

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24590414  
 研究課題名(和文) 甲状腺濾胞性腫瘍の53BP1発現とゲノム不安定性：分子病理マーカーとしての意義  
  
 研究課題名(英文) Correlation analyses between 53BP1 expression and genomic instability in thyroid follicular tumors: significance as a molecular pathologic indicator  
  
 研究代表者  
 中島 正洋 (NAKASHIMA, Masahiro)  
  
 長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授  
  
 研究者番号：50284683  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷応答(DDR)分子53BP1はDNA二重鎖切断(DSB)部位に集積し、核内フォーカス(NF)を形成する。53BP1NFの増加は自然発症DSBの亢進を示唆し、ゲノム不安定性を反映する。本研究では、53BP1発現の甲状腺濾胞性腫瘍の診断への応用の可能性を検討した。濾胞腺腫(FA)、微小浸潤型濾胞癌(MFC)、広範浸潤型濾胞癌(WFC)合計69例を対象に蛍光免疫解析し、NFを低DDR型と高DDR型に分類した。NFは被膜直下に均一に分布し、総数と高DDR型の平均発現率は、FA、MFC、WFCの順に有意に増大した。53BP1蛍光免疫は濾胞性腫瘍の鑑別に有用で、術前診断の応用への可能性がある。

研究成果の概要(英文)：53BP1 belongs to DNA damage response (DDR) molecules and rapidly localizes at the site of DNA double strand breaks (DSB) forming nuclear foci (NF). The presence of 53BP1 NF can be an indicator of endogenous DSBs reflecting GIN. We have reported that type of 53BP1 NF by immunofluorescence (IF) is useful to estimate GIN in diverse tumorigenesis. This study aimed to clarify the type of 53BP1 NF in thyroid follicular tumor (FT). A total of 69 thyroid tissues, including follicular adenomas (FA), minimally invasive follicular carcinomas (MFC) and widely invasive FC (WFC), was analyzed in this study. The type of 53BP1 expression was classified as low DDR and high DDR types. In results, the number of high DDR type of 53BP1 NF in tumor cells appeared to significantly increase with progression of carcinogenesis, such as FA-MFC-WFC. The type of 53BP1 expression by IF seems to reflect GIN to estimate malignant potency of FT. This method may be available in preoperative diagnosis for FT.

研究分野：人体病理学

 キーワード：甲状腺濾胞性腫瘍 病理診断 ゲノム不安定性 53BP1 蛍光免疫染色 ゲノムコピー数異常 アレイCG  
H

1. 研究開始当初の背景

濾胞癌 (Follicular carcinoma: FC) には、乳頭癌で見られるような特徴的核所見は認めず、濾胞構造が正常甲状腺のそれと区別が困難なほどよく分化したものが含まれるため、術前の病理診断・細胞診断はほとんどの場合不可能である。濾胞性腫瘍の悪性基準、すなわち濾胞腺腫 (Follicular adenoma: FA) と FC との鑑別のポイントは、腫瘍細胞の被膜浸潤、脈管侵襲、甲状腺外への転移のいずれか少なくとも一つを組織学的に確認することであり、細胞の異型度は良性・悪性の区別に関与しない (甲状腺癌取扱い規約第6版)。従って、術後切除標本での検索でも微小浸潤型 FC (FC, minimally invasive: MFC) と FA の鑑別には、腫瘍細胞の浸潤性を多数の切片を作製して組織学的に確認する必要がある、確定診断に難渋する場合も少なくない。濾胞性腫瘍の悪性度を推定する分子病理学的マーカーが発見され、病理診断や細胞診に応用可能となれば、FC の術前診断につながり治療方針の決定に大きく貢献することになる。

正常細胞は惹起された DNA 二重鎖切断 (DNA double strand break: DSB) に対し DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) によりゲノムの維持を図る。腫瘍抑制遺伝子 p53 変異や ATM 変異などの DDR 分子の異常は細胞にゲノム不安定性 (genomic instability: GIN) を惹起し、遺伝子変異が蓄積、結果として tumorigenesis を促進する。p53-binding protein 1 (53BP1) は、広く細胞に存在する核内タンパクで、DSB が誘発され DDR が活性化すると他の分子とともに DSB 部位に集積し NF を形成するため、53BP1 NF は DSB を反映する指標で、個々の NF は DSB 1 個に相当する。腫瘍性または非腫瘍性細胞を問わず、内因性 / 自然発症性 DSB の存在は GIN を特徴づける現象である。我々はこれまでに 53BP1 NF の腫瘍組織マーカーとしての意義を検討してきた。その結果、甲状腺癌組織では 53BP1 NF 数の増加と異常発現がみられ、GIN 亢進の関与が示唆されること (Int J Cancer 2008)、皮膚がん化過程では前がん病変から 53BP1 NF 数の増加がみられ、DDR は活性化しているが、浸潤がんでは DDR が異常であること (Cancer Sci 2008)、子宮頸部異形成 / 腫瘍の進展や HPV 発現と 53BP1 NF 数の増加や異常が有意に相関すること (Histopathology 2011) が明らかになった。

