

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701000

研究課題名(和文) 乳がんのバイオマーカー開発とその臨床的有用性を検証する後ろ向き観察研究

研究課題名(英文) Development of biomarker of Breast cancer and retrospective analysis to confirm clinical efficacy of the biomarker

研究代表者

高橋 信(Takahashi, Shin)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20431570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子TP53は乳がんの独立予後因子であることが知られている。本研究では、TP53ステータスを指標としたバイオマーカーの開発とその臨床的有用性を検討することを目的とした。88例の乳がんの手術検体を用いて、遺伝子発現パターンからTP53ステータスを診断する方法を開発した。また、公共のデータベースに公開されている508例の乳がんの遺伝子発現データを用いて、同診断法によって抗がん剤の治療効果が予測可能であることを示した。TP53ステータスを指標としたバイオマーカーによって乳がんの予後の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：TP53 is tumor suppressor gene and is known as independent prognostic factor in breast cancer. The aim of this study is to develop the biomarker to distinguish TP53 status and to confirm the efficacy of the biomarker. Eighty eight operated breast cancer samples were used. We developed the method to predict TP53 status using gene expression profile. Then we presented that the biomarker could predict the efficacy of chemotherapy by 508 breast cancer cohort data in public database. We expect that the biomarker will improve the prognosis of breast cancer.

研究分野：臨床腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：バイオマーカー TP53 遺伝子発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

世界一の長寿国となっている日本において、がんは国民病であり、2人に1人はがんを発症し、3人に1人はがんで亡くなる時代となっている。中でも乳がんは女性のがん罹患者数で第2位を占め、年々増加傾向にある。申請者らはこれまで乳がんおよび大腸がんのバイオマーカーに関する研究に取り組んできた。乳がんのバイオマーカーに関しては、マイクロアレイを利用して、乳がんの独立予後因子である *TP53* 遺伝子の変異の有無 (以下 *TP53* ステータス) を予測できる遺伝子発現プロファイル (以下 *TP53* signature) を作成した。*TP53* signature は細胞周期関連遺伝子を多数含み、*TP53* 変異型群で発現が高いことが示された。また、この *TP53* signature によって予測された *TP53* ステータスは、免疫組織染色法や直接シーケンス法によって決定された *TP53* ステータスよりも予後の予測性が明らかに高いことを報告した (Takahashi S. et al. Cancer Sci. 2008; Feb;99(2):324-32)。またこの成果で特許を取得した(「がんの予後予測法」特許第 4370409 号、2009 年 9 月 11 日特許登録)。現在、臨床応用を目指し、より簡便な multiplex RT-PCR 法を用いた診断法を開発中であり、新鮮凍結組織由来の RNA を使用する方法は完成に近づきつつある状況である。新鮮凍結組織検体 180 例を収集済みであり、データ蓄積を行っている。現在、乳がん診療において遺伝子発現プロファイルに基づいた病型分類である Intrinsic subtype (Perou CM, et al. Nature 2000;406:747-752) が非常に注目されている。Intrinsic subtype は luminal A, luminal B, HER2 enrich, basal like, normal like の 5 つのサブタイプに分類され、乳がんの多様性を遺伝子発現レベルから明解に説明した。このサブタイプが乳癌の臨床病理組織学的特徴や臨床像と良く対応し、このため、乳癌の分子生物学的背景の理解が大きく進歩したと言える。早期乳がんの治療指針として頻用される St. Gallen コンセンサスにおいても、最新の 2011 年版では治療法選択のもっとも重要な要素として Intrinsic subtype が取り入れられるに至った。luminal subtype はホルモンレセプター陽性のサブタイプであり、予後良好な luminal A と予後不良な luminal B に分類される。A と B の違いは細胞増殖能であり、増殖能の低いものを A、高いものを B と分類する。St. Gallen2011 では、この分類に Ki-67 ラベリングインデックス (LI) を推奨し、14% をカットオフとして、以下を luminal A、以上を luminal B とした。しかし、Ki-67LI は病理医によって診断にばらつきが大きいことが知られ、診断精度管理が難しいとされる。また診断に非常な手間を要することから、病理医の負担も非常に大きい。*TP53* signature は前述の様に細胞周期関連遺伝子を多く含み、細胞増殖能と非常に相関

性が高い。また、Intrinsic subtype 分類に使用される遺伝子セット (50 遺伝子) (Cheang MCU et al. J Natl Cancer Inst 2009; 101: 736-750) の中で、細胞周期に関連する 21 遺伝子のうち、7 遺伝子が *TP53* signature に含まれていた。これらの結果から、*TP53* signature は Ki-67LI の代替診断法となりうると考えた。

2. 研究の目的

Intrinsic subtype と *TP53* signature の関連性について検証する。

より簡便で安価に行える multiplex RT-PCR 法を利用した *TP53* signature の診断法を開発する。特に臨床的に簡便に使用できるようにするため、FFPE 組織を使用可能な診断系の開発を行う。

