日本人の甲状腺腫瘍におけるras遺伝子点突然変異穿刺吸引細胞を用いた検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 早川, 哲雄 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9109

金沢大学十全医学会雑誌　第104巻　第1号　15−25 (1995)

日本人の甲状腺腫瘍における *ras* 遺伝子点突然変異

−穿刺吸引細胞を用いた検討−

金沢大学医学部内科学第一講座（主任：小林健一教授）
早　川　哲　雄

欧米人の甲状腺腫瘍では，*ras* 遺伝子の変異が腫瘍形成の初期段階で生じていることが報告されている．しかし，このことを日本人の甲状腺腫瘍を対象として検討した報告は少ない．本研究では，42例の甲状腺腫瘍における H-, K-, N-*ras* 遺伝子それぞれについて，コドン12と61の点突然変異の有無を PCR 法とスロットブロットハイブリダイゼーション法を用いて検討した．21ゲージ針で得られた穿刺吸引細胞を使い乳頭癌７例，未分化癌１例から，また新鮮手術標本を用い濾胞腺腫11例，腺腫様甲状腺腫６例，乳頭癌15例，濾胞癌１例，未分化癌１例から DNA を抽出した．抽出した DNA を，H-, K-, N-*ras* コドン12と61に関して PCR 法により増幅し，コドン12では正常型以外に６種類，コドン61では８種類の点突然変異特異的プローブを用い，スロットブロットハイブリダイゼーション法で変異 *ras* 遺伝子を検出した．手術標本の良性腫瘍では，濾胞腺腫１例と腺腫様甲状腺腫１例で点突然変異を認めた．また手術標本の悪性腫瘍では，濾胞癌１例で点突然変異が検出されたが，乳頭癌，未分化癌では変異は認めなかった．一方穿刺吸引細胞では，乳頭癌，未分化癌とも，*ras* 遺伝子の変異は検出されなかった．穿刺吸引細胞と新鮮手術標本の結果を合わせると，良性腫瘍では濾胞腺腫11例中１例 (9%) に，腺腫様甲状腺腫６例中１例 (17%) に点突然変異を認めた．しかし，悪性腫瘍では25例中濾胞癌の１例に点突然変異を認めたのみで，乳頭癌，未分化癌では *ras* 遺伝子の変異は検出されなかった．また，変異 *ras* 遺伝子を認めた濾胞腺腫，腺腫様甲状腺腫の症例は，変異を認めなかった症例と比べて臨床像に特異な点はなかった．以上より，*ras* 遺伝子の変異は日本人の甲状腺腫瘍では欧米人のものに比べると少なく，限られた一部の症例でのみ腫瘍形成に関与している可能性が考えられた．また，穿刺吸引細胞を用いた *ras* 遺伝子変異の解析は，術前遺伝子診断として施行可能であるがその有用性には限界があるものと思われた．

Key words Japanese thyroid neoplasm, *ras* oncogene, point mutation, fine-needle aspiration, PCR

本邦における甲状腺の結節性病変の有病率は，検診で見い出されるものだけでも腺腫あるいは腺腫様甲状腺腫で 0.5〜2.4%[1]，甲状腺癌で 0.12〜0.63%[1)〜3)] とかなりの高頻度に認められる．また，腫瘍性病変に限っても良性の濾胞腺腫から予後良好な分化癌である乳頭癌や濾胞癌，予後の極度に悪い未分化癌まで様々な生物学的悪性度を有するものが含まれるため，甲状腺結節性病変の適確な診断と適切な治療方針の決定は日常診療上重要である．今日，腫瘍の術前診断として穿刺吸引細胞診が行われており，特に乳頭癌の診断には感度，特異性ともに高くその有用性が評価されている[4]．しかし，濾胞腺腫と濾胞癌の鑑別は穿刺吸引細胞診でもしばしば困難であり，腫瘍摘出術後に組織像を詳細に検討して初めて良性か悪性かが判明することが多いことや，腺腫様甲状腺腫内に生じた結節が単なる過形成であるか，腺腫あるいは癌腫であるのかについても診断困難なことがある等，穿刺吸引細胞診も完成された診断技術とは言い難い．

近年の分子生物学的研究の進歩により，腫瘍の形成には少なくとも５ないし６種類以上の癌遺伝子，癌抑制遺伝子の異常が関与していることが明らかとなり[5]，甲状腺腫瘍においても，*ras*, *myc*, *ret*, *trk*, p53 等の癌遺伝子の変異あるいは発現異常が腫瘍化をもたらしている可能性が推定されている[6]．その中でも *ras* 遺伝子の変異は欧米人における甲状腺腫瘍では比較的高頻度であり，Lemoine ら[7,8]は濾胞癌15例中８例，乳頭癌10例中２例に，Suarez ら[9]は乳頭癌13例中８例に，Namba ら[10]は乳頭癌14例中３例に *ras* 遺伝子変異を認めたと述べている．これらの報告では，濾胞腺腫などの良性腫瘍でも変異を認める場合があることより *ras* 遺伝子の点突然変異は腫瘍形成の初期の段階に生ずる可能性が示唆されている[8,10]．一方では Karga ら[11]のように，濾胞癌14例中遠隔転移を認めた２例のみに *ras* 遺伝子変異を認め，*ras* 遺伝子変異と生物学的悪性度との相関を示唆した報告もある．しかし，甲状腺腫瘍における変異 *ras* 遺伝子の検討で報告されたものはほとんどが欧米人とくに白人を対象としたものであり，本邦での検討は少ない．甲状腺腫瘍の発症頻度は各組織型別にみた場合，国あるいは地域毎にかなり異なっていることより，腫瘍化には環境因子が大きな影響を及ぼしていると考えられている[12]．

平成６年12月14日受付，平成７年１月23日受理

Abbreviations: Arg, arginine; Asp, asparatic acid; Cys, cysteine; dUTP, deoxyuridine 5'-triphosphate; ECL, enhanced chemiluminescence; F, female; FNA, fine-needle aspiration; GAP, GTPase activating protein; Gln, glutamine; Gly, glycine; HRP, horseradish peroxidase; Lys, lysine; M, male

本研究では，日本人の甲状腺腫瘍における H-, K-, N-*ras* 遺伝子それぞれの変異の有無について，PCR 法とスロットブロットハイブリダイゼーション法を用いて検討した．また，腫瘍摘出手術以前の遺伝子診断法としての可能性を調べる目的で，材料として新鮮手術標本に加えて穿刺吸引細胞を用いた検討も行った．

材料および方法

Ⅰ．対　象

1992年4月から1994年2月までに金沢大学医学部附属病院第一内科および関連病院にて得られた甲状腺穿刺吸引細胞8例と，甲状腺腫瘍として手術された新鮮手術標本34例の合計42例を対象とした．穿刺吸引細胞は甲状腺腫瘍を超音波誘導下で21ゲージ針で穿刺し注射筒内の陰圧により吸引することにより採取し[13]，−80℃で保存した．また新鮮手術標本は標本の一部を−80℃で保存して使用した．甲状腺腫瘍の診断は甲状腺癌取扱い規約[14]に従った．穿刺吸引細胞は乳頭癌7例，未分化癌1例であり，新鮮手術標本は濾胞腺腫11例，腺腫様甲状腺腫6例，乳頭癌15例，濾胞癌1例，未分化癌1例であった（表1）．

