

平成 21年 5月 18日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591517  
 研究課題名（和文） 細胞診検体を用いた定量的FISH法によるテロメア測定法の甲状腺癌診断への臨床応用  
 研究課題名（英文） Clinical application to thyroid cancer diagnosis of the telomere measuring method by the quantitative FISH method using the sample of the cytology  
 研究代表者  
 天野 定雄 (AMANO SADAŌ)  
 日本大学・医学部・准教授  
 研究者番号：80159459

研究成果の概要：基礎実験として、進行甲状腺乳頭癌が正常甲状腺組織細胞と比較してtelomere長が短縮していることを組織Q-FISH法にて確認した。甲状腺未分化癌の培養細胞をでは、telomere短縮とsubtelomere異常が存在していた。Telomere代謝と甲状腺癌との関連を明らかにすることが出来たので、今後は細胞診検体を用いての臨床応用への展開を模索したい。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：乳腺内分泌外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学

キーワード：甲状腺、細胞診検体、甲状腺乳頭癌、Q-FISH法、telomere、telomerase、加齢

## 1. 研究開始当初の背景

O'Sullivanら(Nature Genetics '02)は、組織Q-FISH法を用いたtelomere研究で、潰瘍性大腸炎から癌に至る過程で、上皮細胞の異型が増加し、癌に移行するにつれ、テロメア長が短縮し癌では正常よりテロメアが

短縮していると報告しています。また、我々の基礎研究では甲状腺乳頭癌の一部ではテロメア長が短縮せず、テロメラーゼ活性を獲得しないものが存在することが確認されています。以上から、甲状腺分化癌の組織Q-FISH法によるテロメア長測定

で極めて短いテロメアを所持する癌が将来的に未分化癌へ転化すると予想され、甲状腺癌の術前診断の補助診断法として穿刺吸引細胞診を行っています。細胞診検体から癌組織のテロメア長測定が有用であれば、低侵襲で甲状腺癌手術の切除範囲、郭清レベル決定などの治療方針決定に役立つ可能性があると考えられます。組織切片上でQ-FISH法により細胞ごとのテロメア長を比較する方法を確立しました。一方、甲状腺分化癌は加齢とともに **malignancy potential** が増大し未分化転化が生じることが知られている。そして、染色体の保護のために存在するテロメアDNAは、がん化や老化で短縮することが知られている。以上より、甲状腺分化癌とテロメア代謝の検討は、甲状腺未分化転化を解明する手立てとなりうる可能性が存在すると考えられます。

## 2. 研究の目的

甲状腺分化癌(乳頭癌, 濾胞癌)は、低悪性度の癌として知られ術後の10年生存率は90%であるといわれています。しかし、甲状腺分化癌は他の固形癌と異なり加齢(45歳以上)とともに悪性度が上昇します。これは、高齢者の甲状腺分化癌の5-10%に未分化転化という過程を経て最も予後の悪い癌の1つである甲状腺未分化癌が発生するためであります。

一方、甲状腺腫瘍および結節は、米国にてごく一般的に存在し成人の5-10%そして剖検例の50%以上に存在すると報告されています。そして、その甲状腺腫瘍のうち5-10%のみが悪性腫瘍であるのですが、一部の甲状腺悪性腫瘍と良性腫瘍は術前に鑑別しづらいことから、甲状腺腫瘍のほとんどが

手術適応となっているのが現状です。

ところで、染色体末端のテロメアは、染色体の安定に重要な役割を担っています。テロメアは細胞分裂により短縮し、5-6kbpに短縮すると正常細胞は細胞分裂を停止します。多くの癌細胞はテロメアを伸長させるテロメラーゼを発現していますが分裂回数増加による短縮が激しいために、正常細胞の短縮したテロメアよりさらに短いテロメア長(2-4kbp)でも不死化細胞として生存しつづけると考えられています。

我々は、甲状腺悪性腫瘍と良性腫瘍の判別にテロメラーゼ活性とテロメア長測定が利用できること(Kammori M et al, 2000, *Cancer Lett.*)を報告しました。また、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別には、テロメラーゼの発現決定遺伝子であるhTERT mRNAの発現を*in situ hybridization*(ISH)を用いて行うことが有用であることも報告しました(Kammori M et al, 2002, *Int J Oncol.*)。

テロメラーゼやhTERT mRNAの発現が、癌化の早期から生じることからこの測定は癌と良性腫瘍の鑑別法として有用であることが我々の研究により示されています(Kammori M et al, 2005, *Int J Oncol*, 2002, *Clin Endocr-inology*など)。

他方、'96年にLansdorpらにより、細胞分裂中期の染色体個々のテロメア長が、定量的(Q-)FISH法を用いて正確に測定が可能になりました。共同研究者の神森は、2002年から2年間Lansdorp研究室に留学し、mouseのテロメア制御因子(Rtel)のknock out mouseのテロメア測定を共同研究して報告しました(*Cell*, 2004, Ding, 神森(共著者4番目), Lansdorp)。

この手法を組織切片上でテロメア長測定に応用し(組織Q-FISH), 分担研究者神森らは、食道扁平上皮癌とそれに対応する非癌

部の食道組織のテロメアを測定し、癌と非癌部の食道上皮は非担癌者の正常食道組織よりテロメアが短縮していることを報告しました

(Kammori M et al, 2006, Oncology)。

### 3. 研究の方法

組織Q-FISHによる甲状腺正常細胞(甲状腺濾胞細胞, 傍濾胞細胞), 甲状腺未分化癌, 甲状腺乳頭癌, 甲状腺濾胞癌, 濾胞腺腫, 腺腫様甲状腺腫の組織切片からテロメア長を測定:

甲状腺腫瘍を含むパラフィンブロックから病理組織検査用切片と組織Q-FISH用組織切片を薄切し、病理組織検査用切片はHE染色し、顕微鏡検査を行います。組織Q-FISHは、パラフィン切片を脱パラシエタノール系列にて脱水、風乾したのち、組織切片を0.2N HClに20分間、ddH<sub>2</sub>O 10分間、1M NaSCN (80°C)30分間、ddH<sub>2</sub>O 3分間浸漬します。

次いで、切片をペプシン(1mg/ml acid H<sub>2</sub>O, 37°C) 15分間処理し、ddH<sub>2</sub>O 3分間、その後脱水します。RNase A (0.5 ug/ml, 37°C) 10分間、PBS 5分間処理した後、エタノール系列にて脱水、風乾します。

DNA のディネイチャーとハイブリダイゼーション(暗室)処理のため、PNA probe (Cy3-telo, FITC-cenp1)を加えてカバーガラスで覆います。80°C 3分間でディナチュレーションし、湿潤環境で1-2時間のハイブリダイゼーションを行います。その後、Wash I液で15分間、4回洗浄、TBSTで5分間4回洗浄後、エタノール系列にて脱水し、核染蛍光物質 DAPI+Vectashield で封入し顕鏡もしくは冷暗所保存する。

蛍光顕微鏡による画像撮影:

冷暗所保存されたプレパラートを1週間以内に蛍光顕微鏡で撮影し、画像を蛍光高度測定ソフト(Image Pro Plus 5.0 or Isis Metasystems 4)で蛍光量測定を行う。

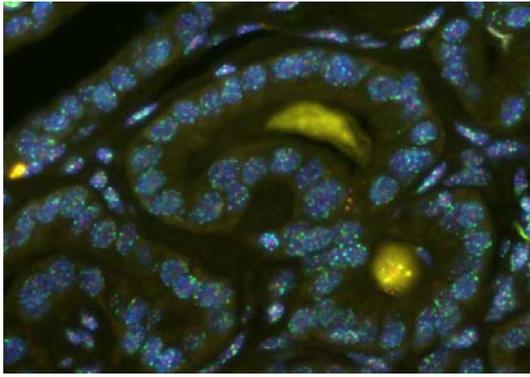
組織Q-FISH用テロメア解析ソフト(TFL2004)によるテロメア長計測:

組織Q-FISH用テロメア解析ソフト(TFL2004)によって得られたdataを解析し正常甲状腺組織(濾胞細胞, 傍濾胞細胞)および甲状腺乳頭癌, 濾胞癌, 甲状腺濾胞腺腫, 腺腫様甲状腺腫のそれぞれの平均テロメア長を算出します。続いて、それぞれの腫瘍、組織ごとのテロメア長分布図を作成し、テロメアが長いものと短いものに特徴的な違いがあるのかを検討しました。

### 4. 研究成果

基礎実験として、17名の甲状腺乳頭癌とその対応する正常甲状腺組織の細胞(甲状腺濾胞細胞, 正常線維芽細胞, 癌周囲線維芽細胞)の細胞ごとのtelomere長を組織FISH法にて測定した。また、甲状腺未分化癌の培養細胞を利用して、そのtelomere長とカリョタイピングで得られた情報を元に個々の染色体ごとのsubtelomereの変化をFISH法にて検討した。

甲状腺乳頭癌では、腫瘍径が20mm(T2)を超えると有意に正常細胞(甲状腺濾胞細胞, 正常線維芽細胞, 癌周囲線維芽細胞)と比較してテロメア短縮が出現していた。また、その他の臨床病理学的因子と甲状腺乳頭癌のテロメア短縮との間には、有意差を認めなかった。



甲状腺乳頭癌の組織Q-FISH  
(red: telomere, green: centromere,  
blue: nuclear)

培養細胞系の甲状腺未分化癌はテロメラーゼ活性を維持しつつも他の正常細胞と比較して有意に短いテロメア長を有していた。また、正常な染色体以外に特異的にsubtelomereの欠損を認める11番染色体の増加を認め、テロメアsubtelomere機構が甲状腺癌の未分化転化と関係している可能性が示唆された。

今後は、本研究によって得られたデータを下に細胞診検体を用いた組織Q-FISH法を確立し、甲状腺分化癌が未分化転化するメカニズムを解明できるようにこの研究を発展させたいと考えている。

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kammori M, Kashio M, Amano S, Yamada T, Demonstration of telomere measurement in human papillary carcinoma of the thyroid by tissue quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH). The 16<sup>th</sup> Asian Pacific Endocrine Congress, GUAM, 2009.1.12.

- ② 神森 眞, 柏尾光彦, 倉林理恵, 坂本明子, 天野定雄, 田久保海誉, 甲状腺乳頭癌と甲状腺正常組織の組織Q-FISH法を用いたテロメア長解析. 第108回日本外科学会定期学術集会 (SF), 長崎, 2008.5.15.

- ③ 柏尾光彦, 神森 眞, 天野定雄, 田久保海誉; 組織Q-FISH法を用いた甲状腺乳頭癌のテロメア長解析. 第40回日本甲状腺外科学会学術集会. 東京 10.18-19, 2007.

- ④ 柏尾光彦, 神森 眞, 倉林理恵, 坂本明子, 天野定雄, 岡野匡雄, 田久保海誉. Demonstration of telomere measurement in human papillary carcinoma of the thyroid by tissue Q-FISH. 第66回癌学会総会 (English workshop), 横浜, 2007.10.3-5.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

天野 定雄 (AMANO SADAOU)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：80159459

### (2)研究分担者

神森 眞 (KANMORI MAKOTO)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号：50292868

柏尾 光彦 (KASIO MITSUHIKO)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：20343577

### (3)連携研究者

なし