

学位論文 (テーシス)

乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍の細胞遺伝学的解析

—劣化した DNA の高密度一塩基多型マイクロアレイへの適用—

及川 将弘

Oikawa, Masahiro

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

平成 23 年 (2011 年) 3 月

目次

ページ

テーシス要旨と参考論文リスト.....	3
第1章 緒言	
1-1 乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍について.....	6
1-2 癌のゲノム不安定性について.....	9
1-3 高密度一塩基多型マイクロアレイについて.....	10
1-4 この研究の目的.....	11
第2章 爪から抽出した DNA を用いた家族性脳動静脈奇形 (Arteriovenous malformation: AVM) 家系のゲノムワイド連鎖解析	
2-1 緒言.....	13
2-1 対象と方法	
2-2-1 対象.....	14
2-2-2 DNA抽出.....	18
2-2-3 Affymetrix 10K 2.0 array を用いた SNP ジェノタイプ.....	18
2-2-4 SNP ジェノタイプデータを用いた連鎖解析とマイクロサテライトマーカーを用いたハプロタイプ解析.....	19
2-2-5 候補遺伝子の変異解析.....	20
2-2-6 コピー数異常の解析.....	20
2-3 結果	
2-3-1 連鎖解析およびハプロタイプ解析.....	20
2-3-2 候補遺伝子の変異解析.....	24
2-4 考察.....	24
第3章 乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍における高密度 SNP マイクロアレイを用いたゲノムワイドコピー数・LOH 解析	

3-1 緒言.....	26
3-2 対象と方法	
3-2-1 対象と臨床的特徴.....	28
3-2-2 DNA抽出とSNPマイクロアレイへのハイブリダイズ.....	31
3-2-3 SNPマイクロアレイのデータ処理.....	31
3-2-4 定量PCR解析.....	32
3-2-5 統計解析.....	33
3-3 結果	
3-3-1 SNPマイクロアレイへのハイブリダイゼーションの評価.....	34
3-3-2 SNPマイクロアレイにより検出されたゲノム変化と臨床病理学的所見との関 連.....	34
3-3-3 定量PCRによるSNPマイクロアレイCGHによるコピー数解析結果の評価	38
3-3-4 複数の乳頭癌で共有されるゲノム変化領域に含まれる遺伝子.....	38
3-4 考察.....	41
第4章 総括と今後の展望.....	42
謝辞.....	44
引用文献.....	45
参考論文縮小印刷.....	51

テーシス要旨と参考論文リスト

要旨

【目的】

乳腺の嚢胞内乳頭状腫瘍には良性の乳頭腫、悪性の上皮内乳頭癌、浸潤性乳頭癌が含まれ、術前の画像所見や病理所見によっても良悪性の鑑別が困難である。また、本病変についての細胞遺伝学的研究は少ない。

本研究の目的は、未だ不明な点の多い乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍についての細胞遺伝学的プロファイルを、高密度一塩基多型 (SNP) マイクロアレイを用いた競合ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) という新しい技術によって明らかにすることにある。本研究により、臨床的に良悪性の判断が難しい本疾患について、新たな診断手技開発の端緒となると考えた。また、良性から悪性への進展に関わるメカニズムの解明にも貢献すると考えた。目的を達成するためには、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本から抽出した劣化した DNA を高密度 SNP マイクロアレイに適用するという技術的なハードルを越えなければならなかった。

【対象と方法】

- ① 劣化した DNA の SNP マイクロアレイへの適用を検討するため、爪から抽出した DNA を用いた家族性脳動静脈奇形 (Arteriovenous malformation: AVM) 家系のゲノムワイド連鎖解析を行った。
- ② 5 例の良性乳頭腫 (Pap 群)、3 例の上皮内乳頭癌 (purePC 群)、2 例の浸潤を伴う乳頭癌 (PCinv 群) を含む 10 例の嚢胞内乳頭状腫瘍について、FFPE 標本の腫瘍部と正常部から DNA を抽出し、SNP マイクロアレイを用いたアレイ CGH を行った。

【結 果】

- ① GeneChip の実験の質を示す指標である QC call rate は 96.05%から 80.07%、平均 91.79%であった。ゲノムワイド連鎖解析の結果、5p13.2-q14.1, 15q11.2-q13.1, 18p11.32-14.1 の 3 箇所を疾患原因候補領域として同定した。これらの領域におけるマイクロサテライトマーカーを用いたハプロタイプ解析の結果は、SNP マイクロアレイを用いたハプロタイプ解析の結果と一致した。
- ② 得られた QC call rate は、70.8%から 91.9%、平均で 80.7%であった。ゲノム全体における染色体構造変化を示した領域の割合は、Pap 群で 2.87%、purePC 群で平均 15.4%、PCinv 群で 35.3%であった。悪性(PurePC 群+PCinv 群)は統計学的有意差をもって、良性(Pap 群)より多くの染色体構造変化を有し (P=0.016)、良性腫瘍から上皮内癌、浸潤癌と進行するにつれて多くの染色体構造変化を獲得していた(P=0.043)。悪性群のなかで最も高頻度 (≥80%) に共有されている染色体構造変化は 3p21.31 と 3p14.2 のコピー数が正常な loss of heterozygosity (LOH) と 20q13.13 の増幅であった。

【考 察】

爪から抽出した DNA を SNP マイクロアレイに適用したが、プロトコルの工夫により得られた call rate は満足いくものであった。爪から抽出した断片化 DNA を使用しても SNP マイクロアレイでの解析は可能であると考えられた。

劣化・断片化した爪 DNA の SNP マイクロアレイ使用が可能であったので、本研究の最大の目的である乳腺嚢胞内乳頭状病変解析を FFPE 標本から抽出した DNA を用いて行った。得られた QC call rate は高品質な DNA を用いた場合と比べて劣るものであったが、同一 FFPE ブロックの正常部から抽出したゲノム DNA を対照に使うことにより、アレイ CGH の結果のアーチファクトを抑えることが可能であった。今回の研究では、ゲノム不安定性の観点からは、乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍の乳頭癌はたとえ上皮内癌であったとしても、良性乳頭腫と大きな違いがあることを明らかにした。これにより、術前の生検標本を用いたコピー数・

LOH解析により良悪性の診断を行い、不必要な外科的介入を避けられる可能性が示唆された。さらに、その他の組織型・癌腫についても、マイクロアレイを用いることによりゲノム不安定性を定量的に解析することが可能であり、癌の予後因子・治療効果予測因子として有用であると思われる。また、悪性群の中で最も高頻度に共有されているゲノム構造変化として 3p21.31 領域と 3p14.2 領域のコピー数が正常な LOH と 20q13.13 領域の増幅が明らかになった。これらの生物学的意義については、今後さらなる検討を進めていかなければならない。

参考論文リスト

1. Masahiro Oikawa, Takeshi Nagayasu, Hiroshi Yano, Tomayoshi Hayashi, Kuniko Abe, Akira Kinoshita, Koh-ichiro Yoshiura, **Intracystic papillary carcinoma of breast harbors significant genomic alteration compared with intracystic papilloma: Genome-wide copy number and LOH analysis using high-density single-nucleotide polymorphism microarrays.** *The Breast Journal* **17(4)**: 2011, In press
2. Masahiro Oikawa, Hideo Kuniba, Tatsuro Kondoh, Akira Kinoshita, Takeshi Nagayasu, Norio Niikawa, Koh-ichiro Yoshiura, **Familial brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA on high-density SNP array.** *European Journal of Medical Genetics* **53**: 2010, 244-249

第1章 緒言

1-1 乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍について

乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍とは、乳腺に生じた嚢胞の壁から発生した腫瘍である。この中には良性腫瘍である嚢胞内乳頭腫と悪性腫瘍である嚢胞内乳頭癌が含まれ、それぞれ乳腺良性腫瘍の約 10%、乳腺悪性腫瘍の約 1%を占めるとされているが (Fayanju et al. 2007, Di Cristofano et al. 2005)、近年のマンモグラフィ検診および乳腺エコー検診の普及により、その割合は増加傾向にあると思われる。嚢胞内乳頭癌は稀な疾患であるが、高齢の女性に多く発生し、乳房内の腫瘤の自覚や血性乳汁分泌を主訴に発見されることが多い。外科的切除を含む適切な治療が施された場合は良好な予後が望めるが (Grabowski et al. 2008)、発見時にすでに所属リンパ節や遠隔臓器への転移を来していた症例も報告されている (Okita et al. 2005, Mulligan and O'Malley 2007, Solorzano et al. 2002)。

乳腺腫瘍のマネジメントにおいて、外科的切除の適応はマンモグラフィ・乳腺エコー・MRI などの画像診断と、穿刺吸引細胞診や針生検による病理診断を総合的に判断して決定される。当然、良性と診断されれば切除の必要はないが、悪性と診断されれば切除が必要となる。しかし、乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍は、特徴的な画像所見に乏しく、細胞異形も少ないため、前述の診断手技を用いても術前に良悪性の鑑別を行うことは困難であることが多い (Douglas-Jones and Verghese 2002) (図 1-1)。われわれの経験した症例も全て切除生検による最終診断が行われており (表 1-1)、不必要な外科的切除を回避するためにも新たな診断手技が望まれている。

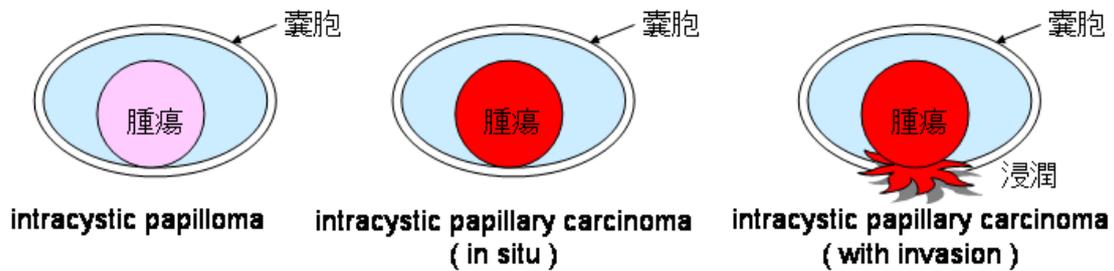


図 1-1 乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍の概要

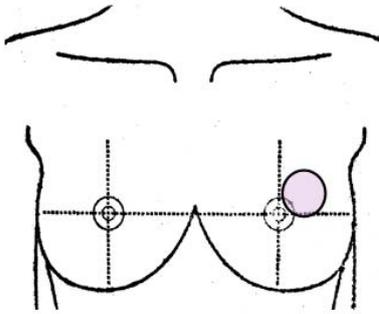
表 1-1 当科で経験した乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍

Case	Clinicopathological findings						
	Diagnosis	age	Size of cyst (mm)	MMG	US	FNAC	Receptor status
1	Pap	43	80	Category 3	Category 3	Class 2	ER(+)
2	Pap	38	10	Category 1	Category 3	Class 3	NaN
3	Pap	49	25	Category 3	Category 3	Class 3	NaN
4	Pap	38	70	Category 3	Category 3	Class 2	NaN
5	Pap	49	75	Category 3	Category 3	Class 2	NaN
6	PurePC	61	31	Category 4	Category 3	Class 4	ER(+), HER2(1+)
7	PurePC	58	49	Category 3	Category 4	Class 4	ER(+)
8	PurePC	43	16	Category 2	Category 4	Class 4	ER(+), HER2(1+)
9	PCinv	60	96	NaN	Category 4	Class 1	ER(-), HER2(1+)
10	PCinv	72	19	Category 4	Category 4	Class 5	ER(+), HER2(1+)

Pap: intracystic papilloma, Pure PC: intracystic papillary carcinoma in situ, PC inv: intracystic papillary carcinoma with invasion, MMG: the mammographic features evaluated according to the BI-RADS, US: the ultrasonographic features evaluated according to diagnostic guideline of JABTS, FNAC: the cytological features of fine needle aspiration cytology, ER: the status of estrogen receptor, HER2: the status of HER2/neu receptor, NaN: not analysed

【症例】49歳、女性

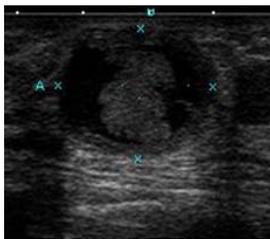
【主訴】しこり自覚、血性乳汁
【病悩期間】1ヶ月



Li CE, 20x20mm, 軟
血性乳汁あり。



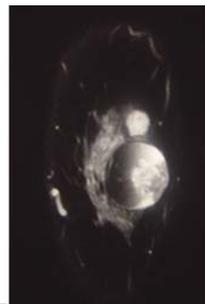
MMG(CC)
腫瘤、境界明瞭平滑、カテゴリー3



US: 嚢胞内腫瘍。
境界明瞭平滑。
カテゴリー3
径25mm

USガイド下FNAC→class3, suspicious malignancy

USガイド下CNB→class3, intracystic papillary lesion
, indetermined



MRI:
造影パターンは
悪性パターン。
壁外浸潤の
所見無し。

術式:
乳房部分切除術
(Bp)

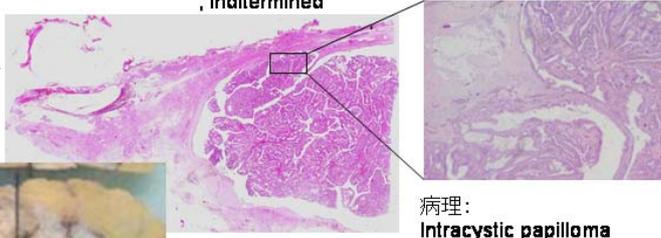


図 1-1 診断に苦慮した乳腺嚢胞内乳頭腫

画像診断上は悪性を否定できず、穿刺吸引細胞診・針生検による組織診では悪性の疑いであったが、切除標本による最終診断は良性の乳頭腫であった。

1-2 癌のゲノム不安定性について

ゲノム不安定性は悪性腫瘍における大きな生物学的特徴のひとつである。ゲノム不安定性は様々な評価法があるが、最も主要な評価のひとつが染色体の構造や数の変化に代表される染色体不安定性である (Negrini et al.)。以前より造血器悪性腫瘍においては転座や欠失などの染色体不安定性が多くみられることが知られていたが、これまでの研究により固形癌においても同様の変化が多くみられ、発癌や悪性化の進展に大きな影響を与えていることが明らかになってきた (Mitelman et al. 2004)。

乳癌においても、染色体不安定性と生物学的および臨床的な悪性度との関連が数多く報告されている。乳癌を細胞遺伝学的なプロファイルでクラスタリングした場合、最も染色体不安定性が高いサブクラスはテロメアの短小化や RB パスウェイの異常と強く関連していた (Fridlyand et al. 2006)。同様のクラスタリング手法を用いた別の報告では、各々のサブクラスは ER や HER2 などレセプター発現状況、病理学的グレード、遺伝子発現プロファイルによる intrinsic subtype と関連していた (Andre et al. 2009)。また、乳癌を免疫染色パターンで分類した場合、HER2 陽性のサブクラスは高度の遺伝子増幅を示し、トリプルネガティブ (ER, PgR, HER2 のいずれもが陰性) のサブクラスは高い染色体不安定性を示した (Hu et al. 2009, Melchor et al. 2008)。染色体欠失の帰結としての loss of heterozygosity (LOH) についても、その出現率と腫瘍の大きさ、核グレードとの関連が報告されている (Loo et al. 2008)。

乳腺の良性腫瘍における細胞遺伝学的解析の報告は、乳癌についての報告と比べると少ない。乳腺良性腫瘍で最も頻度の高い線維腺腫についても、これまでに 40 例程度の報告しかなされていない (Reis-Filho et al. 2005)。約 2/3 の症例でコピー数異常を認めたが、一腫瘍あたり平均 4 箇所と僅かなものであった。一方、良悪性境界病変である葉状腫瘍については、良性葉状腫瘍では線維腺腫と同様に染色体不安定性を認めなかったが、悪性葉状腫瘍では多くの染色体構造変化を認めたとの報告がある (Lu et al. 1997, Wang et al. 2006)。この結果は、染色体不安定性の大きさによって良悪性の鑑別を行い得るのではないかと

いう新たな診断手技についての示唆を与える。乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍についての細胞遺伝学的報告はさらに少なく、その結果についても確定的なものは無い。

1-3 高密度一塩基多型マイクロアレイについて

半導体集積回路の生成技術を応用し、基板上に各一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism: SNP) のジェノタイプに対応した数十塩基のプローブ DNA を配列したものが一塩基多型マイクロアレイ (SNP マイクロアレイ) であり、代表的なものに Affymetrix 社の GeneChip シリーズが挙げられる。ゲノム DNA をアレイ上のプローブにハイブリダイズさせて信号を読み取ることにより、ゲノム上の数十万から百万の SNP を一度に遺伝子型 (ジェノタイプ) を決定することができる。主にジェノタイプのデータを用いて、ゲノムワイド関連解析やゲノムワイド連鎖解析などに用いられるが、各々のプローブの信号強度と対照ゲノムの信号強度の比を取ることによって、仮想的に競合ゲノムハイブリダイゼーション (Comparative genomic hybridization: CGH) を行うことができる (図 1-2)。SNP マイクロアレイを用いた CGH の利点は、単純にコピー数の異常を検知するだけではなく、ジェノタイプのデータを用いた LOH 解析も行えることにある。これにより従来の古典的 CGH や BAC アレイを用いた CGH では検知できなかった、コピー数の正常な LOH (Copy-neutral LOH) も検知できるようになった (Yamamoto et al. 2007, Zhao et al. 2004)。

高密度 SNP マイクロアレイは人類遺伝学的にも細胞遺伝学的にも非常に強力な解析ツールであるが、試料の DNA は高品質のものでなければならないという制限がある。DNA の蛍光標識の過程で酵素反応による DNA 増幅が必要なため、ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin fixed paraffin embedded: FFPE) 標本・髪・爪などの劣化した DNA では、断片化のために増幅効率に偏りができてしまい、遺伝子型の決定が不正確となりシグナル強度も不正確となるからである。しかし、全ての症例で末梢血細胞や新鮮凍結標本から高品質な DNA を抽出できるわけではない。特に稀少な家族性疾患については、遠方の患者から

の試料は爪や髪の毛の形で入手せざるを得ないことがあるし、稀な腫瘍においては FFPE 標本の形態でしか保存されていないことも多い。癌研究に関しては、FFPE 標本はもともと一般的な組織保存の形態であり、多くの大規模な臨床試験のデータとも結び付けられている。このように、劣化した DNA を高密度 SNP マイクロアレイに適用する意義は非常に大きく、これまでも数々の試みが報告されている(Jacobs et al. 2007, Lyons-Weiler et al. 2008, Thompson et al. 2005)。

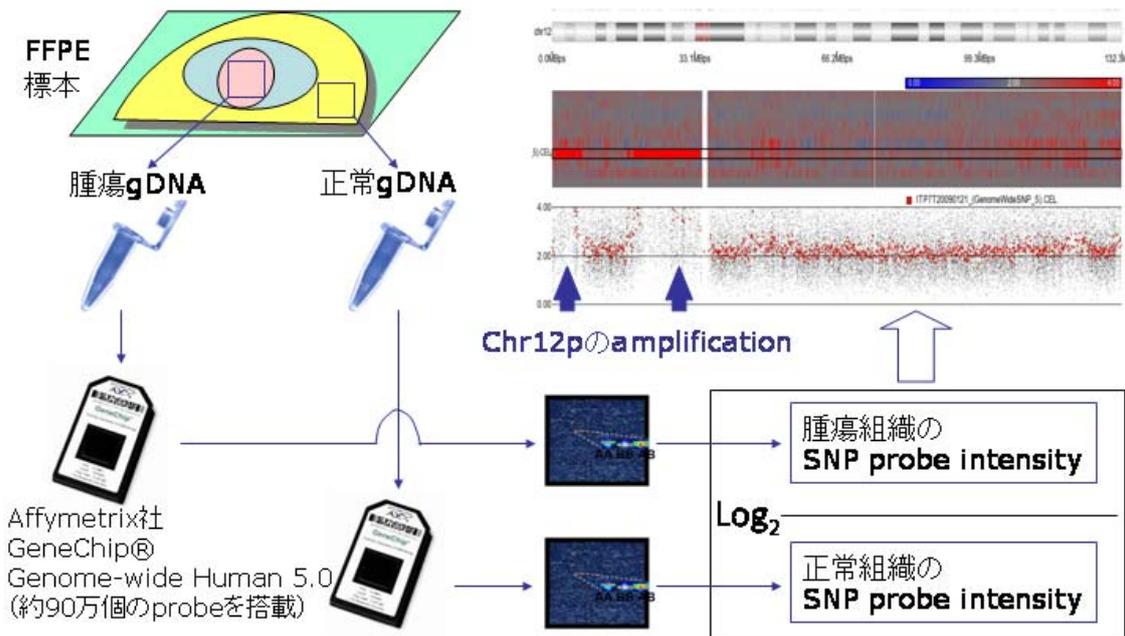


図 1-2 SNP マイクロアレイを用いたアレイ CGH

1-4 この研究の目的

本研究の目的は、未だ不明な点の多い乳腺嚢胞内乳頭状病変についての細胞遺伝学的プロファイルを、高密度 SNP マイクロアレイを用いた CGH という新しい技術によって明らかにすることにある。この研究により、臨床的に良悪性の判断の難しい本疾患について、新たな診断手技開発の端緒となると考えた。また、良性から悪性への進展に関わるメカニズムの解明にも貢献すると考えた。この目的を達成するためには、FFPE 標本から抽出した劣化した DNA を高密度 SNP マイクロアレイに適用するという技術的なハードルを越えな

ければならなかった。

第2章では、劣化したDNAを高密度SNPマイクロアレイに適用した例として、爪から抽出したDNAを用いた家族性脳動静脈奇形 (Arteriovenous malformation: AVM) 家系のゲノムワイド連鎖解析について述べる。第3章では乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍における、FFPE標本から抽出したDNAを用いた高密度SNPマイクロアレイによるゲノムワイドコピー数・LOH解析について述べる。第4章ではこの研究についての総括と、結果を踏まえた今後の展望について述べる。

第2章 爪から抽出した DNA を用いた家族性脳動静脈奇形 (Arteriovenous malformation: AVM) 家系のゲノムワイド連鎖解析

2-1 緒言

脳動静脈奇形 (Arteriovenous malformation: AVM) は、脳実質の動脈と静脈の間に介在する血管叢によって形成されるシャントの存在と定義される (Horton 2007)。AVM の血管異常は先天的な疾患と考えられており、生前もしくは生後間もなくより未熟な動静脈吻合から発生するとされている (Fleetwood and Steinberg 2002)。AVM の最も一般的な症状は頭蓋内出血であり、脳 AVM と診断された場合、その発生リスクは年におよそ 1.3-3.9% と推定されている (Crawford et al. 1986)。その他の症状には難治性てんかんや頭痛、ischemic steal syndrome などが挙げられる。脳 AVM の有病率はおよそ 0.01% と推定されており、発見率は一年あたり 10 万人に 1.12 から 1.34 人である (Fleetwood and Steinberg 2002, Horton 2007)。多くの脳 AVM は孤発性に発症するが、これまでに 25 家系 53 例の家族性発症が報告されている (Van Beijnum et al. 2007)。家族性脳 AVM は第三度近親以内の家族に二人以上の脳 AVM 患者を認め、尚且つ症候性の AVM を含む全身性の血管異常伴う遺伝性毛細血管拡張症 (Hereditary hemorrhagic telangiectasia: HHT) 等の遺伝性疾患ではないものと定義される。家系内の罹患者が無症候性である場合は見過ごされるため、家族性脳 AVM はこれまで考えられているよりも有病率は高い可能性がある。

症候性の AVM については、これまでもいくつかの疾患責任遺伝子が同定されているが、家族性または孤発性 AVM の分子遺伝学的研究は少ない。HHT1 型と 2 型はそれぞれ *ENG* 遺伝子 (9p34.11) および *ACVRL1* 遺伝子 (5q14.3) の変異が原因である (Johnson et al. 1996, McAllister et al. 1994)。毛細血管奇形 - 動静脈奇形 (Capillary malformation-arteriovenous malformation: CM-AVM) は *RASA1* 遺伝子 (5q14.3) の変異が原因である (Boon et al. 2005, Limaye et al. 2009, Revencu et al. 2008)。この疾患は

全身にポートワインステインとも呼ばれる毛細血管奇形が認められるが、約 1/3 の患者では脳 AVM を伴う。*PTEN* 遺伝子の変異は Bannayan-Riley-Ruvalcaba 症候群を含む PTEN hamartoma tumor syndrome と関連し、しばしば脳 AVM を伴う (Suphapeetiporn et al. 2006)。*KIRITI* 遺伝子 (7q21.2) (Laberge-le Couteulx et al. 1999)、*MGC4607* 遺伝子 (7p13) (Denier et al. 2004)、*PDCD10* 遺伝子 (3q26.1) (Bergametti et al. 2005) の 3 遺伝子の変異は、いずれも脳海綿状血管奇形を引き起こす。一方で、家族性脳 AVM に関する報告は 6 家系を含む連鎖解析の報告が 2 報のみである (Inoue et al. 2007, Takenaka et al. 2007)。これらの報告では 6q25 が最も有望な候補遺伝子座として報告され、その他に 3p27, 4q34, 7p21, 13q32-q33, 16p13-q12, 20q11-q13 が候補遺伝子座として挙げられたが、責任遺伝子の同定には至っていない。また、孤発性の脳 AVM についてはマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の報告があり、*VEGFA*, *ITGA5*, *ENG*, *MMP9* が AVM 組織で高発現しており、AVM 形成への関与が示唆されている (Hashimoto et al. 2004, Sasahara et al. 2007, Sure et al. 2004)。

この章では、爪から抽出した DNA を用いた家族性脳 AVM 家系のゲノムワイド連鎖解析の経験について報告する。

2-2 対象と方法

2-2-1 対象

罹患者 4 名を含む、4 世代 19 人の日本人の脳 AVM 家系を対象とした。罹患者のうち二人は脳 AVM を認め、一人は肺 AVM を認め、一人は脳 AVM と肺 AVM をいずれも認めた (図 2-1)。発端者 (III-3) は 13 歳時に難治性てんかんのため医療機関を受診し、脳 MRI の結果、右前頭葉の 2cm 径の AVM を診断された (図 2-2)。来院時に行った胸部単純写真で右下肺野に結節影を指摘され、後の肺動脈造影検査にてシャント率 24% の肺 AVM と診断された (図 2-2)。発端者の肺 AVM は 14 歳の時に外科的に切除された。脳 AVM は 19 歳の時にガンマナイフによる治療が行われ、その後は抗てんかん薬の投与が続けられている。母

親 (II-3) は脳 AVM による頭蓋内出血によって死亡している。従兄弟 (III-5) の脳 AVM は無症候性であり、健診の MRI で偶然に発見された。叔父 (II-5) は肺 AVM と診断されたが、無症候性である。本研究においてはこの 4 人を「罹患者」、MRI で脳 AVM が存在しないことを確認された 6 人 (II-6, III-1, III-7, IV-1, IV-2) を「非罹患者」と定義し、これまでに AVM に関する症状を認めていないが、MRI による検査を行われていない残りの 3 人を「不明」と定義した。

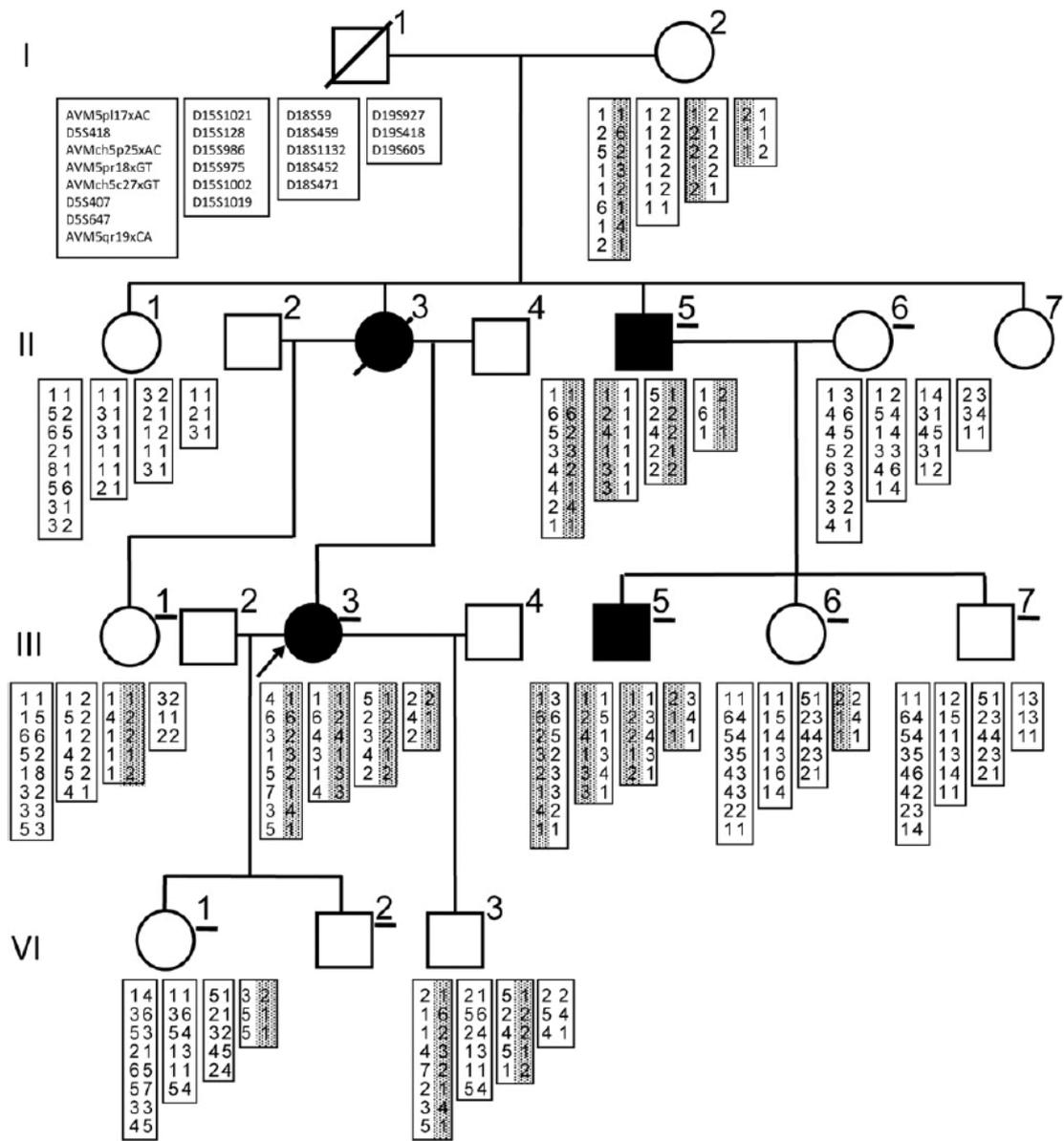
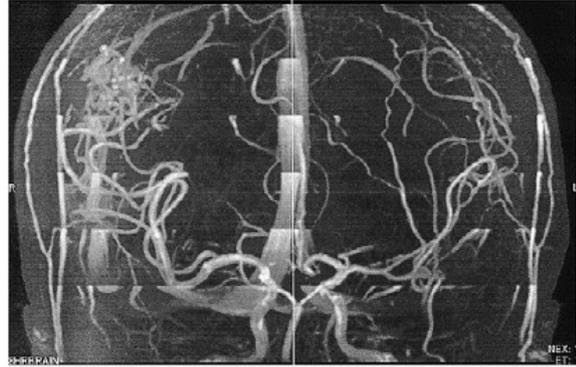
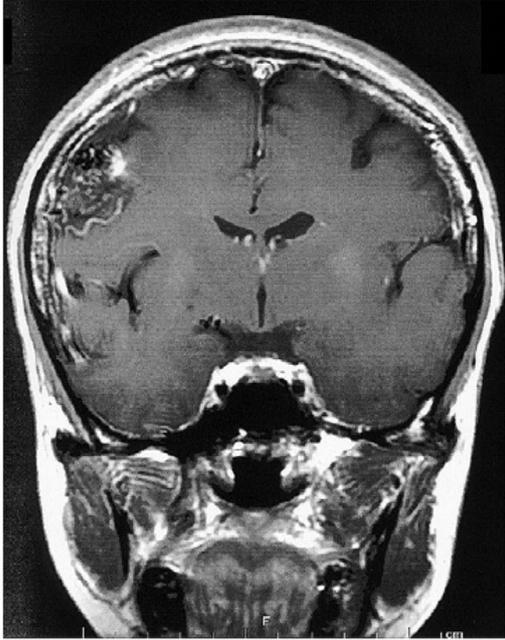


図 2-1 家族性脳動静脈奇形の家系と 5q13.2-q14.1, 15q11.2-13.1, 18p11.32-p11.22, 19q13.3-q13.42 の 4 箇所の候補領域のハプロタイプ

下線を引いてある症例は頭部 MRI が行われた症例。網掛けのハプロタイプは疾患関連が疑われるハプロタイプ。

A



B

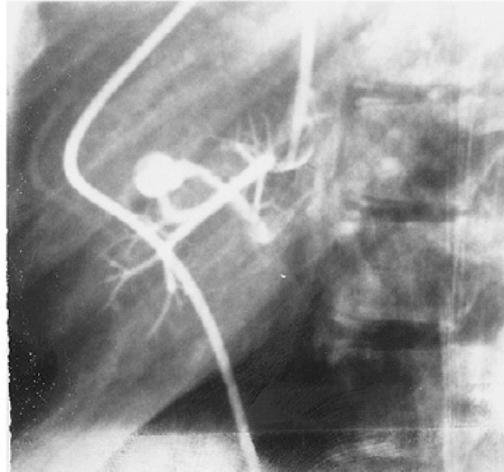
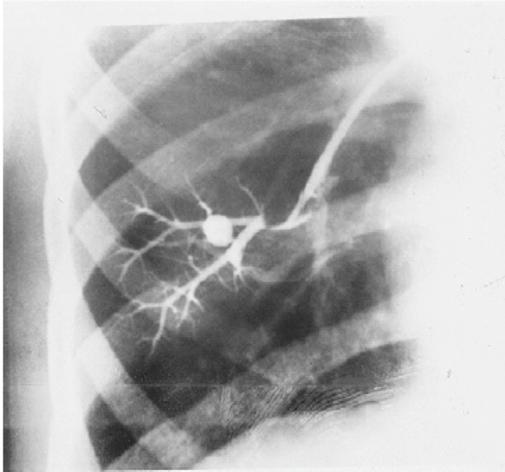


図 2-2 発端者の脳動脈奇形と肺動静脈奇形

(A) 頭部 MRI と MRI アンギオグラフィー。右前頭葉に 2.0 x 1.3 cm の動静脈奇形を認める。

(B) 肺動脈造影。右下葉 (rtS8b) に肺動静脈奇形を認め、24%のシャント率であった。

2-2-2 DNA 抽出

発端者からは末梢血を、発端者を除く 10 名からは爪の形で試料を得た。爪からの DNA 抽出は、以前に報告した尿素、DDT、プロテアーゼ K を含む溶媒を用いて行った (Matsuzawa et al. 2006, Nakashima et al. 2008)。爪片を液体窒素で凍結したのち、マルチビーズショッカー (ヤスイ機械) を用いて粉末状にする。爪の粉末に 1mg/ml のプロテアーゼ K と 40mM の DDT を含む Urea-lysis solution (2M 尿素, 0.5% SDS, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1M EDTA) を加え、55°C のオーブンで一晩インキュベートする。フェノール・クロロホルム法で DNA を抽出し、エタノール沈殿法で回収する。これを 1mg/ml のプロテアーゼ K と 40mM の DDT を含む Extraction buffer (0.5% SDS, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1M EDTA) に溶かし、55°C のオーブンで一晩インキュベートする。前述の方法で DNA を精製し、30 μ L の 1xTE バッファーに溶解した。

2-2-3 Affymetrix 10K 2.0 array を用いた SNP ジェノタイプ

発端者の末梢血から抽出した DNA (250ng) は、GeneChip Mapping 10K Xba Assay Kit (Affymetrix 社) に付属した標準プロトコルに沿って処理を行った。爪から抽出した DNA は劣化していたため (図 2-3)、以下の二点において標準プロトコルの変更を行った。標準プロトコルでは 120 分とされている制限酵素による反応時間を、overnight に延長した。標準プロトコルでは 35 サイクルの PCR サイクルを、45 サイクルに増加した。Affymetrix GeneChip Operating System から得られたデータは、各 SNP のジェノタイプを決定するために Affymetrix GeneChip Genotyping Analysis Software (GTYPE) 4.0 を用いて解析された。

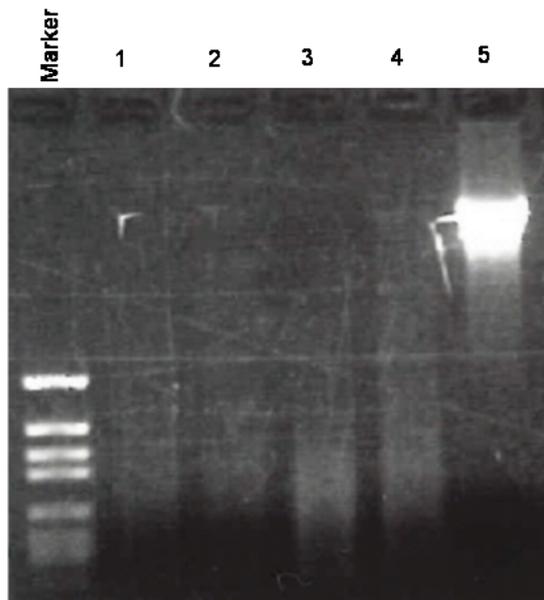


図 2-3 抽出したDNAの電気泳動像

0.8%アガロースゲル

100V, 30min

Lane 1-4: 爪から抽出したDNA

Lane 5: 末梢血から抽出したDNA

爪から抽出したDNAは断片化が進んでいる

2-2-4 SNP ジェノタイプデータを用いた連鎖解析とマイクロサテライトマーカを用いたハプロタイプ解析

本家系の AVM は常染色体優性遺伝形式をとり、浸透率は 90%、疾患関連遺伝子座の頻度は 0.1%の仮定の上で、MERLIN software (Abecasis et al. 2002) を用いた多点 LOD スコアを計算した。SNP ジェノタイプを用いた連鎖解析で LOD スコアが 0 以上の領域については、SNP ジェノタイプを用いたハプロタイプ解析を行って確認し、さらにマイクロサテライトマーカを用いたハプロタイプ解析を行った。使用したマイクロサテライトマーカは National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースより参照した。各々のマーカのプライマーのうち片方を、FAM、NEX、NED の何れかで標識し、5ng の DNA を鋳型に 10 μ L の反応系で PCR が行った ; 0.25 U ExTaq DNA polymerase HS-version (タカラバイオ)、200 μ M dNTP、0.5 μ M プライマー、1xExTaq buffer。PCR 産物は Genetic Analyzer 3130xl (アプライドバイオシステム) によって分離し、ジェノタイプピングには GeneMapper software (アプライドバイオシステム) を用いた。罹患者が疾患関連ハプロタイプを持つ領域については、MLINK program (Lathrop et al. 1984) を用いて二点 LOD スコアを計算した。

2-2-5 候補遺伝子の変異解析

連鎖解析で決定された候補遺伝子座の中からいくつかの遺伝子を選び、変異解析を行った。候補遺伝子座の外であっても、いくつかの有力候補遺伝子については変異解析を行った。変異解析のためのプライマーは、University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser (<http://genome.cse.ucsc.edu/>) から参照した塩基配列を用いて、Primer3-web 0.3.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) によって設計した。PCR は 5 ng の DNA を鋳型に 15 μ L の反応系で行った ; 0.25U ExTaq DNA polymerase HS-version、200mM dNTP、0.5 μ M プライマー、1x ExTaq buffer。PCR 産物は BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (アプライドバイオシステム) と Genetic Analyzer 3130xl を用いて、ダイレクトシーケンスを行った。得られた配列データは ATGC software (GENETYX 社) を用いて、目視で塩基置換を検索した。

2-2-6 コピー数異常の解析

候補遺伝子座におけるコピー数異常を検索するために、マイクロアレイを利用したコピー数解析を行った。末梢血から抽出した発端者の DNA を付属のマニュアルに従い処理し、Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 5.0 (Affymetrix 社) に適用した。各プローブから得られる信号強度のデータを用いて、Partek Genomics Suite (Partek 社) による Unpaired 解析を行った。コピー数異常のある領域の同定は、同プログラムの隠れマルコフモデルを利用した。

2-3 結果

2-3-1 連鎖解析およびハプロタイプ解析

爪から抽出した DNA を用いたマイクロアレイ解析の SNP call rate は平均 92.49%で、血液から抽出した発端者の DNA を用いた解析では 98.11%であった。製品のマニュアルによれば、SNP call rate が 92%以上であれば十分なクオリティを持った実験データと判断さ

れる。この結果から、得られたジェノタイプのデータは連鎖解析に十分利用可能と判断し、LOD スコアの計算へと進んだ。

MERLIN software による SNP ジェノタイプを用いた連鎖解析により、18 箇所の LOD スコアが陽性の領域を同定した。この中で 14 の領域は、機能する RefSeq gene が存在しない、200kb 以下の小さいサイズである、罹患者の間で共通の SNP ハプロタイプが共有されていない等の理由で候補領域から除外した。よって、5p13.2-q14.1, 15q11.2-q13.1, 18p11.32-p11.22, 19q13.33-q13.42 の 4 領域が疾患関連遺伝子座の候補として残った (図 2-1、図 2-4)。

次に、これらの領域についてマイクロサテライトマーカーでジェノタイピングを行い、二点 LOD スコアを計算した (表 2-1)。最終的に先ほどの 4 領域のうち、以下の如く 3 つの領域を疾患関連遺伝子座として同定した。①最大 LOD スコアが 1.632 ($\theta = 0$) の 5p13.2-q14.1 (rs1366265-rs1373965) の 48Mbp の領域。②最大 LOD スコアが 1.632 ($\theta = 0$) の 15q11.2-q13.1 (rs850819-rs818089) の 6Mbp の領域。③最大 LOD スコアが 0.851 ($\theta = 0$) の 18p11.32-p11.22 (rs486633-rs1942159) の 9Mbp の領域。19q13.33-q13.42 のハプロタイプは、非罹患者確定者の 2 名 (III-6、IV-1) に伝達されていたために除外した。

