

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590433

研究課題名(和文) 乳癌におけるミトコンドリアDNA Dループ領域変異解析を用いた癌細胞系譜の解明

研究課題名(英文) An analysis of cell lineage for breast cancer by gene alteration of mitochondria DNA 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：目的：乳癌細胞系譜解明のために、ミトコンドリアDNA-Dループ(mtDNA-DL; MDDL)領域の変異解析を用いて、癌細胞系譜を明らかにすることを目的とした。

課題と結果：(1)正常組織におけるMDDL遺伝子変異は、異時性切除の同側乳腺に0.03%、対側乳腺に0.74%の頻度で指摘された。(2)CEP17 polysomyの症例とHER2 genetic heterogeneityの症例に重複はみられなかった。(3)同一細胞においてHER2蛋白と遺伝子を同時に可視化するためのプロトコルが確立された。(4)原発巣の遺伝子変異有り癌細胞と無し癌細胞に、MDDL遺伝子変異に相違がみられた。

研究成果の概要(英文)：(1)Gene alteration of mtDNA-DL (GAMDDL) was detected in metachronously resected ipsilateral normal breast (0.03%) and contralateral breast (0.74%). (2) Breast cancers with polysomy of centromere 17 and those with HER2 gene heterogeneity were not overlapped. (3) The protocol to visualize HER2 protein and gene simultaneously was established. (4) Primary breast cancer with heterogeneity, e.g. with and without HER2 gene amplification, and recurrent tumor without HER2 gene amplification was analyzed by GAMDDL method. There are differences of MDDL between carcinoma cells of primary tumor with and without HER2 gene amplification.

研究分野：人体病理学

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

1. 研究開始当初の背景

乳癌の形態、形質および遺伝子変異多様性の背景にある癌細胞の系譜を明らかにすることは有意義である。癌発生に関する生物学的知見を得ることが可能となるのみならず、より有効な再発治療戦略を考慮することが可能となる。しかし、固形腫瘍のクロナリティ解析方法は限られている。

われわれは、「乳癌の遺伝子変異多様性とクロナリティ解析(基盤研究(C) H21-23)」において、従来から一般的な方法として知られている androgen receptor (AR) 遺伝子多型解析(HUMARA; human androgen receptor analysis) 法と、mitochondria DNA D loop 領域の多型解析 (GAMDDL; gene alteration of mitochondrial DNA D-loop region analysis) とを比較検討し、後者の方法論が有用であるとの結論にいたった。

2. 研究の目的

乳癌細胞系譜解明のための病理学的方法論として、ミトコンドリア DNA-D ループ(mtDNA-DL; MDDL)領域の変異解析を用い、形態、形質、遺伝子変異の多様性の深層にある癌細胞系譜を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常組織における MDDL 遺伝子変異多様性の基礎的検討

(2) HER2 遺伝子変異多様性の頻度

定義:

・ HER2 polysomy: CEP17 シグナル数の平均が 3 以上(Hanna WM, et al. Mod Pathol 27; 4-18, 2014)

・ HER2 genetic heterogeneity: HER2/CEP17>2.2 の細胞が、>5%, <50% みられる症例 (Hanna WM, et al. Mod Pathol 27; 4-18, 2014)

材料: ヒト乳癌組織のホルマリン固定、パラフィン包埋切片(FFPE)

対象: 免疫染色により HER2 2+ あるいは 3+ と評価された症例

方法: HER2 dual ISH DNA assay を用いて検討した。

(3) 同一細胞における蛋白・遺伝子の可視化プロトコル確立

材料: HER2 陽性乳癌培養細胞株(SK-BR3)のセルブロック

方法: 蛋白の検出には抗 HER2 抗体を用いた免疫染色を、遺伝子の検出には HER2 gene probe, CEP17 probe を用いた in situ hybridization 法を行った。標識物質は、IHC 法には Alexa Fluor 555

