

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：瀧下 茉莉子

専攻分野：乳腺・内分泌外科学

指導教授：津川 浩一郎

主論文の題目：

Elucidation of the Mechanism of c-Myc Expression in Invasive Ductal Breast Cancer Using Fluorescence *in situ* Hybridization  
(蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた浸潤性乳管癌における c-Myc 発現機構の解明)

共著者：

Junki Koike, Kanna Saito, Kazuki Ito, Miyako Yamada, Runa Sugiyama, Taku Arihara, Kaori Sakamaki, Sayoko Kakimoto, Mina Kitajima, Mizuho Tazo, Mari Hara Nakano, Takako Kuroda, Ai Motoyoshi, Toru Nishikawa, Hisanori Kawamoto, Mamoru Fukuda, Koichiro Tsugawa

緒言

Myc は細胞の成長や代謝調節に関与しており、発癌を促す因子として知られている。現在、いくつかの癌種で *myc* 遺伝子の1つである *c-myc* の関与が明らかになってきている。その例として、バーキットリンパ腫では t(8;14) 転座によって *c-myc* が恒常発現することが解明されている。そのほか、小細胞肺癌や大腸癌でも *c-myc* の関与があるとされており、乳癌も例外ではない。

c-Myc の発現は high grade breast cancer の 30~50% で認められ、乳癌の進行や化学療法抵抗性とも関与しており、とくにホルモン受容体陰性 HER2 陰性乳癌 (triple negative breast cancer ; TNBC) にお

いて c-Myc 発現が多いとされている。現在多くの文献で、細胞株を用いたシーケンスによる *c-myc* の変異解析や *c-myc* mRNA の発現の検討は行われているが、現段階で *c-myc* 発現の機序は明らかにされていない。今回、TNBC において、c-Myc 高発現の機序として *c-myc* 増幅をきたしている可能性がある、との仮説を立て、FISH 法を用いた *c-myc* 増幅解析を検討することとした。

## 方法・対象

2019 年 1 月から 2021 年 12 月にかけて、聖マリアンナ医科大学の乳腺内分泌外科で切除された 1498 例の浸潤性乳管癌を対象とした。そのうち、術前化学療法または内分泌療法を受けていない、かつ免疫組織化学および遺伝子解析の両方に十分な腫瘍量を示した 108 例を使用した。切除検体の腫瘍部分に対して c-Myc の免疫組織化学を施行した。染色には一次抗体に c-MYC (EP121, Rabbit, pH9, 1:2, ニチレイ社)、リンカーとして EnVision FLEX+RABBIT (LINKER), Dako を使用した。試料の賦活条件は、pH9 下 98°C で 40 分とした。二次抗体として、ヒストファイン シンプルステイン (MAX-PO (MULTI), ニチレイ社) を使用した。染色結果から得られた「染色濃度」「染色割合」について MITANI CORPORATION Patholoscope version 1.6 ソフトを用いてスコア化し、従来から乳癌のホルモン受容体発現状況 (ER および PgR) の判定に用いられている Allred score の基準に基づいて数値化した。本研究では Allred score 5 を cut off 値に設定し、All red score  $\geq 5$  の症例について *c-myc* FISH を施行した。FISH のプローブには、ZYTOSYSTEM 社の ZytoLight SPEC MYC/CEN 8 Dual Color Probe を使用した。FISH の評価は日常乳癌診療で行っている HER2 FISH の評価方法に則って行い、MYC 発現数値と FISH の相関を検討した。さらに臨床情報から得た抽出項目との相関も併せて、カイ二乗検定を用いて MYC が予後予測の因子となりうるか否か検討した。p 値が 0.05 未満を統計的

に有意とみなした。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会（承認 6124 号）の承認を得たものである。

## 結果

対象症例は、23 例 (21.3%) が ER 陽性 HER2 陰性、30 例 (27.8%) が ER 陽性 HER2 陽性、29 例 (26.9%) が ER 陰性 HER2 陽性、26 例 (24.1%) が ER 陰性 HER2 陰性に分類された。Allred スコアに従って定量化された各 *c-Myc* 発現スコアに対応するサブタイプの分布では、Allred スコアが高いほど TNBC の割合が高いという傾向を認めた。*c-Myc* 発現状態と ER 発現状態には、負の相関があることが示唆された ( $p = 0.0014$ )。また、*c-Myc* の発現状態と HER2 の発現状態との間にも負の相関を認めた ( $p < 0.0001$ )。 *c-myc* FISH は高 *c-Myc* 発現 (Allred score 5 点以上) 例 19 例に対して実施した。19 例中 4 例で FISH スコア  $\geq 2.0$  の *c-myc* 増幅が検出された。遺伝子増幅を認めたこれら 4 例のうち、3 例は TNBC で、1 例は ER 陰性および HER2 陽性であった。さらに TNBC 症例における *c-Myc* 発現と臨床因子 (年齢、組織型、MIB-1、病理学的腫瘍サイズ、リンパ節転移の有無、リンパ管侵襲、静脈侵襲、組織学的悪性度) との相関をについてカイ二乗検定を用いて検討したが、有意な相関は認められなかった。

## 考察

*c-MYC* は、細胞増殖、アポトーシス、形質転換、血管新生、および細胞周期制御において極めて重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、制御・調節のメカニズムや *c-Myc* の過剰発現と遺伝子増幅との関係に関する多くの側面は、まだ未解明である。今回、*c-Myc* 高発現の乳癌には、*c-myc* 増幅例と非増幅例の両方が含まれることが分かった。特に TNBC における *c-Myc* 高発現例のかなりの割合が *c-*

*myc* 増幅群に属する可能性があるという推測できる結果であった。c-Myc 高発現かつ遺伝子非増幅例では多倍体化や代謝の異常が存在する可能性が考えられる。また、この研究では、c-Myc 発現と ER および HER2 両者の発現との間に有意な負の相関が観察された。c-Myc の発現増加が ER および HER2 の発現抑制に関与している可能性を示唆する結果であった。しかし一方で c-Myc の発現は、リン酸化により恒常的に活性化された ER $\alpha$  の存在下で誘導されることが知られているが、c-Myc のエストロゲン応答要素は特定されておらず、その制御メカニズムは不明のままである。

## 結論

本研究の結果から、c-Myc 高発現例は *c-myc* 増幅と非増幅例に分けられることが示された。さらに c-Myc の発現が亢進した TNBC の症例は、*c-myc* 増幅群に分類される可能性が高いと考えられた。その増幅には多倍体化やたんぱく代謝の異常が関与している可能性があり、さらなるメカニズムの解明は、TNBC における転帰不良例を予測するための、予後予測因子としての潜在的な価値があると考えられる。