

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K09913  
研究課題名(和文) 増悪する甲状腺乳頭癌を予測できる分子マーカー：さらなる高精度化と細胞診への応用

研究課題名(英文) Molecular markers that can predict highly malignant papillary thyroid cancer

研究代表者  
松瀬 美智子 (Matsuse, Michiko)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：30533905  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺癌は近年、その数が世界的に増加している疾患であり、再発・転移を来す悪性度の高い甲状腺癌を術前に推定できる新たな分子マーカーの発見が望まれる。本研究において我々は少ないDNAサンプルからも高精度に変異を検出できるddPCR法を用いることで、術前細胞診検体からTERT-p変異を検出できる方法を確認し、この変異が術前細胞診における分子マーカーとして有用であることを明らかにした。また、TERT mRNA発現も甲状腺癌の新たな分子マーカーとして有用であることを明らかにし、予後予測マーカーとして高齢者ではTERT-p変異、若年者ではTERT発現が有用であることを報告した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

TERTは甲状腺癌のみならず膀胱癌、肝癌、黒色腫、脳腫瘍をはじめ様々な癌で悪性度と関連しているとされ、本研究によって得られた知見は、他癌種にも応用可能である。また、術前細胞診検体で悪性度を予測できる分子マーカーを確認することによって、最適な治療方針選択を可能とし、患者QOLの向上、医療経済にも貢献できる。近年、スプライシングを制御する薬剤が同定されてきているが、本研究の成果によってこの種の薬剤が抗がん剤として開発が進む可能性もある。

研究成果の概要(英文)：The incidence of papillary thyroid carcinoma (PTC) has been increasing worldwide. Although most PTCs have a favorable prognosis, small but certain fraction show aggressive behavior. Therefore, a novel and well-performing molecular marker is needed.

In the present study, we developed a highly sensitive detection method for TERT promoter (TERT-p) mutations. Using our method, we could detect TERT-p mutations even from a small amount of DNA samples and showed that the detection of this mutations using preoperative samples could be clinically useful. We also found that TERT-p mutations and TERT mRNA expression can be useful prognostic markers in elderly and young PTC patients, respectively.

研究分野：内分泌学

キーワード：甲状腺癌 TERT

## 1. 研究開始当初の背景

近年、甲状腺癌の罹患率は世界的に急増している。原因として超音波診断装置の解像度が向上したこと、検診に超音波検査が導入されてきたことが考えられるが、罹患数が真に増加しているという報告もある。増加している甲状腺癌のほとんどが1cm以下の甲状腺微小乳頭癌(微小癌)であるが、その9割が進行しないことが明らかとなり、経過観察が推奨されている。微小癌が増大し進行癌となっても多くは外科治療により良好な予後が得られるが、およそ1割の症例は再発し、その中から治療抵抗性となり難治化、さらには原病死する症例もある。このように甲状腺癌は悪性度に関して非常に幅広い性質を持つ。

現在のところ、甲状腺癌の治療は最適化されているとは言えない。進行癌では画像診断をもとに手術範囲が決定され、半葉切除か全摘が選択される。甲状腺組織を全て摘出すると、甲状腺ホルモンが分泌されなくなるため、可能な場合は葉切除を行う。しかし、正常甲状腺組織が残っている場合、転移・再発時に放射性ヨード治療を行うためには事前に残存甲状腺を摘出(再手術)する必要がある。転移・再発する高リスク癌を術前に同定できれば、初回手術時から全摘術を選択でき、治療・管理の最適化、患者QOLの改善、ひいては医療経済の節約にもつながる。

現在、国内外で甲状腺癌の悪性度に関する分子メカニズムの研究が進行中である。*BRAF* 変異と*TERT* プロモーター(*TERT-p*)変異の共存が、甲状腺癌の高度悪性化と関連し、予後を悪化させることが世界中から多数報告されている。我々は共同研究により、甲状腺癌において*TERT-p*変異が検出されることを世界で初めて報告した。さらに*Ki-67LI*とこれら遺伝子変異情報を組み合わせることによって、これまでよりも高精度に予後を予測できることを報告した。

