

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19865

研究課題名(和文) 乳癌術前化学療法におけるクローン交替が治療効果に与える影響の解析とその克服

研究課題名(英文) Analysis of the clonal changes during neo-adjuvant chemotherapy for breast cancer and the effect on outcome of therapy.

研究代表者

及川 将弘(OIKAWA, Masahiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：90612416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アレイCGHの技術を用いて、治療抵抗性で予後不良な特殊型乳癌である乳腺扁平上皮癌の腫瘍内不均一性を検討した。稀な疾患である乳腺扁平上皮癌の細胞遺伝学的プロファイルが明らかになったとともに、腫瘍間不均一性、腫瘍内不均一性ともに大きいことが明らかになった。腫瘍内不均一性の検討により、NST部がSCC部の発生母地であることが示唆された。次に、次世代シーケンサー技術を応用することによって、より微量なDNAから、より精細なコピーナンバー解析が可能となった。この技術を応用して、血漿中のctDNAを用いたコピーナンバー解析が可能となり、術前化学療法前後のctDNAを用いたクローン交替の解析が進行中である。

研究成果の概要(英文)：Copy number analyses of five patients with SCC were conducted using array CGH technique. The cytogenetic profile of the SCC components indicated large intertumoral heterogeneity. There were between 2 and 160 copy number alterations per case, and no common copy number alterations were identified. The cytogenetic profiles of the paired SCC and NST components were similar but not identical. Although, in one case, a larger number of copy number aberrant regions were detected in the SCC component than the NST component. In this case, all of the NST component aberrations were present in the SCC component. This implies that the SCC component originated from the NST component. There were no common SCC-component-specific aberrations in the three NST-component cases. Our results demonstrate the cytogenetic inter- and intratumoral heterogeneity of SCC of the breast. Our comparison of cytogenetic profiles indicated that the SCC component originated from the NST component in one case.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：腫瘍内不均一性 乳癌 術前化学療法 circulating tumor DNA

1. 研究開始当初の背景

ゲノム不安定性は癌の重要な生物学的特徴である。ゲノム不安定性の高い腫瘍は、発達の過程で腫瘍内不均一性 (Intra-tumoral heterogeneity) を獲得し、治療抵抗性の原因となる。特に、最近の癌治療の主流となりつつある標的治療は、標的を持つ癌にはきわめて有効であるが、持たない癌については全く効果がないという特性があり、腫瘍内不均一性および治療中のクローン交替 (Clonal change) にどの様に対処するかが大きな課題となっている。

乳癌に対する術前化学療法は、術後化学療法と比べて同等の予後改善効果があるが、生体内における抗癌剤の治療効果の判定および腫瘍縮小による温存率の上昇が得られるため、広く一般臨床で行われている。術前化学療法の期間は半年程度であるため、この期間のゲノム変化 (塩基変異やコピー数変化) は腫瘍内不均一性によるクローン交替を表していると考えられる。

乳癌術前化学療法後に遺残した癌組織と治療前の組織のゲノム変化を次世代シーケンサーで解析した研究では、遺残組織に多くのクローン交替が認められており、クローン交替は化学療法不耐の乳癌の特徴である可能性がある (Balko, et.al., Cancer Discovery 2014)。また、再発乳癌患者において ctDNA をこれらの技術を用いて解析した研究では、原発巣で認められた変化が治療とともに交替し、治療抵抗性に与える影響が示唆されている (Gormally et.al., NEJM 2013)。しかし、乳癌術前化学療法中のクローン交替が、治療効果にどの様に影響しているかを詳細に検討した研究は未だ無い。

申請者はこれまでに、乳腺腫瘍のゲノム不安定性に着目して、多数の乳癌および乳腺腫瘍を分子生物学的手法を用いて解析し、新規の診断法・治療法の探索を行ってきた (Oikawa, et.al., Breast Cancer 2014, Oikawa, et.al., IJC 2014, Oikawa, et.al., Breast J 2011, Oikawa, et.al., Radiat Oncol 2011)。微量かつ劣化した検体から抽出した DNA を用いたアレイ CGH 解析について豊富な経験を有している (Nakao, Oikawa, et.al., Diagn Mol Pathol 2013, Oikawa, et.al., Eur J Med Genet 2010)。その中で、乳癌を根治させるためには、乳癌の持つ腫瘍内不均一性と治療中のクローン交替を克服しなければならないと考えた。

