

Sedliarou Ilya 論文内容の要旨

主 論 文

The *BRAF*^{T1796A} transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma

(甲状腺微小癌における *BRAF*^{T1796A} 遺伝子変異)

イリヤ・セドリアロウ、ウラジミール・サエンコ、ディミトリー・ランツォフ、
タチアナ・ログノヴィッチ、難波裕幸、アレクサンドロ・アブロシモフ、
エウゲニー・ルシュニコフ、熊谷敦史、中島正洋、セリック・メイルマノフ、
三根真理子、林徳真吉、山下俊一

(International Journal of Oncology 25: 1729-1735, 2004)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(主任指導教員：山下俊一教授)

緒 言

甲状腺乳頭癌 (PTC) は甲状腺癌の大半を占め、臨床的にはおよそ 1 万人に 1 人の割合で発症し、通常予後良好である。しかし、PTC のハイリスク患者の中では再発率が高く、癌関連死亡率も 12% と報告されている。近年 PTC においては、*BRAF* 遺伝子のエクソン 15 コドン 600 に限局した点突然変異 (*BRAF*^{T1796A}) が高頻度に検出され、その結果細胞内情報伝達系である MAPK 経路の恒常的活性化と細胞増殖の促進が示唆され、*BRAF* 変異と PTC の臨床病期および、遠隔転移との関連性も報告されている。

一方、PTC のうち 1cm 以下のものは微小癌 (PMC) と呼ばれ、年齢の増加と共に偶発的な発見頻度が高く、特に剖検症例では、2.3~5.2% から 10% 以上にみられる。大半の症例が無症候性であるが、なぜ生涯微小癌のまま留まるのか、あるいは小さいにも関わらず増殖が速い特徴を持つのか、さらには局所再発、転移する PMC も存在するのか、それらの遺伝子異常の特徴を明らかにする必要がある。しかし、PMC の進行に関わる詳細な分子機構は未だ不明で、*BRAF* 変異との関連も明らかでない。

以上の背景から本研究では PMC 症例における *BRAF* 変異の頻度分析を行い、*BRAF* 変異と PMC の生物学的挙動の関連について検討した。

対象と方法

- 1) 対象；腫瘍径 1cm 以下の甲状腺微小癌 (PMC) 手術症例で日本人 15 症例 (長崎大学医学部・歯学部附属病院) 及びロシア人 31 症例 (ロシア医学放射線研究センター)。研究に際し両施設ともに倫理委員会の承諾を得た上で、各症例の臨床病歴、病理組織所見とパラフィン包埋標本を使用した。

- 2) DNA 抽出；各症例のパラフィンブロックを 5 μ m で薄切した未染色標本の腫瘍部をレーザーマイクロダイセクション法を用いて切り出し、DEXPAT 試薬（タカラバイオ株式会社）を用いてゲノム DNA を抽出した。
- 3) ダイレクトシーケンシング；*BRAF* エクソン 15 の領域を PCR で増幅・精製し、ABI PRISM 3700 Analyzer（アプライドバイオシステム社）を用いて塩基配列を調べた。
- 4) PCR-RFLP 法；*BRAF*^{T1796A} 変異がある場合のみ制限酵素切断部位を含むプライマーを用い *BRAF* エクソン 15 のホットスポット領域を PCR で増幅した。PCR プロダクトを制限酵素で切断しアガロースゲル電気泳動により変異の有無を確認した。

結 果

ダイレクトシーケンシング及びPCR-RFLPによる *BRAF*^{T1796A} の解析結果は完全に一致した。解析を行った症例中検出された *BRAF* 変異は T1796A のみであった。

- 1) *BRAF*^{T1796A} は 46 症例中 13 例 (28.2%)（日本人 15 症例中 4 例 (26.6%)、ロシア人 31 症例中 9 例 (29.0%)）で検出された。微小癌症例で *BRAF*^{T1796A} は高頻度にみられ、地域間での差がないことが示唆された。
- 2) 年齢、性別と PMC の *BRAF*^{T1796A} との間に有意な関連は見られなかった。
- 3) 病理組織学的には、*BRAF*^{T1796A} は線維化間質を背景に索状配列を成して増生する低分化型の PMC では、10 例中 6 例に検出され、高分化型の Follicular variant では 16 例中 1 例しか検出されなかった。
- 4) リンパ節転移、甲状腺外浸潤、遠隔転移と *BRAF*^{T1796A} との間に有意な関連はみられなかった。

考 察

BRAF^{T1796A} は、腫瘍径 1cm 以上の成人発症甲状腺乳頭癌では、約 50% の頻度で検出される。今回の研究により、PMC では、28.3% の頻度で認められることを初めて報告した。*BRAF*^{T1796} の遺伝子異常は、悪性黒色腫に頻度が高く、次いで成人甲状腺乳頭癌に高頻度であるが、小児発症例では極めて稀である。また *Ret/PTC* 再配列遺伝子異常が、同じ乳頭癌でも乳幼児発症や放射線被ばく症例に高頻度に認められるのと対照的で、*BRAF*^{T1796} 異常は甲状腺乳頭癌発症の後期に関与すると考えられている。当初 PMC では *BRAF* 変異は低頻度と予想されたが、今回の解析では PMC の 30% 近くに検出された。

病理組織学的には、低分化型を含む PMC において *BRAF*^{T1796A} の頻度が高く、高分化型の組織像を呈する PMC では頻度が有意に低いことが判明した。このことより、*BRAF*^{T1796A} と低分化度との相関が示唆された。しかしながら、臨床経過データからは、*BRAF*^{T1796A} とリンパ節転移、甲状腺外浸潤、遠隔転移との相関性は認められなかった。したがって、この結果により、*BRAF*^{T1796A} は PMC の診断時点では、転移、浸潤といった悪性度の高い挙動を決定する因子としては十分でなく、PMC が転移、浸潤を起こすためには他の遺伝子変異の役割が必要と推測された。再発についても、*BRAF*^{T1796A} の有無による有意差を認めなかったが、さらに症例数を増やし、各症例において 10 年以上の長期臨床経過を追い *BRAF*^{T1796A} と臨床経過の関連を追跡してゆくことが重要と考えられた。今後、PMC の手術適応や予後予測についての更なる研究が不可欠である。