

令和元年5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10456

研究課題名（和文）ホルマリン固定組織へ応用可能な多重遺伝子発現解析に基づく乳癌の再発予測法の開発

研究課題名（英文）Development of recurrence risk prediction model 95-gene classifier and its application to formalin-fixed paraffin-embedded tissues.

研究代表者

直居 靖人（Naoi, Yasuto）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30646211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：乳癌の再発予測法の開発は、術後補助化学療法の適応を決定する上で臨床現場のニーズが高く近年欧米では多重遺伝子診断法が開発され臨床応用されている。我々は本邦初の多重遺伝子診断法として、乳癌術後再発予測法「Curebest 95GC」を開発し2013年に実用化した。しかしながら本法では生検体：RNA later浸透組織や凍結乳癌組織（-80℃）を必要とするためその保存の煩雑さが普及の妨げとなっている。そこで、本研究では、Curebest 95GCをホルマリン固定パラフィン包埋組織検体（以下、FFPE検体）にも応用可能なように改良した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Curebest 95GCをホルマリン固定パラフィン包埋組織検体（以下、FFPE検体）にも応用可能なように改良した。本研究により95GCはFFPEに適応拡大することに成功し、2019年現在多数の病院施設からのFFPE検体を受け付けている。この事で、より多数の乳癌患者を対象に再発予後予測を施行し、癌個別化医療を実現する事ができた。またFFPE検体を多く有する米国4施設において、95GC性能検証研究を進め、良好な成績を得る事ができた。

研究成果の概要（英文）：We previously developed a 95-gene classifier (95GC) to classify ER-positive, HER2-negative, and node-negative breast cancers as high and low-risk groups. Although the 95GC was originally developed using fresh-frozen (FF) tissues, we aimed to apply this to formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. As the result, 95GC Recurrence Score was well correlated ( $R = 0.92$ ) with FF and FFPE tissues, and the concordance rate (94.6%) of high- and low-risk groups was also considerably high. Our 95GC was applicable to FFPE tissues with a high concordance rate with FF tissues.

研究分野：乳腺内分泌外科学

キーワード：乳癌 マイクロアレイ 再発予測 多遺伝子アッセイ FFPE

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

乳癌の再発予測法の開発は、術後補助化学療法の適応を決定する上で臨床現場のニーズが高く近年欧米では多重遺伝子診断法が開発され臨床応用されている。

我々は本邦初の多重遺伝子診断法として、乳癌術後再発予測法「Curebest 95GC」を開発し2013年に実用化した。

Curebest 95GC は乳癌原発巣における 95 遺伝子の発現パターンにより、乳癌の再発リスクを High-risk/Low-risk の 2 群に分けることで、High-risk 群にのみ術後化学療法を施行し、Low-risk 群には施行しないという個別化医療を実現する。現在 33 都道府県 92 病院施設に採用されている。

しかしながら本法では生検体：RNAlater 浸透組織（冷蔵検体）や凍結乳癌組織検体（-80℃）を必要とするためその保存の煩雑さが更なる普及の妨げとなっていた。

#### 2. 研究の目的

上記の背景があり、本研究では、Curebest 95GC をホルマリン固定パラフィン包埋組織検体（以下、FFPE 検体）にも応用可能なように改良した。

#### 3. 研究の方法

(1)FFPE 検体からの RNA 抽出条件の最適化：ホルマリン濃度や浸透時間の調整等によって FFPE 自体の制作過程を見直し、FFPE 専用に最適化した遺伝子抽出プロトコルを作成した。

(2)FFPE 検体由来の変性した RNA からの予測モデルの作成：Curebest 95GC の 95 個全ての遺伝子群を用いて FFPE 検体用の予測モデルを作成した。

(3)生物情報学 (Bioinformatics) における検討：低品質の遺伝子発現データを除去する数学的フィルタリングや、外れ値を検出する主成分分析図法等の開発によって、独自の Quality control system を確立した。

(4)FFPE 検体専用のマイクロアレイデータ正規化法 refRMA の構築：我々は新たな 1 症例を正確に客観的に予測診断するための FFPE 検体用正規化法 (refRMA) を確立した (Supplementary Figure1)。