2. 研究の目的

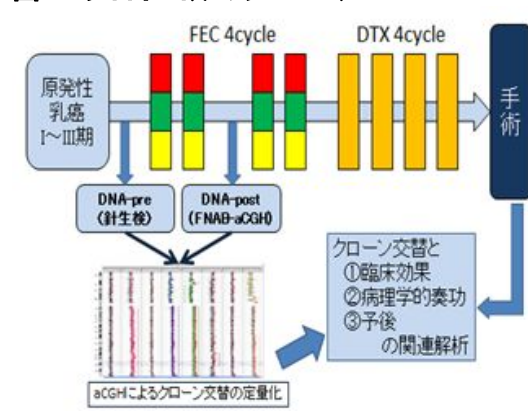
本研究は分子遺伝学的手法を用いて、乳癌術前化学療法における腫瘍内不均一性およびクローン交替の実態を明らかにし、治療効果に与える影響を解析するものである。研究期間内には以下のことを明らかにする

- (1) 乳癌術前化学療法中のクローン交替と治療効果・予後との関連

術前化学療法が行われる、書面での同意を得た乳癌症例を対象とする。化学療法開始前の針生検標本より tumor DNA (DNA-pre) を抽出する。術前化学療法 2 サイクル後、3 サイクル開始前の腫瘍より、以前に我々が報告した穿刺吸引細胞診の手技による tumor DNA (DNA-post) 抽出を行う (Oikawa, et.al., Breast Cancer 2014)。2 サイクル後の検体採取は、2 サイクル後の腫瘍縮小効果により治療レジメンを変更する response-guided therapy の優位性を示した GeparTrio の結果を根拠にした (Minckwitz, et.al., J Natl Cancer Inst 2008)。

DNA-pre と DNA-post を allele 毎のコピー数を検出可能な SNP microarray (Affymetrix 社 OncoScan) を用いて解析し、化学療法前後のクローン交替を定量的に評価する。クローン交替の有無と臨床的效果、病理学的効果、予後の関連を明らかにする。

図1. プロトコルのシェーマ



- (2) 乳癌術前化学療法前後の ctDNA 中の HER2 amplification の変化と治療効果・予後との関連

ヒトの循環血漿中には細胞から漏れ出した DNA が少量ではあるが循環しており、これは cell free DNA (cfDNA) と呼ばれている。担癌患者においては、癌細胞から漏出した DNA が循環しており、これを circulating tumor DNA (ctDNA) と呼ぶ。cfDNA 中には正常組織由来と癌組織由来の DNA が混在しているため、癌特有の変化を同定することにより ctDNA は同定される。ここで、HER2 遺伝子増幅は正常組織では起こり得ないゲノム変化であり、cfDNA 中の HER2 遺伝子増幅は ctDNA と判断できる。

本課題では、HER2 陽性と診断された治療前の乳癌症例を対象とする。治療開始前の血漿より ctDNA を抽出する (ctDNA-pre)。術前化学療法 + 抗 HER2 療法後の血漿より ctDNA を抽出する (ctDNA-post)。ctDNA-pre と ctDNA-post を微量の DNA でも検出可能な DNA microarray (Agilent 社 SurePrintG3) を用いて解析し、治療前後の ctDNA 中の HER2 遺伝子増幅の有無と臨床的效果、病理学的効果、予後の関連を明らか

にする。

保存検体の検出系を確立させた後は、これまでに蓄積した保存検体を用いた解析を追加する。

(3) クローン交替を指標とした乳癌術前化学療法の新たな臨床試験

上述の観察研究にて十分な Rationale が構築された場合は、新たな臨床試験を計画する。術前化学療法 2 サイクル後のクローン交替が術前化学療法の効果不良と関連していた場合、2 サイクル後のクローン交替の有無によってレジメン変更を行う治療法の有用性を検討する (clonal change-guided therapy)。また、HER2 陽性乳癌の術前化学療法における ctDNA 中の HER2 遺伝子増幅の残存が効果不良と関連していた場合、抗 HER2 療法追加 (Perutuzumab や lapatinib) の有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 乳癌術前化学療法中のクローン交替と治療効果・予後との関連

当院では 50-60 例/年で術前化学療法が行われている。対象は当院及び関連施設で術前化学療法が行われる Stage I- III 期の原発性乳癌症例で書面による同意が得られたものとする。

