

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

永澤 慧

専攻分野：外科学

コース：乳腺・内分泌外科

指導教授：太田 智彦

主論文の題目：

次世代シーケンサーを用いた葉状腫瘍および線維腺腫の体細胞変異解析

共著者：

岡南 裕子、前田 一郎、小島 康幸、速水 亮介、西川 徹、  
津川 浩一郎、太田 智彦

緒言

乳腺混合性腫瘍である乳腺線維腺腫（以下、線維腺腫）と乳腺葉状腫瘍（以下葉状腫瘍）は予後、治療法が異なり、日常臨床上鑑別に苦慮する症例も存在し、鑑別の精度を上げるためのバイオマーカーの開発は臨床上重要な課題である。近年次世代シーケンス技術の進歩により網羅的な体細胞変異解析が行えるようになり、また比較的 low コストで解析が可能な簡易型の次世代シーケンサーも開発され、臨床応用への期待が高まっている。そこで我々は、次世代シーケンサーの中でも臨床応用に向けて開発された **Ion Torrent Personal Genome Machine (IonPGM)** を用いて線維腺腫および葉状腫瘍の体細胞変異解析を行い、その有用性について検討した。

方法・対象

2003年5月より2012年12月の間に聖マリアンナ医科大学付属病院

で手術が施行された線維腺腫 10 例と葉状腫瘍境界悪性型 11 例を対象とした。葉状腫瘍は良性、悪性、境界悪性型に分類され、良性は比較的線維腺腫に近い変化を示すのに対して、悪性は肉腫様の変化を来す。本研究では線維腺腫や肉腫の混在を避けるため、組織学的に葉状腫瘍の典型例の多い境界悪性型に焦点を絞り解析した。ホルマリン固定・パラフィン包埋 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: FFPE) 検体より各々ゲノム DNA を抽出し、癌および肉腫において高頻度に変異を認める 409 遺伝子に対応するアンプリコンを増幅しうるプライマーセットを用いて、シーケンシングを行った。得られた配列は CLC Genomics Work Bench 6 (CLC-WB) を用いて解析した。次世代シーケンサーで変異候補となった症例は、Sanger 法で確認を行った。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員の承認を得たものである (承認番号 2330 (遺 105) 号)。

## 結果

FFPE 薄切検体から抽出し得た DNA 総量の平均値は葉状腫瘍が 4.80 $\mu$ g、線維腺腫が 1.24 $\mu$ g であった。葉状腫瘍 7 例、線維腺腫 9 例で、ターゲット領域の 90%以上をカバーすることができた。CLC-WB では葉状腫瘍 11 例と線維腺腫 10 例をあわせて 249 個 (変異のあった遺伝子数) の変異が検出され、このうち 89 個は葉状腫瘍と線維腺腫に共通で、37 個は葉状腫瘍に特異的、123 個は線維腺腫に特異的であった。このうち葉状腫瘍特異的に LPP (chr3;188327343:A>G)、AMER1 (chrX;63410630:T>C)、GATA3 (chr10;8100600:G>A) が、線維腺腫特異的に PAX5 (chr9;36923406:G>A) を Sanger 法で確認することができた。これらはアミノ酸配列において、LPP Tyr275Cys, AMER1 Tyr846Cys, GATA3 Asp192Asn および PAX5 Pro286Ser ミスセンス変異に相当し、それぞれ野生型を含めた全リード配列の 47.9%, 51.0%, 40.0%および 57.0%を占めていた。

## 考察

次世代シーケンサー技術の発展により、今後小規模な施設でも遺伝子レベルでの解析が可能となってくる。その際、保管や入手が容易な検体である FFPE は有益なサンプルであるが、本研究を通じて FFPE 切片を用いて解析をする際のいくつかの問題点が浮き彫りとなった。FFPE はホルマリン修飾による DNA の断片化や塩基置換などが起こる場合があり、DNA の抽出量低下や PCR 反応の阻害につながる。本研究でもそれらの排除に苦慮した。FFPE をサンプルとすることの限界を念頭に おいた上でサンプル調製や解析を行う必要がある。本研究で変異が同定された GATA3 は、GATA 配列を認識する転写因子で、エストロゲンレ

セプター陽性の Luminal A 型乳癌においてその体細胞変異が高頻度に認められ、アロマターゼ阻害剤による内分泌治療の効果予測因子として有用であることが報告されている。葉状腫瘍の上皮成分にはエストロゲンレセプターが発現していることから、エストロゲン刺激と関連した病態も考慮され興味を持たれる。しかし残念ながらいずれも単一症例での同定であり、これらの遺伝子変異が葉状腫瘍および線維腺腫のドライバー遺伝子となるような変異である可能性について、今後症例を重ねて検討する必要があると思われる。

#### 結語

IonPGM 次世代シーケンサーを用いて、葉状腫瘍および線維腺腫の体細胞変異解析を行った。葉状腫瘍特異的に LPP(chr3;188327343:A>G)、AMER1(chrX;63410630:T>C)、GATA3(chr10;8100600:G>A)、線維腺腫特異的に PAX5(chr9;36923406:G>A)の点変異を見いだした。