

〈原著論文〉

甲状腺癌における RET/PTC 再配列遺伝子発現の検討

田中 克浩, 太田 裕介, 齋藤 互

川崎医科大学乳腺甲状腺外科学

抄録 予後良好な甲状腺癌遺伝子異常の臨床的意義は不明な点が多い。甲状腺癌における RET/PTC 遺伝子のうち1と3の発現を検討した。当科で初回手術を受けた甲状腺癌乳頭癌・低分化癌のうち、無作為に甲状腺癌乳頭癌38例と低分化癌4例を選択し、それぞれの原発巣における RET/PTC 1, 3の発現を検討した。RET/PTC 1, 3の発現は real-time PCR 法により検討した。RET/PTC 1 は3例 (5.7%) に発現が見られ、RET/PTC 3は6例 (14.0%) に発現が見られた。1例のみ両遺伝子の発現が見られた。年齢、性別、腫瘍径、リンパ節転移、被膜外浸潤、再発、無病期間、全生存期間の臨床データとは有意な関係は認められなかった。年齢では有意差がないものの RET/PTC 1 または RET/PTC 3の陽性例は、陰性例に比し若年である傾向があった。また、RET/PTC 1の発現例は DFS が短い傾向があった ($p=0.0563$)。今回の検討では、RET/PTC 1, 3の発現意義を見出すことはできなかった。

doi:10.11482/KMJ-J44(1)19 (平成29年11月9日受理)

キーワード：甲状腺癌, RET/PTC, 再配列, 臨床的特徴

緒言

甲状腺癌は内分泌腺にできる最も多い癌であり、大部分の予後が良好であることが知られている。甲状腺癌発生、進展に関与する癌遺伝子がいくつか判明している。乳頭癌における BRAF (B Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) の変異や RET/PTC 再配列 (rearranged during transfection/papillary thyroid carcinoma), 濾胞癌における PPAR γ /Pax8再配列 (Peroxisome Proliferator Activator γ /Paired Box 8), 低分化癌や未分化癌における Ras (Rat Sarcoma) や p53の変異などである¹⁾。このうち RET/PTC 再配列遺伝子とは、濾胞細胞で染色体組み換えがおき、様々な遺伝子の5'端とチロシンキナーゼ領域を含む RET の3'端が融合するように遺伝子組み換えがおこることである²⁾。これにより通常発現してい

ない RET が甲状腺濾胞細胞で発現できるようになり、さらに二量体になることで、RET のチロシンキナーゼ領域は、リガンドに依存することなく自律性に活性化し、下流の RAS-BRAF-MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) カスケードを活性化する。また複数の組み換えの相手が報告されている³⁾。

ところが諸家の報告では RET/PTC 再配列遺伝子全体の発現は3-92%と大きく報告で異なっており、また今までの報告例では RET/PTC 1 または 3の変異が甲状腺癌での発現の大部分を占めている⁴⁾。このため、今回我々は、当科で経験した甲状腺乳頭癌、低分化癌における RET/PTC のうちの1と3の発現状況を検討し、さらに、臨床データとの関連も検討した。この研究は川崎医科大学倫理委員会での承認を受

別刷請求先

田中 克浩

〒701-0192 倉敷市松島577

川崎医科大学乳腺甲状腺外科学

電話：086 (462) 1111

ファックス：086 (462) 1199

Eメール：tanakaka@med.kawasaki-m.ac.jp

けた研究である (受付番号986-1, 2353).

対象と方法

当科で初回手術を受けた甲状腺癌乳頭癌・低分化癌のうち、無作為に甲状腺乳頭癌38例と低分化癌4例を選択し、それぞれの原発巣におけるRET/PTC 1, 3の発現を検討した。RET/PTC 1, 3の発現はreal-time PCR法により検討した。新鮮凍結標本からTRIzol® Plus RNA Purification Kit (Life technologies Japan, Tokyo)によりRNAを抽出し1.5ugのRNAからcDNAを作成した。THUNDERBIRD probe qPCR Mix® (東洋紡ライフサイエンス, Osaka)に2ulのcDNAおよびTaqman Probe®と上下primerを加えreal-time PCR (Applied Biosystems, Tokyo)を40サイクルで増幅した(表1)⁵⁾。それぞれのprobeおよびprimerはMBL (医学生物学研究所, 名古屋)で作成した。

