

原 著

転移性乳癌の遺伝子病理学的同定

病理センター

長谷川 秀 浩、五十嵐 俊 彦

目的：同一の乳房内に認められた組織型が異なる二個の悪性腫瘍が多重癌か転移癌であるかを判断するにあたり、免疫組織染色の結果とあわせてホルマリン固定パラフィンブロックの各腫瘍組織よりフェノール・クロロホルム法により抽出されたDNAについて遺伝子解析を行った。

方法・成績：Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) 法によるp53遺伝子変異の解析の結果、exon5の同一部位に変異が認められた。同時にメチル化により不活化されたX染色体をメチル化感受性制限酵素を用いて解析するX染色体上のHuman androgen receptor gene(HUMARA)によるクローン解析の結果、両親由来の二つのX染色体のうち同一のX染色体がメチル化により不活化されていることが認められた。

結論：以上の結果と免疫組織化学染色所見を合わせて検討した結果、同一乳房内に認められた二つの乳癌の発生源は同一であることが強く示唆されたことから、主病巣からの乳房内転移と判断された。同一臓器に複数の腫瘍が存在するような場合、多重癌か転移かを判断するにあたり、組織所見のみならず、免疫組織染色や遺伝子解析を併用して実施し、総合的に判断することが必要であることが考えられた。

キーワード：Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP), p53 遺伝子変異、ホルマリン固定パラフィン包埋組織、Human androgen receptor gene (HUMARA), 転移性乳癌、遺伝子病理学的診断

緒 言

病理診断上、同一の乳房内に連続性を示さない二つ以上の癌が存在する場合それが、一側性多発乳癌であるか原発部位からの乳房内転移であるかを鑑別しなければならない。通常は組織型により判断するが、組織型が同一である場合は困難である。また、転移先で組織像が変化することが稀ではないことから病理組織形態のみで多重癌か転移かを判断することは必ずしも正確であるとはいえない。また、免疫組織学的技術が、その鑑別に应用されているが、同一臓器に多発した同一組織像を示す癌については同様の免疫学的性格を示すことも多く、その同定にも限界がある。しかし、近年では病理組織標本から抽出したDNAを用いた各種遺伝子の検索がなされ病理診断上、有効な補助的手段として活用されている。^{1)・3)} 多重癌、多発癌においても、遺伝子技術を利用した診断方法が、日常の診断業

務に応用され始めている。中でも、ヒト第17染色体の短腕に存在するp53遺伝子は通常、癌抑制遺伝子として働いているが、後天的な刺激により突然変異意が生じ、増殖抑制が無効となった場合に悪性転化することが知られている。p53遺伝子変異の検出は癌の確定診断の材料、悪性度の指標として用いられるだけでなく、癌細胞から得られたp53遺伝子の変異の位置を具体的に知ることが多発性か転移性かを判断する材料になる。^{4)・5)} 同様に女性に発生した腫瘍細胞では両親由来の一方のX染色体のみにメチル基が結合し、不活化された状態で存在する特性を利用したX染色体上のHuman androgen receptor gene (HUMARA) の違いを解析することが、同時多発性か転移性かを判断する材料となる。⁶⁾

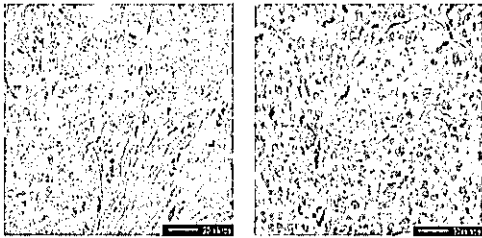
今回、我々は同一乳房内に認められた二つの癌について、遺伝子解析を用いた検索の結果、主病巣からの乳房内転移である衛星病変との結論が得られた症例について報告する。

材料および方法

- A. 対象
症例：70才女性
主訴：胸部腫瘍
- B. 現病歴
2001年2月；左乳腺 [CD] および [C] 領域に腫瘍を自覚した。
マンモグラフィの結果悪性が疑われた。
- C. 細胞診所見
[CD] 穿刺細胞診上、シート状のduct cellのみであり、Negativeと判断された。
[C] 穿刺細胞診上、増生した異型duct cellが多数みられ、悪性が疑われた。
- D. 切除標本の病理所見
[CD] 領域の腫瘍の大きさは、1.2cm×1.0cm×1.0cmであり、組織型は乳頭腺癌を主体とする中に硬癌が混在しており、進達度はGと判断された。また、[C] 領域の腫瘍の大きさは0.8cm×0.6cm×0.6cmであり、組織型は充実腺癌を主体とする中に粘液癌成分が混在しており進達度は同じくGと判断された。(図1)
- E. 免疫組織染色所見
それぞれの切除標本の免疫組織化学染色結果は図2に示すように一部の染色結果に多少の強弱の違いはあるものの検討した各抗体について同様の染色結果を示していた。
- F. 遺伝子解析

