

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32655

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：21590387

研究課題名（和文） 乳癌の遺伝子変異多様性とクロナリティー解析：癌細胞系譜の解明と再発治療の適正化

研究課題名（英文） A clonality analysis of breast cancer tissue with heterogeneity: clarifying the cell lineage for adequate treatment strategy for recurrent tumor

研究代表者

増田 しのぶ (MASUDA SHINOBU)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：20276794

研究成果の概要（和文）：

目的：乳癌治療の個別化、とくに再発治療の個別的適正化をはかることを最終的な研究目標とした。癌細胞の遺伝子変異の多様性(heterogeneity)とクロナリティー(clonality)との関係性を、原発巣と再発腫瘍の比較により明らかにすることを目的とした。

対象：乳癌原発巣の治療後、同側乳房内腫瘍、対側乳房内に腫瘍が発生した症例

方法：リンパ節、背景乳腺および乳癌組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて検討した。Laser microdissection 法をもちいて、腫瘍細胞の DNA を抽出し、PCR 法により対象遺伝子領域を増幅し、direct sequence 法にて解析した。

解析方法：androgen receptor (AR) 遺伝子多型解析 (human androgen receptor (HUMARA)) および mitochondrial DNA D-loop somatic mutation 解析 (gene alteration of mitochondrial D-loop region (GAMDDL)) を比較検討した。

結果：HUMARA, GAMDDL, combined HUMARA and GAMDDL の有効解析率は、それぞれ 42.1%, 76.9%, 89.5% であり、GAMDDL の有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Aim: To clarify the cell lineage of breast cancer cells the present study was performed.

It is significant to understand which cancer cells were recurrent from the initial breast cancer tissue with heterogeneity. The final goal of this study is to provide information for the adequate treatment of recurrent breast cancer.

Materials and methods: Formalin-fixed paraffin-embedded sections of the lymph node, the surrounding mammary gland and breast cancer tissue from the patients who had second breast tumors in ipsilateral and contralateral mammary gland after the treatment for initial breast cancer. Two analysis methods, polymorphism of human androgen receptor (HUMARA) and gene alteration of mitochondrial D-loop somatic mutation (GAMDDL) were compared.

Results and conclusion: The informative rate of analyses was 42.1%, 76.9% and 89.5% by HUMARA, GAMDDL, and combined HUMARA and GAMDDL, respectively. GAMDDL is a useful method to clarify the cell lineage of cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
23 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：泌尿生殖器・内分泌

キーワード：乳癌、遺伝子変異多様性、クロナリティー、ミトコンドリア DNA D-loop 領域

1. 研究開始当初の背景

本邦女性における乳癌の罹患率は第1位であり、死亡率は第4位である。乳癌に対する治療は、乳癌の生物学的特性に応じた個別化と標準化が同時にすすんでいる。

現在、原発性乳癌の個別化治療のための代表的な標的分子は、estrogen receptor (ER) 及び human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) であり、これらの発現状況により標準的な治療の方向性が示されている。

一方、再発乳癌に対する治療の個別的適正化は十分進んでいない。一般的に再発腫瘍は原発癌細胞の遺残から発生すると考えられており、再発時の治療も原発癌細胞の特徴をもとに行われている。しかし、原発腫瘍には形質発現や遺伝子変異の多様性が観察され、再発腫瘍が原発腫瘍の主たる形質と同じであるとは限らない。よって、再発腫瘍をより適切に治療するためには、原発腫瘍の多様性と再発腫瘍細胞との関係性を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

乳癌治療の個別化、とくに再発治療の個別的適正化をはかることを最終的な研究目標とする。癌細胞の遺伝子変異の多様性 (heterogeneity) とクロナリティー (clonality) との関係性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

対象；1991年～2004年までに東海大学医学部附属病院において乳房温存療法を行った558例のうち、同側乳房内腫瘍、対側乳房内腫瘍が発生した症例

材料：ホルマリン固定パラフィン包埋切片

方法：

(1) androgen receptor 遺伝子多型解析

(human androgen receptor (HUMARA))

- ① 原理：ARはXq11.2-12に存在し、N末端領域の polyglutamine (CAG) repeat (n8-36) による遺伝子多型が確認されている。女性体細胞におけるX染色体は、いずれかがランダムに不活化されている。よって、非腫瘍性組織における多クローン性組織においては、maternal, paternal ARのCAG repeat数が異なっているが、腫瘍組織の単ク

ローン性組織においては、いずれか一方のARのみが確認される(図1)

