

乳腺小葉癌における *CDH1* 遺伝子異常の検討 —デジタルPCR法および2色FISH法の比較

唐 小燕¹⁾, 中西陽子¹⁾, 増田しのぶ¹⁾

Examination of the *CDH-1* gene in lobular carcinoma of breast- A comparative study between digital PCR and Dual-FISH methods

Xiaoyan TANG¹⁾, Yoko NAKANISHI¹⁾, Shinobu MASUDA¹⁾

要旨

細胞接着蛋白E-Cadherin(E-Cad)の異常は、乳腺小葉癌の特徴のひとつであり、E-Cad免疫組織化学法(IHC)は、乳腺小葉癌と乳管癌の鑑別診断に有用な手法である。一方、E-Cad陽性の小葉癌も存在する。本研究は、E-Cad(IHC)陽性小葉癌におけるE-Cad遺伝子*CDH-1*(16q22.1)異常の特徴を探ることを目的とする。対象は2013～2016年の間当院にて行われた乳癌手術症例のうち、浸潤性小葉癌と診断された26例。症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、デジタルPCR法および2色Fluorescence in situ hybridization法を行った。結果として、E-Cad陰性・陽性小葉癌群間の比較では、染色体レベルでもDNAレベルでも*CDH-1*の量的な有意差は認めなかったため、*CDH-1*遺伝子変異や転写活性の異常が存在する可能性が示唆された。

1. はじめに

乳腺小葉癌の特徴のひとつは、細胞接着蛋白E-cadherin(E-Cad)の発現低下である。E-Cad免疫組織化学法(IHC)は、乳腺小葉癌と乳管癌の鑑別診断に有用な手法であるが、E-Cad陽性の小葉癌も存在する¹⁾。今回、われわれは、デジタルPCR(D-PCR)法および2色Fluorescence in situ hybridization法にて、E-Cad IHC陽性小葉癌におけるE-Cad遺伝子*CDH1*(16q22.1)異常の特徴を探ることを目的とした。

2. 対象及び方法

2013年1月～2016年12月の間当院にて行われた乳癌手術症例のうち、浸潤性小葉癌と診断された26例(E-Cad陽性5例、E-Cad陰性21例)を対象とした。それら症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片(FFPE, 4 μ m, シランコートスライド)を用いて、以下の実験を行い、*CDH-1*遺伝子異常の特徴を検討した。

2.1 2色Fluorescence in situ hybridization (Dual-FISH)法

FFPEスライドを脱パラフィン後、10mMクエン酸バッファ80°C55分にて前処理、0.01N HCL+80mg pepsin 37°C30分塩酸酵素処理を行った。*CDH-1*プローブ(*CDH-1* Fish Probe: RED 5-ROX, Empire Genomics, New York)を赤色で、16番染色体のセントロメアプローブ(CEP16, Spectrum Aqua Probe: Abbott Molecular Inc. Vysis, Tokyo, Japan)をSpectrum Aquaで標識した。以上のプローブ混合液をスライドガラスにのせ、83°Cで3分間変性させ、サーモライトで37°Cにて24～48時間ハイブリダイゼーションした後、洗浄し、DAPI IIで対比染色した。蛍光顕微鏡(Carl Zeiss Microscope, Tokyo, Japan)にて観察し、各症例に対して20個の細胞をカウントした。*CDH-1*欠損の判断基準は、*CDH-1*/CEP16 ratio ≤ 0.8 とした。また、20個の細胞のうち*CDH-1*シグナルが単体の細胞が占める率(single signal cell)が60%より多い場合は単独lossとした²⁾。

1) 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野
TANG Xiaoyan : tang.xiaoyan@nihon-u.ac.jp

2.2 デジタルPCR (D-PCR) 法によるCDH-1 DNA 定量解析

Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit にて、FFPE (Thermo Fisher Scientific Inc.) サンプルのDNAを抽出し、QuantStudio 3D デジタルPCRシステムにて、CDH-1 DNAの定量を行った。CDH-1 Probeは、TaqMan® Copy Number Assay (Assay ID: Hs0561677_cn) ; Referenceは、TaqMan® RNase P Assay (Thermo Fisher社) を使用した。D-PCRのCDH-1欠損の判断基準は、CNV/RNase<0.5とした。

3. 結果

1) Dual-FISH法によるCDH-1遺伝子検討の結果

- a. CDH-1欠損は5症例、うちE-Cad IHC陽性1、陰性4症例であった。図1は、Dual-FISH法CDH-1欠損、E-Cad IHC陰性症例。
- b. E-Cad IHCの陽性・陰性症例に有意差はなし(図

2a, b)。

- c. CDH-1 single signalの頻度(%)は、CDH-1/CEP16比に有意に相関していた($p=0.001$)。

2) D-PCR法によるCDH-1 DNA定量解析の結果:

