

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08357

研究課題名(和文) 組織型が混在する乳癌のミトコンドリアDNA変異解析による癌細胞系譜の解明

研究課題名(英文) A cell lineage of breast cancer consisting of different histologic types by mutation analysis of mtDNA D-loop region

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腫瘍組織型の背景にある癌細胞の系譜を明らかにすることを目的として行った。乳管癌と小葉癌が併存する癌について、ミトコンドリアDNA-Dループ領域の遺伝子変異および comprehensive cancer panel を用いた遺伝子変異解析を行った。乳管癌と小葉癌という組織形態が異なる癌であっても、病変が近傍に位置している腫瘍においては、同一の癌細胞から発生している可能性が示唆された。また、非浸潤性乳管癌という同一の組織形態であっても、区域が異なる場合には、異なる癌細胞に由来する可能性が示唆された。本研究により、組織型の背景にある癌細胞の系譜について、より深く理解することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of study was to reveal cell lineage of cancer cells behind the characteristics of pathological morphology. Combined lobular and ductal carcinomas were submitted to this study. Genetic alteration of D-loop region of mitochondrial DNA and 409 nuclear genes were analyzed. Closely located cancer cells have a possibility to be originated from an identical cancer cell even though cancer cells were classified into different histological types. It is also suggested that cancer cells far from each other in different segments might be different cell origin, even though they were classified into the same histological type. This study enables us to look into the cell lineage of cancer cells in relation to histological type.

研究分野：人体病理学

キーワード：乳癌 細胞系譜 乳管癌 小葉癌 ミトコンドリアDNA 組織型

1. 研究開始当初の背景

本邦における乳腺腫瘍の組織型分類(乳癌取り扱い規約およびWHO分類(第4版))は基本的に形態学的特徴に基づいた分類である。一方、診療現場では生物学的特性による臨床的内因性サブタイプが使用されている。乳癌組織型と網羅的遺伝子発現解析との関連性に関する研究は少数ながら存在するが、実臨床においては、病理組織学的形態分類と臨床的内因性サブタイプとの乖離が広がっているのが現状である。癌化機序を反映し、また臨床的有用性の高いある形態学的組織型を明確化し、基礎・病理・臨床統合的な分類体系を再考する必要性が生じてきている。

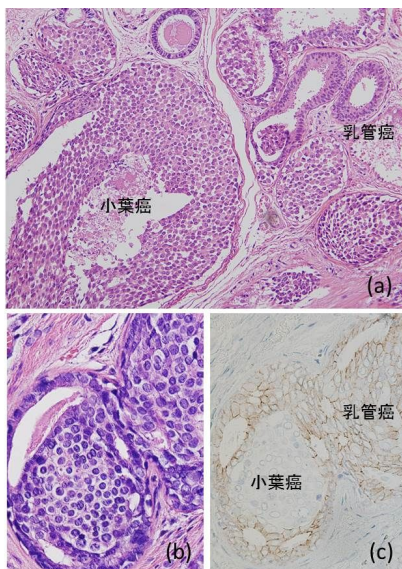
組織型は病理形態像の特徴を基に分類されるが、時に、異なる組織型が混在する腫瘍が存在する。例えば、粘液癌と神経内分泌癌、低異型度乳管癌と古典型小葉癌、背景に小葉病変を伴う粘液癌などである。このような異なる組織型が混在する癌が、複数の癌発生細胞に由来するのか、単一癌発生細胞から派生した遺伝子異常によるのか、あるいは蛋白合成過程における変化なのかを明らかにすることは、癌の発生、進展過程を知るうえで重要であり、組織型分類の再構築のために欠かせない情報となる。

2. 研究の目的

異なる組織型が混在する癌(例えば乳管癌と小葉癌)は、複数の癌発生細胞に由来するかどうか、を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 定義: 癌の形態、形質、遺伝子変異の多様性の背景にある“癌細胞の由来の系譜”を癌細胞のlineageと定義した。
- (2) 症例および検体: 乳管癌と小葉癌が併存する症例(combined lobular and ductal carcinoma; CLDC)のホルマリン固定パラフィン包埋切片(FPPE)



低異型度乳管癌と小葉癌の混在症例
(a)(b):HE染色,(c):E-cadherin

(3) 方法:

Mitochondrial DNA D-loop region (mtDNA-DL)多型解析
comprehensive cancer panel を用いた遺伝子変異解析
Real time PCR 法による検証
Quantitative PCR による copy number variation の検討

(4) 病変の選択:

非腫瘍組織:リンパ節、皮膚、乳腺組織
病変:非浸潤性乳管癌、非浸潤性小葉癌、浸潤性乳管癌、浸潤性小葉癌、平坦型上皮異型他

4. 研究成果

(1) 症例 A に関する結果

mtDNA-DL 多型解析:mtDNA 解析では合計 40 個の塩基置換多型(SNS)と 2 領域 5 個の単純塩基繰り返し数変化(SSRNV)と 1 個の塩基置換変異(SNV)を認めた。CCP では Copy Number Variation 4 個の存在と癌関連遺伝子 5 種の変異が指摘された。