Ⅱ．方　法

1．DNA 抽出

穿刺吸引細胞からの DNA の抽出は Feinmesser ら[15]の方法を用い，吸引物を 500μl の溶解緩衝液 {PCR 反応緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM 塩化カリウム，1.5mM 塩化マグネシウム，0.001％ゼラチン], 0.45% ノニデット P40 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 0.45% トゥイーン20 (Boehringer Mannheim), 100μg/ml プロテイナーゼ K (Boehringer Mannheim)} に56℃で4時間保温後，100℃で10分間加熱し，30〜80μl を PCR に使用した．また，新鮮手術標本の DNA の抽出は DNA 抽出キット (Stratagene, California, USA) を使用し，40〜250mg の標本を粉砕し，蛋白分解酵素，RNase で分解後，DNA をエタノールで沈殿し，TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA) に溶解し，1〜80μl を PCR に用いた．

2．PCR

H-, K-, N-*ras* 遺伝子それぞれのコドン (codon) 12 とコドン61に関して PCR 法[16]を行った．プライマーは *ras* プローブプライマーセット（和光，大阪）を使用した（表2）．各標本より抽

Table 1. Histological characteristics of thyroid neoplasms

Cytology or histology	Number of samples		Total number
	Aspirated cells	Resected tumors	
Benign			
Follicular adenomas	0	11	11
Adenomatous goiters	0	6	6
Malignant			
Papillary carcinomas	7	15	22
Follicular carcinoma	0	1	1
Anaplastic carcinomas	1	1	2

Table 2. Primers used to screen for *ras* point mutations

Codon	Oligonucleotides	
H-*ras* 12	5′ GGAGCGATGACGGAATATAA 3′	
	3′ CTCACCTCTATAGTGGGGTC 5′	
K-*ras* 12	5′ ATGACTGAATATAAACTTGT 3′	
	3′ CTCTATTGTTGGATCATATT 5′	
N-*ras* 12	5′ ATGACTGAGTACAAACTGGT 3′	
	3′ CTCTATGGTGGGATCATATT 5′	
H-*ras* 61	5′ CCTGCAGGATTCCTACCGGA 3′	
	3′ TTCACCTGTACTGGTGGATG 5′	
K-*ras* 61	5′ GATTCCTACAGGAAGCAAGT 3′	
	3′ CTATAATGGTGAATATCTTC 5′	
N-*ras* 61	5′ GATTCTTACAGAAAACAAGT 3′	
	3′ CTGTAGAGGTTAATATCCGC 5′	

出したDNAに，一対のプライマー (500μg/ml) 2μl, PCR反応緩衝液，デオキシリボヌクレチオド混合液 [dATP, dGTP, dCTP, dTTP 各 500μM (Pharmacia, Uppsala, Sweden)], Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 2.5単位を加え，滅菌蒸留水により全量 100μl に調整した．加熱の際に起きる反応液の蒸発を防ぐため，反応液に 50μl のミネラルオイル (Sigma, St. Louis, USA) を重層した．反応にはDNA ミニサイクラー (MJ Research, Massachusetts, USA) を使用し，熱変性を94℃，1分間，アニーリングを55℃，1分間，DNAの伸長を72℃，2分間とし，これを1サイクルとして30サイクル繰り返した．反応終了後，クロロホルム 100μl を加え振盪し，上層に増幅後の DNA 溶液を得た．DNA 溶液 10μl を，3％低融点アガロースゲル (FMC, Rockland, USA) にDNA 分子量マーカー 9 (和光) と共に電気泳動し，紫外線照射により約100塩基の長さを持つ蛍光バンドを確認した．

3．スロットブロットハイブリダイゼーション

増幅した DNA 2μl を，スロットブロットハイブリダイゼーション法[17] に使用した．DNA をナイロン膜 (Amersham,

Table 3. Allele-specific oligonucleotide probes used to screen for *ras* gene point mutations

Codon	Oligonucleotides	Amino acids coded for by the wild and mutant codons
H-*ras* 12	GTGGGCGCCGGCGGTGTGGG	Glycine
	TGC	Cysteine
	AGC	Serine
	CGC	Arginine
	GTC	Valine
	GAC	Asparatic acid
	GCC	Alanine
K-*ras* 12	GTTGGAGCTGGTGGCGTAGG	Glycine
	TGT	Cysteine
	AGT	Serine
	CGT	Arginine
	GTT	Valine
	GAT	Asparatic acid
	GCT	Alanine
N-*ras* 12	GGAGCAGGTGGTGTTGGGAA	Glycine
	TGT	Cysteine
	AGT	Serine
	CGT	Arginine
	GTT	Valine
	GAT	Asparatic acid
	GCT	Alanine
H-*ras* 61	ACCGCCGGCCAGGAGGAGTA	Glutamine
	GAG	Glutamic acid
	TAG	Termination codon
	AAG	Lysine
	CTG	Leucine
	CGG	Arginine
	CCG	Proline
	CAT	Histidine
	CAC	Histidine
K-*ras* 61	ACAGCAGGTCAAGAGGAGTA	Glutamine
	TAA	Termination codon
	AAA	Lysine
	GAA	Glutamic acid
	CTA	Leucine
	CCA	Proline
	CGA	Arginine
	CAT	Histidine
	CAC	Histidine
N-*ras* 61	ACAGCTGGACAAGAAGAGTA	Glutamine
	GAA	Glutamic acid
	TAA	Termination codon
	AAA	Lysine
	CGA	Arginine
	CTA	Leucine
	CCA	Proline
	CAT	Histidine
	CAC	Histidine

Full sequence of wild type oligonucleotide probes is shown. Listed below them are codons with the appropriate single base substitutions.

Buckinghamshire, UK) 上に HYBRI-SLOT Manifold (BRL, Gaithersburg, USA) を使用しブロッティングを行い，80℃，2時間加熱固定した．H-, K-, N-*ras* コドン12では正常型以外に6種類の点突然変異のプローブを，またコドン61では8種類の点突然変異のプローブを用いた．プローブは *ras* プローブプライマーセット (和光) を使用した (表3)．ハイブリダイゼーションはエンハンスドケミルミネッセンス (enhanced chemiluminescence, ECL) 3'-オリゴラベリング・検出システム (Amersham) を使い，Amersham 社のプロトコールに従いプローブの3' 末端をフルオレセイン修飾デオキシウリジン三リン酸 (deoxyuridine 5'-triphosphate, dUTP) で標識し，ハイブリダイゼーションを42℃，2時間行った．洗浄は各プライマーごとに条件を変えて行い，ホースラディッシュペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 標識抗フルオレセイン抗体と検出試薬を用いて化学発光を発生させ，それを X 線フィルム (Kodak, New York, USA) に10～30分露光させて記録した．

成　　績

Ⅰ．PCR 産物の確認

穿刺吸引細胞と新鮮手術標本のそれぞれから得られた DNA に対して PCR を行い，PCR 産物と分子量マーカーをアガロースゲルに電気泳動した (図1)．穿刺吸引細胞，新鮮手術標本いずれの PCR 産物も同じように約100塩基の長さを持つ DNA 断片を認め，穿刺吸引細胞から得られた微量の DNA からも，一度の PCR で充分な増幅がかかっていることが確認された．

Ⅱ．スロットブロットハイブリダイゼーション

1．新鮮手術標本

1）良性腫瘍 (図2)

濾胞腺腫の1例で，H-*ras* コドン61の検討において，正常型 (CAG) のプローブに加えて点突然変異 (CGG) のプローブへの結合を認め，CAG→CGG (グルタミン→アルギニン) の点突然変異が検出された．しかし，他のコドンでは変異型のプローブ

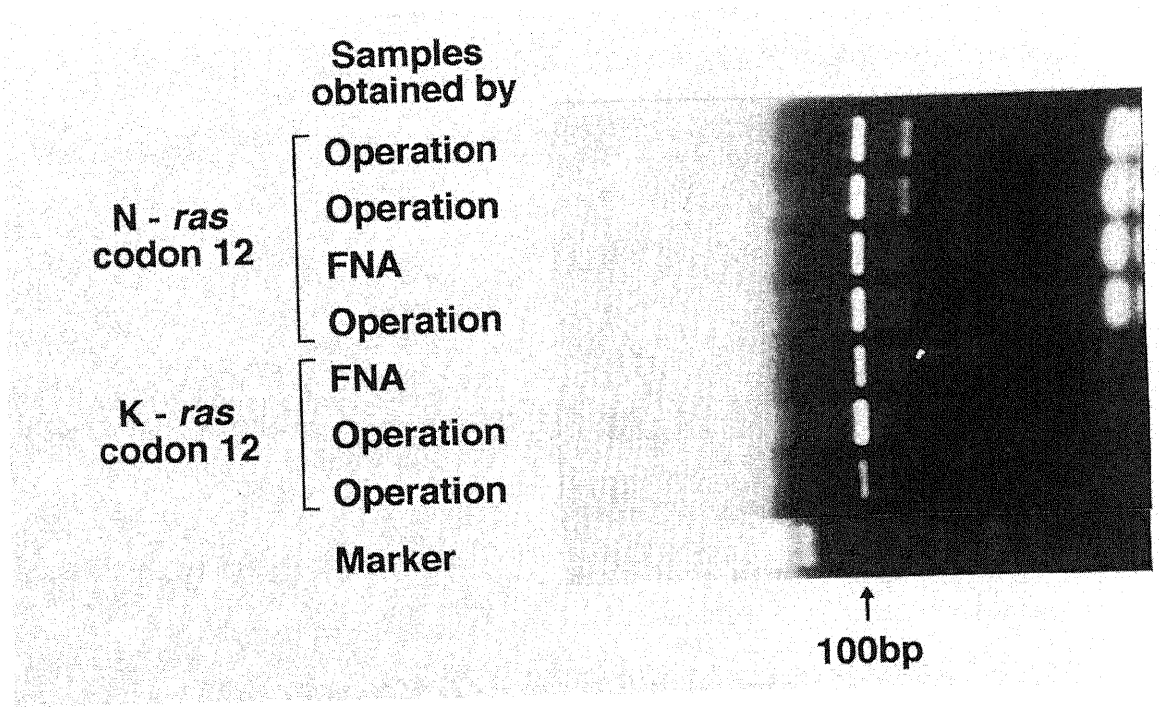

Fig. 1. Agarose gel electrophresis of PCR-amplified DNA. FNA, fine-needle aspiration.

Table 4. Prevalence of *ras* point mutations in thyroid neoplasms

Histology	Number of cases examined	Number (%) of cases with mutations
Benign		
Follicular adenomas	11	1 (9)
Adenomatous goiters	6	1 (17)
Malignant		
Papillary carcinomas	22	0 (0)
Follicular carcinoma	1	1 (100)
Anaplastic carcinomas	2	0 (0)

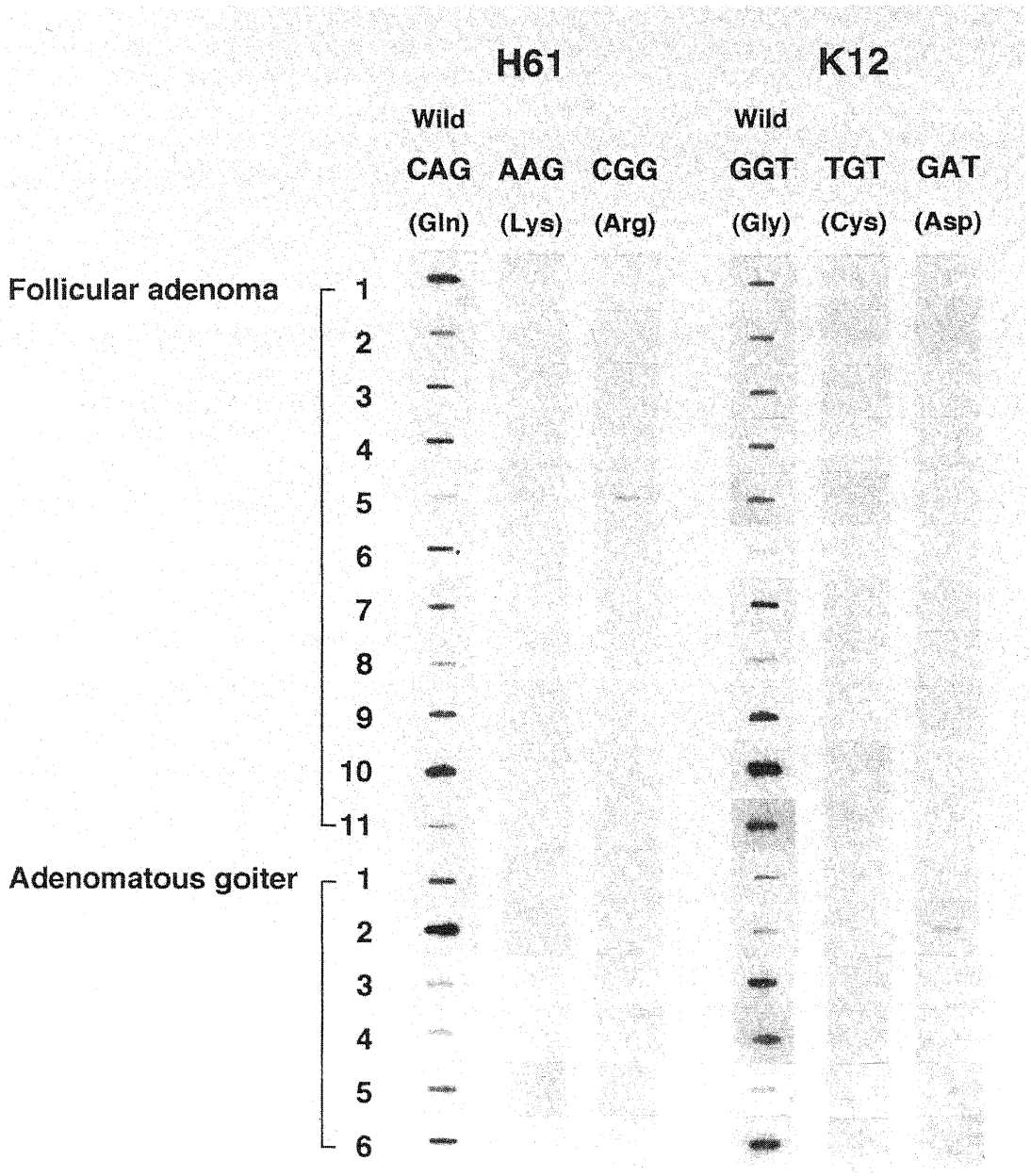

Fig. 2. Sequence-specific oligonucleotide hybridization of PCR-amplified DNA from surgically-resected benign neoplasms to probes for H-*ras* codon 61 and K-*ras* codon 12. The mutant probe for H-*ras* codon 61 (arginine, Arg) hybridized to DNA from case 5 of follicular adenoma, and the mutant probe for K-*ras* codon 12 (asparatic acid, Asp) hybridized to DNA from case 2 of adenomatous goiter. Gln, glutamine ; Lys, lysine ; Gly, glycine ; Cys, cysteine.

Table 5. Patients associated with *ras* mutations

Patient number	Age (years)	Sex	Histology	Tumor size (cm)	Metastasis[a]	Mutation	
						Site	Codon
1	73	F	Follicular adenoma	3.5×2.5	−	H-*ras* codon 61,	CAG→CGG (Gln→Arg)[b]
2	62	F	Adenomatous goiter	2×1.4	−	K-*ras* codon 12,	GGT→GAT (Gly→Asp)[b]
3	43	M	Follicular carcinoma	4×2.5	−	H-*ras* codon 61,	CAG→CGG (Gln→Arg)[b]

F, female ; M, male ; Gln, glutamine ; Arg, arginine ; Gly, glycine ; Asp, asparatic acid.
[a] −, no metastasis.
[b] Amino acids coded for by the wild and mutant codons are shown in brackets.

への結合は認めず，点突然変異は検出されなかった．一方腺腫様甲状腺腫では，K-*ras* コドン12で1例のみ，正常型の GGT のプローブに加えて点突然変異の GAT のプローブでも結合を認め，GGT→GAT（グリシン→アスパラギン酸）の点突然変異が検出された．しかし，他のコドンで変異型のプローブへの結合は認めなかった．

2）悪性腫瘍（図3）

濾胞癌の1例で，H-*ras* コドン61の検討において正常型の CAG のプローブに加えて点突然変異の CGG のプローブに対しても結合を認め，CAG→CGG（グルタミン→アルギニン）の点突然変異が検出された．しかし，他のコドンでは変異型のプローブへの結合は認めなかった．また乳頭癌15例，未分化癌1例では全例正常型のプローブへの結合しか認めず，変異 *ras* 遺伝子は検出されなかった．

2．穿刺吸引細胞（図4）

乳頭癌7例，未分化癌1例とも，H-, K-, N-*ras* コドン12と61で，新鮮手術標本の場合と同じく正常型のプローブでは結合を認めたが，変異型のプローブでは結合を認ず変異 *ras* 遺伝子は検出されなかった．

Ⅲ．H-, K-, N-*ras* 遺伝子のコドン12と61の突然変異（表4）

穿刺吸引細胞と新鮮手術標本の結果を合わせると，良性腫瘍では濾胞腺腫11例中1例（9%）に，腺腫様甲状腺腫6例中1例（17%）に点突然変異を認めた．しかし，悪性腫瘍では，濾胞癌1例に点突然変異を認めたのみで，乳頭癌，未分化癌では変異 *ras* 遺伝子は検出されなかった．

Ⅳ．点突然変異が認められた症例（表5）

H-*ras* コドン61に点突然変異を認めた濾胞腺腫と，K-*ras* コ

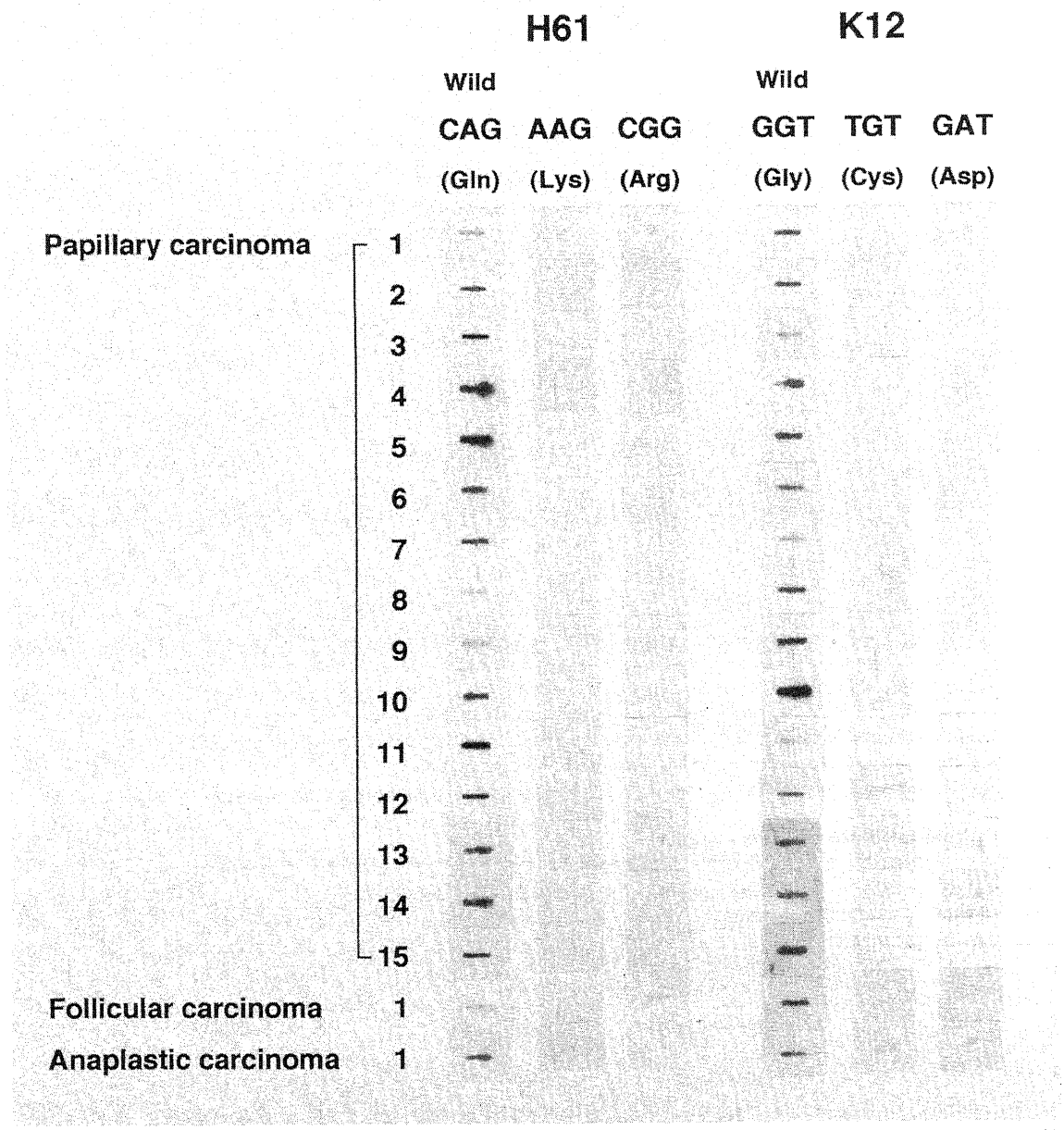

Fig. 3. Hybridization of PCR-amplified DNA from surgically-resected malignant neoplasms to probes for H-*ras* codon 61 and K-*ras* codon 12. The mutant probe for H-*ras* codon 61 (arginine, Arg) hybridized to DNA from case I of follicular carcinoma. Gln, glutamine ; Lys, lysine ; Gly, glycine ; Cys, cysteine ; Asp, asparatic acid.

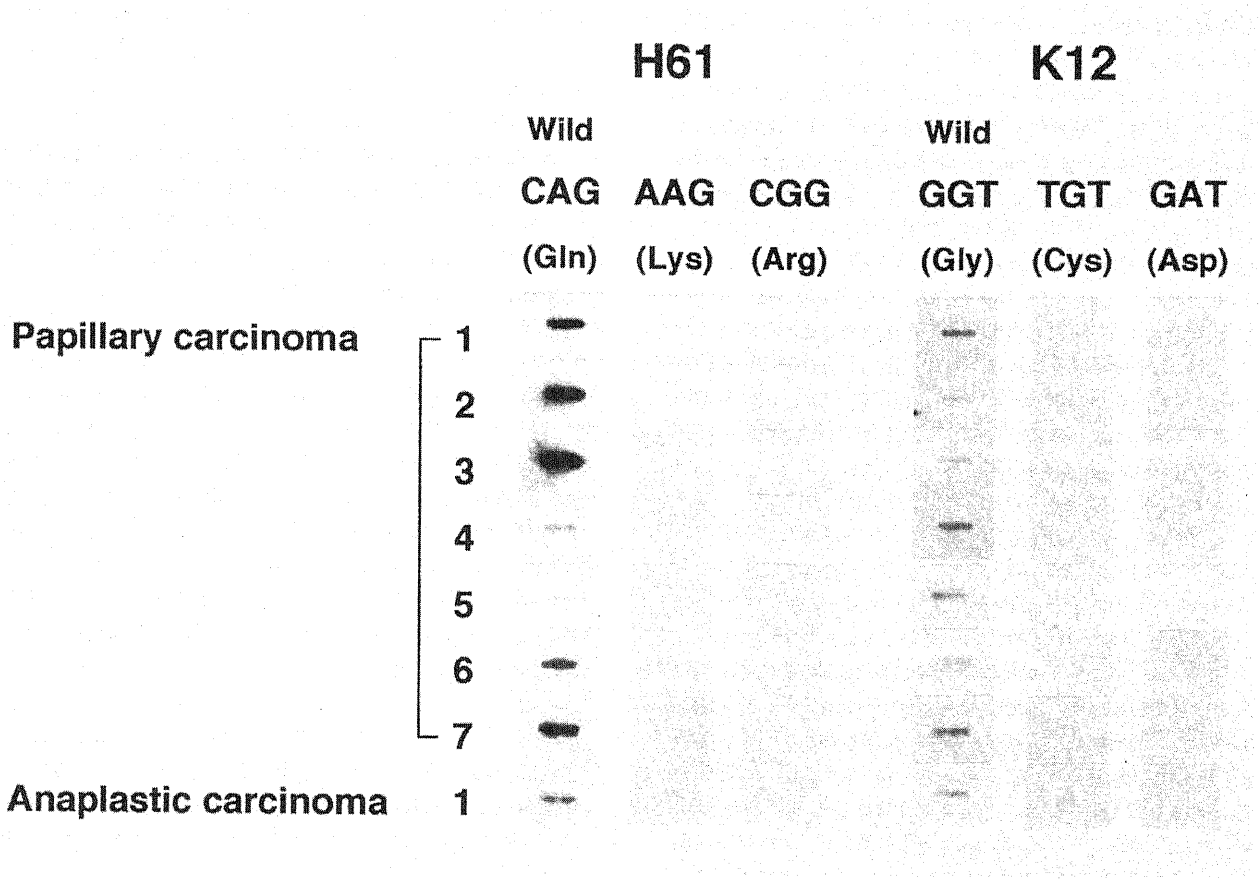

Fig. 4. Hybridization of PCR-amplified DNA from aspirated tumor cells to probes for H-*ras* codon 61 and K-*ras* codon 12. In all cases, DNA hybridized to only wild-type probes. Gln, glutamine; Lys, lysine; Arg, arginine; Gly, glycine; Cys, cysteine; Asp, asparatic acid.

ドン12に点突然変異を認めた腺腫様甲状腺腫の症例は，突然変異をおこさなかった他の濾胞腺腫や腺腫様甲状腺腫の症例と比べて，臨床像に特異な点はなかった．また H-*ras* コドン61の点突然変異を認めた濾胞癌の症例では，腫瘍の大きさは4×2.5cm とやや大きかったが，転移は認めなかった．

考　　察

Ras 遺伝子は H-, K-, N-*ras* の3種類からなる遺伝子ファミリーを形成している．その遺伝子産物は分子量21,000の蛋白質(p21) で細胞膜の内側に局在する．p21 は GTP, GDP に結合し，GTP を脱リン酸化して GDP に変える GTP 分解酵素活性を持ち，細胞の増殖および分化に関与する[18]．また*ras* 遺伝子は12，13あるいは61番目のコドンでの点突然変異によりアミノ酸置換が起こると活性化され，細胞の腫瘍化を引き起こすと考えられている[19]．つまり正常 p21 の活性型である GTP 型は GTP 分解酵素活性化蛋白質 (GTPase activating protein, GAP) と結合し，GTP 分解酵素の活性化により GTP が GDP に脱リン酸化され不活性型の p21-GDP 型に変換されるが，変異した p21 は，正常 p21 に比べ GTP 分解酵素活性が低いため，活性型の p21-GTP 型に長くとどまり，細胞増殖を促進し腫瘍化を引き起こすと推定されている[20]．

