

甲状腺癌の分化・増殖制御機構の変調

菅 間 博¹⁾ 平 野 浩 一²⁾ 中 里 陽 子²⁾
 千 葉 知 宏¹⁾ 石 井 順^{1,3)} 山 本 浩 之¹⁾ 有 益 優¹⁾

- 1) 杏林大学医学部病理学教室
 2) 杏林大学医学部甲状腺外科学教室
 3) 獨協医科大学医学部病理学講座

【はじめに】

甲状腺はヨードからホルモン産生し分泌する特殊なホルモン臓器である。甲状腺から発生する癌の95%は乳頭癌と濾胞癌の分化癌で、ホルモンに関わる分化形質を保持している。甲状腺分化癌には癌遺伝子変異が高率にみられるが、細胞増殖が遅く予後は良好である。本研究では福島原発事故前後の疫学データから甲状腺癌の病態を巨視的に捉えるとともに、その発病機構を明らかにすることを目的として、甲状腺癌分化癌のもつホルモン制御機構の増殖機構への関与を臨床病理学的ならびに実験病理学的に検討した。

【甲状腺癌の発病機構についての疫学的研究】

甲状腺はヨードを取り込み貯留するため、放射性ヨードによる内部被曝が原因で甲状腺癌が発生する。実際に30

年前のチェルノブイリ原発事故後に、小児の甲状腺癌が多発した¹⁾。そのため福島第一原発事故後に若年者を対象とした集団検診が行われ、これまで多数の甲状腺癌が発見されている。しかし放射線医学的には、福島での内部被曝線量はチェルノブイリに比べかなり少ないことが検証されている。また、福島の小児甲状腺癌に検出される遺伝子変異は、チェルノブイリで多くみられたRET/PTC遺伝子再構成ではなく、被曝歴のない成人甲状腺癌に高頻度に検出されるBRAF点変異である²⁾。即ち、福島の甲状腺癌は、内部被曝による発癌ではなく、自然発生したものと解釈される。この事実から甲状腺癌の発病機序について何が解るのか？福島以前の小児および成人の甲状腺癌の疫学データと比較検討した。

福島原発事故以前の甲状腺癌は、国立がんセンター統計(1975～2010年)³⁾によれば、10歳未満では稀で二次性徴

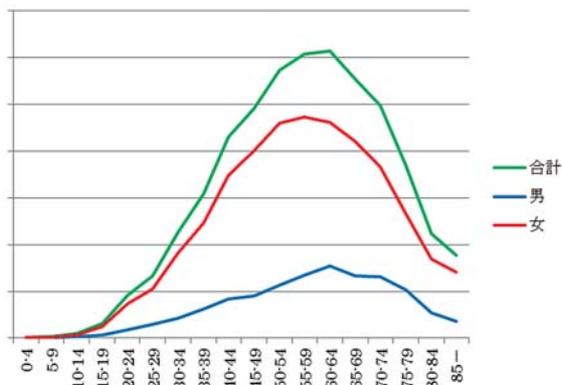


図1A 甲状腺癌の年齢分布

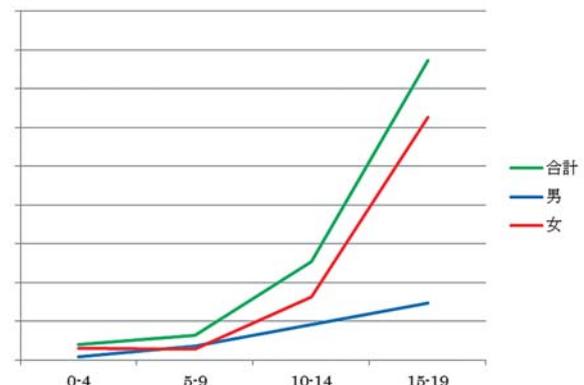


図1B 若年者甲状腺癌の年齢分布

が始まる10歳位から女兒優位に発症がみられる。15歳以下の小児甲状腺癌の罹患率は約100万人に1人程度である。甲状腺癌の罹患率は15歳以降で一次関数的に増加し、女性は55-60歳、男性は60-64歳をピークに以降は減少する(図1A, B)。全年齢の甲状腺癌の罹患率は人口10万あたり14.2人(2015年)と比較的高いが、死亡率は人口10万あたり1人程度と低く予後良好である。2017年の臨床病期別の甲状腺癌の10年相対生存率は前立腺癌に次いで2番であるが、甲状腺癌は前立腺癌より発症年齢が圧倒的に若く病期IVの生存率が高いことを考慮すると、実質的に甲状腺癌の長期予後は1番で、20年相対生存率は95%に達する。福島原発事故以前の国内の多施設の若年者甲状腺癌の病理学的検討では、小児の甲状腺癌の組織型は、成人同様に乳頭癌と濾胞癌の分化癌が大部分で、術後の20年生存率は乳頭癌に限れば98%であった⁴⁾。

福島原発事故後のデータでは、検診を受けた約30万人の18歳以下に、2016年末までの約5年間で145人の甲状腺癌が発見され手術されている。この中には超音波検査の感度が高いため5mm程度の癌も含まれおり、また、15歳以上の小児の定義にあたらない若年者の癌も含まれている。厳密に罹患率に換算することは難しいが、人口10万人の1年あたりの検出率を算出すると、年間9.7人となる。これはそれまでの小児甲状腺癌の罹患率の約100倍で、本邦の全年齢の甲状腺癌の罹患率の半分以上に相当する。病理学的に甲状腺癌の組織型は、乳頭癌が優位(143/145人=98.6%)で、成人と同じである。即ち、福島集団検診の結果、自然に発生する小児ないし若年者の甲状腺癌は、極めて頻度が高く、その組織型は成人と同じ分化癌の乳頭癌が殆どである。乳頭癌の細胞増殖は極めて遅いことから⁵⁾、細胞レベルでの発生時期は発見される小児期より早く、乳幼児期と推測される。福島原発事故以前の国内の疫学データと合わせると、甲状腺分化癌の発病機構についての仮説として、「甲状腺分化癌は乳幼児期に発生し、二次性徴以降に女性ホルモン等の影響下に極めてゆっくり増大し、通常は成人になってから発症する」のではと考えられた。

【甲状腺分化癌の臨床病理学的な研究】

発癌の主な機序は増殖に関与する遺伝子の異常であり、腫瘍の自立的および無限の増殖を惹き起こす。主に遺伝子異常は点突然変異による塩基配列の変化と、遺伝子DNAの2重鎖切断後に生じる遺伝子再構成に分けられる。放射線は障害エネルギーが大きく、後者の遺伝子再構成の原因となる。甲状腺分化癌にも自立的な増殖を惹起する遺伝子異常が高頻度に認められる。具体的に乳頭癌では*BRAF*(*V600E*)の点変異と*RET/PTC*の遺伝子再構成がそれぞれ排他的に認められる⁶⁾。これらの遺伝子異常は肺癌をはじめとする他臓器の癌でもよくみられ、主要な増殖シグナルであるMAPK経路やPI3K経路を恒常的に活性化し、腫瘍細胞の自立的増殖を起こす。また、腫瘍の無限増殖を惹起する遺伝子異常として、細胞寿命を規定するテロメアを伸長するテロメラーゼ(Telomerase Reverse Transcriptase: *TERT*)のプロモーター領域の点突然変異と、一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism: SNP)が報告されている。そこで実際の甲状腺分化癌の臨床検体で、*BRAF*、*RET*、*TERT*プロモーターの異常を解析し、年齢、性、臨床病期等との関係を検討した。

杏林大学医学部附属病院で切除された成人甲状腺乳頭癌の病理組織標本、ホルマリン固定パラフィン包埋標本(FFPE標本)を対照として用いた。腫瘍部、非腫瘍部よりDNAを抽出し、*BRAF*、*RET*、*TERT*プロモーターの塩基配列に特異的なプライマーを設計し、PCR法で増幅し、塩基配列のシーケンス解析をおこなった(図2A, B)。FFPE標本中の腫瘍から癌関連遺伝子の変異を高感度に検出、分析することが可能となった⁷⁾。その結果、*BRAF*^{*V600E*}変異が比較的高頻度に認められたが、*RET/PTC*の遺伝子再構成は認められなかった。*BRAF*^{*V600E*}変異と年齢、性、腫瘍径、臨床病期との間に有意な関係はなかった。また、増殖速度の指標となるKi-67ラベル率は全例1%以下と極めて低く、*BRAF*^{*V600E*}変異との相関はなかった。*TERT*プロモーターに関しては報告されているC228T、C250Tとも変異の頻度は極めて低かった。一方、SNPとして*TERT*プロモーターの多型(regulatory SNP)であるrs2853669

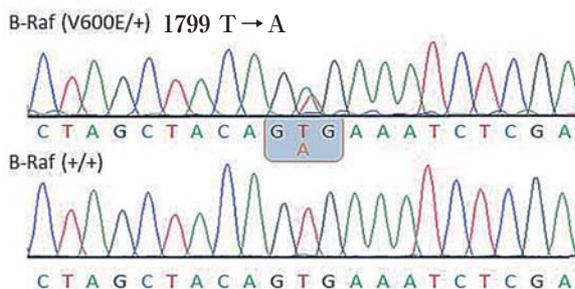


図2A *B-Raf* (*V600E*) 点突然変異

rSNP(rs2853669)

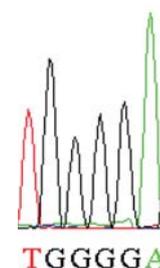


図2B *TERT*プロモーター SNP

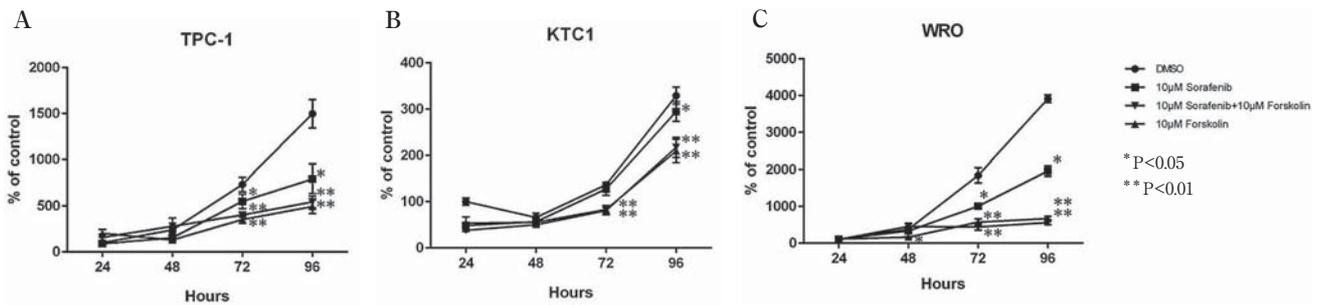


図3 分化型甲状腺癌細胞株 TPC-1 (A), KTC1 (B), WRO (C) の増殖に対する Sorafenib と Forskolin の作用

が約6割にみられた。また、C228T, C250TやSNPの有無と、患者年齢等の臨床病理学的事項との間には統計的に有意な関係はみられなかった。rs2853669は甲状腺癌発症の遺伝的素因の可能性があるが、技術的な検討と症例数を増やし検証する必要がある。

【甲状腺癌培養細胞を用いた実験病理学的な研究】

甲状腺の生理的な増殖シグナルとしては、一般的なチロシンキナーゼ型の増殖因子受容体 (RTK: receptor tyrosine kinase) を介する MAPK 経路や PI3K 経路とともに、甲状腺特異的な TSH 受容体を介する生理的な cAMP 経路がある。最近、根治切除不能な甲状腺癌の治療として、RTK 下流の MAPK 経路を阻害する分子標的薬 (Sorafenib 等) が用いられている¹¹⁾。一方、TSH 受容体刺激による cAMP 経路の活性化は、ホルモン分泌亢進とともに濾胞細胞の増殖をおこすと考えられている。このため進行した甲状腺癌の術後治療として、TSH 抑制薬による cAMP 経路の抑制療法が以前から行われている⁸⁾。しかし、これまで我々は TSH 受容体刺激下流のアデニル酸シクラーゼ (AC) の刺激剤である Forskolin で cAMP 経路を活性化すると、甲状腺癌細胞の増殖が逆に抑制されることを報告している^{9, 10)}。そこで甲状腺癌の増殖における MAPK 経路と cAMP 経路の関係を明らかにすることを目的として、甲状腺癌細胞の増殖への Sorafenib と Forskolin の作用を比較検討した。

甲状腺分化癌のモデル培養細胞として、乳頭癌由来の TPC-1 と KTC1, 濾胞癌由来の WRO を用いた。遺伝子背景として、TPC-1 は RET/PTC の再構成, KTC1 と WRO は B-Raf (V600E) 変異を有している。これにより3種の細胞の MAPK 経路が恒常的に活性化されていることを、リン酸化 ERK1/2 の発現亢進により確認した。Sorafenib と Forskolin の両者は TPC-1, KTC1, WRO のいずれの細胞とも増殖抑制的にかつ相加的に作用し (コントロール DMSO 群比較), その作用は3種の細胞とも Forskolin が有意に強かった (図3)。作用機序としては、Sorafenib ではリン酸化 ERK1/2 の発現が低下することから、MAPK 経路の抑制と考えられた。一方、Forskolin では ERK1/2 の発現は低下せず、またリン酸化 AKT も変化しないことか

ら、MAPK 経路や PI3K 経路とは異なる機序が関与していると考えられた。さらに詳細な機序を解明すべく、cAMP 経路下流の PKA 以下のシグナル解析, ならびに cAMP 経路上流の 10 種 AC アイソフォームの遺伝子工学的な解析を進めている。

以上、研究中間段階で、「甲状腺分化癌の多くは乳幼児期に発生し、2次性徴後にゆっくり増大し、成人になってから発症する」こと、その増殖抑制機構にホルモン制御機構である cAMP 経路が深く関与していることが示唆された。

参考文献

- 1) Kazakov, V.S., Demidchik, E.P., Astakhova, L.N.: Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 359: 21-22, 1992.
- 2) Mitsutake N, Fukushima T, Matsuse M, et al. BRAF^{V600E} mutation is highly prevalent in thyroid carcinomas in the young population in Fukushima: a different oncogenic profile from Chernobyl. *Scientific Reports* 5, 16976, 2015.
- 3) 国立がん研究センターがん情報サービス: 全国がんセンター協議会統計2017.
- 4) 菅間博: 小児甲状腺癌の病理組織学的特徴. *日本内分泌甲状腺外科誌* 30, 281-86, 2013.
- 5) Yoshida A, Kamma H, Asaga T, et al. Proliferative activity in thyroid tumors. *Cancer* 69: 2548-2552, 1992.
- 6) 菅間博, 住石歩, 千葉知宏, 他 甲状腺腫瘍の遺伝子診断と細胞診 *日内分泌甲状腺外科誌* 31, 125-129, 2014.
- 7) Yamamoto H, Ishii J, et al.: Sporadic minute medullary thyroid carcinoma with a double RET mutation: a case report: *Pathology International*. in press.
- 8) Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 American thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer (*Thyroid* 26: 1-133, 2016).
- 9) Yano Y, Kamma H, Matsumoto H, et al. Growth suppression of thyroid cancer cells by adenylcyclase activator. *Oncol Rep* 18: 441-445, 2007.
- 10) Matsumoto H, Sakamoto A, Fujiwara M, Yano Y, Shishido-Hara Y, et al. Cyclic AMP-mediated growth suppression and MAPK phosphorylation in thyroid papillary carcinoma cells. *Mol Med Rep* 1: 245-249, 2008.
- 11) Takami H, Ito K, Sugino K. Development of molecular targeted drugs for advanced thyroid cancer in Japan. *Endocr J* 61: 833-839, 2014.

List of publications 論文

- 1) 菅間博, 千葉知宏: 甲状腺未分化癌, 低分化癌Update 甲状腺低分化癌の病理診断基準Update. 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌 (2186-9545) 33巻Suppl.1 S65, 2016.
- 2) 千葉知宏, 菅間博: 【第7版の甲状腺癌取り扱い規約における変更点について】 甲状腺低分化癌について. 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌 33巻2号78-82 (2186-9545), 2016.
- 3) 藤原正親, 坂本憲彦, 加藤拓, 菅間博: PAX8免疫染色が診断に有用であったNapsin A陽性甲状腺癌による癌性胸膜炎の1例. 日本臨床細胞学会雑誌 55:355-356, 2016.
- 4) 山本浩之, 菅間博: 【甲状腺癌の診断と治療】 甲状腺細胞診の報告様式へのベセスダシステムの導入-第7版『甲状腺癌取り扱い規約』における"鑑別困難". 医学のあゆみ 260巻9号773-778, 2017.
- 5) 岡部 直太, 菅間 博: 予後不良な高分化癌(乳頭癌, 濾胞癌)とは? 日本内分泌外科・甲状腺外科学会雑誌 第34巻2号, 93-96, 2017.
- 6) Sawa A, Chiba T, Kamma H, et al.: Effects of sorafenib and adenylyl cyclase activator on in vitro growth of well-differentiated thyroid cancer cells. Endocrine Journal, in press.
- 7) Yamamoto H, Ishii J, Kamma H, et al.: Sporadic minute medullary thyroid carcinoma with a double RET mutation: a case report: Pathology International.
- 菅間博: ALTがん細胞における巨大テロメア核体の形成機序. 第105回日本病理学会総会, 仙台, 2016年5月12-14日.
- 3) 澤文, 千葉知宏, 石井順, 住石歩, 山本浩之, 原尚人, 菅間博: 甲状腺癌増殖シグナルにおけるアデニル酸シクラーゼの作用. 第105回日本病理学会総会, 仙台, 2016年5月12-14日.
- 4) 千葉知宏, 伊波巧, 下山田博明, 藤原正親, 澤文, 片岡雅晴, 大郷恵子, 佐藤徹, 植田初江, 菅間博: 肺高血圧症に対するソラフェニブ治療 肺血管病理の解析. 第105回日本病理学会総会, 仙台, 2016年5月12-14日.
- 5) 越川卓, 廣川満良, 菅間博, 長沼廣, 近藤哲夫, 加藤良平, 坂本穆彦: 新しい甲状腺癌取り扱い規約(第7版) 組織診断基準と細胞診報告様式 細胞診断報告様式. 第57回日本臨床細胞学会, 横浜, 2016年5月28-29日.
- 6) 菅間博: 新しい甲状腺癌取り扱い規約(第7版) 組織診断基準と細胞診報告様式 甲状腺腫瘍の組織診断基準について. 第57回日本臨床細胞学会春季大会, 横浜, 2016年5月27-29日.
- 7) 岩崎博幸, 林宏行, 千葉知宏, 菅間博: 上咽頭癌の外照射治療後に発症した甲状腺腫瘍の一例. 第49回日本甲状腺外科学会学術集会, 甲府, 2016年10月27-28日.
- 8) 菅間博: 小児甲状腺腫瘍の特徴. 第55回日本臨床細胞学会, 別府, 2016年11月18-19日.
- 9) 石井順: SLC26A7が甲状腺の新たなヨード輸送体である可能性について. 第60回日本甲状腺学会, 別府, 2017年10月5-7日.
- 10) 山本浩之, 石井順, 澤文, 千葉知宏, 菅間博: 甲状腺癌の増殖シグナルにおけるアデニル酸シクラーゼの作用. 第50回甲状腺外科学会, 福島, 2017年10月26-27日.
- 11) 有益優, 廣川達也, 山本浩之, 千葉知宏, 藤原正親, 菅間博: 甲状腺癌細胞株におけるTERTプロモーター領域の点突然変異とrSNP. 第21回日本臨床内分泌病理学会, 東京, 2017年10月27-28日.

講演記録

- 1) 相澤陽太, 千葉知宏, 石井順, 澤文, 住石歩, 菅間博: microRNAを用いたSTAT family分子の同時ノックダウンシステムの開発. 第105回日本病理学会総会, 仙台, 2016年5月12-14日.
- 2) 有益優, 寺戸雄一, 藤原正親, 千葉知宏, 石井順, 岡部直太, 菅