- ② 非腫瘍性リンパ節を用いてAR遺伝子多型の有無を確認し、遺伝子多型が観察された症例について、原発巣と再発腫瘍のAR遺伝子多型の有無を比較検討した。
- ③ HUMARA解析方法は、Wu Yらの方法(Wu Y, et al. Fertility and Sterility 79; 710-717, 2003)をもとに条件の最適化をはかった。また、細胞採取には、laser microdissection 法によった(図2)。

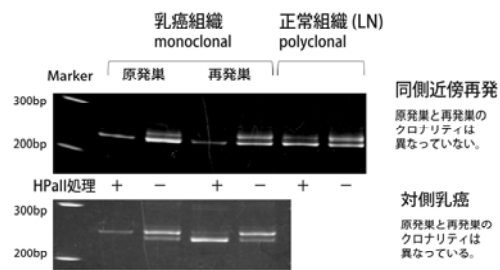


図1 乳房内再発と両側乳癌における HUMARA 解析

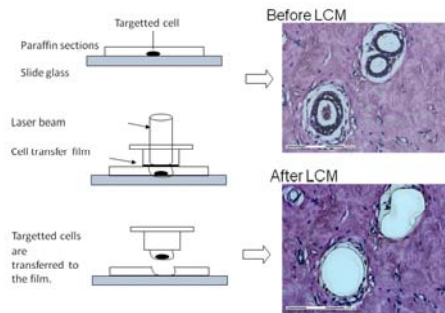


図2 laser microdissection 法による細胞採取

(2) Mitochondrial(mt) DNA D-loop somatic mutation 解析 (gene alteration of mtD-loop region (GAMDDL))

- ① リンパ節、原発腫瘍周囲乳腺組織、原発腫瘍、2次性腫瘍周囲乳腺組織、2次性腫瘍について検討した。
- ② laser microdissection 法により、検体を採取、DNAを抽出した。
- ③ mtDNA D-loop regionの塩基配列をdirect sequence 法にて解析した(図3)。

- ④ 塩基配列はneighbor-joining method により系統樹解析 (MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/index.html>)) をおこない、unweighted pair group method with arithmetic mean (UPMEGA) methodにて、検討した。

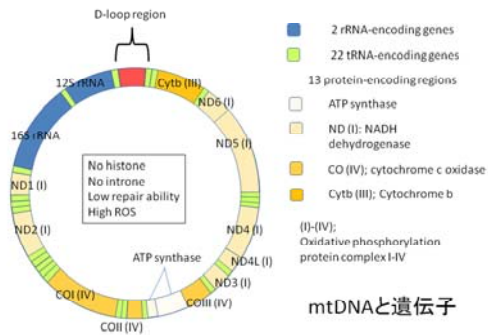


図3 mtDNA D-loop region

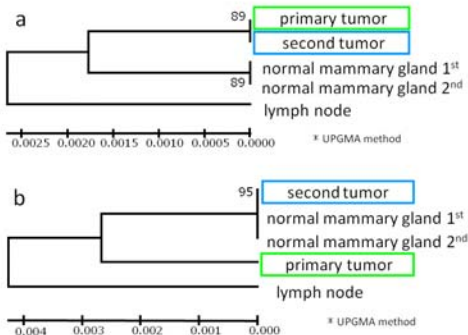


図4 mtDNA-D-loop region 塩基配列の分子系統樹

4. 研究成果

(1) HUMARA

- ① 正常リンパ節を用いた androgen receptor 遺伝子多型解析により、16/19 例で多型が確認され、多型解析によるモノクロナリティ解析が可能であることがわかった。
- ② 同側乳房内腫瘍 2/8 例、対側乳房内腫瘍 6/11 例で、原発巣、再発腫瘍間でのクロナリティが異なることが証明された。残りの症例については、クロナリティが同じ、または異なる確率は約 50%であり、さらに詳細な検討が必要であり、GAMDDL 解析をおこなった。

(2) GAMDDL

- ① 同側乳房内腫瘍 3/8 例、対側乳房内腫

瘍 4/5 例で、原発巣、再発腫瘍間でのクロナリティが異なることが証明された。同側乳房内腫瘍 3/8 例は、遺伝子変異は認められず、真の再発と考えられた。残りの症例については、判定できなかった。