しかし、我々のさらなる解析の結果から次の3つの課題が明らかになってきた。(1)*TERT-p*変異はクローナルな変異ではないため、術前細胞診を行う際に変異を持った癌細胞を採取できない可能性がある。(2)*TERT-p*変異が無くともmRNAが高発現している症例があるが、mRNAの発現亢進と悪性度との関連、*TERT-p*変異以外の*TERT*の発現亢進に関するメカニズムは明らかでない。(3)*TERT*には複数のスプライシングバリエントが存在し、癌の悪性度との関連を示唆するデータが得られてきているが、これも未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、甲状腺癌の様々な進行段階(微小癌 → 進行癌 → 難治癌)における、悪性度の違い(経過観察可能なもの・進行するもの、予後良好なもの・難治化するもの)を規定する分子メカニズムを明らかにし、臨床応用が可能な分子マーカーを同定することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 甲状腺癌における*TERT-p*変異の術前検出について

*TERT-p*変異を術前診断における分子マーカーとして利用可能か検討するため、術前の細胞診検体と同一症例の術後摘出検体における*TERT-p*変異の一致率を解析した。

### (2) *TERT*の発現亢進と悪性度との関連・*TERT*の発現亢進に関するメカニズムの解明

*TERT* mRNAの発現をリアルタイムRT-PCR法にて確認し、*TERT-p*変異の有無や悪性度との関連を検討した。

また、*TERT* プロモーター変異が検出されなかった症例のうちmRNAの発現を認めた症例ではこの領域のDNAのメチル化が*TERT*の発現亢進や甲状腺癌の悪性度に関与しているか検討した。メチル化の解析には、bisulfite処理、メチル化特異的PCR、次世代シーケンサーによる解析を行った。

### (3) *TERT* mRNAのスプライシングバリエントと悪性度との関連

exon7と8が欠失するbeta deletion (dB)とこの部分の欠失のない*TERT* (FL)について、デジタルPCR法にて発現比を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 甲状腺癌における*TERT-p*変異の術前検出について

甲状腺癌において、*TERT-p*変異が甲状腺癌の高度悪性化と関連し、予後を悪化させることは明らかであるが、この変異の有無を術前に検討するためには、穿刺吸引細胞診(細胞診)と組み合わせる必要がある。米国The Cancer Genome Atlas (TCGA)のデータによると、乳頭癌では*TERT-p*変異は癌組織中のすべての癌細胞には存在しない、つまりクローナルな変異でないことが示唆されている。このため、術前細胞診の際に変異を持った癌細胞を採取できない可能性がある。よって*TERT-p*変異を術前診断における分子マーカーとして利用可能か検討するため、術前の細胞診検体と同一症例の術後摘出検体における*TERT-p*変異の一致率を解析した。

*TERT*プロモーター変異にはhot spotが2箇所あるが、一度に両方を区別することのできる

核酸蛍光プローブを設計し、droplet digital PCR法にて高感度に変異を検出できる方法を開発した。術後摘出検体の結果をもとに、*TERT*-p変異の術前細胞診検体における判定結果を評価すると、検出感度81.5%、特異度98.4%、陽性的中率95.7%、陰性的中率92.4%であった。*TERT*-p変異のクローナリティについて解析した結果、乳頭癌内の*TERT*-p変異陽性癌細胞の割合はほとんどの症例で100%に近く、この変異は甲状腺癌組織中のほぼ全ての癌細胞に存在する可能性が示唆された。以上の結果から、術前細胞診検体を用いた*TERT*-p変異の検出は有用であり、術前に*TERT*-p変異を検出することで、適切な術式の選択が可能となることが期待される ( Nakao, *Clinical Endocrinology* 2021 )。

(2) *TERT*の発現亢進と悪性度との関連・*TERT*の発現亢進に関するメカニズムの解明

*TERT* は正常な体細胞では発現が認められないが、*TERT*-p 変異により転写因子の新たな結合領域ができることで *TERT* の転写が活性化されると考えられている。この変異の有無と mRNA の発現量との関連を検討したところ、全ての変異陽性甲状腺癌症例で mRNA の発現を認めた。しかし変異陰性症例の中にも mRNA が発現している症例があることがわかった。さらにこれらの症例は mRNA 発現陰性症例と比較して再発リスクが高いことが明らかとなり、*TERT* mRNA 発現も甲状腺癌の新たな分子マーカーとして有用である可能性が示唆された。さらに興味深いことに、*TERT*-p 変異は年齢と非常に強い相関があることがわかってきたが、変異陰性 *TERT* mRNA 高発現症例はむしろ若年者に多く、予後予測マーカーとして高齢者では *TERT*-p 変異、若年者では *TERT* 発現が有用であることが示唆された ( Tanaka, *Thyroid* 2019 )。

近年、癌における*TERT*の発現亢進に関する新たなメカニズムとしてゲノム再編成やプロモーター領域のメチル化、遺伝子増幅が報告されている。米国大規模研究TCGAのデータを調べたところ、甲状腺癌では*TERT*遺伝子のゲノム再編や遺伝子増幅は確認されなかった。*TERT*プロモーター変異が検出されなかった症例のうちmRNAの発現を認めた症例ではこの領域のDNAのメチル化が*TERT*の発現亢進や甲状腺癌の悪性度に関与しているか検討したところ、発現量の高い症例でこの領域の高メチル化を確認した。現在、メチル化と悪性度、予後との関連を検討中である。

(3) *TERT* mRNAのスプライシングバリエーションと悪性度との関連

*TERT*-p変異や*TERT*発現は現時点で強力なマーカーであるが、マーカー陰性例はほぼ予後が良いが、マーカー陽性例は必ずしも予後が悪いとは言えず、マーカー陽性症例群にも何らかの違い・追加因子が必要であることが示唆される。*TERT* mRNAには複数のスプライシングバリエーションが存在し、バリエーションによってはテロメラーゼ活性に対するドミナントネガティブ効果や、テロメラーゼ活性以外の機能があることが報告されている。これらのバリエーションが機能の違いを生み出している可能性があると考えた。まず、比較的存在比が高いスプライシングバリエーションで、exon7と8が欠失するbeta deletion ( dB ) とこの部分の欠失のない*TERT* ( FL ) について、デジタルPCR法にて発現比を検討した。*TERT*-p変異の有無と2種類のバリエーションの発現との関連を検討したところ、FLの発現量は変異の有無で有意な差は認めなかったが、*TERT*-p変異陰性例は、変異陽性例に比べdBの発現量が有意に高く、FL/dB発現比が低値であった。さらに、FLは腫瘍径や甲状腺外浸潤などハイリスクな臨床病理学的特徴と有意な関連を示し、FL高発現症例はstage分類や再発率も有意に高い結果であった。一方、dBは甲状腺外浸潤のリスク低下と関連し、dB高発現症例はstage分類も低いことが明らかとなった。以上の結果から*TERT* mRNA発現甲状腺癌症例のうち、*TERT*-p変異陰性症例は、陽性症例に比べてdBの発現量が有意に高く、dBが甲状腺癌の悪性化に抑制的に機能することが示唆された。

