

ヒト甲状腺乳頭癌における癌関連遺伝子産物の 発現とその生物学的意義

山 本 俊 治

広島大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任: 夜陣絃治教授)

受付 平成 11 年 11 月 8 日

受理 平成 12 年 7 月 31 日

ヒト甲状腺乳頭癌の癌関連遺伝子の生物学的意義を知る目的で, 21例のパラフィン標本を用いて, 癌関連遺伝子産物 (*c-erbB2*, EGFR, EGF, TGF- α , *p53*, *p27*, *c-Met*, *cyclinD1*, *cyclinE*, *cdc25B*, E2F-1, CD44, *nm23*) の発現を免疫組織化学的に検討し, 発現した癌関連遺伝子産物相互の関連性を検討するとともに, 癌関連遺伝子産物の発現と臨床病理学的事項との関連性についても検討を行った。

癌関連遺伝子産物の発現で新しい知見としては, *cdc25B* の過剰発現は47.6%とほぼ半数に認められ, *c-Met* の発現は認められず, E2F-1 免疫活性陽性例の割合は4.8%と少なかったことがあげられた。

癌関連遺伝子産物相互の相関性については, *cdc25B* の過剰発現と TGF- α および EGFR の発現との間に有意に相関を認め, EGFR の発現は *cyclinD1* の発現とも有意に相関が認められたことから, 細胞増殖シグナルにより *cdc25B* と *cyclinD1* が活性化を受ける可能性があること, 発癌に *cdc25B* および *cyclinD1* の過剰発現が大切な役割を果たしている可能性があることが示された。

臨床病理学的事項との相関性については, *nm23* 蛋白の発現抑制と気管傍リンパ節転移との間に有意な相関が認められ, *nm23* 遺伝子は甲状腺乳頭癌においても転移抑制因子として機能している可能性があることが示された。

Key words : 甲状腺乳頭癌, リンパ節転移, *nm23*, *cdc25B*, E2F-1

甲状腺癌のなかで, 乳頭癌はとりわけ頻度が高く, 比較的前後良好な癌であるが, かなりの頻度で潜在的にリンパ節転移を起こしていることが知られている^{5,41)}。

最近, 癌の生物学的特性について, 癌関連遺伝子産物の発現の視点から検討された報告が多くみられ, 癌細胞における癌関連遺伝子産物の過剰産生は, それぞれの増幅, もしくは転写の活性化によってひきおこされるものと考えられている。

甲状腺癌においてもこの点に関して免疫組織化学的手法などを用いた研究が行われているが, 他の癌で転移抑制因子と報告されている *nm23* の発現や, 細胞調節因子である *cdc25B*, 転写因子である E2F-1 の発現に関する報告は未だみられない。

そこで, 今回, 著者は甲状腺乳頭癌に関して, 細胞増殖因子である *c-erbB2*, EGF, EGFR, TGF- α , *c-Met*, 細胞周期調節因子である *cyclinD1*, *cyclinE*, E2F-1,

p53, *cdc25B*, *p27*, 接着因子である CD44 の発現の有無, 転移抑制遺伝子といわれている *nm23* の発現強度の強弱を検討し, これら癌関連遺伝子産物の発現の相互の関連性および臨床病理学的諸因子との関連性について検討を行った。

材料および方法

1. 実験材料

材料は広島大学医学部附属病院耳鼻咽喉科にて1988年から1995年までに摘出されたパラフィン包埋甲状腺乳頭癌組織21例を用いた。

2. 免疫組織化学的検査

1) *nm23*, *cdc25B*, *p53*, *c-Met* 染色

nm23, *cdc25B*, *p53* および *c-Met* 染色は streptavidin-biotinylated peroxidase complex method (SABC 法) にて行った。使用キットは ScyTeK SAB

kit (Scytek Laboratories) を用いた。パラフィン包埋組織から $4\mu\text{m}$ の切片を作成し、キシレンおよびエタノールにて脱パラフィン、脱水を行い、内因性ペルオキシダーゼの除去のため 0.3% H_2O_2 にて5分間処理した。

ブロッキング用血清（正常ウマ血清）で10分間反応後、1次抗体を室温で2時間反応させた。使用した1次抗体は i) 抗 *nm23* ポリクローナル抗体（広島大学医学部第一病理学教室調製）、ii) 抗 *cdc25B* ポリクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology）、iii) 抗 *p53* ポリクローナル抗体（Novo Castra Laboratory）、iv) 抗 *c-Met* ポリクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology）である。2次抗体および SABC はそれぞれ室温で20分間反応させた。発色は diaminobenzidine (DAB) 液を用い、核染色はヘマトキシリンで行い、水洗、脱水、透徹、封入を行った。陽性コントロールはヒト胃を用いた。

2) *c-erbB-2*, EGFR, TGF- α , cyclinD1, cyclinE, CD44, EGF, *p27*, E2F-1 染色

c-erbB-2, EGFR, TGF- α , cyclinD1, cyclinE, CD44, EGF, *p27* および E2F-1 染色は avidin-biotin角度 method (ABC 法) にて行った。使用キットは Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いた。パラフィン包埋組織から $4\mu\text{m}$ の切片を作製し、キシレンおよびエタノールにて脱パラフィン、脱水を行い、内因性ペルオキシダーゼの除去のため、 0.3% H_2O_2 にて5分間処理した。ブロッキング用血清（正常ウマ血清）で10分間反応後、1次抗体を室温で2時間反応させた。使用した1次抗体は i) 抗 *c-erbB-2* モノクローナル抗体（Novo Castra Laboratory）、ii) 抗 EGFR モノクローナル抗体（Novo Castra Laboratory）、iii) 抗 TGF- α モノクローナル抗体（Oncogene Science）、iv) 抗 cyclinD1 モノクローナル抗体（医学生物学研究所）、v) 抗 cyclinE モノクローナル抗体（Pharmingen）、vi) 抗 CD44 モノクローナル抗体（Seikagaku Corporation）、vii) 抗 EGF モノクローナル抗体（涌永製薬）、viii) 抗 *p27* モノクローナル抗体（Tranduction Laboratories）、ix) 抗 E2F-1 モノクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology）である。2次抗体および ABC はそれぞれ室温で20分間反応させた。発色は diaminobenzidine (DAB) 液を用い、核染色はヘマトキシリンで行い、水洗、脱水、透徹、封入を行った。陽性コントロールはヒト胃を用いた。

3) 染色性の判定

400倍の顕微鏡下で3視野を選び、視野中の全腫瘍

細胞に対する各抗体に陽性の腫瘍細胞の割合を算出し、3視野の平均値を求め、判定に用いた。判定は各癌関連遺伝子免疫活性陽性癌細胞が全く認められないか、かすかに認められる程度のものを -（陰性）、10%未満の免疫活性陽性癌細胞を認めたものを 1+（弱陽性）、10%以上50%未満の免疫活性陽性癌細胞を認めたものを 2+（中等度陽性）、50%以上の免疫活性陽性癌細胞を認めたものを 3+（強陽性）の4段階とした。この分類により *c-erbB2*, EGFR, EGF, TGF- α , *p53*, *c-Met*, cyclinD1, cyclinE, E2F-1, CD44 の染色性については 1+（弱陽性）以上の発現を認めたものを過剰発現とし、*cdc25B* の染色性については 2+（中等度陽性）以上の発現を認めたものを過剰発現とし、*nm23*, *p27* の染色性については 1+（弱陽性）以下のものを発現の抑制を認めたものとした。

