

乳腺小葉癌における *CDH-1* 遺伝子異常の検討 — デジタルPCR法および *CDH-1* DNAシーケンシング法

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 DNA sequencing

Xiaoyan TANG¹⁾, Yoko NAKANISHI¹⁾, Shinobu MASUDA¹⁾

要旨

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 (immunohistochemical, 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。本研究は、小葉癌におけるE-Cad遺伝子 *CDH-1* (16q22.1) 異常の特徴と組織形態学の関連性を探ることを目的とする。対象は2012～2016年の間日本大学医学部附属板橋病院にて行われた乳癌手術症例のうち、浸潤性小葉癌 (invasive lobular carcinoma, ILC) と診断された19例。対照としては浸潤性乳管癌 (invasive ductal carcinoma, IDC) 7例を使用した。以上26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 (digital-PCR, D-PCR) およびDNAシーケンシング法を行った。結果として、D-PCR法では、IDCとILC、E-Cad IHC陰性と陽性乳癌いずれも *CDH-1* DNA値 (*CDH-1/RNaseP*) に差を認め、一方でILC群内ではE-Cad IHC陰性と陽性ILCの間に差を認めなかった。DNAシーケンシング法による *CDH-1* DNA遺伝子変異解析では、多数の変異を認めたが、IDCとILCに特徴的な異常は見いだせなかった。乳腺ILCとIDCの組織形態学的特徴は、*CDH-1* DNA値に強く関連することが示唆された。

1. はじめに

乳腺の浸潤性小葉癌は、浸潤性乳癌の中で浸潤性乳管癌の次に発生頻度の高い腫瘍である。臨床的には、浸潤性乳管癌と比較した場合、発症年齢はやや高く、乳腺内の腫瘍形成は不明瞭であり、発見時における腫瘍直径が大きい。予後は、診断より6年以内は良好であるが、さらなる長期観察では、遠隔転移、再発率および死亡率は高い傾向にある¹⁾。そのため、浸潤性小葉癌と浸潤性乳管癌の鑑別診断は、患者の治療計画や予後予測において大変重要である。

一方、乳癌の組織診断では、浸潤性小葉癌および浸潤性乳管癌中の狭義的硬癌は、いずれも小型の細胞で短い一列並列の形態を示す場合が多く、その形態的鑑別診断は困難になる場合がある。鑑別診断法の一つとして、小葉癌の特徴である細胞接着蛋白E-Cadの機能喪失を利用した免疫組織化学法はよく

使われているが、E-Cad陽性の小葉癌も存在し、診断上問題になる場合がある。

E-Cadの異常を引き起こす原因として、E-Cad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²⁾。その原因を調べる方法として、全ゲノムシーケンシング法、*CDH-1* DNAシーケンシング法、*CDH-1* DNA定量、mRNA定量、*CDH-1/CEP16*のDual-FISH法などがある³⁾。しかし、研究方法によって、*CDH-1* 遺伝子異常の率や種類は様々である^{2), 3)}。また、遺伝子検査が直接病理学診断の補助手段として利用できるものが少ないのが現状である。

2. 目的および意義

今回、われわれは、乳腺小葉癌におけるE-Cad遺伝子 *CDH-1* (16q22.1) 異常の特徴を探ること、また、

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

表 *CDH-1* 遺伝子変異解析用プライマー

target	Forword primer	Reverse primer
<i>CDH-1</i> exon 3	5'-tctgtgatttctgcctgca-3'	5'-tgccaacatacctgatgggg-3'
<i>CDH-1</i> exon 6	5'-ggccccttctcccatgtttt-3'	5'-gaacaacacttggggcca-3'
<i>CDH-1</i> exon 7	5'-agtcccaaatgcagctgt-3'	5'-ctctgaccctgacctctc-3'
<i>CDH-1</i> exon 8	5'-cctggctcctgactgtgt-3'	5'-agaccttcttggaaacctct-3'
<i>CDH-1</i> exon 9	5'-gtcctgcagtacaagggtca-3'	5'-gccagtttctgcatctgcc-3'
<i>CDH-1</i> exon 10-1	5'-tgtttctctcttagggct-3'	5'-aagctctcggacactccac-3'
<i>CDH-1</i> exon 10-2	5'-aggtctctcaccacctcc-3'	5'-accagttgctgcaagtcagt-3'
<i>CDH-1</i> exon 13	5'-ttcctcccctggctcatca-3'	5'-gtcacttgccagctggactt-3'
<i>CDH-1</i> exon 15	5'-tctactcttactgtactcaact-3'	5'-atgctttggcttccacgtg-3'

日常の病理鑑別診断に使用できる *CDH-1* (16q22.1) 異常の検出方法を検討することを目的とした。

3. 対象及び方法

2012年1月～2016年12月の間日本大学医学部附属板橋病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19例 (E-Cad陰性16例, E-Cad弱陽性3例), 浸潤性乳管癌7例 (E-Cad陽性4例, E-Cad弱陽性3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。

3.1 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。*CDH-1* DNA量は*CDH-1* DNAとReferenceのコピー数比、*CDH-1/RNaseP*、として定義した。

3.2 DNAシーケンシング法による *CDH-1* DNA 遺伝子変異解析：

上記同様の方法にて、*CDH-1* DNAを抽出後、下記プライマーで通常DNAシーケンシングを行った。*CDH-1* DNA 全配列情報はhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG_008021.1?from=5001&to=103250&report=genbankより取得。

