

氏 名 (本 籍)	石 川 智 義 (東 京 都)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 2,145 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		
学 位 論 文 題 目	Establishment of molecular diagnosis of cancer in the early stage by RT-PCR for tissue-specific mRNA in peripheral blood (組織特異的 mRNA を標的とした末梢血 RT-PCR による癌の早期分子生物学的診断法の確立)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	野 口 雅 之
副 査	筑波大学教授	医学博士	赤 座 英 之
副 査	筑波大学助教授	医学博士	野 村 文 夫
副 査	筑波大学講師	医学博士	岩 川 真由美

論 文 の 内 容 の 要 旨

(背景)

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いて、末梢血有核細胞 (PBMC) から、*carcinoembryonic antigen (CEA)*, α -fetoprotein (AFP), *prostate-specific antigen (PSA)* 遺伝子などの標的遺伝子の発現を同定し、癌の診断に役立てようとする試みは以前より報告されている。しかし、従来より術後再発の指標や進行癌の微小転移の同定についての報告は数多くあるが、癌の早期診断に応用した報告はほとんどない。

特に RT-PCR 法による末梢血を用いた遺伝子診断を行う場合、標的遺伝子の必要条件として、少なくとも健常者の PBMC および皮膚で発現がまったくないことが大切である。また標的遺伝子として、癌特異的かつ組織特異的に発現する遺伝子が最も理想的である。組織特異的に発現している遺伝子としては、腫瘍マーカー遺伝子あるいはホルモン関連遺伝子が考えられるものの厳密に癌特異的に発現する遺伝子の報告は未だない。

(目的)

本研究では、標的遺伝子として組織特異性が高い遺伝子を選択し、RT-PCR 法により PBMC から選択した標的遺伝子の発現を同定することにより、癌組織由来の細胞を癌の早期から流血中から高感度に出し、かつ定量的 RT-PCR 法により、流血中の標的 mRNA 陽性の細胞数を定量化する方法の確立をめざした。標的遺伝子の候補として、腫瘍マーカー遺伝子からは AFP と PSA を、ホルモン関連遺伝子からは、特に甲状腺に注目し甲状腺特異的発現の高い遺伝子が知られている甲状腺関連遺伝子、*thyroid peroxidase (TPO)*, *thyroid stimulating hormone receptor (TSHR)* および *thyroglobulin (Tg)* 遺伝子を選択した。

(対象と方法)

AFP および PSA 遺伝子の組織特異性を poly A⁺RNA を用いた northern blotting にて検討し、実際に RT-PCR 法にて、種々の組織や健常者の PBMC で AFP および PSA 遺伝子発現を解析した。

次に TPO, TSHR および Tg 遺伝子の組織特異的発現にして検討した。さらに PBMC を用いた RT-PCR 法による早期の甲状腺乳頭癌の遺伝子診断法の確立を試みた。検討症例は、甲状腺乳頭癌 34 例 (Stage I ; 23 例, Stage II ; 8 例, Stage III ; 3 例) (うち手術症例, 23 例), 甲状腺濾胞腺腫 4 例 (うち手術症例, 4 例), 腺腫様甲状腺腫 7 例 (うち手術症例, 7 例), バセドウ病 30 例 (うち手術症例, 7 例), 橋本病 8 例 (うち手術症例なし) およ

び健常者20例である。それぞれ末梢血を5 ml採決（手術症例については術前採決）した。手術症例については、切除甲状腺組織（腫瘍部および非腫瘍部）を採取した。PBMCと切除組織からtotal RNAを抽出し、RT-PCR法を行い、*TPO*、*TSHR*および*Tg*遺伝子発現を検出した。内部コントロールとして β -actin mRNAを用いた。検討した甲状腺乳頭癌のうち、9例（Stage I；6例，Stage II；3例）のPBMCを用いて、ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemで*TPO*mRNAを定量した。この結果をもとに*TPO*mRNA陽性細胞数を求め、術前血中*Tg*値と腫瘍径とを比較した。

（結果）

*AFP*および*PSA*遺伝子は、それぞれ胎児肝臓、前立腺組織では発現が極めて高いものの、PBMCを含め、種々の組織で発現が認められた。RT-PCRでは、種々の組織や健常者のPBMCで*AFP*および*PSA*遺伝子の発現が検出された。

*TSHR*および*Tg*遺伝子は、PBMCを含め、種々の組織で発現が認められ、甲状腺特異的とは言えなかった。一方、*TPO*遺伝子は、甲状腺と唾液腺でのみ発現し、健常者のPBMCでは検出されなかった。RT-PCR法にて健常者のPBMCで発現が確認された例は*TSHR*および*Tg*遺伝子であったが、*TPO*遺伝子は検出されなかった。PBMCで*TPO*mRNAが検出された甲状腺乳頭癌症例は、34例中19例（Stage I；23例中14例，Stage II；8例中4例，Stage III；3例中1例）であった。定量的RT-PCR法を行うと、PBMCで*TPO*mRNAがStage Iの6例中4例（67%），Stage IIの3例中2例（67%）で検出され、*TPO*mRNA陽性細胞数は、全血1 mlあたり0.24から2700個であった。末梢血での*TPO*mRNAのコピー数と腫瘍径や術前血中*Tg*値との間に相関は認められなかった。乳頭癌以外にRT-PCR法にて*TPO*mRNAが検出された症例は、顕著な甲状腺炎を伴う腺腫様甲状腺種の7例中2例のみであり、甲状腺濾胞腺腫、パセドウ病および橋本病では発現は検出されなかった。顕著な甲状腺炎を伴う腺腫様甲状腺種症例で*TPO*mRNAが検出されたことから、癌細胞のみではなく、非癌細胞でも、RT-PCR法により末梢血で*TPO*mRNA陽性細胞として同定されることが示唆された。

（考察）

RT-PCR法を用いてPBMCの遺伝子診断をする場合、RT-PCR法が高感度であるがゆえに厳密に組織特異的あるいは腫瘍特異的な遺伝子を選択することは非常に難しいことがわかったが、今回の検討で甲状腺乳頭癌の遺伝子診断をする上で*TPO*は比較的目的にかなった組織特異的標的遺伝子となり得る事が明らかになった。甲状腺乳頭癌以外の癌についても、原発組織特異的に発現する遺伝子の存在が明らかとなれば、甲状腺乳頭癌での結果を応用して、早期に流血中の癌細胞の存在を末梢血を用いたRT-PCR法によって診断できる可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

悪用腫瘍の遺伝子診断については種々の報告があるが、石川智義氏は末梢血中のがん細胞をReverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法を用いて検出する方法を検討している。その結果、組織特異抗原でありかつホルモン関連抗原でもあるthyroid peroxidase (TPO)が甲状腺乳頭癌を遺伝子診断する際に比較的目的にかなった標的抗原になることが明らかになった。この研究の過程で従来腫瘍特異的に発現すると考えられてきたcarcinoembryonic antigen (CEA)や α -fetoprotein (AFP)の発現が健常者末梢血中にも検出された。もちろんRT-PCRの感度が高いことによる偽陽性の可能性も否定できないが、ごくごく低い発現レベルで非腫瘍細胞内でもこれら癌関連遺伝子が発現している可能性があり興味深い。ヒト末梢血を用い、RT-PCR法による遺伝子診断法を構築し、実用化の可能性を示したことは評価される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。