化学療法開始前の針生検標本 (FFPE 標本) より tumor DNA (DNA-pre) を抽出する。術前化学療法 2 サイクル後、3 サイクル開始前の腫瘍より、以前に我々が報告した穿刺吸引細胞診の手技 (FNAB-aCGH) による tumor DNA (DNA-post) 抽出を行う (Oikawa, et.al., Breast Cancer 2014)。ここで、2 サイクル後に検体採取を行うのは、2 サイクル後の腫瘍縮小効果により治療レジメンを変更する response-guided therapy の優位性を示した GeparTrio の結果を根拠にしている (Minckwitz, et.al., J Natl Cancer Inst 2008)。

DNA-pre と DNA-post を、allele 毎のコピー数を検出可能な SNP microarray (Affymetrix 社 OncoScan) を用いて CGH 解析を行う。このシステムは copy-neutral LOH も検出可能であり、B allele frequency を用いて腫瘍内不均一性も定量評価可能である。化学療法前と 2 サイクル後の cytogenomic profile の concordance rate を比較することにより、クローン交替の程度を定量化する (Arai, Oikawa, et.al., Lung Cancer 2012)。クローン交替と臨床的効果 (cCR, cPR, cSD, cPD) 病理学的奏功 (Grade0 ~ Grade3) 予後 (OS, DFS) の関連を解析する。

本課題では針生検標本 (FFPE 標本) からの DNA 抽出及びアレイ CGH への適用が重要であるが、申請者は劣化した、

微量な試料からの DNA 抽出およびアレイ CGH への適用に関して豊富な経験を有している (Nakao, Oikawa, et.al., Diagn Mol Pathol 2013, Oikawa, et.al., Eur J Med Genet 2010)。また、2 サイクル後の検体採取に用いる FNAB-aCGH では、十分量かつ高品質な tumor DNA が採取できること、腫瘍全体からの cytogenomic profile との一致率が 90% 以上であることが示されている (Oikawa, et.al., Breast Cancer 2014)。

(2) 乳癌術前化学療法前後の ctDNA 中の HER2 amplification の変化と治療効果・予後との関連

治療前の針生検にて HER2 陽性 (IHC にて HER2 3+ または HER2 2+ で FISH 陽性) と診断され、書面での同意を得た、術前化学療法を行う Stage I ~ III の乳癌症例を対象とする。

治療開始前の血漿より QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen 社) を用いて ctDNA を抽出する (ctDNA-pre)。標準的な術前化学療法 + 抗 HER2 療法 (FEC 4cycle → DTX+Herceptin 4cycle 等) 後の血漿より、同様の方法で ctDNA を抽出する (ctDNA-post)。

ctDNA-pre と ctDNA-post を、微量の DNA でも検出可能な DNA microarray (Agilent 社 SurePrintG3) を用いて CGH 解析し、HER2 遺伝子増幅の有無を確認する。治療前後の ctDNA 中の HER2 遺伝子増幅の変化と臨床的効果 (cCR, cPR, cSD, cPD) 病理学的効果 (Grade0 ~ Grade3) 予後 (OS, DFS) の関連を解析する。

前述の血漿を数か月間保管し、同様の方法で ctDNA 抽出・アレイ CGH 解析を行う。再現性が十分に確認された場合は、これまでに当院で蓄積した術前化学療法前後の保存血漿を用いた解析を追加する。転移性乳癌患者と異なり、原発性乳癌患者では ctDNA が微量であり、癌特異的なゲノム変化の検出感度が問題となる。今回使用する Agilent 社の microarray は、マニュアル上は 250ng の DNA を要求するが、申請者は 100ng 以下の DNA 量でも十分に amplification, deletion を検出できることを確認している。また、HER2 遺伝子増幅は通常数十 ~ 数百コピーの増幅であり、十分に検出可能と考える。それでも感度が足りない場合は、whole genome amplification を行った後に解析を行う。

(3) クローン交替を指標とした乳癌術前化学療法の新たな臨床試験

上述の観察研究にて十分な Rationale が構築された場合は、介入を伴う新たな臨床試験

を計画する。状況によっては、JBCRG や JCOG 等の臨床試験グループへ試験の提案を行う。

案 1：術前化学療法 2 サイクル後のクローン交替が術前化学療法の効果不良と関連していた場合

HER2 陰性乳癌において、2 サイクル後のクローン交替の有無によってレジメン変更を行う治療法の有用性を検討する (clonal change-guided therapy)。FEC2 サイクル後にクローン交替を認めた症例は Eribulin 4 サイクル後に DTX4 サイクルを行う群とそのまま FEC2 サイクル後に DTX4 サイクルを行う群にランダム化、クローン交替を認めなかった群は FEC4 サイクル追加後に DTX4 サイクルを行う群とそのまま FEC2 サイクル後に DTX4 サイクルを行う群にランダム化し、手術を行う。FEC2->Eribulin 群+FEC2->FEC4 群を clonal change guided therapy 群、FEC2->FEC2 群を conventional therapy 群として、病理学的効果 (Grade0 ~ Grade3) 予後 (OS, DFS) との関連を比較する。

