—特集(遺伝子診療の)
—現状と展望—

DNA 診断による乳癌の悪性度判定

江見 充

日本医科大学老人病研究所分子生物学部門

DNA-based diagnosis of breast cancer cases

Mitsuru Emi

Department of Molecular Biology Institute of Gerontology, Nippon Medical School

RFLP マーカーを用いたサザン法により乳がんの DNA 診断を prospective study として 1,000 例について実施した。遺伝子異常と臨床病理学的所見や予後との関連を検討したところ、17 p 13.3 の欠失がリンパ節転移陽性症例および硬癌・充実線癌で高頻度に見られること、また、17 q 21 の欠失が充実線癌で高頻度に見られることが明らかとなった。さらに、17 q 21 の欠失を認める症例や erbB 2 の増幅を認める症例では、エストロゲンレセプターおよびプロゲステロンレセプターの陽性率が有意に低かった。また、術後再発して死亡した 19 例については、全例とも 17 p 13.3 の欠失が認められた。

1. 研究目的

がん発生・進展の本質である染色体・遺伝子の変化を直接調べ、個々のがんの生物学的悪性度を把握することによる客観的かつ質的ながんの診断を目指して、本研究では乳がんを対象に、個々の手術症例について癌組織における染色体・遺伝子の変化を調べ、DNA レベルでの乳がん診断を実施した。特に、診断を行う各がん遺伝子の増幅と染色体欠失について種々の臨床病理学的因子や予後との相関を調べ、より適確な予後の予測や術後治療方針の選択への遺伝子診断の利用の意義について検討した。

2. 研究方法

財団法人癌研究会附属病院にて行われる全乳癌

手術症例(週平均 10 例)を対象に prospective study として行った。ここでは現在までに遺伝子診断を実施した 1,000 例の結果について報告する。各乳がん手術症例より癌組織および非癌組織より DNA を抽出し、RFLP マーカーを用いたサザンハイブリダイゼーションにより以下の 5 つの染色体・遺伝子の欠失または増幅を検出した。(1) 第 16 染色体長腕上の 16 q 24 領域の欠失。(2) 第 17 番染色体短腕上の 17 p 13.3 領域の欠失。(3) 第 17 番染色体長腕上の 17 q 21 領域の欠失。(4) 第 8 染色体長腕 8 q 24 の c-myc 遺伝子の増幅。(5) 第 17 番染色体長腕 17 q 11.2 の erbB 2 遺伝子の増幅。また、切除乳癌組織およびリンパ節は病理組織学的検索を日本乳癌研究会の乳癌取扱規約にそって行い、組織学的 tnm 分類と乳腺腫瘍組織学的分類により診断した。以上の研究データについて染色体・遺伝子異常とリンパ節転移(n 因子)、腫瘍の大きさ・浸潤(t 因子)、組織型エストロゲンレセプターおよびプロゲステロンレセプターの有無との間に関連性があるかどうかを χ^2 検定により検討した。

表 1 各染色体領域における診断数と異常所見の頻度

染色体部位	マーカー	変化の種類	診断症例数	異常所見症例数
16 q 24	D 16 S 7	欠失	570	269(47%)
17 p 13.3	144 D 6/YNZ 22	欠失	747	376(50%)
17 q 21	CI 17-701/-730	欠失	593	222(37%)
8 q 24	c-myc(CI 8-134)	増幅	354	110(31%)
17 q 11.2	erbB 2	増幅	792	168(21%)

表2 17pの欠失とリンパ節転移の関係

		リンパ節転移		
		n(-)	n(+)	total
17p	欠失(+)	128	184(59%)	312
	欠失(-)	177	137(43%)	314
	総数	305	321	626

$p < 0.0001 (\chi^2 = 14.7)$

3. 研究結果

癌研附属病院における乳癌手術例全例を対象に、現在まで2年間にわたりDNA診断を実施し、診断した総数は1,000例に達した。

各染色体領域における診断率と異常所見の頻度を表1にまとめた。異常所見を示した症例は、16q24の欠失、17p13.3の欠失、17q21.3の欠失が各々47, 50, 37%であり、c-mycおよびerbB2の増幅が各々31, 21%であった。

次に、これら遺伝的異常と臨床病理学的諸因子との関連性を調べた。リンパ節転移との関連性では、17p13.3の欠失とリンパ節転移の存在との間に強い相関を認めた(表2)。すなわち、17p13.3の欠失のある症例では59%がリンパ節転移陽性であったのに対して、欠失のない症例では陽性は43%のみであった($p < 0.0001$)。他の遺伝的変化はどれもリンパ節転移の有無とは相関しなかった。

組織学的分類との相関については、17p13.3の欠失と17q21.3の欠失に関して有意な相関を見出した(表3, 4)。すなわち、17p13.3の欠失は、硬癌および充実腺管癌において、各々55%および53%と高頻度に見られたが、他の組織型では29~33%と低頻度であった($p < 0.0001$)。また、17q21.3の欠失は充実腺管癌において55%と高頻度に見られたが、他の組織型では26%と低頻度