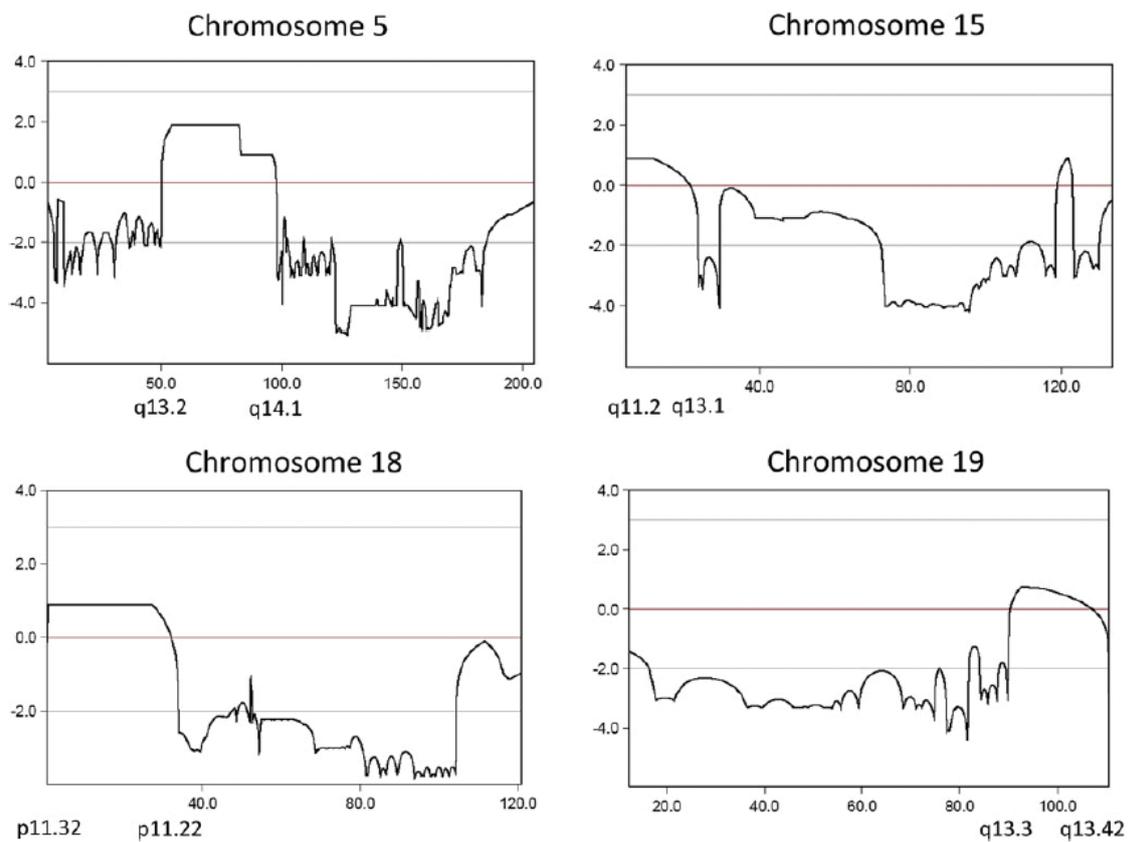


図2-4 MERLIN software によって計算された4箇所の候補領域(5q13.2-q14.1, 15q11.2-13.1, 18p11.32-p11.22, 19q13.3-q13.42)における多点 LOD スコア

表 2-1 候補領域における二点 LOD スコア

Locus	Recombination fraction (θ)					
	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
AVM5p117xAC	0.032	0.030	0.029	0.027	0.026	0.025
D5S418	0.551	0.535	0.518	0.501	0.484	0.467
AVMch5p25xAC	1.334	1.301	1.268	1.234	1.201	1.167
AVM5pr18xGT	0.511	0.491	0.472	0.452	0.433	0.414
AVMch5c27xGT	1.630	1.597	1.564	1.531	1.497	1.463
AVM5c18xAC	1.373	1.344	1.314	1.285	1.255	1.225
D5S407	1.632	1.599	1.566	1.532	1.499	1.465
D5S647	1.154	1.121	1.089	1.056	1.023	0.991
AVM5qr19xCA	0.810	0.790	0.769	0.748	0.727	0.706
D15S1021	0.171	0.164	0.157	0.150	0.143	0.137
D15S128	0.876	0.858	0.841	0.823	0.805	0.787
D15S986	0.812	0.791	0.770	0.749	0.728	0.707
D15S975	0.400	0.387	0.374	0.361	0.348	0.335
D15S1002	1.330	1.298	1.266	1.234	1.202	1.170
D15S1019	1.632	1.599	1.566	1.532	1.499	1.465
D18S59	0.199	0.214	0.225	0.234	0.241	0.246
D18S459	0.142	0.136	0.131	0.125	0.120	0.114
D18S1132	0.677	0.663	0.650	0.636	0.623	0.609
D18S452	0.851	0.832	0.813	0.794	0.774	0.755
D18S471	0.240	0.231	0.222	0.214	0.205	0.197
D19S927	-0.302	-0.277	-0.254	-0.234	-0.216	-0.200
D19S418	-2.655	-2.453	-2.257	-2.078	-1.919	-1.778
D19S605	-0.648	-0.574	-0.512	-0.460	-0.414	-0.374

2-3-2 候補遺伝子の変異解析

最も LOD スコアの高かった 5p13.2-q14.1 の 48Mbp の領域には約 200 個の RefSeq 遺伝子が含まれる。この中から、機能的に血管の発生や維持に関与していると考えられるもの、HHT 等の原因遺伝子と類似の機能を持っていると考えられるもの、脳 AVM 組織中で発現に変化が見られるものを参考に、10 個の遺伝子 (*MAP3K1*, *DAB2*, *OCLN*, *FGF10*, *ESM1*, *ITGA1*, *ITGA2*, *EDFLAM*, *ERBB2IP*, *PIK3R1*) を選出して変異解析を行った。発端者の DNA を用いたこれら 10 個の遺伝子の変異解析では、疾患の原因となるような変異は認められなかった。今回明らかになった疾患関連遺伝子座には含まれていないが、HHT の原因遺伝子である *ENG* と *ALK1*、AVM-CM の原因遺伝子である *RASA1* について、本家系がこれらの症候性 AVM を伴う遺伝性疾患ではないということを証明するために変異解析を行った。疾患の原因となるような変異は認められず、本家系が HHT あるいは AVM-CM であることは否定された。

発端者の DNA を用いて行ったコピー数解析では、12q に増幅、2p, 3q, 4q, 6p, 7q に欠失を認めたが、いずれも以前にコピー数多型として登録されており (<http://projects.tcag.ca/variation/>)、病的な意義は無いと考えられた。また、前述した *ENG* (9q34.11), *ALK1* (12q13.13), *RASA1* (5q14.3) の存在する領域には、コピー数異常は認められなかった。

2-4 考察

本研究では二人の脳 AVM 罹患者、一人の肺 AVM 罹患者、一人の脳・肺 AVM 罹患者からなる日本人の一家系を報告した。この家系は家族性脳 AVM の定義に合致し、AVM は常染色体優性形式で遺伝していると考えられた。本家系について、連鎖解析後に候補遺伝子についてのダイレクトシーケンス解析を行い、疾患責任遺伝子を同定しようと試みた。

連鎖解析の結果、連鎖を確定させるには至らないが比較的高い LOD スコアを示す 3 箇所候補領域 (5p13.2-q14.1, 15q11.2-q13.1, 18p11.32-p11.22) を同定した。得られた LOD

スコアはそれぞれ、1.632, 1.632, 0.851 である。この不完全なマッピングは家系があまり大きくない事と、疾患罹患状況が明らかでない患者が含まれていることに由来すると考えられる。すなわち、「不明」と定義された患者の中に無症候性の罹患者が含まれている可能性があるためである。事実、候補領域 5p13.2-q14.1 については、発端者の祖母 (I-2) と息子 (IV-3) は 4 人の罹患者と共通するハプロタイプを有していたが (図 2-1)、彼らの疾患罹患状況は「不明」であった。もしもこの「不明」に割り当てられた患者に頭部 MRI 検査等が行われて正確な罹患状況が明らかになれば、より確定的な結果が出せるかもしれない。本研究で同定された 3 つの候補領域は、以前に報告された家族性 AVM の連鎖解析による候補領域 (Inoue et al. 2007) とは重ならず、症候性 AVM を伴う遺伝疾患を引き起こす遺伝子座 (ENG, ALK1, RASA1, PTEN, KRIT1, MGC407, PDCD10) とも重ならなかった。

我々は候補領域 5p13.2-q14.1 に含まれる遺伝子のうち、10 個の遺伝子を選出して変異解析を行った。この遺伝子のうち *MAP3K1*, *DAB2*, *OCLN* は、HHT1 型および HHT2 型で責任遺伝子の変異により機能が変化している TGF β パスウェイで重要な働きをするタンパクをコードしている。*FGF10*, *ESM1*, *ITGA1*, *ITGA2*, *EGFLAM*, *ERBB2IP*, *PIK3R1* は、AVM の組織内においてその発現が変化していることが報告されている遺伝子である。しかし、これらの遺伝子には疾患の原因となる変異は認められなかった。同一家系内で脳 AVM と肺 AVM、その両方を含む症例が観察されているため、HHT の家系である可能性を考慮し、HHT 1 型と HHT2 型の責任遺伝子である ENG と ALK1 についても変異解析を行ったが、変異は認めなかった。もう一つの有力な症候性 AVM を伴う遺伝疾患として、CM-AVM の責任遺伝子である RASA1 についても変異解析を行ったが、変異は認めなかった。今後は候補領域内の遺伝子について、次世代シーケンス技術等も活用しながら変異解析を行い、本家系の疾患責任遺伝子の同定を行いたい。

第3章 乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍における高密度 SNP マイクロアレイを用いたゲノムワイドコピー数・LOH 解析

3-1 緒言

乳腺の嚢胞内乳頭状腫瘍には、良性の乳頭腫、悪性の上皮内乳頭癌、浸潤性乳頭癌が含まれる。臨床的には、術前に良悪性の鑑別を行うことが針細胞診・生検をおこなっても難しく、その取り扱いが問題となっている。本疾患における細胞遺伝学的な解析は、良悪性の診断および発癌機構の解明に有用であると思われるが、報告は少なく一定の見解は得られていない（表 3-1）。

津田ら (Tsuda et al. 1997) の 1 番染色体短腕と 16 番染色体長腕のプローブを用いた FISH の報告によると、乳頭癌では高率 (93%) に増幅・欠失・転座等の染色体構造変化を認めたが、乳頭腫ではそのような変化は認めなかった。Boecker ら (Boecker et al. 2001) も Comparative Genomic Hybridization (CGH) 解析の結果から、乳頭腫には染色体構造変化を認めなかったと報告している。LOH 解析に関しては、津田ら (Tsuda et al. 2001) が 16 番染色体の LOH 解析において、乳頭癌では全例に、異型を伴う乳頭腫では 2/3 に LOH を認め、乳頭腫では全く LOH を認めなかったと報告しているが、Lininger ら (Lininger et al. 1998) と Cristofano ら (Di Cristofano et al. 2005) は乳頭腫も乳頭癌と同程度の頻度で LOH を認めると報告している。現在までのところ、本疾患に高密度マイクロアレイを用いたアレイ CGH を行ったという報告は無い。

この章では、乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍において、ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin fixed paraffin embedded: FFPE) 標本から抽出した DNA を用いた高密度 SNP マイクロアレイによるゲノムワイドコピー数・LOH 解析について報告する。

表 3-1 これまでの乳腺乳頭状腫瘍における細胞遺伝学的解析

Pap: papilloma, PC: papillary carcinoma,

	Case	LOH analysis	Copy number analysis
Tsuda 1997	Pap 12	<i>chr16</i>	<i>FISH (16q or 1p)</i>
	PC 14	PC 7/7 (100%)	PC 13/14 (93%)
		Pap 0%	Pap 0/12 (0%)
Lininger 1998	Pap 15	<i>16q</i>	
	PC 18	Pap 6/10 (60%)	
		PC 10/16 (63%)	
Boecker 2001	Pap 22		<i>CGH</i>
			Pap 0/22 (0%)
Tsuda 2001	Usual Pap 10	<i>16q</i>	
	Atyp. Pap 3	Atyp pap 2/3 (66%)	
		Pap 0/10 (0%)	
Cristofano 2005	Pap 12	<i>16p, 16q, TP53</i>	
	PC 15	Pap 6/12 (50%)	
		PC 13/15 (87%)	

3-2 対象と方法

3-2-1 対象と臨床的特徴

長崎大学附属病院で手術が行われた、5 例の良性乳頭腫(Pap 群)、3 例の上皮内乳頭癌 (PurePC 群)、2 例の浸潤を伴う乳頭癌 (PCinv 群)を含む 10 例の嚢胞内乳頭状腫瘍を対象とした。病理診断は熟練した二名の病理専門医により行った。マンモグラフィおよび乳腺エコーにおけるカテゴリー診断は、それぞれ American College of Radiology の Breast Imaging-Reporting and Data System (BI-RADS) と日本乳腺甲状腺超音波診断会議 (JABTS) のガイドラインに沿って行った。本症例の臨床病理学的所見を図 3-1、表 3-2、表 3-3 に示す。

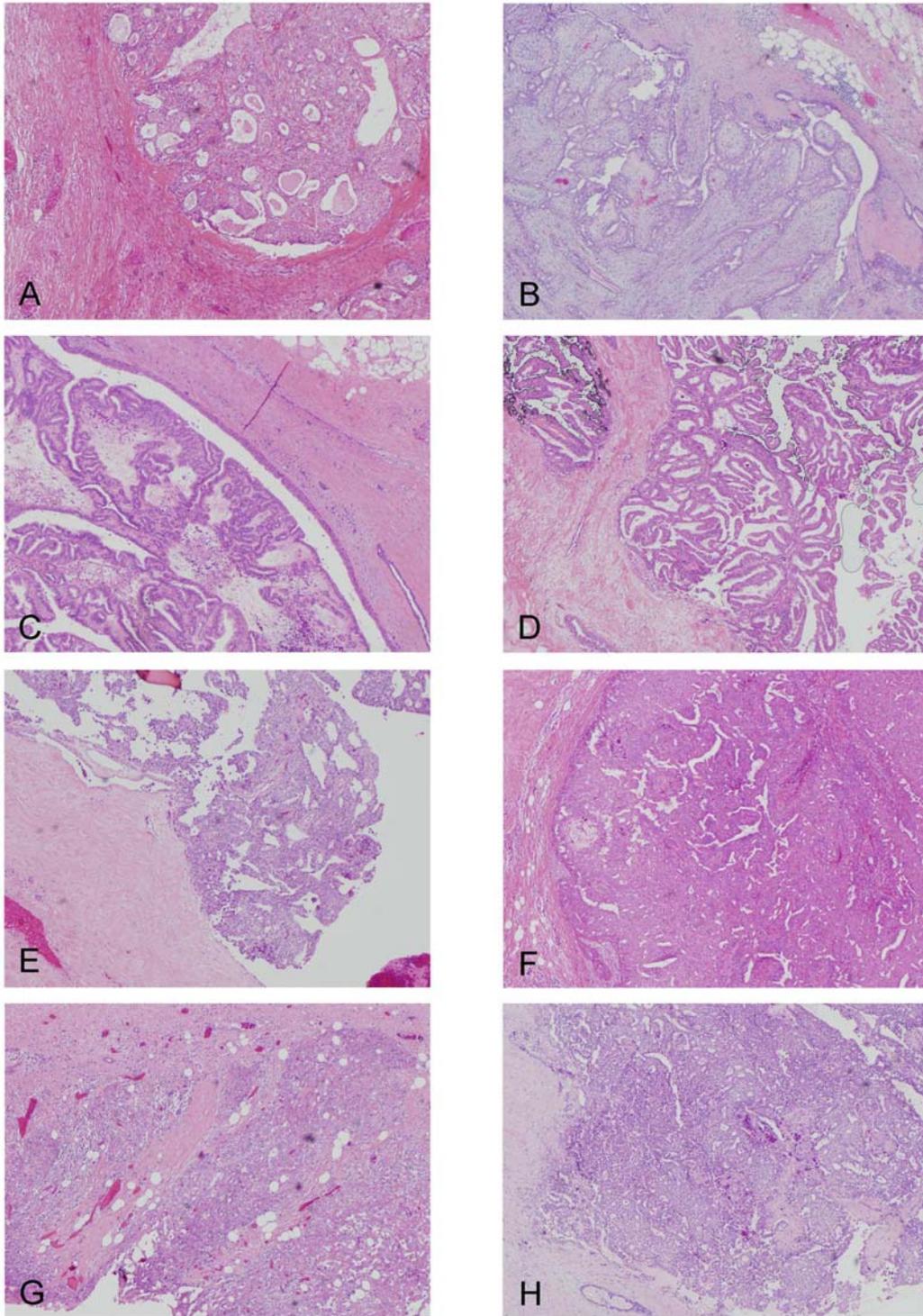


図 3-1 嚢胞内乳頭状腫瘍のHE染色像 (倍率 40 倍)

A-C: Intracystic papilloma (A-case1, B-case2, C-case3). D-F: Intracystic papillary carcinoma in situ (D-case6, E-case7, F-case8). G, H: Intracystic papillary carcinoma with invasion (G-case9, H-case10)

表 3-2 本症例の臨床病理学的所見

Case	Clinicopathological findings						Genetic findings			
	Diagnosis	age	Size of cyst (mm)	MMG	US	FNAC	Receptor status	QC call rate (normal/tumor)	ratio of CNC	ratio of genomic alteration
1	Pap	43	80	Category 3	Category 3	Class 2	ER(+)	75.9%/82.9%	0.14%	0.24%
2	Pap	38	10	Category 1	Category 3	Class 3	NaN	83.4%/80.4%	0.66%	0.69%
3	Pap	49	25	Category 3	Category 3	Class 3	NaN	86.2%/86.5%	1.60%	1.60%
4	Pap	38	70	Category 3	Category 3	Class 2	NaN	89.9%/87.9%	0%	11.8%
5	Pap	49	75	Category 3	Category 3	Class 2	NaN	91.9%/89.8%	0%	0%
6	PurePC	61	31	Category 4	Category 3	Class 4	ER(+), HER2(1+)	75.7%/76.2%	11.3%	24.1%
7	PurePC	58	49	Category 3	Category 4	Class 4	ER(+)	79.7%/70.8%	0.41%	8.83%
8	PurePC	43	16	Category 2	Category 4	Class 4	ER(+), HER2(1+)	77.2%/79.9%	12.0%	13.2%
9	PCinv	60	96	NaN	Category 4	Class 1	ER(-), HER2(1+)	71.6%/73.9%	16.6%	53.1%
10	PCinv	72	19	Category 4	Category 4	Class 5	ER(+), HER2(1+)	82.0%/72.6%	16.0%	17.6%

Pap: intracystic papilloma, Pure PC: intracystic papillary carcinoma in situ, PC inv: intracystic papillary carcinoma with invasion, MMG: the mammographic features evaluated according to the BI-RADS, US: the ultrasonographic features evaluated according to diagnostic guideline of JABTS, FNAC: the cytological features of fine needle aspiration cytology, ER: the status of estrogen receptor, HER2: the status of HER2/neu receptor, CNC: copy number change, genomic alteration: copy number change and copy neutral loss of heterozygosity, NaN: not analyzed.

表 3-3 試料の背景と QC call rate

Case	Diagnosis	subtype	Storage time (month)	Yields of genomic DNA (μg)	Yields of PCR product (μg)	Peak size of PCR product (bp)	QC call rate (%)
1	Pap	tumor	33	26.3	280	370	75.94
		normal	33	7.28	267.2	390	82.86
2	Pap	tumor	23	5.56	310	390	83.42
		normal	23	1.93	307.5	390	80.41
3	Pap	tumor	6	24.1	203.6	489	86.2
		normal	6	5.02	273.3	489	86.5
4	Pap	tumor	15	2.30	191.1	489	89.91
		normal	15	3.39	208.3	489	87.89
5	Pap	tumor	11	7.12	462.3	711	91.93
		normal	11	13.2	433.7	711	89.84
6	PurePC	tumor	54	8.13	206.8	300	75.68
		normal	54	45.7	280.3	242	76.21
7	PurePC	tumor	49	1.51	288.8	404	79.68
		normal	49	75.2	301.3	300	70.75
8	PurePC	tumor	33	11.96	290.5	404	77.2
		normal	33	8.36	209.1	341	79.88
9	PCinv	tumor	30	15.83	210.2	300	71.64
		normal	30	32.2	222.9	300	73.86
10	PCinv	tumor	16	4.92	323.7	341	82.03
		normal	16	3.32	511.4	341	72.57

3-2-2 DNA 抽出と SNP マイクロアレイへのハイブリダイズ

10 μm 厚の薄切 FFPE 標本 10~20 枚から、HE 染色像を参考にして腫瘍部(腫瘍細胞が 90% 以上を占める部位) と非腫瘍部の細胞を削り出した。80%キシレンで脱パラフィンを行った後、100%エタノール 2 回洗浄してキシレンを完全に除去する。エタノールを蒸発させた後、buffer ATL (キアゲン社) 360 μL を加えて 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 分間加熱することにより、ホルマリンによるクロスリンクを解除する。室温に戻した後にプロテアーゼ K を 40 μL 加え、56 $^{\circ}\text{C}$ のオーブンで 3 日間のタンパク分解処理を行う。この際に、24 時間ごとに新鮮なプロテアーゼ K を同量ずつ追加する。

DNA は QIAmp DNA Mini Kit (キアゲン社) を用いて、製品付属のプロトコルに沿って、抽出・精製した。buffer AL 400 μL をタンパク分解処理の終了した試料に加え、70 $^{\circ}\text{C}$ 10 分間インキュベートする。同量の 100%エタノールを加えてよく攪拌した混合液をカラムに添加し、8000 x g で 1 分間遠心分離を行う。buffer AW1 と AW2 で洗浄した後、buffer AE 55 μL で DNA を溶出した。抽出した DNA は分光吸光度計 (NanoDrop ND-1000) で濃度と OD 260/280 比を計測した。

それぞれの検体から抽出した DNA をそれぞれ Affymetrix GeneChip Genome-wide Human 5.0 (SNP5.0) (Affymetrix 社) に、製品付属のプロトコルに沿ってハイブリダイズさせた。FFPE 標本から抽出した DNA は劣化しており高度に断片化が進んでいたため、これまでの知見 (Jacobs et al. 2007, Lyons-Weiler et al. 2008, Thompson et al. 2005) に基づいて以下の様なプロトコルの変更を行った。①使用する DNA の量を 250 ng から 1 μg に増量した。②制限酵素による反応時間を 120 分から over night に延長した。③PCR 産物の量が基準に満たない場合、PCR の反応系を追加した。PCR 産物のピークサイズは 2%アガロースゲルの電気泳動像によるゲル像により決定した。

3-2-3 SNP マイクロアレイのデータ処理

全てのプローブの信号強度及び遺伝子型 (ジェノタイプ) のデータは Genotyping

Console 3.0.1 (Affymetrix 社) の BRLMM-P アルゴリズムを用いて得られた。各実験のハイブリダイゼーションの質的評価は、得られた QC call rate index を元に判定した。

コピー数変化および LOH 解析 (SNP アレイ CGH) は、Partek Genomics Suite (PGS) version 6.3 (Partek 社) を用いて行った。Genotyping Console から得られたデータを入力する際に、各プローブに対応する配列の GC 含有量および断片長を元にした正規化を行った。プローブの信号強度を用いて計算されるコピー数は、同一患者の正常部から抽出した DNA を対照ゲノムとして利用するペア解析によって行った。なぜなら、同程度に劣化した DNA を対照とするため、DNA 品質劣化による増幅効率の偏りを打ち消す効果があるためである。コピー数異常のある領域の検出は、PGS の Copy Number Workflow における segmentation algorithm を用いて行った。ここで用いられたパラメータは、minimum marker size を 150 (既定値 10)、signal/noise ratio 0.25 (既定値 0.30) に設定された。LOH 解析は PGS の LOH Workflow における Hidden Markov Model algorithm を用いて行われた。FFPE から抽出された DNA は断片化が進んでいるため、制限酵素断片長が長い領域に位置する SNP のジェノタイプは不正確である可能性が高い (Jacobs et al. 2007)。そのため、LOH 解析で用いるジェノタイピングデータは、SNP5.0 に搭載されているプローブのなかで *StyI* と *NspI* による制限酵素断片長が 500bp 以下の領域に含まれているものに限って、偏りを制限した。

3-2-4 定量 PCR 解析

SNP アレイ CGH によって検出されたコピー数異常を再評価するために、LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics 社) を用い、SYTO13 (SYBR green I 類似の蛍光色素) のインターカーレーション法による定量 PCR 解析を行った。

解析の対象としたプライマーセットおよび遺伝子は以下のとおりである：ATP-binding cassette, sub-family A, member 5 (ABCA5, Forward; 5' TGCTGTGGTCCCATCAAAC3' Reverse; 5' CATGCCAACACTCGTTCACA3'), G protein-coupled receptor 4 (GPR4, Forward;

5' AGGTGCAGCTGAAGATGCTG3' Reverse; 5' CTGTGGGATGAGAGGGGAAA3'), Frizzled 9 (FZD9, Forward; 5' TGCCCTCTCTGGCTACCTG3' Reverse; 5' GGCACCGTGTAGAGGATGG3'), Snail 1 homolog (SNAI1, Forward; 5' CTAACCAGCTTGGAGGTGGG3' Reverse; 5' AGGGAGGACGTGACTGGTG3')。 内部コントロールとして、全症例の SNP アレイ CGH でコピー数が正常であった、Ornithine decarboxylase antizyme 2 (OAZ2, Forward; 5' CCTTCAGCTTCTGGGCTTT3' Reverse; 5' TGGTCCAGGGGATAAACCAT3') を使用した。

3-2-5 統計解析

ゲノム全体におけるコピー数異常を示した領域の割合（これをコピー数異常率とする）を計算するために、各症例の増加 gain もしくは減少 loss を示した領域の合計 (Mb) をマイクロアレイのプローブでカバーする領域の大きさ 2,829 Mb で除した。同様に、ゲノム全体における染色体構造変化を示した領域の割合（これをゲノム構造変化率とする）を計算するために、コピー数異常を示した領域の合計にコピー数正常な LOH 領域の合計を加えたものを、2,829Mb で除した。良性 (Pap 群) と悪性 (PurePC 群+PCinv 群) および各群におけるコピー数異常率、ゲノム構造変化率の差の検定は、Wilcoxon' s rank sum test あるいは Kruskal-Wallis chi-squared test にて行った。

FFPE 標本から抽出した DNA を用いた SNP アレイ CGH において、どの様な因子が実験の質を左右するのかを検討するため、QC call rate と様々な因子をピアソンの積率相関係数を用いて検定した。上述の統計処理は統計プログラム R (version 2.8.0) を用いて行われ、P 値<0.05 を統計学的有意と定義した。

コピー数が増減している領域に含まれる遺伝子リストの中にどのような働きを持つものが多く含まれているかを検討するために、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を H-InvDB Enrichment Analysis Tool (HEAT) (Yamasaki et al. 2009) にて行った。この解析においては、フィッシャーの正確確率検定による P 値が 0.001 未満の時に統計学的有意と定義した。

3-3 結果

3-3-1 SNP マイクロアレイへのハイブリダイゼーションの評価

FFPE 標本から抽出した DNA を SNP マイクロアレイにハイブリダイズさせて得られた QC call rate は、70.75%から 91.93%、平均 80.72%であった (表 3-2、表 3-3)。PCR 産物のピークサイズと QC call rate の間には有意な正の相関を認め ($r=0.85$, $P<0.0001$)、標本保存期間とは負の相関を認めた ($r=-0.70$, $P<0.006$) (図 3-2)。ゲノム DNA の回収量、ゲノム DNA の 280/260 nm 吸光度比、PCR 産物の回収量とは有意な関連を認めなかった。

3-3-2 SNP アレイ CGH により検出されたゲノム変化と臨床病理学的所見との関連

SNP アレイ CGH によるゲノムワイドコピー数・LOH 解析の結果、乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍のサブグループ間で大きな差異を認めた (図 3-3)。各サブグループ間におけるコピー数異常率の平均は、Pap 群で 0.48% (0.0%から 1.60%)、PurePC 群で 7.89% (0.41%から 12.0%)、PCinv 群で 16.3% (16.0%から 16.6%) であった。同様に各サブグループ間におけるゲノム構造変化率の平均は、Pap 群で 2.87% (0.0%から 11.8%)、PurePC 群で 15.4% (8.83%から 24.1%)、PCinv 群で 35.3% (17.6%から 53.1%) であった (表 3-1)。悪性病変 (PurePC 群 + PCinv 群) は統計学的有意差をもって、良性病変 (Pap 群) より多くのコピー数異常率とゲノム構造変化率を示し (それぞれ $P=0.036$, $P=0.016$) (図 3-4)、良性腫瘍から上皮内癌、浸潤癌と進行するにつれて多くのコピー数異常率とゲノム構造変化率を示していた (それぞれ $P=0.046$, $P=0.043$) (図 3-5)。

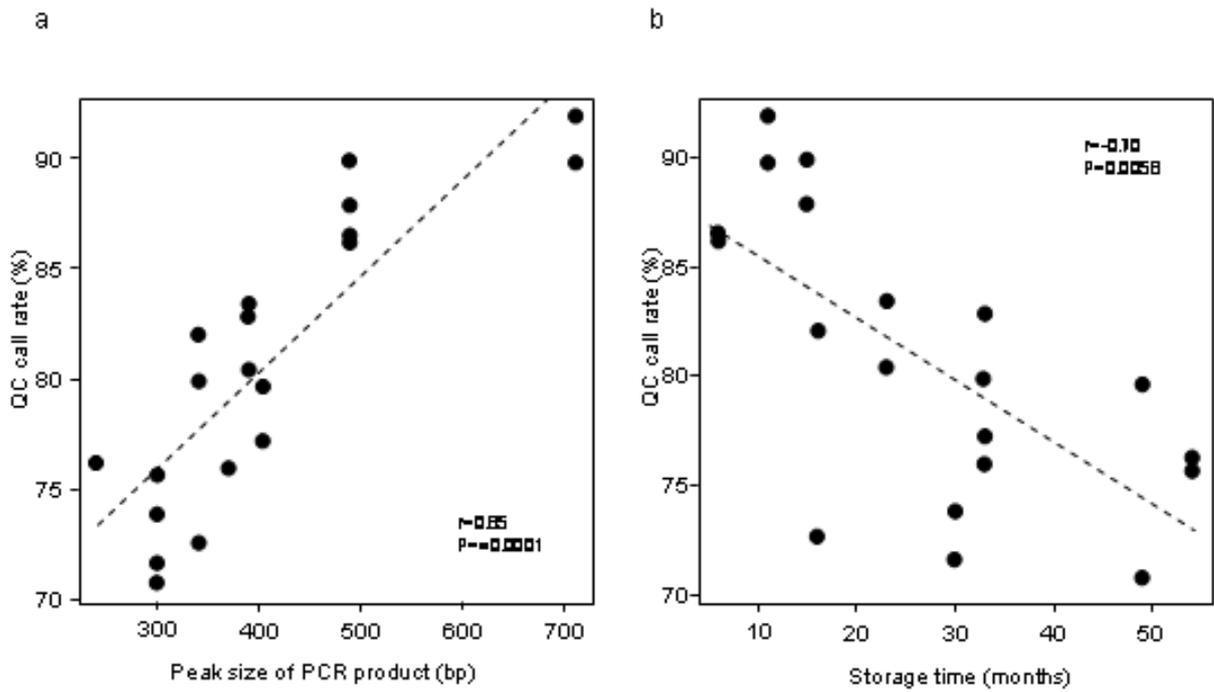


図3-2 QC call rateとPCR産物のピークサイズ (a)、保存期間 (b) の相関

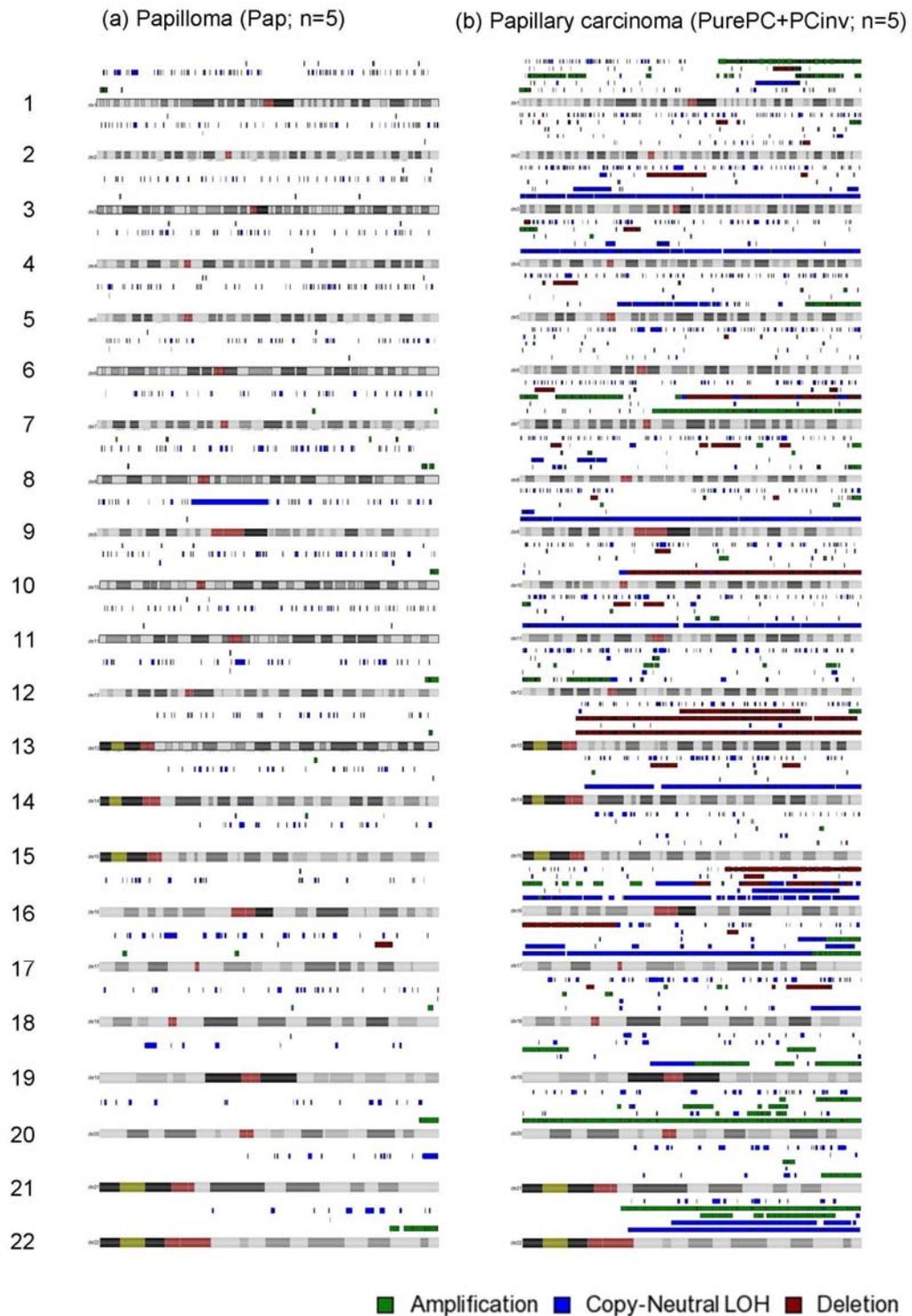


図 3-3 嚢胞内乳頭腫 (a) と嚢胞内乳頭癌 (b) のゲノム変化
 各染色体上部の色付きのカラムは各症例のゲノム変化の種類と領域を表す。緑:Amplification、
 青:コピー数変化の無いLOH、茶:欠失

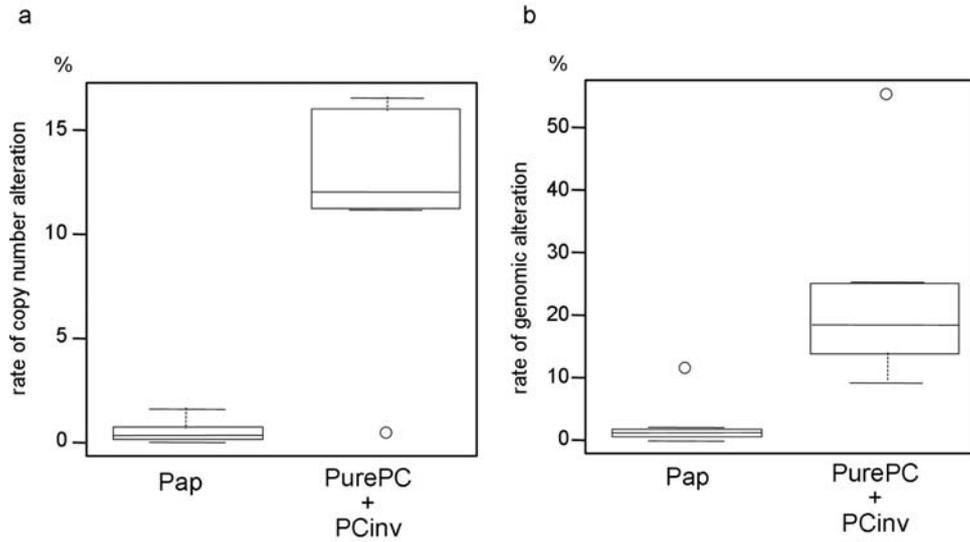


図 3-4 乳頭腫 (Pap) と乳頭癌 (PurePC+PCinv) におけるコピー数変化率 (a) とゲノム構造変化率 (b)

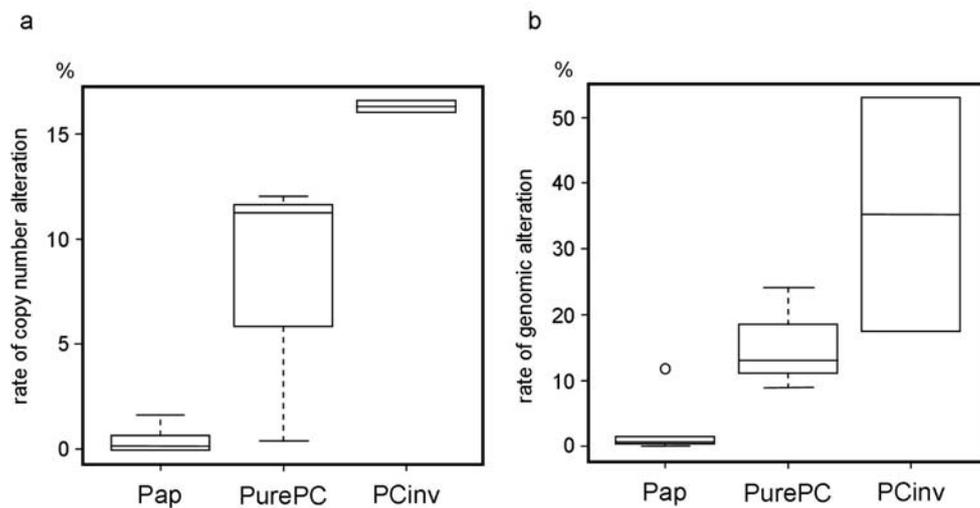


図 3-5 乳頭腫 (Pap)、上皮内乳頭癌 (PurePC)、浸潤を伴う乳頭癌 (PCinv) におけるコピー数変化率 (a) とゲノム構造変化率 (b)

3-3-3 定量 PCR による SNP アレイ CGH によるコピー数解析結果の評価

SNP アレイ CGH によって検出されたコピー数異常を評価するために、4つの遺伝子のコピー数解析を定量 PCR によって行った (表 3-4)。SNP アレイ CGH で認めたコピー数変化は、全て定量 PCR によって確認された。一方、SNP アレイ CGH で変化のなかった 31 箇所のうち、10 箇所の部位 (29.4%) では定量 PCR でコピー数変化を認めた。SNP アレイ CGH と定量 PCR の結果の一致率は 75%であった。悪性病変 (PurePC 群+PCinv 群) における一致率は 73.7%、良性病変 (Pap 群) における一致率は 58.3%であり、両群間に有意な差異は認めなかった (P=0.31)。

3-3-4 複数の乳頭癌で共有されるゲノム変化領域に含まれる遺伝子

悪性病変 (PurePC 群+PCinv 群) の 5 例のうち、3 症例以上で共有されるゲノム変化領域は 93 箇所あった。この中で最も高頻度に共有されている (4 症例以上、 $\geq 80\%$) ゲノム変化領域は 3p21.31, 3p14.2, 20q13.13 の 3 箇所であり、この中には 18 個の RefSeq 遺伝子が含まれていた (表 3-5)。浸潤癌 (PCinv 群) のみで認められるゲノム変化領域には 326 個の RefSeq 遺伝子が存在していたが、これらの遺伝子を GSEA で解析したところ、核酸結合 (GO ID 0000166)、細胞間伝達 (GO ID 0007154)、ATP 結合 (GO ID 0005524) に関わる遺伝子が多く含まれていた (表 3-6)。

表 3-4 SNP アレイ CGH の結果と定量 PCR の結果の比較

Case	ABCA5			GPR4			FZD9			SNAI1		
	aCGH	Light Cycler		aCGH	Light Cycler		aCGH	Light Cycler		aCGH	Light Cycler	
	Copy number state	Relative ratio*	Relative alleles	Copy number state	Relative ratio*	Relative alleles	Copy number state	Relative ratio*	Relative alleles	Copy number state	Relative ratio*	Relative alleles
1	deletion	0.58±0.15	1	diploid	1.33±0.52	3	diploid	1.55±0.23	3	diploid	0.95±0.31	2
2	diploid	0.76±0.17	2	diploid	1.05±0.19	2	diploid	1.16±0.37	2	diploid	0.98±0.48	2
3	diploid	0.87±0.08	2	diploid	1.22±0.10	2	diploid	1.60±0.22	3	diploid	1.11±0.63	2
4	diploid	2.26±1.10	5	diploid	1.45±0.76	3	diploid	0.91±0.48	2	diploid	1.24±0.70	2
5	diploid	1.14±0.16	2	diploid	0.86±0.11	2	diploid	0.80±0.31	2	diploid	0.97±0.13	2
6	diploid	0.97±0.17	2	diploid	1.01±0.12	2	diploid	1.11±0.76	2	diploid	0.96±0.66	2
7	diploid	1.64±1.16	3	diploid	0.52±0.09	1	diploid	0.83±0.17	2	gain	2.55±0.89	5
8	diploid	0.79±0.12	2	diploid	2.40±0.39	5	diploid	2.96±0.57	4	gain	1.56±0.36	3
9	diploid	1.30±0.11	3	gain	4.87±0.38	10	gain	2.87±0.29	5	gain	1.78±0.99	4
10	diploid	1.03±0.32	2	gain	1.86±0.71	4	gain	1.86±0.31	4	gain	2.03±1.07	4

表 3-5 乳頭癌で高度に共有されていた (≥4/5) ゲノム変化領域

Chromosome	Cyto band	Gene symbol	Refseq accession	Description	status
3	p21.31	<i>CACNA2D2</i>	NM_006030.2	calcium channel, voltage-dependent, alpha	Copy-Neutral LOH
3	p21.31	<i>C3orf18</i>	NM_016210	hypothetical protein LOC51161	Copy-Neutral LOH
3	p21.31	<i>HEMK1</i>	NM_016173	HemK methyltransferase family member 1	Copy-Neutral LOH
3	p21.31	<i>CISH</i>	NM_013324	cytokine-inducible SH2-containing protein	Copy-Neutral LOH
3	p21.31	<i>MAPKAPK3</i>	NM_004635	mitogen-activated protein kinase-activated	Copy-Neutral LOH
3	p21.31	<i>DOCK3</i>	NM_004947	dedicator of cytokinesis 3	Copy-Neutral LOH
3	p14.2	<i>FAM3D</i>	NM_138805	family with sequence similarity 3, member D	Copy-Neutral LOH
20	q13.13	<i>KCNB1</i>	NM_004975	potassium voltage-gated channel, Shab-related	Amplification
20	q13.13	<i>B4GALT5</i>	NM_004776	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-	Amplification
20	q13.13	<i>SPATA2</i>	NM_006038	spermatogenesis associated 2	Amplification
20	q13.13	<i>UBE2V1</i>	NM_022442	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	Amplification
20	q13.13	<i>TMEM189-UBE2V1</i>	NM_199203	TMEM189-UBE2V1 readthrough transcript isoform 1	Amplification
20	q13.13	<i>TMEM189</i>	NM_199129	transmembrane protein 189	Amplification
20	q13.13	<i>SNAI1</i>	NM_005985	snail 1 homolog	Amplification
20	q13.13	<i>PTGIS</i>	NM_000961	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	Amplification
20	q13.13	<i>RNF114</i>	NM_018683	zinc finger protein 313	Amplification
20	q13.13	<i>SLC9A8</i>	NM_015266	sodium/hydrogen exchanger 8	Amplification
20	q13.13	<i>CEBPB</i>	NM_005194	CCAAT/enhancer binding protein beta	Amplification

表 3-6 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) の結果

GO ID*	Name	Gene Symbol	P-value
0000166	nucleotide binding	<i>RBM12, INTS6, ARL11, DMPK, RASL11A, ABCA6, STK10, PMS2L3, PABPC3, CPNE1, MYH7B, RBM39, CHD5, TRPC4AP, CDK8, TUBA3C, ATP7B, RAP2A, GSS, MYLK2, DOCK9, ACSS2, SEPT9, ABCA8, RFC3, RAC3, HCK, EIF4H, ATP8A2, LIMK1, KIF3B, ABCA9, THOC4, TPX2, RAGE, NCF1, C20orf112, ELN, MAP2K6, GTF2F2, DUS1L, RFC2</i>	0.000320
0007154	cell communication	<i>FREM2, NCF1, SH3PXD2B, SNX5</i>	0.000700
0005524	ATP binding	<i>INTS6, ATP6V0E1, CHD5, TRPC4AP, ATP7B, ABCA8, ATP8A2</i>	0.000799
0035091	phosphoinositide binding	<i>PIGU, SNX5, NCF1, SH3PXD2B,</i>	0.00100
0005737	cytoplasm	<i>ACOT7, ACSS2, ARHGDI1, BNIP1, C1QTNF9, CANX, DSTN, ELN, EPB41L1, ERRF1, HGS, KCNAB2, KPN A3, LIMK1, NDRG3, PABPC3, PARK7, POFUT1, RAGE, RCBTB1, RUFY1, SEPT9, SLA2, SYMPK, TPP2, TPT1,</i>	0.00428
0005525	GTP binding	<i>TPX2, NCF1, C20orf112, ELN, ARL11, RASL11A, TUBA3C, RAP2A, DOCK9, SEPT9, RAC3</i>	0.00517
0017111	nucleoside-triphosphatase activity	<i>ABCA9, NCF1, RFC2, INTS6, ATP6V0E1, ABCA6, CHD5, TRPC4AP, TUBA3C, ATP7B, RAP2A, SEPT9, ABCA8, RFC3, RAC3, ATP8A2</i>	0.00524
0005242	inward rectifier potassium channel activity	<i>KCNJ16, KCNJ2</i>	0.00676
0007264	small GTPase mediated signal transduction	<i>ARL11, RAC3, RALGPS1, RAP2A, RASL11A, RIN2</i>	0.00716

*: GO ID: the ID assigned in the Gene Ontology project (<http://www.geneontology.org/>)

3-4 考察

本研究では SNP アレイ CGH という新規の実験手法を用いて、乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍の細胞遺伝学的プロファイルを明らかにした。今回の結果から、本疾患の良性病変もある程度のゲノム変化を認めるが、悪性病変の方がより多くのゲノム変化を有することが明らかになった。これまでの FISH および CGH によるコピー数解析やマイクロサテライトマーカーを用いた LOH 解析が限定された領域の変化しか検出できないのに対し、我々の用いた手法はゲノムワイドに変化を検出することが可能であった。

FFPE 標本から抽出された劣化した DNA を利用したため、得られた QC call rate は高品質な DNA を利用した場合と比べて低かった。そのため、DNA の質による影響を抑える目的でペア解析を行い、ゲノム変化検出の際に確実な所のみを選択する条件を設定した。定量 PCR による解析との比較では、感度は劣るものの高い特異度を示した。また、各サブグループにおける感度・特異度には有意な差は認めず、今回の良悪性病変における差異は実験上の問題に起因するものではないと考えられる。

これまでの本疾患の細胞遺伝学的研究では、乳頭癌は 1p の増幅および 16q の欠失または LOH が高頻度に見られると報告されていた (Di Cristofano et al. 2005, Tsuda et al. 1997, Tsuda et al. 2001, Lininger et al. 1998)。本研究でもそれらの変化は高頻度に認められたが、より高頻度に見られる変化として 3p21.31 と 3p14.2 のコピー数が正常な LOH と、20q13.13 の増幅が明らかになった。興味深いことに、このプロファイルは予後良好な乳癌というよりは予後不良な乳癌のものに近い (Boecker et al. 2001)。また、嚢胞内乳頭癌でも浸潤を伴うものに特異的なゲノム変化領域に存在する遺伝子は、核酸への結合や細胞内シグナル伝達に関わるものが多いことが GSEA の結果明らかになった。これらの生物学的意義については、今後さらなる検討を進めていかなければならない。

第4章 総括と今後の展望

本稿においては、第 1 章で乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍の実地臨床における問題点、乳腺腫瘍におけるゲノム不安定性の意義、それに対する新しい解析ツールとして高密度 SNP マイクロアレイとその限界、及びこの研究の目的について簡単に紹介した。

第 2 章では劣化した DNA を高密度 SNP マイクロアレイに適用した例として、爪から抽出した DNA を用いた、家族性脳 AVM 家系のゲノムワイド連鎖解析の経験を提示した。適切な抽出プロトコルを用いて可及的に高品質なゲノム DNA を抽出する事により、また、得られた結果から実験上の影響を除くようにデータ処理を行うことによって、爪試料を使ったゲノムワイド連鎖解析は可能であった。これは世界で初めての試みである。SNP マイクロアレイを用いたゲノムワイド連鎖解析は疾患関連遺伝子の同定について非常に有用な手法であるが、検出力を高めるためには発端者以外の親族の研究への参加が重要な鍵となる。しかし、遠方の居住や既に他界しているなどで末梢血細胞等の試料が得られないことは良く経験される。その様な時に、郵便で簡便に送付する事ができ、常温で長期間保存が可能な爪や髪の利用は非常に有用であると考えられる。これまで末梢血試料の入手困難により断念されていた、希少な家族性疾患への適応および新規疾患責任遺伝子の発見を期待したい。

第 3 章では乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍における、FFPE 標本から抽出した DNA を用いた、高密度 SNP マイクロアレイによるゲノムワイドコピー数/LOH 解析の経験を提示した。得られたアレイ CGH の結果は高品質な DNA を用いた場合と比べるとノイズの多いものであった。しかし、同一の FFPE ブロック内の正常組織 DNA を対照ゲノムとして用いる事、即ち同程度に劣化した DNA を対照として DNA 品質の偏りによる増幅効率の偏りの影響を打ち消す事と、得られたデータの統計処理により、ノイズの多い結果の中からも有用な情報を抽出することが可能であった。その結果、ゲノム不安定性の観点からは、乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍の乳頭癌はたとえ上皮内癌であったとしても、良性乳頭腫と大きな違いがあることが明らかになった。これらの知見から、生検標本を用いたコピー数・LOH 解析によって術前に

良悪性の診断が可能になり、不必要な外科的介入が避けられる可能性が示唆された。さらに、膨大なアーカイブとして保存されている FFPE 標本を活用することにより、その他の組織型・癌腫についても、マイクロアレイを用いたゲノム不安定性の定量的な解析が可能となり、癌の予後因子・治療効果予測因子の発見に貢献するものと思われる。

本研究のテーマに乳腺嚢胞内乳頭状腫瘍を選んだのは、一乳腺外科医としてこの腫瘍の取扱いに悩み、興味を持ったためである。熟練した病理医による、切除標本の診断によって乳頭癌か乳頭腫か判断されるが、専門でない外科医の目には同じように見えてしまう。そのような症例においても、アレイ CGH という最新のツールを用いた細胞遺伝学的解析は、誰が見ても分かる様な差を明らかにした。これは私にとって驚きであった。臨床の現場にはたくさん「なぜ？」が溢れているが、その多くは放置されたままである。しかし、その中には大きな発見に繋がる研究の種が含まれているはずである。一方で、科学技術の進歩は日進月歩であり、以前には不可能と考えられていたことが数年後には可能となり一般化される。臨床家としては、現在の基礎研究で何が分かっている、どの様な解析が可能であるのかを常に意識しつつ、日々の臨床で遭遇する「なぜ？」を吟味して研究に繋げていく努力が必要であると思う。このような地道な研究が将来のトランスレーショナルリサーチに繋がっていくものとする。

謝辞

本研究に参加頂いた患者および患者家族の皆様に深謝いたします。

医学生時代に留年して時間を持て余していた時に、中野基先生（現・佐世保市立総合病院形成外科医長）と近藤新二先生（現・長崎大学大学院薬物治療学分野准教授）に声をかけて頂いたお蔭で遺伝学の世界を知ることができました。本当に有難うございました。その時から現在に至るまで新川詔夫先生（前・長崎大学大学院人類遺伝学教授、現・北海道医療大学学長）には公私にわたって多大なご助力を頂き、大変感謝いたしております。大学院に入学してからは、吉浦孝一郎先生（長崎大学大学院人類遺伝学教室教授）と木下晃先生（長崎大学人類遺伝学教室助教）に何から何までご指導いただきました。深甚の謝意を捧げます。近藤達郎先生（現・みさかえの園むつみの家診療部長）と国場英雄先生（現・長崎大学小児科助教）のご厚意により、家族性脳動脈奇形の連鎖解析を行うことができました。ありがとうございました。人類遺伝学教室での研究を許可していただいた永安武先生（長崎大学腫瘍外科教授）と貴重な症例を提供していただいた矢野洋先生（長崎大学腫瘍外科助教）には大変感謝しております。大学院生の先生方、技術職員の大鋸美穂さん、林田知佐さん、川道麻衣子さん、前受付の森祥子さんには種々の場面で大変お世話になりました。有難うございました。

引用文献

- Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR (2002) Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30:97-101
- Andre F, Job B, Dessen P, Tordai A, Michiels S, Liedtke C, Richon C, Yan K, Wang B, Vassal G, Delaloge S, Hortobagyi GN, Symmans WF, Lazar V, Pusztai L (2009) Molecular characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. *Clin Cancer Res* 15:441-451
- Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E (2005) Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 76:42-51
- Boecker W, Buerger H, Schmitz K, Ellis IA, van Diest PJ, Sinn HP, Geradts J, Diallo R, Poremba C, Herbst H (2001) Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns. *J Pathol* 195:415-421
- Boon LM, Mulliken JB, Vikkula M (2005) RASA1: variable phenotype with capillary and arteriovenous malformations. *Curr Opin Genet Dev* 15:265-269
- Crawford PM, West CR, Chadwick DW, Shaw MD (1986) Arteriovenous malformations of the brain: natural history in unoperated patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49:1-10
- Denier C, Goutagny S, Labauge P, Krivosic V, Arnoult M, Cousin A, Benabid AL, Comoy J, Frerebeau P, Gilbert B, Houtteville JP, Jan M, Lapierre F, Loiseau H, Menei P, Mercier P, Moreau JJ, Nivelon-Chevallier A, Parker F, Redondo AM, Scarabin JM, Tremoulet M, Zerah M, Maciazek J, Tournier-Lasserre E (2004) Mutations within the MGC4607 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 74:326-337
- Di Cristofano C, Mrad K, Zavaglia K, Bertacca G, Aretini P, Cipollini G, Bevilacqua G, Ben Romdhane K, Cavazzana A (2005) Papillary lesions of the breast: a molecular progression? *Breast Cancer Res Treat* 90:71-76

- Douglas-Jones AG, Verghese A (2002) Diagnostic difficulty arising from displaced epithelium after core biopsy in intracystic papillary lesions of the breast. *J Clin Pathol* 55:780-783
- Fayanju OM, Ritter J, Gillanders WE, Eberlein TJ, Dietz JR, Aft R, Margenthaler JA (2007) Therapeutic management of intracystic papillary carcinoma of the breast: the roles of radiation and endocrine therapy. *Am J Surg* 194:497-500
- Fleetwood IG, Steinberg GK (2002) Arteriovenous malformations. *Lancet* 359:863-873
- Fridlyand J, Snijders AM, Ylstra B, Li H, Olshen A, Segraves R, Dairkee S, Tokuyasu T, Ljung BM, Jain AN, McLennan J, Ziegler J, Chin K, Devries S, Feiler H, Gray JW, Waldman F, Pinkel D, Albertson DG (2006) Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6:96
- Grabowski J, Salzstein SL, Sadler GR, Blair S (2008) Intracystic papillary carcinoma: a review of 917 cases. *Cancer* 113:916-920
- Hashimoto T, Lawton MT, Wen G, Yang GY, Chaly T, Jr., Stewart CL, Dressman HK, Barbaro NM, Marchuk DA, Young WL (2004) Gene microarray analysis of human brain arteriovenous malformations. *Neurosurgery* 54:410-423; discussion 423-415
- Horton JC (2007) Arteriovenous malformations of the brain. *N Engl J Med* 357:1774-1775; author reply 1775
- Hu X, Stern HM, Ge L, O'Brien C, Haydu L, Honchell CD, Haverty PM, Peters BA, Wu TD, Amler LC, Chant J, Stokoe D, Lackner MR, Cavet G (2009) Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. *Mol Cancer Res* 7:511-522
- Inoue S, Liu W, Inoue K, Mineharu Y, Takenaka K, Yamakawa H, Abe M, Jafar JJ, Herzig R, Koizumi A (2007) Combination of linkage and association studies for brain arteriovenous malformation. *Stroke* 38:1368-1370
- Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, Ogawa S, Bailey DK, Campbell IG (2007) Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res* 67:2544-2551
- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M,

- Pericak-Vance MA, Diamond A, Guttmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME, Marchuk DA (1996) Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 13:189-195
- Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, Marechal E, Joutel A, Bach JF, Tournier-Lasserre E (1999) Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet* 23:189-193
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J (1984) Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3443-3446
- Limaye N, Boon LM, Vikkula M (2009) From germline towards somatic mutations in the pathophysiology of vascular anomalies. *Hum Mol Genet* 18:R65-74
- Lininger RA, Park WS, Man YG, Pham T, MacGrogan G, Zhuang Z, Tavassoli FA (1998) LOH at 16p13 is a novel chromosomal alteration detected in benign and malignant microdissected papillary neoplasms of the breast. *Hum Pathol* 29:1113-1118
- Loo LW, Ton C, Wang YW, Grove DI, Bouzek H, Vartanian N, Lin MG, Yuan X, Lawton TL, Daling JR, Malone KE, Li CI, Hsu L, Porter PL (2008) Differential patterns of allelic loss in estrogen receptor-positive infiltrating lobular and ductal breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 47:1049-1066
- Lu YJ, Birdsall S, Osin P, Gusterson B, Shipley J (1997) Phyllodes tumors of the breast analyzed by comparative genomic hybridization and association of increased 1q copy number with stromal overgrowth and recurrence. *Genes Chromosomes Cancer* 20:275-281
- Lyons-Weiler M, Hagenkord J, Sciulli C, Dhir R, Monzon FA (2008) Optimization of the Affymetrix GeneChip Mapping 10K 2.0 Assay for routine clinical use on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 17:3-13
- Matsuzawa N, Shimozato K, Natsume N, Niikawa N, Yoshiura K (2006) A novel missense mutation in Van der Woude syndrome: usefulness of fingernail DNA for genetic analysis. *J Dent Res* 85:1143-1146
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold

- EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. (1994) Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8:345-351
- Melchor L, Honrado E, Garcia MJ, Alvarez S, Palacios J, Osorio A, Nathanson KL, Benitez J (2008) Distinct genomic aberration patterns are found in familial breast cancer associated with different immunohistochemical subtypes. *Oncogene* 27:3165-3175
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F (2004) Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat Genet* 36:331-334
- Mulligan AM, O'Malley FP (2007) Metastatic potential of encapsulated (intracystic) papillary carcinoma of the breast: a report of 2 cases with axillary lymph node micrometastases. *Int J Surg Pathol* 15:143-147
- Nakashima M, Nakano M, Hirano A, Kishino T, Kondoh S, Miwa N, Niikawa N, Yoshiura K (2008) Genome-wide linkage analysis and mutation analysis of hereditary congenital blepharoptosis in a Japanese family. *J Hum Genet* 53:34-41
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:220-228
- Okita R, Ohsumi S, Takashima S, Saeki T, Aogi K, Nishimura R (2005) Synchronous liver metastases of intracystic papillary carcinoma with invasion of the breast. *Breast Cancer* 12:327-330
- Reis-Filho JS, Simpson PT, Gale T, Lakhani SR (2005) The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization. *Pathol Res Pract* 201:713-725
- Revenu N, Boon LM, Mulliken JB, Enjolras O, Cordisco MR, Burrows PE, Clapuyt P, et al. (2008) Parkes Weber syndrome, vein of Galen aneurysmal malformation, and other fast-flow vascular anomalies are caused by RASA1 mutations. *Hum Mutat* 29:959-965
- Sasahara A, Kasuya H, Akagawa H, Ujiie H, Kubo O, Sasaki T, Onda H, Sakamoto Y, Krischek B, Hori T, Inoue I (2007) Increased expression of ephrin A1 in brain arteriovenous malformation: DNA microarray analysis. *Neurosurg Rev* 30:299-305; discussion 305

- Solorzano CC, Middleton LP, Hunt KK, Mirza N, Meric F, Kuerer HM, Ross MI, Ames FC, Feig BW, Pollock RE, Singletary SE, Babiera G (2002) Treatment and outcome of patients with intracystic papillary carcinoma of the breast. *Am J Surg* 184:364-368
- Suphapeetiporn K, Kongkam P, Tantivatana J, Sinthuwiwat T, Tongkobpetch S, Shotelersuk V (2006) PTEN c.511C>T nonsense mutation in a BRRS family disrupts a potential exonic splicing enhancer and causes exon skipping. *Jpn J Clin Oncol* 36:814-821
- Sure U, Battenberg E, Dempfle A, Tirakotai W, Bien S, Bertalanffy H (2004) Hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor are expressed more frequently in embolized than in nonembolized cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery* 55:663-669
- Takenaka K, Inoue S, Liu W, Inoue K, Mineharu Y, Yamakawa H, Abe M, Jafar JJ, Herzig R, Kitajima H, Hayashi K, Koizumi A (2007) Linkage studies for familial arteriovenous malformation in the Takayama community. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27
- Thompson ER, Herbert SC, Forrest SM, Campbell IG (2005) Whole genome SNP arrays using DNA derived from formalin-fixed, paraffin-embedded ovarian tumor tissue. *Hum Mutat* 26:384-389
- Tsuda H, Takarabe T, Akashi-Tanaka S, Fukutomi T, Hirohashi S (2001) Pattern of chromosome 16q loss differs between an atypical proliferative lesion and an intraductal or invasive ductal carcinoma occurring subsequently in the same area of the breast. *Mod Pathol* 14:382-388
- Tsuda H, Takarabe T, Susumu N, Inazawa J, Okada S, Hirohashi S (1997) Detection of numerical and structural alterations and fusion of chromosomes 16 and 1 in low-grade papillary breast carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 151:1027-1034
- Van Beijnum J, Van Der Worp HB, Schippers HM, Van Nieuwenhuizen O, Kappelle LJ, Rinkel GJE, Van Der Berkelbach Sprenkel JW, Klijn CJM (2007) Familial occurrence of brain arteriovenous malformations: A systematic review. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 78:1213-1217
- Wang ZC, Buraimoh A, Iglehart JD, Richardson AL (2006) Genome-wide analysis for loss of

heterozygosity in primary and recurrent phyllodes tumor and fibroadenoma of breast using single nucleotide polymorphism arrays. *Breast Cancer Res Treat* 97:301-309

Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, Ogawa S (2007) Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet* 81:114-126

Yamasaki C, Murakami K, Takeda J, Sato Y, Noda A, Sakate R, Habara T, Nakaoka H, Todokoro F, Matsuya A, Imanishi T, Gojobori T H-InvDB in 2009: extended database and data mining resources for human genes and transcripts. *Nucleic Acids Res* 38:D626-632

Zhao X, Li C, Paez JG, Chin K, Janne PA, Chen TH, Girard L, Minna J, Christiani D, Leo C, Gray JW, Sellers WR, Meyerson M (2004) An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 64:3060-3071



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medical Genetics

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmg>



Original article

Familial brain arteriovenous malformation maps to 5p13–q14, 15q11–q13 or 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA on high-density SNP array

Masahiro Oikawa^{a,b}, Hideo Kuniba^{a,c}, Tatsuro Kondoh^d, Akira Kinoshita^{a,f}, Takeshi Nagayasu^b, Norio Niikawa^{e,f}, Koh-ichiro Yoshiura^{a,f,*}

^aDepartments of Human Genetics, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

^bDepartments of Surgical Oncology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

^cDepartments of Pediatrics, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

^dDivision for Developmental Disabilities, The Mutsumi House, Misakaenosono Institute for Persons with Severe Intellectual/Motor Disabilities, Konagai-Cho, Japan

^eResearch Institute of Personalized Health Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, Tobetsu, Japan

^fSolution Oriented Research for Science and Technology (SORST), Japan Science and Technology Agency (JST), Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2010

Accepted 11 June 2010

Available online 22 June 2010

Keywords:

Arteriovenous malformation

Genomewide linkage analysis

Fingernail DNA

Mutation search

GeneChip™

ABSTRACT

Familial arteriovenous malformations (AVM) in the brain is a very rare disease. It is defined as its occurrence in two or more relatives (up to third-degree relatives) in a family without any associated disorders, such as hereditary hemorrhagic telangiectasia. We encountered a Japanese family with brain AVM in which four affected members in four successive generations were observed. One DNA sample extracted from leukocytes of the proband and ten DNA samples from clipped finger nails of other members were available. A genome-wide linkage analysis was performed on this pedigree using Affymetrix GeneChip 10K 2.0 Xba Array and MERLIN software. We obtained sufficient performance of SNP genotyping in the fingernail samples with the mean SNP call rate of 92.49%, and identified 18 regions with positive LOD scores. Haplotype and linkage analyses with microsatellite markers at these regions confirmed three possible disease-responsible regions, i.e., 5p13.2–q14.1, 15q11.2–q13.1 and 18p11.32–p11.22. Sequence analysis was conducted for ten selected candidate genes at 5p13.2–q14.1, such as *MAP3K1*, *DAB2*, *OCN1*, *FGF10*, *ESM1*, *ITGA1*, *ITGA2*, *EGFLAM*, *ERBB2IP*, and *PIK3R1*, but no causative genetic alteration was detected. This is the first experience of adoption of fingernail DNA to genome-wide, high-density SNP microarray analysis, showing candidate brain AVM susceptible regions.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Arteriovenous malformation (AVM) in the brain is a disease defined by the presence of arteriovenous shunt(s) through a nidus of coiled and tortuous vascular connections between feeding arteries and draining veins within the brain parenchyma [10]. This vascular malformation is thought to be congenital, and develops before or after birth [7] from a residual of the primitive artery–vein connection. Its most common symptom is intracranial hemorrhage with an estimated risk of 1.3–3.9% yearly after the diagnosis of AVM [4]. Other signs may include intractable seizures, headache and ischemic steal syndrome. The prevalence of AVM is estimated to be approximately 0.01% and the detection rate ranges between 1.12 and 1.34

per 100,000 person years [7,10]. Although most cases of AVM are sporadic, a total of 53 patients from 25 families have been reported [27]. Familial brain AVM is defined when it occurs in two or more relatives (up to third-degree relative) in a family without associated disorders such as hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), is autosomal dominant multisystemic vascular dysplasia [9,27]. It is plausible that familial cases are more frequent and could be overlooked because of asymptomatic conditions in other relatives.

Although several causative genes have been elucidated in some heritable syndromic AVM [2,3,5,6,12,13,17,20,21,23,26], molecular genetic studies of familial or sporadic AVM remain scant. HHT type 1 (HHT1) and HHT type 2 (HHT2) are known to be caused by mutations in *ENG* at 9q34.11 and *ACVRL1* (or *ALK1*) at 12q13.13, respectively [12,17]. Mutations in *RASA1* at 5q14.3 cause capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM) [3,6,20,21,26] characterized by small, round-to-oval, pink-red and multiple CM: one-third of CV-AVM patients also has fast-flow lesions such as AVM. Mutations in *PTEN* have been implicated in *PTEN* hamartoma tumor syndromes including Bannayan–Riley–Ruvalcaba syndrome, in which AVM

* Corresponding author. Department of Human Genetics, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Sakamoto 1-12-4, Nagasaki 852-8523, Japan. Tel.: +81 95 819 7118; fax: +81 95 819 7121.

E-mail address: kyoshi@nagasaki-u.ac.jp (K. Yoshiura).

occasionally presents [23]. Three genes, *KIRIT1* (*CCM1*) [13] at 7q21.2, *MGC4607* (*CCM2*) [5] at 7p13 and *PDCD10* (*CCM3*) [2] at 3q26.1, are responsible for cerebral cavernous malformation (hamartomatous vascular malformations). On the other hand, regarding familial AVM, only two linkage analyses using 6 small families have been published by a research group [11,25], showing seven possible disease-responsible regions, i.e., 6q25 with the highest LOD score, 3p27, 4q34, 7p21, 13q32–q33, 16p13–q12 and 20q11–q13, but failed to identify the causative mutation. In sporadic brain AVM, microarray study showed that the *VEGFA*, *ITGA5*, *ENG* and *MMP9* genes that may involve vascular development or maintenance, are highly expressed in AVM compared with normal brain parenchyma [8,22,24].

Here we report results of a genome-wide linkage analysis on an AVM family with four affected members in two successive generations.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

A Japanese family consisting of 19 members across four generations included two patients with brain AVM, one patient with

pulmonary AVM and one patient with both brain and pulmonary AVM (Fig. 1). The proband (III-3) first exhibited intractable epilepsy at 13 years old and was diagnosed by magnetic resonance imaging (MRI) as having a brain AVM of 2 cm in diameter located in the right frontal lobe (Fig. 2). Chest X-ray at the first visit detected a nodular shadow in the right lower lung field, and a diagnoses of pulmonary AVM with a 24% of shunt-rate was made following angiogram made (Fig. 2). This was resected when the proband was 14 years old. The proband's brain AVM was treated by gamma knife surgery when she was 19 years old, followed by treatment with antiepileptic medication. Her mother (II-3) died of intracranial hemorrhage due to brain AVM, and the maternal grandfather (I-1) died of a cancer. Another patient (III-5) had asymptomatic brain AVM, which was accidentally diagnosed by MRI. His father (II-5) had pulmonary AVM instead of brain AVM. These four members were assigned to "affected", six members (II-6, III-1, III-6, III-7, IV-1, and IV-2) without AVM confirmed by MRI were "unaffected", and the remaining three (I-2, II-1, and IV-3) who were not assessed by MRI but had neither past history of recurrent epistaxis or gastrointestinal tract bleedings were "unknown". None of the members had any AVM-related diseases, such as HHT. Evaluation of cutaneous

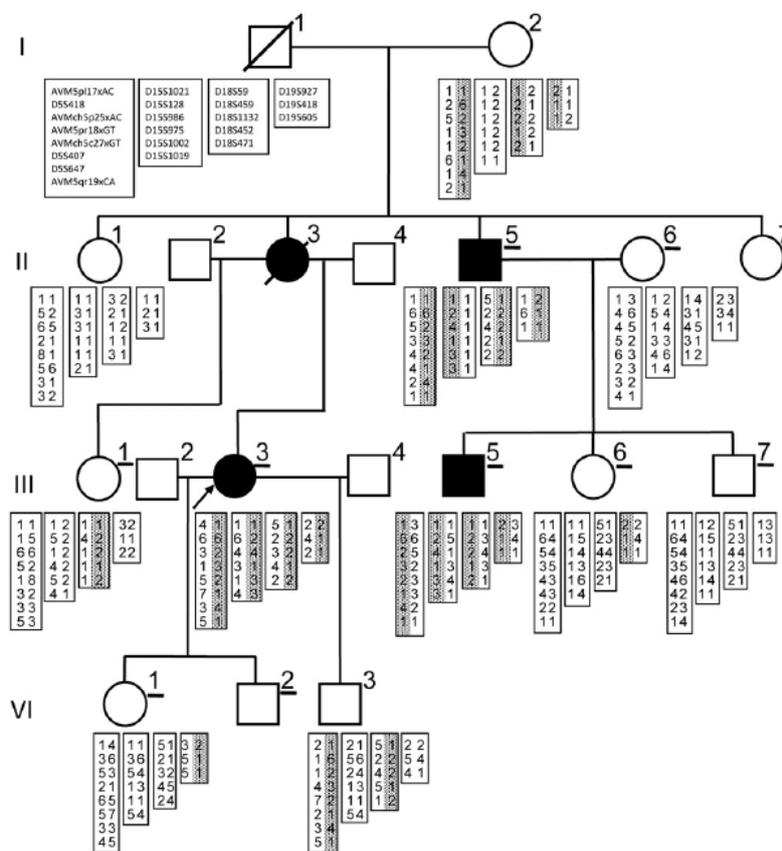


Fig. 1. Results of haplotype analysis at polymorphic loci in four regions, 5q13.2–q14.1, 15q11.2–q13.1, 18p11.32–p11.22 and 19q13.3–q13.42. Underlined individuals indicate those examined by MRI, and DNA was unavailable from individuals without haplotypes. Polymorphic alleles are numbered and candidate disease-associated haplotypes are shown by dotted boxes. Primer sequences designed for CA repeat amplification are available in Supplementary Table.

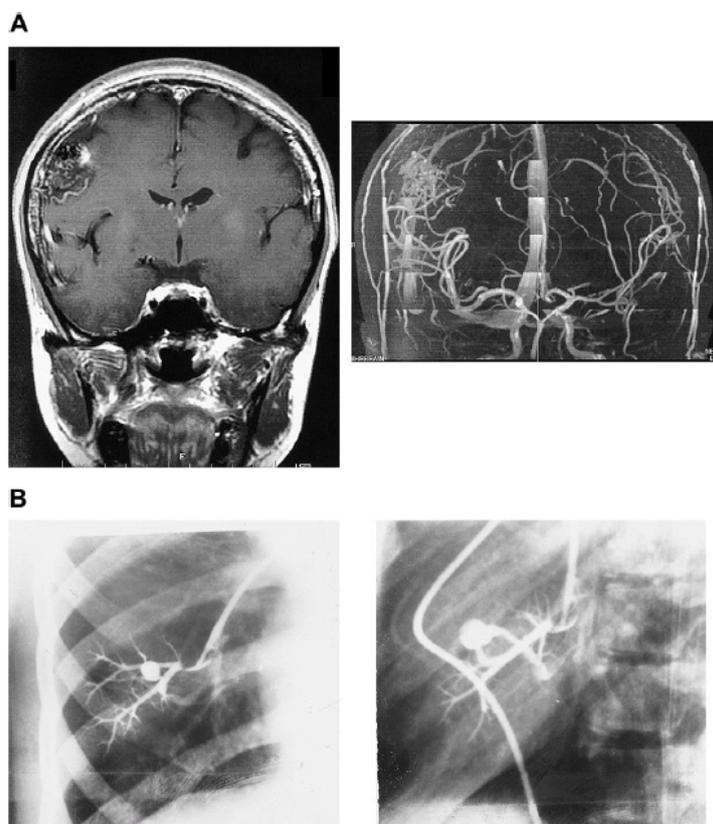


Fig. 2. Imaging of the brain and pulmonary AVM in the proband. (A) MRI scan and MR angiogram of the proband. The AVM is located right frontal lobe measured 2.0×1.3 cm. (B) Pulmonary angiograms of the proband. The pulmonary AVM is located in the right lower lobe (r6S8b) with 24% of shunt-rate.

lesions was conducted by examination of the proband and by detailed interview of the other family members by the proband and her sister (III-1), who is nurse. A total of 13 members participated in this study under informed consent. All experimental procedures for this study were approved by Committee for the Ethical Issues on Human Genome and Gene Analysis in Nagasaki University.

2.2. DNA extraction

As a blood sample was available only from the proband, clipped fingernail samples were obtained from 10 of the other 12 members instead. Genomic DNA was extracted from the fingernails using a buffer solution containing urea, DDT and proteinase K, as reported previously [16,18]. Briefly, clipped fingernails were once frozen in liquid nitrogen and crushed into fine powder using Multi-beads Shocker™ (Yasui Kikai, Osaka, Japan). The nail powder was lysed in a urea-lysis solution (2 M urea; 0.5% SDS; 10 mM Tris–HCl, pH 7.5; 0.1 M EDTA) containing 1 mg/ml proteinase K and 40 mM DDT at 55 °C overnight. Nail DNA was extracted with phenol/chloroform, and precipitated with ethanol and sodium acetate. Precipitated nail DNA was dissolved again in extraction buffer (0.5% SDS; 10 mM Tris–HCl, pH 7.5; 0.1 M EDTA) containing 1 mg/ml proteinase K, and

incubated at 55 °C overnight. DNA was purified again as above, and was suspended in 30 μ l of $1 \times$ TE buffer.

2.3. SNP genotyping with Affymetrix 10K 2.0 array

Blood DNA (250 ng) was processed according to the standard protocol provided by the GeneChip Mapping 10K Xba Assay Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA). Fingernail DNA was processed in a similar manner but with the two following modifications to adapt to the oligonucleotide microarray system [15]. Prolongation of digestion time from 120 min as the standard protocol to overnight; and increase of the PCR cycle number from 35 to 45 cycles. Data acquired from the Affymetrix GeneChip Operating System were analyzed using the Affymetrix GeneChip Genotyping Analysis Software (GTYPE) 4.0 to call genotypes.

2.4. Linkage analysis with SNP-genotype data and haplotype analysis with microsatellite markers

Multipoint LOD scores were calculated using MERLIN software [1], under an assumption that AVM in the family is transmitted in an autosomal dominant mode with reduced penetrance ($p = 0.9$)

and with the disease allele frequency of 0.001. At loci with a positive LOD score by the GeneChip genotyping, possibly disease-associated haplotypes were constructed using SNP calls.

When SNP information was not informative, microsatellite markers were used for genotyping. Microsatellite markers used were referred to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. One each of primer pairs for the markers was labeled with FAM, HEX, or NED (Supplementary Table 1), and PCR was performed in a 10 μ l mixture containing 5 ng genomic DNA; 0.25 U ExTaq DNA polymerase HS-version (TAKARA Bio Inc., Kyoto, Japan); 200 μ M dNTP; 0.5 μ M primer; 1 \times ExTaq buffer on the T1 Thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany). PCR products were separated on Genetic Analyzer 3130xl (AppliedBiosystems), and genotyping was carried out using GeneMapper software (AppliedBiosystems). At the regions where the affected individuals have a disease-associated haplotype, two-point LOD score was calculated by MLINK program (included in FASTLINK software version 4.0P) [14].

2.5. Mutation analysis

Some genes located within candidate regions identified by the linkage analysis were selected for further mutation analysis. A few other genes, albeit outside the regions, were also subjected to mutation analysis. Primer pairs for such genes were designed using Primer3-web 0.3.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), according to their genomic sequences retrieved from the University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser Home (<http://genome.cse.ucsc.edu/>). PCR was carried out in a 15 μ l reaction mixture containing 5 ng DNA; 0.25 U ExTaq DNA polymerase HS version; 200 mM dNTP; 0.5 μ M each primer; 1 \times ExTaq buffer on the T1 Thermocycler. PCR products were subjected to direct sequencing, using BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (AppliedBiosystems) and Genetic Analyzer 3130xl. Electropherograms of sequences were aligned with ATGC software (GENETYX Corp., Tokyo, Japan) to inspect base alterations.

2.6. Search for genomic aberration

To search for copy number change within the candidate loci identified by linkage analysis, we used Affymetrix[®] Genome-Wide Human SNP Array 5.0 (920,568 probes; Affymetrix). Genomic DNA extracted from white blood cell of proband was processed according to manufacture's protocol. Intensity data from each probes were obtained from Affymetrix[®] Genotyping Console 3.0 as a CEL files. Unpaired copy number analysis of whole genome was carried out using Partek Genomics Suite (Partek, MO, USA) and regions with copy number change were determined by Hidden Markov Model at default settings.

3. Results

3.1. Linkage and haplotype analyses

The mean SNP call rate was 92.49% in 11 fingernail DNA samples, compared to 98.11% in a blood DNA sample from the proband. Incorrect SNP calls may result in seemingly inconsistent parent–child transmissions, but the call rates obtained are actually enough for further studies. We thus advanced to calculate LOD scores using these data.

The linkage analysis using MERLIN software revealed 18 regions with positive LOD scores (>0.00). Of the 18 regions, 14 with the following conditions were excluded: those without any functional full-length RefSeq genes; those in small size (<200 kb); and those in which some affected members did not have a common haplotype. Consequently, four loci, 5p13.2–q14.1, 15q11.2–q13.1, 18p11.32–p11.22 and 19q13.33–q13.42, remained as possibly linked regions (Figs. 1 and 3).

We then genotyped with microsatellite markers and calculated two-point LOD scores, considering the affected, unaffected, and the unknown family members. We confirmed three of the four candidate loci. They were a 48-Mb region between markers rs1366265 and rs1373965 at 5p13.2–q14.1, a 6-Mb region between rs850819

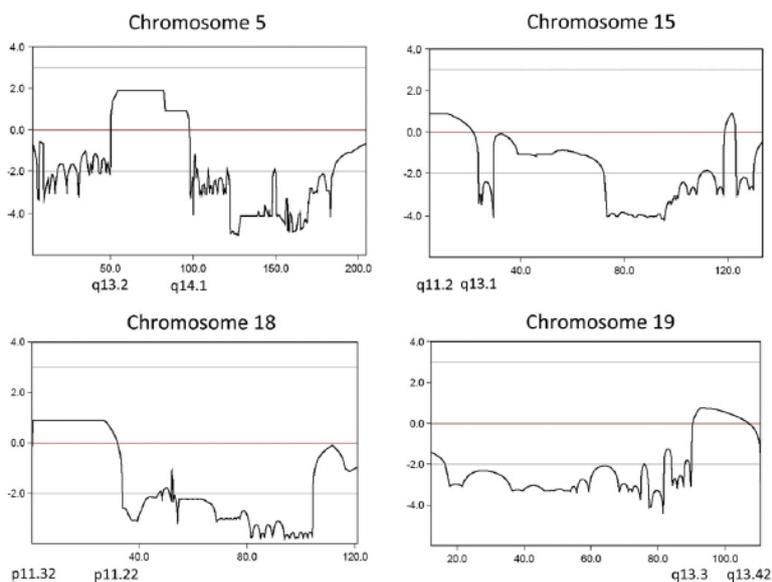


Fig. 3. Multipoint LOD scores calculated by MERLIN in four chromosomal regions, 5q13.2–q14.1, 15q11.2–q13.1, 18p11.32–p11.22 and 19q13.3–q13.42.

and rs818089 at 15q11.2–q13.1, both giving the maximum two-point LOD score of 1.632 ($\theta = 0$), and a 9-Mb region between rs486633 and rs1942150 at 18p11.32–p11.22 with the maximum LOD score of 0.851 ($\theta = 0$) (Table 1). As a possibly disease-associated haplotype on 19q13.33–q13.42 was transmitted to two definitively unaffected individuals (III-6 and IV-1), chromosome 19 was ruled out from the candidacy (Table 1, Fig. 1).

3.2. Mutation analysis of candidate genes

Within the 48-Mb region at 5p13.2–q14.1, there are about 200 RefSeq genes. Ten (*MAP3K1*, *DAB2*, *OCLN*, *FGF10*, *ESM1*, *ITGA1*, *ITGA2*, *EDFLAM*, *ERBB2IP*, and *PIK3R1*) from these genes were focused and selected as candidates for brain AVM, since they concern development or maintenance of vessels, are associated with other heritable vascular disorders such as HHT, or are expressed in the brain with AVM [8,22,24]. Mutation analyses in these 10 genes revealed no pathologic mutation in the proband, although other affected members were not examined because of insufficient amount of their DNA. Although the genes endoglin isoform 1 precursor (*ENG*), activin A receptor type II like 1 (*ALK1*) and RAS p21 protein activator 1 (*RASA1*) are not located in the candidate region, we investigated whether any of them are involved in the etiology of AVM in the family as a partial symptom of HHT or AVM-CM. Direct sequencing of these three genes failed to show any causative variants.

Copy number analysis of proband revealed one increased copy number loci at 12q and decreased at 2p, 3q, 4q, 6p, 7q and 22q (data not shown). But all these alterations were reported previously as copy number polymorphisms (<http://projects.tcag.ca/variation/>) and out of our candidate loci. In addition, neither deletions nor microdeletions were detected at 9q34.11 of *ENG*, 12q13.13 of *ALK1* and 5q14.3 of *RASA1*.

4. Discussion

We have reported a family consisting of two affected members with brain AVM, one with pulmonary AVM and one with both brain and pulmonary AVM. The condition in this family met the criteria of familial brain AVM and seems to be inherited in an autosomal

dominant mode. We tried to assign the location of a putative disease-gene by linkage analysis and search for mutations by subsequent candidate gene approach.

The linkage analysis of the family revealed three candidate regions (5p13.2–q14.1, 15q11.2–q13.1, and 18p11.32–p11.22) with relatively high LOD scores of 1.632, 1.632 and 0.851, respectively (Table 1). However, neither region was conclusive. This insufficient mapping may have arisen from the small pedigree size, and/or from incomplete ascertainment of affected members, e.g., probable existence of asymptomatic affected persons among the “unknown” members. Indeed, as for a candidate locus at 5p13.2–q14.1, the proband's maternal grandmother (I-2) and son (IV-3) had a haplotype common to the three affected members (Fig. 1), but they were fallen into the “unknown” individuals. If DNA from IV-2 was available and if MRI examinations of VI-3 and I-2 were carried out, we would have obtained more definitive results. As we performed linkage analysis using high-density SNP genotyping, 14 small regions not containing RefSeq genes or miRNAs showed a positive LOD score. It is possible that an unidentified transcribed RNA in one of these regions could cause familial AVM, but these regions are candidate loci with a lower priority than those containing known genes. Thus, the three regions have remained at present as the equally possible loci for AVM. The three regions do not overlap with a previously reported candidate locus of familial brain AVM, i.e., 6p25 [11], and do not contain genes responsible for syndromic AVM (heritable disorders involving AVM) or cerebral cavernous malformations, such as *ENG* [17], *ALK1* [12], *RASA1* [3,6,20,21,26], and *PTEN* [23], *KRIT1* [13], *MGC407* [5], *PDCD10* [2].

