

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07847

研究課題名(和文) 甲状腺腫瘍の術前分子診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of preoperative molecular diagnostic methods for thyroid tumors

研究代表者

日高 洋 (HIDAKA, YOH)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30243231

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)：甲状腺腫瘍の良性悪性の鑑別診断で通常行われている細胞診には限界がある。それを補助するために本研究では、術前診断において解析すべき遺伝子を絞り込み、細胞診穿刺検体からmRNAを定量する安価で簡便な検査法を開発した。本検査法では、手術が必要である腫瘍を悪性と診断できた一方で、細胞診では乳頭癌と診断されてしまつが手術の必要がない乳頭癌様核を有する非浸潤性甲状腺濾胞性腫瘍(NIFTP)を良性と判定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺に腫瘍を認めた場合には現在、細胞診を行って良性と悪性の鑑別を行っている。しかし、細胞診で乳頭癌と診断された腫瘍をすべて手術すると過剰治療になるという問題、濾胞癌は細胞診では診断できないという問題がある。本研究で開発した検査法では、手術が必要である腫瘍を悪性と診断できた一方で、手術の必要のない腫瘍の一部を良性と診断できた。したがって、細胞診の診断補助として有用であり、安価かつ簡便であるため実用化が可能である。

研究成果の概要(英文)：Cytology, which is routinely performed in the differential diagnosis of benign and malignant thyroid tumors, has limitations. In order to support this, in this study, we narrowed down the genes to be analyzed in preoperative diagnosis and developed an inexpensive and simple test method to quantify mRNA from cytological puncture specimens. With this examination method, tumors requiring surgery could be diagnosed as malignant. On the other hand, noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP), which was diagnosed as papillary carcinoma by cytology but did not require surgery, was determined to be benign.

研究分野：臨床検査

キーワード：穿刺吸引核酸診断法 RT-PCR 甲状腺濾胞癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌は非常に予後が良い癌とされている。また、甲状腺癌の9割以上を占める乳頭癌は、穿刺吸引細胞診で極めて容易に診断できる。しかし、悪性腫瘍の5%程度を占める甲状腺濾胞癌は、良性の濾胞腺腫と極めて類似しているため多くが良性と判断され、したがって、細胞診で良性との判定をされても、経過観察を打ち切ることができない。また、近年、世界的に甲状腺癌の罹患率は急速に増加しているが、甲状腺癌の死亡率の上昇は認められず、超音波検査の普及によって本来治療が不要癌を診断・治療してしまう過剰診断が起きていることが推定されている。また、福島第一原発事故の対応として開始された福島県の18歳以下の子供全員に対する甲状腺超音波検査の結果、罹患率にして約70倍に相当する甲状腺癌が発見された。すなわち、同じ乳頭癌であっても、10代・20代の若年期にある程度増大した後成長を止めるものが非常に多数存在していることが示唆された。

甲状腺癌に関しては、転移や浸潤をきたしていても一生無害で経過するもの (Self-limiting Cancer, SLC) があることがわかってきた。このような癌が多数存在することが甲状腺癌の良好な予後につながっていたのである。癌死につながる甲状腺癌は SLC とは別の中年以降急速に増大するタイプである。超音波検査で SLC を超早期に診断することは過剰診断 (overdiagnosis) となり、不要な手術につながると同時にがん患者としての心理的負担を与えることで患者に不利益をもたらす。超音波で偶発的に見つかる甲状腺癌の90%以上は過剰診断であると推定されている。

このように、近年の甲状腺癌に関する報告から、従来の検査法では良性と診断されてしまう腫瘍の中に悪性が一定頻度混在し、また、悪性と診断されている腫瘍うちかなりの数が実際には治療が不要のものであるということがわかってきた。患者に害を及ぼさないタイプの乳頭癌の一部は近年病理学的には noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features (NIFTP) と分類され、境界領域と呼ばれるようになったが、術前の診断はやはり困難である。

