

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590570

研究課題名(和文) 悪性リンパ腫の穿刺吸引核酸診断法の臨床検討

研究課題名(英文) Establishment of aspiration biopsy-nucleic acid diagnosis detecting IgH monoclonality in malignant lymphoma

研究代表者

高野 徹 (TAKANO TORU)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00263236

研究成果の概要(和文)：甲状腺の悪性リンパ腫を疑う症例を対象としてVR法による穿刺吸引核酸診断を施行し、IgH遺伝子のモノクロナリティーの有無を検討した。このうち生検となった症例については橋本病の2例中0例、悪性リンパ腫の11例中7例(63.6%)でIgH遺伝子のモノクロナリティーは陽性を示した。VR法を広く普及させるため卓上遠心機とサーマルサイクラーのみでより簡便にVR法を実施するsingle tube法を開発した。

研究成果の概要(英文)：VR was performed in patients suspected having thyroid malignant lymphoma. 0 of 2 and 7 of 11 patients of Hashimoto's and malignant lymphoma, respectively, showed a positive result in monoclonality in the IgH gene. A single tube VR method, which requires only a microcentrifuge machine and thermal cycler, was established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：医学一般・病態検査学

キーワード：悪性リンパ腫、甲状腺、IgH遺伝子、モノクロナリティー、穿刺吸引細胞診

## 1. 研究開始当初の背景

頸部のリンパ節腫脹や甲状腺の炎症性疾患である橋本病は日常よく眼にする病態である。これらは悪性リンパ腫との鑑別診断がしばしば困難で、確定診断に至るためには手術による組織摘出と病理組織診断が必要である。頸部悪性リンパ腫は小さいうちに発見できれば放射線療法でほぼ完治が期待できるが、手術生検は侵襲が大

きく目立つ位置である頸部に大きな傷が残るため、施行をためらうことが多い。しかし、従来行われている細胞診では反応性のリンパ球浸潤と悪性リンパ腫の鑑別は非常に困難である。そこで我々は細い針での穿刺検体からの核酸解析によって診断する穿刺吸引核酸診断法の開発を試みている。

頸部および甲状腺に発生する悪性リン

パ腫の多くが B 細胞由来であるため、ゲノム上でイムノグロブリン重鎖 (IgH) 遺伝子の再構成 (rearrangement) を起こしている。反応性の節腫脹や橋本病では正常の B 細胞がさまざまな rearrangement を起こすため、IgH の配列はポリクローナルであるのに対し、悪性リンパ腫では一つの B 細胞から腫瘍性に増殖しているためモノクローナルである。組織のサザンブロットで IgH 遺伝子のモノクロナリティーを検出することは B 細胞由来の悪性リンパ腫の信頼性の高い診断手段である。しかし、サザンブロットでは  $10\mu\text{g}$  のゲノム DNA が必要な のに対し、穿刺検体中から回収できる DNA は 200ng 程度であるため、直接の解析は不可能である。

我々は 200ng の DNA から IgH 配列のモノクロナリティーを判定する方法として Vectorette PCR-Restriction Enzyme (VR) 法を開発した。VR 法はベクトレット PCR 法により IgH 遺伝子の J 領域 3' 端を基点として上流の配列を増幅するとともに、制限酵素処理により再構成を起こしていないゲノムを除去して検出感度を上げることで、検体中の IgH 配列がモノクローナルであるかどうかを高感度で判定することができる (平成 22 年に国内特許が成立)。

VR 法はサザンブロット法に匹敵する感度と特異度を持つ検査法であり、組織検体での検討結果では甲状腺原発悪性リンパ腫の約 80% で IgH 遺伝子のモノクロナリティーが陽性であると判定され、良性疾患である橋本病では全例陰性と判定される (Takano T, J Clin Endocrinol Metab 2005)。さらに患者の穿刺検体では橋本病の 1 例 0 例 (0%)、悪性リンパ腫の 8 例中 4 例 (50%) が VR 法による術前判定で IgH 配列のモノクロナリティーが陽性であった。(Takano T, Leukemia Res 2008)

以上の結果より VR 法を用いた穿刺吸引核酸診断法は悪性リンパ腫の低侵襲検査として有用であることが示唆されたが、以下の問題点が残った。第一に手術生検までに至った症例数が少なく、さらに多数の症例で検査の性能を検討する必要があること、第二に穿刺検体での VR 法を用いた IgH 配列のモノクロナリティーの陽性率が組織標本を用いた場合と比較して低かったことである。この原因として穿刺での腫瘍細胞採取の際に、強い陰圧をかけた場合相当量の末梢血を同時に吸引し、末梢血に含まれる正常 B 細胞が VR 法によるモノクロナリティー検出を阻害し、偽陰性となって

いることが考えられた。

## 2. 研究の目的

VR 法による穿刺吸引核酸診断を悪性リンパ腫と橋本病の鑑別診断が必要な患者に対して施行し、経験症例数を増やす。その過程で実際の患者での施行する上での問題点を抽出し、解決に努め、VR 法による悪性リンパ腫の低侵襲診断法としての信頼性を高める。また、一般病院での VR 法の施行が可能であるようにプロトコールの簡易化を進める。

## 3. 研究の方法

1) 悪性リンパ腫を疑う患者に対して穿刺吸引を施行し、回収された細胞から DNA を抽出して VR 法を施行する。穿刺時の末梢血の混入状態を評価する指標として穿刺検体中の赤血球数を同時に測定し、末梢血の混入が多い不良検体と判断し、モノクロナリティーが検出されない場合でも判定保留として再穿刺を要請することとする。VR 法の結果と細胞診断、また生検まで施行された場合はその結果と比較検討する。

2) 悪性リンパ腫から採取された DNA と末梢血から抽出した DNA を比率を変えて混ぜて VR 法によるモノクロナリティー解析を施行し、不良検体と判断するためののデシジョンレベルを決定する。

3) 一般病院での VR 法の施行が可能となるように卓上遠心機とサーマルサイクラーのみで最後まで施行できるようプロトコールの改変を試みる。

## 4. 研究成果

1) 悪性リンパ腫を疑う症例を対象とした VR 法を使用した穿刺吸引核酸診断法の実施

症例の集積を進めたが、穿刺の実施に至ったのが 40 例、腫瘍細胞からベクトレット PCR での解析を施行するのに十分な DNA が回収されたのは 21 例にとどまった。症例数が限定されてしまった原因としては、元々甲状腺由来の悪性リンパ腫は非常に珍しい病態であり、症例数が少ないため、今回対象となった病院の患者だけでは数が限られてしまったこと、良性疾患である橋本病に対して穿刺吸引細胞診の施行を避ける傾向がここ数年強まったことが挙げられる。腫瘍細胞からの DNA の回収量が少なかった理由として、これらの症例の多くが超音波検査や臨床像からは悪性リンパ腫よりも橋本病を疑うものであり、線維化が進んでいて組織に浸潤しているリンパ球の回収量が少なかったためと考えられた。こ

れは検査時に同時に作成した細胞診用のスライドグラスでリンパ球の数を計測することで確認された。このうち生検まで至った症例は13例であり、生検の結果は橋本病が2例、悪性リンパ腫が11例であり、橋本病の2例はいずれもIgH遺伝子のモノクロナリティーは陰性、これに対して悪性リンパ腫の11例のうち7例(63.6%)で陽性を示した。このうち2例は同一症例の甲状腺の別の部位からの穿刺であり、ベクトレットPCRで同一の部位にバンドが見られた。このことより、VR法の再現性が良いこと、またこの症例における2か所の腫瘍は1つの腫瘍細胞に由来する腺内転移であることが証明された。VR法における偽陰性の原因として穿刺時の末梢血の混入を考え、穿刺検体中の赤血球数をモニターしていたが明らかに末梢血の混入が原因で偽陰性を呈したと考えられる症例は確認できなかった。

## 2) 穿刺検体中への末梢血の混入のVR法の判定に与える影響

過去にVR法陽性が確認されている悪性リンパ腫組織からゲノムDNAを抽出した。また健常人末梢血を採取し、同じくゲノムDNAを抽出した。両者を比率を変えて混合し、VR法のプロトコールに従い、制限酵素処理、ベクトレットリンカーの結合、制限酵素処理による再構成を起こしていない遺伝子の増幅過程からの除去、nested PCRによる再構成された遺伝子断片の増幅を行った後、アガロースゲル電気泳動により、モノクローナルなPCR産物の増幅が確認できるかどうか判定した。複数の検体で実施した結果、モノクローナルなバンドがどの長さで検出されるかにより多少の変化はあるものの、末梢血由来のDNAと悪性リンパ腫組織由来のDNAがおおよそ10:1以上であればモノクロナリティーが明確に判定できることがわかった。この結果から換算すると、穿刺検体中にB細胞数としては同数、白血球数としては1/10、赤血球数としては1/10000以上の数の腫瘍細胞が存在すればモノクロナリティーの判定が可能であることとなる。したがって、今後穿刺検体を使用してVR法を施行する場合、上記のレベルを超える末梢血の混入が考えられる場合は、不良検体の疑いありとして再穿刺を勧めることが望ましいと判断された。

## 3) VR法のプロトコールの改変

今回の検討で症例数の集積が少な

かったことやVR法が広く普及しない原因として、甲状腺由来の悪性リンパ腫の頻度が非常に低く、また特定の病院に症例が集中することがないことが考えられた。今後、VR法の実施件数を増やすためにはVR法のプロトコールを特殊な器具を使用しないものに改変して、どの病院でも対象となる患者が出た場合に簡単に実施できるようなものにする必要がある。従来のVR法ではミリポア社の吸引ろ過器具を使用していたがこれを使用しないで卓上遠心機とサーマルサイクラーのみで実施するプロトコールの開発を試みた。方法としては下記の2つを施行した。

- ① 1回目のPCR後、吸引器を使用せずにPCR産物をカラム精製して、精製物を2回目のPCRで増幅する(カラム精製法)
- ② 1回目のPCRを低濃度のプライマーを使用して低容量で施行し、その後高濃度のinternal primerを含んだ2回目のPCRの反応液を大量に加えて増幅する(single tube法)。

過去に収集した悪性リンパ腫から採取したDNAを使用して上記の2方法でIgH遺伝子のモノクロナリティーの検出が可能かどうか検討した。どちらの方法でも従来の吸引器を使用する方法と同様にIgHのモノクロナリティーの検出が可能であったが、single tube法では条件によってはPCR後に余分なバンドが出現し、false positiveの結果をもたらすことがあった。これに対し、カラム精製法では従来法に比較して感度が悪く、本来出ていたモノクロナリティーのバンドが消失することがありfalse negativeの結果をもたらす可能性が考えられた。したがって、方法としてはsingle tube法が望ましく、この方法を使用することで特殊な器具を持っていなくてもVR法が施行できることが確認された。

## 4) 総括

今回の検討では症例数の蓄積は十分ではなかったものの、VR法によって穿刺検体中のIgH遺伝子のモノクロナリティーが効率よく検出されることが確認できた。また、より簡便なプロトコールの確立に成功したことにより今後、より多くの施設でVR法を実施できるようになるものと考えられる。また、当研究期間中に本法の特許が成立し、今後悪性リンパ腫を疑う場合のルーチン検査の1つとして確立していくための後押しとなるものと期待される。

## 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)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Maruo, R., Yamada, H., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani Y., and Takano T. mRNA quantification after fluorescence activated cell sorting using locked nucleic acid probes. *Mol biotechnol* (in press) 査読あり
- ② Takano. T. The fifteen percent issue in molecular-based diagnosis of follicular thyroid carcinoma. *Pathol Int* 61: 165-166, 2011. 査読あり
- ③ Yamada, H., Takano, T., Matsuzuka, F., Watanabe, M., Miyauchi, A., and Iwatani, Y. Transcriptional activity of the 5' -flanking region of the thyroid transcription factor-1 gene in human thyroid cell lines. *Genetics Mol Biol* 34: 6-10, 2011. 査読あり
- ④ Yamada, H., Maruo, R., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., and Takano, T. Messenger RNA quantification after fluorescence activated cell sorting using intracellular antigens. *Biochem Biophys Res Commun* 397: 425-428, 2010. 査読あり
- ⑤ Yamada, H., Maruo, R., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., and Takano, T. mRNA quantification after FACS using *in situ* hybridization. *Cytometry A* 77A: 1032-1037, 2010. 査読あり
- ⑥ Kuroda, S., Watanabe, M., Santo, T., Shimizuishi, Y., Takano, T., Hidaka, Y., Kimura, T., and Iwatani, Y. Postpartum increase of serum thioredoxin concentrations and the relation to CD8 lymphocytes. *Ann Clin Biochem*, 47: 62-66, 2010. 査読あり
- ⑦ Takano, T and Yamada, H. Trefoil Factor 3 (TFF3): A promising indicator for diagnosing thyroid follicular carcinoma. *Endocr J*, 56:9-16, 2009. 査読あり
- ⑧ Takano. T., Yane, K., Oue, T., Otsuki, N., Nibu, K., and Hidaka, Y. Outpatient administration of radioactive iodine after total thyroidectomy for pediatric thyroid cancer: a report of three cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 73: 1810-1813, 2009. 査読あり
- ⑨ Yamada, H., Takano, T., Ito, Y., Matsuzuka, F., Miya, A., Kobayashi, K., Yoshida, H., Watanabe, M., Iwatani, Y., and Miyauchi, A. Expression of nestin mRNA is a differentiation marker in thyroid tumors. *Cancer Lett* 280: 61-64, 2009. 査読あり
- ⑩ Ito, Y., Yoshida, H., Maruo, R., Morita, S., Takano, T., Hirokawa, M., Yabuta, T., Fukushima, M., Inoue, H., Tomoda, C., Kihara, M., Uruno, T., Higashiyama, T., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F., and Miyauchi, A. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients. *Endocr J* 56: 89-97, 2009. 査読あり
- ⑪ Nojima, J., Iwatani, Y., Ichihara, K., Tsuneoka, H., Ishikawa, T., Yanagihara, M., Takano, T., and Hidaka, Y. Acquired activated protein C resistance is associated with IgG antibodies to protein S in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Res*, 124: 127-131, 2009. 査読あり
- ⑫ Maeda, I., Yamada, H., Takano, T., Nishihara, E., Ito, Y., Matsuzuka, F., Miya, A., Kobayashi, K., Yoshida, H., Miyauchi, A., and Hidaka, Y. Increased expression levels of tensin3 mRNA in thyroid functional adenomas as compared to non-functioning adenomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 117: 191-193, 2009. 査読あり
- ⑬ Nojima, J., Masuda, Y., Iwatani, Y., Kuratsune, H., Watanabe, Y., Suehisa, E., Takano, T., Hidaka, Y., and Kanakura, Y. Arteriosclerosis obliterans associated with anti-cardiolipin antibody/beta2-glycoprotein I antibodies as a strong risk factor for ischaemic heart disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 47: 684-689, 2008. 査読あり
- ⑭ Takano, T., Higashiyama, T., Uruno, T., Yamada, H., Yoshida, H., and Miyauchi, A. Preparation of thyroid tumor cells in aspiration biopsies fro aspiration

bipsy-nucleic acid diagnosis. Head & Neck, 30: 983-990, 2008. 査読あり

[学会発表] (計8件)

- ① 高野 徹、甲状腺癌へのアプローチ：新たな発癌理論、芽細胞発癌説(fetal cell carcinogenesis)で見た甲状腺癌の臨床(Meet the Specialist)、第20回 臨床内分泌代謝Update 2011年1月28日、札幌市
- ② 高野 徹、新たな発癌理論、芽細胞発癌説(fetal cell carcinogenesis)の理論と実践、第49回日本臨床細胞学会秋季大会、2010年11月21日、神戸市
- ③ 高野 徹、細胞材料からの核酸診断—穿刺吸引核酸診断法の開発の経験から、第49回日本臨床細胞学会秋季大会、2010年11月21日、神戸市
- ④ 高野 徹、山田 宏哉、 渡邊 幹夫、岩谷 良則、日高 洋、甲状腺腫瘍に対する穿刺吸引核酸診断法の開発、第57回日本臨床検査医学会学術集会、2010年9月11日、東京
- ⑤ 高野 徹、芽細胞発癌説(fetal cell carcinogenesis)がリードする癌研究の新展開、第267回 伊藤病院クリニカルカンファレンス、2009年6月16日、東京
- ⑥ 高野 徹、多段階発癌説に代わる発癌理論：芽細胞発癌説(fetal cell carcinogenesis)と癌研究の新戦略、第82回日本内分泌学会学術総会、2009年4月24日、前橋市
- ⑦ 高野 徹、新規発癌モデル、芽細胞発癌説(fetal cell carcinogenesis)と臨床検査の将来、第54回日本臨床検査医学会中国・四国支部総会、第149回日本臨床化学中国支部例会・総会、第19回日本臨床化学会四国支部例会・総会 第5回

合同地方会、2009年2月8日、岡山市

- ⑧ 高野 徹、多段階発癌説に代わる発癌理論：芽細胞発癌説(fetal cell carcinogenesis)の理論と実践(シンポジウム)、第41回日本甲状腺外科学会学術集会 2008年10月16日、東京

[産業財産権]

○取得状況(計2件)

名称：甲状腺腫瘍マーカーおよび甲状腺腫瘍の分子分類法  
発明者：高野 徹  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：第4428932号  
取得年月日：平成21年12月25日  
国内外の別：国内

名称：再構成された遺伝子の単クローン性を判定する方法、およびこれを利用した腫瘍性病変の鑑別方法  
発明者：高野 徹  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：第4587715号  
取得年月日：平成22年9月17日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等  
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/lab/bo/www/CRT/CRT%20Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 徹 (TAKANO TORU)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：00263236

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )