

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 甲状腺の良・悪性腫瘍におけるテロメラーゼ活性、hTERT (human telomerase reverse transcriptase) mRNA 発現とテロメア長

指導教官 上西紀夫教授

氏名 神森 眞

【背景と目的】 テロメラーゼは染色体末端に存在するテロメアの伸長に関与する逆転写酵素の一種である。テロメアは6塩基が繰り返し配列しており、機能的には染色体の分解、再構成、融合、消失などから染色体を保護、およびその対合に関与すると考えられている。体細胞においては、テロメアは増殖のたびにその長さを短縮することが知られ、生存するための限界の長さまで短縮すると分裂限界に至り細胞死を迎えると推測される。このように、体細胞では分裂のたびにテロメアは短縮するが、無限ともいえるべき細胞分裂を必要とする生殖細胞や血液幹細胞では、主にテロメラーゼによりテロメアの伸展、維持が図られている。このテロメラーゼは内在するRNAを鋳型としてテロメアを合成する一種の逆転写酵素であり、テロメアと相補的なRNA部分 (hTR: the human RNA component of telomerase) とテロメラーゼ触媒サブユニット (テロメラーゼ逆転写酵素: human telomerase reverse transcriptase, hTERT) , TEP1 (テロメラーゼ関連蛋白: telomerase associated protein 1) からなっている。テロメラーゼ活性が癌細胞で高頻度に発現していることが報告され新しい腫瘍マーカーとして期待されるようになった。そこで、本研究では甲状腺癌と甲状腺濾胞性腺腫の鑑別に先のパラメーターが有用であるかを検討した。つまり、本研究の目的は、甲状腺腫瘍および正常甲状腺組織について、テロメラーゼ活性、局在診断のためのISH法によるhTERT mRNA発現とテロメア長の変化について検討し、甲状腺腫瘍におけるテロメアとテロメラーゼの意義について解明することである。

【対象と方法】 <研究 1> 27例の甲状腺腫瘍患者の手術材料 (内訳は、甲状腺癌 12例 (乳頭癌 8例、濾胞癌 3例、髓様癌 1例)、甲状腺良性腫瘍 15例 (濾胞腺腫 9例、腺腫様甲状腺腫 5例、慢性甲状腺炎 1例)、同一症例からの正常甲状腺組織 21個) を用いて、TRAP法によるテロメラーゼ活性とサザンブロット法によるテロメア長測定を行い、臨床病理

学的因子およびサイログロブリン値との関連について検討した。〈研究 2〉手術された甲状腺濾胞腫瘍患者 21 例（内訳は、濾胞癌 6 例、濾胞腺腫 15 例）を対象として、TRAP 法によるテロメラーゼ活性測定と in situ hybridization (ISH) 法を用いた hTERTmRNA 発現を行い、臨床病理学的因子およびサイログロブリン値を含め検討した。

[結果]〈研究 1〉テロメラーゼ活性は、乳頭癌 7/8 例 (87.5%)、濾胞癌 3/3 例 (100%)、髓様癌 1/1 例 (100%)、濾胞腺腫 3/9 例 (30%)、慢性甲状腺炎 1/1 例 (100%)、正常甲状腺組織 1/21 例 (4.8%) で陽性を示した。腺腫様甲状腺腫 5 例全例でテロメラーゼ活性は陰性であった。H-E 染色標本による検索で、濾胞腺腫の 4 例にリンパ球浸潤を認め、うち 3 例でテロメラーゼ陽性であり、その 1 例に広範なリンパ球浸潤を認めた。正常甲状腺では 20/21 例でリンパ球浸潤を認めず、テロメラーゼ活性も陰性であった。テロメラーゼ活性と性別、年齢、病期、サイログロブリン値の間には相関関係は存在しなかった。テロメア長は、甲状腺癌 12 例 (100%) と甲状腺濾胞腺腫 9 例 (100%) 全例で正常甲状腺組織より短縮していた。すなわち、甲状腺癌の平均テロメア長は 9.14 ± 3.15 kbp で、これに対応する正常甲状腺組織 12.86 ± 2.76 kbp より有意に短縮していた ($p=0.0055$)。また、甲状腺濾胞腺腫の平均テロメア長は 10.38 ± 3.42 kbp で、これに対応する正常甲状腺組織 13.57 ± 3.80 kbp より有意に、短縮していた ($p<0.006$)。そして、それらのテロメア長差(正常組織テロメア長-腫瘍テロメア長)は、癌症例 3.73 ± 2.15 kbp (1.66-8.53 kbp)、濾胞腺腫症例 3.17 ± 2.09 kbp (0.59-5.87 kbp) であった。テロメア長と性別、年齢、進行度、サイログロブリン値の間には相関関係は存在しなかった。テロメラーゼ活性陽性で平均テロメア長差が 2kbp 以上短縮していた症例は、癌 11/12 例 (91.7%)、腺腫 1/9 例 (11.1%) であった。〈研究 2〉テロメラーゼ活性は、測定された甲状腺濾胞癌 5 例全例 (100%) (1 例未検)、濾胞腺腫 5/15 例 (30%) で活性を示した。テロメラーゼ活性と性別、年齢、病期、サイログロブリン値の間には有意な相関関係は存在しなかった。甲状腺濾胞癌では、主に核を中心に hTERTmRNA 発現が認められた。濾胞癌では、6/6 例全例で hTERTmRNA 発現を認めた。hTERTmRNA 発現は、腫瘍細胞数の 30%以上を ISH 法上の陽性とした。濾胞腺腫では、14/15 例で腫瘍細胞の hTERTmRNA 発現は陰性を示した。テロメラーゼ活性陽性であった濾胞腺腫は、4/5 例でリンパ濾胞に hTERTmRNA の発現を示した。hTERTmRNA 発現と性別、年齢、病期、サイログロブリン値の間には有意な相関関係は存在しなかった。

[考察]〈研究 1〉今回の研究では、テロメラーゼ活性は、乳頭癌 7/8 例 (87.5%)、濾胞癌 3/3 例 (100%)、濾胞腺腫 3/9 例 (33.3%)、髓様癌 1/1 例 (100%) で陽性を示した。これらの結果は、癌においてテロメラーゼ活性例が多く、良性腫瘍でテロメラーゼ活性例が少ないという他の報告と合致している。1 例の慢性甲状腺炎とリンパ球浸潤が広範にみられた 1 例およびリンパ球浸潤が軽度に存在した 2 例の濾胞腺腫でテロメラーゼ活性が陽

性を示した。非腫瘍性甲状腺疾患の中で、高度にリンパ球浸潤を伴った甲状腺炎はテロメラーゼ活性と関係があると報告されていることから、腫瘍へのリンパ球混入は、腫瘍そのもののテロメラーゼ活性偽陽性の原因と成りうると考えられた。この研究は *in vivo* での甲状腺組織のテロメア長測定の最初の報告例である。テロメア長は、ほとんどの癌腫で正常組織に比較して短縮していると報告されているが、今回の研究では、テロメラーゼ活性陽性例においても、甲状腺癌ではテロメア長は正常組織に比較して短縮していた。癌におけるテロメア長とテロメラーゼ活性の関係の検討は、卵巣癌、胃癌、腎細胞癌で行われており、本研究と同様にこれらの癌でテロメラーゼ活性陽性で平均テロメア長の短縮が生じていたと報告されている。このことは、甲状腺癌でもテロメア長の短縮が生じ、テロメア長短縮を補う形でテロメラーゼ活性が発現してくる可能性を示唆している。また、今回の研究でテロメラーゼ活性と平均テロメア長の短縮差 2kbp 以上を組み合わせると甲状腺癌と甲状腺濾胞腺腫を有意に鑑別できる可能性が示唆されたが、Nakamura らも大腸において、テロメア長差 2kbp 以上のもので癌と正常組織を有意に分類できると述べている。今回の研究結果では、甲状腺癌の増殖の過程でテロメラーゼ活性とテロメア長の短縮が生じていることが示唆された。テロメラーゼ活性発現と平均テロメア長短縮差の程度とを組み合わせると、甲状腺癌と甲状腺濾胞腺腫を鑑別するのに有用であると考えられた。そして、テロメラーゼ活性およびテロメア長の測定は、病理組織診断の補助診断および甲状腺濾胞腺腫の手術適応判定に利用できると考えられた。〈研究 2〉この研究は、甲状腺濾胞腫瘍に対する ISH 法を用いた hTERTmRNA 発現を検討した最初の報告である。甲状腺濾胞癌細胞は、核を中心に hTERTmRNA anti-sense probe にて強発現を示したが、sense probe では発現を示さなかった。また、リンパ濾胞内のリンパ球に hTERTmRNA anti-sense probe は、同様の発現を示したが、1 例を除いた濾胞腺腫および正常甲状腺組織では陰性であった。このことは、甲状腺濾胞腫瘍における ISH 法を用いた hTERTmRNA 発現は、甲状腺での hTERTmRNA の局在、濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別に有用であることを示唆している。Hiyama らによれば、血液中のリンパ球および組織中のリンパ組織のテロメラーゼは、極めて弱い活性を示すのみだと述べている。Liu らによれば、いろいろな組織のリンパ球はテロメラーゼ活性と hTERT の発現を示すが、hTERT 発現の程度とテロメラーゼ活性の強さには相関関係は存在しないと述べている。しかし、本研究の結果、腺腫組織そのものや正常組織では TRAP 法でテロメラーゼ活性陰性であるが、リンパ球浸潤の高度な場合にテロメラーゼ陽性となり、報告されている以上に組織内のリンパ組織は強いテロメラーゼ活性をもつこととして hTERTmRNA を発現していることが証明できた。これらの結果は、テロメラーゼ活性のみの検討ではリンパ球混入によるテロメラーゼ活性偽陽性を除外できないので、発現組織の分別のできる ISH 法を用いた hTERTmRNA 発現の検討が重要であることを示している。そして、甲状腺濾胞腫瘍における ISH 法を用いた hTERTmRNA 発現の判定は、リンパ球での hTERTmRNA 発現の除外ができ、濾胞性腫瘍組織のみに限ればほとんど濾胞癌

でしか hTERTmRNA 発現は生じないことから、濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別に有用であることを示している。

【結論】 甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別には、TRAP 法によるテロメラーゼ活性測定に比較して ISH 法を用いた hTERT mRNA 発現の検討が極めて有用であることが証明された。また、将来の臨床応用として、穿刺吸引細胞診検体と術中迅速診検体に対する ISH 法を用いた hTERTmRNA 発現の検討の考えられる。今後は、この 2 つの方法を用いた精度の高い診断方法の確立を視野に入れてこの研究を発展させていきたいと考えている。