CCP 遺伝子変異解析他:論文執筆中

- (2) 考察:遺伝子変異の種類と量的変化を検索することにより、乳管癌と小葉癌という組織形態が異なる癌であっても、病変が近傍に位置している腫瘍においては、同一の lineage の癌細胞から発生している可能性が示唆された。また、非浸潤性乳管癌という同一の組織形態であっても、区域が異なる場合には、異なる lineage に由来する癌の可能性が示唆された。

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 22 件)

Yamaguchi T, Mukai H, Akiyama F, Arihiro K, Masuda S, Kurosumi M, Kodama Y, Horii R, Tsuda H: Inter-observer agreement among pathologists in grading the pathological response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Breast Cancer, 査読有, 25(1):118-125. doi: 10.1007/s12282-017-0799-3, 2018.

Ishibashi N, Maebayashi T, Aizawa T, Sakaguchi M, Nishimaki H, Masuda S: Correlation between the Ki-67 proliferation index and response to radiation therapy in small cell lung cancer. Radiation Oncology, 査読有, 12(1):16, DOI 10.1186/s13014-016-0744-1., 2017.

Sano M, Ichimaru Y, Kurita M, Hayashi E, Homma T, Saito H, Masuda S, Nemoto N, Hemmi A, Suzuki T, Miyairi S, Hao H: Induction of cell death in pancreatic ductal

- adenocarcinoma by indirubin 3'-oxime and 5-methoxyindirubin 3'-oxime in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 査読有, 397:72-82, 2017.
- Sano M, Homma T, Ishige T, Sawada N, Ihara S, Kinoshita K, Masuda S, Hao H: An autopsy case of hyperthyroid cardiomyopathy manifesting lethal congestive heart failure. *Pathol Int.*, 査読有, 67(2):110-112, 2017.
- Kochi M, Iwamoto T, Niikura N, Bianchini G, Masuda S, Mizoo T, Nogami T, Shien T, Motoki T, Taira N, Tokuda Y, Doihara H, Matsuoka J, Fujiwara T: Tumour-infiltrating lymphocytes (TILs)-related genomic signature predicts chemotherapy response in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treatment*, 査読有, DOI 10.1007/s10549-017-4502-3, published online: 13 Sep 2017.
- Banks P, Brown R, Laslowski A, Daniels Y, Branton P, Carpenter J, Zarbo R, Forsyth R, Liu Yh, Kohl S, Diebold J, Masuda S, Plummer T, Dennis E : A Proposed Set of Metrics to Reduce Patient Safety Risk From Within the Anatomic Pathology Laboratory. *Lab. Medicine*, 査読有, 48(2):195-201, 2017.
- Hasegawa H, Matsuzaki H, Furusaka T, Osimi T, Masuda S, Unno T, Abe O: Maxillary sinus hemangioma: usefulness of embolization according to classification. *Brazil. J. Otorhinol.*, 査読有, 83(4):490-493, 2017.
- Nakanishi Y, Masuda S, Iida Y, Takahashi N, Hashimoto S: Case Report of Non-Small Cell Lung Cancer with STRN-ALK Translocation: A nonresponder to Alectinib. *J. Thorac. Oncol.*, 査読有, 12: e202-e204, 2017.
- Niikura N, Tomotaki A, Miyata H, Iwamoto T, Kawai M, Anan K, Hayashi N, Aogi K, Ishida T, Masuoka H, Iijima K, Masuda S, Tsugawa K, Kinoshita T, Nakamura S, Tokuda Y: Changes in tumor expression of HER2 and hormone receptors status after neoadjuvant chemotherapy in 21 755 patients from the Japanese breast cancer registry. *Ann. Oncol.*, 査読有, 27:480-487, 2016.
- Kawai M, Tomotaki A, Miyata H, Iwamoto T, Niikura N, Anan K, Hayashi N, Aogi K, Ishida T, Masuoka H, Iijima K, Masuda S, Tsugawa K, Kinoshita T, Nakamura S, Tokuda Y: Body mass index and survival after diagnosis of invasive breast cancer: a study based on the Japanese National Clinical Database - Breast Cancer Registry. *Cancer Medicine*, 査読有, DOI 10.1002/cam4.678, 2016.
- Iwamoto T, Kumamaru H, Miyata H, Tomotaki A, Niikura N, Kawai M, Anan K, Hayashi N, Hayashi N, Masuda S, Tsugawa K, Aogi K, Ishida T, Masuoka H, Iijima K, Matsuoka J, Doihara H, Kinoshita T, Nakamura S, Tokuda Y: Distinct breast cancer characteristics between screen- and self-detected breast cancers recorded in the Japanese Breast Cancer Registry. *Breast Cancer Res. Treatment*, 査読有, DOI 10.1007/s10549-016-3770-7, 2016.
- Masuda S: Pathological examination of breast cancer biomarkers: current status in Japan. *Breast Cancer*, 査読有, 23:546-51, doi: 10.1007/s12282-014-0566-7, 2016.
- Kataoka A, Iwamoto T, Tokunaga E, Tomotaki A, Kumamaru H, Miyata H, Niikura N, Kawai M, Anan K, Hayashi N, Masuda S, Tsugawa K, Aogi K, Ishida T, Masuoka H, Iijima K, Kinoshita T, Nakamura S, Tokuda Y: Young adult breast cancer patients have a poor prognosis independent of prognostic clinicopathological factors: a study from the Japanese Breast Cancer Registry. *Breast Cancer Res. Treatment*, 査読有, 160:163-172, DOI: 10.1007/s10549-016-3984-8, 2016.
- Nozaki F, Hirotani Y, Nkanishi Y, Yamaguchi H, Nisimaki H, Noda H, Tang X, Yamamoto H, Suzuki A, Seki T, Masuda S: p62 Regulates the Proliferation of Molecular Apocrine Breast Cancer Cells. *Acta Histochem. Cytochem.*, 査読有, 49 : 125-130, doi: 10.1267/ahc.16013, 2016.
- Murakami E, Nakanishi Y, Hirotani Y, Ohni S, Tang X, Masuda S, Enomoto K, Sakurai K, Amano S, Yamada T, Nemoto N: Roles of Ras Homolog A in Invasive Ductal Breast Carcinoma. *Acta Histochem. Cytochem.*, 査読有, 49 : 131-140, 2016.
- Jing Wu, Tang X, Iida Y, Fuchinoue F, Kusumi T, Yagihashi N, Kawachi K, Shimizu S, Masuda S: Adenomyoepithelioma with carcinoma of the breast: A report of two cases and a review of the literature. *Pathol. Res. Pract.*, 査読有, 212: 130-134, doi: 10.1016/j.prp.2015.09.008., 2016.
- Kinoshita T, Fukui N, Anan K, Iwamoto T, Niikura N, Kawai M, Hayashi N, Tsugawa K, Aogi K, Ishida T, Masuoka H, Masuda S, Iijima K, Nakamura S, Tokuda Y: Comprehensive prognostic report of the Japanese Breast Cancer Society Registry in 2004. *Breast Cancer*, 査読有, DOI 10.1007/s12282-015-0644-5, 2015.
- Anan K, Fukui N, Kinoshita T, Iwamoto T, Niikura N, Kawai M, Hayashi N, Tsugawa K, Aogi K, Ishida T, Masuoka H, Masuda S,