4. 結果

4.1 D-PCR法による *CDH-1* DNA 定量解析の結果：

- ILCとIDCに有意差を認めた。Mann-Whitney法のU検定, $p < 0.000$ (図a)。
- E-Cad IHCの陽性・陰性症例に有意差を認めた。Mann-Whitney法のU検定, $p < 0.000$ (図b)。
- ILC群の中では、E-Cad IHCの弱陽性・陰性症例には有意差を認めなかった。Mann-Whitney法のU検定, $p = 0.057$ (図c)。
- IDCとILC E-Cad IHCの弱陽性群に有意差を認めた。Mann-Whitney法のU検定, $p = 0.017$ (図d)。
- IDC E-Cad IHCの弱陽性群とILC E-Cad IHCの弱陽性群に有意差を認めた。Mann-Whitney法のU検定, $p = 0.050$ (図e)。

4.2 DNAシーケンシング法による *CDH-1* DNA 遺伝子変異解析の結果：

- 7例のIDC例のうち3例に異常を認めた。exon3 a→g, exon9 t del, exon7 t del。3例いずれもE-Cad IHCの陽性症例であった。
- 19例のILCのうち5例に異常を認めた。exon10 c→t, exon10 g→a, exon6 c→t, exon3 c→t, exon8 ca Ins。5例いずれもE-Cad IHCの陰性症例であった。
- それらの遺伝子異常は、いずれも異なった場所の単個核酸の変異、欠失、挿入であった。重複した遺伝子異常はなく、遺伝子異常とE-Cad IHCの陽性・陰性や組織型の違いに関連性は認めなかった。

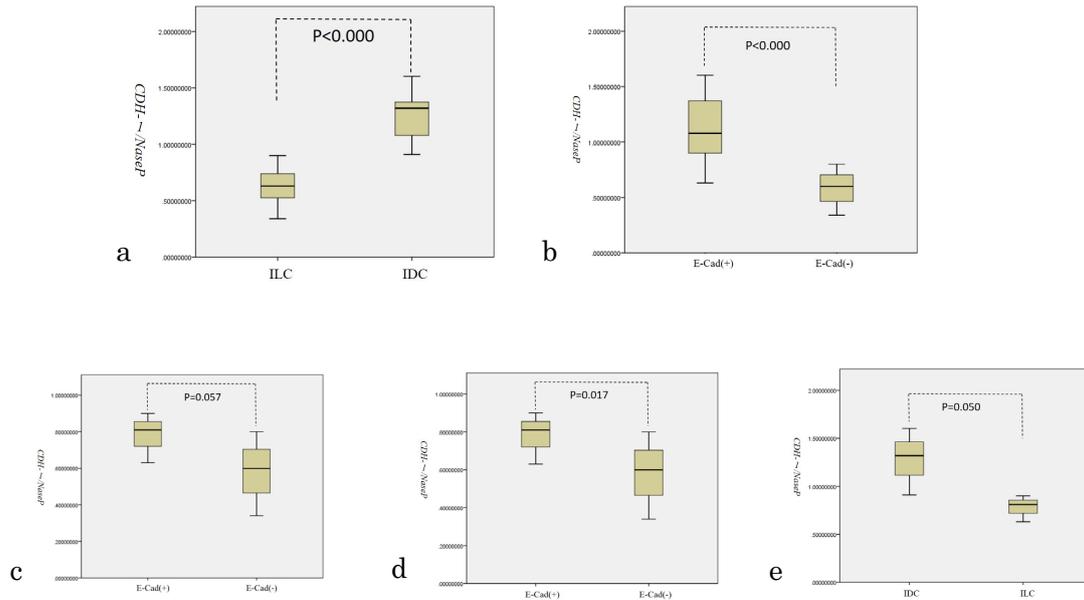


図 D-PCR法による $CDH-1$ DNA定量解析の結果

a. ILCとIDCの比較。b. E-Cad IHCの陽性・陰性症例の比較。c. ILC群の中、E-Cad IHCの弱陽性・陰性症例の比較。d. IDCとILC E-Cad IHCの弱陽性群の比較。e. IDC E-Cad IHCの弱陽性群とILC E-Cad IHCの弱陽性群の比較。(ILC: invasive lobular carcinoma, IDC: invasive ductal carcinoma, E-Cad: E-cadherin, IHC: immunohistochemical)

5. 考察

今回の研究は、D-PCR法では、IDCとILC、E-Cad IHC陰性と陽性乳癌いずれも $CDH-1/RNaseP$ に差を認め、一方でILC群内のE-Cad IHC陰性ILCと陽性ILCの間に差は認めなかった。その結果は、乳癌の組織形態学的特徴は、 $CDH-1$ DNA値に関連することを示唆された。DNAシーケンシング法による $CDH-1$ DNA遺伝子変異解析では、多数の変異を認めたが、IDCとILCの特徴となる異常はなく、また、E-cad IHCの結果との関連性もなかった。それは、 $CDH-1$ 遺伝子の点変異はE-cadタンパク発現への影響が少ない可能性を示唆され、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。

6. 結語

乳癌ILCとIDCの組織形態学的特徴は、 $CDH-1$ DNA値 ($CDH-1/RNaseP$) に関連することが示唆され、D-PCR法は、IDCとILCの鑑別診断に利用できる方法の一つとなる可能性がある。

文献

- 1) Canas-Marques R& Schnitt SJ. E-cadherin immunohistochemistry in breast pathology : uses and pitfalls. *Histopathology* 2016; 68 : 57-69.
- 2) Reed AEM, Kutasovic JR, Lakhani SR, Simpson PT. Invasive lobular carcinoma of the breast : morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Research* 2015; 17:12.
- 3) 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.