高リスク乳頭癌の遺伝子発現プロファイリング解明を目指した研究

名古屋大学医学部附属病院 乳腺・内分泌外科

柴田 雅央 稲石 貴弘 一川 貴洋 添田 郁美 高野 悠子
武内 大 角田 伸行 菊森 豊根

まえがき

日本内分泌外科学会が作成した甲状腺腫瘍診療ガイドライン 2018 において乳頭癌のリスク分類が示され、実臨床ではそれに基づいて治療方針が決定されている¹⁾。ガイドラインによると、「1) T > 4cm、2) Ex2 または sN-Ex、3) 径が 3cm をこえる N1、4) M1 のうち 1 項目以上を満たす乳頭癌症例」は「高リスク」とされ、実際このような患者は通常予後良好な乳頭癌において、不良な転機を来しうる。甲状腺乳頭癌において、*BRAF* や *TERT* の変異が予後と関連することが知られているが^{2), 3)}、今回本邦のガイドラインで示された「高リスク乳頭癌」における遺伝子発現プロファイルの特徴については不明である。

本研究では、「高リスク乳頭癌」と「その他のリスクの乳頭癌」の手術検体を用いて、癌増殖に関連する複数の遺伝子の発現値を調べることによって、「高リスク乳頭癌」で特徴的な発現を示す腫瘍関連遺伝子を同定することを目的とした。

1. 材料と方法

当科で 2002 年～2008 年の間に手術を行った甲状腺乳頭癌症例のうち、切除検体の冷凍凍結標本が保管されており、5 年以上の予後が判明している「高リスク乳頭癌」6 例と「その他のリスクの乳頭癌」(以下、「低リスク乳頭癌」) 6 例を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋切片より total RNA を抽出し、nCounter PanCancer Progression Panel (NanoString Technologies 社) を用いて 740 種類の腫瘍進展に関わる遺伝子の mRNA 発現値を測定し、両群間で発現値が異なる遺伝子を同定した。

次いで、nCounter 解析によって同定した遺伝子について、The Cancer Genome Atlas (TCGA) database を用いて、乳頭癌患者 382 例におけるそれぞれの遺伝子発現値と臨床病理学的因子や予後との関連について検討した。

本研究は、名古屋大学医学部附属病院生命倫理審査委員会の承認を得ている(承認番号: 2019-0019)。

2. 結果

対象とした「高リスク乳頭癌」6 例と「低リスク乳頭癌」6 例の患者背景を Table 1 に示す。nCounter PanCancer Progression Panel を用いて 740 個の腫瘍関連遺伝子の発現値を測定し解析したところ、「高リスク乳頭癌」において、「低リスク乳頭癌」と比較して、14 個の遺伝子発現値が有意に 2 倍以上高く、1 個の遺伝子発現値が 1/2 以下であった(Figure 1、Table 2)。これら 15 個の遺伝子発現が、「高リスク乳頭癌」を特徴づけている可能性が示唆された。

Figure 1. 740 遺伝子の発現値の比較(横軸: 発現値の比、縦軸: p 値)

Table 1. nCounter により解析を行った 12 症例の臨床病理学的因子と予後

Case ID	Age (year)	Sex	Tumor size (mm)	cT	cN	pT	Invasion site	pN	Lymph node metastasis (n)	M	Stage	Prognosis	Follow-up period (month)
L-1	59	F	10	1a	0	1a	None	0	0	0	I	No recurrence	167
L-2	33	F	10	1a	0	1a	None	0	0	0	I	No recurrence	73
L-3	39	F	12	1b	0	1b	None	0	0	0	I	No recurrence	135
L-4	36	F	18	1b	0	1b	None	1a	7	0	I	No recurrence	89
L-5	58	F	17	1b	0	1b	None	1a	1	0	II	No recurrence	150
L-6	63	M	38	2	0	2	None	1a	3	0	II	No recurrence	139
H-1	32	F	50	4a	1	4a	Recurrent laryngeal nerve	1b	30	0	I	No recurrence	199
H-2	75	F	35	4a	1	4a	Recurrent laryngeal nerve	1b	13	0	III	Subclavian lymph node metastasis	129
H-3	65	F	21	4a	1	4a	Recurrent laryngeal nerve	1b	8	0	III	No recurrence	60
H-4	24	F	20	1b	1	1b	None	1b	12	1 (Lung)	II	Stable disease	150
H-5	49	M	30	2	1	3b	Sternothyroid muscle	1b	8	1 (Lung)	II	Stable disease	132
H-6	72	F	50	3a	1	3b	Sternothyroid muscle	1b	8	1 (Lung)	IVB	Death due to disease progression	44

TNM 分類は UICC staging system (第 8 版) に基づく。Case ID: L-, low-risk; H-, high-risk. Sex: F, female; M, male. cN, clinical N stage; cT, clinical T stage; pN, pathological N stage; pT, pathological T stage; UICC, Union for International Cancer Control.

