

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461989

研究課題名(和文)小児甲状腺癌の分子生物学的特性の解明

研究課題名(英文)Analysis of genetic alterations in thyroid cancer in the young population.

## 研究代表者

福島 俊彦 (Fukushima, Toshihiko)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：小児甲状腺癌手術症例のうち、研究参加の同意が得られた67例について、癌関連遺伝子の解析を行った。BRAFの点突然変異は63%で認められ、K, N, H RASには遺伝子変異を認めなかった。これらの結果は、これまでの日本人成人の結果と同等のものであり、チェルノブイリ事故後の甲状腺癌のものとは異なっている。また、BRAFについては、免疫組織化学的検討も行い、染色性と変異陽性は同等の結果であった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the presence of cancer driver mutations in 67 cases of thyroid cancer. Written informed consent was obtained from the parents. We detected BRAF V600E in 43 cases (63%). N, H, K-RAS mutations were not detected. These results were equal to the results in the adult study and different from post-Chernobyl thyroid cancer.

研究分野：外科学

キーワード：甲状腺癌 小児甲状腺癌

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災により生じた、東京電力福島第一原発事故による低線量被ばくに対する健康影響について、我々は継続的に県民の健康管理に取り組んできた(右図)。

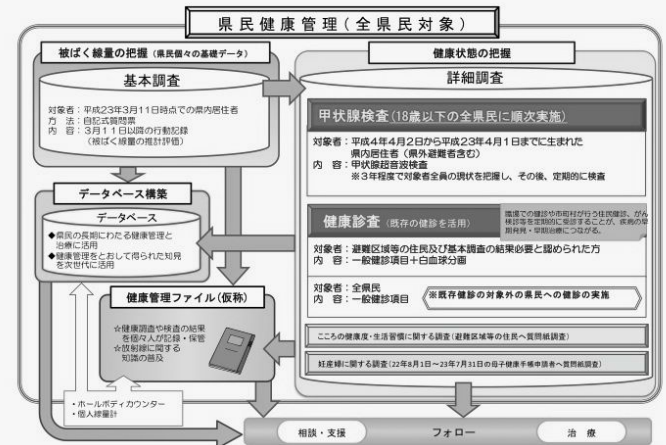
これまでの基本調査による外部被ばく線量予測、及びホールボディカウンターによる内部被ばく線量測定の結果、健康への影響はないと考えている。しかし、チェルノブイリ原発事故で報告された小児甲状腺癌の発生等の小児の長期健康管理に関する問題は多くの保護者の関心事であり重要課題のひとつである。そこで我々は、2011年10月から、福島県内の18歳以下の小児38万人を対象とした、甲状腺超音波健診を進めている。過去において小児の甲状腺に関する大規模なコホート調査は行われていない。

本超音波検診にて要精査と判定された被験者は、精度管理のため、すべて当施設にて2次検診を行なっている。この検診システムにおいて、すでに小児甲状腺癌が発見され手術治療が施された。今後、本検診のスクリーニング効果として一定頻度で甲状腺癌が発見される事が想定される。

これまでに、我々は、一般成人に発生する甲状腺乳頭癌では、MAP kinase pathwayの構成因子である BRAF の遺伝子変異が約半数に認められること、K, H, N-RAS 遺伝子変異がないことを見出し、世界に先駆けて報告してきた(Fukushima et al, Oncogene22, 6455-57)。一方、チェルノブイリ原発事故後に発生した小児甲状腺乳頭癌においては、BRAF、RAS 遺伝子変異の頻度は低く、RET/PTC 遺伝子の再構成の頻度が高いことが報告された(Nikiforov YE et al, Cancer Res 57:1690-1694)。しかし、放射線の影響の無い小児甲状腺癌においても、RET/PTC 遺伝子の再構成の頻度が高いことが報告され、現在では甲状腺乳頭癌は、発生年齢や放

射線の影響の有無により、異なる分子生物学的特性を持つと考えられている。

我々が福島県内で発生した小児甲状腺



癌の DATA 集積を行い、その分子生物学的特性を明らかにすることは、低線量被ばくの健康への影響の有無を知る上で、きわめて重要な知見となる。こうした患児の長期的な経過観察を行ない、その手術サンプルから、得られる genomic DNA および cDNA 等を一元的に保管・管理するシステムの構築し、情報を発信することは我々の社会的な使命と考えている。

2. 研究の目的

一般に小児甲状腺癌の発生頻度は、年間100万人あたり1-2名程度と見積もられている。現在、低線量被爆下の福島県内では、約38万人を対象とした小児甲状腺超音波健診が進行中である。この健診が進行すれば、スクリーニング効果として一定頻度で小児甲状腺癌が発見されることが予想される。本研究では、小児甲状腺腫瘍の組織バンクを構築する。小児甲状腺超音波健診で発見される甲状腺癌の分子生物学的特性を明らかにすることを目的とする。

手術標本の管理保存体制の確立  
甲状腺超音波健診を中心とした、福島県内の小児に対する健康管理調査は、長期にわたって継続されるものである。したがって、今後、発見される可能性のある小児甲状腺癌の手

術標本から、genomic DNA, cDNA, 新鮮凍結標本を保管・管理することは、必要不可欠である。

#### 遺伝子変異の解析

- BRAFV600E 点突然変異の解析：一般成人甲状腺乳頭癌の約60%で認められる異常であるが、濾胞癌での異常は認めない(Fukushima et al, Oncogene22, 6455-57)。本邦の小児甲状腺癌における知見はなく、これを明らかにする。
- RAS 点突然変異の解析：一般成人甲状腺乳頭癌では0-10%程度、濾胞癌では約50%で異常が認められる(Fukushima et al, Oncogene22, 6455-57)。小児甲状腺癌における知見は少なく、これを明らかにする。
- RET/PTC 遺伝子再構成の解析：チェルノブイリ原発事故後の小児甲状腺癌では、50-60%の異常が報告されたが、本邦の小児甲状腺癌における知見はなく、これを明らかにする。
- NTRK1 遺伝子再構成の解析：一般成人甲状腺乳頭癌では、0-50%で異常が報告されているが、本邦小児に関する知見はなく、これを明らかにする。
- p53 遺伝子の変異解析：甲状腺乳頭癌、濾胞癌では、p53 遺伝子の変異はなく、未分化癌の一部で、変異が報告されている。小児甲状腺癌に関する知見は、少なくこれを明らかにする。
- 各種癌関連遺伝子のメチル化解析：p16INK4A, Rap1Gap, PTEN など遺伝子の過メチル化による不活化が、報告されている。小児甲状腺癌に関する知見は

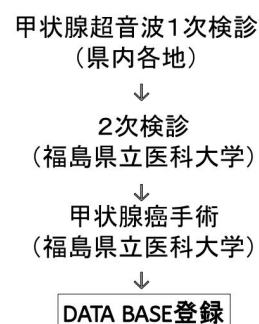
すくなく、これを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 手術標本の管理保存体制の確立

右図のご

とく、要精査となった県民はすべて当大学にて一定の基準に従って2次検診を



行っている。甲状腺癌と診断された場合、同院にて手術を施行する。

手術標本の癌部、非癌部から、genomic DNA, cDNA を抽出、合成する。また、新鮮凍結標本を取得する。

これらを、一元的に長期に渡って、保管・管理する「組織バンク」を整備する。

このDATABASE は匿名化を行い、個人情報管理は厳重に行う。

#### 小児甲状腺癌における、遺伝子異常の解析

##### ● MAP kinase経路の解析

臨床検体について、KRAS, HRAS, NRAS, BRAFの遺伝子変異をdirect sequence法にて検出する。各RAS遺伝子変異は、コドン12, 13, 61がホットスポットして知られているため、この領域について解析を行う。

BRAF遺伝子に関しては、コドン600の変異がホットスポットとして知られているため(Fukushima et al, Oncogene22, 6455-57)、まずこの領域について解析を行う。BRAF遺伝子は、甲状腺癌において最も高頻度に異常が認められる遺伝子であることから、全コード領域につい

て解析を行う。

- RET/PTC、NTRK1遺伝子再構成の解析  
RT-PCR法、FISH法にて、再構成遺伝子の検出を行う。

#### 【DATA 解析】

震災以前の症例とそれ以後の症例とを比較し、その遺伝子的背景を比較検討する

#### 4 . 研究成果

##### 症例データベースの構築

2016年3月31日現在、福島県立医科大学附属病院で手術を施行した症例は、128例であった。腫瘍径、年齢、リンパ節転移の有無、病理組織学的所見などの情報を一元的に管理するデータベースを構築した。

##### 手術標本の凍結保管 組織バンク

手術の際に、研究参加の説明をし、同意の得られた方からは、手術標本の一部を凍結保管した。さらに、DNA, RNA を抽出、cDNA を合成し、保管した。

##### 癌関連遺伝子解析の結果

同意の得られた 68 例について、癌関連遺伝子の解析を行った。

43 症例において BRAFV600E ( 63.2% )、6 症例において RET/PTC1 ( 8.8% )、1 症例において RET/PTC3 ( 1.5% )、そして 4 症例で ETV/NTRK3 ( 5.9% ) を検出した。

これらの結果は、チェルノブイリ原発事故後に報告された放射線関連甲状腺癌とは全く異なったプロファイルであった。

##### BRAF の免疫組織学的検討

54 例の小児乳頭癌を対象とし、1 . ホルマリン固定パラフィン包埋標本について、V600E を epitope とする抗体を用い免疫組織染色を行った。2 . そのうち 20 例については、direct sequence 法による変異解析を併施した。3 . 臨床病理学的諸因子との関連性について検討した。

結果：1 . 免疫組織染色で陽性を示したものの ( IHC+群 ) は 33 例 ( 61% )、陰性 ( IHC-

群) は 21 例 ( 39% ) であった。2 . Direct sequence 法の結果と、免疫染色法の結果は完全に一致した。3 . IHC+群、IHC-群の平均腫瘍型はそれぞれ 14±15 mm、21±14 mm で、有意差はない ( p=0.08 )。平均年齢は、それぞれ 15 ± 2 歳、14 ± 3 歳で有意差はない ( p=0.23 )。リンパ節転移の状況については、IHC+群における転移陰性例は 6 例、陽性例は 27。IHC-群ではそれぞれ 7 例、14 例であり、リンパ節転移と BRAF 免疫染色法の結果については、関連性がない ( p=0.33 )。

結論：小児乳頭癌における BRAFV600E は、成人における頻度と同様であり、その検出については、免疫組織染色が有用である。

#### 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 8 件 )

1. Fukushima T, Suzuki S, (10 人の 1 番目 / 10 番目) Prevalence of Ectopic Intrathyroidal Thymus in Japan: The Fukushima Health Management Survey. *Thyroid*; 25(5): 534-537; 2015 査読有
2. Hayashida N, Suzuki S, (16 人の 13 番目). Thyroid ultrasound findings in a follow-up survey of children from three Japanese prefectures: Aomori, Yamanashi, and Nagasaki. *SCIENTIFIC REPORTS*. 5(9046); 2015 査読有
3. Suzuki S, Fukushima T, Suzuki S, (10 人の 3 番目 / 10 番目) Systematic determination of thyroid volume by ultrasound examination from infancy to adolescence in Japan: The Fukushima Health Management Survey. *ENDO J*. 62(3)261-268; 2015 査読有
4. Hayase S, (15 名の 1 番目) Expression of stanniocalcin 1 in thyroid side population cells and thyroid cancer cells. *Thyroid*. 25(4):425-36.2015 査読有
5. SHIMURA H, Suzuki S, Fukushima T, (21 人

の 2 番目 /3 番目) PREVALENCE OF THYROID NODULAR LESIONS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS.

*FUKUSHIMA JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE*. 60(2); 196-202; 2014 査読有

6. Mykola D., Suzuki S.(6 人の 5 番目). Age Distribution of Childhood Thyroid Cancer Patients in Ukraine After Chernobyl and in Fukushima After the TEPCO-Fukushima Daiichi NPP Accident, *Thyroid*. 24(10),1547-1548, 2014 査読有
7. Norisato Mitsutake, Toshihiko Fukushima, BRAFV600E mutation is highly prevalent in thyroid carcinomas in the young population in Fukushima: a different oncogenic profile from Chernobyl, **Scientific Reports** 5, Article number: 16976 (2015) doi:10.1038/srep16976

[学会発表](計4件)

1. Shinichi Suzuki, Satoru Suzuki, Toshihiko Fukushima, Izumi Nakamura, Hiroki Shimura, Sanae Midorikawa, Tetsuya Ohira, and Shunichi Yamashita Three-Year Results and Future Scope of the Fukushima Thyroid Ultrasound Examination after the Fukushima Nuclear Power Plant Accident ENDO 2015年3月5-8日 San Diego
2. Izumi Nakamura, Satoru Suzuki, Sanae Midorikawa, Toshihiko Fukushima, Hiroki Shimura, Tetsuya Ohira, Akira Ohtsuru, Masafumi Abe, Yoshisada Shibata, Satoshi Suzuki, Shunichi Yamashita and Shinichi Suzuki Systematic Determination of Thyroid Volume By Ultrasound Examination from the Infant to Adolescence in Japan: The Fukushima Health Management Survey ENDO 2015年3月5-8日 San Diego
3. Satoshi Suzuki, Satoru Suzuki, Sanae Midorikawa, Toshihiko Fukushima, Hiroki Shimura, Tetsuya Ohira, Akira Ohtsuru, Masafumi Abe, Izumi Nakamura, Shunichi Yamashita, and Shinichi Suzuki, Preliminary Results in Prevalence of Thyroid Hemiagenesis and Hypoplasia: The Fukushima Health Management Survey ENDO 2015年3月5-8日 San Diego

4. 福島俊彦、中村泉、鈴木聡、鈴木悟、鈴木真一, 小児甲状腺癌における BRAF 異常 日本甲状腺学会 2015年11月6日 福島市

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

福島俊彦 (FUKUSHIMA TOSHIHIKO)

福島県立医科大学・器官制御外科・准教授  
研究者番号: 20336457

##### (2)研究分担者

鈴木真一 (SUZUKI SHINICHI)

福島県立医科大学・器官制御外科・教授  
研究者番号: 70235951

早瀬傑 (HAYASE SUGURU)

福島県立医科大学・器官制御外科・助教  
研究者番号: 00583387