それぞれの腫瘍についてp53遺伝子の解析をPCR-SSCP法により行った。HE染色標本をもとにパラフィン包埋組織から病変部のみを採取し、薄切を行い、フェノール・クロロホルム法によりDNAの抽出を行った。抽出されたDNAは、さらにDNA clean & concentrator TN5 (フナコシ) により、夾雑物の除去、濃縮操作を施した。プライマーはp53 exon5~exon8のエキソン-イントロン境界部に設定した。また、その増幅領域はホルマリン固定液によるDNAのダメージが影響しないように100bp~200bp前後と短く設定されたプライマーによりPCR法での増幅操作を行った。⁷⁾増幅されたPCR産物3 μ lに対し7 μ lのホルムアミドを加え、90℃、10分間加熱後、10分間氷上にて、急速冷却を行い、冷却装置付電気泳動装置により250V、15時間電気泳動を行った。電気泳動終了後Silver stain plus kit (BIO-RAD) により銀染色を施した。その結果図3に示すように両腫瘍はexon5の同一部位に遺伝子の変異が認められた。

同時にX染色体上のHuman androgen receptor gene (HUMARA) のメチル化による不活化パターンのクローン解析を行った。病変部の各DNAをメチル化感受性制限酵素HhaIで37℃、12時間消化処理後のDNAと消化する前のDNAを用いてHUMARAをターゲットとしてPCR法により増幅後、250V、15時間電気泳動を行った。電気泳動終了後Silver stain plus kitにより銀染色を施した。図4に示すように両腫瘍で増幅されたX染色体の不活化パターンは、同一のモノクロナリティーを示していた。



[SD], 1.2cm×1.0cm×1.0cm 乳頭腺管癌)硬癌、[G]
[C], 0.8cm×0.6cm×0.6cm 充実腺管癌)粘液癌、[G]

図1 組織学的検討

図2 免疫組織化学結果一覧表

antigen	area CD	area C
cytokeratin, AE-1,3	++	++
epithelial membrane antigen, EMA	++	++
CA15-3	++	++
human milk fat globule, HMFG	++	++
c-erbB-2	++	+
alpha-1-fetoprotein, AFP	-	-
carcinoembryonic antigen, CEA	-	-
c-kit	+	+
progesterone receptor, PgR	++	+
estrogen receptor, ER	++	++
p53	-	-
Ki-67	+	+

結 果

組織型では異なるものの、免疫組織染色において、同様の免疫学的性格を示した。またPCR-SSCP法によるp53遺伝子変異を解析した結果、exon5の同一部位に変異が認められ、X染色体上にあるHUMARAの解析では同一の不活化パターンを示していたことから[CD]および[C]領域の腫瘍は発生源が同一であることが強く示唆され、転移性乳癌であると判断された。

考 察

一側性多発乳癌とは同一の乳房内に二つ以上の原発性乳癌が発生したものを言う。組織学的には乳管内成分による連続性を示さない原発性病変と定義されており、同一の領域ではない場合などもその定義に加えられる。その際、浸潤癌の多発性浸潤や乳房内転移は除いて考える必要がある。通常は形態的類似性を基に判断されるためか、その発生頻度はきわめて高く9%~75%と報告されている。⁸⁾しかし、転移性乳癌において転移先で組織型が変化することは稀ではないため多重癌として取り扱われている可能性が高く、同時に連続性病変や乳房内転移が含まれている可能性も否定できない。しかし、診療の質を高めるうえで病理診断の精度向上が不可欠であると考えられることから、これらを正確に解析し判断する必要がある。したがって、免疫組織染色が広くその診断根拠として用いられている。分子量の異なるCytokeratinを組み合わせ免疫組織染色を行うことにより原発を同定する方法や各種マーカーを用いて、その免疫学的特性の違いより同定する方法もその判断材料になり得ると考えられる。同時に治療計画を構築するのに必要なホルモンレ

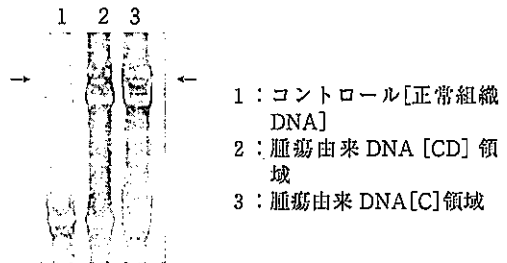
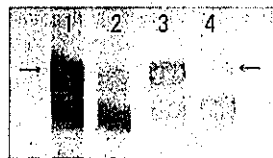


