

令和元年5月20日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10451

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子・蛋白質解析を用いて非浸潤性乳癌の新規悪性度マーカーを同定する研究

研究課題名(英文) Comprehensive gene and protein analysis of ductal carcinoma in situ for novel prognostic biomarkers

研究代表者

三階 貴史 (Sangai, Takafumi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00375685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では針生検で非浸潤性乳癌と診断された病変の中で、浸潤性乳癌へ進行しているリスクが高い症例のバイオマーカー探索を目的とし、ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルおよび吸引式針生検の検体採取時に遺残する微量検体(VAB検体)から蛋白、DNAおよびmRNAを抽出して、蛋白、遺伝子の発現および遺伝子変異の解析を試みた。VAB検体を用いてHigh resolution melting analysisによりPIK3CAの変異を検出することが可能であった。また非浸潤性乳癌の浸潤能に関連すると思われる4つの遺伝子候補についてRT-PCRによる解析が可能なることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、吸引式針生検の検体採取時に遺残する微量検体を使用して、遺伝子解析が可能な事を確認できた。本研究をさらに発展させることにより、非浸潤性乳がんに対する従来の形態学的病理診断を補完し、浸潤癌の存在を予測する為の悪性度マーカーの確立が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed to find biomarkers of high risk of invasion among the lesions diagnosed with noninvasive breast cancer by core needle biopsy. We tried to analyze protein expression, mRNA expression, and gene mutation using formalin fixed paraffin embedded breast cancer samples and samples which remained in washing saline after vacuum assisted biopsy (VAB). It was possible to detect PIK3CA mutations by high resolution melting analysis using the VAB sample. We also confirmed that gene expression analysis using RT-PCR with VAB sample is possible for four candidate genes that may be related to the invasive ability of non-invasive breast cancer.

研究分野：乳癌外科

キーワード：非浸潤性乳癌 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、針生検で病理学的に非浸潤性乳癌 (DCIS) と診断されれば手術は不可避であり、理論上転移する恐れのない早期癌でありながら乳房の全摘やセンチネルリンパ節生検を行わざるを得ない事も多い。また乳房温存切除術が施行された場合には術後の放射線照射もほぼ全例が必要である。乳房温存手術後の局所再発リスクや、放射線照射の必要性を予測する際に参考となる The Van Nuys Prognostic Index は臨床病理学的指標であり、分子病理学を応用した同様のツールはこれまで存在しなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、DCIS 病変の網羅的遺伝子・蛋白質解析を行い、浸潤性乳癌 (IDC) に進行する DCIS が発現する遺伝子ならびに蛋白質の異常を包括的かつ正確に解析し、DCIS が IDC に進行する分子病理学的メカニズムを解明するとともに、形態学的病理組織診断を補完する、より普遍的な新しい分子病理学的悪性度マーカーの確立、DCIS から IDC へ進行する危険性や DCIS 術後の再発を予測するツールの開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

- (1) 針生検で DCIS、Nuclear Grade I 又は II と診断された病変の手術標本を用いて網羅的遺伝子・蛋白質解析を行い、術後の診断が変わらず DCIS と診断された群と術後 IDC と診断が変わった群との間で比較する。術後 IDC と診断された病変に特異的な発現パターンを示す分子を同定する。
- (2) 吸引式針生検を行う際、組織バスケット内に遺残した組織 (VAB 洗浄検体) を研究用サンプルとして採取し、同定した遺伝子・蛋白質の発現を定量する。針生検の病理診断にて DCIS とされた症例に関して、測定した分子の発現量から IDC の有無を予測し、手術標本の病理結果と合わせて感度、特異度を求める。

4. 研究成果

当院で 2007 年以降に手術施行した症例の中で術前針生検で DCIS、Nuclear Grade I 又は II と診断された症例は 125 例。その中で術後手術標本による診断が IDC となった症例は Grade I で 8/46 例、Grade II で 16/79 例。その中にはセンチネルリンパ節生検で転移陽性となった症例も各 2 例含まれていた。これら DCIS IDC となった症例 24 例と術前針生検結果ならびに臨床的背景が一致する症例を DCIS DCIS であった 101 例から選び、それぞれ 10 例の手術標本の FFPE ブロックを準備した。FFPE サンプルから蛋白質と RNA の抽出を行ったが、RNA array や MS 分析等の網羅的な解析に用いることが可能な Quality の蛋白質と RNA の抽出を全例からは行う事は困難であった。FFPE サンプルを用いた蛋白質の解析を行う為、MS 解析用の蛋白の抽出方法を新たに検討中である。また蛋白発現の解析を FFPE サンプルの組織マイクロアレイを用いて免疫染色で行う事を計画している。

遺伝子変異の解析を 20 例の VAB 洗浄検体を用いて、High resolution melting analysis (HRM) により行った。この検体から抽出できた DNA 収量は $5.30 \pm 6.92 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、RNA 収量は $27.61 \pm 28.19 \text{ ng}/\mu\text{l}$ であった (表 1)。LightCycler 480 System (Roche) を使用し、HRM による抽出した DNA の *PIK3CA* exon9、*PIK3CA* exon20、*KRAS* exon2、*BRAF* exon15 における変異の検出を試みたところ、2 検体に *PIK3CA* exon20 の変異が疑われた (図 1)。3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた direct sequence により変異を同定、確認したところ、1 検体で *PIK3CA* exon20 c.3120G>A p.N1040I の変異を確認出来た (図 2)。しかし、非浸潤性乳癌の浸潤能に関連すると思われる遺伝子候補を文献的に考察し、対象となる遺伝子候補を文献的に考察、決定