表3 17pの欠失と組織学的分類との関係

		17p		
		欠失(+)	欠失(-)	総数
組織型	1a 非浸潤乳管癌	5(33%)	10	15
	a1 乳頭腺管癌	38(29%)	89	127
	a2 充実腺管癌	84(53%)	72	156
	a3 硬癌	131(55%)	105	236
総数		258	276	534

$$1a + a1 \text{ vs. } a2 + a3 : p < 0.0001 (\chi^2 = 25.357)$$

表4 17qの欠失と組織学的分類との関係

		17q		
		欠失(+)	欠失(-)	総数
組織型	1a 非浸潤乳管癌	1(10%)	9	10
	a1 乳頭腺管癌	25(26%)	68	93
	a2 充実腺管癌	77(55%)	62	139
	a3 硬癌	69(33%)	140	209
総数		172	279	451

$$a2 \text{ vs. other} : p < 0.0001$$

$$a2 \text{ vs. } a3 : p < 0.0001$$

$$a2 \text{ vs. } 1a + a1 : p < 0.0001$$

であった($p < 0.0001$)。他の遺伝的変化と組織型との間には相関はなかった。また、t因子については各遺伝的変化との間に相関は認めなかった。

各腫瘍における遺伝的変化の総数(G)と組織病理学的所見との関係を調べるため、3カ所以上の染色体領域で診断の得られている症例について遺伝的変化の数とn因子、t因子、組織型との関連をまとめ、表5に示した。複数の遺伝的異常を持つ症例ほどリンパ節転移の頻度が高く、腫瘍が大きく、また、より未分化な組織型の占める割合が高い傾向が見られた。

ホルモンレセプターの有無との相関については、17q21の欠失が認められた症例では欠失を認めない症例に比べER陰性率が有意に高く

表5 遺伝的変化の総数(G)と臨床病理学的所見

	n(-)	n(+)	t1	t2, t3	1a, a1	a2, a3
G = 0	124(56%)	97(44%)	81(39%)	129(61%)	59(29%)	140(71%)
G = 1	81(46%)	96(54%)	60(34%)	117(66%)	42(26%)	114(74%)
G = 2	61(42%)	88(58%)	40(28%)	107(72%)	29(22%)	102(78%)
G ≥ 3	38(42%)	48(58%)	22(26%)	62(74%)	8(9%)	73(91%)

図1 サザンブロット法による乳癌 DNA 診断の実例
LOH：染色体欠失，amplifi：遺伝子増幅，N：正常組織 DNA，T：乳癌組織 DNA

表6 各遺伝的变化とエストロゲンレセプター (ER)・プロゲステロンレセプター (PgR) の有無との関係

	ER			PgR		
	(-)	(+)		(-)	(+)	
16 q 24						
LOH	68	96		51	113	
Retain	93	97	n.s.	67	123	n.s.
17 p 13						
LOH	106	118		84 (37%)	140	
Retain	101	140	n.s.	65 (26%)	176	p=0.01
17 q 21						
LOH	96 (55%)	77		84 (48%)	89	
Retain	102 (38%)	166	p<0.0003	58 (21%)	210	p=0.0001
c-MYC						
Ampli (+)	23	36		20	39	
Ampli (-)	58	78	n.s.	39	97	n.s.
ERBB 2						
Ampli (+)	67 (65%)	36		49 (47%)	54	
Ampli (-)	156 (39%)	235	p<0.0001	107 (27%)	284	p=0.0001

n.s.=not significant

(96/173, 56% vs. 102/268, 38%), 同様に, PgR 陰性率も有意に高かった (84/173, 49% vs. 42/192, 22%) (表6). 一方, erbB 2 の増幅の認められた症例でも増幅を認めない症例に比べ ER 陰性率が有意に高く (67/103, 65% vs. 156/391, 38%), 同様に PgR 陰性率も有意に高かった (49/103, 48% vs. 107/391, 27%). また, 17 番染色体短腕

上の欠失が認められた症例では認められない症例に比べ PgR 陰性率が有意に高かった (84/224, 38% vs. 65/241, 27%).

術後再発して死亡した 19 例については, 全例とも 17 p 13.3 の欠失が認められ, この染色体部位の遺伝子の不活性化と転移とを関連づける知見が得られた.

4. 考察

2年間にわたる prospective study としてのサザン法による乳癌の DNA 診断を実施し、乳癌 DNA 診断は臨床病理診断とならぶ新たな診断法として日常的に実施できることが実証された。染色体欠失の判定には多形性を示す RFLP マーカーの使用は不可欠である。現在のところ、サザン法が信頼性の高い方法であるが、今後 PCR-マイクロサテライト多形などより簡便な方法の利用も考えられる。ホルモンレセプター消失との相関においては 17 q の欠失および ERBB 2 の増幅とエストロゲンレセプター、およびプロゲステロンレセプターの消欠との相関から、これら第 17 染色体上の癌遺伝子・癌抑制遺伝子の異常が乳癌にお

けるホルモン依存性の喪失の引き金となっている可能性が示唆された。また、予後との関係においては死亡症例の全例に 17 p の欠失が認められ、この欠失が長期予後の指標となりうる可能性が示された。さらに、腫瘍径 2 cm 以下・リンパ節転移陰性、あるいは非浸潤癌・乳癌腺管癌など臨床病理学的には比較的予後に良いと判断される群の中に、DNA 診断では 3 個以上の異常をしめす症例が 5～10% 認められたことから、これらを新たなハイリスク群としてとらえて今後再発・予後の追跡や術後補助療法の選択基準に生かすことが重要と考えられた。

(受付：1995 年 8 月 3 日)