

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461951

研究課題名(和文) 甲状腺濾胞性腫瘍の術前細胞診診断における53BP1核内フォーカスの有用性の検討

研究課題名(英文) Immunofluorescence analysis of P53-binding protein 1 in thyroid follicular tumours

研究代表者

矢野 洋 (YANO, Hiroshi)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：50380887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍断面から細胞を採取する捺印細胞診、腫瘍を針で刺す針細胞診、刺した針を洗浄する液体細胞診を用いて53BP1核内フォーカスを評価した。全体的に癌細胞以外の反応が多く、細胞の重なりが少ない液体細胞診以外では評価が難しかった。液体細胞診でも重なりがない部分に限って組織標本と同様の核内フォーカスを確認できた。良性疾患より悪性疾患に核内フォーカスが多い傾向があったが、症例毎のばらつきが大きかった。

以上より、細胞診検体での核内フォーカスを用いた良悪性の鑑別は難しかったが、今後も研究を継続する。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the nuclear foci using stamp cytology that is collected from a surface of tumors, fine-needle cytology that is collected with puncture to tumors, and liquid-based cytology samples that is collected from lavage fluid of puncture needles. We found that there were a lot of non-specific reaction, and stamp cytology and fine-needle cytology samples were improper methods due to overlaps of cells. Proper nuclear foci were recognized in liquid-based cytology, which was limited in sites with less cellular overlaps. Also, we observed some tendency that nuclear foci were more frequent in malignancies compared with benign tumors, however, there were much unevenness in each case.

In conclusion, it was difficult to distinguish thyroid cancers from benign thyroid tumors using nuclear foci of cytology specimen, however, we would like to continue the evaluation about this theme.

研究分野：乳腺内分泌外科学

キーワード：甲状腺濾胞性腫瘍 術前細胞診診断 53BP1核内フォーカス

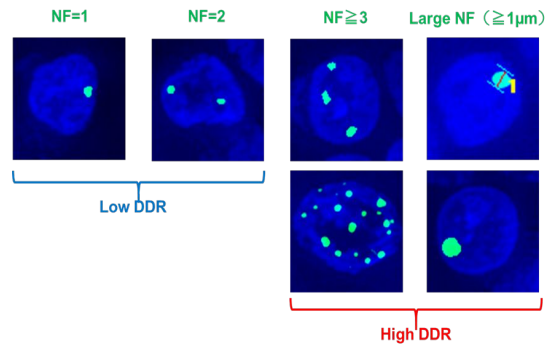
1. 研究開始当初の背景

甲状腺濾胞癌は甲状腺濾胞細胞への分化を示す高分化悪性腫瘍で、甲状腺癌全体の5-10%と少数であるが、約90%と多数を占める乳頭癌よりも予後不良である。発症原因としてヨード不足と放射線被曝が考えられており、過形成性結節、濾胞腺腫、濾胞癌へと徐々に進展すると言われている。しかし、濾胞癌は乳頭癌で認められるような特徴的な核所見を有さず、細胞診診断による術前診断は殆どの場合不可能である。濾胞癌の診断は術後の病理組織学的診断により被膜浸潤、脈管浸潤、遠隔転移を確認する必要があるため、病理組織学的診断の確定後に甲状腺全摘術の追加が必要になる場合がある。また、実臨床では甲状腺濾胞性腫瘍の手術適応は、癌の可能性が高くなる腫瘍径3cm以上、急速増大や被膜の不整、血中サイログロブリンが1000以上などを総合的に判断して決定されるが、絶対的な指標は存在しない。これに対して細胞診検体を用いた遺伝子解析による術前診断の有効性が発表されたが、感度92%、特異度52%、費用が約4000USドルと高額であり、費用対効果は低い。

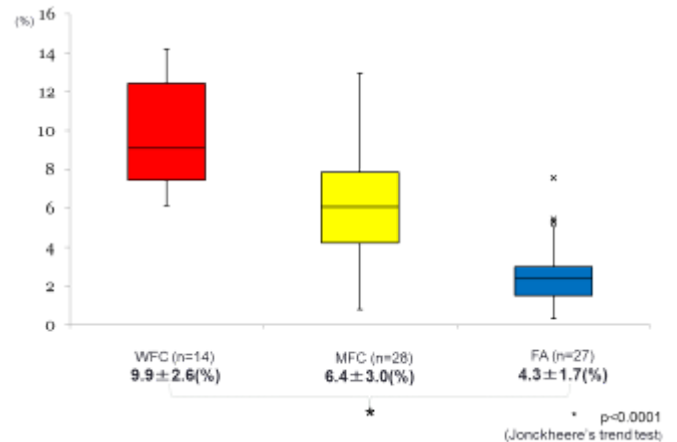
腫瘍発生・進展にはゲノム不安定性が関与しており、我々はこれまでにゲノム不安定性の指標の一つである p53-binding protein 1 (53BP1) の核内フォーカス形成(図1)を指標として、種々の組織で腫瘍の進展過程とゲノム不安定性との関連を検討してきた。甲状腺濾胞性腫瘍の病理組織標本を用いた検討では、広範浸潤型濾胞癌、微少浸潤型濾胞癌、良性の濾胞腺腫における High DDR 型核内フォーカスの出現率は各群で有意差を認め、良悪性の鑑別に有用である事が示唆された(図

2)

(図1) 核内フォーカスの分類



(図2) 甲状腺濾胞性腫瘍における High DDR 型核内フォーカスの出現率



2. 研究の目的

この研究の目的は、53BP1 核内フォーカスを指標とした甲状腺濾胞性腫瘍の細胞診を用いた術前鑑別診断への応用の可能性を検証する事である。

3. 研究の方法

(1) 当院および関連施設で手術された広範浸潤型濾胞癌約10例、微少浸潤型濾胞癌約30例、濾胞腺腫約30症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本(4μm厚)を用い、53BP1 蛍光免疫染色を行い総核内フォーカス出現率、High DDR 出現率、臨床病理学的諸因子について検討を行う。

(2) (1)で検討した症例のホルマリン固定パラフィン固定標本(10µm厚、10枚)からDNAを抽出し、各10症例にアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)を用いて得られた染色体変化の数と大きさを指標にゲノム不安定性の評価を行う。

(3) 当院で採取された甲状腺濾胞性腫瘍の針細胞診検体(Liquid-based cytology:LBC)に対して53BP1蛍光免疫染色を行い、染色性・核内フォーカス出現率・High DDR出現率を指標とした核内フォーカスの評価を行う。

(4) 前方視的多施設共同研究を計画し、針細胞診検体での53BP1蛍光免疫染色によるゲノム不安定性を指標にした甲状腺濾胞性腫瘍の術前診断における有用性を検討する。

#### 4. 研究成果

検体は組織検体をスライドガラスに接触させて細胞を採取する捺印細胞診と、腫瘍を針で穿刺してスライドガラスに吹き付けた針細胞診検体、穿刺した針を洗浄して得られる細胞を用いるLBCを用いた。また、腫瘍は良性の濾胞腺腫、悪性の濾胞癌、乳頭癌、髄様癌を用いて評価を行った。

結果として、全体的に非特異的反応が多く、特に細胞の重なりが多いLBC以外の検体では評価が難しかった。LBCでも細胞の重なりが多い部分では非特異的反応が大きいため評価に適さず、重なりのない部分の細胞ではFFPE組織標本と同様な核内フォーカスを確認できた。また、良性疾患と比較して悪性疾患、特に乳頭癌に関しては核内フォーカスが多い傾向が観察されたが、評価対象のばらつきが大きく正確な評価は難しかった。

以上より、仮説の検証は一部可能であった

が、今後課題を残す状況である。原因としては、大規模施設からの検体確保が出来ず濾胞癌LBC検体の採取が難しかった事と、細胞の重なりのない検体を作る方法を確立できなかった事が考えられる。今後も大学院生の研究課題として実験を継続したい。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Ryota Otsubo, Katsuya Matsuda, Shiro Miura, Hisakazu Shindo, Mitsuyoshi Hirokawa, Akira Miyauchi, Takeshi Nagayasu, Masahiro Nakashima: Immunofluorescence analysis of P53-binding protein 1 (53BP1) in thyroid follicular tumours: Possibility for preoperative diagnosis. 26th European Congress of Pathology (ECP2014), 2014-08-30,31,09-01,02,03, ロンドン (英国)

〔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:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 洋 (YANO, Hiroshi)  
長崎大学・病院 (医学系)・講師  
研究者番号 : 50380887

(2) 研究分担者

永安 武 (NAGAYASU, Takeshi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・  
教授  
研究者番号 : 80284686

大坪 竜太 (OOTSUBO, Ryota)  
長崎大学・病院 (医学系)・助教  
研究者番号 : 80570043