このような不要な手術につながる弊害を軽減する手段として、本当に治療が必要な腫瘍のみを判定する術前診断法の確立が求められる。我々は、甲状腺腫瘍を細い針で穿刺し、細胞診の検体を作成した後、針の中に残った細胞から核酸を回収して DNA、RNA を解析することで腫瘍の性質を判定する穿刺吸引核酸診断法を世界に先駆けて開発した。

穿刺検体から mRNA を定量する方法については我々が世界に先駆けて開発し、論文として報告しているが、検査の市販については諸外国が先行している。アメリカでは2012年ころより、Afirma Gene Expression Classifier、ThyroSeq Next-generation Sequencing Assay 等が発売された。これらのキットは数百~千個以上の遺伝子を一度に解析する、という特徴がある。しかし、最近の報告されたこれらのキットの診断性能は当初の期待を裏切るものであり、その原因としては、検体の前処理をしていないため穿刺の仕方によって結果にぶれがでること、甲状腺腫瘍の診断は病理医による観察者誤差が大きく施設によって診断が異なることなどがあげられている。これらのキットは非常に価格が高く (1解析30万円程度) アメリカなど特殊な保険事情がある国以外では使用されていない。実用的な検査法とするためには、大幅なコストダウンが必要であると同時に、検体の状態に影響されない解析法を確立する必要がある。

このような状況を鑑みて、我々は検査法開発に必要な情報を蓄積するために、各種甲状腺腫瘍の遺伝子発現について企業と共同でマイクロアレイを用いて解析を進め、多数の検体から作成したデータベースを完成させている。また、穿刺検体から mRNA の解析をするための最適な方法の開発を進め、穿刺検体から同時に回収されてしまう血球細胞を除去するフィルター濾過法という新たな方法を開発し、この弊害の軽減ができることを確認している。

2. 研究の目的

甲状腺超音波検査の普及によって、世界的に甲状腺腫瘍の手術数は近年急増しており、医療コストの増大のみならず、過剰診断も深刻な問題となっている。甲状腺腫瘍の診断は術前の細胞診のみならず、術後の病理診断においても病理医による観察者誤差は非常に大きいという問題があり、客観的な分子診断の導入による助けが必要であるが、市販のキットは価格が高く、手術をした方がコストが安いという現状では普及が困難である。明らかな診断上の有用性を持ち、かつ臨床導入するために現実的な価格の検査法を導入することで、不要な手術を大幅に減少させる効果が期待でき、また日本と異なり細胞診スクリーナーの技量の低い諸外国では細胞診に優先して手術適応の判定に用いられるようになる可能性がある。このような背景を鑑み、細胞を使用した術前診断において解析すべき遺伝子を絞り込み、少数の遺伝子の発現量を単一チューブで測定することで、コストダウンを図り、安価で簡便な検査法を開発すると同時に、検体を安定して測定できる前処理法を実際の臨床検体を多数解析していくことで確立することを目標とする。

3. 研究の方法

【手術が必要な症例を選別するために有用な少数の遺伝子群の同定】

1) 以前に DNA マイクロアレイ解析にて収集した約 100 例の甲状腺腫瘍の遺伝子発現プロファイルのデータと、公開されている公共データベースから得られる甲状腺腫瘍の遺伝子発現プロファイルのデータを使用する。これらのデータベース作成に使用された症例の病理組織診のデータと、得られる範囲の臨床データから、手術が必要であったと考えられる症例を選別する。

2) 遺伝子発現プロファイルのデータをスクリーニングし、これらの症例に共通する遺伝子発現パターンを同定する。

3) 候補となる遺伝子群を抽出し、診断効率を極端に落とさない範囲で、遺伝子数を絞り込む。

【TaqMan 法による定量解析に必要なプライマー・プローブのデザイン】

本研究では遺精度の高い TaqMan 法による複数の遺伝子の発現量の同時計測を予定している。上の解析で抽出された遺伝子群に対して、それぞれに対応するプライマーとプローブをデザインする。

【複数遺伝子の単一チューブによる定量解析法の確立】

上記でデザインしたプライマーとプローブを用いて、単一チューブで逆転写から解析まで行う計測系を確立する。精度の低下が許容される範囲に収まる最低の反応試薬の量・濃度を決定することでコストダウンを図る。同時に使用する物品・機材についてもコストダウンの方法を検討する。

【臨床検体を使用した検査のトライアル】

穿刺吸引核酸診断法は、細胞診のために穿刺を実施した時に使用した針の中に残った細胞から核酸を抽出して解析する患者に負担を与えない検査法である。フィルター濾過法による検体前処理は下記の通りの手順を踏む。まず、穿刺で採取された検体をいったん低張液に懸濁してコンタミしてくる赤血球を溶血で除去し、RNA 保存液 (RNAlater) にていったん保存する。後日、35 μ m のフィルターを通すことで、塊として採取される甲状腺腫瘍細胞をメンブレン上に回収し、コンタミしている白血球を濾過で排除する。最後に、メンブレンに細胞溶解液を加えて、腫瘍細胞のみからの核酸を回収する。当方法を用いて、実際の患者検体より腫瘍由来の RNA を回収し、定量解析を行い、検査に伴う問題点を抽出し、可能なものに関しては検査法の改良を進める。

【多数検体を使用した検査の性能評価】

検査法が確定した後は、患者検体の収集を行う。主として手術適応の可能性のある対象患者に対して穿刺検体から RNA を抽出して解析する。目標検体数は 2 年間で 300 検体を目指す。その後、細胞診、手術となった場合は病理組織診、および臨床経過を評価し、検査の性能を評価する。

4. 研究成果

【手術が必要な症例を選別するために有用な少数の遺伝子群の同定】

以前に DNA マイクロアレイ解析にて収集した甲状腺腫瘍の遺伝子発現プロフィールのデータを使用し、症例の病理組織診のデータ等から手術が必要であったと考えられる症例を選別した。遺伝子発現プロフィールのデータをスクリーニングし、これらの症例に共通する遺伝子発現パターンを同定した。候補となる遺伝子群を抽出し、診断効率を極端に落とさない範囲で遺伝子数を絞り込んだ。その結果 12 個から 2 個までの遺伝子セットが抽出されたが、手術が必要な腫瘍を抽出する性能に大きな差が無く、2 個の遺伝子セットでの定量が好ましいと判断した。2 個の遺伝子を選択した場合、最も感度・特異度が高いものは TFF3 と LGALS3 のセットであり、当グループを含む複数の研究グループが以前に出した結果と一致した。

【TaqMan 法による定量解析に必要なプライマー・プローブのデザイン】

上記の 2 遺伝子に対して、それぞれに対応するプライマーとプローブを複数デザインした。デザインされたプライマーとプローブを用いて、甲状腺組織から抽出した RNA を用いて RT-PCR を実施し、下記の最も増幅効率の高いプライマーとプローブのセットを同定した。

qPCR 用プライマー

- ・ TFF3 forward TGTCCCTCCAGCTCTGCTGAGGAGTA
- ・ TFF3 reverse TTGCACTCCTTGGGGTGACAT
- ・ LGALS3 forward CTTATAACCTGCCTTTGCCTGG
- ・ LGALS3 reverse GCAACATCATTCCCTCTTTGGA

qPCR 用プローブ

- ・ TFF3 probe (5' 標識 FAM, 3' 標識 BHQ1)
CAAACCAGTGTGCCGTGCCA
- ・ LGALS3 probe (5' 標識 HEX, 3' 標識 BHQ1)
CTGATAACAATTCTGGGCACGGTGA

【複数遺伝子の単一チューブによる定量解析法の確立】

上記でデザインしたプライマーとプローブを用いて、単一チューブで逆転写から解析まで行う計測系の確立を目指した。試薬キットとしては THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit (TOYOBO) を使用した。TFF3 mRNA と LGALS3 mRNA をそれぞれの遺伝子に対応する異なる蛍光色素で標識したプローブで同時測定し、十分な増幅効率を示す最低のプライマー濃度を決定した。また、反応系の量を 10 µl まで削減した。この状態で甲状腺組織由来の RNA を用いて測定間・測定内誤差を測定したところ、測定内誤差は 10% 以下に、測定間誤差も TFF3 mRNA が低値となる検体を除けば 15% 以下に収まり、臨床検査として使用可能なレベルと考えられた。

【臨床検体を使用した検査のトライアル】

甲状腺穿刺検体からの RNA 抽出法の最適化と低コスト化を検討した。

検体の保存と運搬

検体は採取後精製せずに 4℃ にて保存していたが 1 か月程度の保存でも解析に影響をみとめなかった。運搬に関しては真夏の 2 時間程度の常温による運搬の後でも問題なく解析できた。

DNase 処理の省略

初期のプロトコールでは核酸抽出キットのマニュアルのとおり RNA 抽出作業を実施していた。このキットでは検体に混在する DNA を除くため、DNase 処理のステップが入っていた。穿刺検体に DNase 処理を加える、加えないという 2 つの条件で、結果の差異を検討した。処理の有無で、TFF3/LGALS mRNA の発現比の測定結果、および検出される RNA のコピー数に明らかな差を認めなかった。この結果を受けて、DNase 処理を省いた結果、核酸抽出の作業期間が 15 分短縮した。

フィルター付チップの使用の一部省略

RNA 抽出作業にはすべてフィルター付き、かつ RNase Free のチップを使用していたが、蛋白変性試薬が共存しているステップでは通常のチップを使用することとし、コストダウンを図った。検体の性状に特に

影響は認められなかった。

血球細胞分離時の遠心力の最適化

今回のプロトコールでは、血球細胞と甲状腺腫瘍細胞の分離に、フィルターメッシュを介して遠心することでフィルター上に甲状腺腫瘍細胞のみを残す方法（フィルター濾過法）を用いていた。しかし、血球細胞が大量に混入している穿刺検体では、1回の遠心では検体の濾過が完了せず、同じ操作を何回も繰り返したり、ピペットを用いた懸濁操作を必要とした。このような煩雑な作業を回避するため、遠心時の回転数を後の解析に影響しないレベルで最大限上げた。この変更によって、血球が大量に混入している検体でも1回の遠心分離で作業が完了するようになった。

【多数検体を使用した検査の性能評価】

これまでの検討で確立した検査法を使用して、実際の甲状腺結節を有する患者に対して穿刺吸引核酸診断を実施した。超音波所見で悪性腫瘍の可能性のある結節、あるいはサイズが大きく、高い確率で近い将来手術を必要とするであろう結節を中心に対象患者を選択した。患者から検査の実施についての同意を文書で取得した。

通常の診療と同様に、22Gの注射針を使用して穿刺吸引細胞診を実施した後、細胞診用の検体を作成した。その際に針の中に残った細胞を低張液に懸濁して赤血球を破碎した後、RNA保存液を加えた。検体は4で保存し、2週間以内をめどに腫瘍細胞のRNAをフィルター濾過法にて回収した。確立した方法に従い、TFF3 mRNA/Galecitin-3 mRNAの発現比（T/G比）を定量RT-PCRにて測定した。

新型コロナウイルス感染症の蔓延の影響を受け、検討できた症例は予定数を大幅に下回った。80例に対して検査を実施した。細胞診では検体不良が14例（17.5%）、Class II 32例（40%）、Class III 29例（36.3%）、Class IV 2例（2.5%）、Class V 3例（3.8%）であった。核酸診断ではTFF3 mRNA, Galecitin-3 mRNAの両方のコピー数が100未満のものを検体量不足による不良検体と判断した。不良検体は12例（15%）で細胞診とほぼ同等であった。

細胞診でClass II, IIIであった検体ではT/G比の結果は大きくばらついた。Class II, III間で有意な差は認めなかった。Class IV, Vの症例では一例を除き、T/G比は極端な低値を示した。

研究実施期間が短かったため、このうち手術が実施されたのは9例にとどまった。病理組織診の結果は、乳頭癌2例、未分化癌1例、濾胞腺腫1例、濾胞腺腫/腺腫様甲状腺腫2例、濾胞癌（微少浸潤型）2例、NIFTP1例である。乳頭癌と未分化癌ではT/G比は全例極端な低値を示した。濾胞腺腫と濾胞癌ではT/G比は様々な値を取り、症例数が少ないため有用性の判断はできなかった。特筆すべきはNIFTPの症例で、細胞診ではClass VであったがT/G比は高く、良性の判定で両者の判断ははっきりと乖離した。

【まとめ】

今回の検討では、計測法自体の精度、コストパフォーマンスの検証はできたが、実際の臨床検体を使用した場合の有用性についての検証は、実施例が不足していたため明らかにできなかった。少なくとも、細胞診でClass IV以上の症例についてはT/G比でも明確に区別できること、また細胞診で悪性と判断されてしまうNIFTPを良性と判断できる可能性があることがわかった。これに対して、濾胞癌を鑑別できるかどうかは、臨床的に悪性であることが確実な広範浸潤型濾胞癌が一例もなかったため不明である。また、Class II, IIIの症例でT/G比が極端に低い例が一定数あった。維芽細胞はT/G比が極端に低く、偽陽性の原因となることがわかっており、変性部位などを穿刺した場合、線維芽細胞が混入することが考えられる。今後は線維芽細胞の混入の有無を判定する方法の併用が望ましいと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshioka Nori, Deguchi Matsuo, Hagiya Hideharu, Kagita Masanori, Tsukamoto Hiroko, Takao Miyuki, Yoshida Hisao, Hamaguchi Shigeto, Maeda Ikuhiro, Hidaka Yoh, Tomono Kazunori	4. 巻 94
2. 論文標題 Comparison of extraction based and elution based polymerase chain reaction testing, and automated and rapid antigen testing for the diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 3155 ~ 3159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.27709	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 Yoshimura Sho, Tanaka Hisashi, Kawabata Shuichi, Kozawa Junji, Takahashi Hiroto, Hidaka Yoh, Hotta Masaki, Kashiwagi Nobuo, Tomiyama Noriyuki	4. 巻 40
2. 論文標題 Effect of urinary glucose concentration and pH on signal intensity in magnetic resonance images	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 930 ~ 938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11604-022-01273-2	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 Homma Hinako, Watanabe Mikio, Inoue Naoya, Isono Moeko, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 31
2. 論文標題 Polymorphisms in Vitamin A-Related Genes and Their Functions in Autoimmune Thyroid Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 1749 ~ 1756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2021.0312	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 Kawabata Mayumi, Inoue Naoya, Watanabe Mikio, Kobayashi Ayaka, Hidaka Yoh, Miyauchi Akira, Iwatani Yoshinori	4. 巻 54
2. 論文標題 PD-1 gene polymorphisms and thyroid expression of PD-1 ligands differ between Graves' and Hashimoto's diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 450 ~ 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08916934.2021.1946796	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 Okamoto Mami, Watanabe Mikio, Inoue Naoya, Ogawa Kazane, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 67
2. 論文標題 Gene polymorphisms of VEGF and VEGFR2 are associated with the severity of Hashimoto's disease and the intractability of Graves' disease, respectively	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 545 ~ 559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ19-0480	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 Takao Miyuki, Yoshioka Nori, Hagiya Hideharu, Deguchi Matsuo, Kagita Masanori, Tsukamoto Hiroko, Hidaka Yoh, Tomono Kazunori, Tobe Toru	4. 巻 26
2. 論文標題 Risk for the occupational infection by cytomegalovirus among health-care workers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 681 ~ 684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.02.011	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0件

〔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
研究分担者	高野 徹 (TAKANO TORU) (00263236)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師 (14401)	

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
---------	---------