を、ISH 法には Texas red (HER2) および FITC (CEN-17) の蛍光色素を用いた。

IHC 法のみ、IHC 法後 ISH 法、ISH 法のみを検討を行い、IHC 法後 ISH 法のシグナルの適正性を確認した。

IHC 法については、ポリマー標識法と LSAB 法とを比較検討した。

ISH 法の前処置として酵素処理の必要性の有無について比較検討した。

(4) HER2 遺伝子変異多様性と MDDL 遺伝子変異解析

対象: 原発巣と再発巣における HER2 遺伝子増幅の有無に差異がみられた 2 症例

方法: 原発時の非腫瘍性乳腺および HER2 遺伝子増幅有り癌細胞、増幅無し癌細胞、再発巣の増幅無し癌細胞について検討した。GAMDDL 法により得られた塩基配列を MEGA 4 を用いて解析し、樹形図は minimum evolution 法により表記した。

4. 研究成果

(1) 正常組織における mtDNA-DL 領域の遺伝子変異多様性の基礎的検討

異時に切除された乳腺組織の MDDL 遺伝子変異の頻度は、同側乳腺では、0.03%、対側乳腺では 0.74% であった(p=0.0358, 文献 12)。

(2) HER2 遺伝子変異多様性の頻度

CEP17 polysomy は 14.7% に、genetic heterogeneity は 17.6% に指摘された。Polysomy が指摘された症例と genetic heterogeneity が指摘された症例に重複はみられなかった。

genetic heterogeneity は HER2 遺伝子増幅のない症例にやや多い傾向がみられたが、統計学的有意差は認められなかった。polysomy, genetic heterogeneity は、個々の癌細胞単位で観察され、必ずしも遺伝子変異を有する癌細胞集塊を形成してはいなかった。

(3) 同一細胞における蛋白・遺伝子の可視化プロトコル確立

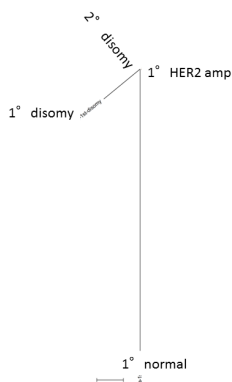
蛍光標識による IHC 法後 ISH 法により、蛋白と遺伝子の同時検出は可能であった。IHC 法については、ポリマー標識法のほうが LSAB 法よりも良好なシグナルが得られた。

ISH 法の前処置として酵素処理は不要であり、この過程を省略することにより良好なシグナルが得られた。

(4) HER2 遺伝子変異多様性と mtDNA D-loop 領域(MDDL)遺伝子変異解析
症例 1 (右図)

原発巣の非腫瘍乳腺と乳癌とは、MDDL 遺伝子変異に大きな差異がみられた。HER2 遺伝子増幅有り癌細胞と遺伝子増幅無し癌細胞とに、MDDL 遺伝子変異に差異がみられた。

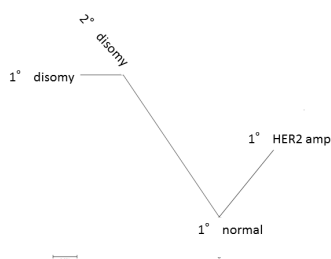
再発時 HER2 遺伝子増幅無し癌細胞は、原発巣の HER2 増幅有り癌細胞と同じであった。



症例 2 (下図)

原発巣の非腫瘍性乳腺と乳癌とは、MDDL 遺伝子変異に差異がみられた。HER2 遺伝子増幅有り癌細胞と遺伝子増幅無し癌細胞とに、MDDL 遺伝子変異に差異がみられた。

再発巣の HER2 遺伝子増幅無し癌細胞は、原発巣のいずれの癌細胞の MDDL 遺伝子変異とも異なっていた。原発巣の遺伝子増幅無し癌細胞に近似していた。



非腫瘍性乳腺と乳癌、および原発巣の遺伝子変異有り癌細胞と無し癌細胞とに、MDDL 遺伝子変異に相違がみられた。再発巣の癌細胞の MDDL 遺伝子変異は、必ずしも原発巣の MDDL 遺伝子変異と一致しなかった。

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 12 件)

1. 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: 307-314, 2015.

2. 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.
3. Niikura N, Masuda S, Kumaki N, Tang X, Terada M, Terao M, Iwamoto T, Oshitanai R, Morioka T, Tuda B, Okamura T, Saito Y, Suzuki Y, Tokuda Y. Prognostic Significance of the Ki67 Scoring Categories in Breast Cancer Subgroups. *Clinical Breast Cancer*, 査読有, 14: 323-329.e3, 2014.
4. Kushima R, Kuwata T, Yao T, Kuriki H, Hashizume K, Masuda S, Tuda H, Ochiai A. Interpretation of HER2 tests in gastric cancer: confirmation of interobserver differences and validation of a QA/QC educational program. *Virchows Arch.*, 査読有, 464: 539-545, 2014.
5. Kim SJ, Masuda N, Tsukamoto F, Inaji H, Akiyama F, Sonoo H, Kurebayashi J, Yoshidome K, Tsujimoto M, Takei H, Masuda S, Nakamura S, Noguchi S. The cell cycle profiling: Risk score based on CDK1 and 2 predicts early recurrence in node-negative, hormone receptor-positive breast cancer treated with endocrine therapy. *Cancer Letters*, 査読有, 355: 217-223, 2014.
6. Terada M, Niikura N, Tsuda B, Masuda S, Kumaki N, Tang X, Okamura T, Saito Y, Suzuki Y, Tokuda Y. Comparative Study of the One-step Nucleic Acid Amplification Assay and Conventional Histological Examination for the Detection of Breast Cancer Sentinel Lymph Node Metastases. *Tokai Exp Clin Med.*, 査読有, 39: 122-127, 2014.
7. Masuda S. Pathological examination of breast cancer biomarkers: current status in Japan.

Breast Cancer, 査読有, DOI
10.1007/s12282-014-0566-7, 2014.

8. 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, 2014
9. Mikami Y, Ueno T, Yoshimura K, Tsuda H, Kuroishi M, Masuda S, Horii R, Toi M and Sasano H. Interobserver concordance of Ki67 labeling index in breast cancer: Japan Breast Cancer Research Group Ki67 Ring Study. Cancer Sci, 査読有, 104: 1539-43, 2013.
10. Kochi M, Fujii M, Masuda S, Kanamori N, Mihara Y, Funada T, Tamegai H, Watanabe M, Suda H and Takayama T. Differing deregulation of HER2 in primary gastric cancer and synchronous related metastatic lymph nodes. Diagnostic Pathology, 査読有, 21: 8:191, 2013.
11. Niikura N, Iwamoto T, Masuda S, Kumaki N, Tang X, Shirane M, Mori K, Tsuda B, Okamura T, Saito Y, Suzuki Y, Tokuda Y. Immunohistochemical Ki67 labeling index has a similar proliferation predictive power as various gene signatures in breast cancer. Cancer Sci, 査読有, 103: 1508-1512, 2012.
12. Masuda S, Kadowaki T, Kumaki N, Tang X, Tokuda Y, Yoshimura S, Takekoshi S, Osamura RY. Analysis of gene alterations of mitochondrial DNA D-loop regions to determine breast cancer clonality. Br. J. Cancer, 査読有, 107: 2016-2023, 2012.

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・准教授
研究者番号: 10147019

唐 小燕 (TOU, Shoen)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 20326036

淵之上 史 (FUCHINOUE, Fumi)
日本大学・医学部・助手
研究者番号: 10409021

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

櫻井 健一 (SAKURAI, Kenichi)
日本大学・医学部・講師
研究者番号: 2036602