- a. D-PCR法によるCDH-1欠損症例は3例で、うち2例は、Dual-FISH法による欠損症例であった。いずれもE-Cad IHC陰性例であった
- b. E-Cad IHCの陽性・陰性症例に有意差はなかった(図2c)。

3) D-PCR法およびDual-FISH法の結果の相関解析

- a. D-PCR法によるCDH-1 DNA量(CNV/Rnase)とDual-FISH法のCDH-1/CEP16比に相関は認めなかった($p=0.269$)(図3a.)。
- b. D-PCR法によるCDH-1 DNA量とDual-FISH法のCDH-1 single signalの頻度(%)に相関傾向

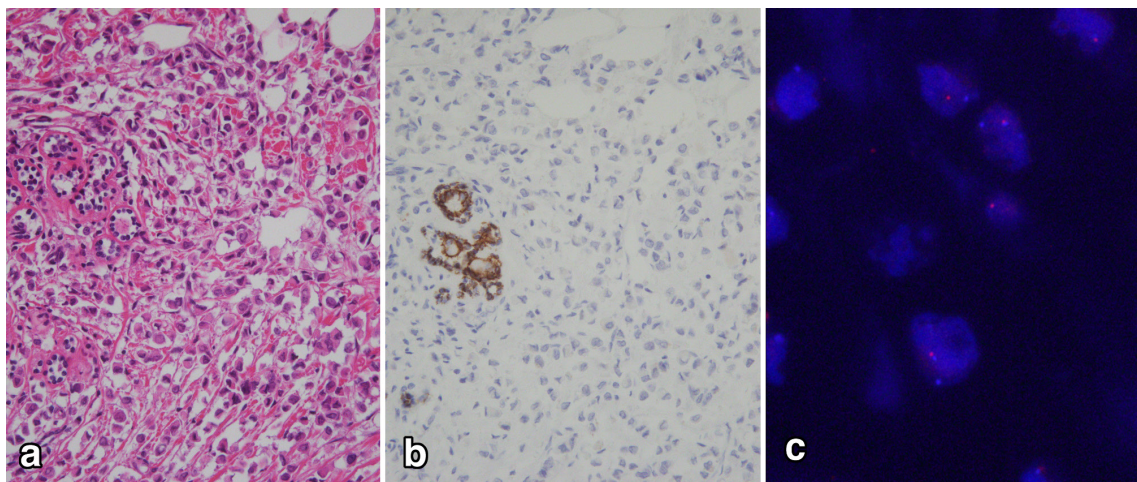


図1 浸潤性小葉癌。a. HE染色：癌細胞は結合性が弱く、乳管周囲に瀰漫性に浸潤増殖する。b. E-Cadherin IHC, 癌細胞は陰性で、残存する乳管上皮の膜に陽性。c. FISH: CDH-1/CEP16=0.7

