

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590536

研究課題名（和文） 甲状腺乳頭癌の予後予測因子の検討

研究課題名（英文） Analysis of prognostic predictor for papillary thyroid carcinoma

研究代表者

清水 友章（Shimizu Tomoaki）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30384077

研究成果の概要（和文）：

甲状腺乳頭癌のBRAF遺伝子解析は、本研究進行中に全世界的に術前診断としての有用性が多く報告されている。我々の検討では、日本人におけるBRAF遺伝子異常(T1796A)と甲状腺乳頭癌の臨床的悪性度を穿刺吸引細胞診検体を用いて術前診断としての有用性を報告した。摘出標本から単離した腫瘍部でのBRAF遺伝子変異は、陰性例と陽性例に分かれ、直接シーケンス法にて遺伝子型の確認を行ったところ、陽性例全例でBRAF遺伝子変異はヘテロ接合体の表現系であった。この現象に関して野生型アレルのコンタミネーションの有無を確認し、更なる検討を進める。

研究成果の概要（英文）：

Analysis of BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma using Fine-needle aspiration (FNA) sample is established in recent 3 years. We showed the relationship between BRAF mutation (T1796A) and clinical malignancy of Japanese PTC using FNA sample. In surgical PTC tissue, BRAF mutation (T1796A) is positive or negative, the direct sequence method revealed PTC with positive BRAF mutation had heterogeneous alleles. We are going to exclude wild type allele such as blood cells, mesenchymal cells and endothelial cells, further investigate the genetic heterogeneity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：甲状腺乳頭癌, BRAF 遺伝子異常, 臨床的悪性度

1. 研究開始当初の背景

甲状腺乳頭癌の予後規定因子として Raf ファミリーである BRAF 遺伝子の点突然変異 (T1796A) が欧米では多く報告されている。この点突然変異は、BRAF 蛋白のバリンからグルタミン(V600E)へのアミノ酸置換をまねき、結果として、BRAF が恒常活性型の蛋白として作用し、Erk の活性化を解して、細胞増殖分子として機能することが、*in vivo*, *in vitro* で確認されている。これまでの BRAF 遺伝子異常の検討は主に海外でなされており、日本人を含めたアジア人を対象とした検討の報告は極めて少ない。甲状腺乳頭癌の発生頻度はヨード摂取量に影響を受け、日本人に多いことを考えると、日本人におけるエビデンスの構築が日本の甲状腺診療に必須と考えられ、その意味で、本検討は、極めて新規性の高い検討である。また、エコー所見、細胞診などを組み合わせて検討を行うことで、より詳細な予後判定に繋がると考えられる。

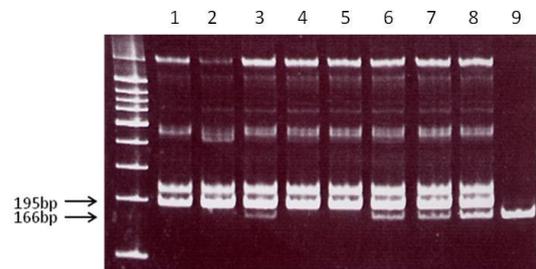
## 2. 研究の目的

この遺伝子変異が臨床上重要と考えられるのが、甲状腺微小乳頭癌であり、BRAF 遺伝子変異と局所浸潤や遠隔転移といった臨床的悪性度に明らかな関連性が認められれば、術前に遺伝子診断し、手術の必要性や長期的な治療計画に極めて重要な臨床マーカーとして有用であると考え。そこで、1) 甲状腺穿刺吸引細胞診(FNA)検体、2) 手術により摘出された甲状腺微小乳頭癌組織を用いて BRAF 遺伝子異常の有無と臨床的悪性度との関連性を検討する。

## 3. 研究の方法

1) 甲状腺穿刺吸引細胞診(FNA)にて甲状腺乳頭癌(PTC)疑いと診断し、手術による摘出標本で PTC と確定診断された 33 結節(33

例)について術前 FNA 検体における BRAF 遺伝子変異の有無を PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP)法(下図)にて解析し、解析し、臨床的悪性度を preliminary に評価した。



### PCR-restriction fragment length polymorphism

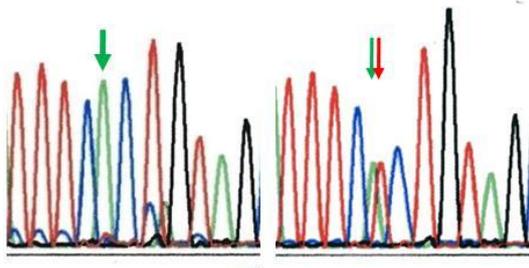
#### 法による BRAF T1796A 遺伝子変異解析

BRAF 遺伝子 Exon15 1799 番 T→A 変異が存在した場合に Xba- I により切断される回文構造を形成する primer を設計する。アガロースゲル電気泳動により PCR 増幅確認し、制限酵素(Xba-I)処理16時間 37°C 行う。10%アクリルアミドゲル電気泳動により RFLP 確認。BRAF 遺伝子変異がある場合には、制限酵素により PCR 産物が切断され 166bp と 195bp のバンドが認められる。変異がない場合には PCR 産物は切断されないため、166bp のバンドは認められず、195bp のバンドのみ認められる。1,2,4,5 ; cytology Class II 6 ; Class III 超音波所見より malignancy 疑い手術→乳頭癌 3,7,8 ; Class V 手術→乳頭癌 9 ; 当研究室作成 Positive control

2) 甲状腺微小乳頭癌における BRAF 遺伝子異常(BRAF T1796A)の有無と15年生命予後、転移・浸潤能などの悪性度、および有症候性症例(術前に1cm以上の頸部リンパ節転移もしくは反回神経麻痺による嚔声を認める)と無症候性症例の BRAF 遺伝子変異保有率との関連を解析した。甲状腺微小癌と最終病理診断を得た36検体(手術後のフォローアップ期間 median: 7876日 interquartile range: 6165-10558日)のパラフィン固定された甲状腺手術切除標本から腫瘍組織のDNA

を採取し、The QIAamp DNA FFPE Tissue Kit® (QIAGEN)を用いてDNAを抽出し、同様に解析し、さらにBigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies)を用いた直接シーケンス法にて遺伝子型の確認を行った(下図)。

BRAF T1799A(-/-)    BRAF T1799A(-/+)  
 ATTTCCCTG TAG    ATTTCCCTG TAG  
 29 133 137            131 136



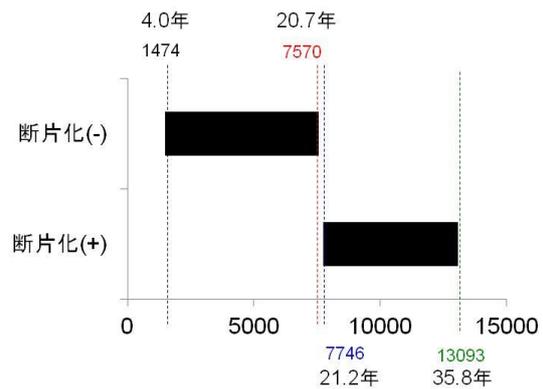
**直接シーケンス法による BRAF T1799A 遺伝子変異解析**

BigDye® Terminator v3.1 を用いた DNA シーケンシング(1977±5bp)を示す

4. 研究成果

1) BRAF遺伝子変異陽性(BRAF(+))20結節および変異陰性(BRAF(-)) 13結節に群分けした。甲状腺外浸潤(Ex(+))はBRAF(+)<sup>15/20</sup>例、BRAF(-)<sup>1/13</sup>例にて有意差を認め(p=0.002)、LN(+)<sup>はBRAF(+)<sup>9/20</sup>例、BRAF(-)<sup>5/13</sup>例にて有意差を認めず(p=0.710)、BRAF (+)の甲状腺乳頭癌の悪性度とBRAF遺伝子変異に関連性があることが示唆された。</sup>

2) 組織標本からDNA抽出した際の問題として、7570日(20.7年)を境に過固定が原因と考えられるDNAに断片化が進んでおり、DNA解析が不能であった(下図)。



解析が可能であった16検体の甲状腺微少乳頭癌におけるBRAF遺伝子変異は、すべて陽性であった。直接シーケンス法にて遺伝子型の確認を行ったところ、全例でBRAF遺伝子変異はヘテロ接合体の表現系であった。そこで、当初の目的であるBRAF遺伝子異常の有無と臨床的悪性度との関連性の検討が難しくなったため、正常組織のコンタミネーションを再度確認の上、変異アレルの定量的な追加検討を行っている。

Preliminaryな結果では、腫瘍ごとに全BRAF遺伝子中の変異アレル率にかなりのばらつきがあり、同じ民族内でも甲状腺乳頭癌におけるBRAF保有率や有無による生命予後への影響に関する結果にばらつきが認められる1つの原因となっている可能性や分子生物学的に腫瘍のHeterogeneityを示唆する減少を捉えている可能性もあり非常に興味深いデータと考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1) 内田豊義、後藤広昌、竹野景海、菅野玲、

高橋聡美、酒井謙、藤谷与士夫、弘世貴久、河盛隆造、綿田裕孝、第52回日本甲状腺学会学術集会、甲状腺乳頭癌B-raf T1796A変異の術前診断における有用性、2009年11月3～5日、名古屋

2) 竹野景海、内田豊義、小宮幸次、後藤広昌、弘世貴久、綿田裕孝、第53回日本甲状腺学会学術集会、甲状腺乳頭癌 B-raf T1796A 変異の術前診断における有用性 2 - 追加検討結果 - 、2010年11月11～13日、長崎

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

清水 友章 (Shimizu Tomoaki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30384077