2. 研究の目的

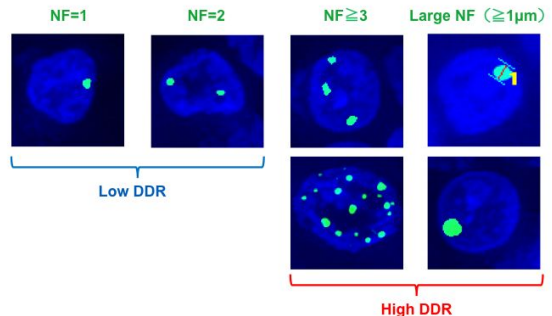
甲状腺濾胞性腫瘍の悪性度の鑑別は、甲状腺腫瘍診断病理学における重要課題のひとつである。本研究では、53BP1NF の発現解析を甲状腺濾胞性腫瘍の病理診断に応用することを最終目的に、種々の濾胞性腫瘍組織を用いて 53BP1 の発現動態と生物学的悪性度および GIN の指標としての遺伝子コピー数変異 (copy number alteration: CNA) との関連を検討することにある。

3. 研究の方法

正常甲状腺 (NT) 7 例、FA27 例、MFC28 例、広範浸潤型濾胞癌 (FC, widely invasive: WFC) 14 例の計 76 例の、外科的に切除されたホルマリン固

定パラフィン包埋切片を対象に、53BP1 の発現を蛍光免疫により観察し、画像解析装置で定量・定性的に解析した。53BP1 蛍光染色発現型は図 1 の 4 型に分類し、2 個以下を低 DDR 型、3 個以上または径 1 μm 以上の NF を高 DDR 型とした。

図 1 53BP1 蛍光染色発現パターン

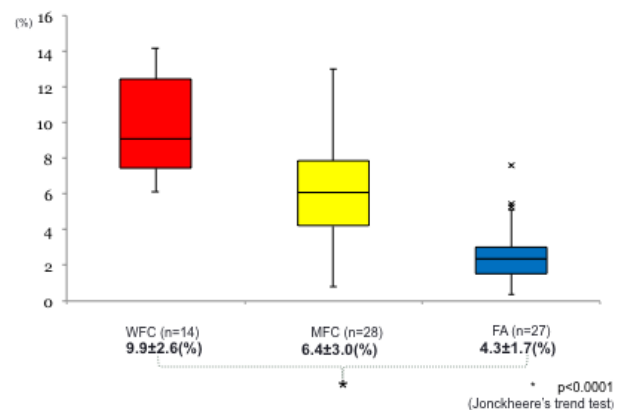


他の GIN の指標として、FA 8 例、MFC 10 例、WFC 9 例の計 27 から DNA を抽出し、CNA を Affymetrix 社の Genome-Wide Human SNP Array 6.0 により microarray comparative genomic hybridization (mCGH) 法により解析した。Reference としては市販の pooled female genomic DNA (Promega, Madison, WI, USA) を用いた。

4. 研究成果

蛍光免疫で、53BP1 NF 発現は線維性被膜直下の腫瘍細胞に均一に分布して観られた。FA、MFC、WFC の総 NF の平均発現率は各々  $20.9 \pm 11.3$ 、 $28.3 \pm 9.5$ 、 $36.4 \pm 7.5\%$ 、高 DDR 型の平均発現率は各々  $4.3 \pm 1.7$ 、 $6.4 \pm 3.0$ 、 $9.9 \pm 2.6\%$  であり、いずれも悪性度に伴って有意に ( $p < 0.001$ ) 増大することが判明した (図 2)。高 DDR 型発現率 3.1% 未満を cut-off 値とした時、悪性腫瘍の診断的感度と特異度は各々 90.5% と 78.6% であった。

図 2 濾胞性腫瘍での高 DDR 型 53BP1 発現の比較

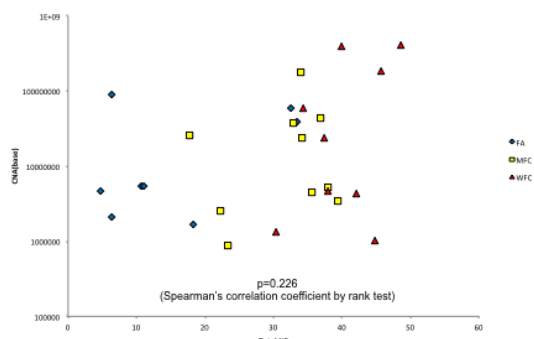


一方、平均 CNA は、FA、MFC、WFC 各々 25.7、32.2、120.8Mbp で、悪性度に伴って増大する傾向はみられたが、有意差は明らかでなかった ( $p = 0.656$ )。各症例における 53BP1 発現型と CNA の間にも有意な相関は認めなかった ( $p = 0.226$ ) (図 3)。

53BP1 NF の増加は、自然発症性 DSB の亢進を示唆し、腫瘍細胞の悪性化に伴うゲノム不安定性を反映する現象と考察する。濾胞性腫瘍では CNA の

程度は悪性度の有意な指標とはならないが、被膜直下からの腫瘍組織を用いた 53BP1 蛍光染色は、濾胞性腫瘍の良悪性の鑑別に有用であることが明らかになった。穿刺細胞吸引診などでの濾胞性腫瘍の術前診断に応用が期待できる。

図3 濾胞性腫瘍での 53BP1 発現と CNA の関係



### 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 15 件)

1. 中島正洋: 原爆被爆者の放射線腫瘍病理. 病理と臨床 査読無 33 巻 2015 17-22
2. Khan KN, Nakashima M, et al(6 名中 5 番目): 17 $\beta$ -estradiol and lipopolysaccharide additively promote pelvic inflammation and growth of endometriosis. *Reprod Sci* 査読有 22 巻 2015 585-594 10.1177/1933719114556487
3. Nakashima M, et al(13 名中 3 番目): Clinicopathological characteristics of multiple primary cancers in hepatobiliary and pancreas malignancies. *Anticancer Res* 査読有 35 巻 2015 1073-1078
4. Rogounovitch TI, Nakashima M, et al(24 名中 5 番目): The common genetic variant rs944289 on chromosome 14q13.3 associates with risk of both malignant and benign thyroid tumors in the Japanese population. *Thyroid* 査読有 25 巻 2015 333-340 10.1089/thy.2014.0431
5. Khan KN, Nakashima M, et al(6 名中 5 番目): Involvement of hepatocyte growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in human adenomyosis. *Biol Reprod* 査読有 92 巻 2015 35 10.1095/biolreprod.114.124891
6. Stanojevic B, Nakashima M, et al(10 名中 8 番目): Low VHL mRNA expression is associated with more aggressive tumor features of papillary thyroid carcinoma. *PLoS One* 査読有 9 巻 2015 e114511, 10.1371/journal.pone.0114511
7. Matsuu-Matsuyama, Nakashima M et al(7 名中 7 番目): Effect of age on the sensitivity of the rat thyroid gland to ionizing radiation. *J Radiat Res* 査読有 0 巻 201

5 1-9 10.1093/jrr/rrv003

8. Khan KN, Nakashima M, et al(6 名中 5 番目): Intra-uterine microbial colonization and occurrence of endometritis in women with endometriosis†. *Hum Reprod* 査読有 29 巻 2014, 2446-2456 10.1093/humrep/deu222
9. Akazawa Y, Nakashima M, et al(13 名中 12 番目): Infliximab therapy for Crohn's-like disease in common variable immunodeficiency complicated by massive intestinal hemorrhage: a case report. *BMC Res Notes* 査読有 22 巻 2014, 382 10.1186/1756-0500-7-382
10. Ito M, Nakashima M, et al(11 名中 9 番目): Morphological difference in adult thyroid papillary carcinoma between Japan and Ukraine. *Endocr J* 査読有 61 巻 2014 1221-1228 10.1507/endocrj.EJ14-0239
11. Orim F, Nakashima M, et al(12 名中 4 番目): Thyrotropin signaling confers more aggressive features with higher genomic instability on BRAFV600E-induced thyroid tumors in a mouse model. *Thyroid* 査読有 24 巻 2014 502-510
12. Nakashima M, et al(11 名中 11 番目): Radiation-associated small cell neuroendocrine carcinoma of the thyroid: a case report with molecular analyses. *Thyroid* 査読有 24 巻 2014 593-598
13. Nakashima M, et al(12 名中 12 番目): Significance of p53-binding protein 1(53BP1) expression in thyroid papillary microcarcinoma: association with BRAFV600E mutation status. *Histopathology* 査読有 63 巻 2013 726-734
14. Nakao K, Nakashima M, et al(11 名中 7 番目): A predictive factor of the quality of microarray comparative genomic hybridization analysis for formalin-fixed paraffin-embedded archival tissue. *Diagnostic Molecular Pathology* 査読有 22 巻 2013 174-180
15. 松山睦美、中島正洋 他(7 名中 7 番名): ラット甲状腺濾胞上皮の DNA 損傷応答と放射線誘導オートファジーに対する年齢と影響. *長崎医学会雑誌* 査読無 87 巻 2012 269-272

[学会発表](計 14 件)

1. 三浦史郎, 中島正洋 他: 原爆被爆者正常皮膚にみられる放射線晩発障害としてのゲノム不安定性解析. 第 103 回 日本病理学会総会 2014.4.24-4.26 広島国際会議場・ANA クワンプラザホテル広島(広島県)
2. 松田勝也, 中島正洋 他: 多臓器神経内分泌腫瘍における腫瘍抑制遺伝子 PTEN の分子異常. 第 103 回 日本病理学会総会 2014.4.24-4.26 広島国際会議場・ANA クワンプラザホテル広島(広島県)

3. Nakashima M and Yamashita S: Storage of Biosamples from Atomic Bomb Survivors at Nagasaki University. RadiOmics Workshop 2014.4.30 Lisbon(Portuguesa)
4. Otsubo R, Nakashima M, et al: Immunofluorescence analysis of P53-binding protein 1 (53BP1) in thyroid follicular tumors: possibility for preoperative diagnosis. 50th American Society Of Clinical Oncology annual meeting 2014.5.30-6.3 Chicago(USA)
5. 大坪竜太, 中島正洋 他: 濾胞性腫瘍術前診断法としての p53-binding protein 1 (53BP1) 蛍光免疫染色の意義. 第2回日本甲状腺病理学会学術会 2014.7.12 医療法人甲会隈病院 6階大会議室(神戸市)
6. Otsubo R, Nakashima M, et al: Immunofluorescence analysis of P53-binding protein 1 (53BP1) in thyroid follicular tumors: possibility for preoperative diagnosis. 26th European Congress of Pathology 2014.8.30-9.3 London(UK)
7. 中島正洋: シンポジウム: 甲状腺癌発生をその分子機構から考える「甲状腺がん幹細胞研究からみた甲状腺がん」. 第18回日本内分泌病理学会学術集会 2014.11.1-11.2 都道府県会館(東京都)
8. 中島正洋: シンポジウム: がん登録法制化と病理情報システム「長崎県がん登録と被爆者腫瘍病理疫学」. 第60回日本病理学会学術期特別総会 2014.11.21 国立劇場おきなわ・浦添市産業振興センター結の街(沖縄県)
9. 松山睦美, 中島正洋 他: ラット甲状腺濾胞上皮の放射線誘発腫瘍に対する年齢影響とオートファジーの関与. 第54回原子爆弾後障害研究会 2013.6.2 広島国際会議場(広島県)
10. 伊東正博, 中島正洋 他: チェルノブイリ成人の甲状腺乳頭癌と本邦症例との臨床病理学的検討. 第102回日本病理学会 2013.6.6-2013.6.8 ロイトン札幌・サッポロ芸文館(札幌市)
11. 大坪竜太, 中島正洋 他: 甲状腺濾胞性腫瘍術前診断法としての P53-binding protein 1 (53BP1) 蛍光免疫染色の意義. 第17回日本内分泌病理学会学術総会 2013.10.4-2013.10.5 関内新井ホール(神奈川県)
12. 松山睦美, 中島正洋 他: ラット甲状腺濾胞上皮の放射線応答に対する年齢の影響 第56回日本放射線影響学会 2013.10.18-2013.10.20 ホテルクラウンパレス青森(青森県)
13. 中島正洋: シンポジウム 2: 「放射線とがん分子疫学」原爆被爆者固形がん保存試料を用いた分子病理疫学研究. 第35回日本がん疫学・分子疫学研究総会(招待講演) 2012.7.5-2012.7.6 アステールプラザ(広島県)
14. 中島正洋, 三浦史郎 他: 原爆被爆者腫瘍組織バンクと分子病理学的研究の現状(放射線病理学の現状と展望(ワークショップ)) 第5

5 回日本放射線影響学会 2012.9.6-2012.9.8  
東北大学 川内北キャンパス(仙台市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等:  
<http://users.tls-style.jp/nagasaki-u/pathology/>

#### 6. 研究組織

(1) 中島 正洋 (NAKASHIMA, Masahiro)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授  
研究者番号: 50284683

(2) 研究分担者 (無し)

研究者番号:

(3) 連携研究者 (無し)

研究者番号: