

甲状腺濾胞癌の術前分子診断法の開発状況

たかの とおる
高野 徹*

* 大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学

Key words 甲状腺濾胞癌 (follicular thyroid carcinoma), 分子診断 (molecular-based diagnosis), 穿刺吸引核酸診断法 (ABND), trefoil factor 3, galectin-3

濾胞癌の術前診断法—30年来の宿題

甲状腺濾胞癌 (follicular thyroid carcinoma) は甲状腺悪性腫瘍の10%弱を占める日本では比較的頻度の低い腫瘍である。WHOの診断基準では濾胞を形成する腫瘍のうち、局所浸潤や遠隔転移を来しているものを濾胞癌とし、それらを認めないものを濾胞性腫瘍としている。しかし、これらの所見は当然のことながら手術摘出後の病理組織標本のみで検討が可能であり、術前に判定することはできない。したがって、穿刺吸引細胞診で濾胞性腫瘍と診断される症例のうち圧倒的多数が濾胞腺腫であるにもかかわらず、濾胞癌との鑑別が困難なため、これらの症例は手術をしない限りは一生の経過観察を余儀なくされるのである。この問題は穿刺吸引細胞診が導入された当時から指摘されていたことであり、いわば30年来の宿題である。

過去15年くらいにわたり、各国で様々な研究開発がなされてきたが、現在はこれら研究レベルの検討はほぼ終了し、可能性を示された数々の方法のうちベストなものを選択して実用化を目指す段階に移っている。それらの試みのうちで先行しているのがイタリアを中心として解析が進められている免疫染色法、Galectin-3 thyrotectと我々のグループが開発した穿刺吸引核酸診断法 (Aspiration biopsy nucleic acid diagnosis, ABND) である¹⁾。

Galectin-3 thyrotect

Galectin-3 (LGALS3) は2001年にBartolazziらから濾胞性腫瘍からの穿刺吸引検体を対象として抗Galectin-3モノクローナル抗体を使用した免疫染色を試みたところ、濾胞癌からの穿刺検体の90%が染色されたのに対し、濾胞腺腫からの検体では8%しか

染色されなかったとする劇的な報告が出されたのをきっかけに、多くの追試検討がなされた²⁾。しかし、報告数が増えるにしたがって以下の二つの問題点が浮かび上がってきた。一つは濾胞癌と濾胞腺腫との鑑別が可能かどうかについては研究者によって結論がまちまちであり、濾胞腺腫、濾胞癌での陽性率はそれぞれ0~89%, 21~100%と報告によって極端な開きがある。実験手技の違いが原因ではないかとの説もあるが理由は不明である。もう一つは濾胞癌と濾胞腺腫の間のgalectin-3の発現量は蛋白レベルでもメッセンジャーRNA (mRNA) レベルでも定量解析では有意な差がないことである^{3), 4)}。したがって、実際に抗galectin-3抗体による染色性に差があるなら発現量との間に乖離があることになるが、その理由は不明である。

Bartolazziらは2008年に免疫染色キットGalectin-3 thyrotectを使用した多施設での性能検討の結果を報告した。この検討では乳頭癌の術前診断に対する有用性は確認されたが、濾胞癌での検討例は15例にとどまり、キットの陽性率も60%と以前の報告から大きく後退している⁵⁾。このキットの濾胞癌の診断における有用性についての判断は、さらなる追試の結果を待つべきであろう。

穿刺吸引核酸診断法 (ABND)

ABNDは、穿刺で回収された腫瘍細胞の核酸を解析することで腫瘍の良悪を判定する方法で我々のグループが世界で最初に開発し、その後も改良を続けてきた。甲状腺癌では主として腫瘍細胞内のmRNAの発現量を定量して良悪の判定をすることになる。甲状腺の穿刺検体でこの方法を使用するには一つの問題点があった。穿刺吸引で甲状腺腫瘍細胞を回収する場合、よほど上手に操作しない限り、同

時にかかりの量の末梢血を吸引する。特に、血流が豊富で細胞同士の接着が強い濾胞性腫瘍の場合にこの傾向が強い。この場合、肝心の腫瘍細胞は同じくmRNAを発現する白血球に対して比較的少数となり、mRNAの発現量の定量結果に重大な誤差をもたらす。したがって、検体中の白血球を除く操作が必須である。我々は、日常診療における検体の採取・保存が簡便な方法としてフィルター濾過法を開発した⁶⁾。この方法の概略を図1に示す。まず、通常のとおり、腫瘍を穿刺して、細胞診用の検体を作成する。その後、直ちに抗凝固剤を加えた低張液中に針に残った細胞を懸濁することで、赤血球を溶血させると同時に白血球が塊となることを防ぐ。この後、全量をRNA保存液に移す。この操作は10秒ほどしかかからず、溶液を移し変えるだけなので特に分子生物学の知識のない医療者でも簡単に検体採取ができる。検体は最低2週間保存可能である。採取された検体は30 μ mのフィルターを通すと、白血球は濾過されてしまうが、通常細胞塊となって採取される甲状腺腫瘍細胞はフィルター上に残って回収される。ただし、この方法では血球細胞は除かれるものの、変性部位や嚢胞などの穿刺で結合組織の断片を吸引した場合は除去できず、中に含まれる線維芽細胞などの干渉を受けて癌か否かの判定において偽陽性の原因となる可能性も指摘されている。

濾胞癌を診断するための マーカーとなる遺伝子の探索

我々は濾胞癌と濾胞腺腫に発現している遺伝子を網羅的に解析し、trefoil factor 3 (TFF3)を両者で発現量の差が最も大きい遺伝子として同定した。TFF3 mRNAの発現は乳頭癌・未分化癌・濾胞癌で低下し、

濾胞腺腫、腺腫様結節で上昇しているため、濾胞癌に限らず、甲状腺の結節性病変の鑑別診断に広く使えるマーカーである⁷⁾。最近になって、報告された候補遺伝子のうちどれが最も有用であるかという比較検討がなされるようになり、多くの論文でTFF3 mRNAはベストマーカーとして位置付けられている。TFF3は分泌蛋白として細胞表面を保護する働きがあることが示唆されている。甲状腺においてはホルモン合成時に発生する活性酸素などから甲状腺上皮細胞を保護する目的で発現しているのではないかと考えられ、実際、TFF3 mRNAは機能性腺腫では高発現している。良性腫瘍にTFF3 mRNAが発現する理由については、甲状腺において機能性腺腫が良性とみなされるのと同様に、TFF3 mRNA高発現型の腫瘍はホルモン合成に向けての準備が整ったより高分化な腫瘍であるからと考えられる。なお、抗TFF3抗体を使用した免疫染色法はあまりうまくいかないようである。

TFF3 mRNAが提示した 濾胞癌の分子診断の「15%問題」

このように、各国からのデータで濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別マーカーのエースとしてみなされている割にはTFF3 mRNAの性能はあまりぱっとしない（これは発見者の私が言うのだから間違いない）。濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別診断についてのTFF3 mRNAをベースとした診断の正診率は80%程度である。しかし、どう追試してもやはりTFF3 mRNAを超えるマーカーは見つからないのである。

この現象を解釈する材料となる情報を二つ提供したい。まず、考えなければいけないのは微少浸潤型濾胞癌の診断は必ずしも容易でないという事実である。事実、術後の病理診断で濾胞腺腫と診断されていても、後日遠隔転移が見つかる例は時折報告されるのでまったく油断できない⁸⁾。我々の検討でも、病理医が自信を持って診断していない症例を除くとTFF3 mRNAによる診断との一致率は90%近くまで上昇する。第二点であるが、谷口らの報告によると、濾胞性腫瘍に発現している2500個以上の遺伝子の発現量をマーカーにして、あらゆる組み合わせを試してみると、どんな組み合わせを使っても良悪鑑別において病理診断との一致率は90%を超えることはなかったとのことである⁹⁾。この事実は少なくとも10%の症例に関しては現状の病理診断が腫瘍の生物学的特性から乖離しているということを証明している。

以上の事実より、分子診断法の性能を議論する場合、微少浸潤型濾胞癌の病理診断との一致率のみを指標に評価するのは適当でないと考えられる。我々が濾胞性腫瘍に関して知りたい情報は、臨床的に問

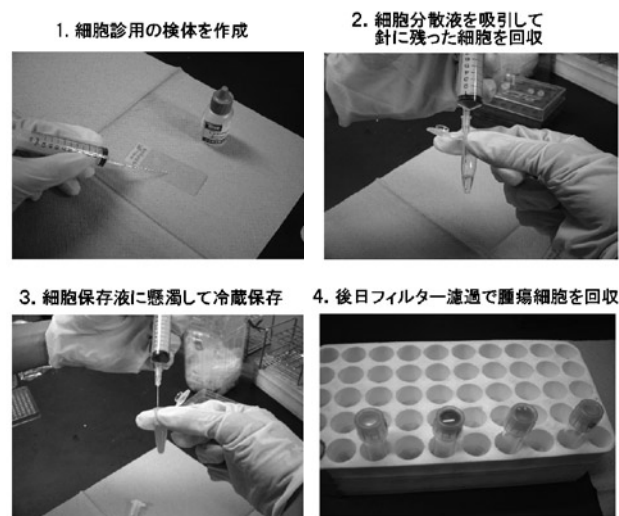


図1. ABNDにおける検体採取法

題を起し得る症例であるかどうか、すなわち広汎浸潤型濾胞癌や微小浸潤型濾胞癌でも遠隔転移を起こしうる症例であるか否かである。まずはこの原点に戻ってデータを見直す必要がある。このような観点から、広汎浸潤型濾胞癌と微小浸潤型濾胞癌で遠隔転移を有する症例について解析してみたところ、TFF3 mRNAによる診断と病理診断が完全に一致した。同様の現象がヨーロッパにおける追試でも確認されている¹⁰⁾。すなわち、乳頭癌などを含め遠隔転移や広汎な浸潤など臨床的に問題を起こしうる腫瘍は必ずTFF3 mRNA低発現型であり、臨床的にはこれらにのみ注目して管理したらよいことになる。分子診断と病理診断の乖離は遠隔転移を有さない微小浸潤型濾胞癌に限定して発生し、その率は前述の谷口の報告には広汎浸潤型濾胞癌を少数例含むため、15%程度ではないかと推測される(我々はこれを濾胞癌の15%問題、15% issueと呼んでいる)(図2)。微小浸潤型濾胞癌の病理診断の診断基準に関してはなんらかの分子的クライテリアを導入した上での改訂を望みたいところである。

ABNDが臨床現場に登場した場合の予想される問題点

我々はTFF3 mRNA発現を指標としたABNDのトライアルを実際の患者を対象として開始している。手術摘出を施行されているものも数例出ているが(全例TFF3 mRNA低発現型で乳頭癌であった)、残念ながら症例数がまだ少ないこともあり濾胞癌の情報は得られていない。この実施の過程でもう一つの問題が浮かび上がってきた。それは、平行して施行している細胞診で濾胞性腫瘍と判断された検体のうち20%程度がTFF3 mRNA低発現型と判断されていることである。前述のように検体に結合組織が混入した場合の偽陽性のケースも考えられるが、それでも15%程度の症例は実際にTFF3 mRNA低発現型ではないかと推測する。

これは、組織標本を用いた解析ですでに予測されていたことである。TFF3 mRNA発現量で乳頭癌・未分化癌・臨床的濾胞癌を見逃さないラインでカットオフを引くと、濾胞腺腫の15%程度がTFF3 mRNA低発現型と判定されてしまうのである(図2)。これがもう一つの15%問題である。病理診断が正しく、分子診断がover diagnosisであるとすると、遠からずこれらの腫瘍を良性と判定できるようなマーカーが発見され、問題は解決されるであろう。しかし、そうでない場合、これらの腫瘍は乳頭癌・未分化癌・臨床的濾胞癌といった臨床的に問題を引き起こす可能性のある腫瘍と生物学的に区別できないことを意味し、臨床的な扱いをどうするかを今後考えてい

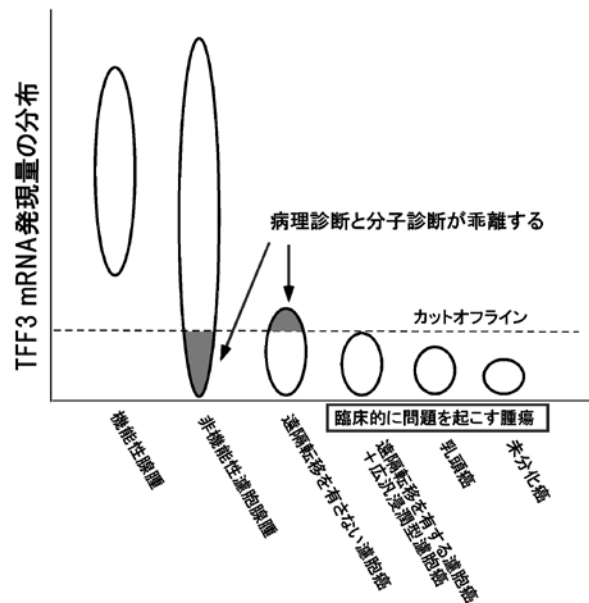


図2. 濾胞癌の分子診断の15%問題

臨床的に問題を起こすことが明らかな腫瘍をすべて拾えるようにカットオフ値を設定すると、遠隔転移を有さない濾胞癌と非機能性濾胞腺腫の一部の症例(グレーの部分)が病理診断の結果と乖離してしまう。

かなければならない。

濾胞性腫瘍の15%という非常に多くの症例が存在することになるが、それほど多数の悪性形質を持つ腫瘍が転移を起こさず臨床的にサイレントな状態で長期間存在し得るのであるだろうか? 甲状腺に関してはすでに前例がある。乳頭癌は微小なものまで含めると剖検例では30%程度に確認されるほど高頻度であるが、ほとんどがサイレントに経過し、臨床的に明らかな転移を来すものは極めて少数である。実際、1cm以下の小さな微小癌はただちに手術摘出するより経過観察されることが多い。同様な現象が濾胞性腫瘍で起こっていると考えても、あながちの外れな推測ではないのではないだろうか。甲状腺癌に限れば癌と診断されても実際に患者を癌死に至らせるものはごく少数であり、癌細胞が生物学的に転移・浸潤能を持つことと、生命予後に影響するかどうかということはまったく別に考えていくべきであるのかもしれない。TFF3 mRNAはおそらく前者の指標であろう。

現状でプロジェクトが進行すると、ABNDが臨床現場で登場するのはそれほど先の話ではない。予想されるスペックとしては現在細胞診で濾胞性腫瘍あるいはclass IIと判定されている症例のうち80%程度は良性、残りの20%程度は悪性の可能性のある腫瘍として分別可能である。術前に濾胞癌を判定する手段はまったくないのが実情であり、ABNDは甲状腺の結節性病変の治療方針決定の客観的指標として大いに活用してもらえないのではないかと期待している。

文献

- 1) Freitas BC, Cerutti JM: Genetic markers differentiating follicular thyroid carcinoma from benign lesions. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 321: 77-85
- 2) Bartolazzi A, et al.: Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001; 357: 1644-1650
- 3) Takano T, Miyauchi A, Matsuzuka F, Yoshida H, Kuma K, Amino N: Ubiquitous expression of galectin-3 mRNA in benign and malignant thyroid tumors. *Cancer Lett* 2003; 199: 69-73
- 4) Inohara H, et al.: Cytoplasmic and serum galectin-3 in diagnosis of thyroid malignancies. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376: 605-610
- 5) Bartolazzi A, et al.: Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study. *Lancet Oncol* 2008; 9: 543-549
- 6) Takano T, Higashiyama T, Uruno T, Yamada H, Yoshida H, Miyauchi A: Preparation of thyroid tumor cells in aspiration biopsies for aspiration biopsy nucleic acid diagnosis. *Head Neck* 2008; 30: 983-990
- 7) Takano T, Yamada H: Trefoil factor 3 (TFF3): a promising indicator for diagnosing thyroid follicular carcinoma. *Endocr J* 2009; 56: 9-16
- 8) Ito Y, et al.: Distant and lymph node metastases of thyroid nodules with no pathological evidence of malignancy: a limitation of pathological examination. *Endocr J* 2008; 55: 889-894
- 9) Taniguchi K, et al.: Differentiation of follicular thyroid adenoma from carcinoma by means of gene expression profiling with adapter-tagged competitive polymerase chain reaction. *Oncology* 2005; 69: 428-435
- 10) Foukakis T, Gusnanto A, Au AY, Hoog A, Lui WO, Larsson C, Wallin G, Zedenius J: A PCR-based expression signature of malignancy in follicular thyroid tumors. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14: 381-391