以上の結果から、我々は少ないDNAサンプルからも高精度に変異を検出できるddPCR法を用いることで、術前細胞診検体から*TERT*-p変異を検出できる方法を確立し、この変異が術前細胞診における分子マーカーとして有用であることを明らかにした。術前細胞診検体で悪性度を予測できるこの分子マーカーによって、甲状腺癌の最適な治療方針選択を可能とし、患者のQOLの向上に貢献できるものと考えている。また、*TERT* mRNA発現も甲状腺癌の新たな分子マーカーとして有用であることを明らかにし、予後予測マーカーとして高齢者では*TERT*-p変異、若年者では*TERT*発現が有用であることを報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 1. Iwadate M, Mitsutake N, Matsuse M, Fukushima T, Suzuki S, Matsumoto Y, Ookouchi C, Mizunuma H, Nakamura I, Nakano K, Sakamoto A, Hirokawa M, Ito M, Naganuma H, Hashimoto Y, Shimura H, Yamashita S, Suzuki S.	4. 巻 105
2. 論文標題 The clinicopathological results of thyroid cancer with BRAFV600E mutation in the young population of Fukushima.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 e4328-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgaa573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka A, Matsuse M, Saenko V, Nakao T, Yamanouchi K, Sakimura C, Yano H, Nishihara E, Hirokawa M, Suzuki K, Miyauchi A, Eguchi S, Yoshiura KI, Yamashita S, Nagayasu T, Mitsutake N.	4. 巻 29
2. 論文標題 TERT mRNA Expression as a Novel Prognostic Marker in Papillary Thyroid Carcinomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 1105-1114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2018.0695.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Meng Z, Matsuse M, Saenko V, Yamashita S, Ren P, Zheng X, Jia Q, Tan J, Li N, Zheng W, Zhao L, Mitsutake N.	4. 巻 71
2. 論文標題 TERT promoter mutation in primary papillary thyroid carcinoma lesions predicts absent or lower 131I uptake in metastases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IUBMB Life.	6. 最初と最後の頁 1030-1040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iub.2056.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shiraiwa K, Matsuse M, Nakazawa Y, Ogi T, Suzuki K, Saenko VA, Xu S, Umezawa K, Yamashita S, Tsukamoto K, Mitsutake N.	4. 巻 29
2. 論文標題 The JAK/STAT3 and NF-kappaB signaling pathways regulate cancer stem cell properties in anaplastic thyroid cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 674-682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2018.0212.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimura K, Shibata H, Mizuno Y, Amano N, Hoshino K, Kuroda T, Kameyama K, Matsuse M, Mitsutake N, Sugino K, Yoshimura Noh J, Hasegawa T, Ishii T.	4. 巻 91
2. 論文標題 Rapid Growth and Early Metastasis of Papillary Thyroid Carcinoma in an Adolescent Girl with Graves' Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Horm Res Paediatr	6. 最初と最後の頁 210-215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000491102.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohba K, Mitsutake N, Matsuse M, Rogounovitch T, Nishino N, Oki Y, Goto Y, Kakudo K.	4. 巻 53
2. 論文標題 Encapsulated Papillary Thyroid Tumor with Delicate Nuclear Changes and a KRAS Mutation as a Possible Novel Subtype of Borderline Tumor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pathol Transl Med.	6. 最初と最後の頁 136-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4132/jptm.2018.12.07.	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 -

1. 著者名 Nakao T, Matsuse M, Saenko V, Rogounovitch T, Tanaka A, Suzuki K, Higuchi M, Sasai H, Sano T, Hirokawa M, Miyauchi A, Kawakami A, Mitsutake N.	4. 巻 95
2. 論文標題 Preoperative detection of the TERT promoter mutations in papillary thyroid carcinomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Endocrinology	6. 最初と最後の頁 790-799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen.14567	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松瀬美智子、中尾朋恵、光武範史
2. 発表標題 増悪する甲状腺乳頭癌を予測できる分子マーカー:さらなる高精度化と細胞診への応用
3. 学会等名 第63回日本甲状腺学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松瀬美智子、光武範史
2. 発表標題 甲状腺乳頭癌におけるTERTプロモーター領域のメチル化とmRNA発現の検討
3. 学会等名 第62回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松瀬美智子、酒匂あやか、Vladimir Saenko、山下俊一、光武範史
2. 発表標題 TERTの転写制御の違いと甲状腺癌悪性度との関連
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------