

甲状腺癌の組織学的分化度に関する病理学的研究: 細胞増殖因子及び
ras遺伝子との関連についての免疫組織化学的, 分子生物学的研究

指導教官 町並 陸生 教授

東京大学大学院医学系研究科

第3 Ⅱ 博士課程 (医学) 病因病理学専攻

元井 紀子

①

甲状腺癌の組織学的分化度に関する病理学的研究：細胞増殖因子及び
ras遺伝子との関連についての免疫組織化学的，分子生物学的研究

指導教官 町並 陸生教授

平成4年4月
東京大学大学院医学系研究科
第3種博士課程（医学）
病因病理学専攻 入学
氏名 元井 紀子

THE HISTORY OF THE UNITED STATES OF AMERICA

FROM THE FOUNDATION OF THE COLONIES TO THE PRESENT

BY JOHN B. HENNINGSEN

VOLUME I: THE FOUNDING YEARS

CHAPTER I: THE EARLY COLONIES

THE FIRST SETTLEMENTS

THE ROYAL CHARTERS

THE STRUGGLE FOR INDEPENDENCE

THE DECLARATION OF INDEPENDENCE

THE CONSTITUTION

THE EARLY REPUBLIC

THE GROWING ECONOMY

目次

1. 序論

2. 材料と方法

1) 手術および剖検材料

2) 試薬およびその入手先

a) 免疫組織化学用試薬及び抗体

b) 核酸の抽出、精製用試薬

c) Polymerase chain reaction (PCR)用試薬

d) ダイレクトシーケンス用試薬

3) 年齢、性、肉眼所見および転移について

4) 病理組織学的検索

a) 検体の固定、包埋および染色

b) 分類基準

5) 細胞増殖因子に関する免疫組織化学的検索

a) パラフィン切片における検体の固定と包埋

b) ヒアルロニダーゼ処理によるパラフィン切片の前処理

c) 免疫組織化学的染色

d) 免疫組織化学的染色結果の判定基準

6) ras遺伝子の突然変異およびras遺伝子産物に関する検索

a) 検体からのDNAの抽出と精製

b) Nested PCR (polymerase chain reaction)によるras遺伝子の増幅

c) PCR産物の精製

d) ダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定

e) ras遺伝子産物の免疫組織化学的染色

7) データ解析

3. 結果

1) 病理組織学的分類と年齢、性、肉眼所見および転移について

2)細胞増殖因子に関する免疫組織化学的染色の結果

3)ras遺伝子の突然変異およびras遺伝子産物の検索結果

4. 考察

5. まとめ

6. 引用文献

7. 図

8. 表

1. 序論

甲状腺癌は一般に予後良好な癌であるが、時に急速な経過をたどり死亡する症例があり、悪性化を規定する因子の解明が待たれている。一方、甲状腺腫瘍は組織学的分類が予後と相関する腫瘍としても有名である。甲状腺腫瘍の組織学的分類は近年その診断基準の国際的な標準化の試みがなされつつあるが、現在でも、なお組織学的悪性度の評価、良悪性の鑑別などの点で、未だ統一見解のない部分が残されており、これらの問題点の詳細な検討は焦眉の課題である。甲状腺腫瘍は多様な組織像を示し、研究者によって異なる立場での分類が行なわれてきた。甲状腺腫瘍の組織学的分類は、現在までにいくつか提唱されているが、1988年のWHO分類(30)、あるいはWHO分類を基盤とした「外科・病理甲状腺癌取扱い規約」(第4版)分類(90)が汎用されている。これらの分類は、甲状腺原発性上皮性腫瘍を、大きく濾胞上皮由来の腫瘍と、傍濾胞細胞(C細胞)由来の腫瘍に分類し、前者については、良性と悪性に、さらに悪性腫瘍を主に細胞学的な所見に基づいて乳頭癌、濾胞癌および未分化癌に分類している。また、Sakamotoらは濾胞上皮由来の悪性腫瘍を、組織構築の観点で、高分化癌、低分化癌および未分化癌と組織学的分化度で分類することを提唱し、新たに低分化癌の概念を導入した。このような分化度分類は、臨床的な予後と相関することが報告されている(70)。また、分子生物学的には、未分化癌ではp53遺伝子の過剰発現(14)(64)、あるいは変異の頻度が増加する(15)(21)(36)(89)などの報告、癌遺伝子産物bcl-2の発現の変化(64)あるいはDNA ploidyの変化(84)と組織学的分化度との関連が報告されている。しかしながら、組織学的分化度に関する分子生物学的、或いは細胞生物学的因子との関連は未だ解明されていない点が多く、今後、甲状腺癌の悪性度の指標としての組織学的分化度分類の妥当性の有無を多面的に検証する必要がある。

他方、甲状腺では種々の増殖因子が濾胞上皮細胞或いは腫瘍細胞の増殖あるいは進展に関与していることが報告されている(17)(32)。他の癌と同様に増殖因子は腫瘍の悪性化に重要な役割を果たしている可能性があり、増殖因子と甲状腺癌の関係が注目されている(1)(22)(24)。

細胞増殖因子は正常細胞の増殖、分化や発生などに関与する重要な因子である。また、多くの癌原遺伝子産物は、増殖因子、増殖因子受容体やその変異型であることが知られ、癌細胞の増殖、あるいは形態形成、浸潤、転移に関わっている可能性が示唆されている(4)。細胞増殖因子には、現在までに、上皮増殖因子/形質転換増殖因子アルファEGF(epidermal growth factor)/TGF-alpha(transforming growth factor-alpha)、形質転換増殖因子ベータTGF-beta(transforming growth factor-beta)、線維芽細胞増殖因子FGF(fibroblast growth factor)、肝細胞増殖因子HGF(hepatocyte growth factor)、血小板由来増殖因子PDGF(platelet-derived growth factor)、インスリン様増殖因子IGF(insulin-like growth factor)各ファミリーの6つのファミリーが知られている。

甲状腺では、in vivo, in vitroの系で、上皮増殖因子EGF(epidermal growth factor)(2)(9)(11)(29)(47)(55)(74)、形

質転換増殖因子ベータTGF-beta (transforming growth factor- beta)(38)(67)、インスリン様増殖因子IGF (insulin-like growth factor) (85)(86)、血小板由来増殖因子PDGF (platelet-derived growth factor) (31)(53)等の増殖因子が、腫瘍の増殖あるいは進展に関与していることが報告されている(2)。例えば、Hashimotoら、Mizukamiらの報告では、免疫組織化学的に甲状腺悪性腫瘍にEGFとEGF受容体の発現がみられるが、正常甲状腺、良性腫瘍、あるいは過形成性病変では認められなかった。このような増殖因子とレセプターの共発現は濾胞癌よりも乳頭癌で多く認められている(29)(55)。Di CarloらによるEGF受容体のradioligand assayによる検索では、正常甲状腺、過形成性甲状腺、および良性、悪性腫瘍に発現が認められ、未分化癌で最も強く発現していた(11)。Aaslandらによると、EGF受容体あるいはその変異体をコードしている癌遺伝子であるc-erbB1 およびc-erbB2/neu のmRNA レベルでの発現は正常甲状腺よりも乳頭癌で亢進していると報告されている(2)。Jasaniらによる免疫組織化学的検索では、TGF-betaは甲状腺癌にのみ発現が認められ、良性腫瘍や正常部には発現が認められないとされている(38)。また、濾胞癌ではTGF-betaの発現と、Ha-ras codon 61 (Glu → Arg)の変異との間に相関があるとする報告もある(67)。

肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)は初代培養肝細胞の増殖を促進する因子として最初に単離された、比較的新しい増殖因子である(58)。HGFは上皮細胞の分散性、運動性を亢進する因子であるscatter factorと同一の分子であることが見い出され(81)、培養細胞系において多様な作用を有することが判明した(8)(56)(60)(69)(73)(80)。主として、線維芽細胞などの間葉系細胞から分泌され主に上皮に作用する因子であり、上皮間質相互作用を担う因子としても注目されている。その作用には、細胞増殖促進作用、細胞増殖抑制作用、細胞分散作用、運動性亢進作用、形態形成作用、血管新生作用などが知られている。HGFの受容体はc-met癌原遺伝子産物と同定されている(7)。c-Met蛋白は、膜貫通型の受容体で、細胞内ドメインにチロシンキナーゼ活性を有する。c-met mRNAは、肝臓、消化管、肺、甲状腺および腎臓に高レベルの発現が認められている。一方、western blot法でのc-Met産物の発現は、mRNAの発現とほぼ一致するが、甲状腺では例外的にc-Met蛋白の発現が検出されなかった(12)(66)(78)。この現象は、mRNA転写以降の過程で蛋白合成が抑制される機構の存在が想定されるがその詳細は不明である。c-Metは、ある種の癌細胞で発現が亢進しており、腫瘍発生、増殖、進展に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた(12)。例えば、胃癌では、予後不良の硬癌で発現が高く、臨床病期、進達度、リンパ節転移と良く相関するとの報告もある(44)。また、甲状腺癌でも、c-Met蛋白が発現していることが報告されているが(13)、甲状腺癌の分化度との関連は明かではない。

線維芽細胞増殖因子Fibroblast growth factor (FGF)は、1974年にGospodarowicsらにより発見されて以来(28)、現在までにacidicFGF (aFGF)、basicFGF (bFGF)のプロト型の他、9つの因子が知られ、ファミリーを形成している。FGFはヘパリン結合性増殖因子であり、細胞の増殖、分化、血管新生、発生過程等に関与する多

様な作用を有する(52)。FGFファミリーのレセプターは、遺伝子の差により5種、つまりFGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FGFR5が知られ、レセプターもファミリーを形成している(52)。FGFRは、細胞外に免疫グロブリンドメインを持つ膜型のチロシキナーゼ型レセプターである。各FGFとFGFRは親和性に微妙な差があり、複雑な相互関係がある(34)(40)(52)。甲状腺は免疫組織化学的にbFGF、aFGFおよびFGFR1の高発現臓器の一つであることが知られている(25)(35)(51)。またin vitroの実験では、FGFに甲状腺濾胞上皮の増殖促進作用があることが報告されている(5)(19)(49)。しかし、甲状腺癌の分化度におけるFGFおよびFGFRの関連の有無は明かではない。

さて、近年の分子生物学的進歩にともなう、甲状腺腫瘍においてもras、p53、bcl-2、erbB2、ret、trkなどの多くの癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常が報告されてきた(17)(22)(24)(83)。このような遺伝子異常のなかでも、ras遺伝子の異常が最も高頻度であると報告されている。ras遺伝子は、NIH3T3のtransfection assayによりクローニングされた最初の癌遺伝子で、現在までにKi-ras、Ha-ras、N-rasの3種類のものが知られている。ras遺伝子産物はGTP結合蛋白で細胞内シグナル伝達に関与しており、細胞の増殖分化のシグナル伝達系で重要な役目を果たしている(3)。ras遺伝子産物は上流にはチロシキナーゼ等が存在しており(18)、その下流にはRaf、MAPKの経路が知られている(23)(57)。また、ある種の増殖因子のシグナル伝達系にはras遺伝子産物が関与することが知られている。ras遺伝子の突然変異は、GTPase活性の弱い変異ras蛋白の発現を介し、活性化GTP結合蛋白の増加を引き起こし、細胞内シグナル伝達を促進することにより、細胞の悪性転化に関与していると言われている(50)。現在までに、多くの癌細胞でras遺伝子の点突然変異が報告されている(6)。これまでに甲状腺癌全体ではras遺伝子の点突然変異は10-60%にみられるが、報告によりかなり差がある(33)(42)(43)(46)(61)(62)(76)(72)。また、正常甲状腺組織、良性腫瘍にも、低頻度(33-46%)であるが同様の異常が報告されており、腫瘍化の早期での関与が指摘されている。またras遺伝子の異常の頻度には地域差が認められ、ヨード摂取量との関連が推定されている(72)。また、発癌因子により変異の部位が異なることが報告されている(45)(82)。しかしながら、甲状腺癌の組織学的分化度とras遺伝子の変異との関連は明かではない。

本研究では以上のような研究の進展状況を踏まえ、過去18年間に得られた甲状腺腫瘍手術検体或いは剖検検体(合計241例)を対象とし、Sakamotoらの提唱している甲状腺癌を病理組織学的分化度により高分化癌、低分化癌、未分化癌と3型に分類した場合、その分類が各種の細胞生物学的マーカーと相関しているか否かを検討し、甲状腺癌の分化度分類の有用性、特に高分化癌と未分化癌の中間的存在としての低分化癌の位置付けを明かにすることを目的とした。細胞生物学的マーカーとしては、上記の如く細胞増殖因子とそのレセプター(HGF/c-Met、basicFGF/FGFR1)の発現の変化、およびras遺伝子の変異およびras遺伝子産物の発現について検索した。

2. 材料と方法

1) 手術および剖検材料

1976年から1994年の間に、東京大学医学部付属病院にて外科的に切除された甲状腺腫瘍手術材料210例、剖検材料1例、および関連施設にて外科的に切除された甲状腺手術材料30例、合計241例を対象とした。そのうち、新鮮凍結検体の得られた例は26例であった。これらを用いて以下の検索を行った。

2) 試薬およびその入手先

- | | |
|---------------------------------------|------------|
| a) 免疫組織化学用試薬及び抗体 | 表1および2に示す。 |
| b) 核酸の抽出、精製用試薬 | 表3に示す。 |
| c) Polymerase chain reaction (PCR)用試薬 | 表4に示す。 |
| d) ダイレクトシーケンス用試薬 | 表5に示す。 |

3) 年齢、性、肉眼所見および転移について

各症例の手術時あるいは受診時年齢(以下年齢)、性別、腫瘍最大径を検索した。さらに悪性腫瘍についてはリンパ節転移の有無、および腺内転移の有無について検索した。

4) 病理組織学的検索

a) 検体の固定、包埋および染色

切除された検体は、可能な症例では新鮮な検体を肉眼で観察後、腫瘍部分に割をいれ観察し、一部を凍結検体として採取、残りを速やかに10%ホルマリンにて固定した。固定後、腫瘍の最大割面を観察し、最大4.0 x 2.0 x 0.5 cmまでの大きさの切片にし、パラフィン包埋し、3ミクロン厚で薄切、通常のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行なった。HE染色標本を各症例について検鏡し、「甲状腺癌取扱規約(第4版)」に沿って組織分類を、さらに坂本らの提唱する分化度による分類を行なった。HE染色で確定診断の困難な症例については、適宜、特殊染色(弾性線維染色EVG (elastica van Gieson)染色、グリメリウスGrimelius染色)や免疫組織化学的検索(サイログロブリンthyroglobulin、ケラチンkeratin、上皮膜抗原epithelial membranous antigen (EMA)、カルシトニン calcitonin、癌胎児性抗原carcinoembryonic antigen (CEA)、白血球共通抗原leucocyte common antigen (LCA) 等)を施行した。

b) 分類基準

組織学的分類: 「甲状腺癌取扱規約(第4版)」に沿って分類した。悪性腫瘍は、乳頭癌 papillary

carcinoma、濾胞癌 follicular carcinoma、未分化癌 undifferentiated carcinoma、髄様癌 medullary carcinoma、悪性リンパ腫 malignant lymphomaに分類されるが、本研究では上皮由来の腫瘍のみを対象とした。

乳頭癌は、以下に示す特徴的な細胞所見を示す腫瘍と定義した。腫瘍細胞の核が、(1)すりガラス核 ground glass nuclei、(2)核内細胞質封入体 intranuclear cytoplasmic inclusion、(3)核溝 nuclear groove という特徴を示すものを乳頭癌と診断した(図1)。その他に、石灰化、砂粒小体の存在が認められることが多く、診断の傍証とした。組織構築は、大部分の症例では、乳頭状構造をとるが、ときに全く乳頭状構造をとらない例があり、このような症例は濾胞型乳頭癌 papillary carcinoma, follicular variantとした。

濾胞癌は、線維性被膜で被包された濾胞状構造をとる腫瘍で、細胞所見では濾胞腺腫と区別できない。濾胞癌の診断根拠は、(1)完全な被膜侵襲(図2)、(2)脈管侵襲(図3)のいずれか、あるいはその両方が認められることとした。(1)(2)の認められない濾胞性腫瘍は濾胞腺腫 follicular adenomaと診断した(図4)。被膜形成の認められない濾胞性腫瘍が多発しているものは腺腫様甲状腺腺腫 adenomatous goiter、単発であるものは腫瘍様結節 adenomatous noduleと診断した(図5)。

未分化癌は、大型で細胞異型の強い腫瘍細胞からなり、時に核のいびつな腫瘍細胞や多核の腫瘍巨細胞の出現を認め、非常に多形性の強い腫瘍と定義した(図6)。一定の構造をとらず、壊死や出血を伴うことが多い。

髄様癌は、傍濾胞細胞(C細胞)由来の悪性腫瘍と定義されている。組織構築は多様であり、主に充実性シート状、島状、索状構造をとる(図7)。細胞質は、好酸性で豊かであり、嗜銀性 argyrophilic を示す。免疫組織化学的染色で、細胞質内にカルシトニンが陽性であれば、診断確定とした(図8)。サイログロブリンは陰性である。また、間質へのアミロイド沈着が認められることが多く、診断の傍証とした。

分化度分類：甲状腺癌のうち、濾胞上皮由来の癌、つまり乳頭癌、濾胞癌については特徴的な乳頭状、あるいは濾胞状の構造をとり、コロイド産生の認められるものは高分化癌(図1.2)と定義し、索状、充実性あるいは胞巣状の構造をとり、コロイド産生の認められない部分が一部でも認められるものを低分化癌と定義した。低分化癌は、上述の腫瘍細胞の細胞所見に従って、低分化乳頭癌(図9)と低分化濾胞癌(図10)に分類した。コロイドはPAS陽性であり、コロイド産生の有無の判定には、PAS染色を補助的に施行した(図11)。

5)細胞増殖因子に関する免疫組織化学的検索

a) パラフィン切片における検体の固定と包埋

検体は、速やかに10%ホルマリンで固定し、固定後に4.0 x 2.0 x 0.5 cmまでの大きさの切片にしパラフィンに包埋した。石灰化の強い硬い検体は固定後にEDTAあるいは硝酸にて脱灰操作を行なった。標本は3