統計学的検討はEZR⁶⁾ (自治医科大学附属さいたま医療センター作)を用いて χ^2 乗検定, Kaplan-Maier法を行い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

男性10例, 女性32例で, 年齢は 50 ± 29.0 歳 (平

均±標準偏差)であった。すべての対象患者の甲状腺機能は正常であった。腫瘍径の中央値は2.3 (0.8-5) cmで, pEX 0または1が30例 (71.4%)でpEX 2が12例 (28.6%)であった。組織学的リンパ節転移は陰性が6例 (14.3%)で陽性が36例 (85.7%)であった。RET/PTC 1は3例 (5.7%)に発現が見られ, RET/PTC 3は6例 (14.0%)に発現が見られた(図1にそれぞれの発現の例を示す)。1例のみ両遺伝子の発現が見られた。表2にRET/PTC発現の有無と臨床データとの関連を示す。検討した臨床データとは有意な関係は認められなかった。しかし, 年齢では有意差がないもののRET/PTC 3の陽性例は, 陰性例に比し若年である傾向が認められた ($p=0.09$)。対象の43例の観察期間の中央値は53.5カ月でこの間の再発は10例に認められた。このうち4例は頸部リンパ節のみで, 残りの6例は遠隔再発を認めていた。RET/PTC 1またはRET/PTC 3の発現の有無と再発の有無には関係はなかった ($p=0.28$ と $p=0.30$)。RET/PTC 1およびRET/PTC 3の発現別の無病生存率 (DFS, 図2 a) と全生存率 (OS, 図2 b)を示す。有意差はなかったが, RET/PTC 1の発現例はDFSが短い傾向があった ($p=0.0563$)。

表1 作成 Taqman Probe®とprimer

RET/PTC1	Sequence
Taqman® probe	5-CCC ACT TTG GAT CCT CGA TGG TAA C-fluorescein-3, 5-LC Red705-CTG GCT TTG CGC AGG TCG CG-phosphate-3
F-primer (5'-3') CCDC6 (H4)	CAA GAG AAC AAG GTG CTG AAG
R-primer (5'-3') RET	GCA GGT CTC AAG CTC ACT C
RET/PTC3	Sequence
Taqman® probe	5-CCC ACT TTG GAT CCT CCT GAC TGT TC-fluorescein-3 5-LC Red640-CCA AGG TCT GCT TTT GCG TAA GCCA-phosphate-3
F-primer (5'-3') ELE1	CGG TAT TGT AGC TGT CCC TTT C
R-primer (5'-3') RET	GCA GGT CTC AAG CTC ACT C

