

乳管癌小葉癌併存乳癌の細胞系統的解析
(要約)

日本大学大学院医学研究科 博士課程

病理学系形態病理学専攻

野 田 博 子

修了年2017年

指導教員 増 田 しのぶ

【背景・目的】乳管癌と小葉癌はいずれも Terminal ductal lobular unit (TDLU)より発生する。その形態や性質は異なっており、乳癌の予後判定と治療法選択にあたり、2者の鑑別が重要である。近年、病理診断の際に乳管癌と小葉癌が混在した症例に遭遇する機会が増えているが、その細胞系統的関係については十分明らかにはなっていない。今回われわれは、乳管癌と小葉癌が混在する癌を Combined lobular and ductal carcinoma (CLDC)と呼び、乳管癌および小葉癌細胞の細胞系統的関係を明らかにする事を目的として検討を行った。

【対象】2013年から2014年の期間に日本大学医学部附属板橋病院で乳腺摘出手術を施行した乳癌症例から選出した CLDC3 症例を検討した。

- ・ Case1 (46才女性, 右側)は、内頭側領域を中心に、浸潤性小葉癌(Invasive lobular carcinoma: ILC)、非浸潤性小葉癌(Lobular carcinoma in situ: LCIS)、浸潤性乳管癌(Invasive ductal carcinoma: IDC)、非浸潤性乳管癌(Ductal carcinoma in situ: DCIS)1が存在した。外尾側領域には主病変とは連続性がない DCIS2が存在した。さらに乳房全体に Flat epithelial atypia(FEA)と呼ばれる乳管内上皮増殖病変が広範に広がっており、代表的な2か所を FEA1 および 2とした。
- ・ Case2(80才女性, 左側)は ILC、IDC、DCIS が併存する。DCIS は ILC、IDC と近接するが、ILC と IDC は 25mm 離れていた。
- ・ Case3 (41才女性, 左側)は IDC、ILC、LCIS、FEA が含まれており、いずれの病変も互いに接していた。

各症例ともに非腫瘍部として正常乳腺と乳腺外組織(リンパ節(LN)あるいは皮膚(skin))を採取した。

【方法】

a) Laser microdissection (LMD)

LMD6000 (Leica Microsystems)を利用して症例の FFPE 切片から DNA 採取対象部位を選択的に採取した。

b) DNA 抽出

FFPE 切片から Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて DNA を抽出した。

c) Mitochondria DNA D-loop 領域解析

ミトコンドリアDNA(mtDNA)の多型は複製開始点を含む D-loop と呼ばれる約 1000塩基対の領域で多くみられ、中でも、Hyper variable lesion (HVL) と呼ばれる領域で多型が頻発する。D-loop 領域の PCR を行い、PCR 産物に対して、サンガー法を用いて塩基配列を解析した。

d) Next generation sequence (NGS)

Case 1の LN、IDC、ILC、DCIS2 について、Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel(CCP) (Thermo Fisher Scientific)を用いて解析し、Trent Suite, Ion Reporter (Thermo Fisher Scientific)の Tumor-Normal pair analysis 法を用いて変異を抽出した。検出された変異は塩基変異(塩基置換、欠失および挿入)とコピー数多型(Copy number variants: CNV)に分類される。検出された塩基変異から読み取り回数と変異率を基準にして検証対象とする塩基変異を選出した。Case1の全組織型について

Realtime PCR 法を用いた変異定量解析法を用いて検証し、とサンガー法および定量 PCR 法も併用した。

e) 定量 PCR 法

全例に対し、16q の 1 倍体化と、1q の 3 倍体化について、QuantStudio™ 3D Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific)をもちいた定量 PCR 法による検討を行った。解析標的遺伝子として、16q の 1 倍体化検討には Cadherin1(CDH1)を、1q の 3 倍体化検討には VPS45A (Vacuolar protein sorting 45A)を用いた。

【結果】

1) MtDNA D-loop 領域解析

各症例と NCBI 参照配列との間に塩基の相違が見られる状態をミトコンドリア SNP(mSNP)とした。症例内において、特定の採取組織型の塩基配列の 1 塩基がその他の組織と不一致である場合を Single nucleotide variation (SNV)とした。症例内において、単純塩基繰り返し配列の配列数が乳腺外組織の繰り返し数と不一致であった場合を Simple sequence repeat number variation (SSRNV)とした。

Case1 では 15 ヶ所、Case2 では 11 ヶ所、Case3 では 12 ヶ所に mSNP を認めた。SNV は Case1 の ILC において1ヶ所確認するのみであった。SSRNV は HVL に存在するものと、HVL 外に発生するものに分けられた。Case1 の NB と DCIS1、および Case3 の NB と FEA には HVL に SSRNV がみられ、いずれも C の繰り返し数 8/7 が混在するものであった。Case1 の ILC のみ、HVL 外の領域に SSRNV が 1 か所確認された。これは CA の繰り返し数 7/6 が混在するものであった。

