

## 論文審査の結果の要旨

### *BRAF*, *KIT*, and *NRAS* mutations and expression of c-KIT, pERK and pAKT in Japanese melanoma patients

日本人悪性黒色腫患者における *BRAF*, *KIT*, *NRAS* 遺伝子変異と c-KIT, pERK, pAKT 発現

日本医科大学大学院医学研究科 皮膚粘膜病態学分野

大学院生 大山 聡美

The Journal of Dermatology 掲載予定

悪性黒色腫は最も予後の悪い皮膚腫瘍の一つである。その生物学的特徴として自律増殖能があげられ、シグナル伝達経路としては MAPK や AKT が主要な経路だと考えられている。しかし、これらの経路の活性化機序に関してはまだ統一した見解は得られていない。そこで、日本人の悪性黒色腫における遺伝子異常と増殖シグナル活性化状態について *in vivo* で検討し、病型、臨床像との相関について解析した。

悪性黒色腫患者 37 名（末端黒子型<ALM>：20 例、表在拡大型<SSM>：17 例）のパラフィン切片からレーザーマイクロダイセクションにより腫瘍細胞のみを切り出し、抽出した DNA を用いて *BRAF*, *NRAS*, *KIT* のダイレクトシーケンスを行った。また抗 c-KIT 抗体、抗 pERK 抗体（活性化されたリン酸化 MAPK を認識）、抗 pAKT 抗体を用いた免疫染色を行い、病型、臨床像との相関を解析した。

結果、*BRAF* の変異は 25 例（ALM の 65%、SSM の 71%）、*KIT* 変異は 9 例（ALM の 15%、SSM の 12%）にあり、*NRAS* の変異はなかった。また、*KIT* 変異では exon 9 に最も多くみられた。c-KIT の発現は ALM の水平増殖病変では増強していたが、ALM の垂直増殖病変ならびに SSM では発現が低下していた。*BRAF* 変異により ERK、AKT のリン酸化の軽度増強が、また *KIT* の変異により AKT のリン酸化の軽度増強がみられたが、統計学的な有意差はなかった。

今回の解析では、*BRAF* 変異率が既報告（ALM：0~33%、SSM：49~64%）よりも高かった。最近、悪性黒色腫の腫瘍はヘテロな細胞の集団であることが指摘されている。今回の検討ではレーザーマイクロダイセクションで腫瘍細胞のみを切り出して解析しているため、変異細胞の検出感度が上がった可能性を考えた。*KIT* 遺伝子で比較的稀とされる exon 9 の変異頻度が高かったのは、今まで欧米人を中心に解析がなされてきたため、人種的な遺伝的背景の違いを反映したものと考えた。また、c-KIT の発現が ALM の水平増殖病変では増強していたのは、既報告の結果と矛盾しなかった。なお、悪性黒色腫の増殖シグナル活性化機序に関しては、*BRAF* や *KIT* の変異以外に、他のリン酸化脱リン酸化制御も働いている可能性が考えられた。

第二次審査では、①悪性黒色腫が分子標的薬に対して耐性を獲得する機序、②悪性黒色腫と microRNA の関連、③蛋白レベルでの解析の必要性、などに関して質疑がなされ、それぞれに対して的確な回答が得られ、本研究に関する知識を十分に有していることが示された。

本論文により、日本人の悪性黒色腫における遺伝子異常と増殖シグナル活性化状態の一端が明らかとなった。本研究の臨床的意義は高く、今後の分子標的薬治療に対する貢献も大きいと考えられた。以上より本論文は学位論文として価値あるものと認定した。