(5)凍結/冷蔵検体を対象に、95GC recurrence score (95GC RS)を開発した。95GC RS は 0-100 の数字から成り、数字が低いほど再発の Low-risk、数字が高いほど再発の High-risk であることを示す。Low-risk/High-risk の境界値は 50 である。95GC RS は、術後 5 年/10 年再発率とよく相関し (Figure1)、数字が高いほど術前化学療法の奏効率 (pCR%) が高い事が示された (Figure2)。

(6)上記 FFPE 検体専用プロトコル及び 95GC RS の独立した Validation として、56 例の癌原発巣検体を正中切開して、片面から凍結検体、もう片面から FFPE 検体をペアで作成し、それぞれ 95GC High-risk/Low-risk 判定 及び 95GC RS を解析した。その結果、ペア間で高い 95GC 判定一致率 (94.6%) を得た。ペア間における 95GC RS の相関係数は 0.92 と高値を示した (Figure3)。

#### 4. 研究成果

本研究により 95GC は FFPE 検体に適応拡大することに成功し、2019 年現在、多数の病院施設からの FFPE 検体を受け付けている。この事で、より多数の乳癌患者を対象に再発予後予測を施行し、癌個別化医療を実現する事ができた。また FFPE 検体を数多く有する米国 4 施設において、95GC 性能検証研究を進め、良好な成績を得る事ができた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

2019 年 7 月 日本乳癌学会シンポジウム 直居靖人  
「乳癌診療における多重遺伝子解析」

2018 年 10 月 日本癌治療学会シンポジウム 直居靖人  
「乳癌再発予測を目的とした多遺伝子アッセイ Curebest 95GC」

2018年5月 日本癌治療学会シンポジウム 直居靖人  
「多遺伝子アッセイの開発」

〔図書〕(計 2件)

直居靖人、ニューサイエンス社、Medical Science Digest、2019年

(今夏に出版予定にて総ページ数不明)

「マイクロアレイを用いた多遺伝子診断法による乳癌個別化医療」

直居靖人、富士山マガジンサービス社、カレントセラピー、2017年、35(9): 846 -850

「Curebest® 95GC 日本で開発された多遺伝子発現解析」

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.curebest.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

Figure 1

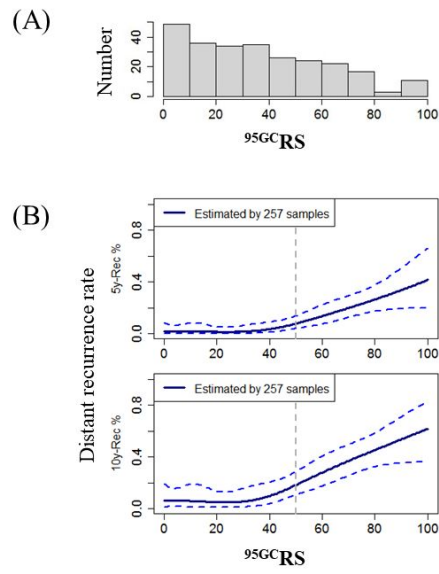


Figure 2

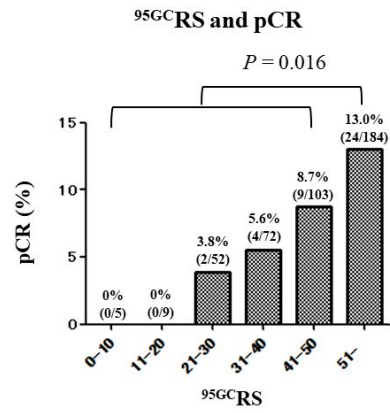
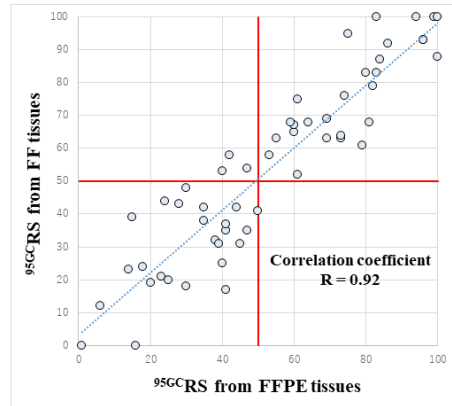


Figure 3

(A) Correlation between <sup>95</sup>GC-RS and FF and FFPE tissues



(B) Concordance of <sup>95</sup>GC results between FF and FFPE

		95GC for FFPE	
95GC for FF	Low	High	
Low	26	0	
High	3	27	

Concordance rate = 94.6%

Supplementary Figure 1