2) 遺伝子変異と変異定量解析

Case1 に対する NGS を用いた CCP 解析では、5 個の遺伝子、CDH1: (Cadherin-1), PIK3CA (phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha), RALGDS (ral guanine nucleotide dissociation stimulator), AKT1 (AKT serine/threonine kinase 1)に変異が検出された。CDH1 変異は ILC と IDC で存在を検出され、変異定量解析による検証では LCIS、ILC、IDC に存在する事が確認された。RRM1 変異は CCP において ILC にのみ存在を検出され、AKT1、RALGDS、PIK3CA 変異はいずれも CCP において DCIS2 のみで存在が検出された。この4遺伝子変異は変異定量解析でも CCP に合致する結果だった。また、CCP 解析の染色体倍数変化については IDC、ILC、DCIS2 とともに、1q の一部に 3 倍体化が、DCIS2 と ILC では 16q の一部に欠損が検出された。

3) 定量 PCR 法

Case1 では、16q 欠失変異細胞の存在割合は FEA2: 37.2%、DCIS1: 0%、DCIS2: 65%、IDC: 36.8%、LCIS: 46.2%、ILC: 47.8% であった。1q 増幅変異細胞の存在割合は FEA2: 35.0%、DCIS1:31.0%、DCIS2: 131.4%、IDC: 82.6%、LCIS: 97.8%、ILC: 75.0% だった。

Case2 では、16q 欠失変異細胞の存在割合は、DCIS 79.4%、IDC 69%、ILC 51.8%

であった。1q 増幅変異細胞の存在割合は、DCIS、IDC ともに 0%であり、ILC も 4.0%であった。

Case3 では 16q 欠失変異細胞の存在割合は、FEA 0%、LCIS 31.2% IDC 12.8%で、1q 増幅変異細胞の存在割合は、FEA 59.4%、LCIS 39.6%、IDC 91.8%、だった。

4) 症例ごとのまとめ

Case1: IDC、LCIS、ILC、に共通して CDH1 の変異が、IDC、LCIS、ILC、FEA に共通して 16q の欠失が見られたが、DCIS1 には CDH1 変異も 16q 欠失も認めなかった。一方で 1q 増幅は正常組織以外のすべてに存在した。さらに ILC のみに SNV と HVR ではない領域の SSRNV、および RRM1 変異がみられた。これは、FEA を背景として乳管癌と小葉癌が発生し、IDC、LCIS、ILC に共通の起源があり、最も変異が蓄積された癌組織として ILC が存在する事を示唆する。DCIS2 は、主病変とは距離が離れ、独自の変異が複数存在する事から、独立発生した癌であると考えられる。

Case2: mtDNA 解析、定量 PCR ともにすべての癌が同様の遺伝子型を示しており、ごく近い起源の病変であることが示唆される。

Case3: FEA、LCIS、IDC が 1q 増幅を共有しており、共通起源が示唆される一方、LCIS にのみ 16q 欠失がみられ、小葉癌には異なった変異が生じたと考えられる。

【考察】

今回われわれは、CLDC について、mtDNA D-loop 領域解析と、NGS を行いその結果を検証する、という 2 つの異なる方法により細胞系統的解析を行った。

NGS と検証検討から得られた情報は mtDNA D-loop 領域解析により得られる情報よりも多く、癌細胞の系統的關係に関する考察が可能であった。LMD により十分な腫瘍細胞が採取でき、DNA 量と質が確保できれば、NGS と検証検討はより有益な方法と考えられた。しかし、mtDNA D-loop 領域解析結果も、NGS の検証結果から推察される癌細胞の細胞系統的関係性と符号していたため、DNA 採取量が少ない標本においては有用な解析手法といえる。

従来、乳癌の組織型は形態学的特徴から、乳管癌と小葉癌とは独立した別の組織型として扱われてきた。小葉癌は、乳管癌と異なる遺伝子発現の特徴を有し、CDH1 遺伝子異常を高頻度に伴うことが知られている。一方、低異型度乳癌は乳管癌、小葉癌ともに、1q および 16q の loss of heterozygosity が高頻度に共通して指摘されることも報告されている。本検討においても、これらの遺伝子異常は DCIS1, DCIS2, LCIS, IDC, ILC に共通して指摘され、従来の報告を裏付ける結果であった。今回の検討で新たに明らかになった点は、乳管癌と小葉癌の形態的特徴よりも、病変の乳房内局在のほうに遺伝子異常の差異に関連性が見られた点である。これらの結果から、近接する乳管癌と小葉癌とは、異なる細胞から個別に発生して衝突したと考えるよりは、一連の腫瘍で、遺伝子異常の蓄積の程度と CDH1 遺伝子変異に基づいて現れた形態学的特徴の差異を見ている可能性が高いと考えられた。

【結論】

乳管癌小葉癌併存乳癌について、mtDNA D-loop 領域解析と、NGS を行いその結果を検証する、という 2 つの異なる方法により細胞系統的解析を行った。同一乳房内の非浸

潤癌と浸潤癌について、領域が異なる場合、非浸潤性乳管癌であっても、必ずしも同一癌細胞由来ではない可能性が考えられた。また、近接する乳管癌と小葉癌は、同一癌細胞が遺伝子変異を獲得し、異なる細胞組織形態を示している可能性が考えられた。