We then searched for mutations in 10 genes within 5p13.2–q14.1, among which *MAP3K1*, *DAB2* and *OCLN* encode proteins playing roles in the TGF- β signaling pathway, and *FGF10*, *ESM1*, *ITGA1*, *ITGA2*, *EGFLAM*, *ERBB2IP* and *PIK3R1* were those expressed in brain AVM tissues by previous microarray analysis [8,22,24]. Nevertheless, no pathologic mutation was found in any of them. Because the presence of both brain AVM and pulmonary AVM in this pedigree is reminiscent of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, we analyzed *ENG* and *ALK1* for mutations and genomic aberrations, which may cause HHT1 and HHT2 respectively [12,17]. The proband did not have any mutations in the coding exons or intron/exon boundaries of either gene, nor any genomic aberrations at those loci. We also analyzed *RASA1* because this may cause CM-AVM, which is characterized by multiple CM and AVM [3,6,20,21,26]. No causative mutation or genomic aberration was detected in the proband. Although other genes, such as *KRIT1*, *MGC407* and *PDCD10*, have been shown to cause slow-flow lesions i.e., cerebral cavernous malformation [2,5,13], they were not investigated in the present study, because the clinical manifestations in our family did not meet the criteria for these diseases.

Participation of family members and compliance with guidelines for human genome researches are critical to conduct a linkage analysis. Whole-blood samples cannot occasionally be available in some family members because of their far domicile. In such case, fingernail DNA is useful, since clipped fingernails can be mailed in a usual way, and stored long at a room temperature, as indicated previously [16,19]. The present study is the first experience to adopt fingernail DNA to genome-wide high-density SNP microarray analysis. The performance obtained from fingernail DNA was sufficient, showing all SNP call rates of >86%. According to the manufacturer's protocol, samples with an SNP call rate of <85% should further be evaluated before including the data in downstream analysis. Incorrect SNP calls may make serious problems in linkage analysis. For instance, SNPs with parent–child transmission inconsistency may be omitted, leading to a reduced LOD score.

In conclusion, we have assigned the familial AVM locus to three alternative regions, 5p13.2–q13.2, 15q11.2–q13.1 and 18p11.32–p11.22, by a genome-wide, high-density, SNP-based

Table 1
Two-point LOD scores for brain AVM at various loci.

Locus	Recombination fraction (θ)					
	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
AVM5p17xAC	0.032	0.030	0.029	0.027	0.026	0.025
D5S418	0.551	0.535	0.518	0.501	0.484	0.467
AVMch5p25xAC	1.334	1.301	1.268	1.234	1.201	1.167
AVM5pr18xGT	0.511	0.491	0.472	0.452	0.433	0.414
AVMch5c27xGT	1.630	1.597	1.564	1.531	1.497	1.463
AVM5c18xAC	1.373	1.344	1.314	1.285	1.255	1.225
D5S407	1.632	1.599	1.566	1.532	1.499	1.465
D5S647	1.154	1.121	1.089	1.056	1.023	0.991
AVM5qr19xCA	0.810	0.790	0.769	0.748	0.727	0.706
D15S1021	0.171	0.164	0.157	0.150	0.143	0.137
D15S128	0.876	0.858	0.841	0.823	0.805	0.787
D15S986	0.812	0.791	0.770	0.749	0.728	0.707
D15S975	0.400	0.387	0.374	0.361	0.348	0.335
D15S1002	1.330	1.298	1.266	1.234	1.202	1.170
D15S1019	1.632	1.599	1.566	1.532	1.499	1.465
D18S59	0.199	0.214	0.225	0.234	0.241	0.246
D18S459	0.142	0.136	0.131	0.125	0.120	0.114
D18S1132	0.677	0.663	0.650	0.636	0.623	0.609
D18S452	0.851	0.832	0.813	0.794	0.774	0.755
D18S471	0.240	0.231	0.222	0.214	0.205	0.197
D19S927	-0.302	-0.277	-0.254	-0.234	-0.216	-0.200
D19S418	-2.655	-2.453	-2.257	-2.078	-1.919	-1.778
D19S605	-0.648	-0.574	-0.512	-0.460	-0.414	-0.374

linkage analysis with fingernail DNA in an AVM family. However, mutation analyses of some genes in the regions failed to identify any pathological changes.

Funding

This research was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research (Nos. 17019055 and 19390095) from the Ministry of Education, Sports, Culture, Science and Technology of Japan, and by SORST from Japan Science and Technology Agency (JST). K.Y. was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Competing interests

There are no competing interests.

Acknowledgments

We are grateful to the family members for their participation in this research. We also thank Ms Yasuko Noguchi, Ms Miho Ooga, and Ms Chisa Hayashida for their technical assistance.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.ejmg.2010.06.007.

References

- [1] G.R. Abecasis, S.S. Cherny, W.O. Cookson, L.R. Cardon, Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees, *Nat. Genet.* 30 (2002) 97–101.
- [2] F. Bergametti, C. Denier, P. Labauge, M. Arnoult, S. Boetto, M. Clanet, P. Coubes, B. Echenne, R. Ibrahim, B. Irthum, G. Jacquet, M. Lonjon, J.J. Moreau, J.P. Neau, F. Parker, M. Tremoulet, E. Tournier-Lasserre, Société Française de Neurochirurgie, Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 42–51.
- [3] L.M. Boon, J.B. Mulliken, M. Viskula, RASA1: variable phenotype with capillary and arteriovenous malformation, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15 (2005) 265–269.
- [4] P.M. Crawford, C.R. West, D.W. Chadwick, M.D.M. Shaw, Arteriovenous malformations of the brain: natural history in unoperated patients, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 49 (1986) 1–10.
- [5] C. Denier, S. Goutagny, P. Labauge, V. Krivosic, M. Arnoult, A. Cousin, A.L. Benabid, J. Comoy, P. Frerebeau, B. Gilbert, J.P. Houtteville, M. Jan, F. Lapiere, H. Loiseau, P. Menei, P. Mercier, J.J. Moreau, A. Nivelon-Chevallier, F. Parker, A.M. Redondo, J.M. Scarabin, M. Tremoulet, M. Zerah, J. Maciazek, E. Tournier-Lasserre, Société Française de Neurochirurgie, Mutations within the MGC4607 gene cause cerebral cavernous malformations, *Am. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 326–337.
- [6] I. Eerola, L.M. Boon, J.B. Mulliken, P.E. Burrows, A. DompMartin, S. Watanabe, R. Vanwijck, M. Viskula, Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations, *Am. J. Hum. Genet.* 73 (2003) 1240–1249.
- [7] I.G. Fleetwood, G.K. Steinberg, Arteriovenous malformations, *Lancet* 359 (2002) 863–873.
- [8] T. Hashimoto, M.T. Lawton, G. Wen, G.Y. Yang, T. Chaly, C.L. Stewart, H.K. Dressman, N.M. Barbaro, D.A. Marchuk, W.L. Young, Gene microarray analysis of human brain arteriovenous malformations, *Neurosurgery* 54 (2004) 410–423 discussion 423–425.
- [9] R. Herzig, S. Burval, V. Vladylke, L. Janouskova, P. Krivanek, B. Krupka, I. Vlachova, K. Urbanek, Familial occurrence of cerebral arteriovenous malformation in sisters: case report and review of the literature, *Eur. J. Neurol.* 7 (2000) 95–100.
- [10] J.C. Horton, Arteriovenous malformations of the brain, *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 1774–1775.
- [11] S. Inoue, W. Liu, K. Inoue, M. Youhei, K. Takenaka, H. Yamakawa, M. Abe, J.J. Jafar, R. Herzig, A. Koizumi, Combination of linkage and association studies for brain arteriovenous malformation, *Stroke* 38 (2007) 1368–1370.
- [12] D.W. Johnson, J.N. Berg, M.A. Baldwin, C.J. Gallione, I. Marondel, S.-J. Yoon, T.T. Stenzel, M. Speer, M.A. Pericak-Vance, A. Diamond, A.E. Guttmacher, C.E. Jackson, L. Attisano, R. Kucherlapati, M.E.M. Porteous, D.A. Marchuk, Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2, *Nat. Genet.* 13 (1996) 189–195.
- [13] S. Laberge-le Couteux, H.H. Jung, P. Labauge, J.-P. Houtteville, C. Lescoat, C. Michale, E. Marechal, A. Joutel, J.-F. Bach, E. Tournier-Lasserre, Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas, *Nat. Genet.* 23 (1999) 189–193.
- [14] G.M. Lathrop, J.M. Lalouel, C. Julier, J. Ott, Strategies for multilocus linkage analysis in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81 (1984) 3443–3446.
- [15] M. Lyons-Weiler, J. Hagenkord, C. Sculli, R. Dhir, F.A. Monzon, Optimization of the Affymetrix GeneChip mapping 10K 2.0 Assay for routine clinical use on formalin-fixed paraffin-embedded tissues, *Diagn. Mol. Pathol.* 17 (2008) 3–13.
- [16] N. Matsuzawa, K. Shimozato, N. Natsume, N. Niikawa, K. Yoshiura, A novel missense mutation in Van der Woude syndrome: usefulness of fingernail DNA for genetic analysis, *J. Dent. Res.* 85 (2006) 1143–1146.
- [17] K.A. McAllister, K.M. Grogg, D.W. Johnson, C.J. Gallione, M.A. Baldwin, C.E. Jackson, E.A. Helms, D.S. Markel, W.C. McKinnon, J. Murrell, M.K. McCormick, M.A. Pericak-Vance, P. Heutink, B.A. Oostra, T. Haitjema, C.J.J. Westerman, M.E. Porteous, A.E. Guttmacher, M. Letarte, D.A. Marchuk, Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1, *Nat. Genet.* 8 (1994) 345–351.
- [18] M. Nakashima, M. Nakano, A. Hirano, T. Kishino, S. Kondoh, N. Miwa, N. Niikawa, K. Yoshiura, Genome-wide linkage analysis and mutation analysis of hereditary congenital blepharoptosis in a Japanese family, *J. Hum. Genet.* 53 (2008) 34–41.
- [19] A.M. Oberbauer, D.I. Grossman, M.L. Eggleston, D.N. Irion, A.L. Schaffer, N.C. Pedersen, J.M. Belanger, Alternatives to blood as a source of DNA for large-scale scanning studies of canine genome linkages, *Vet. Res. Commun.* 27 (2003) 27–38.
- [20] N. Revencu, L.M. Boon, J.B. Mulliken, O. Enjolras, M.R. Cordisco, P.E. Burrows, P. Clapuyt, F. Hammer, J. Dubois, E. Baselga, F. Brancati, R. Carder, J.M.C. Quintal, B. Dallapiccola, G. Fischer, I.J. Frieden, M. Garzon, J. Harper, J. Johnson-Patel, C. Labreze, L. Martorell, H.J. Paltiel, A. Pohl, J. Prendiville, I. Quere, D.H. Siegel, E.M. Valente, A. van Hagen, L. van Hest, K.K. Vaux, A. Vicente, L. Weibel, D. Chitayat, M. Viskula, Parkes Weber syndrome, vein of Galen aneurysmal malformation, and other fast-flow vascular anomalies are caused by RASA1 mutations, *Hum. Mutat.* 29 (2008) 959–965.
- [21] N. Revencu, L.M. Boon, M. Viskula, From germline towards somatic mutations in the pathophysiology of vascular anomalies, *Hum. Mol. Genet.* 18 (R1) (2009) R65–R74.
- [22] A. Sasahara, H. Kasuya, H. Akagawa, H. Ujiiie, O. Kubo, T. Sasaki, H. Onda, Y. Sakamoto, B. Kricshek, T. Hori, I. Inoue, Increased expression of ephrin A1 in brain arteriovenous malformation: DNA microarray analysis, *Neurosurg. Rev.* 30 (2007) 299–305 discussion 305.
- [23] K. Suphapeetiporn, P. Kongkam, J. Tantivatana, T. Sinthuwitvat, S. Tonglobpetch, V. Shotelersuk, PTEN c511C>T nonsense mutation in a BRRS family disrupts a potential exonic splicing enhancer and causes exon skipping, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 36 (2006) 814–821.
- [24] U. Sure, E. Battenberg, A. Dempfle, W. Tirakotai, S. Bien, H. Bertainffy, Hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor are expressed more frequently in embolized than in nonembolized cerebral arteriovenous malformations, *Neurosurgery* 55 (2004) 663–669.
- [25] K. Takenaka, J. Muroi, S. Yamada, H. Yamakawa, M. Abe, K. Tabuchi, A. Koizumi, Genetic dissection of the familial cerebral arteriovenous malformation, *Jpn. J. Neurosurg.* 13 (2004) 837–845.
- [26] R. Thieck, J.B. Mulliken, N. Revencu, L.M. Boon, P.E. Burrows, M. Cordisco, Y. Dwight, E.R. Smith, M. Viskula, D.B. Orbach, A novel association between RASA1 mutations and spinal arteriovenous anomalies, *AJNR. Am. J. Neuro-radiol.* 31 (2010) 775–779.
- [27] J. van Beijnum, H.B. van der Worp, H.M. Schippers, O. van Nieuwenhuizen, L.J. Kappelle, G.J.E. Rinkel, J.W.B. van der Sprenkel, C.J.M. Klijn, Familial occurrence of brain arteriovenous malformations: a systematic review, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 78 (2007) 1213–1217.



Intracystic papillary carcinoma of breast harbors significant genomic alteration compared with intracystic papilloma: Genome-wide copy number and LOH analysis using high-density single-nucleotide polymorphism microarrays

Journal:	<i>The Breast Journal</i>
Manuscript ID:	TBJ-00609-2009.R2
Manuscript Type:	Letter to Editor
Date Submitted by the Author:	02-Dec-2009
Complete List of Authors:	Oikawa, Masahiro; Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Human Genetics; Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Surgical Oncology Nagayasu, Takeshi; Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Surgical Oncology Yano, Hiroshi; Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Surgical Oncology Hayashi, Tomayoshi; Nagasaki University Hospital, Department of Pathology Abe, Kuniko; Nagasaki University Hospital, Department of Pathology Kinoshita, Akira; Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Human Genetics Yoshiura, Koh-ichiro; Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Human Genetics
Key Words:	Intracystic papillary tumor, breast cancer, array CGH, GeneChip®, FFPE



LETTERS TO EDITOR

Intracystic papillary carcinoma of breast harbors significant genomic alteration compared with intracystic papilloma: Genome-wide copy number and LOH analysis using high-density single-nucleotide polymorphism microarrays

Masahiro Oikawa, MD,^{1,2} Takeshi Nagayasu, MD, PhD,² Hiroshi Yano, MD, PhD,² Tomayoshi Hayashi, MD, PhD,³ Kuniko Abe, MD, PhD,³ Akira Kinoshita, PhD,¹ Koh-ichiro Yoshiura, MD, PhD^{*1}

¹Departments of Human Genetics and ²Surgical Oncology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan; ³Department of Pathology, Nagasaki University Hospital, Nagasaki, Japan.

Address for reprints and correspondence:

Koh-ichiro Yoshiura, Department of Human Genetics, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Science, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852-8523, Japan

Tel.: +81-95-819-7120

Fax: +81-95-819-7121

E-mail: kyoshi@nagasaki-u.ac.jp

Running title

Molecular-cytogenetic Profile of ICPTs

KEY WORDS

Intracystic papillary tumor, breast cancer, array CGH, GeneChip®, FFPE

ABSTRACT

Purpose: Intracystic papillary breast tumors consist of benign papilloma, carcinoma in situ and carcinoma with invasion. Using high-density single-nucleotide polymorphism arrays, this study aimed to determine the profile of genomic alterations in these lesions and to identify novel diagnostic criteria. **Methods:** Ten samples of intracystic papillary tumor, which included five papillomas (Pap), three papillary carcinomas in situ (PurePC) and two papillary carcinomas with invasion (PCinv), were studied. DNA was extracted from tumor and normal tissues that were microdissected from the same formalin-fixed paraffin embedded blocks. Using probe intensity and genotype data from high-density oligonucleotide SNP microarrays (Affymetrix® GeneChip Genome-wide Human 5.0), paired copy number and LOH analysis was performed using Partek Genomic Suite Software. **Results:** Quality control (QC) call rate, which is an index measuring the quality of a SNP microarray experiment, ranged from 70.75% to 91.93%, mean 80.72%. The mean total genomic alteration rate (sum of amplifications, deletions and copy-neutral loss of heterogeneity) with respect to the whole genome was 2.87%, 15.4% and 35.3% in Pap, PC and IDC, respectively, and was significantly different between samples (Kruskal-Wallis chi-squared test, $p = 0.043$). The most commonly altered regions ($\geq 4/5$) in papillary carcinoma were copy-neutral loss of heterogeneity at 3p21.31 and 3p14.2 and amplification at 20q13.13. **Conclusions:** Among intracystic papillary breast tumors, malignant tumors, including non-invasive tumors, which are difficult to diagnose histopathologically, harbor significant genomic alteration. Our findings may aid clinical management of these tumors and may provide insight into their carcinogenesis.

Intracystic papillary breast tumors (ICPT) consist of benign papillomas, carcinomas in situ and carcinomas with invasion, and they account for approximately 10% of benign breast tumors and less than 1% of malignant tumors, respectively (1, 2). In breast lesions, indication for surgery is usually determined by pathological diagnosis together with radiological findings but differential, preoperative diagnosis of papillary carcinoma from papilloma is very difficult, even following needle biopsy (3) because of their non-specific radiological characteristics and their modest cytological and histological appearance (4). To avoid excessive surgical intervention, another diagnostic procedure needs to be developed.

Cytogenetic studies of breast papillary tumors are limited and cytogenetic differences between papillomas and papillary carcinomas are still controversial. Tsuda et al. (5, 6) reported that papillary carcinomas have frequent changes in gene copy-number and loss of heterozygosity (LOH), while papillomas did not show any gene copy-number alteration or LOH at 16q and 1q. Boecker et al. (7) also reported that conventional comparative genomic hybridization (CGH) did not reveal any gene copy-number change in papillomas. On the other hand, Lininger et al. (8) and Cristofano et al. (2) demonstrated that LOH at 16p or 16q was frequent in both papillomas and papillary carcinomas.

The purpose of this study was to determine the profile of genomic alterations in breast ICPT and to explore the possibility of using high-density oligonucleotide SNP arrays as the basis of a novel diagnostic method of ICPT. Ten formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) breast ICPT were obtained from the Department of Pathology, Nagasaki University Hospital. The samples included five benign papillomas (Pap), three papillary carcinomas in situ (PurePC) and two papillary carcinomas with invasion (PCinv). Pathological diagnosis was independently determined by two

pathologists. Clinicopathological findings of these tumors are provided in Figure 1 and Table 1.

Extracted DNA from each sample was processed following the manufacturer's protocol and hybridized on Affymetrix GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 5.0® (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The QC call rates, which is an index measuring the quality of a SNP microarray experiment, obtained from the FFPE samples were from 70.75 to 91.93 %, with a mean of 80.72 % (Table 1), which was comparable to the results from former cytogenetic studies using DNA extracted from FFPE samples(9-11).

Copy number change and LOH analyses (called here SNPacGH) were conducted using the Partek Genomics Suite (PGS) version 6.3 (Partek, St. Louis, MI, USA). To estimate the total rate of a copy number changed region, each segment amplified or lost was summed and divided by 2,829 Mb, which is the total Mb in the genome, excluding heterochromatic, centromeric and telomeric regions not covered by probes. Similarly, to estimate the total rate of genomic alteration, the sum of segments with copy number change and copy number neutral loss of heterozygosity (CNLOH) was divided by 2,829 Mb. To validate the copy number change identified by SNPacGH, quantitative PCR assays were performed on a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) at four selected loci, including independent genes (Supplementary table 1).

In SNPacGH analysis, substantial divergence was observed between each ICPT subtype (Figure 2). The mean rate of copy number change was 0.48% (from 0.0% to 1.60%), 7.89% (from 0.41% to 12.0%) and 16.3% (from 16.0% to 16.6%) in Pap, PC and PCinv, respectively. The mean rate of genomic alteration (including copy number change and CNLOH) was 2.87% (from 0.00% to 11.8%), 15.4% (from 8.83% to 24.1%) and 35.3% (from 17.6% to 53.1%) in Pap, PC and PCinv, respectively (Table 1). Malignant tumors

(PurePC and PCinv) showed significantly more copy number changes and genomic alterations (copy number change and CNLOH) than benign tumors (Pap) (Wilcoxon's rank sum test, $p = 0.036, 0.016$ respectively) and these differences correlated with their malignant phenotype (Kruskal-Wallis' chi-squared test, $p = 0.046, 0.043$, respectively). The real time qPCR analysis to validate the copy number state in SNPacGH demonstrated sufficient specificity, thus all loci showing alteration in SNPacGH were confirmed by real-time qPCR (Supplementary table 1). On the other hand, at 31 loci from the ten samples, where SNPacGH showed the copy number state as disomy, ten loci were revealed to have a copy number change by real-time qPCR. At regions determined to be disomy by SNPacGH, 70.6 % were determined by qPCR to be two copies. Previous studies have documented that the most common genomic alteration in papillary carcinoma is amplification on 1p and deletion or LOH on 16q (2, 5, 6, 8). Our study revealed chromosomal regions at 3p21.31, 3p14.2 and 20q13.13 were commonly altered ($\geq 4/5$) among five carcinomas in addition to deletion or CNLOH on 16q ($\geq 3/5$) (Figure 2, Supplementary table 2). The significance of 3p and 20q are currently unclear but require further investigation.

In summary, we have elucidated significant differences in the molecular-cytogenetic profile between papilloma and papillary carcinoma. Thus papillary carcinoma harbored significantly more genomic alterations than papilloma, even though papilloma had a number of genomic alterations, and the rate of genomic alteration correlated with pathological malignancy classification. These genome wide findings could not be obtained by conventional cytogenetic study such a fluorescent in situ hybridization or conventional CGH. Our findings may aid clinical management of breast ICPT and may provide insight into their carcinogenesis.

REFERENCES

1. Fayanju OM, Ritter J, Gillanders WE, *et al.* Therapeutic management of intracystic papillary carcinoma of the breast: the roles of radiation and endocrine therapy. *Am J Surg* 2007;194:497-500.
2. Di Cristofano C, Mrad K, Zavaglia K, *et al.* Papillary lesions of the breast: a molecular progression? *Breast Cancer Res Treat* 2005;90:71-76.
3. Douglas-Jones AG, Verghese A. Diagnostic difficulty arising from displaced epithelium after core biopsy in intracystic papillary lesions of the breast. *J Clin Pathol* 2002;55:780-783.
4. Solorzano CC, Middleton LP, Hunt KK, *et al.* Treatment and outcome of patients with intracystic papillary carcinoma of the breast. *Am J Surg* 2002;184:364-368.
5. Tsuda H, Takarabe T, Susumu N, *et al.* Detection of numerical and structural alterations and fusion of chromosomes 16 and 1 in low-grade papillary breast carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 1997;151:1027-1034.
6. Tsuda H, Takarabe T, Akashi-Tanaka S, Fukutomi T, Hirohashi S. Pattern of chromosome 16q loss differs between an atypical proliferative lesion and an intraductal or invasive ductal carcinoma occurring subsequently in the same area of the breast. *Mod Pathol* 2001;14:382-388.
7. Boecker W, Buerger H, Schmitz K, *et al.* Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns. *J Pathol* 2001;195:415-421.
8. Lininger RA, Park WS, Man YG, *et al.* LOH at 16p13 is a novel chromosomal alteration detected in benign and malignant microdissected papillary neoplasms of the breast. *Hum Pathol* 1998;29:1113-1118.
9. Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, *et al.* Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res* 2007;67:2544-2551.
10. Lyons-Weiler M, Hagenkord J, Sciulli C, Dhir R, Monzon FA. Optimization of the Affymetrix GeneChip Mapping 10K 2.0 Assay for routine clinical use on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 2008;17:3-13.
11. Nessling M, Richter K, Schwaenen C, *et al.* Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue. *Cancer Res* 2005;65:439-447.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Hematoxylin-eosin stain in intracystic papillary tumors (Original magnification x40). A-C, Intracystic papilloma (A: case 1, B: case 2, C: case 3). D-F, Intracystic papillary carcinoma in situ (D: case 6, E: case 7, F: case 8). G and H, Intracystic papillary carcinoma with invasion (G: case 9, H: case10).

Figure 2. Graphic display of whole genomic alterations in papilloma (a) and papillary carcinoma (b). The color bar over each chromosome indicates copy number amplification (green color bars), copy-neutral LOH (blue color bars) and deletion (brown color bars) for each case. Papilloma includes 5 cases of Pap (a), and papillary carcinoma includes 3 cases of PurePC and two of PCinv (b).

FIGURES

Figure 1.

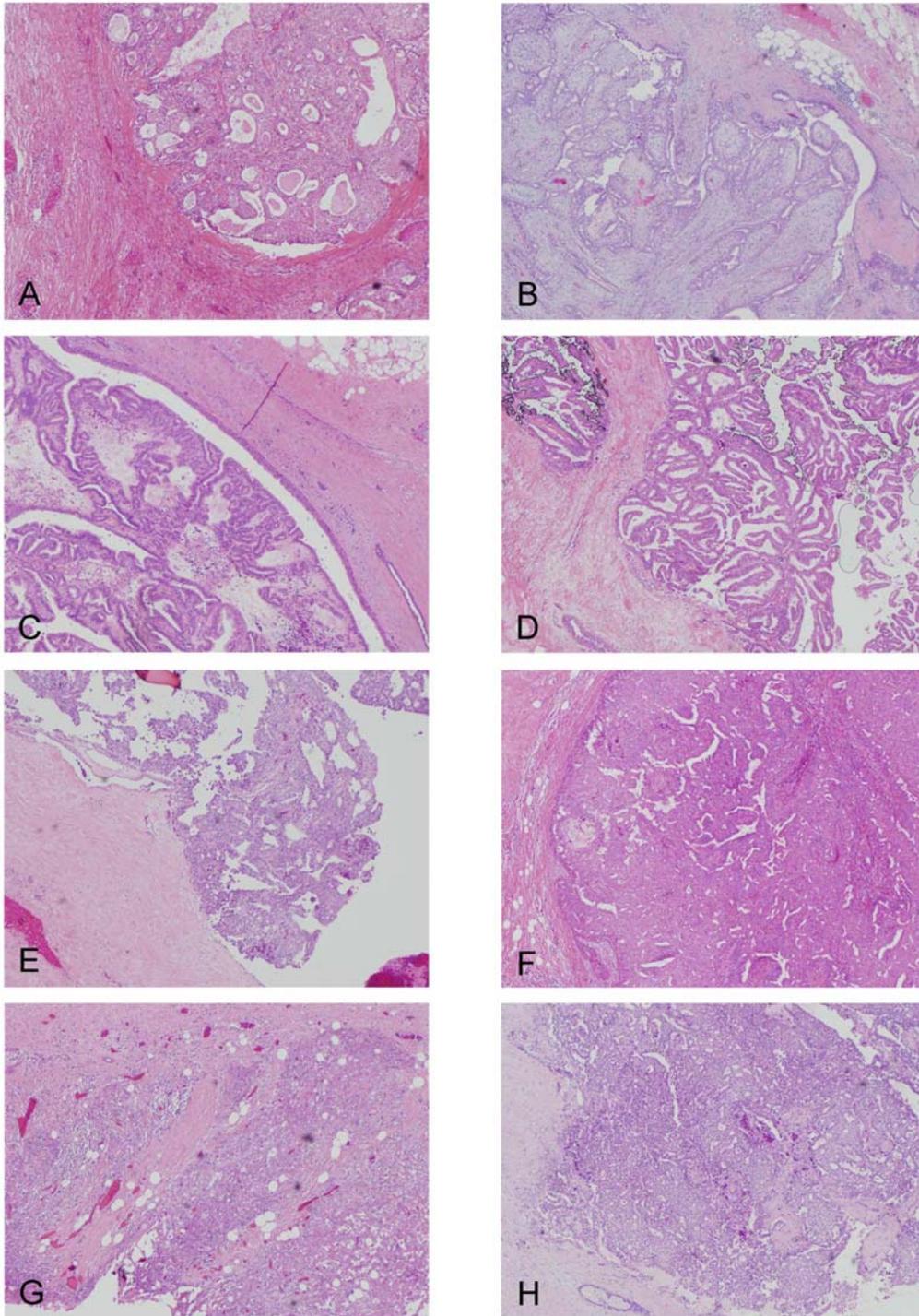


Figure 2.

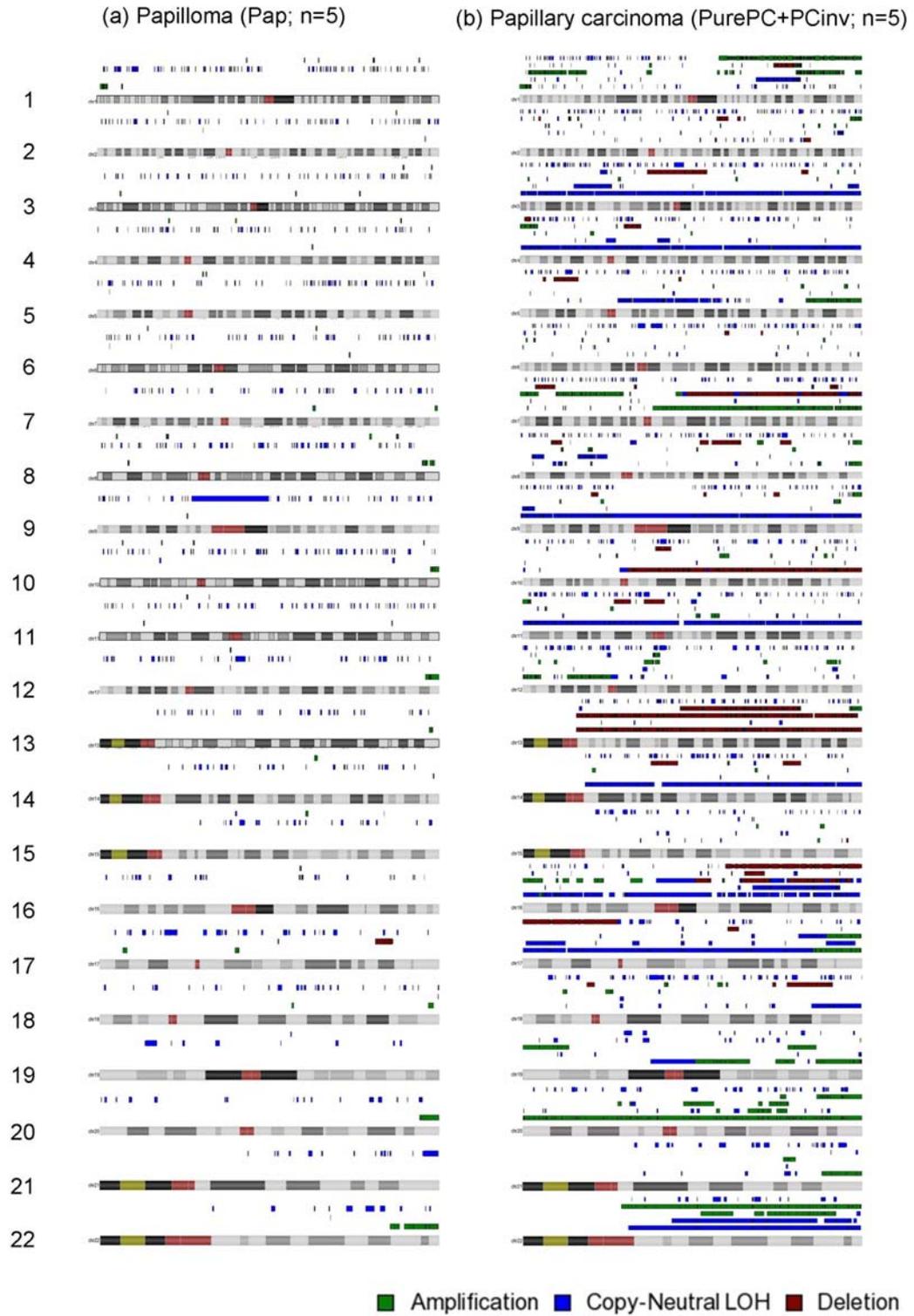


Table 1. Characteristics of ten intracystic papillary lesions

Case	Clinicopathological findings						Genetic findings			
	Diagnosis	age	Size of cyst (mm)	MMG	US	FNAC	Receptor status	QC call rate (normal/turnor)	ratio of CNC	ratio of genomic alteration
1	Pap	43	80	Category 3	Category 3	Class 2	ER(+)	75.9%/82.9%	0.14%	0.24%
2	Pap	38	10	Category 1	Category 3	Class 3	NaN	83.4%/80.4%	0.66%	0.69%
3	Pap	49	25	Category 3	Category 3	Class 3	NaN	86.2%/86.5%	1.60%	1.60%
4	Pap	38	70	Category 3	Category 3	Class 2	NaN	89.9%/87.9%	0%	11.8%
5	Pap	49	75	Category 3	Category 3	Class 2	NaN	91.9%/89.8%	0%	0%
6	PurePC	61	31	Category 4	Category 3	Class 4	ER(+), HER2(1+)	75.7%/76.2%	11.3%	24.1%
7	PurePC	58	49	Category 3	Category 4	Class 4	ER(+)	79.7%/70.8%	0.41%	8.83%
8	PurePC	43	16	Category 2	Category 4	Class 4	ER(+), HER2(1+)	77.2%/79.9%	12.0%	13.2%
9	PCinv	60	96	NaN	Category 4	Class 1	ER(-), HER2(1+)	71.6%/73.9%	16.6%	53.1%
10	PCinv	72	19	Category 4	Category 4	Class 5	ER(+), HER2(1+)	82.0%/72.6%	16.0%	17.6%

Pap: intracystic papilloma, Pure PC: intracystic papillary carcinoma in situ, PC inv: intracystic papillary carcinoma with invasion, MMG: the mammographic features evaluated according to the BI-RADS, US: the ultrasonographic features evaluated according to diagnostic guideline of JABTS, FNAC: the cytological features of fine needle aspiration cytology, ER: the status of estrogen receptor, HER2: the status of HER2/neu receptor, CNC: copy number change, genomic alteration: copy number change and copy neutral loss of heterozygosity, NaN: not analyzed

Supplementary table 1. The validation of Array-based comparative genomic hybridization by real time quantitative PCR

Case	ABCA5			GPR4			FZD9			SNAI1		
	aCGH	Light Cycler		aCGH	Light Cycler		aCGH	Light Cycler		aCGH	Light Cycler	
	Copy number state	Relative ratio*	Relative alleles	Copy number state	Relative ratio*	Relative alleles	Copy number state	Relative ratio*	Relative alleles	Copy number state	Relative ratio*	Relative alleles
1	deletion	0.58±0.15	1	disomy	1.33±0.52	3	disomy	1.55±0.23	3	disomy	0.95±0.31	2
2	disomy	0.76±0.17	2	disomy	1.05±0.19	2	disomy	1.16±0.37	2	disomy	0.98±0.48	2
3	disomy	0.87±0.08	2	disomy	1.22±0.10	2	disomy	1.60±0.22	3	disomy	1.11±0.63	2
4	disomy	2.26±1.10	5	disomy	1.45±0.76	3	disomy	0.91±0.48	2	disomy	1.24±0.70	2
5	disomy	1.14±0.16	2	disomy	0.86±0.11	2	disomy	0.80±0.31	2	disomy	0.97±0.13	2
6	disomy	0.97±0.17	2	disomy	1.01±0.12	2	disomy	1.11±0.76	2	disomy	0.96±0.66	2
7	disomy	1.64±1.16	3	disomy	0.52±0.09	1	disomy	0.83±0.17	2	amplification	2.55±0.89	5
8	disomy	0.79±0.12	2	disomy	2.40±0.39	5	disomy	2.96±0.57	4	amplification	1.56±0.36	3
9	disomy	1.30±0.11	3	amplification	4.87±0.38	10	amplification	2.87±0.29	5	amplification	1.78±0.99	4
10	disomy	1.03±0.32	2	amplification	1.86±0.71	4	amplification	1.86±0.31	4	amplification	2.03±1.07	4

*: relative ratio is indicated mean ± coefficient variance

Supplementary Document

MATERIALS AND METHODS

DNA extraction and hybridization to SNP arrays

Using ten to twenty 10 μm thick sections cut from FFPE blocks, tumor tissue areas containing more than 90% tumor cells and normal tissue areas not having any cancer cells, which were identified by staining with hematoxylin and eosin, were microdissected. Paraffin removal was performed in 80% xylene and samples were then washed twice with absolute ethanol. After drying the pellet was resuspended in 360 μL of buffer ATL (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Germany) and incubated at 95°C for 15 minutes and then cooled to room temperature. Samples were then digested with proteinase K for 3 days at 56°C in a rotation oven with periodic mixing and the addition of fresh proteinase K every 24 hours.

DNA was collected using the QIAmp DNA Mini Kit according to the manufacturer's instructions. Briefly, 400 μL of buffer AL was added to the sample and incubated at 70°C for 10 minutes. 400 μL of absolute ethanol was then added. The sample solution was then placed into the spin column and centrifuged for 1 minute at 8000 x g. The spin column was washed twice with 500 μL of AW1 by centrifugation at 8000 x g for one minute and then washed with AW2 by centrifugation at 14,000 x g for three minutes. The DNA was finally eluted with 55 μL buffer AE. Extracted DNA was quantified on a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). All samples used in this study had an OD 260/280 ratio higher than 1.8.

Extracted DNA from each sample was processed following the manufacturer's protocol and hybridized on Affymetrix GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 5.0® (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Because DNA extracted from FFPE samples was degenerated, the following modifications were adopted to the oligonucleotide microarray system, taking into consideration previous studies (1, 2, 3): the initial DNA amount was increased from 250 ng to 1 μg ; digestion time was prolonged from 120 minutes to overnight; the volume of PCR reactions was increased when the yields of PCR product failed to reach prescribed levels. The peak size of mapping PCR products was

determined by visual inspection of electropherograms following 2% TBE agarose gel electrophoresis.

SNP array data analyses

All signal intensities of probes and genotype calls were generated and obtained from Genotyping Console 3.0.1[®] (BRLMM-P algorithm) using default parameter settings. Overall hybridization quality was estimated by a generated QC call rate index. We use the term “copy number change” meaning deletion or amplification of a genomic region and “CNLOH” meaning copy number neutral loss of heterozygosity.

Copy number change and LOH analyses (called here SNPacGH) were conducted using the Partek Genomics Suite (PGS) version 6.3 (Partek, St. Louis, MI, USA). When signal intensities of probes were imported from CEL files into PGS, a normalization procedure with correction for GC-content and fragment length effects was performed. Copy number estimates from signal intensities were determined by “paired analysis”, to compare copy number state from tumor and matching normal tissue. Detection of amplifications and deletions was performed with a segmentation algorithm in the copy number workflow in PGS, where the minimum marker size was set at 150 (default setting is 10) and signal/noise ratio was set at 0.25 (default setting is 0.30). Genotype calls data were imported from CHP files into PGS following the restriction of SNPs to fragment sizes ≤ 500 bp, because genotype calls of SNPs on longer fragments are unreliable from degenerated DNA, such as DNA extracted from FFPE samples (1). LOH values were inferred by paired analysis with the Hidden Markov Model default setting in the LOH Workflow in PGS. All of these modifications from the default settings are adopted to maximize detection specificity.

Quantitative PCR (qPCR) assay

Quantitative PCR analyses to validate copy number changes were performed on a LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using an intercalating dye, SYTO13 (Molecular probes, OR, USA), which is an alternative to SYBR green I. Absolute quantification was carried out using a second

derivative max method (4). A standard calibration curve was generated with a serial dilution of genomic DNA to estimate the copy number state of sample for each set of primers. A corrected copy number state was given as the ratio of a target gene divided by an internal control gene. Copy number changes in tumors were determined by comparing paired samples (paired analysis).

Target genes for copy number validation and sequences of primer sets were as follows: ATP-binding cassette, sub-family A, member 5 (ABCA5, Forward; 5' TGCTGTGGTTCCCATCAAAC3' Reverse; 5' CATGCCAACACTCGTTCACA3'), G protein-coupled receptor 4 (GPR4, Forward; 5'AGGTGCAGCTGAAGATGCTG3' Reverse; 5'CTGTGGGATGAGAGGGGAAA3'), Frizzled 9 (FZD9, Forward; 5' TGCCCCTCTCTGGCTACCTG3' Reverse; 5' GGGCACCGTGTAGAGGATGG3'), Snail 1 homolog (SNAI1, Forward; 5'CTAACCAGCTTGGAGGTGGG3' Reverse; 5'AGGGAGGACGTGACTGGTG3'). The diploid internal control gene and primer set sequences were Ornithine decarboxylase antizyme 2 (OAZ2, Forward; 5'CCTTCAGCTTCTTGGGCTTT3' Reverse; 5'TGGTCCAGGGGATAAACCAT3'). BLAST searches confirmed all primer sequences to be specific for the gene.

Samples were analyzed in quadruplicate in a 384-well format in a 10 µL final volume containing about 2 ng genomic DNA, 0.5 µM forward primer, 0.5 µM reverse primer, 0.1 Units TaKaRa ExTaq HS version (TaKaRa, Kyoto, Japan), 1 x PCR buffer, 200 µM dNTP and 0.5 µM SYTO13. The amplification conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 seconds, annealing at 55°C for 10 seconds and extension at 72°C for 15 seconds. The data were analyzed using LightCycler® 480 Basic Software (Roche Diagnostics) and melting curve analysis was always performed to verify the absence of non-specific amplification.

Statistical analysis

To estimate the total rate of a copy number changed region, each segment amplified or lost was summed and divided by 2,829 Mb, which is the total Mb in the genome, excluding heterochromatic, centromeric and telomeric regions not covered by probes.

Similarly, to estimate the total rate of genomic alteration, the sum of segments with copy number change and CNLOH was divided by 2,829 Mb. Wilcoxon's rank sum test and Kruskal-Wallis' chi-squared test were performed to compare the rate of copy number change and genomic alteration between subgroups.

To determine successful predictive factors for the analysis of FFPE samples, Pearson's product-moment coefficient of correlation test was performed with the QC call rate.

The analyses above were done with the free statistical program, R (version 2.8.0) (<http://www.r-project.org/>) and the results were considered statistically significant when the p-value was <0.05.

REFERENCES

1. Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, *et al.* Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res* 2007;67:2544-2551.
2. Lyons-Weiler M, Hagenkord J, Sciulli C, Dhir R, Monzon FA. Optimization of the Affymetrix GeneChip Mapping 10K 2.0 Assay for routine clinical use on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 2008;17:3-13.
3. Thompson ER, Herbert SC, Forrest SM, Campbell IG. Whole genome SNP arrays using DNA derived from formalin-fixed, paraffin-embedded ovarian tumor tissue. *Hum Mutat* 2005;26:384-389.