症例1

症例5

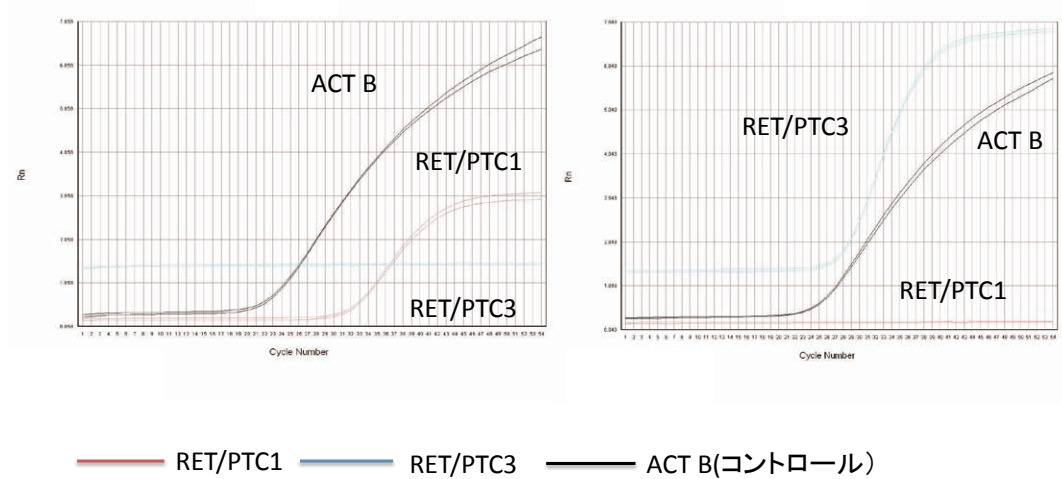


図1 Real-time PCR のサイクル図

RET/PTC 1 および 3 の検出結果 (陽性例) を示す. 症例 1 では RET/PTC 1 が陽性, 症例 5 では RET/PTC 3 が陽性を示している.

表2 臨床データと発現の関係

RET/PCR 1 の発現					RET/PCR 3 の発現				
		陽性	陰性	P 値			陽性	陰性	P 値
性別	男	1	9	n.s.	性別	男	1	9	n.s.
	女	2	30			女	5	27	
年齢		26 (18, 26 and 70)	53 (12-84)	0.31	年齢		28 (12-84)	52 (15-80)	0.09
径 (cm)		3 ± 2.1	2 ± 0.1	0.31	径 (cm)		2 ± 1.7	3 ± 0.4	0.83
EX*	0, 1	2	28	n.s.	EX*	0, 1	4	26	n.s.
	2	1	11			2	2	10	
pN**	-	0	6	n.s.	pN**	-	1	5	n.s.
	+	3	33			+	5	31	