4ミクロンの厚さで薄切し、3-アミノプロピルトリエトキシシラン 3-aminopropyltriethoxysilane でコートしたスライドグラスにて作成した。

b) ヒアルロニダーゼ処理によるパラフィン切片の前処理

一次抗体としてAnti-Bovine basic FGF, type II (Upstate Biotechnology)を用いる場合には、過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼのブロッキング処理後に、以下のヒアルロニダーゼによる蛋白分解処理を行ない抗原性の賦活化を行なった。酢酸緩衝液にて2 mg/ml hyaluronidase Type IV-S (Sigma Chemical)溶液を作成し、標本と37℃にて15分間反応させた。0.01 Mリン酸緩衝生理食塩水pH 7.6 (phosphate buffer saline, 以下PBS)にて5分ずつ3回の洗浄を行った。

c) 免疫組織化学的染色

キシレン、エタノールによる脱パラフィン処理を行なった。3%過酸化水素水加メタノール中に切片を浸し、常温で10-20分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼブロッキング処理を行った。PBSにて5分ずつ3回の洗浄を行った。ブロッキング試薬II(正常ウサギ血清(M), 正常ヤギ血清(R))を常温、10分間反応させた。ブロッキング試薬IIを払い落とし、各々至適な濃度に調整した第一抗体を十分量、切片上に滴下した。陰性対照スライドとして、第一抗体の代わりに正常血清を滴下した。4℃で1晩反応させた。PBSにて5分ずつ3回の洗浄を行った。第二抗体を常温、10分間反応させた。PBSにて5分ずつ3回の洗浄を行った。酵素試薬を常温、10分間反応させた。PBSにて5分ずつ3回の洗浄を行った。0.01% 過酸化水素水加ジアミノベンチジンDAB溶液を切片上に滴下し発色反応を行い、顕微鏡で観察した。用いた一次抗体の条件は表2に示す。

d) 免疫組織化学的染色結果の判定基準

免疫組織化学的染色の結果は、陽性コントロールが染色され、陰性コントロールが染色されないことを確認した後、陰性(-)、陽性(+)、強陽性(++)の3段階、或いは陰性(-)、弱陽性(+), 陽性(+), 強陽性(++)の4段階で評価した。

c-Metについては、全く染色されないものを陰性(-)、背景に比し弱くではあるが染色されるもの、あるいは全細胞数の10%以下にのみ強い細胞質の染色性を認めるものを弱陽性(+), 全細胞数の10-50%に強い細胞質の陽性が確認されるものを陽性(+), 全細胞数の50%以上に強い細胞質の陽性が確認されるものを強陽性(++)と、4段階で評価した(図12,13,14)。核に陽性のもは共染と判断し評価から除外した。陽性コントロールとしては流産例の胎児組織を用いた。

HGFは全く染色されないものを陰性(-)、背景に比し弱くではあるが染色されるもの、あるいは全細胞数の50%以下にのみ明瞭な細胞質の染色性を認めるものを陽性(+), 全細胞数の50%以上に明瞭な細胞質の陽性が確認されるものを強陽性(++)と、3段階で評価した(図15,16,17)。核に陽性のもは共染と判断し

評価から除外した。陽性コントロールとしては流産例の胎児組織を用いた(39)。

FGFR1(FLG)は全く染色されないものを陰性(-)、背景に比し弱くではあるが染色されるもの、あるいは全細胞数の50%以下にのみ明瞭な細胞質の染色性を認めるものを陽性(+)、全細胞数の50%以上に明瞭な細胞質の陽性が確認されるものを強陽性(++)と、3段階で評価した(図18,19,20)。核に陽性のものは共染と判断し評価から除外した。陽性コントロールとしては子宮頸部扁平上皮を用いた(35)。

Basic-FGFについては、全く染色されないものを陰性(-)、背景に比し弱くではあるが染色されるもの、あるいは全細胞数の50%以下にのみ明瞭な細胞質の染色性を認めるものを陽性(+)、全細胞数の50%以上に明瞭な細胞質の陽性が確認されるものを強陽性(++)と、3段階で評価した(図21,22,23)。核に陽性のものは共染と判断し評価から除外した。陽性コントロールとしては皮膚組織を用いた(25)(35)。

6)ras遺伝子の突然変異およびras遺伝子産物に関する検索

a) 検体からのDNAの抽出と精製

外科的に摘出された検体は、 $1.0 \times 1.0 \times 0.5$ cm大までに細切し、OCTコンパウンドに包埋し、ドライアイスで冷却したアセトンで速やかに凍結後、使用までは -80°C に凍結保存した。検体は、クライオスタットにて6-10 mm厚の切片を50枚以上薄切し1.5mlチューブに採取した。同時に、4 mm厚の切片をスライドグラスにとり、HE染色を施行し、組織像の確認を行った(図24)。1.5mlチューブに採取した検体はイソジェンを1ml加え、十分に混和した。以下は、イソジェンのDNA抽出プロトコールに従って操作を行った。フェノールを加え、激しく混和した後、14000 rpmで15分間遠心操作を行った。検体から上清を採取、酢酸ナトリウムを加え、静かに転倒し混和した。エタノール沈殿、70%エタノールによる洗浄を行った。得られたDNAは、最終濃度 $0.2 - 0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように8mM NaOHで溶解した。DNAは吸光分析計でOD₂₆₀, OD₂₈₀の値を測定し、収量と純度の測定を行った。また、1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで発色し、比色により収量を確認した。

b) Nested PCR (polymerase chain reaction)によるras遺伝子の増幅

微量な検体からシーケンスを行うために、PCRによるras遺伝子の増幅を行った。

プライマー(primer)は、Janssenらの方法(37)を参考に一部改変した表6の配列のオリゴペプチドを用いた。プライマーは依託合成し、1回目のPCR反応に用いたouter primerはカラム精製品を、2回目のPCR反応およびシーケンス反応に用いたinner primerはHPLC精製品を使用した。通常の方法でpolymerase chain reaction (PCR)反応を行った。反応液は、10x reaction bufferを $2.5 \mu\text{l}$ 、dNTP($2.5 \text{ mM} \times 4$)を $1.0 \mu\text{l}$ 、sense primer ($4 \text{ pmol}/\mu\text{l}$)を $1.0 \mu\text{l}$ 、antisense primer($4 \text{ pmol}/\mu\text{l}$)を $1.0 \mu\text{l}$ 、Taq DNA polymerase ($8 \text{ U}/\mu\text{l}$)を $0.25 \mu\text{l}$ 、template DNA $\times \mu\text{l}$ ($50 - 100 \text{ ng}$ のDNAを含む)、さらに滅菌水を加え全量 $25.0 \mu\text{l}$ に調整した。10x reaction bufferおよびdNTP

mixtureは、TAKARA recombinant Ampli Taqキットに付属のものを使用した。反応液は十分混和後、軽く遠心をして、最後にミネラルオイルを滴下し検体を覆い、ホットスタートPCR法でサーマルサイクル反応を行った。サーマルサイクルの反応条件は、94℃で3分を1サイクル、続いて94℃で1分、60℃(Ki-rasについては55℃)で2分、72℃で3分を1サイクルとして35サイクル、反応を繰り返した。サーマルサイクル反応には、ASTECC program TEMP control system PC-700 (sci-media) またはTAKARA thermal cycler, TP 2000 (TAKARA)を使用した。

c) PCR産物の精製

得られたPCR産物は、8%アクリルアミドゲル(組成: 30%アクリルアミドストック溶液 2.7 ml, 蒸留水 6.3 ml, 10x TBE 1.0 ml, 10% APS 70 μ l, TEMED 7 μ l)を用い、電気泳動(電圧180Vにて18-24分間)を行い、目的とする分子量のバンドを切り出した(図25)。TE buffer(組成: 10mM Tris-HCl pH7.4 / 1 mM EDTA pH8.0)を用い37℃にて一晩溶出した。フェノール/クロロホルムによる抽出および精製を行い、エタノール沈殿の操作を行なった。得られた精製産物は、最後に至適な濃度となるように滅菌水にて溶解した。

d) ダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定

Sangerらのジデオキシ(dideoxy)法(71)に準拠したdideoxy terminator法の変法を用い、Applied Biosystems社のCATALYST 800を使用し、シーケンス反応を行なった。シーケンス反応は、蛍光色素でラベルしたジデオキシオリゴヌクレオチドを使用したDye Deoxy™ Terminator法で、サーマルサイクラーを用いるサイクルシーケンシング反応を行った。テンプレートはinner PCR精製産物の半量から全量を使用した。プライマーは、inner PCRと同じものを使用した。テンプレートに、3.2 p molのプライマーを加え、滅菌水で16 μ lに調節した。プレミックスとして、1サンプルあたり、5x TACS buffer 4 μ l, dNTP mix 1 μ l, Dye Deoxy Terminators 1 μ l, each, Ampli Taq (8U/ μ l) 0.5 μ l: total volume 9.5 μ lの組成で調節した。Applied Biosystems, CATALYST 800 Molecular Biology LabstationのTemintor法によるサイクルシーケンシングのプログラムを使用した。サイクルシーケンスの条件は、96℃にて30秒、50℃にて15秒、60℃にて4分を1サイクルとし、25サイクル繰り返した。得られたPCR産物は、過剰のddNTPを除去する目的で、フェノール/クロロホルムによる抽出および精製を行い、エタノール沈殿の操作を行った。Applied Biosystems社の373A DNA Sequencerを用いて、Full Scanのプログラムを施行した。精製産物は、ローディング用バッファにて溶解し、ヒートショック後にアプライした。ゲルの組成は指定のとおり7.5%アクリルアミドゲルを使用した。

e) ras遺伝子産物の免疫組織化学的染色

ras遺伝子の変異を検索した症例について、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、ras遺伝子産物の発現を免疫組織化学的に検索した。方法は5) a)c)と同様である。染色結果の判定基準は、全く染色されないものを陰性(-)、背景に比し弱くではあるが染色されるものを陽性(+)、強い細胞質の陽性が認められ

るものを強陽性(++)と3段階で評価した(図26)。核に陽性のものは共染と判断し、評価から除外した。陽性コントロールとしては膀胱組織を用いた。

7) データ解析

組織型分類および組織学的分化度分類の各群について、症例数、平均年齢および標準偏差、男女比、平均腫瘍径および標準偏差を算出し表にまとめた(表7)。癌についてはリンパ節転移および腺内転移の陽性例の百分率(%)を求めた(表7)。次に、各群別の細胞増殖因子に関する免疫組織化学的染色結果をクロス表にまとめた(表8-15)。組織学的分化度分類あるいは組織型分類と免疫組織化学的染色性の関連の有無を調べる目的でKruskal Wallis検定を行った。ras遺伝子の変異は、各群別の有無をクロス表にまとめた(表16)。各症例についてのras遺伝子の変異部位の詳細については表17にまとめた。また、ras遺伝子の変異の有無とras遺伝子産物の免疫組織化学的染色性との関係をクロス表にまとめた(表18)。両者の関連を調べる目的でMann Whitney-U検定を行った。

統計処理ソフトとして、Adacus Concepts社のStatView ver.4.0を用いた。

3. 結果

1) 病理組織学的分類と年齢、性、肉眼所見および転移について

対象とした検体の、病理組織学的分類、年齢、性、肉眼所見および転移についての検索結果を表7に示す。症例は241例、年齢は10才から88才、平均47.2歳であった。男性61例、女性180例、男女比は1:2.9であった。

組織学的には、乳頭癌149例(濾胞型乳頭癌4例を含む)、濾胞癌21例、未分化癌3例、髓様癌4例、濾胞腺腫39例、腺腫様結節19例、腺腫様甲状腺腫6例であった(図27)。濾胞上皮由来悪性腫瘍は分化度分類の結果、高分化癌148例、低分化癌22例、未分化癌3例であった(図28)。

年齢(歳)は、高分化癌 47.0 ± 15.4 (mean \pm SD)、低分化癌 55.4 ± 18.2 、未分化癌 56.7 ± 20.5 、髓様癌 49.3 ± 8.1 、濾胞腺腫 43.3 ± 18.0 、腫瘍様病変 45.9 ± 15.3 であった(図29)。癌については分化度が低下すると、年齢は高くなる傾向が認められた。

男女比は、高分化癌で1:3.5、低分化癌で1:2.1、未分化癌で1:0.5、髓様癌1:1、濾胞腺腫1:2.9、腫瘍様病変1:2.7であった。腫瘍全体としては女性の割合が高かった。癌については、分化度が低下すると、男性の割合が増加する傾向が認められた。

平均腫瘍径(cm)は、高分化癌 2.5 ± 1.8 (mean \pm SD)、低分化癌 3.6 ± 3.0 、未分化癌 13.5 、髓様癌 3.6 ± 2.2 、濾胞腺腫 3.4 ± 1.1 であった(図30)。癌については、分化度が低下すると腫瘍径の増大する傾向が認められた。

リンパ節転移の頻度は、高分化癌で78.8%、低分化癌で62.5%、未分化癌で100%であった(図31)。分化度との関連は認められなかった。一方、組織型別に分類すると、乳頭癌75.8%、濾胞癌40.0%と乳頭癌に多い傾向が認められた(図32)。

腋内転移の頻度は、高分化癌で29.5%、低分化癌で36.8%と低分化癌に高い傾向が認められた(図33)。一方、組織型別に分類すると、乳頭癌33.3%、濾胞癌4.8%と乳頭癌に高い傾向が認められた(図34)。

2)細胞増殖因子に関する免疫組織化学的染色の結果

c-Metの免疫組織化学的染色結果を表8および図12,13,14に示す。抗体は、ヒトc-Metの α 鎖を認識するポリクローナル抗体を用いた。陽性コントロールでは、細胞膜および細胞質内に顆粒状の陽性所見が得られた。高分化癌では、114例中41例(35.9%)が強陽性、50例(43.9%)が陽性、13例(11.4%)が弱陽性、10例(8.8%)が陰性であった。低分化癌では、19例中2例(10.5%)が強陽性、2例(10.5%)が陽性、12例(63.2%)が弱陽性、3例(15.8%)が陰性であった。未分化癌では、全例(3例中3例)陰性であった。一方、組織型分類では、乳頭癌は112例中39例(34.8%)が強陽性、45例(40.2%)が陽性、20例(17.9%)が弱陽性、8例(7.1%)が陰性であった。濾胞癌は21例中4例(19.1%)が強陽性、7例(33.3%)が陽性、5例(23.8%)が弱陽性、5例(23.8%)が陰性であった。髄様癌では、4例中3例(75.0%)が弱陽性、1例(25.0%)が陰性であった。濾胞腺腫では、31例中1例(3.2%)が強陽性、7例(22.6%)が陽性、16例(51.6%)が弱陽性、7例(22.6%)が陰性であった。腫瘍様癌は、19例中2例(10.5%)が強陽性、9例(47.4%)が陽性、7例(36.8%)が弱陽性、1例(5.3%)が陰性であった。背景の正常濾胞上皮は陰性であった。また、慢性甲状腺炎の組織像を示す症例では、リンパ濾胞に近接した好酸性の細胞質の豊かな再生性と考えられる上皮に強い陽性所見が認められた。

濾胞上皮由来の甲状腺癌について、組織学的分化度あるいは組織型とc-Metの免疫組織化学的染色性に関するKruskal Wallis検定の結果を表9-(a)、-(b)に示す。組織学的分化度との間には統計的に有意な関連が認められた($p=0.001$)。平均順位は高分化癌が75.0、低分化癌が38.8、未分化癌が8.0と高分化癌ほど順位が高かった。即ち免疫組織化学的発現が強い傾向が認められた。また、組織型との間にも統計的に有意な関連が認められた($p=0.002$)。平均順位は乳頭癌が73.0、濾胞癌が53.3、未分化癌が8.5と、乳頭癌が最も高かった。

そのリガンドであるHGFの免疫組織化学的染色結果を表10および図15,16,17に示す。抗体は、ヒトHGF α 鎖を認識するモノクローナル抗体を使用した。陽性コントロールでは、細胞質に顆粒状の陽性像が認められた。高分化癌では、146例中33例(22.6%)が強陽性、27例(18.5%)が陽性、86例(58.9%)が陰性であった。低分化癌では、19例中4例(21.0%)が強陽性、3例(15.8%)が陽性、12例(63.2%)が陰性であった。未分化癌では、3例中1例(33.3%)が陽性、2例(66.7%)が陰性であった。一方、組織型分類では、乳頭癌は144例中34例

(23.6%)が強陽性、27例(18.8%)が陽性、83例(57.6%)が陰性であった。濾胞癌は21例中3例(14.3%)が強陽性、3例(14.3%)が陽性、15例(71.4%)が陰性であった。髄様癌は、4例中2例(50.0%)は陽性、2例(50.0%)は陰性であった。濾胞腺腫では、39例中4例(10.3%)が強陽性、8例(20.5%)が陽性、27例(69.2%)が陰性であった。腫瘍様病変は、25例中3例(12.0%)が強陽性、5例(20.0%)が陽性、17例(68.0%)が陰性であった。背景の正常濾胞上皮は陰性であった。また間質血管壁に陽性所見が得られた。

濾胞上皮由来の甲状腺癌について、組織学的分化度あるいは組織型とHGFの免疫組織化学的染色性に関するKruskal Wallis検定の結果を表11-(a)、-(b)に示す。組織学的分化度との間には有意な関連は認められなかった($p=0.787$)。また、組織型との間にも有意な関連は認められなかった($p=0.419$)。

FGFR1(FLG)の免疫組織化学的染色結果を表12および図18,19,20に示す。抗体は、ヒトFGFR1を認識するモノクローナル抗体を使用した。陽性コントロールでは細胞膜および細胞質に顆粒状の陽性所見を認めた。高分化癌では、145例中74例(51.0%)が強陽性、46例(31.7%)が陽性、25例(17.3%)が陰性であった。低分化癌では、21例中5例(23.8%)が強陽性、5例(23.8%)が陽性、11例(52.4%)が陰性であった。未分化癌では、3例中1例(33.3%)が強陽性、2例(66.7%)が陰性であった。一方、組織型分類では、乳頭癌は145例中70例(48.3%)が強陽性、46例(31.7%)が陽性、29例(20.0%)が陰性であった。濾胞癌は21例中9例(42.9%)が強陽性、5例(23.8%)が陽性、7例(33.3%)が陰性であった。髄様癌では、4例中1例(25.0%)が強陽性、1例(25.0%)が陽性、2例(50.0%)が陰性であった。濾胞腺腫では、39例中4例(10.3%)が強陽性、10例(25.6%)が陽性、25例(64.1%)が陰性であった。腫瘍様病変は、25例中5例(20.0%)が強陽性、5例(20.0%)が陽性、15例(60.0%)が陰性であった。非腫瘍部濾胞上皮は大部分は陰性であったが、一部でまばらに陽性所見が認められた。

濾胞上皮由来の甲状腺癌について、組織学的分化度あるいは組織型とFGFR1の免疫組織化学的染色性に関するKruskal Wallis検定の結果を表13-(a)、-(b)に示す。組織学的分化度とFGFR1の免疫組織化学的染色性の間には統計的に有意な関連が認められた($p=0.002$)。平均順位は、高分化癌が91.1、低分化癌が55.9、未分化癌が57.3と高分化癌が他の2群に比し高く、免疫組織化学的発現が強い傾向が認められた。一方、組織型別では有意な関連は認められなかった($p=0.360$)。

そのリガンドであるbFGFの免疫組織化学的染色結果を表14および図21,22,23に示す。抗体は、ウシbFGFを精製したものを抗原としたモノクローナル抗体を使用した。この抗体は、ウシの他、ヒト、ラット、マウスのbFGFを認識する。陽性コントロールでは細胞質内に、顆粒状の陽性所見を認めた。Basic-FGFは、上皮基底膜、腫瘍間質および血管壁に強く陽性であった。高分化癌では、141例中70例(49.5%)が強陽性、14例(9.9%)が陽性、57例(40.5%)が陰性であった。低分化癌では、21例中7例(33.3%)が強陽性、4例(19.1%)が陽性、10例(47.6%)が陰性であった。未分化癌では、3例中1例(33.3%)が強陽性、2例(66.7%)が陰性であった。一方、組織型分類では、乳頭癌は142例中67例(47.2%)が強陽性、15例(10.5%)が陽

性, 60例(42.3%)が陰性であった。濾胞癌は20例中10例(50.0%)が強陽性, 3例(15.0%)が陽性, 7例(35.0%)が陰性であった。髄様癌では, 4例中1例(25.0%)が強陽性, 2例(50.0%)が陽性, 1例(25.0%)が陰性であった。濾胞腺腫では, 39例中24例(61.5%)が強陽性, 6例(15.4%)が陽性, 9例(23.1%)が陰性であった。腫瘍様病変は, 25例中15例(60.0%)が強陽性, 2例(5.7%)が陽性, 8例(32.0%)が陰性であった。非腫瘍部の正常濾胞上皮は基本的には陰性であったが, 一部で基底膜側に弱い陽性所見が認められた。

濾胞上皮由来の甲状腺腺腫について, 組織学的分化度あるいは組織型とbFGFの免疫組織化学的染色性に関するKruskal Wallis検定の結果を表15-(a), -(b)に示す。組織学的分化度との間には有意な関連は認められなかった($p=0.689$)。また, 組織型との間にも有意な関連は認められなかった($p=0.708$)。

3) ras遺伝子の突然変異およびras遺伝子産物の検索結果

ras遺伝子の突然変異の検索結果を表16, 17及び図35に示す。ras遺伝子は, codon 12, 13, および61に変異の起こる頻度が高いことが知られており, 検索した範囲でも同部に変異が集積していた。組織学的分化度分類で評価すると, 高分化癌としては17例中11例(64.7%)に変異が認められた。そのうち, 9例(52.9%)がアミノ酸置換を伴う変異であり, 2例(11.8%)はアミノ酸置換を伴わない変異であった。また, 5例では, 1検体で2ヶ所以上に変異が認められた。高分化癌の変異の内訳は, N ras codon 61の変異が最も多く認められた。N ras codon 61は, 正常配列はCAA(Gln)であるが, 6例にCCA(Pro), 1例にCTA(Leu)への変異が認められた。N ras codon 12, GGT(Gln)からGCT(Ala), AGT(Ser)への変異を各1例, Ha ras codon 13ではGGT(Gln)からAGT(Ser), GTT(Val)への変異を各1例, Ha-ras codon 61にCAG(Gln)からCTG(Leu), AAG(Lys)への変異が各1例, Ki-ras codon 13, GGC(Gln)からAGC(Ser)の変異を1例, GGA(Gly)への変異を2例に認めた。N ras codon 13には1例にGGT(Gln)からGGC(Gln), またHa ras codon 12には1例にGGC(Gln)からGGT(Gln), Ki-ras codon 13には1例にGGC(Gln)からGGT(Gln)と, 合計3例にアミノ酸置換を伴わない変異が認められた。低分化癌には3例中3例(100%)と全例にアミノ酸置換を伴う変異が認められた。その内訳は2例にN ras codon 61, CAA(Gln)からCTA(Leu)へ, 1例がHa ras codon 12, GGC(Gln)からGAT(Asp)へ, 1例がHa ras codon 13, GGT(Gln)からAGC(Ser)へ, 1例がKi-ras codon 13, GGC(Gln)からGTC(Val)への変異が認められた。そのうち2例は1検体について2ヶ所に変異が認められた。

一方, 組織型分類で評価すると, 濾胞癌は4例中2例(50.0%)にアミノ酸置換を伴う変異が認められた。乳頭癌では16例中12例(75.0%)に変異が認められ, 10例(62.5%)はアミノ酸置換を伴う変異であったが, 2例(12.5%)はアミノ酸置換を伴わない変異であった。

良性腫瘍である濾胞腺腫には5例中2例(40.0%)にアミノ酸置換を伴う変異が認められ, そのうち1例には2ヶ所に変異が認められた。2例はN ras codon 61, CAA(Gln)からCTA(Leu)への変異が認められた。Ha ras

codon 13, GGT(Gln)からAGT(Ser)へ, Ha ras codon 61, CAG(Gln)からCTG(Leu)への変異が各1例に認められた。検索した全ての腫瘍でKi ras codon 12, Ki ras codon 61に変異は認められなかった。

pan-rasの免疫組織化学的染色結果を表17, 18および図26に示す。3種のras遺伝子産物を認識するモノクローナル抗体を用いた。陽性コントロールは細胞質内に顆粒状の陽性所見が認められた。高分化癌では、16例中8例(50.0%)が強陽性、6例(37.5%)が陽性、2例(12.5%)が陰性であった。低分化癌では、3例中3例(100%)が陽性であった。検索した髄様癌は陰性であった。濾胞腺種は、4例中1例(25.0%)は強陽性、3例(75.0%)は陽性であった。非腫瘍部の濾胞上皮にも、散在性に種々の程度の陽性所見が認められた。

また、ras遺伝子の変異の有無とpan-rasの免疫組織化学的染色性に関するMann-Whitney-U検定の結果を表19に示す。両者の間には、有意な関連は認められなかった($p=0.517$)。

4. 考察

甲状腺癌は一般に予後良好な癌であるが、時に急速な経過をたどり死亡する症例があり、悪性化を規定する因子の解明が待たれている。一方、甲状腺腫瘍は組織学的分類が予後と良く相関する腫瘍としても有名である。しかし、甲状腺腫瘍の組織学的分類には、癌の悪性度の評価、或いは濾胞腫瘍での良悪性の鑑別等の点でいまだ問題点が残されている。これまでに、癌の悪性度は乳頭癌、濾胞癌、未分化癌の順に転移、浸潤の頻度が高く予後不良であることが臨床的研究から判明しており、細胞学的所見を重んじた分類が主流を占めてきた。しかし、一般に乳頭癌、濾胞癌が10年生存の期待できる予後良好な癌であるが、未分化癌は殆ど全ての症例が発見から半年から1年以内の経過で死に至る非常に予後の悪い癌であり、臨床的には予後の点から極端な違いが認められる(48)(68)。Sakamotoらは予後の良好な癌である乳頭癌と濾胞癌に、高分化癌、低分化癌の組織学的分化度による分類を提唱し、高分化癌と未分化癌の中間的存在としての低分化癌の概念を導入した(70)。分化度分類は臨床並びに病理学的に予後因子との相関が認められることが明かとなり、1988年の甲状腺癌取扱規程分類にも、亜分類という形で取り入れられ(90)、臨床的にも重要な分類であると注目されている。

本研究では、まず第一に年齢、性別、最大腫瘍径、リンパ節転移の有無、腺内転移の有無を臨床並びに病理学的予後因子として、組織学的分化度との関連を検証した。その結果、分化度の低下に伴って、高齢、男性の割合の増加、腫瘍径の増大、腺内転移の頻度の増加傾向が認められた。一般に、臨床的なハイリスクグループとして、高齢、男性であることが知られているが、本研究の結果もこれを支持するものであった。腫瘍径の増大、腺内転移の頻度の増加は、腫瘍の悪性化を反映していると考えられ、これらの因子と組織学的分化度は良く相関することが明かとなった。これらの結果は、Sakamotoらの論文とほぼ同様であった(70)。本研究では、リンパ節転移の頻度は、分化度との相関は認められなかった。一方、組織型分類で

は、リンパ節転移は濾胞癌に比し乳頭癌に多く認められた。リンパ節転移は、癌の悪性度の指標の1つであるが、組織学的分化度だけでは、全てを説明することが困難であり、分化度と組織型の併記の必要性が示唆された。

細胞増殖因子は、多くの腫瘍で増殖、進展、浸潤あるいは組織型との関連が知られており、ある種の癌の悪性化に関与している可能性が報告されている(1)(77)。本研究では、細胞増殖、細胞運動性亢進、形態形成、器官再生或いは組織修復の過程で重要かつ多様な作用を有する肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (HGF) およびそのレセプターであるc-Metの甲状腺腫瘍における発現と局在を免疫組織化学的に検索した。また、組織修復あるいは腫瘍化の際に発現が亢進することが報告されており、甲状腺は高発現臓器の一つである線維芽細胞増殖因子、特に塩基性線維芽細胞増殖因子basic-fibroblast growth factor(basic-FGF)とその高親和性レセプターである線維芽細胞増殖因子レセプター-1 fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1)の甲状腺腫瘍における発現および局在を免疫組織化学的に検索した。

met 癌遺伝子は、ヒト骨肉腫細胞株であるHOS細胞をMNNG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine)で処理した培養細胞のトランスフォーム遺伝子として発見された(10)。そのプロト型癌遺伝子であるc-metはチロシンキナーゼドメインを有することが知られていた(63)。その後、c-met癌原遺伝子産物は、HGF/SFのレセプターであることが判明した(7)。c-met癌原遺伝子産物は50 kDaの α 鎖と145 kDaの β 鎖よりなり、成熟型は190 kDaの $\alpha\beta$ ヘテロ二量体である。チロシンキナーゼドメインは β 鎖のC末端側、即ち細胞質内に存在する。c-Metのシグナル伝達系としては、Ash/GRB2を経てras, Raf, MAPK, MAPKK, MAPKKKから細胞増殖に作用する経路や、PLC- γ , rhoを介し、細胞骨格に作用し細胞運動性に関与する経路などが知られている。一方、肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (HGF)は、1984年Nakamuraらによって肝細胞の強力な増殖促進因子として発見、精製、分子クローニングがされ(58)(59)、その後、HGFは上皮細胞の分散性や運動性を亢進させる因子として知られていたScattered factor(SF)と同一の分子であることが判明した(81)。HGFは82-85 kDaの蛋白質で、69 kDaの α 鎖と34 kDaの β 鎖からなるヘテロダイマー分子である。 α 鎖には4個のクリングドメインが存在している。HGF遺伝子は、全長約70 kbであり18個のエクソンからなっている(59)。HGF遺伝子の座位はヒトでは7番染色体長腕(7q21)に決定されている。c-met遺伝子の座位も7番染色体長腕上(7q31)に決定されている。HGFは、肝細胞のみならず様々な細胞の増殖促進作用、抗腫瘍作用、細胞運動性亢進作用、さらに形態形成誘導因子としての活性を持つ、多様で重要な作用を有する増殖因子であることが明らかとなってきた(8)(56)(60)(69)(73)(80)。HGFは線維芽細胞、血球系細胞、血管内皮細胞など主に中胚葉由来の間葉系細胞から産生されている。HGFの活性の中に、細胞増殖促進作用、細胞運動性亢進作用があることから、消化器などの腫瘍の悪性化、浸潤性との関連が検討されている(44)。正常甲状腺は、c-met mRNAが高レベルに発現しているが、c-Met産物はwestern blot法では検出されていない

(12)(66). In vitroの実験では、HGFはイヌ甲状腺初代培養細胞に対して細胞増殖作用及び細胞分散作用があることが報告されている(16). di Renzo MFらによると、ヒト甲状腺癌ではc-met mRNAの増幅は、乳頭癌と低分化癌に70%、濾胞癌に25%認められ、未分化癌、髄様癌では増幅が認められず、また正常甲状腺や良性病変ではc-met mRNAの増幅は認められなかった(12)(13). また、そのリガンドであるHGFの甲状腺組織での発現は検出されていない(88).

本研究の免疫組織化学的検索では、c-Metは、正常濾胞上皮では陰性で、良性腫瘍、悪性腫瘍ともに腫瘍細胞に陽性であり、c-Metの発現が腫瘍化と関連があることが示唆された。また、腫瘍に慢性甲状腺炎の組織像を合併していた症例では、炎症の強い部分に見られる好酸性の豊かな細胞質をもつ濾胞上皮細胞に強い陽性所見が認められた。このことから、c-Metは腫瘍化だけでなく、炎症などの細胞障害に対する反応の際にも、強く発現することが示唆された。c-Metは悪性腫瘍では高分化癌で陽性率が高く、低分化癌、未分化癌と分化度が低いと陽性率も低い傾向が認められ、統計的に有意な関連が認められた($p=0.001$)。このことは、一見、腫瘍の悪性化と相反する結果のようであるが、c-Met/HGF系の多様な作用を考慮すると、細胞増殖作用だけでなく、抗腫瘍作用、分化誘導作用或いは形態形成作用などが腫瘍の悪性度に関与している可能性があり、分化度と関連することは非常に興味深い知見であると思われる。本研究では、癌の組織学的分化度とc-Metの発現の変化との間に関連が認められたことから、分化度分類は生物学的特性を反映していると考えられた。組織型で分類すると、乳頭癌が最も高率かつ強く染色され、濾胞癌、未分化癌では低い傾向があり、統計的に有意な関連が認められた($p=0.002$)。c-Metの免疫組織化学的発現は組織型にも関与することが示唆された。特に乳頭癌で高率であったことは、これまでの報告と一致する結果であった。

一方、そのリガンドであるHGFは、腫瘍細胞自身に関しては全体に発現が弱く、また分化度による有意差は認められなかった。また、組織型との有意な関連は認められなかった。HGFは腫瘍血管壁あるいは非腫瘍部の血管壁に陽性所見が認められた。この結果から、甲状腺腫瘍におけるHGF/c-Metの系では、HGFは腫瘍細胞以外の血管内皮細胞などで産生される可能性が考えられた。この結果は、Zarnegar Rらの報告で、甲状腺濾胞上皮からHGFの産生が認められなかったことと一致している(88)。しかし、人体材料を用いた研究の限界として、免疫組織化学に用いた抗体の感度が不良である(特にパラフィン切片)、或いは検体でのHGFの保存状態が不良である(古い症例では陽性率が著しく低い)などの人工的な偏りの可能性は完全に否定できないため、今後northern blot, in situ hybridizationなどの方面からの検索が必要と考えられた。

線維芽細胞増殖因子 fibroblast growth factor (FGF)は、近年多くの遺伝子がファミリーを形成していることが明かになり、少なくとも9つのメンバーが存在していることが知られている(52)。そのプロトタイプは血

管新生因子として同定された塩基性線維芽細胞増殖因子basic fibroblast growth factor (basic FGF, bFGF), 酸性線維芽細胞増殖因子acidic fibroblast growth factor (acidic FGF, aFGF)の二つである(20)(26)。aFGF, bFGFは分子量約18 kDaの一本鎖ペプチド分子で、aFGFの等電点は4.0-5.0, bFGFは9.0である。免疫組織化学的検査では、全身に広範に分布しており殆どの臓器の上皮の基底膜及び血管に発現が確認されている(27)(35)。また、血管内皮細胞からはbFGFの産生が認められている。また、幾つかの癌細胞株の培養上清中にはaFGF, bFGFの存在が認められている。FGFの主な作用として細胞増殖促進作用、分化誘導作用、血管新生作用、細胞外マトリックス改変作用、造血系に対する作用などが知られている。aFGF, bFGFは古典的なエキソサイトーシス以外の機構で細胞外に分泌されると考えられている。細胞外に分泌されたFGFは、プロテオグリカン、ヘパリン、ヘパラン硫酸分子に結合して保護、貯蔵されそこから遊離することで活性型FGFとなり受容体に結合すると考えられている(75)。一方、FGF受容体はこれもファミリーを形成しており、5種の遺伝子を異にするFGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGFR5が知られている(52)。ヒトFGFRの場合、ファミリー間の相同性は55%以上であり、また種を越えてよく保存されている。共通する基本構造は、細胞外に3つの免疫グロブリン様ドメインを持ち、細胞内にチロシンキナーゼ領域を有する。リガンドの種類とレセプターの多様性の間での微妙な特異性の相違が一部明らかにされつつある。ヒトFGFR1は822アミノ酸からなり、aFGF, bFGFの両者と親和性を持つ。FGFR1, FGFR2の活性化は、リガンドが細胞外部位に結合し、受容体の二量体化を形成することにより引き起こされる(75)。シグナル伝達にはPLC- γ , SH2蛋白質あるいはRaf-1, MAPKなどのカスケードの存在が推定されている。甲状腺は、FGFの高発現臓器の一つであり(25)(35)(51)。ブタ甲状腺培養細胞あるいはラット甲状腺培養細胞(FRTL-5)を用いた実験では、bFGFにより細胞増殖促進作用があることが証明されている(19)(49)。また、bFGFはFRTL-5細胞の甲状腺ホルモンの合成、代謝に関与することが示唆されている(79)。本研究では、最も基本的なFGFであるbasic FGFとその高親和性レセプターであるFGFR1の発現について、免疫組織化学的に検討した。

FGFR1は正常濾胞上皮では基本的に陰性であるが、良性腫瘍、悪性腫瘍共に陽性所見が認められ、腫瘍化に関与している可能性が示唆された。悪性腫瘍については、高分化癌で最も高率で強く発現しており、分化度が低いと、FGFレセプターの発現も低い傾向が認められ、統計的に有意な関連が得られた($p=0.002$)。一方、組織型による有意差は認められなかった($p=0.360$)。以上の結果からFGFR1の免疫組織化学的発現の面から見ると、組織学的分化度分類は組織型分類よりも良好な関連を示し、腫瘍の生物学的特性をよく反映している分類と考えられた。FGFR1のリガンドの1つであるbasic-FGFは、分化度または組織型のいずれにも関係なく腫瘍細胞の基底膜側、腫瘍間質および腫瘍血管壁に強く高率に陽性所見が認められた。この局在パターンからは、bFGFが間質の基質に取り込まれている像である可能性も考えられ、産生細胞の推定はできなかった。本研究の結果から、免疫組織化学的なFGFRの発現は甲状腺癌の分化度と関連して

おり、c-Metの発現パターンと類似していた。甲状腺癌においてはFGFの細胞増殖促進作用以外の何らかの作用が組織学的分化度に関与している可能性が推察された。甲状腺癌におけるFGF/FGFRの系では、bFGFは腫瘍細胞以外の細胞からの産生が主体である可能性が推察された。

ras癌遺伝子は、NIH3T3のtransfection assayのより初めて同定された癌遺伝子として有名で、ヒトでは3種類の高い相同性を有するras遺伝子、すなわちKi-ras, Ha-ras, N-rasが知られている。ras遺伝子は、様々な腫瘍で変異が検出されており、癌化、腫瘍の悪性化との関連が報告されている(3)。Ki-ras癌遺伝子はKirsten sarcoma virusから最初に発見され、ヒトでは12番染色体短腕上に存在している。Ha-ras癌遺伝子は、Harvey sarcoma virusから発見され、ヒトでは11番染色体短腕上に存在している。またN-ras癌遺伝子は、ヒト神経芽細胞腫のcDNAライブラリーからras関連遺伝子として発見され、1番染色体セントロメア近傍の短腕上に存在している。ras遺伝子産物(ras蛋白質、p21)は、21 kDaの大きさのGTP結合蛋白で、正常細胞ではGTPase活性を示し、細胞の増殖分化のシグナル伝達系で重要な役目を果たしている。ras遺伝子産物の上流にはチロシキナーゼ型レセプターリン酸/Ash/Grb2-SOS等が存在しており(18)、その下流にはRaf-1/MEK/MAPKの経路が知られている(57)。また、ある種の増殖因子のシグナル伝達系にはras遺伝子産物が関与することが知られている。ras遺伝子の変異により癌化する機構としては、GTPase活性の弱いmutant ras(onc-ras)蛋白の発現あるいは正常ras遺伝子産物の過剰発現により活性化ras-GTP結合蛋白の増加を引き起こし、細胞増殖のシグナルを恒常的に伝達し続けることで、細胞の悪性転化に関与していると言われている(50)。現在までに、多くの癌細胞でras遺伝子の点突然変異が知られている(6)。例えば、大腸癌、膵癌ではK-rasの点突然変異が高率に検出され、大腸では腺腫にも変異が検出されることから癌化の初期に関与していることが示唆されている。また、甲状腺では、in vivoの系で、活性化Rasによるtransform活性が示されている(65)。

甲状腺腫瘍では、甲状腺癌全体ではras遺伝子の点突然変異は10-60%に変異がみられるが、報告によりかなり差が見られる(33)(42)(43)(46)(61)(62)(76)(72)。一般に、濾胞癌で頻度が高く(0-100%)、特にHa-ras、N-ras codon 61の異常が多い。乳頭癌では濾胞癌よりは低いが、6-62%に認められている。また、濾胞癌、乳頭癌よりも、未分化癌で頻度が高い。しかし、腺腫様甲状腺腫、甲状腺腺腫にも、低頻度(33-46%)であるが同様の異常が報告されている。またras遺伝子の異常は、ヨード不足地域で高頻度である(72)。ラット化学誘発癌の甲状腺癌ではHa-rasが活性化されており(45)、一方、放射線照射後に発生するヒト甲状腺癌ではK-rasの異常が多いこと(82)などから、発癌因子の相違を反映している可能性が指摘されている。これまでの日本の報告では、ヨーロッパでの報告よりも変異は低頻度である。

本研究の結果では、甲状腺癌を組織学的分化度分類した場合、分化度の低下と共にras遺伝子変異は頻度が増加し、組織学的分化度は腫瘍の悪性度を反映していることが示唆された。一方、従来の組織型分類を

用いると、濾胞癌は50.0%、乳頭癌62.5%にアミノ酸置換を伴う変異が認められた。過去の報告よりも、高率に変異が検出され、特に乳頭癌では62.5%とかなり高率に変異が検出された。本研究では、nested PCR法からダイレクトシーケンス法を用いて検索しており、従来の報告でのoligonucleotide dot blot hybridization法よりも、検出感度、精度がともに高く、かつ材料として凍結検体を使用したため、パラフィン検体よりも核酸の保存状態が良好であったことが、高率の変異が検出された一つの要因として考えられる。一般にダイレクトシーケンス法は従来のサブクローニングを経るシーケンス法よりも複数クローンの配列を同時に解析できるため、検出感度が良好であると言われている。また、いままでの報告と同様に良性腫瘍である濾胞腺腫でも50%の症例で変異が認められており、腫瘍化の極く早期でも変異が起きている可能性が示唆された。このことは、組織学的に濾胞性腫瘍の良悪性の判断が困難であることと関連があると思われるが、逆に今まで良性と考えられていた濾胞腺腫は潜在的に悪性の性格を持っている可能性が考えられる。また、ras遺伝子の変異はそれ自身で腫瘍化或いは腫瘍の悪性化に関与しているほかに、腫瘍の増殖に伴う二次的な出来事である可能性も挙げられている。

現在までに、ras遺伝子産物は、正常甲状腺、良性腫瘍、悪性腫瘍の順に発現が強く、正常でもわずかに発現が認められると報告されている(41)(54)(87)。本研究では、腫瘍の組織型、或いは組織学的分化度とras遺伝子産物の免疫組織化学的染色性の間に関連は認められなかった。

ras遺伝子の変異とras遺伝子産物の免疫組織化学的発現の間には有意な関連は認められなかった。同じ傾向が、前立腺癌でも報告されている。他の癌遺伝子や癌抑制遺伝子(例えばp53遺伝子の変異とP53蛋白)では遺伝子変異と遺伝子産物の発現の間には関連があると報告されているが、ras遺伝子とras蛋白については、両者の関係は単純ではなく、免疫組織化学の結果の解釈の難しさを反映する結果であった。ras遺伝子産物は細胞内情報伝達系の一部を担っており、その発現の調節には、レセプター型チロシンキナーゼの活性化など多因子の関与が考えられた。

本研究では、ヒト甲状腺癌の組織学的分化度と、肝細胞増殖因子レセプターであるc-Met、線維芽細胞増殖因子レセプター-1、FGFR1の免疫組織化学的発現の間に関連が認められ、細胞生物学的な性格を反映している分類であることが明らかにされた。また、ras遺伝子の変異は、高分化癌に比し低分化癌で高率に認められ、分子生物学的側面からも分化度分類は癌の悪性度を反映していることが示唆された。

5. まとめ

甲状腺癌の組織学的分化度に関して、これまでの臨床及び病理学的検索に加え、細胞生物学的、分子生物学的側面からの検討を行う目的で、特に細胞増殖因子およびレセプターの発現とras遺伝子の変異に注目し、腫瘍の細胞生物学的な悪性度と組織学的分化度との関連の有無を検討した。

その結果、甲状腺癌における、肝細胞増殖因子レセプターであるc-met癌原遺伝子産物、または線維芽細胞増殖因子レセプター-1の免疫組織化学的検索では、腫瘍細胞に陽性に認められ、癌については分化度が低いと各々の発現は低率で弱くなる傾向があることが明らかとなった。この結果から、組織学的分化度分類はある種の生物学的特性を反映していることが示唆された。一方、組織型分類では、c-met癌原遺伝子産物の免疫組織化学的発現は乳頭癌で高く、濾胞癌、未分化癌で低い傾向が認められた。この結果は、従来の報告と一致しており、c-met癌原遺伝子産物の発現は乳頭癌の組織型形成にも関与する可能性が示唆された。線維芽細胞増殖因子レセプター-1に関しては、組織型分類では有意差は認められなかったが、分化度分類では有意な関連が認められ、この点において、より腫瘍の特性を反映している分類であることが示唆された。また、c-MetあるいはFGFR1は炎症の強い部分での発現が強く認められたことから、細胞障害の際の上皮の再生にも作用することが示唆された。これら増殖因子レセプターの甲状腺疾患での発現の意義については今後の検討課題であると考えている。またそのリガンドである肝細胞増殖因子、および線維芽細胞増殖因子は腫瘍細胞における発現はレセプターの陽性率に比し低く、腫瘍細胞以外の細胞から産生される可能性が示唆された。

ras遺伝子の点突然変異は、従来よりも高率に検出され、技術的にダイレクトシーケンス法の検出感度の良好さを反映していると考えられた。組織学的分化度が低いと変異の頻度は高い傾向があり、組織型分類よりも良く関連していた。

ras遺伝子の点突然変異とras遺伝子産物の免疫組織化学的な発現の間には関連は認められなかった。このことから、ras遺伝子産物の免疫組織化学的発現に関しては細胞内情報伝達に関わる複雑な相互関係を反映しているものと考えられた。

甲状腺癌については、組織学的分化度は、細胞生物学的、分子生物学的側面からも悪性度あるいは生物学的特徴をよく反映している分類であることが明らかとなり、今後ますます重要な位置を占めていくものと考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり貴重なご指導を賜りました東京大学医学部病理学教室、町並陸生教授並びに坂本穆彦助教授に深甚なる謝意を表します。また、PCR、シーケンス法に関してご教示いただいた東京大学医学部病理学教室、堀内啓先生並びに東京大学医科学研究所病理学研究室、矢持忠徳先生、免疫組織化学的染色に関してご指導いただいた東京大学医学部附属病院病理部、岡輝明先生、示唆に富むご意見を頂いた東京大学医学部病理学教室、石田剛先生、黒田雅彦先生並びに元井亨先生、貴重な症例を提供していただいた東京大学医学部附属病院病理部、松谷章司助教授、同第二外科学教室、馬場紀行先生、虎の門病院病理学科、原満部長、東京大学医学部病理学教室、鹿島健司先生、統計学的方面でご助言いただいた、東京大学医学部疫学生物統計学教室、小田英世先生、標本作製等にご指導、ご協力頂いた大平嘉一技師、福島のみ子技師及び原田伸一技官に感謝いたします。

6. 参考文献

1. Aaronson S A, Rubin J S, Finch P W, Wong J, Marchese C, Falco J, Taylor W G, Kraus M H (1990) Growth factor-regulated pathways in epithelial cell proliferation. *Am Rev Respir Dis* 142: S7- S10
2. Aasland R, Lillehaug J R, Male R, Josendal O, Varhaug J E, Kleppe K (1988) Expression of oncogenes in thyroid tumours: coexpression of c-erbB2/neu and c-erbB. *Br J Cancer* 57: 358-363
3. Barbacid M (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827
4. Baserga R (1994) Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 79: 927-930
5. Battaglia C, Berlingieri M T, Martelli M L, Trapasso F, Delli B P, Fusco A (1993) Mitogenic and dedifferentiating effect of the K-fgf/hst oncogene on rat thyroid PC clone 3 epithelial cells. *Cell Growth Differ* 4: 185-192
6. Bos J L (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682-4689
7. Bottaro D P, Rubin J S, Faletto D L, Chan A M, Kmieciak T E, Vande W G, Aaronson S A (1991) Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251: 802-804
8. Bussolino F, Di Renzo M, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffer A, Comoglio P M (1992) Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119: 629-641
9. Cheifetz R E, Davis N L, Robinson B W, Berean K W, LeRiche J C (1994) Differentiation of thyroid neoplasms by evaluating epithelial membrane antigen, Leu-7 antigen, epidermal growth factor receptor, and DNA content. *Am J Surg* 167: 531-534

10. Cooper C S, Park M, Blair D G, Tainsky M A, Huebner K, Croce C M, Vande W G (1984) Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311: 29-33
11. Di Carlo A, Mariano A, Pisano G, Parmeggiani U, Beguinot L, Macchia V (1990) Epidermal growth factor receptor and thyrotropin response in human thyroid tissues. *J Endocrinol Invest* 13: 293-299
12. Di Renzo M, Narsimhan R P, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio P M (1991) Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* 6: 1997-2003
13. Di Renzo M, Olivero M, Ferro S, Prat M, Bongarzone I, Pilotti S, Belfiore A, Costantino A, Vigneri R, Pierotti M A, Comoglio P M (1992) Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 7: 2549-2553
14. Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimura H, Mernyei M, Mori M, Oyama T, Machinami R (1993) Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 17: 375-381
15. Dobashi Y, Sugimura H, Sakamoto A, Mernyei M, Mori M, Oyama T, Machinami R (1994) Stepwise participation of p53 gene mutation during dedifferentiation of human thyroid carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 3: 9-14
16. Dremier S, Taton M, Coulonval K, Nakamura T, Matsumoto K, Dumont J E (1994) Mitogenic, dedifferentiating, and scattering effects of hepatocyte growth factor on dog thyroid cells. *Endocrinology* 135: 135-140
17. Duh Q Y, Grossman R F (1995) Thyroid growth factors, signal transduction pathways, and oncogenes. *Surg Clin North Am* 75: 421-437
18. Egan S E, Giddings B W, Brooks M W, Buday L, Sizeland A M, Weinberg R A (1993) Association of

Sos/Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation.

Nature 363: 45-51

19. Emoto N, Isozaki O, Arai M, Murakami H, Shizume K, Baird A, Tsushima T, Demura H (1991) Identification and characterization of basic fibroblast growth factor in porcine thyroids. *Endocrinology* 128: 58-64

20. Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Bohlen P, Guillemin R (1985) Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6507-6511

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

22. Farid N R, Shi Y, Zou M (1994) Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev* 15: 202-232

23. Feig L A, Schaffhausen B (1994) Signal transduction. The hunt for Ras targets. *Nature* 370: 508-509

24. Frauman A G, Moses A C (1990) Oncogenes and growth factors in thyroid carcinogenesis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 19: 479-493

25. Fu Y M, Spirito P, Yu Z X, Biro S, Sasse J, Lei J, Ferrans V J, Epstein S E, Casscells W (1991) Acidic fibroblast growth factor in the developing rat embryo. *J Cell Biol* 114: 1261-1273

26. Gimenez G G, Rodkey J, Bennett C, Rios C M, DiSalvo J, Thomas K (1985) Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science* 230: 1385-1388

27. Gonzalez A M, Buscaglia M, Ong M, Baird A (1990) Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *J Cell Biol* 110: 753-765

28. Gospodarowicz D (1974) Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249: 123-127

29. Hashimoto T, Matsumoto F, Mizukami Y, Miyazaki I, Michigishi T, Yanaihara N (1990) Tumor markers and oncogene expression in thyroid cancer using biochemical and immunohistochemical studies. *Endocrinol Jpn* 37: 247-254

30. Hedinger C (1988) *Histological Typing of Thyroid Tumours*. 2nd ed. WHO, Geneva

31. Heldin N E, Gustavsson B, Claesson-Welsh L, Hammacher A, Mark J, Heldin C H, Westermark B (1988) Aberrant expression of receptors for platelet-derived growth factor in an anaplastic thyroid carcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9302-9306

32. Hishinuma A, Yamamoto T, Kasai K, So S, Bamba N, Shimoda S (1994) Growth regulation of the human papillary thyroid cancer cell line by protein tyrosine kinase and cAMP-dependent protein kinase. *Endocr J* 41: 399-407

33. Horie H, Yokogoshi Y, Tsuyuguchi M, Saito S (1995) Point mutation of ras and Gsa subunit genes in thyroid tumors. *Jpn J Cancer Res* 86: 737-742

34. Hughes S E, Hall P A (1993) The fibroblast growth factor and receptor multigene families. *J Pathol* 170: 219-221

35. Hughes S E, Hall P A (1993) Immunolocalization of fibroblast growth factor receptor 1 and its ligands in human tissues. *Lab Invest* 69: 173-182

36. Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi T, Hayashi Y, Dohi K, Nakamura N, Akiyama M (1992) Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res* 52: 1369-1371

37. Janssen J W, Lyons J, Steenvoorden A C, Seliger H, Bartram CR (1987) Concurrent mutations in two different ras genes in acute myelocytic leukemias. *Nucleic Acids Res* 15: 5669-5680

38. Jasani B, Wyllie F S, Wright P A, Lemoine N R, Williams E D, Wynford-Thomas D (1990) Immunocytochemically detectable TGF-beta associated with malignancy in thyroid epithelial neoplasia. *Growth Factors* 2: 149-155

39. Jennische E, Ekberg S, Matejka G L (1993) Expression of hepatocyte growth factor in growing and regenerating rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 265: c122- c128

40. Johnson D E, Williams L T (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60: 1-41

41. Johnson T L, Lloyd R V, Thor A (1987) Expression of ras oncogene p21 antigen in normal and proliferative thyroid tissues. *Am J Pathol* 127: 60-65

42. Kaihara M, Taniyama M, Tadatomo J, Tobe T, Tomita M, Ito K, Ban Y, Katagiri T (1994) Specific PCR amplification for N-ras mutations in neoplastic thyroid diseases. *Endocr J* 41: 301-308

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

44. Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E (1992) Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 227-232

45. Lemoine N R, Mayall E S, Williams E D, Thurston V, Wynford-Thomas D (1988) Agent-specific ras oncogene activation in rat thyroid tumours. *Oncogene* 3: 541-544

46. Lemoine N R, Mayall E S, Wyllie F S, Williams E D, Goyns M, Stringer B, Wynford-Thomas D (1989)

High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 4: 159-164

47. Lemoine N R, Hughes C M, Gullick W J, Brown C L, Wynford-Thomas D (1991) Abnormalities of the EGF receptor system in human thyroid neoplasia. *Int J Cancer* 49: 558-561

48. LiVolsi V A (1990) *Surgical pathology of the thyroid*. W.B.Saunders, Philadelphia

49. Logan A, Black E G, Gonzalez A M, Buscaglia M, Sheppard M C (1992) Basic fibroblast growth factor: an autocrine mitogen of rat thyroid follicular cells? *Endocrinology* 130: 2363-2372

50. Lowy D R, Willumsen B M (1993) Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62: 851-891

51. Luqmani YA, Graham M, Coombes RC (1992) Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR1 and FGFR2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. *Br J Cancer* 66: 273-280

52. Mason IJ (1994) The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell* 78: 547-552

53. Matsuo K, Tang S H, Sharifi B, Rubin S A, Schreck R, Fagin J A (1993) Growth factor production by human thyroid carcinoma cells: abundant expression of a platelet-derived growth factor-B-like protein by a human papillary carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 996-1004

54. Mizukami Y, Nonomura A, Hashimoto T, Terahata S, Matsubara F, Michigishi T, Noguchi M (1988) Immunohistochemical demonstration of ras p21 oncogene product in normal, benign, and malignant human thyroid tissues. *Cancer* 61: 873-880

55. Mizukami Y, Nonomura A, Hashimoto T, Michigishi T, Noguchi M, Matsubara F, Yanaihara N (1991) Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor and c-myc oncogene product in normal,

benign and malignant thyroid tissues. *Histopathology* 18: 11-18

56. Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L (1991) Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67: 901-908

57. Moodie S A, Willumsen B M, Weber M J, Wolfman A (1993) Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260: 1658-1661

58. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A (1984) Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 1450-1459

59. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishino T (1987) Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *Febs Letters* 224: 311-316

60. Nakamura T, Matsumoto K (1994) Pleiotropic roles of HGF in mitogenesis, morphogenesis, and organ regeneration. In: T Nakamura and K Matsumoto, Monograph on cancer research. vol. 42. Japan Scientific Societies Press, CRC Press, Tokyo

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

62. Oyama T, Suzuki T, Hara F, Iino Y, Ishida T, Sakamoto A, Nakajima T (1995) N-ras mutation of thyroid tumor with special reference to the follicular type. *Pathol Int* 45: 45-50

63. Park M, Dean M, Kaul K, Braun M J, Gonda M A, Vande W G (1987) Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6379-6383

64. Pilotti S, Collini P, Del Bo R, Cattoretti G, Pierotti MA, Rilke F (1994) A novel panel of antibodies that segregates immunocytochemically poorly differentiated carcinoma from undifferentiated carcinoma of

the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 18: 1054-1064

65. Portella G, Ferulano G, Santoro M, Grieco M, Fusco A, Vecchio G (1989) The Kirsten murine sarcoma virus induces rat thyroid carcinomas in vivo. *Oncogene* 4: 181-188

66. Prat M, Narsimhan R P, Crepaldi T, Nicotra M R, Natali P G, Comoglio P M (1991) The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int J Cancer* 49: 323-328

67. Roberts A B, Sporn M B (1988) Transforming growth factor beta. . *Adv Cancer Res* 51: 107-145

68. Rosai J, Carcangiu M L, Delellis R A (1992) Tumors of the thyroid gland. In: J Rosai. Atlas of tumor pathology. vol. 5. Armed forces institute of pathology, Washington

69. Rubin J S, Chan A M, Bottaro D P, Burgess W H, Taylor W G, Cech A C, Hirschfield D W, Wong J, Miki T, Finch P W, Aaronson S A (1991) A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 415-419

70. Sakamoto A, Kasai N, Sugano H (1983) Poorly differentiated carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic entity for a high-risk group of papillary and follicular carcinomas. *Cancer* 52: 1849-1855

71. Sanger F, Nicklen S, Coulson A R (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467

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

73. Shima N, Nagao M, Ogaki F, Tsuda E, Murakami A, Higashio K (1991) Tumor cytotoxic factor/hepatocyte growth factor from human fibroblasts: cloning of its cDNA, purification and characterization of recombinant protein. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 1151-1158

74. Song B (1991) Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor receptor and ceruloplasmin in thyroid diseases. *Acta Pathol Jpn* 41: 336-343

75. Spivak-Kroizman T, Lemmon M A, Dikic I, Ladbury J E, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I (1994) Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* 79: 1015-1024

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

77. Tahara E, Yasui W, Yokozaki H (1993) Carcinogenesis and metastasis. The Second International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar, Hiroshima, Japan, June 1992. *J Cancer Res Clin Oncol* 119: 560-563

78. Tajima H, Higuchi O, Mizuno K, Nakamura T (1992) Tissue distribution of hepatocyte growth factor receptor and its exclusive down-regulation in a regenerating organ after injury. *J Biochem* 111: 401-406

79. Tang K T, Braverman L E, DeVito W J (1994) Effects of fibroblast growth factor on type I 5-deiodinase in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology* 135: 493-500

80. Uehara Y, Kitamura N (1992) Expression of a human hepatocyte growth factor/scatter factor cDNA in MDCK epithelial cells influences cell morphology, motility, and anchorage-independent growth. *J Cell Biol* 117: 889-894

81. Weidner K M, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, Birchmeier W (1991) Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7001-7005

82. Wright P A, Williams E D, Lemoine N R, Wynford-Thomas D (1991) Radiation-associated and

'spontaneous' human thyroid carcinomas show a different pattern of ras oncogene mutation. *Oncogene* 6: 471-473

83. Wynford-Thomas D (1993) Molecular basis of epithelial tumorigenesis: the thyroid model. . *Crit Rev Oncog* 4: 1-23

84. Yamashita H, Noguchi S, Murakami N, Tsuji K, Yamaoka N, Sakamoto A (1993) DNA ploidy and stromal bone formation as prognostic indicators of thyroid papillary carcinoma in aged patients: a retrospective study. *Acta Pathol Jpn* 43: 22-27

85. Yashiro T, Tsushima T, Murakami H, Obara T, Fujimoto Y, Shizume K, Ito K (1991) Insulin-like growth factor-II (IGF-II)/Mannose-6-phosphate receptors are increased in primary human thyroid neoplasms. *Eur J Cancer* 27: 699-703

86. Yashiro T, Arai M, Shizume K, Obara T, Murakami H, Hizuka N, Emoto N, Miyakawa M, Ito K, Tsushima T (1994) Increased activity of insulin-like growth factor-binding protein in human thyroid papillary cancer tissue. *Jpn J Cancer Res* 85: 46-52

87. Yoshida K, Hamatani K, Koide H, Ikeda H, Nakamura N, Akiyama M, Tsuchiyama H, Nakayama E, Shiku H (1988) Preparation of anti-ras Mr 21,000 protein monoclonal antibodies and immunohistochemical analyses on expression of ras genes in human stomach and thyroid cancers. *Cancer Res* 48: 5503-5509

88. Zarnegar R, Muga S, Rahija R, Michalopoulos G (1990) Tissue distribution of hepatopoietin-A: a heparin-binding polypeptide growth factor for hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1252-1256

89. Zou M, Shi Y, Farid NR (1993) p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1054-1058

90. 甲状腺外科検討会編 (1991) 外科病理甲状腺癌取扱い規約. (第4版) 金原出版, 東京

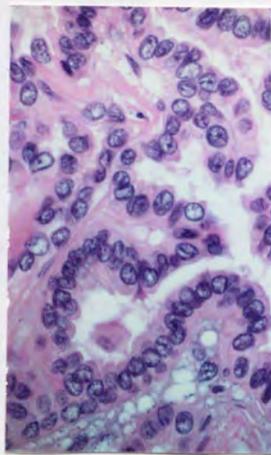
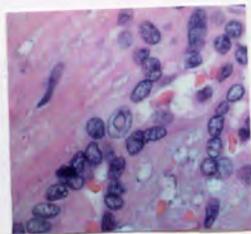
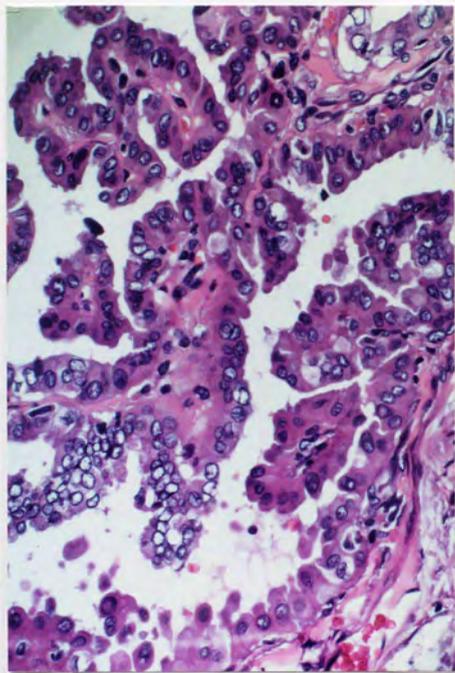


図1 高分化型乳頭癌：

左図：乳頭状構造を示す腫瘍。腫瘍細胞は特徴的なスリガラス核を呈する。
HE, x 400

右上図：核内細胞質封入体を示す。HE, x 530

右下図：腫瘍細胞の核の切込み(核溝)を示す。HE, x 530

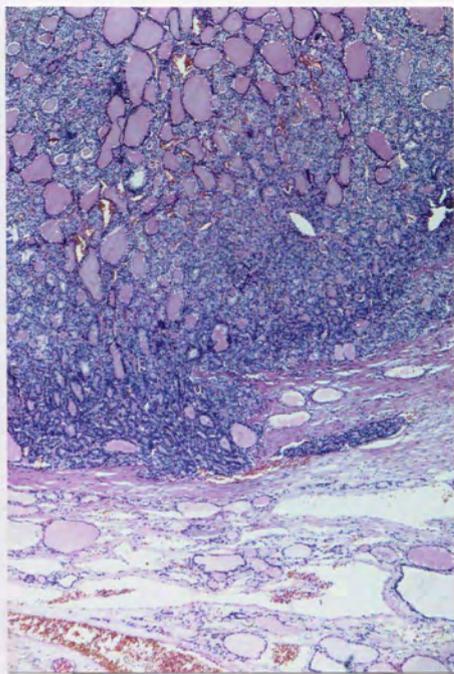


図2 高分化濾胞癌：
濾胞状構造を示す腫瘍。
線維性被膜を完全に貫通する浸潤部分を示す。
HE, x 50

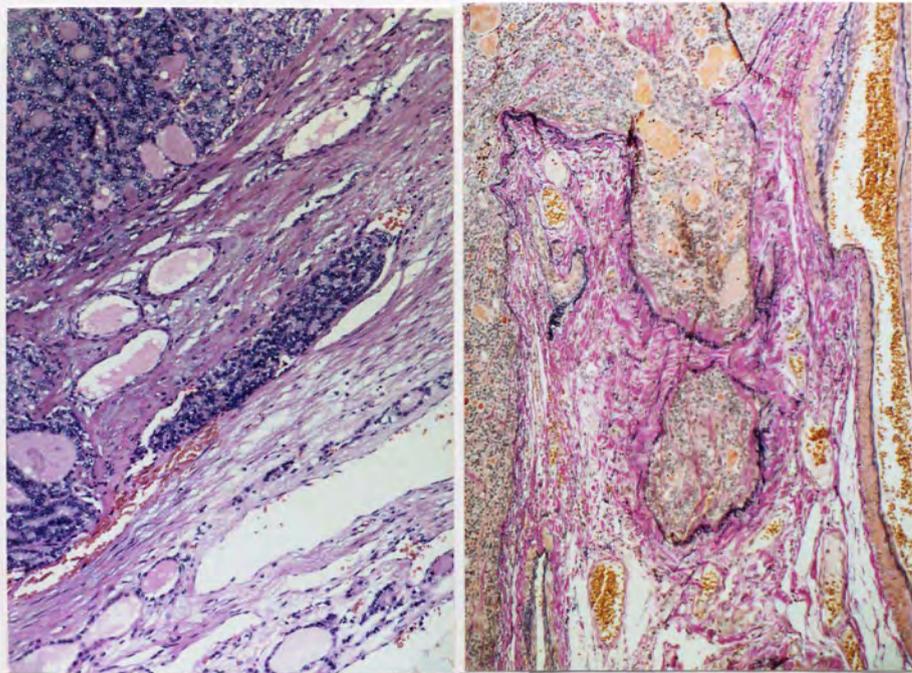


図3 高分化濾胞癌：
腫瘍細胞の核はヘマトキシレンに濃染する。腫瘍の血管侵襲部分を示す。
左図 HE, x 100, 右図 Elastica von Gieson, x 100

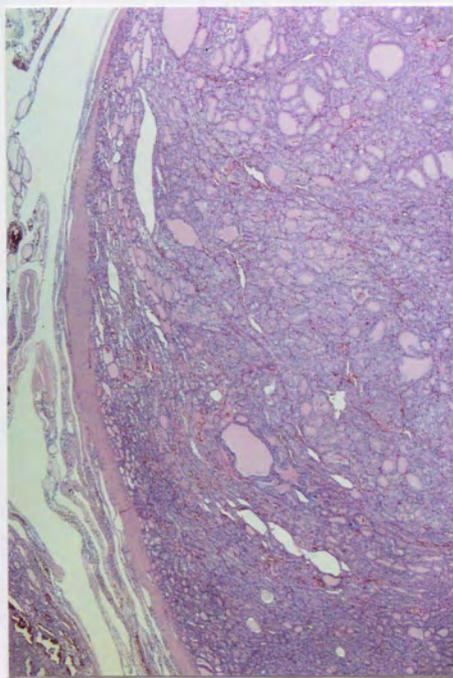


図4 濾胞腺腫：
線維性被膜に被包された濾胞構造を示す腫瘍。
被膜侵襲、血管侵襲はない。
HE, x10

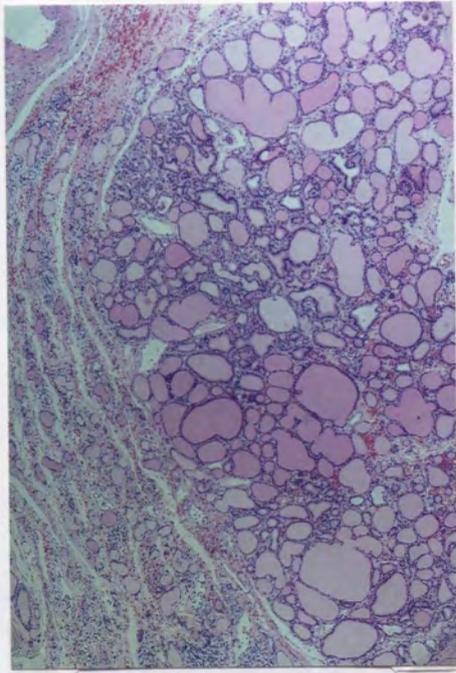


図5 腺腫様甲状腺腫：
被膜構造の認められない濾胞状構造を示す腫瘍。
HE, x50

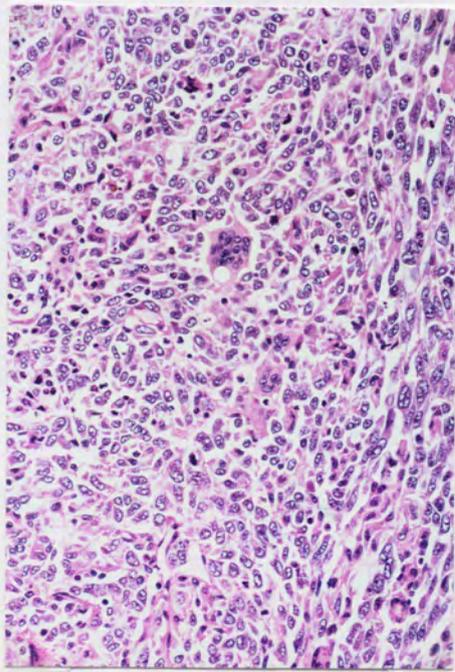


図6 未分化癌：
異型及び多形性の強い腫瘍細胞が増生し、多核の腫瘍巨細胞を認める。
HE, x200

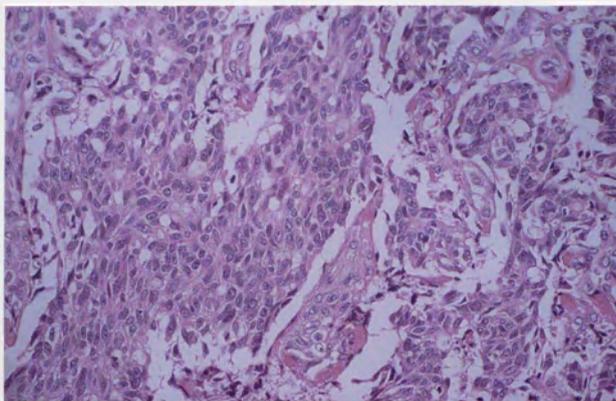


図7 髄様癌：
シート状、島状に増生する腫瘍。腫瘍細胞の細胞質は好酸性を示す。
HE, x200

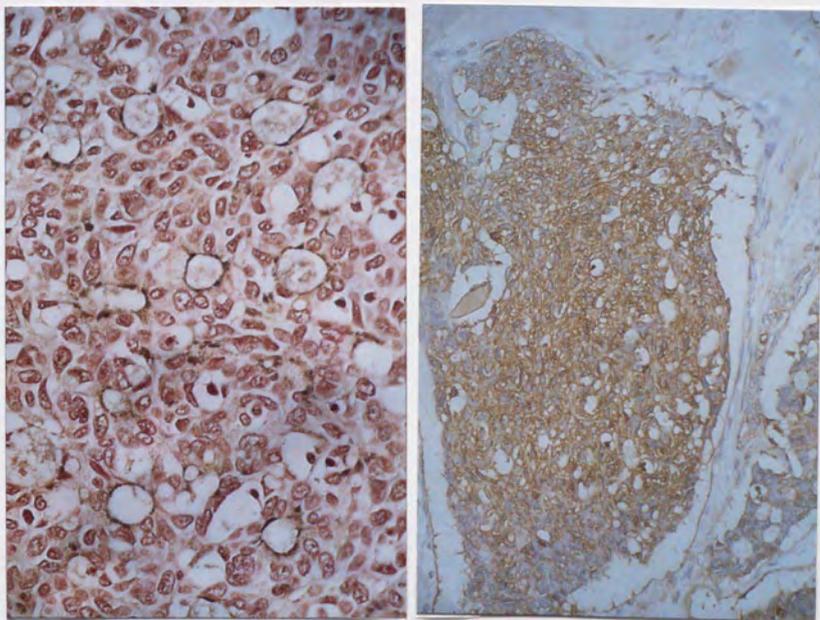


図8 髄様癌：

左図 腫瘍細胞は嗜銀性(Grimelius 染色陽性)を示す. x450

右図 カルシトニンの免疫組織化学的染色では腫瘍細胞に陽性. x450

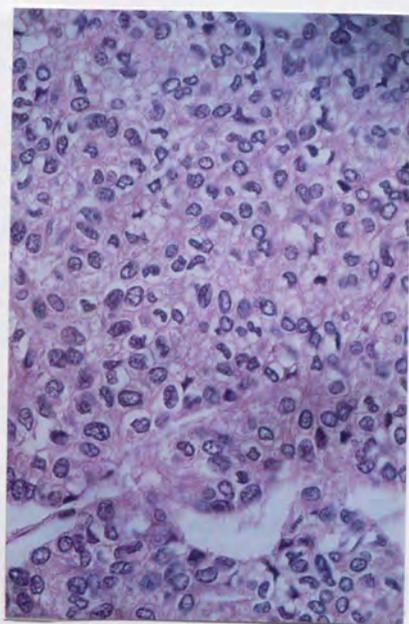
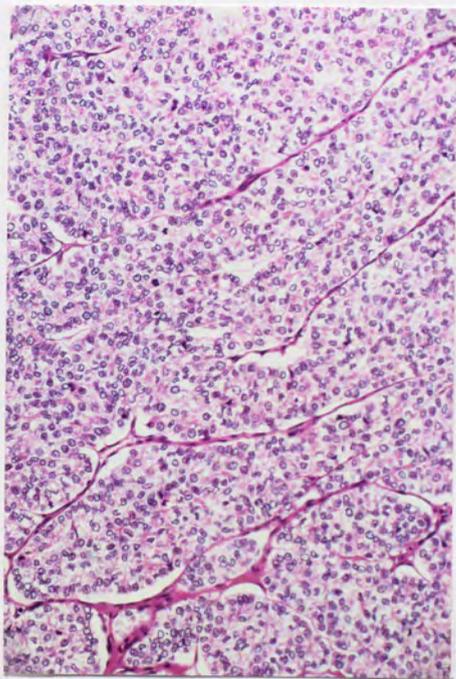


図9 低分化乳頭癌：

索状、胞巣状構造を示す腫瘍。HE, x180

腫瘍細胞は乳頭癌に特徴的なスリガラス核を呈する。HE, x450

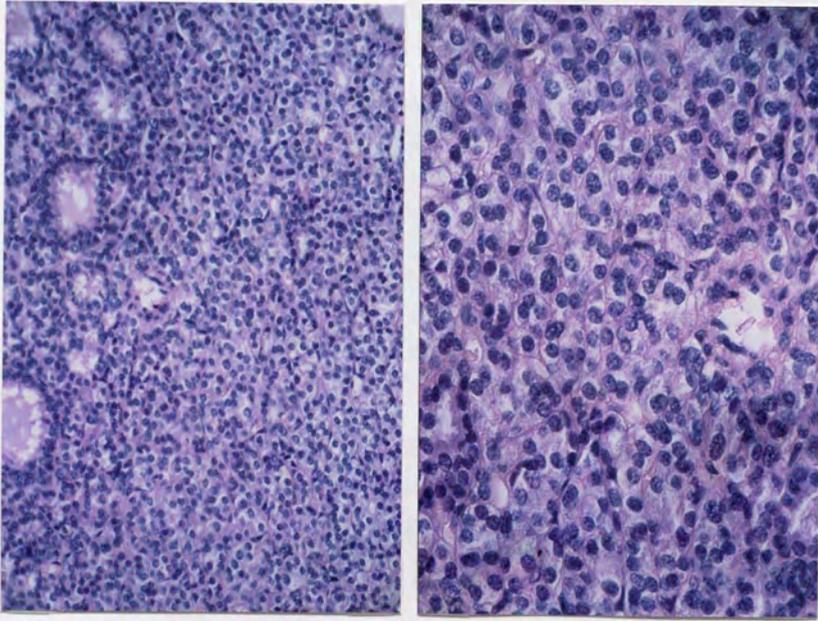


図10 低分化濾胞癌：
索状、充実性構造を示す腫瘍。HE, x 230
腫瘍細胞の核はヘマトキシレンに濃染する。HE, x 460

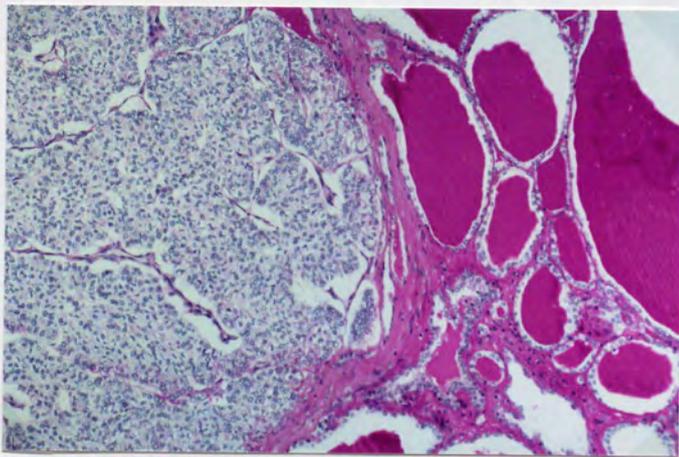


図 1 1 低分化癌：
腫瘍部分ではコロイド産生は認められない。右に示す正常濾胞部分には
PAS陽性のコロイドが認められる。
Periodic acid-Schiff, x 130

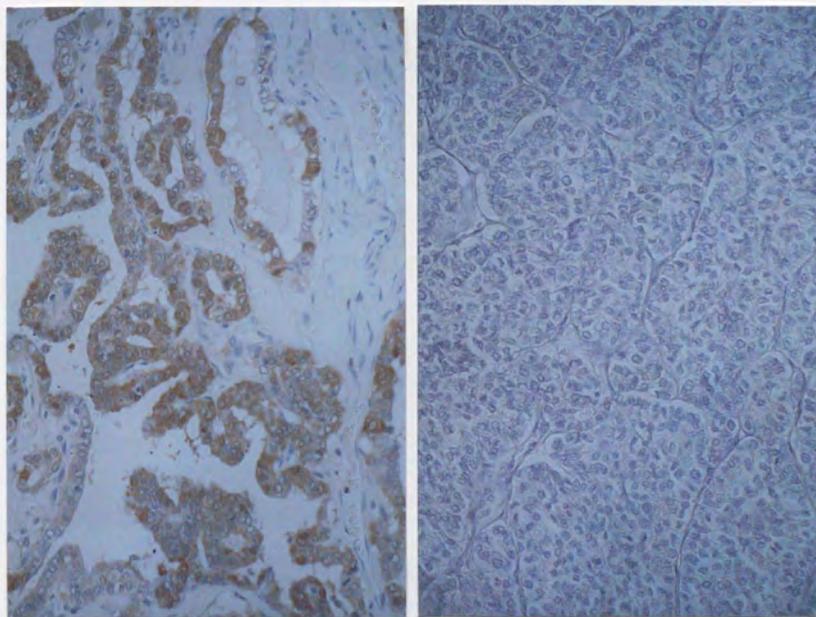


図 1 2 免疫組織化学的染色 c-Met

左図 高分化乳頭癌 ほとんどの腫瘍細胞に強く陽性である. (++) x230

右図 低分化乳頭癌 陰性. (-) x230

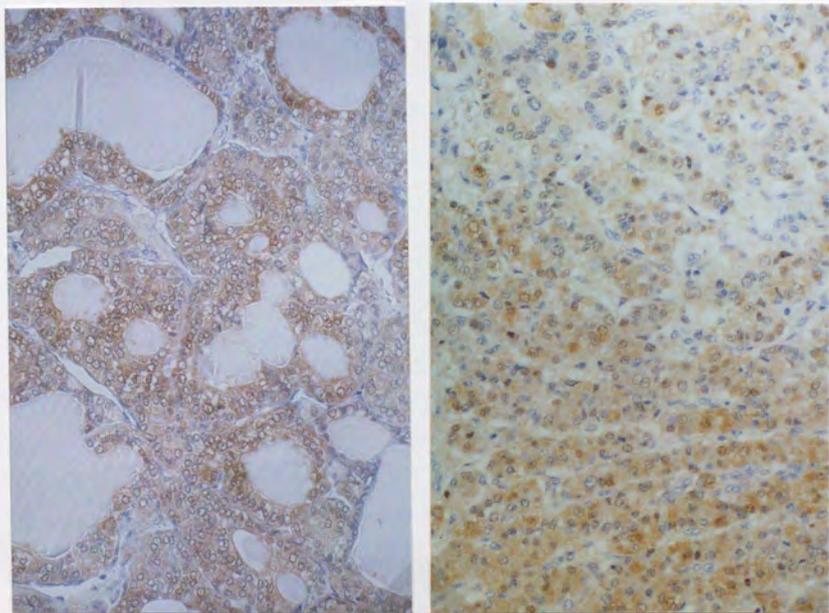


図13 免疫組織化学的染色 c-Met

左図 高分化濾胞癌 約70%の腫瘍細胞が陽性である。(++)x230

右図 低分化濾胞癌 約30%の腫瘍細胞が陽性である。(+)x230

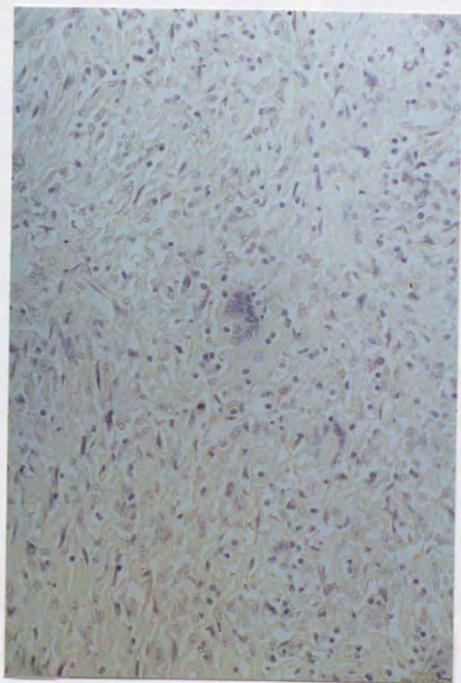


図14 免疫組織化学的染色 c-Met
未分化癌 腫瘍細胞が極く弱く陽性である. (+) x250

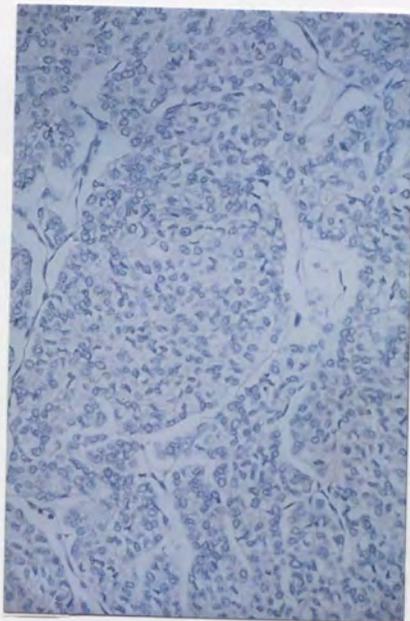
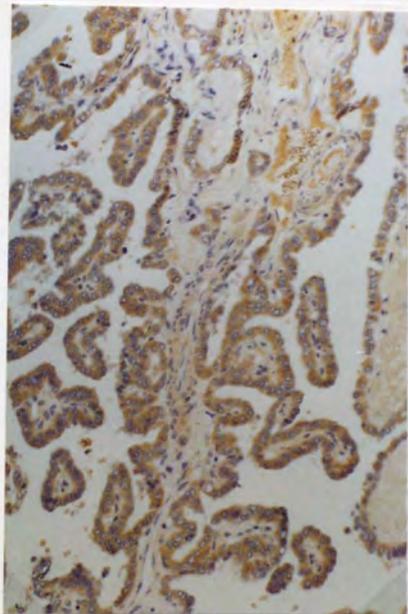


図15 免疫組織化学的染色 HGF

左図 高分化乳頭癌 ほとんどの腫瘍細胞が強陽性である。(++)x200

右図 低分化乳頭癌 陰性。(-)x230

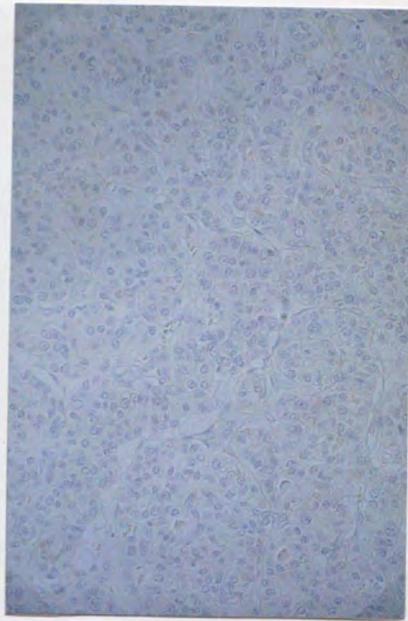
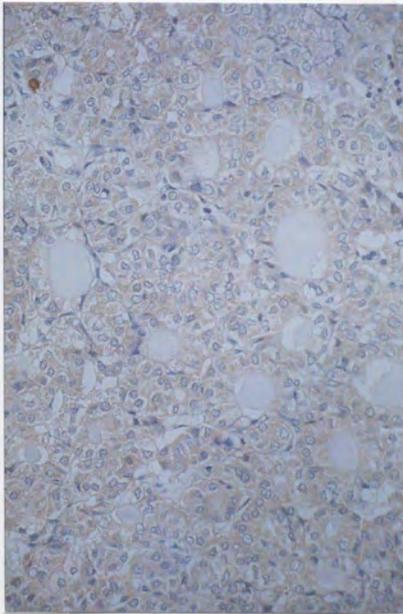


図16 免疫組織化学的染色 HGF

左図 高分化濾胞癌 腫瘍細胞に弱く陽性である. (+) x230

右図 低分化濾胞癌 陰性. (-) x230

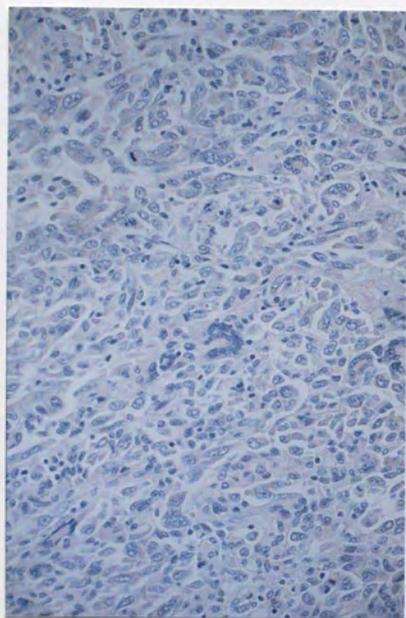


图 1 7 免疫組織化学的染色 HGF
未分化癌 陰性. (-) x230

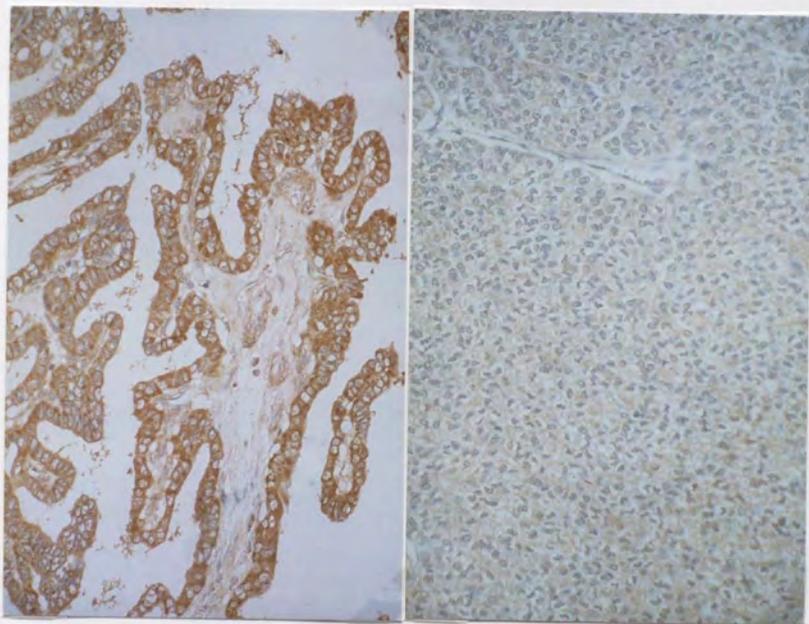


図18 免疫組織化学的染色 FGFR1
左図 高分化乳頭癌 ほとんどの腫瘍細胞が強陽性である。(++) x230
右図 低分化乳頭癌 腫瘍細胞が極く弱く陽性である。(+) x230

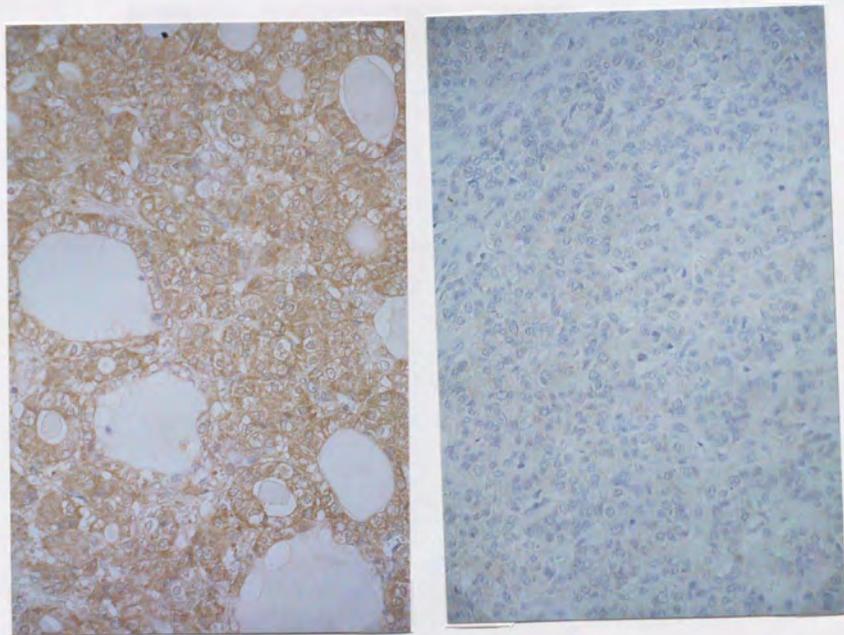


図 1 9 免疫組織化学的染色 FGFR1

左図 高分化濾胞癌 80%以上の腫瘍細胞が強く陽性である。(++) x230

右図 低分化濾胞癌 腫瘍細胞が極く弱く陽性である。(+) x230

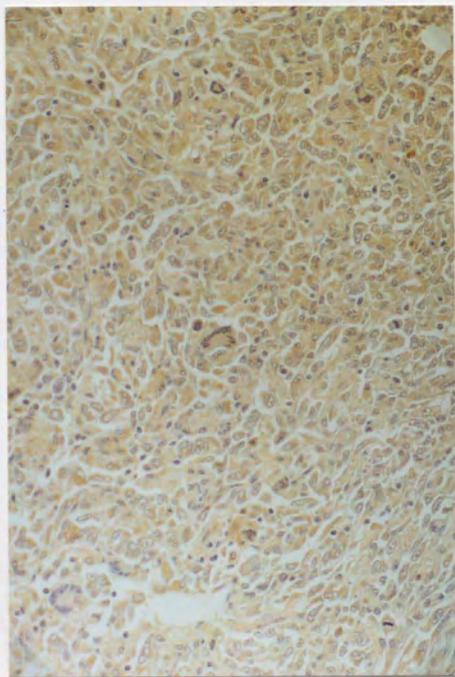


図 2 0 免疫組織化学的染色 FGFR1
未分化癌 ほとんどの腫瘍細胞に陽性である. (++) x260

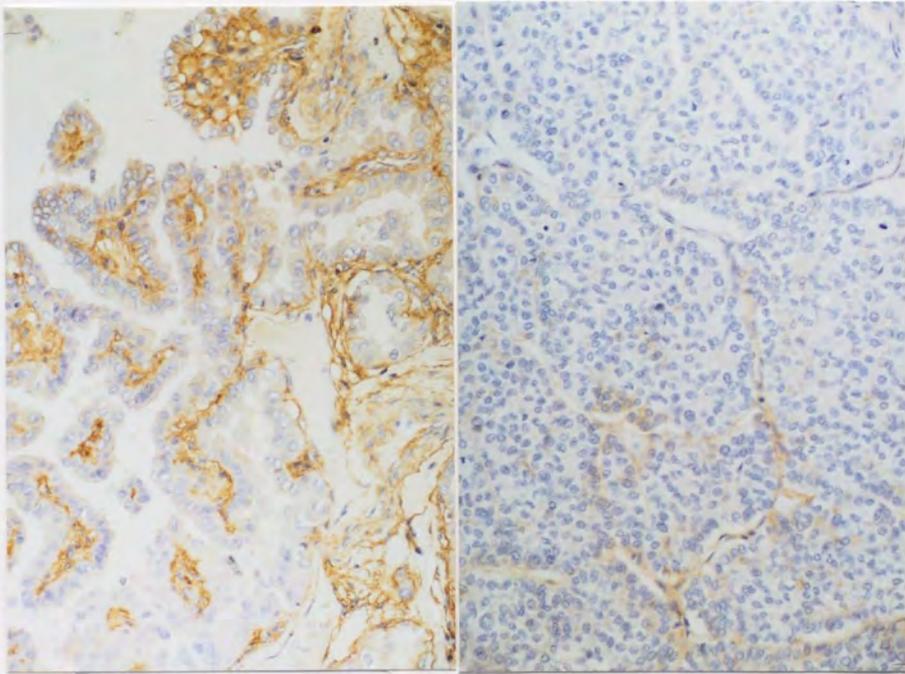


図 2 1 免疫組織化学的染色 basic FGF

左図 高分化乳頭癌

ほとんどの腫瘍細胞の基底膜側及び間質に強く陽性である. (++) x260

右図 低分化乳頭癌

約40%の腫瘍細胞の基底膜側及び間質に陽性である. (+) x260

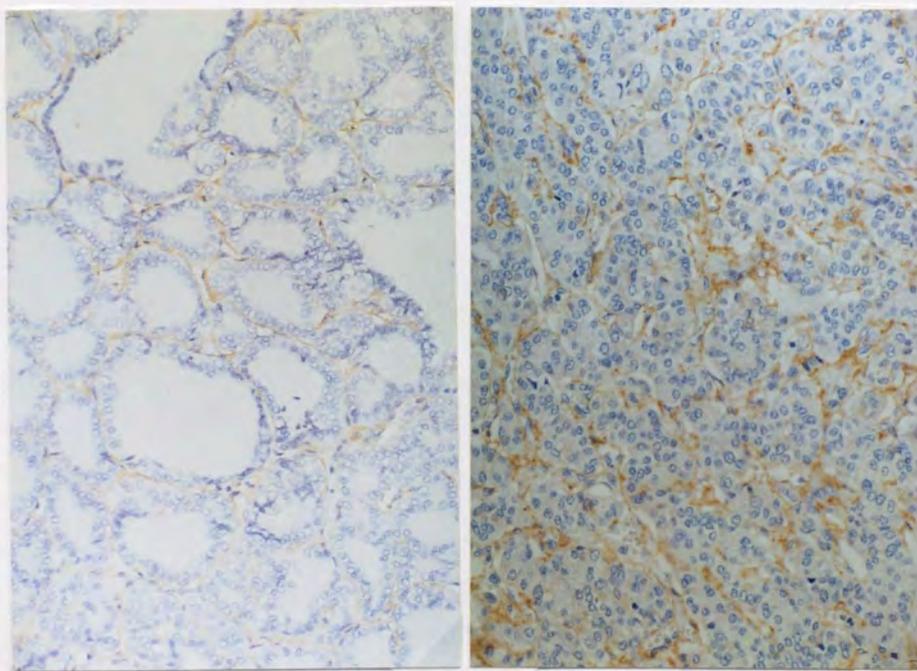


図 2 2 免疫組織化学的染色 basic FGF

左図 高分化濾胞癌

ほとんどの腫瘍細胞の基底膜側及び間質に弱く陽性である. (+) x200

右図 低分化濾胞癌

80%以上の腫瘍細胞の基底膜側及び間質に強く陽性である. (++) x260

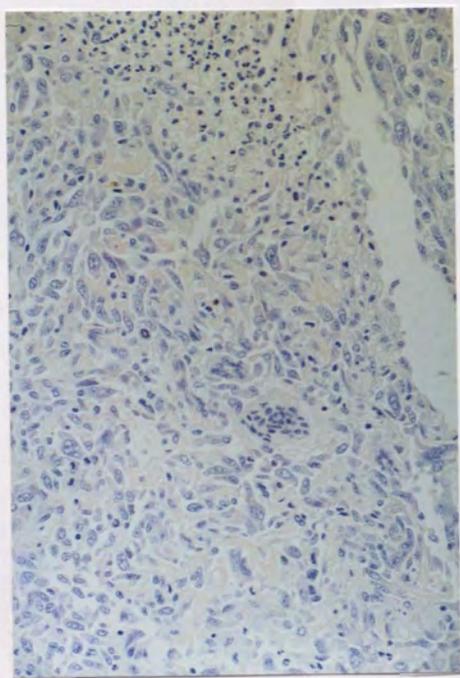


图 2 3 免疫組織化学的染色 basic FGF
未分化癌 陰性. (-) x260

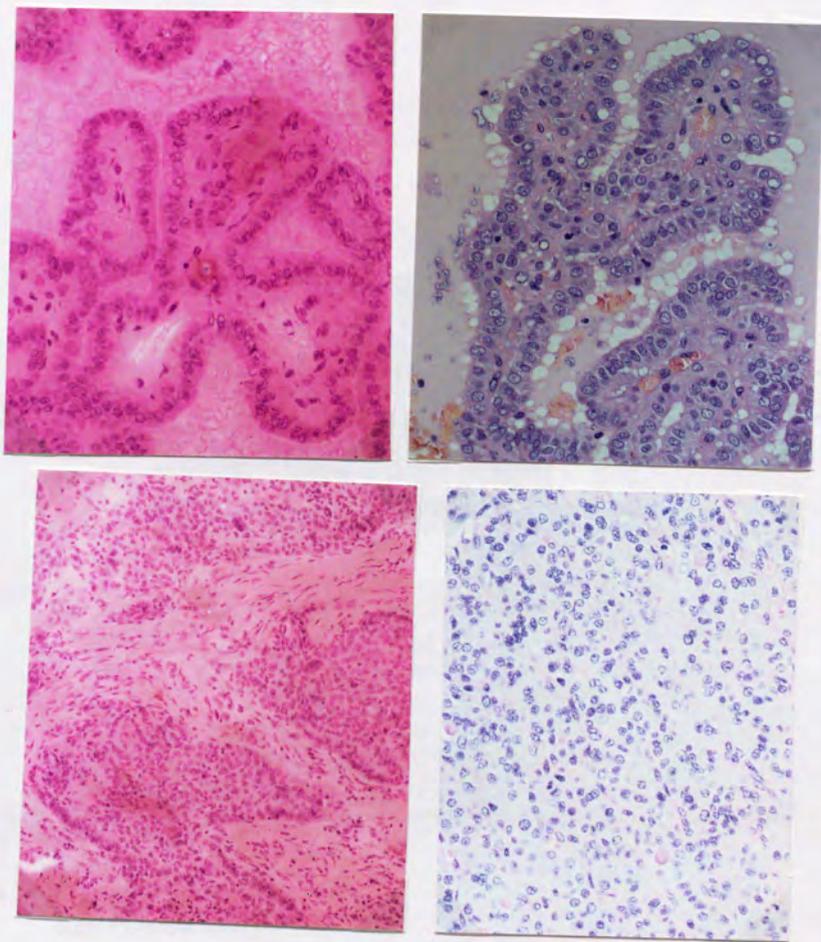


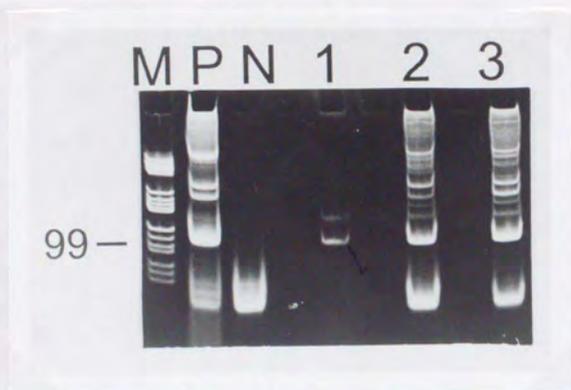
図 2 4 DNA抽出検体の組織像

左上 case 16の凍結標本組織像. HE, x 230

右上 case 16のパラフィン標本組織像. 高分化乳頭癌である. HE, x 230

左下 case 24の凍結標本組織像. HE, x 120

右下 case 24のパラフィン標本組織像. 低分化乳頭癌である. HE, x 230



M: Marker V
 P: Positive control (A431)
 N: Negative control (H₂O)
 1 : case 1
 2 : case 2
 3 : case 3

図 2 5 N ras (codon 61)の outer PCR

outer PCR産物を8%アクリルアミドゲルにて電気泳動した。
 症例 1、2、3および陽性コントロールのレーンには99 bpの高さに
 バンドが認められる。この部分を切り出して精製した。
 陰性コントロールにはバンドは認められない。

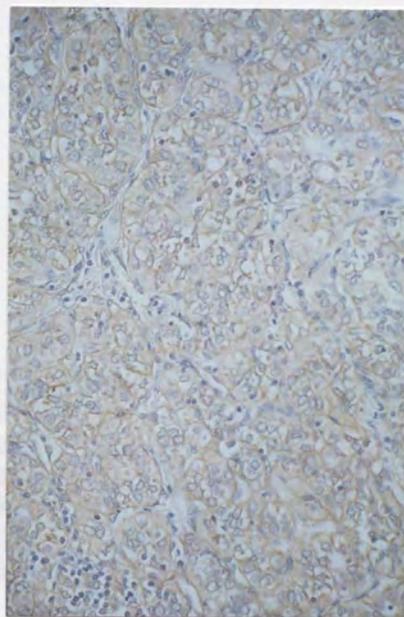
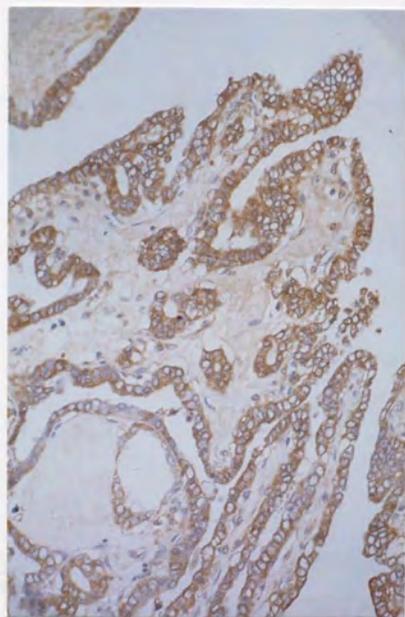
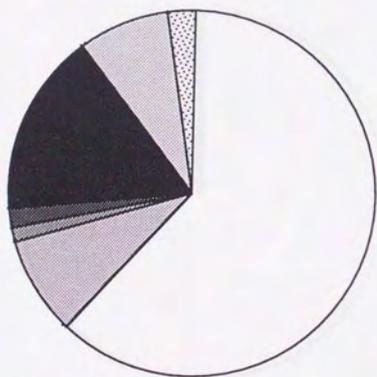


図 2 6 免疫組織化学的染色 pan-ras
左図 高分化乳頭癌 ほとんどの腫瘍細胞に強く陽性. (++) x230
右図 低分化乳頭癌 ほとんどの腫瘍細胞に弱く陽性. (+) x230

図 2 7 組織型分類による症例分布図



□ 乳頭癌	149例	61.8%
■ 濾胞癌	21例	8.7%
■ 未分化癌	3例	1.2%
■ 髓様癌	4例	1.7%
■ 濾胞腺種	39例	16.2%
■ 腺腫様結節	19例	7.9%
■ 腺腫様甲状腺種	6例	2.5%
合計		241例

図 2 8 組織学的分化度分類による甲状腺癌の症例分布図

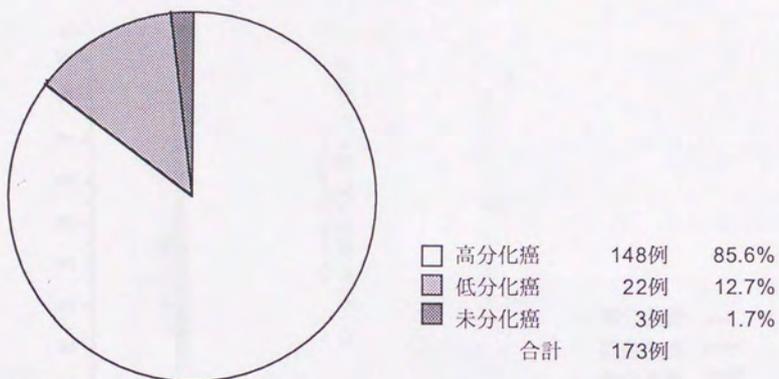


図 2 9 組織学的分化度分類による年齢分布図

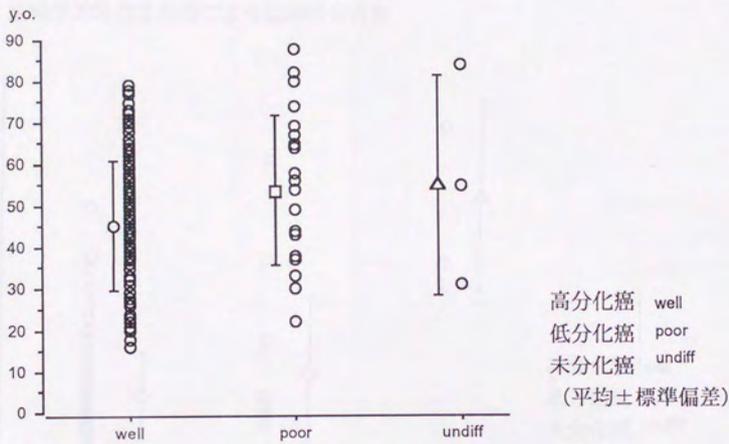


図30 組織学的分化度分類による腫瘍径分布図

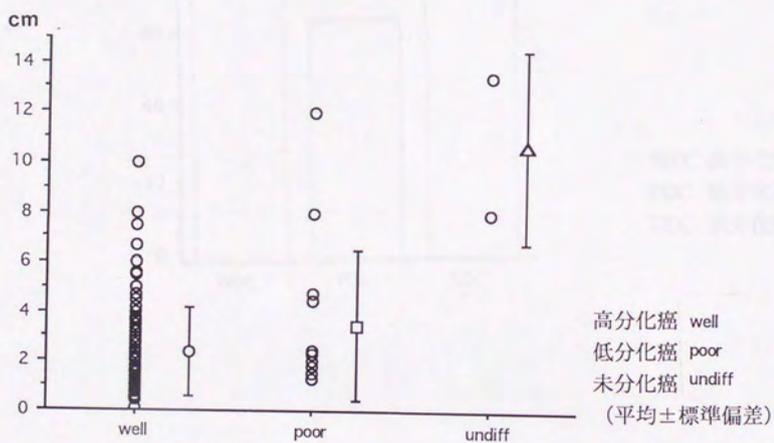


図3 1 組織学的分化度分類によるリンパ節転移の頻度

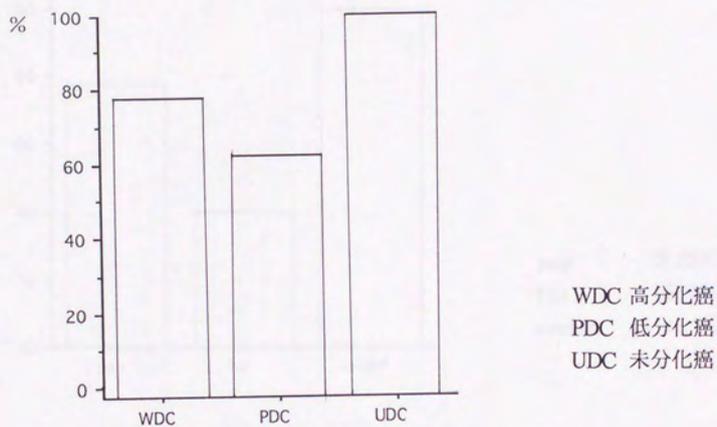


図 3 2 組織型分類によるリンパ節転移の頻度

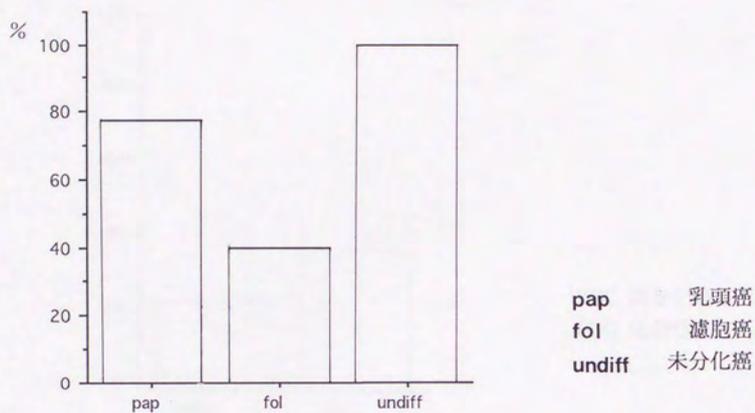


図33 組織学的分化度分類による腺内転移の頻度

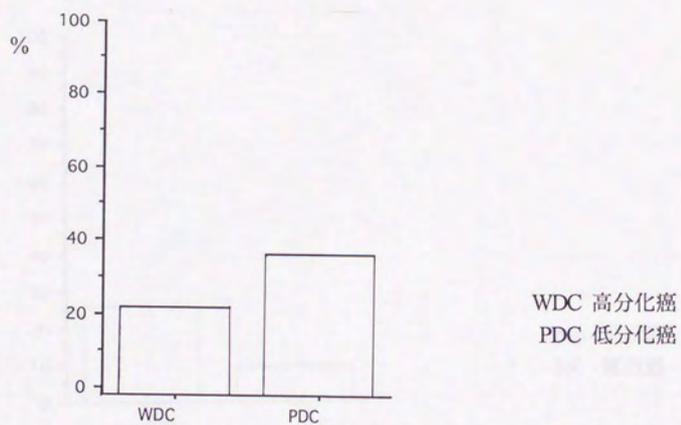
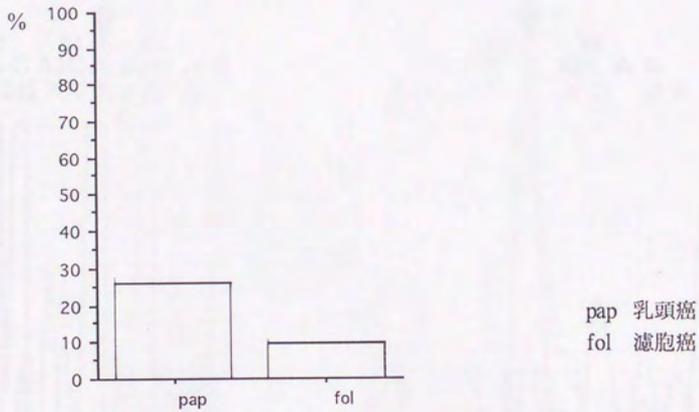


図34 組織型分類による腺内転移の頻度



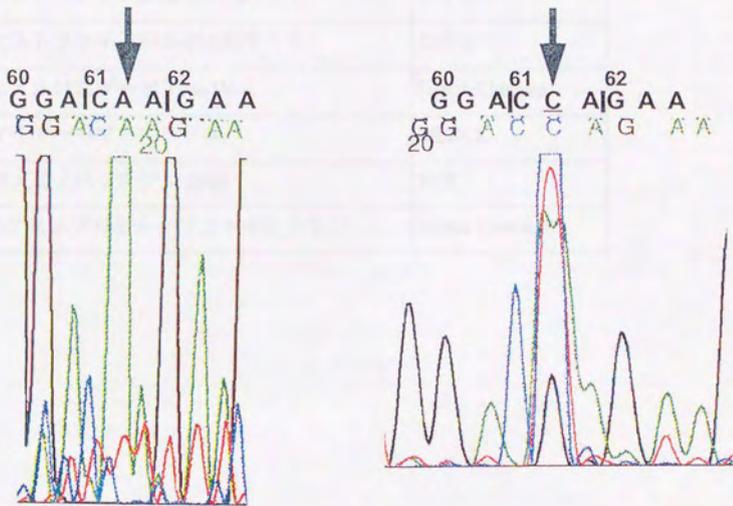


図35 N ras codon 61のシーケンス結果
 左図に正常配列を示す。
 右図に点突然変異のある配列を示す。
 CAAからCCAへの変異が認められる。

表 1

免疫組織化学的染色用試薬のリスト

試薬名	入手先
ヒストファインSAB-PO(M)キット	ニチレイ
ヒストファインSAB-PO(R)キット	ニチレイ
ヒアルロニダーゼ Type IV-S	Sigma Chemical
マイヤーヘマトキシリン	MERCK
ジアミノベンチジン DAB	和光
3-アミノプロピルトリエトキシシラン	Sigma Chemical

表2

免疫組織化学的染色に用いた抗体のリスト

Antibody	*	Specificity	Source	Dilution
c-met (C-12)	P	α -subunit of c-Met	Santa Cruz Biotechnology	1:50
HGF	M	α -subunit of HGF	Institute of Immunology	1:50
FGF(R) (VBS6)	M	human flg (i.e. FGF-R1) FGF receptor	Santa Cruz Biotechnology	1:50
Anti-Bovine basic FGF, type II	M	basic FGF from bovine, human, rat and mouse	Upstate Biotechnology	1:500
pan-ras (Ab-1)	M	p21 translational product of the H-, K-, and N-ras human, other mammalian c- and v-ras oncogenes	Oncogene Science	1:20

* M: monoclonal antibody, P: polyclonal antibody

表3

核酸の抽出、精製用試薬のリスト

試薬名	入手先
ティッシュテックOCTコンパウンド	Miles
イソジェン Isogen	ニッポンジーン
フェノール	和光
クロロホルム	和光
エタノール	和光
クエン酸ナトリウム	和光
水酸化ナトリウム	和光
エタ沈メイト	ニッポンジーン
酢酸ナトリウム	和光
N,N'-メチレンビス (アクリルアミド) -HG	和光
過硫酸アンモニウム ammonium persulfate (APS)	Bio Rad
TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylenediamine)	Bio Rad
EDTA	Sigma
Trizma base	Sigma
塩酸	三共
ほう酸	和光

表 4

Polymerase chain reaction (PCR)用試薬のリスト

試薬名	入手先
PCR反応用バッファー 組成(10x) : 100mM Tris-Hcl(pH 8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl ₂)	宝酒造
dNTP Mixture 組成 : dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各2.5 mM	宝酒造
Recombinant Taq DNA Polymerase	宝酒造
ミネラルオイル	Sigma

表5

ダイレクトシーケンス用試薬のリスト

試薬名	入手先
PRISM Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing kit	Applied Bio
DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing kit 内容 : 100 µl A DyeDeoxy TM Terminator, 100 µl C DyeDeoxy TM Terminator, 100 µl G DyeDeoxy TM Terminator, 100 µl T DyeDeoxy TM Terminator, 100 µl dNTP mix, 50 µl Ampli Taq (8U/ µl), 400 µl 5x Terminator Ammonium Cycle Sequencing (TACS) buffer: 組成 : 400mM Tris-HCl pH 9.0, 10 mM MgCl ₂ , 400 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	Applied Bio
フェノール	和光
クロロホルム	和光
エタノール	和光
酢酸ナトリウム	和光
アクリルアミド : ビス	Bio Rad
EDTA	Sigma
Trizma base	Sigma
塩酸	三共
ほう酸	和光
過硫酸アンモニウム	Bio Rad
TEMED	Bio Rad
脱イオン化ホルムアミド	Bio Rad
尿素	Eastman Kodak

表6

List of primers

Target	Primers	Sequences (5'--3')	Strand
N-12/13	N-12/13 o	CTT GCT GGT GTG AAA TGA CT	S
N-12/13	N-12/13 o	ACA AAG TGG TTC TGG ATT AG	A
N-12/13	N-12/13 i	GAC TGA GTA CAA ACT GGT GG	S
N-12/13	N-12/13 i	AGC TGG ATT GTC AGT GCG CT	A
N-61	N-61 o	GTT ATA GAT GGT GAA ACC TG	S
N-61	N-61 o	AAG CCT TCG CCT GTC CTC AT	A
N-61	N-61 i	GGT GAA ACC TGT TTG TTG GA	S
N-61	N-61 i	AAG CCT TCG CCT GTC CTC AT	A
Ha-12/13	Ha-12/13 o	GAG ACC CTG TAG GAG GAC CC	S
Ha-12/13	Ha-12/13 o	CGT CCA CAA AAT GGT TCT GG	A
Ha-12/13	Ha-12/13 i	TGG ATG GTC AGC GCA CTC TT	A
Ha-12/13	Ha-12/13 i	GAC GGA ATA TAA GCT GGT GG	S
Ha-61	Ha-61 o	CCG GAA GCA GGT GGT CAT TG	S
Ha-61	Ha-61 o	ACA CAC ACA GGA AGC CCT CC	A
Ha-61	Ha-61 i	AGA CGT GCC TGT TGG ACA TC	S
Ha-61	Ha-61 i	CGC ATG TAC TGG TCC CGC AT	A
Ki-12/13	Ki-12/13 o	TTT TTA TTA TAA GGC CTG CT	S
Ki-12/13	Ki-12/13 o	GTC CAC AAA ATG ATT CTG AA	A
Ki-12/13	Ki-12/13 i	TGT ATC GTC AAG GCA CTC TT	A
Ki-12/13	Ki-12/13 i	GAC TGA ATA TAA ACT TGT GG	S
Ki-61	Ki-61 o	AGA AAC CTG TCT CTT GGA TA	S
Ki-61	Ki-61 o	CTA TAA TGG TGA ATA TCT TC	A
Ki-61	Ki-61 i	ACC TGT CTC TTG GAT ATT CT	S
Ki-61	Ki-61 i	TGA TTT AGT ATT ATT TAT GG	A

o= for outer PCR, i= for inner PCR, S= sense primer, A= antisense primer

表7

Age, sex, size and metastasis data of the cases

	No. of cases	age(y.o) (mean±SD)	sex ratio (M:F)	size(cm) (mean±SD)	n (%)	ITM (%)
WDC	148	47.0±15.4	1:3.5	2.5±1.8	78.8	29.5
pap	129	48.5	1:3.3	2.2	78.7	32.8
fol	19	46.7	1:4	4.3	40.0	5.6
PDC	22	55.4±18.2	1:2.1	3.6±3.0	62.5	33.4
pap	20	55.1	1:2.3	2.5	62.5	36.8
fol	2	58.5	1:1	5.3	ne	0.0
UDC	3	56.7±20.5	1:0.5	13.5	100	ne
MED	4	49.3±8.1	1:1	3.6±2.2	100	0
FAd	39	43.3±18.0	1:2.9	3.4±1.1		
TLL	25	45.9±15.3	1:2.7			
AdG	6	49.7	1:1.3			
AdN	19	43.6	1:3.8			
total	241	47.2±16.2	1:2.9			

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma, pap: papillary carcinoma, fol: follicular carcinoma, UDC: undifferentiated carcinoma, MED: medullary carcinoma, FAd: follicular adenoma, TLL: tumor like lesion, AdG: adenomatous goiter, AdN: adenomatous nodule

n: lymph node metastasis, ITM: intrathyroidal metastasis, ne: not examined

表8

Result of immunohistochemical expression of c-Met

	-	+~	+	++	total
WDC	10 (8.8%)	13 (11.4%)	50 (43.9%)	41 (35.9%)	114
pap	5	10	43	37	95
fol	5	3	7	4	19
PDC	3 (15.8%)	12 (63.2%)	2 (10.5%)	2 (10.5%)	19
pap	3	10	2	2	17
fol	0	2	0	0	2
UDC	3 (100%)	0	0	0	3
MED	1 (25%)	3 (75%)	0	0	4
FAd	7 (22.6%)	16 (51.6%)	7 (22.6%)	1 (3.2%)	31
TLL	1 (5.3%)	7 (36.8%)	9 (47.4%)	2 (10.5%)	19

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma, pap: papillary carcinoma, fol: follicular carcinoma, UDC: undifferentiated carcinoma, MED: medullary carcinoma, FAd: follicular adenoma, TLL: tumor like lesion (adenomatous goiter, adenomatous nodule),

-: negative, +~: weakly and scattered positive, +: moderately positive (positive cell count < 50%), ++: strongly and diffuse positive (positive cell count > 50%)

表9

Result of Immunohistochemical expression and
Kruskal Wallis test of c-Met

(a) classification of histological differentiation

	-	+-	+	++	total	mean rank
WDC	10	13	50	41	114	75.0
PDC	3	12	2	2	19	38.8
UDC	3	0	0	0	3	8.0

$p=0.001$

(b) ordinary classification

	-	+-	+	++	total	mean rank
pap	8	20	45	39	112	73.0
fol	5	5	7	4	21	53.3
UDC	3	0	0	0	3	8.5

$p=0.002$

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma,

UDC: undifferentiated carcinoma,

pap: papillary carcinoma, fol: follicular carcinoma,

-: negative, + -: weakly and scattered positive, +: moderately positive (positive cell count < 50%), ++: strongly and diffuse positive (positive cell count > 50%)

表10

Result of immunohistochemical expression of HGF

	-	+	++	total
WDC	86 (58.9%)	27 (18.5%)	33 (22.6%)	146
pap	73	24	30	127
fol	13	3	3	19
PDC	12 (63.2%)	3 (15.8%)	4 (21.0%)	19
pap	10	3	4	17
fol	2	0	0	2
UDC	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0	3
MED	2 (50%)	2 (50%)	0	4
FAd	27 (69.2%)	8 (20.5%)	4 (10.3%)	39
TLL	17 (68.0%)	5 (20.0%)	3 (12.0%)	25

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma, pap: papillary carcinoma, fol: follicular carcinoma, UDC: undifferentiated carcinoma, MED: medullary carcinoma, FAd: follicular adenoma, TLL: tumor like lesion (adenomatous goiter, adenomatous nodule),

-: negative, +: positive (positive cell count < 50%), ++: strongly and diffuse positive (positive cell count > 50%)

表11

Result of Immunohistochemical expression and
Kruskal Wallis test of HGF

(a) classification of histological differentiation

	-	+	++	total	mean rank
WDC	86	27	33	146	86.3
PDC	12	3	4	19	81.9
UDC	2	1	0	3	72.0

$p=0.787$

(b) ordinary classification

	-	+	++	total	mean rank
pap	83	27	34	144	86.3
fol	15	3	3	21	74.1
UDC	2	1	0	3	72.3

$p=0.419$

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma,
UDC: undifferentiated carcinoma,

pap: papillary carcinoma, fol: follicular carcinoma,

-: negative, +: positive (positive cell count < 50%), ++: strongly and diffuse positive
(positive cell count > 50%)

表12

Result of immunohistochemical expression of FGFR1(FLG)

	-	+	++	total
WDC	25 (17.3%)	46 (31.7%)	74 (51.0%)	145
pap	20	41	65	126
fol	5	5	9	19
PDC	11 (52.4%)	5 (23.8%)	5 (23.8%)	21
pap	9	5	5	19
fol	2	0	0	2
UDC	2 (66.7%)	0	1 (33.3%)	3
MED	2 (50.0%)	1 (25.0%)	1 (25.0%)	4
FAd	25 (64.1%)	10 (25.6%)	4 (10.3%)	39
TLL	15 (60.0%)	5 (20.0%)	5 (20.0%)	25

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma, pap: papillary carcinoma, fol: follicular carcinoma, UDC: undifferentiated carcinoma, MED: medullary carcinoma, FAd: follicular adenoma, TLL: tumor like lesion (adenomatous goiter, adenomatous nodule),

-: negative, +: positive (positive cell count < 50%), ++: strongly positive (positive cell count > 50%)

表13

Result of Immunohistochemical expression and
Kruskal Wallis test of FGFR1

(a)classification of histological differentiation

	-	+	++	total	mean rank
WDC	25	46	74	145	91.1
PDC	11	5	5	21	55.9
UDC	2	0	1	3	57.3

p= 0.002

(b) ordinary classification

	-	+	++	total	mean rank
pap	29	46	70	145	86.7
fol	7	5	9	21	77.2
UDC	2	0	1	3	56.2

p= 0.360

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma,

UDC: undifferentiated carcinoma,

pap: papillary carcinoma, fol: follicular carcinoma,

-: negative, +: positive (positive cell count < 50%),

++: strongly positive (positive cell count >50%)

表14

Result of immunohistochemical expression of basic-FGF

	-	+	++	total
WDC	57 (40.5%)	14 (9.9%)	70 (49.6%)	141
pap	50	11	62	123
fol	7	3	8	18
PDC	10 (47.6%)	4 (19.1%)	7 (33.3%)	21
pap	10	4	5	19
fol	0	0	2	2
UDC	2 (66.7%)	0	1 (33.3%)	3
MED	1 (25.0%)	2 (50.0%)	1 (25.0%)	4
FAd	9 (23.1%)	6 (15.4%)	24 (61.5%)	39
TLL	8 (32.0%)	2 (5.7%)	15 (60.0%)	25

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma, pap: papillary carcinoma, fol: follicular carcinoma, UDC: undifferentiated carcinoma, MED: medullary carcinoma, FAd: follicular adenoma, TLL: tumor like lesion (adenomatous goiter, adenomatous nodule),

-: negative, +: positive (positive cell count < 50%), ++: strongly and diffuse positive (positive cell count >50%)

表15

Result of Immunohistochemical expression and
Kruskal Wallis test of basic-FGF

(a) classification of histological differentiation

	-	+	++	total	mean rank
WDC	57	14	70	141	86.6
PDC	10	4	7	21	80.1
UDC	2	0	1	3	69.7

$p=0.689$

(b) ordinary classification

	-	+	++	total	mean rank
pap	60	15	67	142	82.8
fol	7	3	10	20	87.3
UDC	2	0	1	3	65.5

$p=0.708$

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma,

UDC: undifferentiated carcinoma,

pap: papillary carcinoma, fol: follicular carcinoma,

-: negative, +: positive (positive cell count < 50%),

++: strongly and diffuse positive (positive cell count > 50%)

表16

Result of detection of ras oncogene mutation

	-	+	total
WDC	6	11	17
PDC	0	3	3
MED	0	1	1
FAd	3	2	5

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma,

MED: medullary carcinoma, FAd: follicular adenoma,

-: no mutation, +: more than one point mutation was detected

表17

Sequence data of ras oncogene

case	diff.	histol	age	sex	Nras12	Nras13	Nras61	Hras12	Hras13	Hras61	Kras12	Kras13	Kras61	Mutation (%)	IHp21
					*GGT(Gln)	*GGT(Gln)	*CAA(Gln)	*GGC(Gln)	*GGT(Gln)	*CAG(Gln)	*GGT(Gln)	*GGC(Gln)	*CAA(Gln)		
1	benign	FAd	27	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	2+
2	benign	FAd	39	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	1+
3	benign	FAd	42	F	N	N	CTA(Leu)	N	AGT(Ser)	CTG(Leu)	N	N	N	+	1+
4	benign	FAd	46	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	40 -
5	benign	FAd	60	F	N	N	CTA(Leu)	N	N	N	N	N	N	+	-
6	well	FCa	21	F	N	N	CCA(Pro)	N	AGT(Ser)	CTG(Leu)	N	AGC(Ser)	N	+	2+
7	well	FCa	23	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	1+
8	well	FCa	29	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	2+
9	well	FCa	48	F	N	N	CCA(Pro)	N	N	AAG(Lys)	N	N	N	+	50 nd
10	well	PCa	16	F	N	N	N	N	N	N	N	GGT(Gln)	N	+	1+
11	well	PCa	28	M	N	N	CCA(Pro)	N	N	N	N	N	N	+	1+
12	well	PCa	45	F	N	N	CCA(Pro)	N	N	N	N	N	N	+	1+
13	well	PCa	46	F	AGT(Ser)	N	N	N	N	N	N	GGA(Gly)	N	+	2+
14	well	PCa	51	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	2+
15	well	PCa	52	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	2+
16	well	PCa	55	F	N	GGC(Gln)	N	N	N	N	N	N	N	+	1+
17	well	PCa	58	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	2+
18	well	PCa	61	M	GCT(Ala)	N	CCA(Pro)	GGT(Gln)	N	N	N	N	N	+	2+
19	well	PCa	70	M	N	N	CTA(Leu)	N	GTT(Val)	N	N	N	N	+	1+
20	well	PCa	72	F	N	N	N	N	N	N	N	GGA(Gly)	N	+	-
21	well	PCa	73	F	N	N	CCA(Pro)	N	N	N	N	N	N	+	.
22	well	PCa	79	F	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	69 2+
23	poor	PCa	30	F	N	N	CTA(Leu)	N	N	N	N	GTC(Val)	N	+	100 1+
24	poor	PCa	56	F	N	N	N	AGC(Ser)	N	N	N	N	N	+	1+
25	poor	PCa	58	F	N	N	CTA(Leu)	N	GAT(Asp)	N	N	N	N	+	1+
26	.	MCa	55	F	N	GTT(Val)	CTA(Leu)	N	N	N	N	N	N	+	-

diff.: differentiation classification, benign= benign neoplasm,

well= well differentiated carcinoma, poor = poorly differentiated carcinoma

histol. : histological classification, FAd= follicular adenoma, FCa= follicular carcinoma, PCa= papillary carcinoma, MCa= medullary carcinoma,

age(years old), sex: F= female, M= male,

* showing normal sequence (amino acid) of each codon, N= normal,

mut: ras oncogene mutation+ = present, - = absent,

IH p21: Result of immunohistochemical expression of pan-ras,

(-) negative, (+) positive, (2+) strongly positive, nd: not done

表18

Result of immunohistochemical expression of pan-ras

	-	+	++	total
WDC	2 (12.5%)	6 (37.5%)	8 (50.0%)	16
pap	2	5	6	13
fol	0	1	2	3
PDC all pap	0	3 (100%)	0	3
MED	1 (100%)	0	0	1
FAd	0	3 (75.0%)	1 (25.0%)	4

WDC: well differentiated carcinoma, PDC: poorly differentiated carcinoma,
 pap: papillary carcinoma, fol: follicular carcinoma, MED: medullary carcinoma,
 FAd: follicular adenoma,

-: negative, +: positive, ++: strongly positive

表19

ras 癌遺伝子の変異とRas遺伝子産物(pan-ras) の
免疫組織化学的検索及びMann Whitney U testの結果

IH	-	+	++	total	mean rank
M					
+	3	7	5	15	13.61
-	1	4	4	9	11.83

p= 0.517

IH: Result of immunohistochemical expression of pan-ras

-: negative, +: positive, ++: strongly positive

M: Result of rasoncogene mutation:

+ ; present, - ; abscent