図3 遺伝子病理学的検討(p53 PCR-SSCP)



1 : [CD], 腫瘍 DNA
2 : [CD], 腫瘍 DNA, 制限酵素消化後
3 : [C], 腫瘍 DNA
4 : [C], 腫瘍 DNA, 制限酵素消化後

図4 遺伝子学的検討(HUMARA)

セプターの確認やc-erbB2の発現などの貴重な情報も提供してくれる。しかし、原発巣を同定し腫瘍の性格を証明するには、有効な方法ではあるものの原発か転移性を判断する上で必ずしも特異的な所見が得られるとは限らない。したがって、これらの結果のみで判断するには正確性に限界がある。そこで、診断根拠の裏付けとなる客観的手段として遺伝子病理学的同定法が極めて有効な手段であると考えられる。特に発癌のプロセスにp53遺伝子の変異が関与している場合、それぞれの病変部より抽出されたDNAの解析を行うことにより、多重癌か転移かの判断は可能である。同時にp53遺伝子の変異が陽性である乳癌は臨床的に悪性度が高くホルモンレセプター陰性の傾向が強いとされていることからp53遺伝子の変異は腫瘍の悪性度の指標と考えることができる。しかし、p53遺伝子の変異が原因でない場合や設定したプライマーの増幅領域外に変異があった場合については検出できない。このような場合でもHUMARAのクロナリティー解析を併用して行うことにより、原発か転移かの判断は可能となる。病理診断において多重癌か転移かを正確に判断するには組織所見のみならず、免疫組織染色や遺伝子解析を併用して実施し、総合的に判断することが必要であると考えられた。本法を用いた解析結果は、病理診断の精度向上につながるとともに臨床側に対し、有効でより正確な情報が提供できるものと考えられる。

文 献

1. 長谷川秀浩, 五十嵐俊彦. PCR (polymerase chain reaction)法を用いたホルマリン固定パラフィン包埋組織からの結核菌DNAの検出. 新潟県厚生連医誌 2000;10 (1) :21-4.
2. Ikarashi T, Hasegawa H. Detection of monoclonality in B-and T-cell lymphoma by the use of polymerase chain reaction of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Niigata-ken Koseiren Med J 2000;10 (1) :10-5.
3. Ikarashi T, Hasegawa H. Detection of monoclonality in B-cell lymphoma by polymerase chain reaction (PCR) with the use of DNA extraction kit (TaKaRa DEXPAT) for formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Niigata-ken Koseiren Med J 2000;10 (1) :16-20.
4. 長谷川秀浩, 五十嵐俊彦. PCR-SSCP法によるp53遺伝子変異の検出についての基礎的検討. 新潟県厚生連医誌 2001;10 (1) :42-5.
5. Noguchi M, et al : Application of the p53 gene mutation pattern for differential diagnosis of primary

versus metastatic lung carcinoid. *Diagn Mol Pathol* 1993;2:29-35.

6. Po-shing Lee, et al : Molecular evidence that the stromal and epithelial cells in pleomorphic adenomas of salivary gland arise from the same origin: clonal analysis using human androgen receptor gene (HUMARA) assay. *Hum Pathol* 2000;31 (4) : 498-503.
7. 上野一郎, 他. p53遺伝子変異における免疫染色法と簡易PCR-cold SSCP法の検出感度の比較. *臨床病理* 2000;48:469-72.
8. 松尾兼幸, 他. 多発乳癌についての分子生物学的特性について. *癌の臨床* 2001;47:247-51.

英 文 抄 録

Original Article
Identification of the metastatic breast cancer by genetic pathological method

Pathology Center
Hidehiro Hasegawa and Toshihiko Ikarashi

Objective: When there are plural cancers in one organ, they must require the confirmation of origin or metastasis in pathology. We analyzed two cancers in the same breast by genetic pathological methods. The result of immuno-histochemical stain between them was same and failed to differentiate. We tried to differentiate the metastasis by the genetic analysis with an extracted formalin fixation and paraffin embedded tissue.

Study design and Results: The genetic analysis included (1) detection of the p53 gene mutation pattern by Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) method (p53-SSCP). And (2) the human androgen receptor gene (HUMARA) that used methylation of the X chromosome.

Conclusion: These analytic results showed same pattern. It was diagnosed as the metastasis between them of same the one side lobe breast.

Key Words : Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP), p53 genomic mutations, Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue, Human androgen receptor gene (HUMARA), Metastasis, Breast cancer, Genetic pathological diagnosis.