多くのヒト腫瘍において *ras* 遺伝子の点突然変異が報告されているが，変異の頻度と種類は腫瘍により異なっている[19]．K-*ras* 遺伝子変異は膵臓癌の約90%，大腸癌の約50%，肺腺癌の約30%に認められている．また，H-*ras* 遺伝子変異は膀胱癌の10%，腎癌の10%に，N-*ras* 遺伝子変異は悪性黒色腫の約15%，急性骨髄性白血病の10～70%に報告されている．また，大腸癌においては数種類の遺伝子変異が蓄積されて正常粘膜から腺腫を経て大腸癌に至る多段階発癌が明らかとなっており，*ras* 遺伝子の点突然変異は腫瘍化の初期の段階で起こることが示されている[21]．さて欧米の甲状腺腫瘍でも H-, K-, N-*ras* いずれかの遺伝子に点突然変異を認めることが報告されており，その頻度は報告者によりさまざまだが，濾胞腺腫で0～85%（平均32%），腺腫様甲状腺腫で21%，濾胞癌で0～100%（平均41%），乳頭癌で0～62%（平均17%），未分化癌で0～60%（平均59%）となっている[7~11][22~28]．また大腸癌の場合に似て，良性腫瘍でも *ras* 遺伝子変異が認められることから，甲状腺においても *ras* 遺伝子の点突然変異は腫瘍形成の初期の段階でおこっていることが示唆されている[10]．

一方，本邦では Yoshimoto らが，濾胞腺腫24例中5例(21%) に点突然変異を認めるものの，乳頭癌26例と未分化癌1例では変異を認めなかったことより，日本人では濾胞腺腫の一部でのみ *ras* 遺伝子変異が腫瘍形成に関与していると報告している[29]．今回の我々の検討でも，腺腫様甲状腺腫1例，濾胞腺腫1例，濾胞癌1例に点突然変異を認めたが，乳頭癌と未分化癌では変異を認めず，日本人の甲状腺腫瘍における *ras* 遺伝子

点突然変異は欧米に比し低頻度であり，変異が認められる組織型も限られている可能性が考えられた．

以前より，日本と欧米とで甲状腺癌の病理組織型別の頻度には大きな隔たりがあることが知られていた．甲状腺悪性腫瘍登録集計 (1977～1988) によれば，乳頭癌79.4%，濾胞癌16.6%，未分化癌2.5%，髄様癌1.5%と，日本では乳頭癌の発生頻度が高く，濾胞癌および未分化癌の頻度が低い[30]．一方，欧米では濾胞癌が20～39.3%，未分化癌が20～25.7%と多く，乳頭癌は25.3～51%と少ない[31][32]．このような差を生ずる原因として，環境因子，特にヨード摂取量の違いが重要であると考えられている．すなわちヨード欠乏地域では，乳頭癌が少なく濾胞癌，未分化癌が多いことが疫学的に指摘されており[12][33][34]，実際スイスではヨード添加食卓塩の普及により濾胞癌が41.8%から29.7%へ，未分化癌が36.9%から23.8%へと著明に減少し，乳頭癌は7.8%から33.4%と相対的上昇を認めている[12]．日本人は1日1～2mg と欧米人の約10倍多くヨードを摂取することも[35]，乳頭癌の発生が高頻度で，濾胞癌や未分化癌の発生が低頻度であることの一因であると考えられている[36]．ヨード摂取量の差が，甲状腺の発癌過程のどの段階に影響するのかについて興味がもたれるところであるが，実際 Shi らはヨード摂取量が *ras* 遺伝子の点突然変異にも影響する可能性を示している[28]．すなわち，彼らはヨード摂取量の異なった二つの地域において，甲状腺腫瘍における *ras* 遺伝子の点突然変異を検討した結果，濾胞腺腫における *ras* 遺伝子変異は，ヨード摂取量1日 46～70μg のデブレツェン (ハンガリー) では84.6%と高率だったが，ヨード摂取量1日 190～550μg のニューファンドランド (カナダ) では16.6%にすぎなかったこと，また濾胞癌での *ras* 遺伝子変異はデブレツェンで50%であったが，ニューファンドランドでは10%であり，さらに乳頭癌では両地域とも変異を認めなかったことを報告し，濾胞腺腫と濾胞癌においては，ヨード摂取不足が *ras* 遺伝子変異を介した腫瘍化の要因となっている可能性を示唆している．したがって，今回の結果で日本人の甲状腺腫瘍での *ras* 遺伝子変異が低頻度であったことは，日本人のヨード摂取量が多いことを反映したものであると推測することも可能かもしれない．しかしながら，*ras* 遺伝子変異を引き起こす原因として，ヨード摂取不足以外に，放射線被爆，遺伝的素因，血清 TSH 濃度，感染なども考えられており[29]，例えば Wright らは過去の放射線治療歴の有無で甲状腺腫瘍を分け，*ras* 遺伝子の点突然変異を検討した結果，変異は放射線治療歴の有るもので33%，無いもので37%と差がなかったが，濾胞癌に限った検討では，K-*ras* 遺伝子の変異は放射線治療歴の有るもので60%と高率であったが，治療歴の無いものでは6%であり，放射線が K-*ras* 遺伝子の点突然変異を引き起こした可能性を報告している[27]．今回少数ながら一部の症例で *ras* 遺伝子変異が認められたことより，遺伝的素因，ヨード摂取量とは無関係な環境因子など他の因子が *ras* 遺伝子変異を介した腫瘍化に関与している可能性も考慮する必要があると思われる．

甲状腺腫瘍の診断としては超音波検査，X 線 CT，核医学的検査などの画像診断や穿刺吸引細胞診が用いられている．その中でも穿刺吸引細胞診は手技が簡単で安全で繰り返し実施でき質的診断精度が高く最も有用とされており，本法が用いられてから甲状腺腫瘍に対する手術の比率が減少し，手術標本に占める癌の比率が上昇したとされている[13][37]～[39]．甲状腺腫瘍における穿刺吸引細胞診の偽陰性は1～11%，偽陽性は1～8%で感度は65～98%，特異性は72～100%であり[38]，特に乳頭癌では正診率は80～90%である[40]．しかし濾胞癌は，腫瘍細胞の被膜浸潤像や脈管浸潤像が組織学的に確認されるものと定義されており，細胞診において濾胞腺腫との区別は不可能である[41]．そこでそれらを鑑別する指標が求められてきた．近年の分子生物学的研究の進歩により，甲状腺腫瘍においても *ras* 遺伝子の点突然変異の他に，DNA メチル化の増加[42]，染色体 11q13 の欠失[43]，染色体 3p の欠失[44]，*ret* 遺伝子の活性化[45]，p53 遺伝子の点突然変異[46]など多段階発癌に関与する遺伝子変異が見い出されており[6][47]，それらの変異を検出することにより甲状腺腫瘍の生物学的悪性度診断が可能であれば，患者にもたらされる恩恵も大きいものがある．今回の穿刺吸引細胞を用いた方法では *ras* 遺伝子の変異は検出されなかったが，穿刺吸引細胞を用いた *ras* 遺伝子変異の解析は術前遺伝子診断として施行可能であることが明らかとなった．しかし *ras* 遺伝子の検討だけでは，日本人における変異陽性頻度が少ないことからその有用性には限界があると考えられた．他の遺伝子についても穿刺吸引細胞を用いた方法は応用可能であり，今後他の遺伝子を含めた複数の遺伝子変異の検討を行えば術前遺伝子診断の有用性につき評価できるものと思われる．

結　　論

甲状腺腫瘍の H-, K-, N-*ras* 遺伝子それぞれのコドン12とコドン61の点突然変異の有無を，穿刺吸引細胞と新鮮手術標本を用い，PCR 法とスロットブロットハイブリダイゼーション法を使って検討し，以下の結論を得た．