- ② HUMARA, GAMDDL, combined HUMARA and GAMDDL の有効解析率は、それぞれ 42.1%, 76.9%, 89.5%であり、GAMDDL の有用性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Masuda S. Breast cancer pathology: The impact of molecular taxonomy on morphological taxonomy. *Pathol Int.* 査読有 62:209-302, 2012
2. Kumaki N, Umemura S, Tang X, Saito Y, Suzuki Y, Tokuda Y. Alteration of immunohistochemical biomarkers between pre- and post-chemotherapy: hormone receptors, HER2 and Ki-67. *Breast Cancer.* 査読有 18:98-102, 2011
3. Tang X, Umemura S, Kumaki N, Izumi M, Saito Y, Suzuki Y, Ozawa A, Tokuda Y. A case report of pigmented mammary Paget's disease mimicking nevus of the nipple. *Breast Cancer.* 査読有 DOI 10.1007/s12282-010-0249-y, 2011.
4. Tang XY, Umemura S, Tsukamoto H, Kumaki N, Tokuda Y, Osamura RY. Overexpression of fatty acid binding protein-7 correlates with basal-like subtype of breast cancer. *Pathol Res and Pract.* 査読有 206: 98-101, 2010
5. Itoh H, Miyajima Y, Kato N, Serizawa A, Machida T, Umemura S, Osamura RY. Fine needle aspiration cytology of ductal adenoma of the breast with intracellular mucin. *Acta Cytologica.* 査読有 54: 753-758, 2010
6. Kato N, Itoh H, Serizawa A, Hatanaka Y, Umemura S, Osamura RY. Evaluation of HER2 gene amplification in invasive breast cancer using a dual-color chromogenic in situ hybridization (Dual CISH). *Pathol Int.* 査読有 60: 510-515, 2010

7. Tang X, Takekoshi S, Itoh J, Umemura S, Shoji S, Terachi T, Osamura RY. Somatostatin analogue inhibits the mobility of prostate carcinoma cells: a new therapeutic method for advanced prostate carcinoma. Int J Oncol. 査読有37:1077-1083, 2010
8. Tsuda H, Kurosumi M, Umemura S, Yamamoto S, Kobayashi T, Osamura RY. HER2 testing on core needle biopsy specimens from primary breast cancers: interobserver reproducibility and concordance with surgically resected specimens. BMC Cancer. 査読有 10:534, 2010
9. Umemura S, Shirane M, Takekoshi S, Tokuda Y, Mori K, Osamura RY. High expression of thymidine phosphorylase in basal-like breast cancers: stromal expression in EGFR positive, CK5/6 positive breast cancers. Oncology Letters. 査読有 1: 261-266, 2010
10. Niikura N, Kimura M, Hirabayashi K, Umemura S, Minakawa T, Shintoku J, Suzuki Y, Tokuda Y. Breast conserving surgery for male noninvasive intracystic papillary carcinoma: A case report. Tokai J Exp Clin Med. 査読有 35: 13-16, 2010
11. Umemura S, Kurosumi M, Moriya T, Oyama T, Arihiro K, Yamashita H, Umekita Y, Komoike Y, Shimizu C, Fukushima H, Kajiwarra H, Akiyama F. Recommendation for "Adequate evaluation of hotmonr receptor" : A report of task force of Japanese Breast Cancer Society. Oncology Reports. 査読有 24:299-304, 2010
12. Umemura S, Shirane M, Takekoshi S, Kusakabe T, Itoh J, Egashira N, Tokuda Y, Mori K, Osamura RY. Overexpression of E2F-5 correlates with a pathological basal phenotype and a worse clinical outcome. Br J Cancer. 査読有 100: 764-771, 2009
13. Shoji S, Tang XY, Umemura S, Itoh J, Takekoshi S, Shima M, Usui Y, Nagata Y, Uchida T, Osamura RY, Terachi T. Metastin inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma with

overexpression of metastinc receptor. Eur Urology. 査読有 55: 441-451, 2009

[学会発表] (計 3 件)

1. 門脇哲郎, 梅村しのぶ 他. 乳癌における androgen receptor 遺伝子多型による clonality解析の有用性について. 第98回日本病理学会総会 2009年5月 京都
2. 梅村しのぶ. Clonality analysis of breast cancer cells by androgen receptor polymorphism and somatic mutation of mitochondria DNA. 第69回癌学会総会2010. 9. 22 大阪
3. Umemura S, et al.. Analysis of polymorphism of androgen receptor gene in primary and in ipsi-lateral or contra-lateral breast cancers 33rd San Antonio Breast Cancer Symposium 2010. 12. 12 San Antonio, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

増田しのぶ (MASUDA SHINOBU)
 日本大学・医学部・教授
 研究者番号 : 20276794

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(平成21年度)
 長村 義之 (OSAMURA YOSHIYUKI)
 東海大学・医学部・教授
 研究者番号 : 10100992

(平成21, 22年度)

徳田 裕 (TOKUDA YUTAKA)
 東海大学・医学部・教授
 研究者番号 : 20163975

竹腰 進 (TAKEKOSHI SUSUMU)
 東海大学・医学部・准教授
 研究者番号 : 70216878