次に、TCGA database に登録されている 382 例の乳頭癌患者 (Table 3) の各遺伝子の発現値を用いて検討を行った。

nCounter 解析より抽出された 15 個の遺伝子のうち、*CCL11*、*COL6A3*、*INHBA*、*SRPX2* の 4 個の遺伝子発現値が T4 stage (n = 11) や N1 stage (n = 153) で、T1-T3 stage (n = 351) や N0 stage (n = 172) とそれぞれ比較して、有意に高かった (Figure 2)。また、これら 4 つの遺伝子について、発現値の 4 分位解析における第 1 分位群 (n = 82) と第 2-4 分位群 (n = 241) との間で無病生存率を比較したところ、*SRPX2* 高発現群で無病生存

率が低かった (5 年生存率 70.9% vs 85.0% ; $P = 0.013$ 、Figure 3)。Cox ハザードモデルを用いた多変量解析では、無病生存率に影響を及ぼす因子として、“リンパ節転移陽性”と並んで“*SRPX2* 高発現”が独立した予後不良因子であった (ハザード比 : 3.12 ; 95% 信頼区間 : 1.21-8.32、 $P = 0.019$ 、Table 4)。

以上より、nCounter 解析によって抽出された 15 遺伝子のうち、*CCL11*、*COL6A3*、*INHBA*、*SRPX2* の 4 個の遺伝子は進行乳頭癌で発現値が実際に高く、その中でも *SRPX2* の発現値は予後を規定する因子であることが示された。

Table 2. “低リスク乳頭癌”と比較して、“高リスク乳頭癌”で有意に 2 倍以上あるいは 1/2 以下の発現値を認めた遺伝子

Symbol	Full name	High-risk / Low-risk	
		Fold change (Log2)	p-value
<i>THBS4</i>	Thrombospondin 4	2.584	0.006
<i>COL7A1</i>	Collagen type VII alpha 1 chain	1.818	0.025
<i>PLA2G2A</i>	Phospholipase A2 group IIA	1.730	0.045
<i>COMP</i>	Cartilage oligomeric matrix protein	1.693	0.048
<i>COL6A3</i>	Collagen type VI alpha 3 chain	1.366	0.043
<i>TPM2</i>	Tropomyosin 2	1.206	0.007
<i>CDH11</i>	Cadherin 11	1.178	0.034
<i>INHBA</i>	Inhibin subunit beta A	1.173	0.046
<i>POPDC3</i>	Popeye domain containing 3	1.104	0.034
<i>BGN</i>	Biglycan	1.089	0.030
<i>CCL11</i>	C-C motif chemokine ligand 11	1.081	0.003
<i>SRPX2</i>	Sushi repeat containing protein X-linked 2	1.051	0.028
<i>AGT</i>	Angiotensinogen	1.029	0.014
<i>RAMP1</i>	Receptor activity modifying protein 1	1.004	0.027
<i>ADM2</i>	Adrenomedullin 2	-1.088	0.040

Table 3. TCGA database における乳頭癌患者 382 人の臨床病理学的因子

Clinicopathological parameter	
Age, median (range)	46 (17-89)
< 55 year	249 (65.2%)
≥ 55 year	115 (30.1%)
Unknown	18 (4.7%)
Sex	
Male	93 (24.3%)
Female	271 (71.0%)
Unknown	18 (4.7%)
Pathological T stage	
pT1	105 (27.5%)
pT2	117 (30.6%)
pT3	129 (33.8%)
pT4	11 (2.9%)
Unknown	20 (5.2%)
Pathological N stage	
pN0	172 (45.0%)
pN1	153 (40.1%)
Unknown	57 (14.9%)
Clinical M stage	
M0	193 (50.5%)
M1	6 (1.6%)
Unknown	183 (47.9%)

TNM 分類は UICC staging system (第 8 版) に基づく。
TCGA, The Cancer Genome Atlas; UICC, Union for International Cancer Control.

Figure 2. TCGA database における各遺伝子発現値の比較 (pT1/T2/T3 vs pT4, pN0 vs pN1. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.)