各癌関連遺伝子産物産物の染色性についての統計学的有意差の検定には χ 自乗検定 (Fisher の直接法併用) を用いた。

3. 臨床病理学的事項

甲状腺癌の分類に関しては、甲状腺外科検討会編、甲状腺癌取り扱い規約第5版および Union Internationale Contre le Cancer (UICC) の Tumor node metastasis classification (TNM) 分類に従った。

臨床病理学的事項は 1) 性、2) 年齢 (45歳未満と45歳以上)、3) 術前エコー診断での腫瘍径、4) 摘出時の腫瘍径、5) 手術時の気管傍リンパ節転移の有無、6) 内頸静脈リンパ節転移の有無、7) 被膜外進展の有無、8) 血管侵襲の有無、9) 臨床病期 Stage I, II 群と Stage III, IV 群間 (但し、今回の検討では Stage IV 群に相当する症例はなかったため、Stage I, II 群と Stage III 群間の検討を行った) 10) 重複癌の有無の10項目について、各癌遺伝子産物の発現 (但し、*cdc25B* については過剰発現、*nm23* と *p27* については発現の抑制) との相関性について検討した。

統計学的検討は χ 自乗検定にて行った。

4. 予後調査

今回検討した各癌遺伝子産物の発現 (但し、*cdc25B* については過剰発現、*nm23* と *p27* については発現の抑制) と、10項目の臨床病理学的事項との間に相関性が認められるか、また、各癌遺伝子産物の発現の有無や臨床病理学的事項で生存率および無病生存率で有意差を認めるかについても検討した。

生存率と無病生存率の算出は Kaplan-Meier 法にて行い、有意差検定は log-rank 検定にて行った。

成 績

1. 臨床病理学的事項

Table 1 に臨床病理学的事項を示した。

1) 性

全21例の内訳は、男性6例、女性15例であった。

2) 年齢

全21例の年齢構成は24歳から72歳までであり、平均年齢は49.2歳であった。

45歳以上が13例、45歳未満が8例であった。また、

Table 1. Clinicopathological findings of cases

Variables	n
Gender	
females	15
males	6
Age	
0-45 years	8
45+ years	13
Size by clinical examination	
1 cm >	0
1-3.99 cm	18
4 cm ≤	3
Size of resected tumors	
1 cm >	2
1-3.99 cm	16
4 cm ≤	3
Paratracheal lymph node metastasis by pathological assessment	
negative	5
positive	16
Jugular lymph node metastasis by pathological assessment	
negative	14
positive	7
Primary tumor extent by pathological assessment	
intrathyroid tumor	9
thyroid capsular invasion	12
Vascular invasion	
negative	19
positive	2
TNM Stage	
I	10
II	8
III	3
Second primary cancer	
absent	17
present	4

21例の年齢構成を男女別にみると、男性は25歳から69歳で、平均年齢は51.2歳、女性は24歳から72歳で、平均年齢は48.4歳であった。

3) 術前エコー診断での腫瘍径

最大径をもって腫瘍径とした。腫瘍径は最小径が1.0 cm で最大径が4.0 cm の範囲であり、平均値は2.2 cm であった。腫瘍径が1 cm 未満が0例、1 cm 以上4 cm 未満が18例、4 cm が3例であった。

4) 摘出時の腫瘍径

最大径をもって腫瘍径とした。腫瘍径は最小径が0.7 cm で最大径が4.0 cm の範囲であり、平均値は2.2 cm であった。腫瘍径が1 cm 未満が2例、1 cm 以上4 cm 未満が16例、4 cm が3例であった。

5) 手術時の気管傍リンパ節転移

21例中16例(76.2%)に気管傍リンパ節転移を認めた。

6) 内頸静脈リンパ節転移

21例中7例(33.3%)に内頸静脈リンパ節転移を認めた。

7) 甲状腺被膜外進展

21例中12例(57.1%)に被膜外進展を認めた。

8) 脈管侵襲

21例中2例(9.5%)に脈管侵襲を認めた。

9) Stage 分類 (UICC の分類に準じた) Stage 分類では21例中10例が Stage I, 8例が Stage II, 3例が Stage III に分類され、Stage IV に分類される症例は認めなかった。

10) 重複癌の合併

21例中4例に重複癌を認めた。その内訳は異時性重複癌1例(腎癌)、同時性重複癌3例であった。同時性重複癌3例の内訳は2重癌が2例(結腸癌および乳癌)で、3重癌が1例(胃癌と下咽頭癌を合併)であった。

11) その他

遠隔転移を認めた症例はなかった。原爆被爆歴患者は女性の1例に認められた。

2. 病理組織学的所見

病理組織学的には、21例いずれも高分化型乳頭癌であった。

3. 免疫組織化学的検討

1) *c-erbB-2* 染色

c-erbB-2 染色の局在部位は主に細胞質に認め、染色強度(1+)は11例、(2+)は1例であり、陽性率は57.1%であった。

2) EGFR 染色

EGFR の局在部位は主に細胞質に認め、染色強度

(1+) は10例, (2+) は3例であり, 陽性率は61.9%であった。

3) EGF 染色

EGF の局在部位は主に細胞質に認め, 染色強度(1+) は11例, (2+) は3例であり, 陽性率は66.7%であった。

4) TGF- α 染色

TGF- α の局在部位は主に細胞質に認め, 染色強度(1+) を認めた症例は8例 (38.1%) であった。

5) c-Met 免疫活性陽性例は21例いずれにも認めなかった。

6) cyclinD1 染色

cyclinD1 の局在部位は核に認め, 正常甲状腺組織には認めなかった。染色強度(1+) は7例, (2+) は3例であり, 陽性率は47.6%であった。

7) cyclinE 染色

cyclinE の局在部位は核に認め, 正常甲状腺組織には認めなかった。染色強度(1+) は14例, (2+) は3例であり, 陽性率は81.0%であった。

8) nm23 染色

nm23 の局在部位は主に細胞質に認め, 正常甲状腺組織にも認めた。正常組織においては, 21例のいずれも中等度の nm23 染色性を認めた。一方, 乳頭癌組織においては, 発現の抑制を14例 (66.7%) に認め, そのうち3例 (14.3%) は陰性で, 11例 (52.4%) が弱陽性例 (1+) であった。

発現の抑制を認めなかったものは7例 (33.3%) で, そのうち4例 (19.0%) は中等度陽性例 (2+) で, 3例 (14.3%) が強陽性例であった。

発現の抑制が認められた染色強度弱陽性 (1+) の症例を Photo. 1 に, 発現の抑制が認められなかった染色強度強陽性 (3+) の症例を Photo. 2 に示した。

9) CD44 染色

CD44 の局在部位は細胞膜に認め, 正常甲状腺組織には認めなかった。染色強度 (1+) は11例で, (2+)

は1例であり, 陽性率は57.1%であった。

10) cdc25B 染色

cdc25B の局在部位は主に細胞質に認め, 染色強度(1+) は10例で, (2+) は10例であり, 中等度以上の陽性率を示したものは47.6%であった。染色強度(2+) を認めた症例を Photo. 3 に示す。

11) p53 免疫活性陽性例は21例いずれにも認めなかった。

12) p27 染色

p27の局在部位は核と細胞質に認め, 正常甲状腺組織にも認めた。乳頭癌組織においては, 発現の抑制を18例 (85.7%) に認め, そのうち染色強度 (1+) のものが14例 (66.7%), 陰性を示したものは4例 (19%) であった。残りの3例 (14.3%) は発現の抑制が認められず, 染色強度が中等度陽性 (2+) であった。