EX*= 被膜外浸潤 0 ~ 2 で分類, pN**= 組織学的リンパ節転移

図2a. 無病生存率との関係

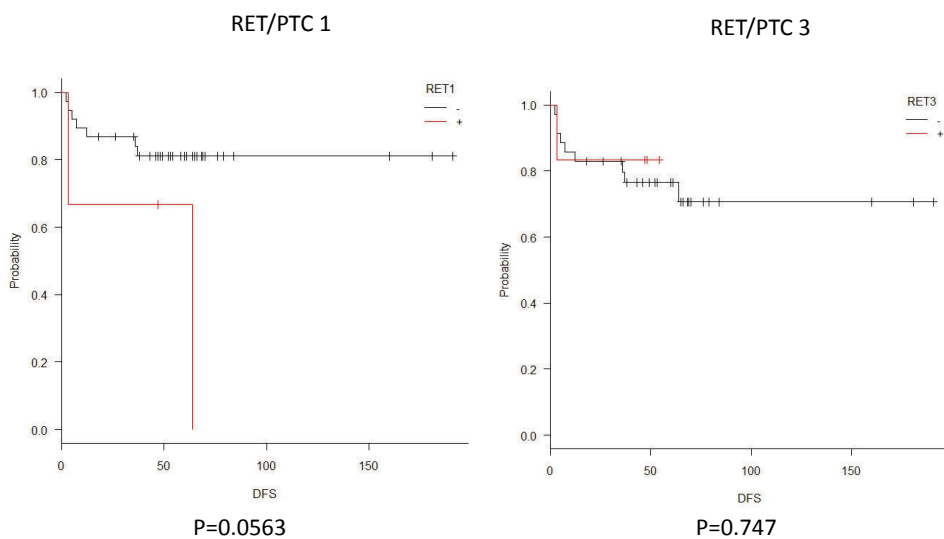


図2b. 全生存率との関係

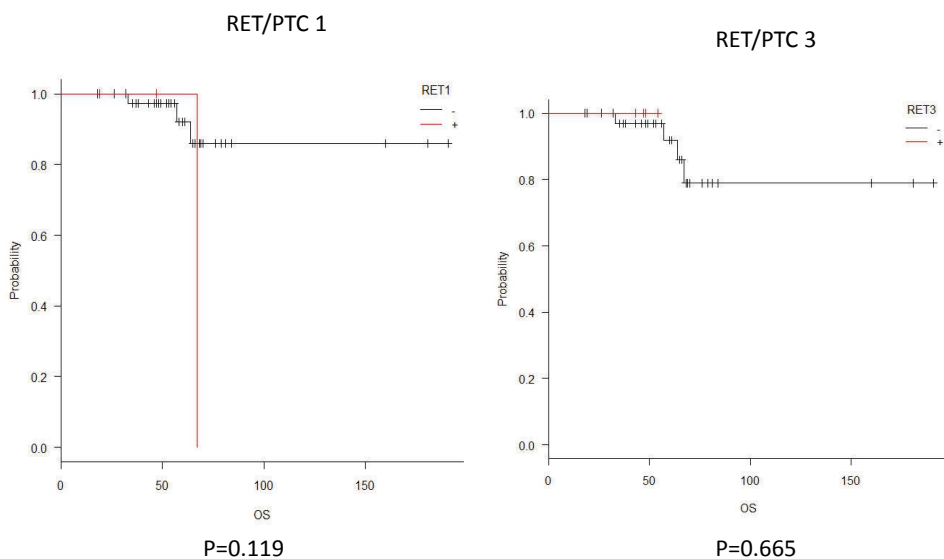


図2 RET/PTC 1, 3発現と無病率と全生存率との関係

図2a: 無病率, 図2b: 全生存率とRET/PTC 1と3の発現の関係を示す. いずれも有意な相関は見られなかったが, RET/PTC 1では陽性例で無病率が短い傾向があった.

考 察

今回, 甲状腺癌で発現を検討した結果では RET/PTC 1 は5.7%, RET/PTC 3 は14.0% の発現率であった. 両者とも発現している症例は1例のみであった. 2011年に Marotta ら⁴⁾が RET/PTC 1 の発現に関しての総説を発表しているが, 3-92% のばらつきがある. RET/PTC 3 に関しては複数の報告から0-20% である. これらの発現のばらつきに関して zhu ら⁵⁾は, RT-PCR (通常法と高感度法), real-time PCR, サザンプロット法, FISH 法で発現の検討を行い, 検出方法の差と同一腫瘍内での異常発現の差の両者の関与を報告している. 世界での地域によって発現が異なるかもしれないとの仮説もあるが, 同じ地域で全く異なる頻度の報告もあり, 地域格差が事実かどうかは不明である²⁾.

甲状腺乳頭癌は性別や年齢に予後に差を認める癌であり, 女性, 若年者ではその予後が良好とされている. 性別では甲状腺乳頭癌におけるエストロゲン受容体などの検討もされているが, 癌で発現が多い報告⁷⁾や, 少ない報告⁸⁾があり明らかな関係に関しては議論が多い. 一方, 年齢に関しては IGF (insulin-like growth factor) の発現の関係性を見た報告があるが, 56歳以上では有意に, それ未満の年齢よりも血清の IGF-1濃度が低いことが示されている⁹⁾. 今回検討した RET/PTC の発現と年齢の関係の報告があり, 若年者に発現が多いとされている^{10, 11)}. メタ解析では, 若年者, 女性が RET/PTC 1 と RET/PTC 3 の発現に有意に関係していたと報告されている¹²⁾. しかし, 我々の検討のように, 臨床的特徴との関連性がないと報告しているものもある. Puxeddu らは, 年齢のみならず, 腫瘍径, 性別, 組織グレードでも RET/PTC 発現に有意な関係はなかったと報告している¹³⁾.

悪性度との関連で, 今回の検討では, 有意差はないものの RET/PTC 1 の発現例は DFS が短い傾向があった ($P=0.0563$).

Santoro ら³⁾や Sugg ら¹¹⁾は RET/PTC 1 発現例では, 非発現例に比してリンパ節転移が多い報

告をしているが, 一方, 種々の臨床指標および悪性度指標とは有意な関係がなかった報告もある^{13, 14)}.

Miki らはリンパ節転移や腫瘍径, 遠隔転移と関係はなかったが, 被膜外浸潤 (変異あり対なしが68%と20%で $p<0.01$) とは有意な関係があったと報告している¹⁵⁾.

現時点でも RET/PTC の乳頭癌における臨床病理学的意味は明らかにされておらず, 発現の検出方法を統一し, かつ大規模な検索が必要と考えられた.