案 2：HER2 陽性乳癌の術前化学療法における ctDNA 中の HER2 遺伝子増幅の残存が効果不良と関連していた場合

標準的な術前化学療法 (FEC4 サイクル DTX+Herceptin 4 サイクル、または、DTX+カルボプラチン+herceptin 6 サイクル) 後に ctDNA 中の HER2 遺伝子増幅が残存していた症例を対象に抗 HER2 療法をランダム化にて追加する。Arm A: lapatinib+capecitabine 4 サイクル、Arm B: Pertuzumab + Herceptin + weekly PTX 4 サイクル、Arm C: TDM1 4 サイクル。いずれかの Arm を追加した後、手術を行う。病理学的効果 (Grade0 s ~ Grade3) 予後 (OS, DFS) との関連を解析する。

4. 研究成果

- (1) アレイ CGH の技術により腫瘍内不均一性およびクローン交替を検出できるかを調べるため、病理形態学的に特徴的な形質をもつ乳癌扁平上皮癌 (SCC) と通常型乳癌 (NST) の混合癌において cytogenetic な解析を試みた。5 例の扁平上皮癌を対象に、通常型乳癌の混在を示す 3 症例においては各々の部位より tumor DNA を抽出し、SurePrint G3 8x60k microarray (Agilent 社) を用いたアレイ CGH 解析を行い、各症例および同一症例内の SCC 部と NST 部の細胞遺伝学的プロファイルと比較した。コピー数変化領域の数は 2 か所から 160 か所と症例によって大きな変化を認めたが、SCC で共通の変化領域は認められなかった。同一症例内で SCC 部と NST 部の比較を行った 3 例では、2 例で細胞遺伝学的プロファイルはほぼ一致した。1 例では SCC 部で多数のコピー数変化を認め、NST 部で見ら

れるコピー数変化はすべて一致していた。これにより、稀な疾患である乳癌扁平上皮癌の細胞遺伝学的プロファイルが明らかになったとともに、腫瘍内不均一性、腫瘍内不均一性ととも大きなことが明らかになった。腫瘍内不均一性の検討により、NST 部が SCC 部の発生母地であることが示唆された。この成果は全国学会・国際学会で発表し (学会発表 2), 3)、学術雑誌に掲載された (雑誌論文 2)。

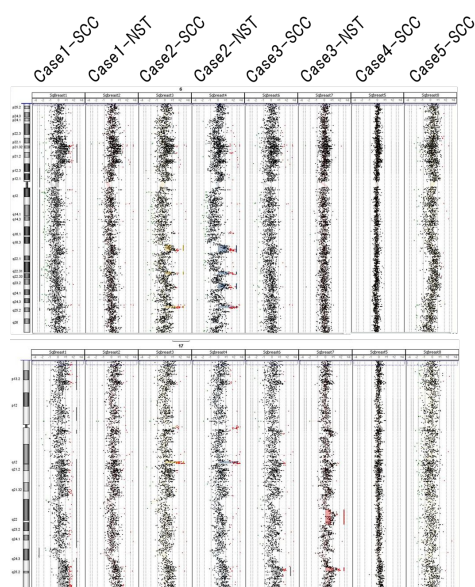


図 2. 6 番染色体 (上図) と 17 番染色体 (下図) の genomic profile.

