

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目:若手研究(B)  
 研究期間:2007-2008  
 課題番号:19790651  
 研究課題名(和文) BRAF 遺伝子周囲の遺伝子多型を指標とした腫瘍クローナリティと予後との関連性  
 研究課題名(英文) Analysis of tumor clonality using SNPs surrounding BRAF gene and its association with clinicopathological features.  
 研究代表者  
 ログノビッチ タチアナ (Rogounovitch Tatiana)  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号:30423643

研究成果の概要:甲状腺乳頭癌(PTC)のクローナリティを、X染色体上のHUMARA遺伝子の不活性化を指標として解析したところ、多くのPTCは単クローン性であったが、多クローン性のPTCも存在した。次に、BRAF変異とその周囲の遺伝子多型部位を指標として用いたところ、驚くべき事に、単クローン性、多クローン性の両方の腫瘍に、片アレルのみ、もしくは両アレルに変異BRAFが見つかった(ただし、ホモ接合性ではない)。BRAF変異はおそらくヘテロ接合性、片アレルに生じるが、腫瘍の進展に伴い、相同染色体組換えの様なメカニズムにより、別のアレルに移る可能性が示唆された。また、単一の腫瘍といえども、複数の細胞に遺伝子変異が生じた多クローン性の起源を持つものもあると考えられた。

## 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・内分泌学

キーワード:甲状腺乳頭癌、BRAF変異、クローナリティ、アレル、対立遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 一般的に、悪性腫瘍は一つの細胞を起源として発生するという考えが受け入れられていると言えるが、確固とした証拠がある訳ではない。多くの研究はX染色体におけるHUMARA遺伝子の不活性化を使った検討を行っているが、技術的な制限がある事も事実である。

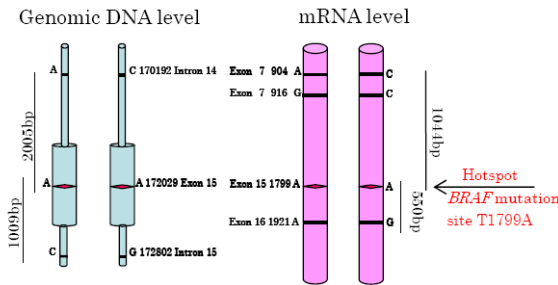
(2) BRAF 遺伝子変異は成人の甲状腺乳頭癌

(PTC)において、最も頻度が高い(40%)遺伝子異常である事が分かっており、予後不良との関連が報告されている。しかしながら、BRAF変異を持つすべてのPTCの悪性度が高い訳ではなく、またある程度の頻度で微少癌にもこの変異は発見されている。つまり、BRAF変異の有無だけではない、何か他のメカニズムがPTCの悪性度と関連している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

BRAF 遺伝子は、変異の hot spot であるエクソン 15 の周囲に 2 つの遺伝子多型部位があり、これは腫瘍のクローナリティを判断する上で、有用な分子マーカーとして使う事が出来る事を発見した。さらに mRNA レベルでも、エクソン 7 とエクソン 16 に遺伝子多型部位があり、この部位も使用する事が出来る(下図参照)。

### BRAF mutation and surrounding polymorphic sites



これらの遺伝子多型部位を使って、本研究では以下の事柄を明らかにする目的を設定した。

- (1) BRAF 変異、X 染色体不活性化を指標として、PTC が単クローン性か多クローン性を判定する。この際、複数の異なる組織パターン(亜型)を含む PTC 標本を用いる。
- (2) 生細胞のソーティング技術を使用して、個々の細胞レベルでの発現している BRAF のアレルを確認する。
- (3) (2)において、野生型のアレルと変異したアレル間で mRNA の発現レベルに差異があるのかどうかを検討する。

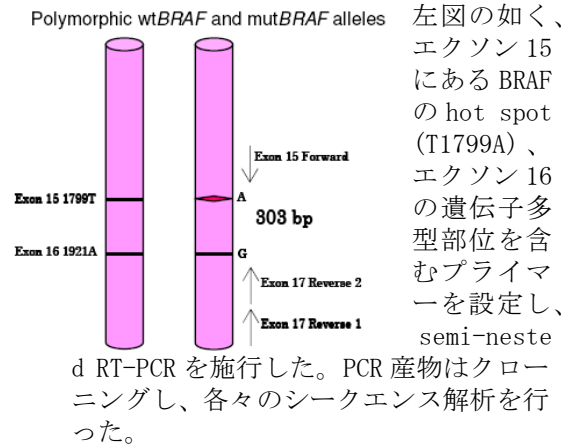
## 3. 研究の方法

- (1) PCR を用いた BRAF 変異の解析
  - a. 遺伝子多型部位と BRAF 変異の hot spot を含む領域を PCR で増幅する
  - b. PCR 産物を TA ベクターにクローニングする。
  - c. 多数のクローンのシーケンス解析を行う。これにより、BRAF 変異が生じたアレルを確認する。
- (2) マイクロダイセクション
 

複数の異なった組織パターンを持つ(乳頭状パターン、濾胞状パターンなど)凍結 PTC 組織から、それぞれの部位を顕微鏡下で切り出し、DNA、RNA 抽出を行った。
- (3) 単一細胞ソーティング
 

FACS Vantage SE と CloneCyt オプションを用い、単一の細胞を 96 ウェルプレートのそれぞれのウェルに分注した。

## (4) 単一細胞からの semi-nested RT-PCR

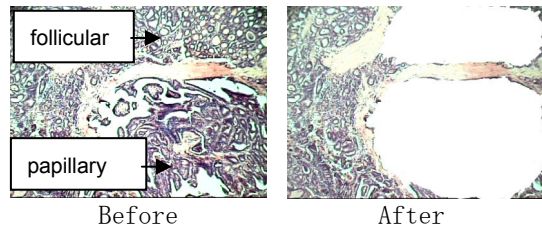


## (5) HUMARA 遺伝子を用いた X 染色体不活性化の解析

DNA のメチル化特異的な切断酵素である HhaI による処理と、FAM 標識したプライマーを用いた PCR 増幅を施行し、PCR 産物は、ABI Prism 3100 DNA Analyzer と GeneScan 3.1.2 ソフトウェアにて解析した。

## 4. 研究成果

- (1) 複数の異なる組織パターン(乳頭性パターンや濾胞性パターン)から成る 34 の女性甲状腺乳頭癌凍結切片より、それぞれのパターン部位をマイクロダイセクションにより単離し、遺伝子学的解析を行った(下図参照)。



BRAF 変異陽性率は非常に高く(30/34, 88.2%)、これはおそらく患者が比較的高齢(平均 51.3 歳)であったためと考えられた。BRAF 変異陽性であった 30 例のうち、全ての組織パターンで BRAF 変異が陽性であったものが 27 例(90%)、2 例では濾胞性パターン部位に、残りの 1 例には乳頭性パターン部位には変異が認められなかった。

(2) X 染色体における HUMARA 遺伝子不活性化の検討の結果、HUMARA 部位がヘテロ接合であり、解析に有用なのは 32 例であった。そのうち、25 例、78.1%は単クローン性、7 例、21.9%が多クローン性であると判断された。

(3) BRAF 変異と腫瘍クローナリティの関連すべての組織パターン部位に BRAF 変異を認めた 25 例のうち、20 例、80%は単クローン性であった。残りの多クローン性の腫瘍では、以下の様に複雑なパターンが確認された。1 例はそれぞれのパターン部位は単クローン性であったが、部位によって不活化された X 染色体が異なっていた。2 例はそれぞれのパターン部位が多クローン性であり、残りの 2 例は、一つの部位が単クローン性で、別の部位は多クローン性であった。パターン部位によって BRAF 変異の有無が異なっていた 3 例に関しては、2 例が単クローン性、1 例が多クローン性であった。

(4) BRAF 変異を持つ PTC において、BRAF 変異が対立遺伝子のどちらで起こったかを解析した。前述の様に 1921 A/G の遺伝子多型を持つ PTC は、29 例中 6 例であり、この 6 例は、いずれも乳頭状パターン部位と濾胞状パターン部位から成っていた。X 染色体の不活性化の状態によると、6 例中 4 例が単クローン性、2 例が多クローン性であった。単クローン性の 4 例中、1 例は BRAF 変異が同じアレル上のみに見られた。別の 1 例は、乳頭状パターン部位には同じアレル上に BRAF 変異が見られたが、濾胞状パターン部位には両アレルに変異が見られた。残りの 2 例では、両パターン部位で両方のアレルに変異が見つかった。

(6) 単一細胞ソーティングからの RT-PCR  
BRAF 変異を持った甲状腺癌細胞株 (ARO、KTC-1) と甲状腺癌や正常甲状腺組織からの初代培養細胞を用い、single cell sorting からの RT-PCR を施行した。甲状腺組織は、あらかじめ BRAF 変異の有無と遺伝子多型を確認した。また、甲状腺組織中に存在する甲状腺濾胞細胞以外の細胞(間質細胞や C 細胞)は、TSH レセプターや KRT7 に対する RT-PCR を行う事によって判別した。

KTC-1 細胞は BRAF 遺伝子のエクソン 16 に 1921 A/G 多型を持ち、アレル間の判別が可能であった。異なった 7 パターンの発現様式が見られ、それには野生型 BRAF、変異 BRAF 共に片アレルのみの発現と両アレルからの発現が含まれていた。次に、甲状腺乳頭癌とバセドウ病甲状腺組織からの初代培養細胞について検討した。検討した甲状腺乳頭癌組織では、エクソン 16 に遺伝子多型が見られずアレル間の発現が比較出来なかった。しかしながら、野生型 BRAF のみの発現、変異 BRAF のみの発現、そして両方の BRAF の発現と 3 パターンが観察された。変異 BRAF を持つ乳頭癌では、常に変異 BRAF の発現が優勢であった。初代培養甲状腺細胞でも、片方のアレルのみ発現している細胞、両方のアレルが発

現している細胞が見られた。

(7) まとめ  
X 染色体の不活性化は腫瘍形成の以前に起こる事より、これが多クローン性を示せば、それは確かに異なった細胞から発生したものであると言う事が出来る。今回の検討では、78.1%が単クローン性であることを示唆し、BRAF 変異を考慮に入れても、すべての組織パターン部位に BRAF 変異を認めた症例の 80%は単クローン性であった。しかしながら、20%程度の症例は多クローン性であると考えられ、PTC の発生についてさらに詳細な検討が必要であると考えられた。

また、単一細胞ソーティングの結果は、さらに複雑なメカニズムを示唆するものとなった。正常甲状腺細胞と甲状腺癌細胞の両方において、BRAF の片アレルからのみの発現、もしくは両アレルからの発現が観察された事となる。これらの発現パターンの経時的な変化は考慮されていないため、この点も検討の必要がある。変異 BRAF を持つ癌組織を一つ一つの細胞レベルで検討すると、変異 BRAF のみしか発現していない細胞が見られ、野生型、変異型の両アレルを発現している細胞でも、変異型 BRAF が常に優勢であった。この事は、変異は始め片方のアレルに起こるが、何らかの遺伝子転移の様なメカニズムにより別のアレルにも変異が拡がる可能性が推察された。このメカニズムが癌の多様性をもたらしている可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Akulevitch N, Saenko V, Rogounovitch T, Drozd V, Lushnikov E, Ivanov V, Mitsutake N, Kominami R, Yamashita S. Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* in press, 2009 査読あり
2. Matsuse M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko V, Nakazawa Y, Lushnikov E, Yamashita S. Mutation analysis of RAP1 gene in papillary thyroid carcinomas. *Endocrine Journal* 56: 161-164, 2009

査読あり

3. Nakazawa Y, Saenko V, Rogounovitch T, Suzuki K, Mitsutake N, Matsuse M, Yamashita S. Reciprocal paracrine interactions between normal human epithelial and mesenchymal cells protect cellular DNA from radiation-induced damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71: 567-577, 2008 査読あり
4. Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, Namba H, Saenko VA, Rogounovitch TI, Nakazawa Y, Hayashi T, Ohtsuru A, Yamashita S. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci* 99: 1147-1154, 2008 査読あり
5. Matsuse M, Saenko V, Sedliarou I, Rogounovitch T, Nakazawa Y, Mitsutake N, Akulevich N, Namba H, Yamashita S. A novel role for thyroid hormone receptor beta in cellular radiosensitivity. *J Radiat Res (Tokyo)* 49: 17-27, 2008 査読あり
6. Sedliarou I, Matsuse M, Saenko V, Rogounovitch T, Nakazawa Y, Mitsutake N, Namba H, Nagayama Y, Yamashita S. Overexpression of wild-type THRbeta1 suppresses the growth and invasiveness of human papillary thyroid cancer cells. *Anticancer Res* 27: 3999-4009, 2007 査読あり
7. Abrosimov A, Saenko V, Meirmanov S, Nakashima M, Rogounovitch T, Shkurko O, Lushnikov E, Mitsutake N, Namba H, Yamashita S. The cytoplasmic expression of MUC1 in papillary thyroid carcinoma of different

histological variants and its correlation with cyclin D1 overexpression. *Endocr Pathol* 18: 68-75, 2007 査読あり

8. Abrosimov A, Saenko V, Rogounovitch T, Namba H, Lushnikov E, Mitsutake N, Yamashita S. Different structural components of conventional papillary thyroid carcinoma display mostly identical *BRAF* status. *Int J Cancer* 120: 196-200, 2007 査読あり

[学会発表] (計 13 件)

1. Tatiana Rogounovitch: Molecular and clinico-pathological analysis of pediatric thyroid cancers in Belarus. ENDO 2008, the 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society, 2008年6月15日-18日, San Francisco, USA
2. Natallia Akulevich: Thyroid cancer susceptibility: implication of *ATM* and *TP53* genetic variations in papillary thyroid carcinoma of different etiology. ENDO 2008, the 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society, 2008年6月15日-18日, San Francisco, USA
3. Tatiana Rogounovitch: Molecular and clinico-pathological features of sporadic pediatric thyroid cancers from Belarus. 第81回日本内分泌学会学術総会, 2008年5月16日-18日, 青森
4. Natallia Akulevich: Variations in the ATM and TP53 as a potential genetic markers of papillary thyroid carcinoma of different etiology. 第81回日本内分泌学会学術総会, 2008年5月16日-18日, 青森

5. ウラジミール サエンコ: Preoperative evaluation of thyroid nodules by molecular analysis of FNAB materials. 第51回日本甲状腺学会, 2008年11月21日-23日, 宇都宮
6. 松瀬 美智子: 甲状腺乳頭癌における RAP1遺伝子変異. 第51回日本甲状腺学, 2008年11月21日-23日, 宇都宮
7. 中沢 由華: 甲状腺細胞および間質細胞間の相互作用による放射線誘発DNA損傷の低減. 第51回日本甲状腺学, 2008年11月21日-23日, 宇都宮
8. Natallia Akulevich: Association of SNPs in the ATM and MTF-1 genes with the risk of human papillary thyroid carcinomas. American Thyroid Association 78<sup>th</sup> Annual Meeting, 2007年10月4日-7日, New York, USA
9. Tatiana Rogounovitch: Peculiarities of distribution of genetic patterns of mutant BRAF in papillary thyroid carcinoma tissues. 第80回日本内分泌学会学術総会, 2007年6月14日-16日, 東京
10. Natallia Akulevich: A case of thyroid hormone resistance with novel type of abnormal THRB1 transcripts. 第80回日本内分泌学会学術総会, 2007年6月14日-16日, 東京
11. Ilya Sedliarou: Overexpression of wild-type THRB1 suppresses the growth and invasiveness of human papillary thyroid cancer cells. 第80回日本内分泌学会学術総会, 2007年6月14日-16日, 東京
12. Tatiana Rogounovitch: Clonality of papillary thyroid carcinomas harboring BRAF mutation.

第 50 回日本甲状腺学会,  
2007 年 11 月 15 日-17 日, 神戸

13. Vladimir Saenko: Efficacy of molecular tests in preoperative diagnosis of thyroid nodules. 第 50 回日本甲状腺学会, 2007 年 11 月 15 日-17 日, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ログノビッチ タチアナ (Rogounovitch Tatiana)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 30423643