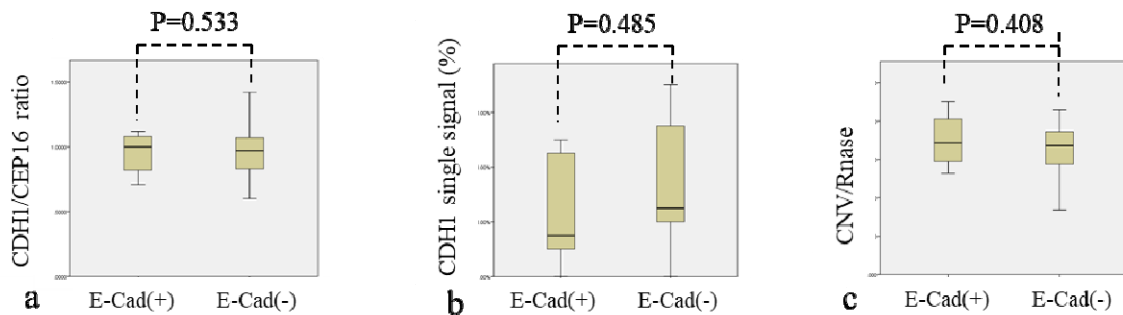


図2 E-Cad(+) VS E-Cad(-)症例のカイ2乗検定結果。a,bはDual-FISH法,cはD-PCR法

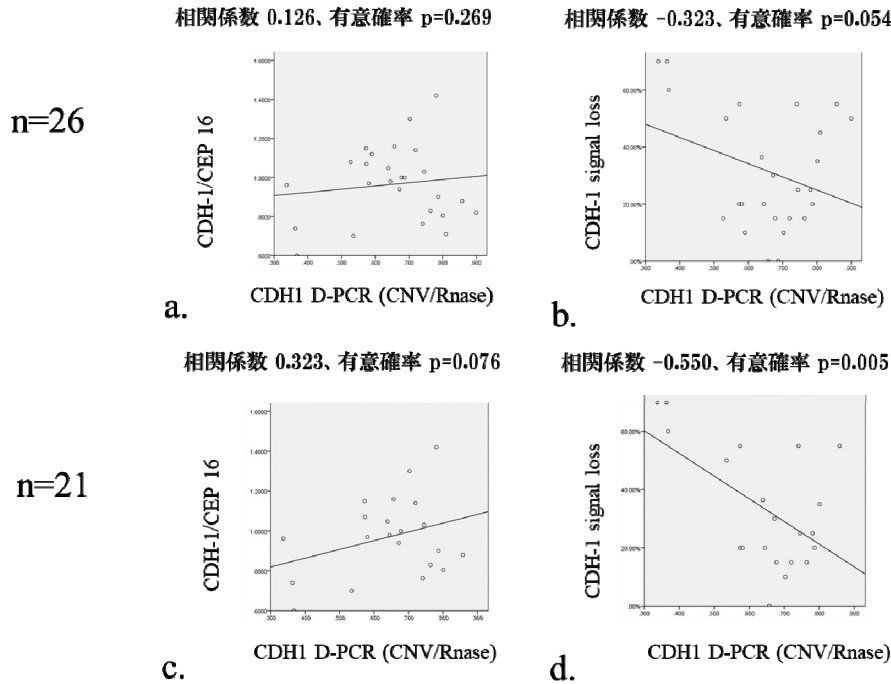


図3 デジタルPCR(D-PCR)によるCDH-1 DNA定量およびDual-FISH法の比較検定結果。a.b.はE-Cad陰性・陽性全例 ($n=27$), c.d.はE-Cad陰性例 ($n=21$)

($p=0.054$, 図3b.)を示した。

- b. E-Cad (IHC) 陰性・陽性小葉癌群間の比較では、Dual-FISH法でもD-PCR法でもCDH-1の量的な有意差は認めなかった。
- c. E-Cad (IHC) 陰性群では、D-PCR法によるCDH-1 DNA量は、Dual-FISH法によるCDH-1 signal lossの頻度 (%) に有意に相関していた ($p=0.005$, 図3d.)。また、統計的有意差は出なかったが、D-PCR法によるCDH-1 DNA量はDual-FISH法のCDH-1/CEP16比に正の相関傾向 ($p=0.076$, 図3c.)を示した。

4. 考 察

E-cadherin蛋白の異常を引き起こす原因として、E-cadherinの遺伝子CDH-1 (16q22.1)の変異、欠失、gene methylation, LOH, 或いは16番染色体長腕の欠失 (16q loss) などが挙げられる³⁾。その原因を調べる方法として、CDH-1 DNA定量, mRNA定量, CDH-1/CEP16のDual-FISH法などがある⁴⁾。今回の研究では、E-Cad IHC陰性・陽性小葉癌の2群の間で、Dual-FISH法のCDH-1/CEP16率あるいはDNA定量PCR法のCDH-1/Rnase値は、いずれも有意差は認められず、欠失以外の機序によるCDH-1

機能異常の喪失の割合がより高いと思われた。一方、D-PCR法によるCDH-1 DNA定量 (CNV/Rnase) とDual-FISH法のCDH-1/CEP16比に相関は認めなかったが、D-PCR法によるCDH-1 DNA定量とDual-FISH法のCDH-1シグナルが単体の細胞が占める率 (CDH-1 single signalの頻度) に相関傾向を示し、特にE-Cad (IHC) 陰性群では、有意に相関していた。その原因として、乳腺小葉癌は16番染色体の部分的lossやgainの発生頻度が高く、CDH-1/CEP16比よりも、CDH-1 single signalの頻度 (%) がより一致すると推測され、また、今回の研究に使った症例数が少ないことも一因として考えられる。

5. 結 語

E-Cad陰性・陽性小葉癌では、CDH-1遺伝子の量的な差異は認められなかったため、欠失以外の機序によるCDH-1機能異常、或いはCDH-1遺伝子変異や転写活性の異常が存在する可能性があると考えられた。

文 献

- 1) Canas-Marques R& Schnitt SJ. E-cadherin immunohistochemistry in breast pathology: uses and pitfalls. *Histopathology* 2016; 68: 57-69.

- 2) Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, et al. HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positive by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 2002; 77:148-154.
- 3) Reed AEM, Kutasovic JR, Lakhani SR, Simpson PT. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and ' omics. *Breast Cancer Research* 2015; 17:12.
- 4) R Roylance, P Gorman, T Papior, et al. A comprehensive study of chromosome 16q in invasive ductal and lobular breast carcinoma using array CGH *Oncogene* 2006; 25: 6544-6553.