- Iijima K, Nakamura S, Tokuda Y: Comprehensive prognostic report of the Japanese Breast Cancer Society Registry in 2005. Breast Cancer, 査読有, DOI 10.1007/s 12282-015-0645-4, 2015.
- Iwamoto T, Fukui N, Kinoshita T, Anan K, Niikura N, Kawai M, Hayashi N, Tsugawa K, Aogi K, Ishida T, Masuoka H, Masuda S, Iijima K, Nakamura S, Tokuda Y: Comprehensive prognostic report of the Japanese Breast Cancer Society Registry in 2006. Breast Cancer, 査読有, DOI 10.1007/s 12282-015-0646-3, 2015.
- Iizuka M, Nakanishi Y, Fuchinoue F, Maeda T, Murakami E, Obana Y, Enomoto K, Tani M, Sakurai K, Amano S, Masuda S: Altered intracellular region of MUC1 and disrupted correlation of polarity-related molecules in breast cancer subtypes. Cancer Sci., 査読有, 106: 307-14, 2015.
- 21 Fuchinoue F, Hirotsu Y, Nakanishi Y, Yamaguchi H, Nishimaki H, Noda H, Tang X, Iizuka M, Amano S, Sugitani M, Nemoto N, Masuda S: Overexpression of PGC1 α and accumulation of p62 in apocrine carcinoma of the breast. Pathol. Int., 査読有, 65: 19-26, 2015.
- 22 Tang X, Yamashita T, Hara M, Kumaki N, Tokuda Y, Masuda S: Histopathological characteristics of breast ductal carcinoma in situ and association with imaging findings. Breast Cancer, 査読有, DOI 10.1007/s12282-015-0592-0, 2015.

〔学会発表〕(計 3 件)

野田博子, 江角真理子, 山口裕美, 増田しのぶ: 乳管癌小葉癌併存症例の分枝系統樹解析. 第 106 回日本病理学会総会, 東京, 2017.4

野田博子, 江角真理子, 山口裕美, 中井登紀子, 唐小燕, 増田しのぶ: ミトコンドリア DNA 多型と癌関連遺伝子体細胞突然変異解析を併用した乳管癌小葉癌併存症例の分子系統樹解析. 第 105 回日本病理学会総会, 仙台, 2016.5

野田博子, 江角真理子, 山口裕美, 増田しのぶ: 乳腺乳管癌と小葉癌併存症例の分子系統樹解析: FFPE/レーザーマイクロダイセクションサンプルのミトコンドリア DNA 多型から. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015.10

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

江角真理子 (ESUMI, Mariko)
日本大学・医学部・客員教授
研究者番号: 10147019

唐小燕 (TOU, Shoen)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 20326036

天野 定雄 (AMANO, Sadao)
日本大学・医学部・客員教授
研究者番号: 80159459

櫻井 健一 (SAKURAI, Kenichi)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 20366602