



Title	Measurement of the Expression of Oncofetal Fibronectin mRNA in Thyroid Carcinomas by Competitive Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
Author(s)	東山, 卓也
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41681">https://hdl.handle.net/11094/41681</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ひがし やま たく や 東 山 卓 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 3 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Measurement of the Expression of Oncofetal Fibronectin mRNA in Thyroid Carcinomas by Competitive Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (競合的 RT-PCR 法による甲状腺癌の癌胎児性フィブロネクチン m RNA発現量の測定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 野口眞三郎  (副査) 教 授 網野 信行 教 授 門田 守人

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

甲状腺腫瘍の診断は専ら細胞診と組織診によって行われており、その形態診断にはかなりの熟練を要する。また、サンプル量が不足したり、血液などのコンタミネーションが原因で、しばしば診断が困難となる。したがって、微量サンプルでより客観的な診断法の開発が必要であるが、そのひとつの可能性として遺伝子診断が考えられる。遺伝子診断には標的とする遺伝子が必要であるが、最近、われわれは癌胎児性フィブロネクチンが甲状腺癌に特異的に発現していることを明らかにし、甲状腺腫瘍の遺伝子診断の標的となりうることがわかった。

フィブロネクチンは血漿中や細胞外マトリックスに存在する細胞接着因子で、細胞の増殖、分化、細胞死の制御に関与するとされている。癌胎児性フィブロネクチンはフィブロネクチンのうち癌胎児性ドメインをもつスプライシングバリエーションでその発現は癌および胎児組織に限定的である。

甲状腺では癌胎児性フィブロネクチンの発現が甲状腺乳頭癌および未分化癌に特異的で、正常甲状腺や結合組織では発現していないことが示されており、それゆえ、癌胎児性フィブロネクチンは甲状腺腫瘍の遺伝子診断の標的としては理想的な遺伝子である。

一方、サイログロブリンは甲状腺の正常細胞や腫瘍細胞で特異的、恒常的に発現しており、また、甲状腺乳頭癌、濾胞癌、未分化癌では発現が減少していることが報告されている。このことは、甲状腺癌の遺伝子診断のための内部標準としてサイログロブリンが適していることを示している。

さらに、最近、PCR産物をサイクル毎に自動測定する装置が実用化され (realtime quantitative RT-PCR)、甲状腺腫瘍の術前術後遺伝子診断の完全自動化に可能性がでてきた。

以上のことから、われわれは、種々の甲状腺腫瘍における癌胎児性フィブロネクチン mRNA のサイログロブリンに対する相対発現を PCR 産物で測定し、この方法による甲状腺癌と甲状腺良性腫瘍との判別ができるかについて検討した。

#### 【方法ならびに成績】

甲状腺濾胞腺腫14, 甲状腺濾胞癌6, 甲状腺乳頭癌11, 甲状腺未分化癌2, 腺腫様甲状腺腫9, および癌の対側葉より得られた正常甲状腺10, 計42例の手術で得られた甲状腺組織を検体として使用した。組織は摘出後速やかに液体

窒素で凍結し、Total RNA を抽出した。

50ng の Total RNA を用い、サイログロブリンと癌胎児性フィブロネクチン双方のプライマーとともに PCR 法でこれらの遺伝子を co-amplify した。16 サイクルから 32 サイクルのところまでサンプルを 5  $\mu$  l ずつ取り出し、それぞれを 1 % アガロースゲルで電気泳動し Sybr Green I で染色して、イメージアナライザーで蛍光強度を測定し片対数グラフにこれをプロットした。サイログロブリン由来 PCR 産物の蛍光強度を固定し、そのサイクル数での癌胎児性フィブロネクチン由来 PCR 産物の蛍光強度を Thyroglobulin Index (TgI) と名づけた。サイログロブリン由来 PCR 産物の蛍光強度固定値の最適化を図るため、サイログロブリンと癌胎児性フィブロネクチンの PCR 産物の蛍光強度が直線的に増加し、かつ相対比を最もよく反映する部分を策定した。その結果、サイログロブリン由来 PCR 産物の蛍光強度が 6.5 であるときの癌胎児性フィブロネクチン由来 PCR 産物の蛍光強度が最もよくあわすことがわかった。これを TgI6.5 とし、以後、これを計測することで、癌胎児性フィブロネクチンのサイログロブリンに対する相対発現レベルの測定をおこなった。

まず、正常甲状腺組織、甲状腺濾胞腺腫、甲状腺乳頭癌につき、Total RNA の濃度を変えて TgI6.5 を測定したが、TgI6.5 が濃度に依存しないことを確かめた。

ついで、TgI6.5 を良性、悪性の甲状腺組織について測定した。

TgI6.5 は甲状腺乳頭癌、甲状腺濾胞癌で正常甲状腺組織や良性病変にくらべ明らかに上昇していた。2 つの甲状腺未分化癌で、サイログロブリン mRNA の RT-PCR 産物を 32 回の PCR でも得られなかった。

カットオフ値を 5.0 に設定すると 11 例すべての甲状腺乳頭癌と 2 例すべての未分化癌、6 例のうち 3 例の甲状腺濾胞癌を良性病変と鑑別できた。

#### 【総括】

以上の結果より、TgI を測定することで甲状腺乳頭癌と未分化癌のすべておよび濾胞癌の一部を良性組織と鑑別することが可能であった。TgI のような癌胎児性フィブロネクチンの相対発現の測定はこれらの腫瘍の術後組織診断の確定のみならず術前診断にも役立つと考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

当該研究グループでは甲状腺乳頭癌および未分化癌で癌胎児性フィブロネクチンが特異的に発現していることを見出している。本研究は、甲状腺癌における癌胎児性フィブロネクチンのサイログロブリンに対する相対的発現量を競合的 RT-PCR 法により測定することで、甲状腺癌の分子生物学的診断を行うことを目的としたものである。今回新しく設定した指標 TgI6.5 を用いると、甲状腺乳頭癌、未分化癌においては全例で正常甲状腺および良性腫瘍との鑑別が可能であった。また従来、病理組織検索からは診断が困難であった甲状腺濾胞癌においても半数の例でこの指標の異常高値が見られた。

これらの結果は、これまで専ら病理組織形態学的診断によっていた甲状腺癌の診断に対して、分子生物学的診断が可能であることを示している。

上記の内容に鑑み、本研究が学位の授与に値するものと認める。