

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 菊池 弥寿子

本研究は、甲状腺乳頭癌の分子生物学的特徴を明らかにするため、遺伝子変化、特に DNA メチル化について注目し、複数の網羅的、定量的な解析手法を用いて探索した。その結果、乳頭癌における異常高メチル化遺伝子を抽出した。さらに、抽出された候補遺伝子について、DNA 高メチル化の評価を別の手法、追加の症例で確認し、臨床所見との相関を検討している。その後、細胞株を用いて、DNA メチル化の発現回復実験を行い、下記の結果を得ている。

1. 既報の遺伝子変化に関する再検討

複数の文献的報告を踏まえ、乳頭癌の遺伝子変異、既報の乳頭癌 DNA メチル化遺伝子について、マイクロアレイである MassARRAY、Infinium を用いた解析を行った。本研究で用いた乳頭癌症例においては、既報同様、*BRAF*、*RAS* 変異が多くみられた。DNA メチル化については、既報ほどのメチル化は認めず、また、非癌部でもメチル化を認める遺伝子もあり、癌特異的とは言い難かった。従来報告で用いられた手法は感度が強く出てしまう解析手法を用いており、定量的な解析ではなかったからである。これにより、新規のメチル化遺伝子の探索が必要と検討された。

2. 乳頭癌における遺伝子プロモーター領域のメチル化状態の探索

乳頭癌症例 14 例について、マイクロアレイである Infinium を用いたゲノムワイドなメチル化の解析を行い、甲状腺乳頭癌は、他の癌種と異なるメチル化状態が存在することが示された。更に、複数の癌（前立腺、頭頸部扁平上皮癌、大腸癌、胃癌、膠芽腫、慢性骨髄性白血病）と比較すると、乳頭癌は比較的遺伝子プロモーター領域のメチル化の頻度は高くないことが示された。

3. 乳頭癌特異的な異常高メチル化遺伝子の抽出

Infinium を用いて、甲状腺組織において、癌病変部と非癌部でのメチル化の相違を解析し、癌において高メチル化を示す 25 遺伝子を抽出した。更にこの遺伝子を用いると、癌の中でもメチル化の多くみられる症例と、メチル化のみられない症例が存在することが示された。

4. メチル化候補遺伝子の評価

14 例の癌症例での網羅的探索により抽出されたメチル化候補遺伝子について、

他症例を加えた検討、及び別の定量的手法、パイロシークエンシング法を用いた検討を行い、候補遺伝子が、乳頭癌特異的高メチル化遺伝子であることを評価している。25 遺伝子のうち、パイロシークエンシング法の解析ができた 6 遺伝子についてメチル化を検討すると非癌部とは異なり、高メチル化を示すことが確認された。更に、追加症例を合わせた検討においても癌の中でもメチル化の多くみられる症例と、メチル化のみられない症例が存在することが示された。

5. メチル化と臨床所見との関連の検討

14 例での検討、及び追加症例を加えた 34 例の乳頭癌の検討を再度行い、メチル化異常の見られる症例では、*BRAF*、*RAS* の点突然遺伝子変異が有意差を持って多くみられた。また、有意差はでなかったものの、メチル化異常のみみられる症例では腫瘍径が大きく、サイログロブリン値も高い傾向が示唆された。

6. 細胞株を用いた発現回復解析

評価された、メチル化候補遺伝子 6 遺伝子について、メチル化により発現がサイレンシングされているかどうか、細胞株を用い検討を加えている。DNA 脱メチル化剤を細胞株に投与し、RNA を採取後 RT-PCR を行い、5 遺伝子について脱メチル化剤投与による発現の回復を確認している。

以上、本論文は甲状腺乳頭癌について、DNA メチル化の解析を行い、他癌とは異なるメチル化状態を呈することを明らかにした。更に乳頭癌特異的な高メチル化遺伝子を、複数の解析手法をもちいて抽出、確認し、乳頭癌自体においても、異なる特徴を持つ癌種が存在する可能性を示した。今まで、複数の手法、臨床症例を用いた乳頭癌メチル化の検討は殆どなされておらず、メチル化情報を用いて乳頭癌を特徴づけることができる可能性を今回初めて示しており、甲状腺乳頭癌の診断、治療の選択において、重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。