全てのプローブの Log2 ratio が、染色体上の物理位置に従ってプロットされている。ゲノム変化は基線より右または左に縦線として表示されている。Case 2 と Case 3 では ERBB2 の amplification を認めた。Case 2 と Case 3 では SCC 部と NST 部の profile はほぼ一致しているが、Case 1 では SCC 部で非常に多くのゲノム変化を示した。また、Case 1 において NST 部で認められたゲノム変化は、全て SCC 部でも認められた。

- (2) HER2 陽性乳がん患者の術前化学療法後の血漿より ctDNA を抽出したが、ctDNA 濃度が低く、アレイ CGH での解析は困難であった。一方、Whole genome amplification (WGA) と次世代シーケンサー (NGS) を用いることでより高感度に、高精細なゲノム構造変化の解析が可能であることが近年の研究により明らかになった。今回、国際共同研究強化の機会を得て、MD Anderson Cancer Center, Nick Navin Lab にて、NGS を用いたゲノム解析手技を習得した。RARECYTE システム (RareVyte Inc. 社) を用いて、末梢血単核球分画より循環腫瘍細胞 (CTC) を一細胞として単離する手技を習得した。一つの乳癌細胞より、Next-generation sequence (NGS) 用のバーコードライブラ

リを作成し、whole genome copy number analysis, whole exome mutation analysis を行う手技 (HM-SNS, SNES) を習得した。さらに本技術を応用して、微量な血漿循環腫瘍 DNA (ctDNA) より、原発巣・転移巣の変異情報を用いることなく、whole genome copy number analysis, whole exome mutation analysis を行う手技 (PEGASUS: Plasma Exome and Genome Analysis by Size-Selection and Unbiased Sequencing) を習得した。これらの技術を活用して、転移・再発トリプルネガティブ乳がん患者における、抗がん剤治療中の腫瘍内不均一性と治療抵抗性に関わる因子を解析するための前向き観察研究を Department of Breast Medical Oncology と共同で企画立案し、開始した。

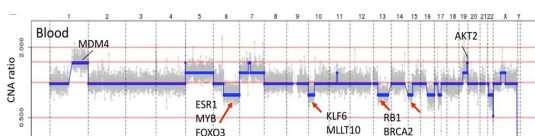


図3. 転移性 TN 乳がん患者の ctDNA を、PEGASUS protocol を用いて行った高精度 whole-genome copy number profiling
全ゲノムに渡って、高精度な amplification, deletion を認め、多くのがん遺伝子・がん抑制遺伝子が含まれている。

- (3) HER2 陽性乳がん患者の治療前後および治療継続中の血漿サンプルを十数例蓄積しており、これらに PEGASUS 法を適応して whole genome copy number analysis を行い、HER2 amplification の検出および治療効果と予後との関連を解析する予定である。転移・再発トリプルネガティブ乳がん患者における、抗がん剤治療中の腫瘍内不均一性と治療抵抗性に関わる因子を解析するための前向き観察研究 (Genomic Profiling of Therapy Resistance in Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Using Liquid Biopsies-PA17-0437) について、国内の施設でも IRB への申請を行い、サンプルの収集を開始する。サンプルの保管方法についての基礎実験は終了しており、CTC, ctDNA とともに冷凍での保存・輸送が可能である。集まったサンプルは国内で処理したのちに Navin Lab, MD Anderson Cancer Center へ送付し、共同で解析を行う予定である。乳がん癌性髄膜炎症例における CSF と血漿中の ctDNA のゲノムプロファイル解析については、この技術の feasibility に関する報告を国際学会にて行った (学会発表 1)。今後は同報告の論文化と、症例蓄積を行い、中枢神経系への転移に関わる機序の同定に繋がりたいと考えている。

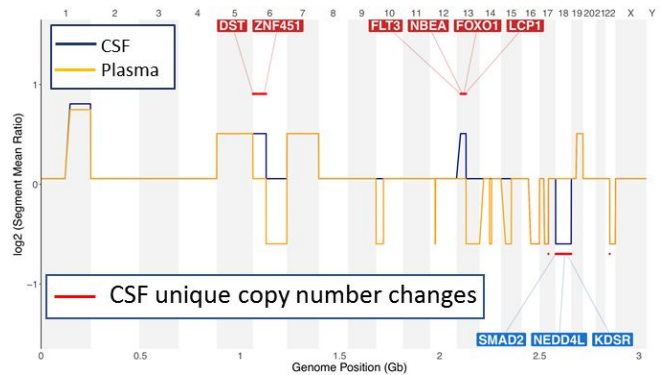


図4. 脳脊髄液と血漿から抽出した ctDNA の copy number profile の比較

両者の copy number change は多くが共有されているが、脳脊髄液特異的な変化も認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 8 件)

