D1 発現を認める 100 倍 6 視野で少なくとも 10 個以上の濾胞細胞がみられる集塊を観察し、400 倍で構成する陽性細胞数を観察した。また、Cyclin D1 の細胞陽性率を 3 人の細胞検査技師が独立して計算した。パラフィン包埋ブロックからは 10 μm 厚の脱パラフィン化した切片から QIA amp DNA mini kit を用いて、DNA を抽出した。液状化細胞診検体からは、PBS で洗浄し集められた細胞から DNA を抽出した。2 ステップの PCR を用いて次世代シーケンシングライブラリーを作成した。PCR には 36 pairs of 変異を起こすことで知られている p53, BRAF, KRAS, HRAS, CTNNB1, AKT1, PI3KCA を含む 36 ペアのプライマーを用いた。また、FFPE 腫瘍切片を用いて FISH 解析も合わせて行い CCND1 遺伝子増幅の有無についても調べた。

4. 研究成果

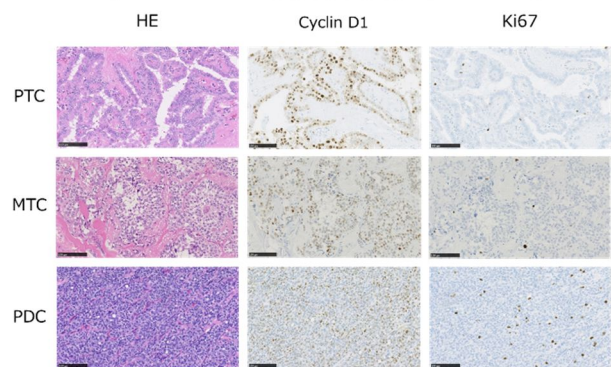
・患者背景と臨床的特徴

対象症例の年齢は 11 ~ 85 歳 (中央値 64 歳)、男性 39 例、女性 63 例、観察期間は 1~168 ヶ月 (中央値 9 ヶ月) であった。腫瘍径が 4cm 以上の症例が 19 例 (18.6%)、腫瘍の甲状腺外進展が見られた症例が 57 例 (55.8%)、腺内転移を認めた症例が 26 例 (25.5%)、中央区域および外側区域に頸部リンパ節転移を認めた症例が 50 例 (49%)、遠隔転移を認めた症例が 28 例 (27.5%) であった。

・Cyclin D1 免疫染色について

病理組織診断における Cyclin D1 の陽性的中率 (PPV) と Cyclin D1 による核染色率の中央値 (MSR) について検討した。組織型別に乳頭癌 (PPV91.5%、MSR48.5%)、髄様癌 (PPV100%、MSR66.4%)、濾胞癌 (PPV77.8%、MSR34.2%)、低分化癌 (PPV85.7%、MSR45.9%)、未分化癌 (PPV33.3%、MSR15%)、WDT-UPT (PPV100%、MSR41.5%)、濾胞腺腫 (PPV66.7%、MSR13.1%)、正常もしくは腺腫様甲状腺腫

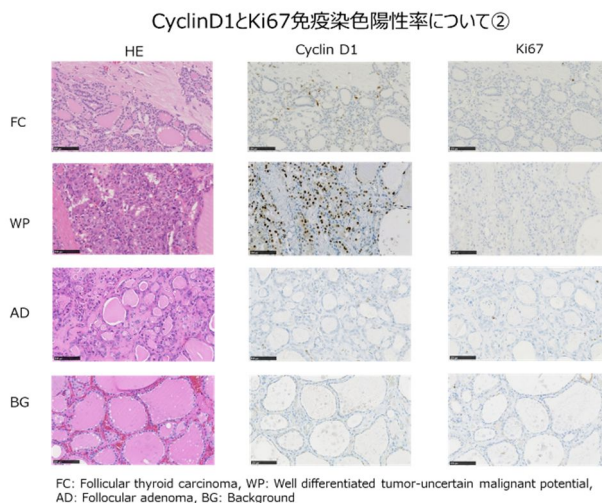
CyclinD1とKi67免疫染色陽性率について①



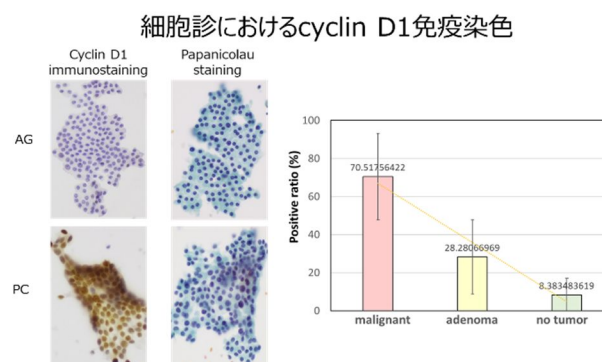
PTC: Papillary thyroid carcinoma, MTC: Medullary thyroid carcinoma, PDC: Poorly differentiated thyroid carcinoma

MSR3.4%であった。MIB1 index に用いられる Ki67 免疫染色と染色性について比較を行ったが、感度、特異度ともに Cyclin D1 が Ki67 を上回る結果であった。次に液状化細胞診検体を用いて細胞診における Cyclin D1 免疫染色の検討を行った。それぞれの検体における細胞数の中央値は 131 個であり、一つの検体当たりの Cyclin D1 染色の中央値は 61%であった。

甲状腺悪性腫瘍の細胞診における Cyclin D1 核染色率 46%をカットオフ値とすると、その細胞診診断は感度 85%、特異度 100%であった。病理組織診では、ROC カーブをもとに Cyclin D1 染色率 5.8%のカットオフ値で感度 94.4%、特異度 92.3%で甲状腺腫瘍性病変の診断が可能であり、15.7%のカットオフ値で感度 86.4%、特異度 80.5%で悪性腫瘍の診断が可能であった。また、Cyclin D1 の発現率と腫瘍径 4cm 以上、腺外進展の有無、腺内転移の有無などの病理組織学的特徴にも有意な相関関係が見られた。LBS と FFPE 検体におけるシーケンス結果に相違は見られなかった。



また我々の研究では、甲状腺悪性腫瘍検体で CCND1 遺伝子の増幅がみられると考え FISH を行ったが、予想と反して CCND1 コピー数の変化を確認することができなかった。甲状腺腫瘍における Cyclin D1 免疫染色の感度について ROC カーブを元に cut off 値を設定した。予想していなかったことであるが、本研究結果では、腺腫や悪性腫瘍では Cyclin D1 は染色されるものの正常甲状腺や腺腫様甲状腺腫では染色されなかった。これらは甲状腺分化癌における緩徐な細胞増殖によるものと仮定したが、いくつかの未分化癌ではランダムな染色パターンで染色率が低いものも見られた。未分化癌や他の甲状腺癌において細胞内染色体の不安定性によるものと推測した。低分化癌についても cyclin D1 染色の免疫染色性の強度は様々であった。一方で、腺腫様甲状腺腫や正常甲状腺組織では明らかに Cyclin D1 の染色性が異なっていた。また、Ki67 染色はリンパ球も染色されることが知られているが、Cyclin D1 ではそのような事象が見られなかった。我々の分析では、臨床的に予後不良であるリンパ節転移、腺外進展や腺内転移などの因子と Cyclin D1 染色性については相関関係がみられており、臨床的側面からも Cyclin D1 染色が陽性であることは予後不良因子である可能性が示唆された。この細胞診に関する研究では、ベセスダシステムに基づいて甲状腺結節の細胞診検体から 6 つの細胞集塊でそれぞれ cyclin D1 免疫染色について確認を行った。細胞診に用いた検体で遺伝子解析を行い、その結果と組織診断を合わせることで、結節の病変診断だけでなく良悪性の組織系も区別することが可能である。また濾胞性病変においても腺腫と悪性腫瘍についての鑑別が可能か検討を行ったが、濾胞性腫瘍の Cyclin D1 正診率は低かった。これは、核異型の乏しさ、細胞増殖能の低さ、組織診断における被膜浸潤や血管侵襲の有無が診断に関わっているためと推測された。従って濾胞性腫瘍の良悪鑑別には細胞診検体を用いて TP53, PAX8-PPAR, RAS ターゲットシーケンスを併用する必要があると考えられた。



本研究の結果として、細胞診における Cyclin D1 スクリーニングシステムは高い感度、特異度を有しており、この診断方法に次世代シーケンサーを併用することで患者のための個人化診療への迅速な治療戦略決定が可能である。さらに症例数を重ねて検討を加えることで、甲状腺結節の手術対象か否かをスクリーニングするシステムの強化につながると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Teshima Masanori, Tokita Kazuya, Ryo Eijitsu, Matsumoto Fumihiko, Kondo Madoka, Ikegami Yota, Shinomiya Hiroataka, Otsuki Naoki, Hiraoka Nobuyoshi, Nibu Ken-ichi, Yoshimoto Seiichi, Mori Taisuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Clinical impact of a cytological screening system using cyclin D1 immunostaining and genomic analysis for the diagnosis of thyroid nodules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1186/s12885-019-5452-4	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 手島直則 森泰昌 下田光 四宮弘隆 大月直樹 吉本世一 丹生健一
2. 発表標題 甲状腺結節の診断を目的としたCyclin D1免疫染色とゲノム解析を用いた細胞学的スクリーニングシステムの臨床的影響
3. 学会等名 第52回日本内分泌外科学会学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----