

林田直美 論文内容の要旨

主 論 文

A Rapid and Simple Detection Method for the *BRAF*^{T1796A} Mutation in Fine-Needle Aspirated Thyroid Carcinoma Cells

(簡便、かつ高感受性解析法による甲状腺腫瘍吸引細胞サンプルからの
BRAF 遺伝子変異解析)

林田直美、難波裕幸、熊谷敦史、林徳眞吉、大津留晶、伊東正博、
サエンコ・ウラディミール、前田茂人、兼松隆之、山下俊一

Thyroid・14 卷 11 号 910—915 2004 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：兼松隆之教授)

緒 言

BRAF は serine-threonine kinase である RAF ファミリー蛋白の一つであり、MEK を活性化させる。近年、BRAF 遺伝子の活性型変異が Melanoma をはじめ多くの癌組織で見られることが報告された。甲状腺癌では、我々を含めいくつかのグループが乳頭癌において Melanoma について高頻度 (30~50%) に BRAF 遺伝子変異がみられることを報告した。甲状腺腫瘍での BRAF の変異の特徴は、正常甲状腺や良性甲状腺腫では認めず、乳頭癌にのみ見られ、しかも、変異は、ほとんど BRAF exon15 の kinase domain コドン 600 (ヌクレオチド 1799) に局限している。変異した BRAF 蛋白により kinase 活性は恒常的に上昇し MEK-MAPK 経路を活性化する。また、BRAF 遺伝子変異は甲状腺癌の予後不良に相関があることより、BRAF 変異を術前に判定することは、予後の予測と治療法の選択に応用できる可能性がある。

BRAF 遺伝子変異について、甲状腺吸引細胞を用いて解析が可能であるかどうか、また、その術前診断への応用の可能性について簡便かつ迅速な方法を開発して検討した。

対象と方法

対象；甲状腺腫瘍の術前症例 21 例と当科で手術を行った甲状腺腫瘍 130 例。甲状腺腫瘍の切除標本は切除後直ちに -80 度に凍結した。22G 針をつけたシリンジを用いて通常の穿刺吸引を行った。穿刺吸引細胞は二人の病理医により、乳頭癌 72 例、濾胞癌 8 例、未分化癌 2 例、濾胞腺腫 18 例、髄様癌 1 例、悪性リンパ腫 2 例、腺腫様甲状腺腫 27 例と診断された。臨床病期は International Union Against Cancer (UICC) の分類により、TNM に沿って分類された。また、研究のプロトコールは長崎大学倫理

委員会によって承認され、研究に用いた全症例より書面によるインフォームドコンセントを得た。

方法 ; QIAamp DNA Mini Kit を用いて細胞および組織から DNA を抽出し、BRAF エクソン 15 に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。次に PCR 反応液を Min Elute PCR Purification Kit を用いて purify し、DNA を、制限酵素 (Xba-I) で処理し、10%アクリルアミドゲルで電気泳動を行い、バンドを確認した。Xba-I は TCTAG A を認識する酵素であり、プライマーは 2 塩基のミスマッチ(下線)をつけることによって Xba-I により認識され、Mutant type でのみ切断されるようにデザインした。また、PCR-RFLP 解析とは別のプライマーを用いて PCR 後、Big Dye Premix を用いて sequence PCR を施行した。これを ABI PRISM 3100 にてシーケンス解析した。

結 果

今回用いた、PCR-RFLP 法の精度検定では、Mutant allele と Wild allele の比が 1 : 35 でも検出可能であった。

甲状腺組織からの穿刺吸引細胞サンプル 130 症例の PCR-RFLP 解析では、BRAF 変異を認めた症例は全例が乳頭癌であり、その頻度は乳頭癌 71 例中 37 例(51.4%)であった。悪性腫瘍の他の組織型や良性腫瘍では、BRAF 変異は認められなかった。この結果の精度を見るために、乳頭癌 14 例でシーケンス解析を行ったところ、PCR-RFLP の結果と一致していた。

また、インフォームドコンセントが得られた 21 症例で、術前細胞診の際の洗浄液から PCR-RFLP 法で BRAF 変異を検索し、細胞診で suspicious であった 1 例で BRAF 変異陽性であり、術後病理診断は乳頭癌であった。

BRAF 変異と TMN 病期分類との関連では、stage4 との関連は明らかではなかったものの、stage1 から stage3 までは BRAF 変異と有意な相関を認めた。

さらに、BRAF 変異と腫瘍サイズの相関を見たところ、1cm 以下と 3cm 以上で有意差を認めた。

考 察

甲状腺腫瘍組織を用いた吸引細胞による BRAF 変異解析により、良性腫瘍では全く変異をみとめず、乳頭癌の 51.4%に変異を認めた。今回の解析方法 PCR-RFLP では、BRAF 変異部にあわせてプライマーをデザインすることにより Xba-1 制限酵素認識部位を形成することを利用し、シーケンス法を用いずに簡便に解析ができた。この方法はきわめて鋭敏でありシーケンスで判定の難しかった症例でも、BRAF 遺伝子変異の診断が可能であった。また、解析にかかる時間も短く、吸引細胞サンプルから、短時間 (約 5 時間) で変異を検出することが可能であった。術前細胞診のサンプルを用いての PCR-RFLP 法による BRAF 変異解析は、簡便かつ信頼性の高い方法として日常臨床で施行可能であり、今後甲状腺乳頭癌の細胞診の補助診断として、また進行度予測因子、治療法の選択などに臨床応用されることが期待できる。