- 1) Otsubo R, Hirakawa H, Oikawa M, Baba M, Inamasu E, Shibata K, Hatachi T, Matsumoto M, Yano H, Abe K, Taniguchi H, Nakashima M, Nagayasu T. Validation of a Novel Diagnostic Kit Using the Semidry Dot-Blot Method to Detect Metastatic Lymph Nodes in Breast Cancer: Distinguishing Macrometastases From Nonmacrometastases. Clin Breast Cancer. 査読あり. 2017 Jul 15. pii: S1526-8209(17)30274-4.
- 2) Oikawa M, Igawa A, Taguchi K, Baba K, Ishida M, Akiyoshi S, Yano H, Nagayasu T, Ohno S, Tokunaga E. Cytogenetic analysis of metaplastic squamous cell carcinoma of the breast inter- and intratumoral heterogeneity. Breast Cancer. 査読あり. 2017 Nov;24(6):733-741.
- 3) Kuba S, Ishida M, Oikawa M, Nakamura Y, Yamanouchi K, Tokunaga E, Taguchi K, Esaki T, Eguchi S, Ohno S. Aromatase inhibitors with or without luteinizing hormone-releasing hormone agonist for metastatic male breast cancer: report of four cases and review of the literature. Breast Cancer. 査読あり. 2016 Nov;23(6):945-949.
- 4) Mussazhanova Z, Akazawa Y, Matsuda K, Shichijo K, Miura S, Otsubo R, Oikawa M, Yoshiura K, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko V, Kozykenova Z, Zhetpisbaev B, Shabdarbaeva D, Sayakenov N, Amantayev B, Kondo H, Ito M, Nakashima M. Association between p53-binding protein 1 expression and genomic instability in oncocyctic

follicular adenoma of the thyroid. Endocr J. 査読あり. 2016 May 31;63(5):457-67.

5) Otsubo R, Hatachi T, Shibata K, Yoshida T, Watanabe H, Oikawa M, Matsumoto M, Yano H, Taniguchi H, Nagayasu T. Evaluation of totally implantable central venous access devices with the cephalic vein cut-down approach: Usefulness of preoperative ultrasonography. J Surg Oncol. 査読あり. 2016 Jan;113(1):114-9.

6) Tomoshige K, Tsuchiya T, Otsubo R, Oikawa M, Yamasaki N, Matsumoto K, Miyazaki T, Hayashi T, Kinoshita N, Nanashima A, Nagayasu T. Intraoperative diagnosis of lymph node metastasis in non-small-cell lung cancer by a semi-dry dot-blot method. Eur J Cardiothorac Surg. 査読あり. 2016 Feb;49(2):617-22.

7) Tomoshige K, Matsumoto K, Tsuchiya T, Oikawa M, Miyazaki T, Yamasaki N, Mishima H, Kinoshita A, Kubo T, Fukushima K, Yoshiura K, Nagayasu T. Germline mutations causing familial lung cancer. J Hum Genet. 査読あり. 2015 Oct;60(10):597-603.

8) Oikawa M, Yano H, Matsumoto M, Otsubo R, Shibata K, Hayashi T, Abe K, Kinoshita N, Yoshiura K, Nagayasu T. A novel diagnostic method targeting genomic instability in intracystic tumors of the breast. Breast Cancer. 査読あり. 2015, Sep;22(5):529-35.

〔学会発表〕(計 3件)

1) Masahiro Oikawa, Naveen Ramesh, Emi Sei, Shanshan Bai, Min Hu, John de Groot, Rashmi K Murthy, Barbara O'Brien, Nicholas E Navin. Noninvasive genomic profiling of cerebral spinal fluid in breast cancer patient with leptomeningeal disease. AACR2018. 2018年4月14日~18日, シカゴ, 米国

2) Masahiro Oikawa, Akiko Igawa, Mayumi Ishida, Yoshiaki Nakamura, Sumiko Nishimura, Chinami Koga, Sayuri Akiyoshi, Yumiko Koi, Kenichi Taguchi, Shinji Ohono, Eriko Tokunaga. Cytogenetic analysis of squamous cell carcinoma of the breast reveals inter- and intra-tumoral heterogeneity.

SABCS2015, 2015年12月8日~12日, サンアントニオ, 米国

3) 及川将弘, 井川明子, 石田真弓, 中村吉昭, 西村純子, 古閑知奈美, 秋吉清百合, 厚井裕三子, 田口健一, 大野真司. 乳腺扁平上皮癌の細胞遺伝学的プロファイルと腫瘍内不均一性の検討. 第23回日本乳癌学会学術総会, 2015年7月2日~4日, 東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 将弘 (OIKAWA, Masahiro)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
客員研究員
研究者番号: 90612416

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし