

濱田亜衣子 論文内容の論旨

主論文

Diagnostic usefulness of PCR profiling of the differentially expressed marker genes in thyroid papillary carcinomas
(甲状腺乳頭癌の診断における PCR 法による遺伝子発現プロファイルの有用性)

濱田亜衣子、スベトラーナ・マンコフスカヤ、ウラジミール・サエンコ、
タチアナ・ログノビッチ、三根真理子、難波裕幸、中島正洋、
ユーリ・デミチック、エウゲニー・デミチック、山下俊一

(Cancer Letters 掲載予定)

長崎大学大学院医学研究科 生理系専攻
(指導教授: 山下 俊一 教授)

緒言

術前甲状腺乳頭癌(PTC)の診断は、細胞診における特徴的な核所見が有用である。しかし、濾胞型乳頭癌(FVPTC)や濾胞癌では、良性腫瘍と重複する細胞所見があり、術中の病理診断や細胞診でも診断が困難な例が多い。ここ数年 DNA マイクロアレイやプロテオミクス研究が進み、網羅的遺伝子発現解析の結果、細胞診の補助診断となりうる可能性のある遺伝子群が新たに報告されている。PTC は多彩な臨床経過をとる疾患であるが、FVPTC を含む PTC の網羅的遺伝子発現解析により、PTC に共通する遺伝子発現プロファイルが注目される。今回の研究では、複数の遺伝子発現パターンに基づき、RT-PCR の従来法でも解析可能で、簡便かつ感度の高い PTC の遺伝子診断法の臨床応用の可能性について検討した。

対象と方法

- 1) PTC 患者 9 例の腫瘍組織と正常組織を用いて、mRNA 発現プロファイルで先に報告された遺伝子(発現上昇: *CITED1*, *CHI3L1*, *FN1*, *RIL*, *SFTPB*, 発現低下: *ITPR1*, *TFF3*, *TPO*)を real-time PCR で定量した。
- 2) PTC 患者 18 例と良性甲状腺腫瘍患者 21 例(濾胞腺腫 19 例・腺腫様甲状腺腫 2 例)の腫瘍組織と正常組織、加えて健康な提供者の末梢血 10 例を用いて、目的の遺伝子と housekeeping gene (*KPNA4*)を同時に増幅する duplex PCR を行い発現を半定量した。ゲルの画像をデジタル化してバンドの強さを数値化した後、組織間の発現レベルの差を Mann-Whitney test で解析した。
- 3) stepwise logistic regression analysis と partition analysis を行って PTC の鑑別に最適な遺伝子の組み合わせ条件を検討し、その条件で cluster analysis を行った。

- 4) 3) で選択した *SFTPB* と *TFF3* の遺伝子発現に基づき、組織標本の解析結果を用いて PTC の鑑別を行い感度・特異度・正確度を求めた。
- 5) FNAB サンプル 42 例 (組織診断が得られた 9 例と経過観察中の 33 例) を用いて同様に解析した。

結 果

- 1) 先に報告された遺伝子群について、PTC 腫瘍組織における過剰発現と発現低下を確認した。
- 2) duplex PCR による半定量で *TPO* を除いた 7 種類の遺伝子群で PTC 腫瘍組織と良性腫瘍組織、また正常組織との間に有意な発現レベルの差を認めた。
- 3) *TPO* 以外の 7 種類の遺伝子による解析の結果 PTC の鑑別に最適な因子は *SFTPB* と *TFF3* であった。
- 4) PTC の腫瘍組織の発現パターンは *SFTPB* が *TFF3* より高く、正常組織や良性腫瘍組織では逆の関係を示した。*SFTPB* が *TFF3* の発現より高い症例を PTC と診断すると感度、特異度、正確度はそれぞれ 77.8、93.3、89.7 (%) (partition analysis では 88.9、96.7、94.9) であった。
- 5) 病理診断が得られた FNAB9 症例では、分子診断と病理診断の結果が一致したのが 8 例 (88.9%) で偽陰性が 1 例あり、感度、特異度、正確度はそれぞれ 75、100、88.9 (%) であった。病理診断が得られていない FNAB33 例では、PCR による増幅が不可能であった症例が 4 例 (9.5%)、発現パターンが細胞診の結果と一致したのが 22 例 (75.8%: 細胞診が PTC であった 7 例全例、non-PTC であった 22 例中 15 例)、細胞診上悪性所見を認めなかった 22 例中 PTC 様の遺伝子発現パターンを示した症例が 7 例 (病理診断がない 33 症例中の 24.1%) があった。

考 察

PTC 遺伝子診断の候補遺伝子群の有用性を RT-PCR により検討した。duplex PCR 法による解析では、PTC とそれ以外の組織の間に *TPO* 以外の遺伝子で有意な発現の差を認めたが、発現レベルが重複する範囲が幅広く存在することから、1 つの遺伝子の発現量の過少による PTC の鑑別は難しい。そこで統計学的解析から *SFTPB* と *TFF3* の組み合わせた発現量の半定量解析を行うことで、通常の細胞診で良悪性の判定が困難な場合における補助的な検査方法となりうる可能性が示唆された。*SFTPB* と発がんとの関連性が最近報告され、*TFF3* は甲状腺濾胞癌や PTC における発現低下とは逆に、乳癌、大腸癌、粘液型皮膚癌における発現上昇が報告されており、細胞分化への関連性が示唆されている。しかし、発がんにおける役割は明らかではない。これらの遺伝子群の発がんにおける分子機構の解明は今後の検討課題である。

最後に、細胞診では良性で PTC 様の遺伝子発現パターンを示すものがあるなど、この方法の有用性を最終的に確認するためには、これらの症例の今後の経過観察が必要であり、更に術前診断と手術成績の一致率を高める効率的な発現プロファイルの種類や組み合わせを含めた包括的診断基準の作成も必要である。