本研究施行にあたり, 川崎医科大学プロジェクト研究費 (26基-2, 27基-6) を拠に施行した. 本論文著者の利益相反は田中克浩がエーザイ(株)より研究費, 講演料があるが, 本研究に関係しない. 他2名は報告すべき利益相反はなし.

引用文献

- 1) Kondo T, Ezzat S, Asa SL: Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6: 292-306, 2006
- 2) Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA, Della Porta G, Vecchio G: A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature* 328: 170-172, 1987
- 3) Santoro M, Melillo RM, Fusco A: RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol* 155: 645-653, 2006
- 4) Marotta V, Guerra A, Sapio MR, Vitale M: RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid diseases: a clinical standpoint. *Eur J Endocrinol* 165: 499-507, 2011
- 5) Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE: Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3603-3610, 2006
- 6) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZS' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48, 452-458, 2013
- 7) Miki H, Oshimo K, Inoue H, Morimoto T, Monden Y: Sex hormone receptors in human thyroid tissues. *Cancer*

- 66: 1759-1762, 1990
- 8) Chaudhuri PK, Patel N, Sandberg L, Prinz RA: Distribution and characterization of steroid hormone receptors in human thyroid tissue. *World J Surg* 10: 737-744, 1986
 - 9) Schmidt JA, Allen NE, Almquist M, *et al.*: Insulin-like growth factor-1 and risk of differentiated thyroid carcinoma in the European Prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23: 976-985, 2014
 - 10) Santoro M, Melillo RM, Fusco A: RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol* 155: 645-653, 2006
 - 11) Sugg SL, Zheng L, Rosen IB, Freeman JL, Ezzat S, Asa SL: *ret/PTC*-1, -2, and -3 oncogene rearrangements in human thyroid carcinomas: implications for metastatic potential? *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3360-3365, 1996
 - 12) Su X, Li Z, He C, Chen W, Fu X, Yang A: Radiation exposure, young age, and female gender are associated with high prevalence of RET/PTC1 and RET/PTC3 in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 7: 16716-16730, 2016
 - 13) Puxeddu E, Moretti S, Giannico A, *et al.*: Ret/PTC activation does not influence clinical and pathological features of adult papillary thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol* 148: 505-513, 2003
 - 14) Romei C, Elisei R: RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol* 3: 54, 2012
 - 15) Miki H, Kitaichi M, Masuda E, Komaki K, Yamamoto Y, Monden Y: *ret/PTC* expression may be associated with local invasion of thyroid papillary carcinoma. *J Surg Oncol* 71: 76-82, 1999

〈Regular Article〉

Analyses of expression of RET/PTC in thyroid cancer

Katsuhiro TANAKA, Yusuke OHTA, Wataru SAITO

Department of Breast Thyroid Surgery, Kawasaki Medical School

ABSTRACT We analyzed the expression of RET/PTC 1 and 3 in thyroid cancers. We used specimens that were resected from 38 papillary thyroid carcinomas and four poorly differentiated thyroid carcinomas at our hospital. Using each extracted messenger RNA, the rearrangements of RET/PTC 1 and 3 were analyzed by a real-time PCR method. RET/PTC 1 and RET/PTC 3 expression were found in three patients (5.7%) and six patients (14.0%), respectively. Only one patient expressed both. There was no significant relationship between expression of RET/PTC and clinical features such as age, gender, tumor size, lymph node involvement, extrathyroidal infiltration, recurrence, disease-free survival or overall survival. However, younger patients tended to have a higher positive rate of RET/PTC 1 and 3, while DFS tended to be shorter in RET/PTC 1-positive patients ($p=0.0563$).

In this study, we did not find any significant relationship between RET/PTC 1 and 3 and thyroid carcinoma.

(Accepted on November 9, 2017)

Key words : **Thyroid cancer, RET/PTC, Rearrangement, Clinical features**

Corresponding author

Katsuhiro Tanaka

Department of Breast Thyroid Surgery, Kawasaki
Medical School 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192,
Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : tanakaka@med.kawasaki-m.ac.jp