Figure 3. TCGA database における各遺伝子の高発現群 (第 1 分位) とその他の群 (第 2-4 分位) での無病生存率の比較

Table 4. TCGA database における乳頭癌患者 (n=323) の無病生存に関する予測因子

Variables	n	Univariate			Multivariate		
		Hazard ratio	95% CI	p-value	Hazard ratio	95% CI	p-value
Age (≥ 55)	84	2.14	0.84 – 5.18	0.109			
Sex (male)	74	2.29	0.86 – 5.63	0.095			
UICC pT stage (pT4)	4	2.17	0.12 – 10.6	0.501			
UICC pN stage (pN1)	132	5.31	1.75 – 22.9	0.002*	4.20	1.35 – 18.4	0.012*
SRPX2 expression (highest quartile)	82	2.77	1.17 – 6.43	0.022*	3.12	1.21 – 8.32	0.019*

*Statistically significant in multivariate analysis ($p < 0.05$). CI, confidence interval; TCGA, The Cancer Genome Atlas; UICC, Union for International Cancer Control. 単変量解析は log-rank test を用い、多変量解析は Cox ハザード解析モデルを用いて行った。

3. 考 察

甲状腺乳頭癌において、*BRAF*^{V600E} や *TERT* プロモーター変異などいくつかの癌遺伝子変異が予後不良因子として報告されている^{2), 3)}。しかし、“高リスク乳頭癌”に特徴的な遺伝子発現プロファイルについては知られていない。今回、nCounter PanCancer Progression Panel を“高リスク乳頭癌”を特徴づける遺伝子を探索する最初のステップとして用いた。nCounter は、次世代シーケンシング法と異なり、PCR による RNA 増幅を必要としないことが特徴である。その結果、“高リスク乳頭癌”で高発現を示す 14 遺伝子と、低発現を示す 1 遺伝子を同定した。これらの遺伝子発現は、“高リスク乳頭癌”を特徴づけるものと考えられた。

nCounter 解析は少数例での検討であったため、次いで TCGA database を用いて各遺伝子の発現値と臨床病理学的因子との関連について検討した。その結果、15 個の遺伝子のうち、いずれも他癌腫で腫瘍促進に関与する働きが報告されている *CCL11*、*COL6A3*、*INHBA*、*SRPX2* が pT4 または pN1 症例で高発現であった。さらに、これら 4 つの遺伝子の予後解析では、*SRPX2* 高発現群で無病生存率が低く、“*SRPX2* 高発現”は独立した予後不良因子であった。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである *SRPX2* は、胃癌や食道癌で過剰発現しており、癌細胞の増殖や転移の促進に関与することが報告されている^{4), 5)}。いずれの遺伝子についても、これまで甲状腺癌における報告はされていない。今後、これらの遺伝子の乳頭癌における役割を明らかにすることによって、新たな予後予測ツールの開発あるいは新規治療標的分子の同定につながることを期待される。

結 語

740 種類の腫瘍関連遺伝子のうち、*CCL11*、*COL6A3*、*INHBA*、*SRPX2* が進行甲状腺乳頭癌において発現値が高かった。中でも、*SRPX2* 発現高値は予後不良因子であった。今後さらに検討を進め、これらの遺伝子の乳頭癌における機能を明らかにしていきたい。

文 献

- 1) 岡本高宏, 伊藤康弘, 小野田尚佳, 赤須東樹, 伊藤研一, 内野真也, 小川利久, 亀山香織, 菅間 博, 菊森豊根, 北川 亘, 絹谷清剛, 茂松直之, 杉谷 巖, 杉野公則, 田中克浩, 田原 信, 筒井英光, 野口仁志, 野口靖志, 原 尚人, 東 達也, 日比八束, 前田茂人, 宮川めぐみ, 森谷季吉, 和田修幸, 吉田 明, 高見 博, 吉田雅博, 今井常夫, 岩崎博幸, 北野博也, 鈴木真一, 福成信博, 甲状腺腫瘍診療ガイドライン作成委員会, 甲状腺腫瘍診療ガイドライン 2018, 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌, 2018; 35: 1-87.
- 2) Bournaud C, Descotes F, Decaussin-Petrucci M, Berthiller J, de la Fouchardiere C, Giraudet AL, Bertholon-Gregoire M, Robinson P, Lifante JC, Lopez J, Borson-Chazot F. TERT promoter mutations identify a high-risk group in metastasis-free advanced thyroid carcinoma. Eur J Cancer. 2019; 108: 41-9.
- 3) Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, Carson KA, Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2012; 91: 274-86.
- 4) He F, Wang H, Li Y, Liu W, Gao X, Chen D, Wang Q, Shi G. SRPX2 knockdown inhibits cell proliferation and metastasis and promotes chemosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. Biomed Pharmacother. 2019; 109: 671-8.
- 5) Tanaka K, Arao T, Maegawa M, Matsumoto K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y, Yokote H, Yanagihara K, Yamada Y, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion. Int J Cancer. 2009; 124: 1072-80.