13) E2F-1 染色

E2F-1 陽性の男性症例を1例 (4.8%) にのみ認め, 局在部位は核に認めた。この症例は, 初診時より両側頸部リンパ節転移を認めており, 癌細胞の血管侵襲が陽性で, 術後再発もみられている症例であった。染色強度 (2+) を認めた症例を Photo. 4 に示す。

14) 各癌関連遺伝子産物の同時発現について

13種の各癌関連遺伝子産物のうち, 発現が認められた11種の発現 (ただし nm23, p27 に関しては発現強度の強弱, cdc25B の発現に関しては過剰発現) について, 互いに関連性があるか否かを比較検討した。

cdc25B の過剰発現は, EGFR および TGF- α の発現との間に有意な相関 ($p < 0.05$) を認めた (Table 2)。一方, EGFR の発現は, cdc25B の過剰発現だけでなく, cyclinD1 の発現との間にも有意な相関を認めた (Table 3)。

4. 臨床病理学的事項と免疫組織化学的染色結果との関連性

先に述べた11種の癌関連遺伝子産物の発現と臨床病理学的事項との関係については, nm23 蛋白の発現

Table 2. Correlation between cdc25B and other gene products

	n	cdc25B	
		positive to strong	negative to weak
EGFR ¹⁾			
positive	13	9	4
negative	8	1	7
TGF- α ²⁾			
positive	10	7	3
negative	11	1	10

1) Significant statistical association was observed between EGFR and cdc 25B positivity. (χ^2 -test, $p < 0.05$)

2) Significant statistical association was observed between TGF- α and cdc 25B positivity. (χ^2 -test, $p < 0.05$)

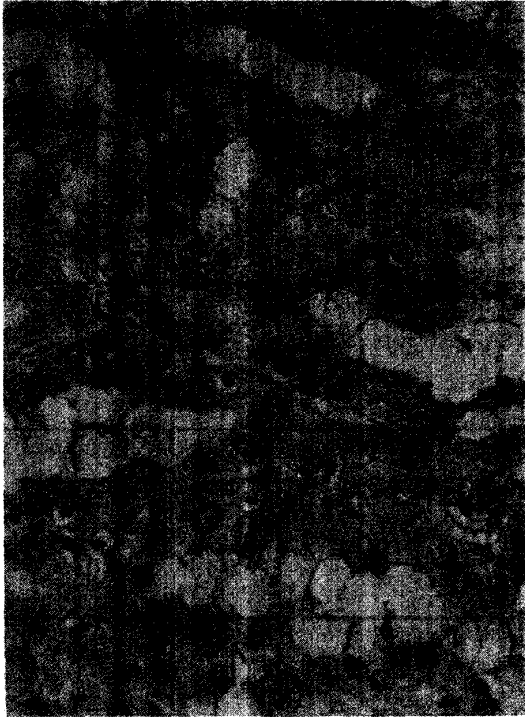


Photo. 1. *nm23* positive (1+) tumor cells in a papillary thyroid carcinoma.

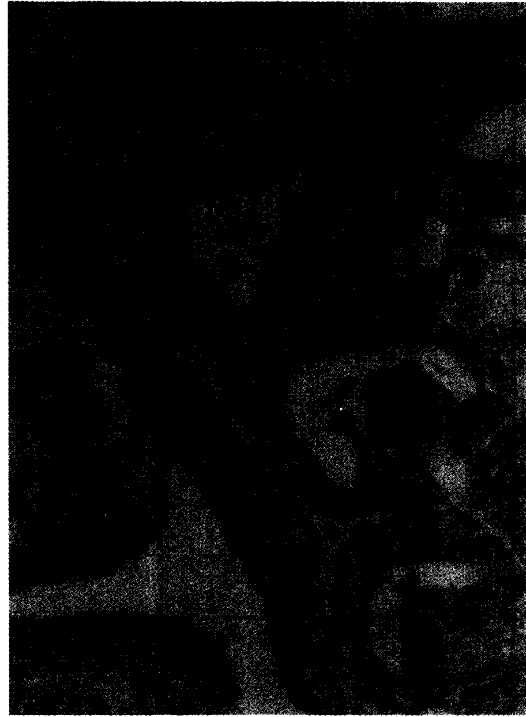


Photo. 2. *nm23* positive (3+) tumor cells in a papillary thyroid carcinoma.

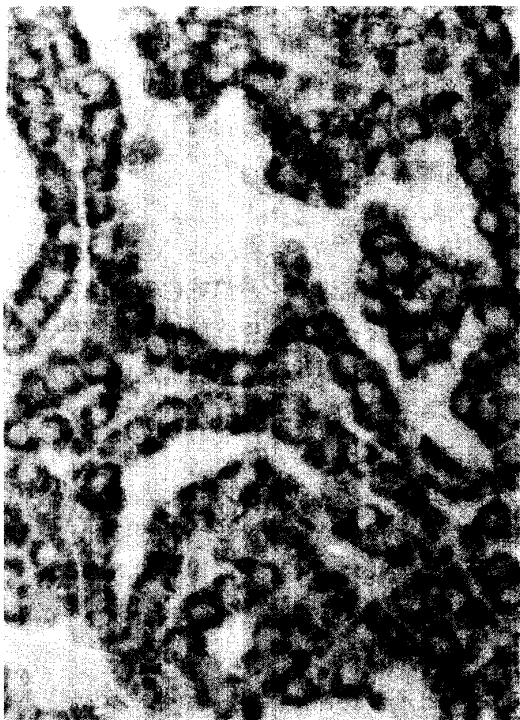


Photo. 3. *cdc25B* positive (2+) tumor cells in a papillary thyroid carcinoma.

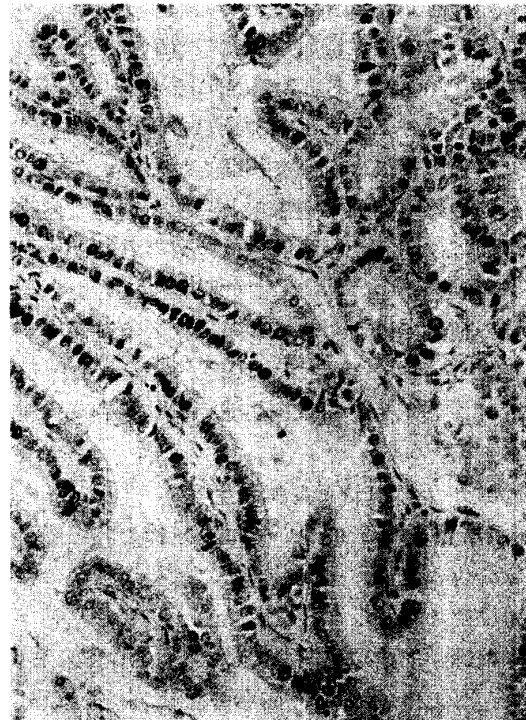


Photo. 4. E2F-1 positive (2+) tumor cells in a papillary thyroid carcinoma.

Table 3. Correlation between EGFR and other gene products

Variables	n	EGFR positive	EGFR negative
cyclinD1 ¹⁾			
positive	10	9	1
negative	11	4	7
cdc25B ²⁾			
positive to strong	10	9	1
negative to weak	11	4	7

1) Significant statistical association was observed between cyclinD1 and EGFR positivity. (χ^2 -test, $p < 0.05$)

2) Significant statistical association was observed between cdc 25B and EGFR positivity. (χ^2 -test, $p < 0.05$)

Table 4. Correlation between *nm23* and paratracheal lymph node metastasis

	n	paratracheal lymph node metastasis positive	paratracheal lymph node metastasis negative
<i>nm23</i> ¹⁾			
negative to weak	14	13	1
moderate to strong	7	3	4

1) Significant statistical association was observed between decreased expression of *nm23* and paratracheal lymph node metastasis positivity. (χ^2 -test, $p < 0.05$)

強度の強弱と気管傍リンパ節転移との間に有意な逆相関が認められた。

すなわち, 21例中, 気管傍リンパ節に転移を認めたのは16例 (76.2%) であり, この16例の内, *nm23* 蛋白の発現強度が減少していたのが13例 (81%) であったのに対し, 気管傍リンパ節転移が陰性であった5例の内, *nm23* 蛋白発現強度の減少がみられたのは1例のみ (20%) であった。この結果を, χ 自乗検定にて検討したところ, *nm23* 蛋白の発現の抑制と気管傍リンパ節転移には有意な相関を認めた。(Table 4)

その他の臨床病理学的事項と癌関連遺伝子産物の発現との間には明らかな相関性は認められなかった。

5. 予後調査

今回の検討ではいずれも5年以上の追跡調査が可能であったが, その結果は, 19例が生存, 2例が死亡しており, 5年生存率は90.5%, 無病生存率は80.9%であった。

また5年生存率および無病生存率 (Kaplan-Meier法, log-rank 検定) については, 11種の各癌関連遺伝子産物発現の有無, 過剰発現または発現強度の強弱で有意差は認められなかった。

臨床病理学的事項に関しては, 無病生存率において, 1) 性, 2) Stage, 3) 内頸静脈リンパ節転移, 4) 重複癌の4項目で有意差を認めた。

すなわち, 無病生存率は男女別では, それぞれ50.0%, 93.3%と男性群において不良であり, Stage別では Stage I, II 群と Stage III 群との無病生存率はそ

れぞれ88.9%, 33.3%, と Stage III 群において不良であり, 内頸静脈リンパ節転移陰性群と陽性群とにおける無病生存率はそれぞれ92.9%, 57.1%と陽性群において不良であり, 重複癌については, 重複癌合併群の無病生存率は25%, 非合併群のそれは94.1%であり, 前者において不良であった。

他の6項目 (年齢, 術前エコー診断での腫瘍径, 摘出時の腫瘍径, 被膜外進展, 血管侵襲, 気管傍リンパ節転移) の臨床病理学的事項に関しては, 無病生存率において有意差は認めなかった。

考 察

最近, *nm23* が癌のリンパ節転移抑制因子として報告されるようになったが, 甲状腺癌での報告はほとんどない^{15,62)}。また, 甲状腺乳頭癌において細胞周期調節因子である *cdc25B* や, 転写因子である *E2F-1* に関する報告はみられない。

これらの理由から, 著者は甲状腺乳頭癌の各癌関連遺伝子産物の発現を免疫組織化学的に検討し, リンパ節転移など患者背景因子との関連性を検討した。

1. 甲状腺乳頭癌における増殖因子およびその受容体の発現の意義

増殖因子とその受容体は癌細胞の異常増殖に関与しているといわれている。これらには *c-erbB-2*, *EGF*, *EGFR*, *TGF- α* , *c-Met* が知られている。

c-erbB-2 遺伝子は染色体 17p11-q21 に位置しており, *EGFR* とよく似た膜通過型の形態をした 138 kD

蛋白をコードしているといわれている。Haugen らは甲状腺乳頭癌で *c-erbB-2* 産生蛋白の発現が70.5%に認められたとしており²⁰⁾、著者の検討では甲状腺乳頭癌で *c-erbB-2* 産生蛋白の発現は57.1%と過半数を占めていた。

ヒトの乳癌では *c-erbB-2* 遺伝子の増幅が強いほど、悪性度が高いことが知られている。Aasland らは甲状腺乳頭癌において、RNA レベルで *c-erbB-2* の過剰発現を認めたとしているし¹⁾、Umekita らも乳癌では *c-erbB-2* 産生蛋白の発現が予後因子として重要であると報告しているが⁵⁴⁾、逆に、Akslen らは、甲状腺乳頭癌では、女性では *c-erbB-2* 産生蛋白の発現の減少が生存率に関連しているとしている³⁾。著者の検討では、死亡した1例の女性患者は *c-erbB-2* 産生蛋白の発現は陰性であり、Akslen らの報告を支持するものであるように思われたが、甲状腺乳頭癌においては、*c-erbB-2* の発現のみを、甲状腺乳頭癌の予後と関連付けるのは無理があるように考えられた。

ところで、著者が甲状腺乳頭癌に対し、マイクロサテライト領域における遺伝子不安定性の検討を行った結果によると、*c-erbB-2* 蛋白発現強陽性(2+)と遺伝子不安定性の両方を認めた男性症例1例は、重複癌を併発し、死亡していた⁶¹⁾。*c-erbB-2* 蛋白の発現とマイクロサテライト領域での遺伝子不安定性の関連性については、Lin らの胃癌での報告があるが³⁰⁾、甲状腺乳頭癌における両者の関連性については未だに報告はみられず、今後、より多数例の検討が必要であると思われた。

EGFR はチロシンキナーゼ活性を持つ 175 kD の糖蛋白で、乳癌、胃癌などで EGFR の強発現が報告されており、甲状腺乳頭癌でも、Akslen らの報告によると、EGFR の免疫陽性率は96%に認められ、被膜外進展と無病生存率に関連を認め、特に、細胞質における EGFR の免疫染色陽性率はリンパ節転移と関連することを指摘しているが³⁾、著者の検討では特に両者に相関を認めなかった。特筆すべき点として、著者の検討では、EGFR の発現は cyclinD1 の発現との間に相関が認められ、EGFR の発現は *cdc25B* の過剰発現と相関が認められた。(Table 4)

TGF- α は 5.6 kD のポリペプチド鎖であり、EGF の胎児型であると想定されており、多くの癌が TGF- α を分泌しているといわれている。春田は甲状腺乳頭癌では、EGF は63.5%に、TGF- α は44.2%に認めたと報告しており¹⁹⁾、著者の検討でも乳頭癌では EGF は66.7%に、TGF- α は38.1%に認めるなど、ほぼ同様な傾向を認めた。

Ness らは、免疫組織化学とウェスタンブロットによる検討から、甲状腺乳頭癌における EGFR の細胞質の免疫染色性が、TGF- α -EGFR autoline loop における receptor degradation product の蓄積によるものであることを示している⁴⁰⁾。Umekita らは乳癌では EGFR と TGF- α の共発現が予後因子として重要であると報告しており⁵⁴⁾、Castellani らも乳癌では TGF- α と EGFR の共発現が再発予後因子となりうるとしているが¹⁴⁾、著者の検討では、甲状腺癌における TGF- α と EGFR の共発現は、予後に有意な相関が認められなかったことから、甲状腺乳頭癌では、少なくとも、TGF- α と EGFR の共発現は、予後に影響しないのではないかと考えられる。

Met 癌遺伝子は第1染色体上の *tpr* と第7染色体 *q21-31* 上の *c-Met* が DNA 再構成によって連結されて活性化される。

Ruco らは、甲状腺乳頭癌では、*c-Met* の発現が77%に認められたと報告しており⁴⁶⁾、Oyama らも、甲状腺乳頭癌における *c-Met* の発現が、免疫染色では100%に、ウェスタンブロットでは75%に発現したとしているが⁴³⁾、著者の検討では、甲状腺乳頭癌21例において *c-Met* の発現は認めなかった。この原因については以下のことが考えられる。まず第一に、Oyama らは Vectastain ABC kit を用いた ABC 法にて行っているのに対し、著者は ScyTek SAB kit を用いた SABC 法にて行っていること、第二に、Oyama らは 4℃で一昼夜と比較的長く1次抗体と反応させているのに対し、著者は1次抗体を常温で20分間反応させていることが異なっており、この2点で結果に差がでたのではないかと考えられる。

まとめると、今回の検討から、甲状腺乳頭癌では、増殖因子およびその受容体 (*c-erbB-2*, EGF, EGFR, TGF- α) の発現はほぼ他の報告とほぼ同じ頻度であったが、臨床病理学的事項との間に有意な相関性は認められなかったこと、*c-Met* の発現を認めた症例はなかったことが示された。

2. 甲状腺乳頭癌における細胞周期調節因子および癌抑制遺伝子の意義

細胞周期調節因子および癌抑制遺伝子も癌化に関与しているといわれており、これらには cyclinD1, cyclinE, E2F-1, p53, p27 などが相当する。

細胞周期の進行は、cyclin, Cdk とそのインヒビターによって制御されており、これらの異常によって細胞の過剰増殖が起こり、癌が発生し進展してゆく。

cyclinD1 および cyclinE は G1 期に機能する cyclin であり、cyclinD1 遺伝子は 11q13 領域に位置し、乳

痛などで増幅および異常発現が認められている。

cyclinE は、細胞周期において、p53 の下流で、G1/S 期遷移を制御しているといわれていて、その遺伝子は第9染色体の9p21に位置している。cyclinE は cyclinD1 より遅れて発現し、E2F の活性化により、G1 後期から G1/S 期にかけて活性が最大となる。cyclinE の過剰発現は、胃癌では深部浸潤癌、進行癌、転移癌に有意に頻度が高いことが指摘されている。

Wang らは、甲状腺乳頭癌では、cyclinD1 の発現は63%に、cyclinE の発現は86%に認めたと報告しており⁵⁶⁾、著者の検討でも甲状腺乳頭癌の47.6%に cyclinD1 の発現を、81%に cyclinE の発現を認めるなど頻度的には同様な傾向を認めたが、cyclinD1, cyclinE それぞれの発現と臨床病理学的所見との間に関連性は認められなかった。また、cyclinD1 の発現は、EGFR の発現と相関していたが (Table 3)、これは、G1/S 期において cyclinD1 が増殖因子刺激に反応して発現することを示唆するものと思われた。

p53 蛋白質は 53 kD の転写制御因子で知られる核内リン酸化蛋白質であり、コードする遺伝子は第17染色体長腕に位置している。多くの癌組織で p53 の変異、欠失が見いだされており、p53 遺伝子に変異を持つ癌がより悪性であるとの報告がある。p53 遺伝子産生蛋白質は正常状態では、存在時間が短く不安定なものであるが、癌化に伴って変異を起こした p53 遺伝子産生蛋白質は安定で、腫瘍細胞内に過剰に蓄積し、p53 免疫染色で陽性となる。

Bertheau らは乳癌では p53 の免疫染色性は36歳から50歳までの女性に予後因子として重要であったと報告している⁷⁾。

Kurozumi らは、甲状腺乳頭癌では、p53 の発現が10%未満に認めたとしており²⁸⁾、Ito らは、p53 の発現は甲状腺分化癌では認めなかったが、未分化癌に認めたと報告していることなどから²⁴⁾、p53 の発現は、乳頭癌ではほとんど認められないか稀なものであり、主として未分化癌に認められるものと考えられ、著者が検討した症例もいずれも高分化型乳頭癌であったため、p53 蛋白発現が認められなかったものと考えられた。

E2F は細胞周期の G1 期から S 期への移行制御を促す転写因子であり、E2F 活性と cyclinE/Cdk 活性とが急速に高まることで、G1/S 移行に重要な制限点をこえる機序の1つであると考えられており、癌細胞ではこれらによる制御が崩れていることが多いといわれている。胃癌では、E2F-1 mRNA の過剰発現は40%に認められることが報告されており、癌化に関わってい

るものとみなされているが、著者らの検討で E2F-1 の染色性の発現は甲状腺乳頭癌21例中1例のみに認められたに過ぎなかった。

しかしながら、E2F-1 の発現を認めた1例は男性患者であり、初診時より両側頸部リンパ節転移を認めており、癌細胞の血管侵襲が陽性で術後再発も認めたとことから、甲状腺乳頭癌では E2F-1 の関与は少ないが、E2F-1 の発現は比較的悪性度が高いことの指標になりうることを示唆するものと思われた。

p27遺伝子はヒト染色体 12p13 に存在し、p27 蛋白質は cyclinD1/Cdk 複合体に結合している蛋白質であり、細胞の増殖が停止するときその発現量が増加し、細胞の G0 期への誘導とともに、その状態で安定して停止しているのに重要であると考えられている。Lloyd らは、甲状腺においては、濾胞腺腫や正常組織に比べ、癌組織では p27 の発現の低下が認められたと報告しており³¹⁾、Wang らも、甲状腺乳頭癌では p27 の発現は89%に認めたとしたが、p27 の染色性が弱陽性以下のものが半数以上を占めていたと報告している⁵⁶⁾。

著者の検討でも、Wang らの報告と同様に、甲状腺乳頭癌において p27 の発現は81%とほぼ同率となっており、p27 の染色性が弱陽性または陰性のものが85.7%と過半数を占めたこととも一致している。

Tan らは乳癌でリンパ節転移を認めないものでは、p27 の免疫染色性を欠くことと予後との関連性が存在することを指摘しており⁵¹⁾、Yasui らも胃癌では p27 産生蛋白質の発現の減少が悪性度の指標になりうるとしているが⁵⁹⁾、著者の検討では、甲状腺乳頭癌では p27 蛋白質の発現の低下は、特に、臨床病理学的事項との間に有意な相関を認めなかったため、予後にはあまり関与していないのではないかとと思われる。

脱リン酸化酵素 cdc25 は G2/M 期において Cdk の最終的な活性化に必須であるが、胃癌では、cdc25A, cdc25B の過剰発現が、それぞれ40%、70%に認められ、cdc25B は胃癌の進行度、壁深達度、リンパ節転移と相関するといわれている^{27,60)}。現在まで甲状腺乳頭癌では cdc25B の発現を検討した論文はなく、著者の検討では、甲状腺乳頭癌では中等度以上の cdc25B の発現は47.6%と約半数に認め、甲状腺の発癌に cdc25B の過剰発現が大切な役割を果たしている可能性が示唆された。

また、甲状腺乳頭癌では、cdc25B の過剰発現は EGFR の発現および TGF- α の発現の双方に有意に相関が認められたが (Table 2)、これは、細胞膜表面に存在する EGFR などの増殖因子の受容体を介した細胞増殖シグナルが核に伝達されることで、G2/M 期に

において *cdc25B* が活性化を受けることを反映していると考えられる。

まとめると、甲状腺乳頭癌での細胞周期調節因子にみられた知見として *cdc25B* の過剰発現は47.6%とほぼ半分を占め、細胞増殖因子 *TGF- α* と *EGFR* の発現と有意に相関を認めるなど発癌に大切な役割を果たしている可能性が強いこと、*E2F-1* の発現はきわめて少ないことが示された。

3. 甲状腺乳頭癌における転移関連遺伝子の意義

接着因子および転移抑制遺伝子は癌の転移に関与しているといわれており、前者に相当するものとして *CD44* が、後者に相当するものとして *nm23* がある。

細胞外マトリックスの主要成分であるヒアルロン酸のレセプターとして見いだされた接着因子 *CD44* は癌細胞増殖、転移などに関わることが知られており^{34,42)}、多くのヒトの癌組織が多数の *CD44* バリエーションフォームを過剰発現していることが知られている。リンパ腫や子宮頸癌では *CD44-v6* 発現と予後に相関が報告されており、Kurosumi らは甲状腺乳頭癌の69%に *CD44-v6* の発現が陽性を認め、*CD44-v6* の発現は年齢およびリンパ節転移との間に相関を認めたことを報告しているが²⁸⁾、著者の検討では甲状腺乳頭癌では、*CD44* 免疫染色性と臨床病理学的事項との間に相関は認めなかった。しかしながら、唯一、*CD44* 染色性の強陽性(2+)を認めた男性症例1例は、著者が以前に行った検討において、マイクロサテライト領域での遺伝子不安定性を認めており、重複癌にて死亡していることなどから⁶¹⁾、*CD44* の発現が、転移や予後を反映する可能性を示唆するものと思われるが、今後の検討課題としたい。

nm23 はリンパ節転移抑制因子であることが指摘されているが、癌の原発部位により、*nm23* の発現とリンパ節転移が相関する場合と、逆相関する場合のあることが指摘されている。

すなわち *nm23* の発現とリンパ節転移に正の相関が認められたとする胃癌³⁶⁾に関する報告がある一方、両者の間に逆相関が認められたとする報告は胃癌³⁷⁾、子宮頸癌および子宮内膜癌³³⁾、卵巣癌⁵⁵⁾、乳癌⁴⁷⁾のそれぞれに関してみられるなど、*nm23* の発現とリンパ節転移に逆相関が認められたとする報告の方がどちらかといえば多い。

甲状腺癌における *nm23* の発現の報告は少なく、Zou らの報告によれば甲状腺未分化癌および Stage IV の甲状腺癌などに、*nm23* の著明な mRNA レベルでの過剰発現を認めたとしている⁶²⁾。

また、甲状腺癌における *nm23* の発現とリンパ節

転移との関連性については Arai らは35例の甲状腺乳頭癌において、*nm23-H1* が mRNA レベルで強い発現を認めたが、転移のあるリンパ節組織では mRNA レベルでの発現は減少していたとしており⁴⁾、同じく、Bertheau らは、*nm23* 産生蛋白は正常組織の93%に、甲状腺腫瘍の29%に認めたことを報告し、リンパ節転移および進展への関与を示唆しているが⁵⁸⁾、Farley らの報告では、甲状腺乳頭癌では、*nm23* の発現と遠隔部位におけるリンパ節転移の有無は相関性を認めなかったとしている¹⁵⁾。

著者の検討において甲状腺乳頭癌では、*nm23* 蛋白発現の抑制と気管傍リンパ節転移との間に相関を認めたことから、Bertheau らの指摘を確認するデータであると考えられる。

まとめると、甲状腺乳頭癌では、高頻度に気管傍リンパ節転移を認められ、*nm23* 蛋白の発現抑制と気管傍リンパ節転移との間には相関が認められた。しかし、内頸静脈リンパ節転移や無病生存率には関連性が認められなかった。

4. 予後との関連

甲状腺乳頭癌は予後が良好であるといわれるが、今回の検討でも5年生存率は90.5%と良好な結果が得られている。

甲状腺癌の予後因子には、これまでに性、年齢、腫瘍径、リンパ節転移、被膜外進展などが検討されており、Aksten らは甲状腺乳頭癌では男性、高齢、組織学的悪性度が甲状腺乳頭癌の生存率に相関していたと報告している。

今回の検討では、予後の指標としての5年生存率、無病生存率については、11種の各遺伝子産物発現および発現の抑制と有意な関連性を認めなかった。しかし、無病生存率は臨床病理学的事項の内、男性群、臨床病期進行群、内頸静脈リンパ節転移陽性群および重複癌陽性群において有意に低くなっていた。

男性であることは、甲状腺乳頭癌の予後を悪くする因子の1つと考えられ、以前に著者が検討を行った結果、甲状腺乳頭癌でマイクロサテライト領域での遺伝子不安定性を認めた2例は、いずれも男性症例であり、うち1例は重複癌を併発し、死亡していたことなどから考察すると、甲状腺乳頭癌では、男性であることは、少なくとも再発率を高めるなど比較的予後不良の因子になりうる。

年齢に関しては、高齢であることが予後不良の因子であるといった報告が多く、春田らも、高齢者の乳頭癌は浸潤性が高いことを明らかにしており¹⁹⁾ Cady らも甲状腺乳頭癌の危険因子の1つに年齢を用いてい

るが¹¹⁻¹³⁾, 今回の著者の検討では, 年齢については, 甲状腺乳頭癌の5年生存率や無病生存率に有意差を認めなかった。

また, 組織学的悪性度については, 著者が検討した21例については, すべて高分化型乳頭癌であったため検討はできなかった。腫瘍径, 被膜外進展については, 甲状腺乳頭癌の生存率や無病生存率に有意な関連性を認めなかった。

次に, 甲状腺乳頭癌の予後因子としてリンパ節転移も検討されているが⁵³⁾, リンパ節転移が予後に関連するかは疑問視されている^{25,53)}。リンパ節転移が局所再発には重要であるが生命予後には影響しないといったいくつかの報告がある^{18,49)}。

今回の検討では気管傍リンパ節転移の有無で5年生存率や無病生存率に有意差を認めなかったが, 内頸静脈リンパ節転移陽性群では無病生存率は有意に低かったことから, 著者の検討は, 甲状腺乳頭癌ではリンパ節転移が局所再発には重要であるが, 生命予後には影響しないといった報告と矛盾しないと思われた^{18,49)}。

以上の結果, 甲状腺乳頭癌においては, 1) 増殖因子のうち *c-Met* の発現は認められなかったこと, 2) 47.6%に認められた *cdc25B* の過剰発現は *TGF- α* と *EGFR* の発現に相関を認め, 細胞増殖シグナルにより G2/M 期において *cdc25B* が活性化を受ける可能性があり, 発癌に *cdc25B* の過剰発現が大切な役割を果たしている可能性があること, 3) 61.9%に認められた *EGFR* の発現は *cyclinD1* の発現にも相関を認め, 細胞増殖シグナルにより G1/S 期において *cyclinD1* が活性化を受けている可能性があること, 4) *E2F-1* 免疫活性陽性例の割合は4.8%ときわめて低いが, 予後と関連する可能性のあること, 5) *nm23* 蛋白発現の抑制と気管傍リンパ節転移に相関が認められ, *nm23* 遺伝子は甲状腺乳頭癌においても転移抑制因子として機能している可能性があることが新しい知見として示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始懇切なる御指導, 御校閲を賜った耳鼻咽喉科学講座・夜陣紘治教授, 広島大学医学部病理学第一講座・田原栄一名誉教授に深甚なる謝意を表します。また, 本研究について終始御指導, 御助力下さいました本学第一病理学教室・横崎宏助教授に深く感謝致します。併せて, 御指導, 御協力下さいました本学第一病理学教室・高谷雅善技官, 広島市医師会臨床センター病理部・恵木紀子氏ならびに黒墨園美氏に深謝致します。