1．新鮮手術標本の良性腫瘍では，濾胞腺腫1例に H-*ras* コドン61で CAG→CGG の，腺腫様甲状腺腫1例に K-*ras* コドン12で GGT→GAT の点突然変異を認めた．

2．新鮮手術標本の悪性腫瘍では，濾胞癌1例に H-*ras* コドン61で CAG→CGG の点突然変異を認めたが，乳頭癌と未分化癌では *ras* 遺伝子の変異は検出されなかった．

3．穿刺吸引細胞を用いた方法では，乳頭癌，未分化癌とも *ras* 遺伝子の変異は検出されなかった．

4．穿刺吸引細胞と新鮮手術標本の結果を合わせると，良性腫瘍では濾胞腺腫11例中1例 (9%) に，腺腫様甲状腺腫6例中1例 (17%) に点突然変異を認めた．しかし悪性腫瘍では濾胞癌1例に点突然変異を認めたのみで，乳頭癌と未分化癌では *ras* 遺伝子の変異は検出されなかった．

以上の結果より，日本人の甲状腺腫瘍では *ras* 遺伝子の変異は欧米人に比べると少なく，腫瘍形成の上で *ras* 遺伝子の点突然変異は限られた一部の症例でのみ関与している可能性が考えられた．また，穿刺吸引細胞を用いた *ras* 遺伝子変異の解析は術前遺伝子診断として施行可能だが，日本人における変異陽性頻度が少ないことからその有用性には限界があるものと思われた．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を表します．また，終始直接の御指導を賜りました大沢謙三講師に心から感謝いたします．さらに貴重な手術材料を提供して下さった金沢大学医学部第一外科，金沢市立病院，市立敦賀病院，国立山中病院，穴水総合病院および黒部市民病院外科諸先生方に厚く御礼申し上げます．最後に，本研究遂行に多大な御協力を戴きました金沢大学医学部第一内科第一研究室の諸先生方に深く感謝の意を表します．

なお，本論文の要旨の一部は，第67回日本内分泌学会総会（1994年，長崎）において発表した．

文　　献

1） **樋口郁夫，杉本光郎，及川幹夫**：福島県の会津地方における甲状腺検診（第2報）日本各地における甲状腺検診との比較．日農医誌，**35**，147-151 (1986).

2） **Maruchi, N., Furihata, R. & Makiuchi, M.**: Population surveys on the prevalence of thyroid cancer in a non-endemic region, Nagano, Japan. Int. J. Cacer, **7**, 575-583 (1971).

3） **藤本吉秀**：甲状腺疾患．内分泌疾患（藤本吉秀編），第1版，17-156 頁，中外医学社，東京，1989.

4） **宮内　昭，高井新一郎，森本茂人，大西利夫，川村修司，岸野文一郎，前田昌純，神前五郎**：頚部腫瘤の穿刺吸引鑑別診断．多角的診断技術の応用．日外会誌，**84**，667-673 (1983).

5） **Weinberg, R. A.**: Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogesis. Cancer Res., **49**, 3713-3721 (1989).

6） **Fagin, J. A.**: Genetic basis of endocrine disease 3. Molecular defects in thyroid gland neoplasia. J. Clin. Endocrinol. Metab., **75**, 1398-1400 (1992).

7） **Lemoine, N. R., Mayall, E. S., Wyllie, F. S., Farr, C. J., Hughes, D., Padua, R. A., Thurston, V., Williams, E. D. & Wynford-Thomas, D.**: Activated *ras* oncogenes in human thyroid cancers. Cancer Res., **48**, 4459-4463 (1988).

8） **Lemoine, N. R., Mayall, E. S., Wyllie, F. S., Williams, E. D., Goyns, M., Stringer, B. & Wynford-Thomas, D.**: High frequency of *ras* oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. Oncogene, **4**, 159-164 (1989).

9） **Suarez, H. G., du Villard, J. A., Severino, M., Caillou, B., Schlumberger, M., Tubiana, M., Parmentier, C & Monier, R.**: Presence of mutations in all three *ras* genes in human thyroid tumors. Oncogene, **5**, 565-570 (1990).

10) **Namba, H., Rubin, S. A. & Fagin, J. A.**: Point mutations of *ras* oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. Mol. Endocrinol., **4**, 1474-1479 (1990).

11) **Karga, H., Lee, J. K., Vickery, Jr. A. L. J., Thor, A., Gaz, R. D. & Jameson, J. L.**: *Ras* oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. J. Clin. Endocrinol. Metab., **73**, 832-836 (1991).

12) **Hedinger, C.**: Geographic pathology of thyroid diseases. Path. Res. Pract., **171**, 285-292 (1981).

13) **Loewhagen, T., Willems, J. S., Lundell, G., Sundblad, R. & Granberg, P. O.**: Aspiration biopsy cytology in diagnosis of thyroid cancer. World J. Surg., **5**, 61-73 (1981).

14) **甲状腺外科検討会編**：外科・病理甲状腺癌取扱い規約，第4版，17-47 頁，金原出版，東京，1991.

15) **Feinmesser, R., Miyazaki, I., Cheung, R., Freeman, J. L., Noyek, A. M. & Dosch, H. M.**: Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine-needle aspiration. N. Engl. J. Med., **326**, 17-21 (1992).

16) **Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N.**: Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, **230**, 1350-1354 (1985).

17) **Verlaan-de Vries, M., Bogaard, M. E., van den Elst, H., van Boom, J. H., van der Eb, A. J. & Bos, J. L.**: A dot-blot screening procedure for mutated *ras* oncogenes using synthetic oligodeoxynucleotides. Gene, **50**, 313-320 (1986).

18) **Barbacid, M.**: *Ras* genes. Annu. Rev. Biochem., **56**, 779-827 (1987).

19) **Bos, J. L.**: *Ras* oncogene in human cancer: A review. Cancer Res., **49**, 4682-4689 (1989).

20) **McCormick, F.**: *Ras* GTPase activating protein: Signal transmitter and signal terminator. Cell, **56**, 5-8 (1989).

21) **Fearon, E. R. & Vogrlstein, B.**: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, **61**, 759-767 (1990).

22) **Fusco, A., Gierco, M., Santoro, M., Berlingieri, M. T., Pilotti, S., Pierotti, M. A., Porta, G. D. & Vecchio, G.**: A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. Nature, **328**, 170-172 (1987).

23) **Suarez, H. G., Du Villard, J. A., Caillou, B., Schlumberger, M., Tubiana, M., Parmentier, C. & Monier, R.**: Detection of activated *ras* oncogenes in human thyroid carcinomas. Oncogene, **2**, 403-406 (1988).

24) **Wright, P. A., Lemoine, N. R., Mayall, E. S., Wyllie, F. S., Hughes, D., Williams, E. D. & Wynford-Thomas, D.**: Papillary and follicular thyroid carcinomas show a different pattern of *ras* oncogene mutation. Br. J. Cancer, **60**, 576-577 (1989).

25) **Namba, H., Matsuo, K. & Fagin, A.**: Clonal composition of benign and malignant human thyroid tumors. J. Clin. Invest., **86**, 120-125 (1990).

26) **Namba, H., Gutman, R. A., Matsuo, K., Alvarez, A. & Fagin, J. A.**: H-*ras* protooncogene mutations in human thyroid neoplasms. J. Clin. Endocrinol. Metab., **71**, 223-229 (1990).

27) **Wright, P. A., Williams, E. D., Lemoine, N. R. & Wynford-Thomas, D.**: Radiation-associated and 'spontaneous' human thyroid carcinomas show a different pattern of *ras* oncogene mutation. Oncogene, **6**, 471-473 (1991).

28) **Shi, Y., Zou, M., Schmidt, H., Juhasz, F., Stensky, V., Robb, D. & Farid, N. R.**: High rates of *ras* codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area. Cancer Res., **51**, 2690-2693 (1991).

29) **Yoshimoto, K., Iwahana, H., Fukuda, A., Sano, T., Katsuragi, K., Kinoshita, M., Saito, S. & Itakura, M.**: *Ras* mutations in endocrine tumors: Mutation detection by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. Jpn. J. Cancer Res., **83**, 1057-1062 (1992).

30) **甲状腺外科検討会甲状腺悪性腫瘍登録委員会**：甲状腺悪

性腫瘍登録集計 (1977～1988). 第23回甲状腺外科検討会抄録集, 125-139 (1990).

31) **Heitz, P., Moser, H. & Staub, J. J.**: A study of 573 thyroid tumors and 161 autopsy cases observed over a thirty-year period. Cancer, **37**, 2329-2337 (1976).

32) **Beaugie, J. M., Brown, C. L., Doniach, I. & Richardson, J. E.**: Primary malignant tumours of the thyroid: The relationship between histological classification and clinical behaviour. Br. J. Surg., **63**, 173-181 (1976).

33) **Williams, E. D., Doniach, I., Bjarnason, O. & Michie, W.**: Thyroid cancer in an iodide rich aera. A histopathological study. Cancer, **39**, 215-222 (1977).

34) **Belfiore, A., La Rosa, G. L., Padova, G., Sava, L., Ippolito, O. & Vigneri, R.**: The frequency of cold thyroid nodules and thyroid malignancies in patients from an iodine-deficient area. Cancer, **60**, 3096-3102 (1987).

35) **石突吉持**: ヨードと甲状腺機能. 日内会誌, **79**, 922-926 (1990).

36) **Ezaki, H., Ebihara, S., Fujimoto, Y., Iida, F., Ito, K., Kuma, K., Izuo, M., Makiuchi, M., Oyamada, H., Matoba, N. & Yagawa, K.**: Analysis of thyroid carcinoma based on material registered in Japan during 1977-1986 with special reference to predominance of papillary type. Cancer, **70**, 808-814 (1992).

37) **Hamberger, B., Gharib, H., Melton Ⅲ, L. J., Goellner, J. R. & Zinsmeister, A. R.**: Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. Impact on thyroid practice and cost of care. Am. J. Med., **73**, 381-384 (1982).

38) **Gharib, H. & Goellner, J. R.**: Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: An appraisal. Ann. Intern. Med., **118**, 282-289 (1993).

39) **Haas, S., Trujillo, A. & Kunstle, J.**: Fine needle aspiration of thyroid nodules in a rural setting. Am. J. Med., **94**, 357-361 (1993).

40) **鳥屋城男**: 穿刺吸引細胞診の実際. 乳頭癌と濾胞癌. 内分泌外科, 1, 2-6 (1984).

41) **坂本穆彦**: 甲状腺腫瘍の病理診断. 内分泌学の進歩, 11, 93-101 (1993).

42) **Matsuo, K., Tang, S. H., Zeki, K., Gutman, R. A. & Fagin, J. A.**: Aberrant deoxyribonucleic acid methyration in human thyroid tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab., **77**, 991-995 (1993).

43) **Matsuo, K., Tang, S. H. & Fagin, J. A.**: Allelotype of human thyroid tumors: Loss of chromosome 11q13 sequences in follicular neoplasms. Mol. Endocrinol., **5**, 1873-1879 (1991).

44) **Herrmann, M. A., Hay, I. D., Bartelt, Jr. D. H., Ritland, S. R., Dahl, R. J., Grant, C. S. & Jenkins, R. B.**: Cytogenic and molecular genetic studies of follicular and papillary thyroid cancers. J. Clin. Invest., **88**, 1596-1604 (1991).

45) **Santoro, M., Carlomagno, F., Hay, I. D., Herrmann, M. A., Gierco, M., Melillo, R., Pierotti, M. A., Bongarzone, I., Porta, G. D., Berger, N., Peix, J. L., Paulin, C., Fabien, N., Vecchio, G., Jenkins, R. B. & Fusco, A.**: Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. J. Clin. Invest., **89**, 1517-1522 (1992).

46) **Fagin, J. A., Matsuo, K., Karmakar, A., Chen, D. L., Tang, S. H. & Koeffler, H. P.**: High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. J. Clin. Invest., **91**, 179-184 (1993).

47) **Wynfold-Thomas, D.**: Molecular genetics of thyroid cancer. Trends Endoclinol. Metab., **4**, 224-232 (1993).

Low Prevalence of *Ras* Oncogene Mutations in Benign and Malignant Thyroid Neoplasms in Japan

Tetsuo Hayakawa, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920

J. Juzen Med Soc., **104,** 15－25 (1995)

Key words Japanese thyroid neoplasm, *ras* oncogene, point mutation, fine-needle aspiration, PCR

Abstract

Although high frequency of *ras* oncogene activation by point mutations in thyroid neoplasms has been reported in European countries, little is known about whether this is the case in Japan. In this study, the frequency of three *ras* oncogene mutations (H-*ras*, K-*ras*, and N-*ras*) in 42 benign and malignant thyroid neoplasms in Japan was investigated. DNA was obtained from 34 fresh surgically-resected tumors (11 follicular adenomas, 6 adenomatous goiters, 15 papillary carcinomas, one follicular carcinoma, and one anaplastic carcinoma), and from 8 samples obtained by fine-needle aspiration (7 papillary carcinomas and one anaplastic carcinoma). The DNA was then amplified by PCR and screened for mutations using oligonucleotide-specific hybridization. In surgically-resected tumors, *ras* mutations were detected in one follicular adenoma, one adenomatous goiter, and one follicular carcinoma. No mutation was found in the papillary carcinomas or the anaplastic carcinoma. In samples obtained by fine-needle aspiration, no mutation was identified in spite of there being enough PCR-amplified DNA. In total, *ras* oncogene point mutations were detected in 2 of 17 benign lesions (12%), and in one of 25 malignant lesions (4%). The patients with mutation-positive lesions showed no differences in clinical characteristics from the patient with mutation-negative lesions. These results indicate the low frequency of *ras* oncogene point mutations in thyroid neoplasms in Japan, suggesting that the activation of *ras* gene may play only a minor role in thyroid tumorigenesis in Japan. Although preoperative gene diagnosis of various neoplasms by detecting the *ras* gene mutation using PCR amplification may be possible in terms of technology, its application to thyroid neoplasms in Japan would be of little use because of its low positive rate.