

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590367

研究課題名（和文）

甲状腺高悪性度腫瘍（低分化癌・未分化癌）の遺伝子異常プロファイルの多角的解析研究

研究課題名（英文）

Diversified studies on the genetic background of high-grade malignant thyroid tumors

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（和文）：

我々は甲状腺癌の遺伝子背景について多面的な観点から検討した。その結果、分化癌（乳頭癌や濾胞癌）から低分化癌や未分化癌のプログレッションには、*BRAF* 遺伝子突然変異が重要で、*RET* 遺伝子の再構成はこのプログレッションとの関係は見いだされなかった。さらに従来、濾胞癌の発生に関係するといわれている *PPAR γ /PAX8* 遺伝子もこのプログレッションには見いだされなかった。今回の検討では、甲状腺分化癌の進展増殖にアクアポリン (AQP) のタイプ 4 が強く関係したが、未分化癌でのアクアポリンはこれまでのところ見いだされず、今後の課題となった。これらの結果は、甲状腺癌の病理学的理解に重要で、さらに将来的な分子標的治療の確立にも有用なものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We have performed diversified studies on the genetic background of thyroid cancers and found some interesting findings as follows:

- 1) The point mutation of BRAF gene can play an important role in the progression mechanism from well differentiated thyroid cancer to undifferentiated thyroid cancer.
- 2) Our studies revealed that RET gene rearrangements and/or *PPAR γ /PAX8* is not important for the undifferentiated progression.
- 3) It was interesting that aquaporin 4 can be related to follicular cell derived thyroid tumors and not expressed in undifferentiated thyroid carcinoma.

In conclusion, these findings described above can be important for understanding thyroid cancer pathology and molecular therapies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：甲状腺癌、未分化癌、遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌の遺伝子背景に関しては、*BRAF* 遺伝子、*RET/PTC* 遺伝子、*P53* 遺伝子、*PPAR γ* /*PAX8* 遺伝子などの関わりを検討し、乳頭癌、濾胞癌などの分化癌と異なることを解明し、さらに、*RET* 遺伝子再構成に関しては、乳頭癌での診断的有用性やこの遺伝子変異が乳頭癌の組織発生に関連していないこと検討している。また、*RET* 遺伝子再構成に関しては、従来日本人では定率とされてきたが、日本人と欧米人では差が無いことも証明した。一方、近年、WHO の甲状腺腫瘍分類や日本の取り扱い規約分類が改定され、分化癌と未分化癌の間に低分化癌の概念が導入されるに至った。研究代表者の加藤はイタリアの Turin で行われた低分化癌の診断基準の国際的コンセンサス作成に参加し、Turin proposal を発表した。未分化癌の発生に関しては、高分化癌から転化する転化説と正常濾胞上皮細胞から直接発生する de novo 説がある。米国ピッツバークの Nikiforov を中心とするグループが、甲状腺癌に関する一連の遺伝子研究 *BRAF* 遺伝子の突然変異が甲状腺の未分化癌の発生に重要な役割を果たすことを示唆してきた。しかしながら、どちらの説も遺伝子変異のレベルで十分に解析されているとはいえず、さらに低分化癌の遺伝子背景は現在でもなおほとんど知られていないといわざるをえない。さらに、高分化癌、低分化癌、未分化癌の段階的プログレッションに関して検討も行われていない。

一方、甲状腺細胞の機能的な因子である甲状腺転写因子 (TTF-1) の検討や水輸送体タンパク (アクアポリン) の発現を検討してきたが、これらの機能的な遺伝子の発現につい

ても、従来の遺伝子と同様に検討課題とした。

2. 研究の目的

甲状腺癌の高分化癌は予後良好な腫瘍として知られているが、同じ器官から発生する低分化癌や未分化癌は予後が悪く (高悪性度甲状腺腫瘍)、また治療法も現在もなお確立されていない。甲状腺の高悪性度腫瘍に関して、もともと存在した分化癌からの転化 (低分化癌ないし未分化癌転化: anaplastic transformation, dedifferentiation) により発生するという説と正常濾胞上皮細胞から直接発生するという de novo 説が想定されている。そこで、本研究では甲状腺高悪性度腫瘍を多角的遺伝子解析し、さらに従来知られている遺伝子変異に加えて、アクアポリンなどの機能的遺伝子の発現やその意義についても検討した。具体的には以下のことを目的とした。

(1) 高分化癌 (乳頭癌、濾胞癌) ととも低分化癌と未分化癌の遺伝子変異を多角的に解析して、これらの高悪性度甲状腺腫瘍の遺伝子プロファイルを作成する。

(2) 高分化癌と高悪性度腫瘍の合併 (併存) 腫瘍で、それぞれの成分の遺伝子プロファイルを比較検討し、腫瘍の転化メカニズムを解明する。 また、転化しやすい高分化癌を遺伝子背景のレベルで診断できるかどうかも検討。

(3) 甲状腺分化癌、未分化癌、髄様癌などにおけるアクアポリーポリン (AQP) の subtype を明らかにして、分子標的治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 甲状腺癌の手術材料を用いた。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部から集めた。その内訳は、164例のヒト甲状腺組織で、12例のバセドウ病甲状腺、38例の腺腫様甲状腺腫、20例の濾胞癌、52例の乳頭癌、10例の濾胞癌、10例の未分化癌、20例の髄様癌が含まれる。これらの組織診断は、WHO分類によった。腫瘍の診断は当研究者のうち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 μ 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。

(3) アクアポリンのサブタイプ (AQP3 と AQP4) の発現に関する検討では、濾胞上皮由来の腫瘍、過形成では、AQP4 が細胞に発現し、一方、AQP3 は髄様癌だけに発現することがわかった。未分化癌はいずれも陰性で、そのサブタイプの解明は今後の課題となった。

この結果、従来知られているいくつかの遺伝子異常の中で、RET 遺伝子と BRAF 遺伝子突然変異は、高分化癌(乳頭癌)でのみで発現し、同じ高分化癌でも濾胞癌での発現はみられなかった。一方、未分化癌では RET 遺伝子の異常は見られず、BRAF 遺伝子の突然変異だけが証明された。これより、未分化癌は BRAF 遺伝子突然変異を有する乳頭癌から転化し、RET 遺伝子の異常を持つ乳頭癌からは発生しないことが示唆された。

また機能的な遺伝子である、甲状腺転写因子 (TTF-1) やアクアポリン (AQP) などの発現は高分化な癌である乳頭癌や濾胞癌のいずれにもみられた。興味あることに、甲状腺髄様癌では、乳頭癌や濾胞癌と異なるアクアポリンのサブタイプを示すことがわかり、髄様癌の発生的相違や機能的な相違を反映しているものと考えられた。未分化癌での発現は現在までのところアクアポリンや TTF-1 などの機能的遺伝子は証明することができなかった。しかしながら、TTF-1 は陰性で良いとしても、水代謝をコントロールするアクアポリンは陽性となるのが自然であり、今後、未分化癌における水輸送体 (アクアポリン) のサブタイプの検討が課題として残ることになった。

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 10 件)

①Tadao NAKAZAWA, Tetsuo KONDO, Ryohei KATO, 他 6 名、9 番目 : Global histone modification of histone H3 in colorectal cancer and its precursor lesions. HUMAN PATHOLOGY, 2011 (In press) 査読有

②Tadao NAKAZAWA, Tetsuo KONDO, Ryohei KATO, 他 8 名、11 番目 : Fine-needle aspiration biopsy of low-grade cribriform cystadenocarcinoma of the salivary gland. DIAGNOSTIC CYTOPATHOLOGY, 39(3):218-222, 2011, 査読有

③Def MA, Tetsuo KONDO, Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATO, 他 4 名、8 番目 : Hypoxia-inducible adenosine A2B receptor modulates proliferation of colon carcinoma cells. HUMAN PATHOLOGY, 41(11):1550-1557, 2010, 査読有

④Def MA, Tetsuo KONDO, Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATO, 他 6 名、10 番目 : Polyclonal origin of hormone-producing cell populations evaluated as a direct in situ demonstration in EGFP/BALB/Cchimeric mice. JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, 207(1):17-25, 2010, 査読有

⑤Kunio MOCHIZUKI, Tetsuo KONDO, Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATO, 他 6 名、10 番目 : RET rearrangements and BRAF mutation in undifferentiated thyroid carcinomas having papillary carcinoma components. HISTOPATHOLOGY, 57(3):444-450, 2010, 査読有

⑥Tadao NAKAZAWA, Tetsuo KONDO, Ryohei KATO, 他 7 名、10 番目 : Giant oesophageal liposarcoma mimicking spindle cell liposarcoma and containing eosinophilic cells with rhabdomyoblastic differentiation. JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, 63(5):469-469, 2010, 査読有

⑦Tetsuo KONDO, Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATO : Peculiar intracytoplasmic

basophilic bodies in papillary thyroid carcinoma. ENDOCRINE PATHOLOGY, 20(2):145-148, 2009, 査読有

⑧Tadao NAKAZAWA, Tetsuo KONDO, Ryohei KATOH, 他6名、9番目: RET/PTC rearrangements arising from a small population of papillary thyroid carcinoma cells, possible candidate for passenger mutation. VIRCHOWS ARCHIV, 6(455):35-41, 2009, 査読有

⑨Niu DONGFENF, Tetsuo KONDO, Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATOH, 他5名、9番目: Involvement of centrosomes in nuclear irregularity of thyroid carcinoma Cells. VIRCHOWS ARCHIV, 455(2):149-157, 2009, 査読有

⑩Tetsuo KONDO, Tadao NAKAZAWA, Ryohei KATOH 他3名、6番目: Epigenetic silencing of TTF-1/NKX2-1 through DNA hypermethylation and histone H3 modulation in thyroid carcinomas. LABORATORY INVESTIGATION, 89(7):791-799, 2009, 査読有

[学会発表] (計12件)

①加藤 良平、甲状腺濾胞性腫瘍の良悪性診断におけるオブザーバーバリエーション、第84回日本内分泌学会学術総会、招待講演2011年4月21日、神戸市

②中澤 匡男、近藤 哲夫、加藤 良平他 甲状腺、胸腺、耳下腺に鰹溝性嚢胞様病変を認めた1例、第100回日本病理学会総会、2011年4月28日、パシフィコ横浜、横浜市

③近藤 哲夫、中澤 匡男、加藤 良平他 A Genome-wide Screening DNA Methylation Reveals Differential Profiles of Thyroid Neoplasms. 第100回日本病理学会総会、2011年4月28日、パシフィコ横浜、横浜市

④ 鈕 東峰、近藤 哲夫、中澤 匡男、加藤 良平他 甲状腺癌において高発現する Runx2 は浸潤関連遺伝子を制御している 第100回日本病理学会総会、2011年4月28日、パシフィコ横浜、横浜市

⑤近藤 哲夫、中澤 匡男、加藤 良平他 シンポジウム・甲状腺濾胞癌の病理、第14回日本内分泌病理学会学術総会、2010年10月29日、ハイヤットリージェンシー京都、京都市

⑥中澤 匡男、近藤 哲夫、加藤 良平他 多発甲状腺乳頭癌の発生機序-HUMARA assay-、第99回日本病理学会総会、2010年4月28日、京王プラザホテル、東京都

⑦近藤 哲夫、中澤 匡男、加藤 良平他 Tumor promoting properties of adenosine receptor A1 in thyroid carcinomas, 第99回日本病理学会総会、2010年4月28日、京王プラザホテル、東京都

⑧Ryohei KATOH, Molecular Pathology of Thyroid Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1), 2009 6th Asia Pacific IAP Congress, 招待講演, 2009年8月20日、インド、コーチン

⑨Ryohei KATOH, Genetic background of progression in thyroid carcinomas, 2009 6th Asia Pacific IAP Congress, 招待講演, 2009年8月20日、インド、コーチン

⑩Ryohei KATOH, Are we overdiagnosing papillary carcinoma of the thyroid? 2009 6th Asia Pacific IAP Congress, 招待講演, 2009年8月20日、インド、コーチン

⑪中澤 久美子、中澤 匡男、近藤 哲夫、加藤 良平他 甲状腺低分化癌4例の細胞学的検討、第48回日本臨床細胞学会秋期大会、2009年10月30日、JALリゾートシーホークホテル福岡、福岡市

⑫近藤 哲夫、中澤 匡男、加藤 良平他

転写因子 TTF-のエピジェネティックス制御
に関する検討、第 13 回日本内分泌病理学会
学術総会、2009 年 10 月 24 日、山梨大学甲府
キャンパス、甲府市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 良平 (KATOH 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

近藤 哲夫 (KONDO TETSUO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准
教授

研究者番号：30334858

中澤 匡男 (NAKAZAWA TADAO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助
教

研究者番号：10345704

(3) 連携研究者

なし