

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18590328

研究課題名 (和文) 甲状腺癌のプログレッションにおける遺伝子背景の分子病理学的解析

研究課題名 (英文) Genetic background of thyroid cancer -molecular analysis-

研究代表者

加藤 良平 (KATO RYOHEI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30152755

研究成果の概要：

乳頭癌と未分化癌混在例について、RET 遺伝子の再構成と BRAF 遺伝子の突然変異を解析した。その結果、乳頭癌成分、未分化癌成分とも RET 遺伝子再構成は無く、BRAF 遺伝子は両成分で 40% 以上が検出された。さらに、2 例では、BRAF 遺伝子の突然変異は、乳頭癌成分にのみ認められた。以上より、RET 遺伝子再構成、とくに RET/PTC1 は乳頭癌から未分化癌へのプログレッションにはほとんど関係せず、BRAF 遺伝子の突然変異がプログレッションに重要な役割をもつ可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,100,000	0	2,100,000
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

甲状腺から発生する癌では、分化癌(乳頭癌、濾胞癌)は発育が遅く、予後が良好で、未分化癌は発育が急速で、予後も不良である。甲状腺未分化癌は、乳頭癌や濾胞癌から発生するというプログレッションの機構(未分化転化 dedifferentiation)が知られている。しかしながら、現在まで、甲状腺の分化癌から低分化癌、未分化癌へのプログレッションにおける遺伝子背景については不分明で、またその形態的なクライテリアも十分に確立さ

れていない。そこで、甲状腺癌のプログレッションの形態的な客観性を確立する目的で、イタリアのトリノでコンセンサスミーティングに参加し、甲状腺低分化癌の病理学的クライテリアについてまとめた(VOLANTE et al. Am J Surg Pathol 31, 2007)。一方、甲状腺癌の遺伝子背景については、昨年までの実績を踏まえて、B-Raf 蛋白の発現との関係を免疫組織化学的に検討したところ、甲状腺癌では B-Raf 蛋白の発現が更新していることが証明された(Kondo et al. Hum Pathol 38, 2007)。

さらに現在は甲状腺未分化癌での B-Raf 遺伝子や RET 遺伝子の発現について検討しており、RET 遺伝子は甲状腺癌のプログレッションに関与する可能性は少なく、B-Raf 遺伝子の関係が重要であることが考えられた (Nakazawa et al. Virchows Arch in publication)。

## 2. 研究の目的

甲状腺未分化癌は最も予後の悪い甲状腺癌で、現在までその治療法は確立されていない。我々は甲状腺癌の遺伝子変異と知られる BRF 遺伝子の点突然変異と RET 遺伝子の再構成について検討することにした。

RET 遺伝子の再構成は乳頭癌で高率に出ることが知られており、RET/PTC1 は RET 遺伝子の tyrosine domain と H4 が融合する。一方、RET/PTC3 は RET 遺伝子の tyrosine domain が ELE-1 と融合する。

7 番染色体短腕 24 にある BRAF 遺伝子の点突然変異は codon 600 の valine を glutamate に変異させる。BRAF 遺伝子の点突然変異は甲状腺乳頭癌や未分化癌では高い検出率で、他の組織型の甲状腺腫瘍ではほとんど見つからない。

甲状腺未分化癌は乳頭癌や濾胞癌からのプログレッションで発生することが知られているが、現在まで同一症例で乳頭癌と未分化癌の遺伝子は背景を検討した研究は無い。そこで、われわれは、甲状腺腫瘍のプログレッション (未分化癌転化) の機構を解明するために、同一症例で乳頭癌成分と未分化癌成分において、BRAF 遺伝子、RET 遺伝子を検討することにした。

## 3. 研究の方法

(1) 甲状腺癌 47 例の手術材料と 2 例の生検組織を用いた。これらの症例は、山梨大学医学部附属病院および東京女子医科大学病院の病理入るから集めた。その内わけは、未分化癌と乳頭癌の混在例が 7 例、未分化癌のみが 14 例、乳頭癌のみが 28 例であった。これらの組織診断は、WHO 分類によった。腫瘍の診断は著者のうち 2 名の病理医が担当した。

(2) マイクロダイゼクションとホルマリン固定、パラフィン包埋切片からの核酸 (RNA, DNA) の抽出。

10 ミクロン厚のホルマリン固定パラフィン切片 5 枚から注射針を用いて腫瘍部だけを切り出し、核酸を抽出した。Sampling の問題を避けるために、壊死の無い部分を選択した。ISOGENE PB Kit (NIPPON GENE CO, LTD, Toyama, Japan) により、型のごとく RNA を抽出した。さらに、切片の一部は、2mg/ml の proteinase K を含む 50  $\mu$ l の lysis buffer (10mM

Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) に容れ、55°C、24 時間浸漬し、DNA を抽出した。

(3) RT-PCR : 抽出された RNA を用いて、RET/PTC1 と RET/PTC3 に対応するプライマーで PCR 法により解析した。

(4) Direct sequence 法 RT-PCR 法検出された RET/PTC1 と RET/PTC3 の PCR 産物 (バンド) を精製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems Division, Foster City, CA) によって、直接シーケンス法でその塩基配列を分析した。

## 4. 研究成果

(1) 乳頭癌、未分化癌混在例 (7 例) における RET 遺伝子再構成と BRAF 遺伝子突然変異 : 乳頭癌、未分化癌混在例の乳頭癌成分と未分化癌成分をそれぞれ別々に採取して、RET 遺伝子再構成と BRAF 遺伝子突然変異を検討した。

RET/PTC1 は 7 例とも、いずれの成分にも検出できなかった。一方、RET/PTC3 は 1 例のみで、乳頭癌成分と未分化癌成分の両方に証明することができた。

BRAF 遺伝子突然変異は 7 例中 3 例で両方の成分に陽性になった。2 例では両成分と陰性だった。興味あるのは、残りの 2 例では、乳頭癌成分のみが BRAF 遺伝子突然変異が陽性で、未分化癌成分は陰性だった。すなわち、BRAF 遺伝子突然変異に乳頭癌成分と未分化癌成分で解離が認められた。

(2) 未分化癌単独例 (14 例) と乳頭癌単独例 (28 例) における RET 遺伝子再構成と BRAF 遺伝子突然変異 :

RT-PCR 法で検索すると、RET/PTC1 は乳頭癌 28 例中 3 例で陽性になり (10.7%)、未分化癌 14 例はいずれも陰性だった。

PCR 法での BRAF 遺伝子突然変異 (thymine to adenine missense mutation in nucleotide 1799 in the *BRAF* gene) は、未分化癌 14 例中 3 例 (21.4%) で陽性になったが、乳頭癌での出現率は 82.1% を示した。

上記の結果は直接シーケンス法で、その塩基配列を確認した。

現在まで、乳頭癌、未分化癌混在例

(composite tumor) を用いた遺伝子背景の検討は無い。我々は 7 例の混在例と単独例 (未分化癌 14 例、乳頭癌 28 例) を用いて、RET 遺伝子の再構成 (RET/PTC-1, RET/PTC3) と BRAF 遺伝子突然変異について検討した。単独

例での RET 遺伝子再構成の頻度、BRAF 遺伝子突然変異の頻度も以前の報告とそれほど差がなかった。一方、混在例では、未分化癌成分に BRAF 遺伝子が、乳頭癌成分とともに検出されたことは興味深い。さらに 2 例では乳頭癌成分のみに BRAF 遺伝子の突然変異が認められ、未分化癌成分は陰性という解離を生じたことは、未分化癌の発生を考える上で興味深い所見を提供したと考えられた。

Vasko V. et al. は原発巣の乳頭癌では BRAF 遺伝子の突然変異が認められたが、リンパ節転移巣の腫瘍では陰性であったことを報告している。もしも未分化癌が乳頭癌から発生するとするならば、BRAF 遺伝子突然変異の無い乳頭癌細胞に BRAF 遺伝子の突然変異が起こり、未分化癌は BRAF 遺伝子の無い乳頭癌細胞から転化した可能性が考えられる。

以上の結果から、RET 遺伝子再構成、とくに RET/PTC1 は乳頭癌から未分化癌へのプログレッションにはほとんど関係しない

(RET/PTC3 の関与は否定できない)。BRAF 遺伝子の突然変異は乳頭癌から未分化癌へのプログレッションに重要な役割をもつ可能性が示唆された。さらに、BRAF 遺伝子突然変異において、同一症例で乳頭癌成分と未分化癌成分での解離の説明は難しいが、腫瘍のプログレッションを考える上で重要である可能性が想定された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

①Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATOH, 他 5 名、7 番目: Histopathology of the thyroid in amiodarone-induced hypothyroidism. PATHOLOGY INTERNATIONAL, 58; 55-58, 2008, 査読有

②Marco VOLANTE, Ryohei KATOH, 他 6 名、6 番目: Poorly differentiated thyroid carcinoma: The turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach, AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY, 31(8); 1256-1264, 2007, 査読有

③Tetsuo KONDO, Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATOH, 他 4 名 7 番目: Enhanced B-Raf protein expression is independent of V600E mutant status in thyroid carcinoma. HUMAN PATHOLOGY, 3(8); 1810-1818, 2007, 査読有

④Tetsuo KONDO, Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATOH, 他 6 名、9 番目: Gastric mucin is

expressed in a subset of endocervical tunnel clusters: type A tunnel clusters of gastric phenotype. HISTOPATHOLOGY, 50(7):843-850 2007, 査読有

⑤YaLan Liu Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATOH, 他 8 名、11 番目: Expression of aquaporin 3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues. HUMAN PATHOLOGY, 38(1); 17, 1-8, 2007, 査読有

⑥Shin-ichi MURATA, Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATOH, 他 5 名、8 番目 Conservation and alteration of chromosome territory arrangements in thyroid carcinoma cell nuclei. THYROID, 17(6):489-96, 2007 査読有

⑦Tetsuo KONDO, Tadao NAKAZAWA, Shin-ichi MURATA Ryohei KATOH: Expression of CD73 and its ecto-5'-nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas. HISTOPATHOLOGY, 48(5); 612-614, 2006, 査読有

⑧Akihiko HASHI, Ryohei KATOH, 他 6 名、7 番目: p16INK4a overexpression independent of human papillomavirus infection in lobular endocervical glandular hyperplasia. Int J Gynecol Pathol. 25(2); 187-94, 2006

⑨Tetsuo KONDO, Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATOH, 他 1 名、4 番目 Expression of CD73 and its ecto-5'-nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas. HISTOPATHOLOGY 48(5):612-614, 2006

[学会発表] (計 10 件)

①近藤哲夫、中澤 匡男、加藤 良平他、甲状腺癌における thyroid transcription factor-1 のエピジェネティック機構を介した遺伝子発現調節、第 98 回日本病理学会総会、

2009 年 5 月 2 日、京都市

②山根 徹、中澤 匡男、加藤 良平他、甲状腺未分化癌における hypoxia inducible factor (HIF-1) 発現と血管新生機序の検討、第 98 回日本病理学会総会、

2009 年 5 月 2 日、京都市

③中澤 匡男、加藤 良平他、甲状腺乳頭癌における FISH 法を用いた PET/PTC の検討、第 97 回日本病理学会総会、

2008 年 5 月 15 日、金沢市

④鈕東峰、中澤 匡男、加藤 良平他、甲状腺乳頭癌の培養細胞株における核の溝および核内細胞質封入体の形成—中心体とマイクロチューブとの関連、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15 日、金沢市

⑤近藤哲夫、中澤 匡男、加藤 良平他、甲状腺癌における adenosine 受容体の発現と

その意義、第 97 回日本病理学会総会、  
2008 年 5 月 15 日、金沢市  
⑥山根徹、中澤 匡男、加藤 良平他、甲状腺未分化癌における hypoxia inducible factor 発現の免疫組織化学的検討、第 97 回日本病理学会総会、  
2008 年 5 月 15 日、金沢市  
⑦望月邦夫、中澤 匡男、加藤 良平他、甲状腺未分化癌における RET 再構成、BRAF 突然変異、p53 の過剰発現の検討、第 95 回日本病理学会総会、  
2008 年 5 月 1 日、東京  
⑧中澤 匡男、加藤 良平他、甲状腺腫様におけるリンパ管、血管密度についての免疫組織化学的検討、第 95 回日本病理学会総会、  
2008 年 5 月 1 日、東京  
⑨岩科 雅範中澤 匡男、加藤 良平他、Intranuclear cytoplasmic inclusions (ICIs) in papillary thyroid carcinoma-morphogenesis and nature-、  
第 95 回日本病理学会総会、  
2008 年 5 月 1 日、東京  
⑩中澤 匡男、加藤 良平他、甲状腺乳頭癌における FISH 法を用いた RET/PTC の検討、第 48 回日本組織細胞化学会総会(第 8 回日中合同組織細胞化学セミナー)、第 39 回日本臨床分子形態学会総会、2007 年 9 月 28 日、甲府市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 良平 (KATO RYOHEI)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授  
研究者番号: 30152755

### (2) 研究分担者

中澤 匡男 (NAKAZAWA TADAO)  
山梨大学・医学部付属病院・助教  
研究者番号: 10345704

### (3) 連携研究者

なし