参 考 文 献

1. Aasland, R., Lillehang, J. R., Male, R., Josendal, O., Varhaug, J. E. and Kleppe, K. 1988. Expression of oncogenes in thyroid tumors: Coexpression of *c-erbB-2/neu* and *c-erbB*. Br. J. Cancer 57 : 358-363.
2. Akslen, L. A., Myking, A. O., Salvesen, H. and Varhaug, J. E. 1993. Prognostic impact of EGF-receptor in papillary thyroid carcinoma. Br. J. Cancer 68 : 808-812.
3. Akslen, L. A. and Varhaug, J. E. 1995. Oncoproteins and tumor progression in papillary thyroid carcinoma. Cancer 76 : 1643-1654.
4. Arai, T., Watanabe, A., Onodera, M., Yamashita, T., Masunaga, A., Itoyama, S., Itoh, K. and Sugawara, I. 1993. Reduced *nm23-H1* messenger RNA expression in metastatic lymph nodes from patients with papillary carcinoma of the thyroid. Am. J. Pathol. 142 : 1938-1944.
5. Attie, J. N., Khafif, R. A. and Steckler, R. M. 1971. Elective neck dissection in papillary carcinoma of the thyroid. Am. J. Surg. 122 : 464-471.
6. Attie, J. N., Moskowitz, G. W., Margouleff, D. and Levy, L. M. 1979. Feasibility of total thyroidectomy in the treatment of thyroid carcinoma: postoperative radioactive iodine evaluation of 140 cases. Am. J. Surg. 138 : 555-560.
7. Bertheau, P., Stenberg, S. M. and Merino, M. J. 1998. *c-erbB-2*, *p53*, and *nm23* gene product expression in breast cancer in young women. Hum. Pathol. 29 : 323-329.
8. Bertheau, P., De La Rosa, A., Steeg, P. S. and Merino, M. J. 1994. *nm23* protein in neoplastic and nonneoplastic thyroid tissues. Am. J. Pathol. 145 : 26-32.
9. Bos, J. L. 1989. *ras* oncogenes in human cancer: A Review. Cancer Res. 49 : 4682-4689.
10. Byar, D. P., Green, S. B., Dor, P., Williams, E. D., Colon, J., Glise, H. A., Mayer, M., Sylvester, R. J. and Glabbeke, M. V. 1979. A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. thyroid cancer cooperative group. Eur. J. Cancer 15 : 1033-1041.
11. Cady, B., Rossi, R., Silverman, M. and Wool, M. 1985. Further evidence of the validity of risk group definition in differentiated thyroid carcinoma. Surgery 98 : 1171-1178.
12. Cady, B. and Rossi, R. 1988. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. Surgery 104 : 947-953.
13. Cady, B., Sedgwick, C. E., Meissner, W. A., Wool, M. S., Salzman, F. A. and Werber, J. 1979. Risk factor analysis in differentiated thyroid

- cancer. *Cancer* 43 : 810-820.
14. **Castellani, R., Visscher, D. W., Wykes, S., Sarkar, F. H. and Crissman, J. D.** 1994. Interaction of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. *Cancer* 73 : 344-349.
 15. **Farley, D. R., Eberhardt, N. L., Grant, C. S., Schaid, D. J., van Heerden, J. A., Hay, I. D. and Khosia, S.** 1993. Expression of a potential metastasis suppressor gene (nm23) in thyroid neoplasms. *World J. Surg.* 17 : 615-620.
 16. **Galaktionov, K., Lee, A. K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M. and Beach, D.** 1995. CDC25 phosphatases as potential human oncogenes. *Science* 269 : 1575-1577.
 17. **Gasparotto, D., Maestro, R., Piccinin, S., Vukosavljevic, T., Barzan, L., Sulfaro, S. and Boiocchi, M.** 1997. Overexpression of CDC25A and CDC25B in head and neck cancers. *Cancer Res.* 57 : 2366-2368.
 18. **Hannequin, P., Liehn, J. C. and Delisle, M. J.** 1986. Multifactorial analysis of survival in thyroid cancer. *Cancer* 58 : 1749-1755.
 19. 春田るみ 1991. ヒト甲状腺癌における増殖因子、癌遺伝子産物およびエストロゲンレセプターの発現とその生物学的意義. *広大医誌* 39 : 319-342.
 20. **Haugen, D. R., Akslen, L. A., Varhaug, J. E. and Lillehaug, J. R.** 1992. Expression of c-erbB-2 protein in papillary thyroid carcinomas. *Br. J. Cancer* 65 : 832-837.
 21. **Haugen, D. R., Akslen, L. A., Varhaug, J. E. and Lillehaug, J. R.** 1996. Expression of c-erbB-3 and c-erbB-4 proteins in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 56 : 1184-1188.
 22. **Hay, I. D., Grant, C. S., Taylor, W. F. and McConahey, W. M.** 1987. Ipsilateral lobectomy vs bilateral lobar resection on papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery* 102 : 1088-1095.
 23. 家根且右, 田中 治, 宮原 裕, 松永 喬 1993. 甲状腺腫瘍における上皮増殖因子 (Epidermal growth factor receptor) およびエストロゲン受容体の発現. *日耳鼻* 96 : 787-790.
 24. **Ito, T., Seyama, T., Mizuno, T., Tsuyama, N., Hayashi, T., Hayashi, Y., Dohi, K., Nakamura, N. and Mitoshi, A.** 1992. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res.* 52 : 1369-1371.
 25. 河西信勝, 坂本昭彦 1983. 甲状腺癌の悪性転化. *癌の臨床* 29 : 105-110.
 26. 甲状腺外科検討会編 1996. 甲状腺癌取扱い規約. 第5版 金原出版株式会社, 東京.
 27. **Kudo, Y., Yasui, W., Ue, T., Yamamoto, S., Yokozaki, H., Nikai, H. and Tahara E.** 1997. Overexpression of cyclin-dependent kinase-activating Cdc25B phosphatase in human gastric carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* 88 : 947-952.
 28. **Kurozumi, K., Nakao, K., Nishida, T., Nakahara, M., Ogino, N. and Tsujimoto, M.** 1998. Significance of biologic aggressiveness and proliferating activity in papillary thyroid carcinoma. *World J. Surg.* 22 : 1237-1242.
 29. 黒田嘉紀, 牧嶋和美, 杉本卓矢 1996. 唾液腺腫瘍の腫瘍細胞増殖能と癌遺伝子 (c-erbB-2) 産生蛋白の発現に関する免疫病理組織学的研究. *日耳鼻* 99 : 353-360.
 30. **Lin, J. T., Wu, M. S., Shun, C. T., Lee, W. J., Sheu, J. C. and Wang, T. H.** 1995. Occurrence of microsatellite instability in gastric carcinoma is associated with enhanced expression of c-erbB-2 oncoprotein. *Cancer Res.* 55 : 1428-1430.
 31. **Lloyd, R. V., Jin, L., Qian, X. and Kulig, E.** 1997. Aberrant expression p27kip1 in endocrine and other tumors. *Am. J. Pathol.* 150 : 401-407.
 32. **Loeb, L. A.** 1994. Microsatellite instability: Marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 54 : 5059-5063.
 33. **Marone, M., Scambia, G., Ferrandina, G., Giannitelli, C., Benedetti-Panici, P., Iacovella, S., Leone, A. and Mancuso, S.** 1996. Nm23 expression in endometrial cancer: inverse correlation with lymph node involvement and myometrial invasion. *Br. J. Cancer* 74 : 1063-1068.
 34. **Matsumura, Y. and Tarin, D.** 1992. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340 : 1053-1058.
 35. **Mazzaferri, E. L. and Young, R. L.** 1981. Papillary thyroid carcinomas: a 10-year follow-up report of the impact of therapy in 576 patients. *Am. J. Med.* 70 : 511-518.
 36. **Muller, W., Schneiders, A., Hommel, G. and Gabbert, H. E.** 1998. Expression of nm23 in gastric carcinoma. *Cancer* 83 : 2481-2487.
 37. **Nakayama, H., Yasui, W., Yokozaki, H. and Tahara, E.** 1993. Reduced expression of nm23 is associated with metastasis of human gastric carcinomas. *Jpn J. Cancer Res.* 84 : 184-190.
 38. 中村靖司, 覚道健一 1996. 甲状腺癌 病理と臨床 14 : 138-142.
 39. **Namba, H., Gutman, R. A., Matsuo, K., Alvarez, A. and Fagin, J. A.** 1990. H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71 : 223-229.
 40. **Ness, G. O., Haugen, D. R., Varhaug, J. E., Akslen, L. A. and Lillehaug, J. R.** 1996. Cytoplasmic localization of EGF receptor in papil-

- lary thyroid carcinomas: association with the 150-kDa receptor form. *Int. J. Cancer* **65** : 161-167.
41. **Noguchi, S., Noguchi, A. and Murakami, N.** 1970. Papillary carcinoma of the thyroid I. Developing pattern of metastasis. *Cancer* **26** : 1053-1060.
 42. 岡本 勇, 佐谷秀行 1998. CD44と癌転移. *実験医学* **16** : 86-92.
 43. **Oyama, T., Ichikawa, E., Sano, T., Kashiwabara, K., Fukuda, T. and Nakajima, T.** 1998. c-Met expression of thyroid tissue with special reference to papillary carcinoma. *Pathology Int.* **48** : 763-768.
 44. **Rossi, R. L., Cady, B., Silverman, M. L., Wool, M. S., ReMine, S. G., Hodge, M. B. and Salzman, F. A.** 1988. Surgically incurable well-differentiated thyroid carcinoma: Prognostic factors and results of therapy. *Arch. Surg.* **123** : 569-573.
 45. **Rossi, R. L., Nieroda, C., Cady, B. and Wool, M. S.** 1985. Malignancies of the thyroid gland: the Lahey Clinic experience. *Surg. Clin. North. Am.* **65** : 211-230.
 46. **Ruco, L. P., Ranalli, T., Marzullo, A., Bianco, P., Prat, M., Comoglio, P. M. and Baroni, C. D.** 1996. Expression of met protein in thyroid tumors. *J. Pathol.* **180** : 266-270.
 47. **Russel, R. L., Pederson, A. N., Kantor, J., Geisinger, K., Zbieranski, N., Townsend, A., Shelton, B., Brunner, N. and Kute, T. E.** 1998. Relationships of nm23 to proteolytic factors, proliferation and motility in breast cancer tissues and cell lines. *Br. J. Cancer* **78** : 710-717.
 48. 坂本昭彦, 河西信勝, 小川伸一郎, 北川知行, 菅野晴夫 1980. 甲状腺分化癌. *癌の臨床* **26** : 131-135.
 49. **Simpson, W. J., McKinney, S. E., Carruthers, J. S., Gospodarowicz, M. K., Sutcliffe, S. B. and Panzarella, T.** 1987. Papillary and follicular thyroid cancer. Prognostic factors in 1578 patients. *Am. J. Med.* **83** : 479-488.
 50. **Stricker, J. G., Zheng, J., Shu, Q., Burgart, J., Albertd, S. R. and Shibata D.** 1994. P53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: When Guardians Fail. *Cancer Res.* **54** : 4750-4755.
 51. **Tan, P., Cady, B., Wanner, M., Worland, P., Cukor, B., MagiGalluzzi, C., Lavin, P., Draetta, G., Pagano, M. and Loda, M.** 1997. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small invasive breast carcinomas. *Cancer Res.* **57** : 1259-1263.
 52. **Tauchi, K., Hori, S., Itoh, H., Osamura, RY., Tokuda, Y. and Tajima, T.** 1989. Immunohistochemical studies on oncogene products (c-erbB-2, EGFR, c-myc) and estrogen receptor in benign and malignant breast lesions. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* **416** : 65-73.
 53. **Thorenson, S. O., Akslen, L. A., Glatte, E., Haldorsen, T., Lund, E. V. and Schoultz, M.** 1989. Survival and prognostic factors in differentiated thyroid cancer: a multivariate analysis of 1055 cases. *Br. J. Cancer* **59** : 231-235.
 54. **Umekita, Y., Enokizono, N., Sagara, Y., Kuriwaki, K., Takasaki, T., Yoshida, A. and Yoshida, H.** 1992. Immunohistochemical studies on oncogene products (EGFR, c-erbB-2) and growth factors (EGF, TGF- α) in human breast cancer: their relationships to oestrogen receptor status, histological grade, mitotic index and nodal status. *Virchows Archiv A (Pathol. Anat.)* **420** : 345-351.
 55. **Viel, A., Dall'Agnesse, L., Canzonieri, V., Sopracordevole, F., Capozzi, E., Carbone, A., Visentin, M. C. and Boiocchi, M.** 1995. Suppressive Role of the Metastasis-related nm23-H1 Gene in Human Ovarian Carcinomas: Association of High Messenger RNA Expression with Lack of Lymph Node Metastasis. *Cancer Res.* **55** : 2645-2650.
 56. **Wang, S., Wu, J., Savas, L., Patwardhan, N. and Khan, A.** 1998. The role of cell cycle regulatory proteins, cyclinD1, cyclinE, and p27 in thyroid carcinogenesis. *Hum. Pathol.* **29** : 1304-1309.
 57. 渡辺慶一 1995. 免疫組織化学の基本原則とその応用. *組織細胞化学* 1995, p.81-91. 日本組織細胞化学会編, 学際企画, 東京.
 58. **Wright, P. A., Lemoine, N. R., Mayall, E. S., Wyllie, E. S., Hughes, D., Williams, E. D. and Wynford-Thomas D.** 1989. Papillary and follicular thyroid carcinomas show a different pattern of ras oncogene mutation. *Br. J. Cancer* **60** : 576-577.
 59. **Yasui, W., Kudo, Y., Semba, S., Yokozaki, H. and Tahara, E.** 1997. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn. J. Cancer Rws.* **88** : 625-629.
 60. 安井 弥 1999. 胃の多段階発癌の分子機構. *Molecular Medicine* **36** : 389-392.
 61. **Yamamoto, T.** 1999. Infrequent microsatellite instability in papillary carcinomas of the thyroid. *Hiroshima J. Med. Sci.* **48** : 95-98.
 62. **Zou, M., Shi, Y., Al-Sedairy, S. and Farid, N. R.** 1993. High level of nm23 gene expression in advanced stage of thyroid carcinomas. *Br. J. Cancer* **68** : 385-388.

Expression and Biological Significance of Cancer-related Gene Products in Human Papillary Thyroid Carcinomas

Toshiharu YAMAMOTO

Department of Otorhinolaryngology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima
(Director: Prof. Koji YAJIN)

Twenty cases of papillary carcinoma of the thyroid, embedded in paraffin wax, was analyzed immunohistochemically for the expression of *c-erbB-2*, EGFR, EGF, TGF- α , c-Met, cyclinD1, cyclinE, *p53*, *cdc25B*, E2F-1, CD44, *nm23* and *p27*.

Significant statistical correlation was observed between reduced *nm23* immunoreactivity and paratracheal lymph node metastasis.

In addition, overexpression of *cdc25B* and cyclinD1 was significantly correlated with that of EGFR.

These result suggests that the staining intensity of *nm23* is associated with metastatic potential inversely in papillary carcinomas of the thyroid. Overexpression of *cdc25B* and cyclinD1 would be important factor in thyroid carcinogenesis.