したところ、解析候補とした遺伝子には *PIK3CA* のような hot spot が存在しなかった為、1 遺伝子の変異を検出する為に複数のプライマーとコントロール DNA が必要であった。また、これらの遺伝子変異の頻度は高くないと予測され、サンプル数が不足し、解析が困難であった。

VAB 洗浄検体から抽出した mRNA を用いて非浸潤性乳癌組織の遺伝子発現を検討する目的で、非浸潤性乳癌の浸潤能に関連すると思われる遺伝子候補を文献的に考察、決定した。特に VAB 検体には上皮だけでなく間質細胞の遺伝子も含まれるため、上皮-間質相互作用に着目して遺伝子候補を決定した。プライマーを設計し、コントロール mRNA を用いて RT-PCR による解析が可能か検討した結果、4 つの遺伝子候補について発現の検出が可能なることを確認した。今後実際のサンプルを用いた解析を行う予定である。

表 1 SampleからのRNA, DNA収量と病理診断結果

| sample # | RNA ng/ul | DNA ng/ul | Pathological findings | |
|----------|-----------|-----------|-----------------------|--------------------|
| 1 | 27.24 | 3.97 | benign | MP |
| 2 | 8.97 | 1.12 | benign | MP LCIS |
| 3 | 12.62 | 3.91 | benign | FA |
| 4 | 11.08 | 4.72 | DCIS | Low papillary type |
| 5 | 19.80 | 5.06 | benign | FA |
| 6 | 13.41 | 8.23 | DCIS | Solid type |
| 7 | 47.33 | 7.74 | DCIS | Cribri comedo type |
| 8 | 23.42 | 6.04 | DCIS | Apocrine type |
| 9 | 66.67 | 9.45 | DCIS | Cribri comedo type |
| 10 | 33.92 | 2.00 | DCIS | Cribri comedo type |
| 11 | 15.86 | 1.43 | benign | MP |
| 12 | 9.78 | 1.81 | benign | IDP/MP |
| 13 | 24.91 | 1.60 | DCIS | Solid type |
| 14 | 26.56 | 4.61 | IDC | 2a1 HG2 |
| 15 | 20.88 | 2.51 | benign | MP |
| 16 | 14.58 | 0.21 | Normal breast tissue | |
| 17 | 12.49 | 2.26 | DCIS | Cribri comedo type |
| 18 | 14.75 | 1.83 | benign | MP |
| 19 | 16.35 | 4.87 | DCIS | Comedo type |
| 20 | 131.64 | 32.68 | benign | IDP/MP |

図 1 *PIK3CA* exon20のMelting CurvesとDifference plot

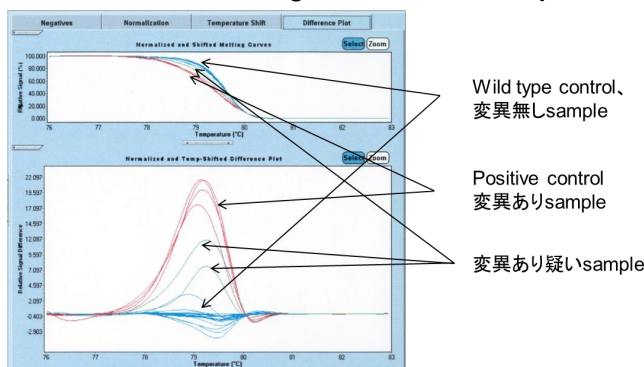
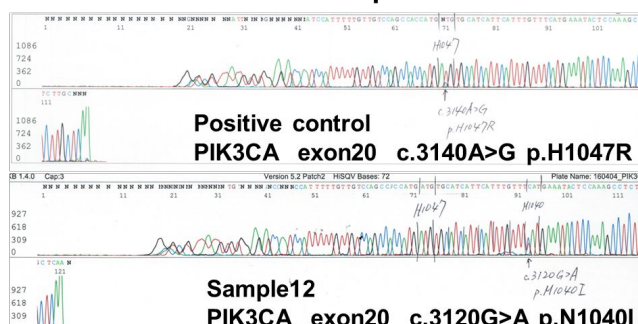


図 2 *PIK3CA* exon20のdirect sequence



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

1. 三階 貴史 Vacuum-assisted biopsy の洗浄液検体を用いた、乳癌の悪性度予測遺伝子検索システムの構築．第 116 回日本外科学会定期学術集会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：長嶋健

ローマ字氏名：Nagashima Takeshi

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：60292710

研究分担者氏名：宮崎勝

ローマ字氏名：Miyazaki Masaru

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：大学病院

職名：教授

研究者番号(8桁)：70166156

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤守

ローマ字氏名：Sato Mamoru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。