上記を利用し、過去の臨床検体 (FFPE サンプル) を用いた検証的な後ろ向き観察研究を行う。予後の予測性に関して、Ki-67LI と比較し、その有用性を検証する。

3. 研究の方法

TP53 signature と Intrinsic subtype の関連性解析

網羅的遺伝子発現データは Gene Expression Omnibus (GEO) 等のデータベース上に公開されているものが複数ある。Intrinsic subtype を分類する遺伝子セットに関しても既に公開されている。公開されている乳がんコホートのマイクロアレイデータをダウンロードし、Intrinsic subtype の分類を行う。また、*TP53* signature を用いて、*TP53* status も分類する。Intrinsic subtype と *TP53* ステータスの関連性について検討を行う。特に、luminal A と luminal B を分類可能かについて検証する。また、Ki-67LI は MKI67 遺伝子がコードするタンパク質を免疫染色したものであるため、MKI67 遺伝子の発現と、Intrinsic subtype、*TP53* ステータスとの関連性も検討する。予後データの得られるコホートについては予後の予測性についても検討する。数十～数百例程度のコホートデータが複数公開されていることを確認している。データ解析には網羅的遺伝子発現解析ソフトウェアである GeneSpring GX (Agilent) を使用する。

FFPE 由来の RNA を用いた multiplex RT-PCR 法の開発

これまでの研究で、2007 年以降に手術を行った乳がん症例 180 例の新鮮凍結組織を収集済みである。新鮮凍結組織由来の RNA については既に multiplex RT-PCR にて *TP53* ステータスのデータを取得している。これらの症例の FFPE 組織を収集し、RNA を抽出する。新鮮凍結組織用に構築した *TP53* signature の遺伝子セットより FFPE 組織用に最適な遺伝子セットを抽出する。分解した RNA でも増幅できるようにするため、増幅鎖長が短くなる様に全ブ

ライマーの設計を見直し、再設計する。各プライマーの組み合わせで非特異的増幅が起こらないことを全組み合わせについて確認する。必要に応じてプライマーの設計を見直す。完成した FFPE 用の診断系の結果と新鮮凍結組織用の診断系の結果を比較し、診断精度を検証する。

症例収集

手術後 10 年以上経過した早期乳がん症例の FFPE サンプルを収集する。東北大学病院、宮城県立がんセンター、星総合病院にて手術を施行した早期乳がん症例とする。これらの病院では本研究に関して倫理委員会の承認を既に受けている。同意書の取得が可能な症例には、文書を用いて説明し、同意を得る。死亡などにより本人より同意の得られない症例についてはできる限り家族より同意を得る。遺伝子発現解析に関する包括的同意が得られている症例に関しては、B 群検体として研究に使用する。100 例程度の症例収集を見込む。

FFPE 組織由来 RNA を用いた TP53 signature データの収集

前年度までに構築した FFPE 組織由来 RNA 用の Multiplex RT-PCR の診断系を使い、収集した FFPE サンプルの TP53 ステータスを診断する。

統計解析

TP53 ステータスと無再発生存期間 (Recurrence Free Survival; RFS)、全生存期間 (Overall Survival; OS) の関連性を統計学的に解析する。生存分析は Kaplan-Meier 法で行い、統計学的な差の有無を Log-Rank 法にて検定する。症例の臨床病理学的背景 (年齢、組織型、腫瘍径、組織学的グレード、Ki-67LI、ホルモンレセプター、HER2、リンパ節転移の有無、個数等) のデータとの関連性の検討、リスク分類、Intrinsic subtype (病理学的分類) との比較検討を行う。

4. 研究成果

インターネット上に公開されている術前化学療法を受けた HER2 陰性の乳がんコホート 508 例のデータを用いて以下の解析を行った。臨床病理学的因子と TP53 ステータスの関連性の検討では、Stage、Grade、ER ステータス、PR ステータス、Intrinsic subtype で統計学的な有意差を認めた。TP53 signature と Intrinsic subtype の関連性を検討した結果、Basal like および HER2 enrich subtype の症例の大多数は TP53 変異型症例であり、Luminal A ではほとんどの症例で野生型、Luminal B では約半数が変異型であった。また、MK167 遺伝子の発現量との関連については、変異型で有意に MK167 遺伝子の発現量が高い結果であった。術前化学療法の有効性について検討した結果、TP53 signature によって変異型と予測された症例では術前化学療法によって有意に病理学的完全寛解 (pCR)

率が高いことが示された (37.4% vs 3.7%)。また、TP53 ステータス変異型群では野生型群と比較して優位に術後の無再発生存期間が短いことが示された。pCR は既知の予後因子であるが、pCR ステータスと TP53 ステータスを組み合わせることによって、予後の予測精度が向上することが示された。具体的には、pCR が得られない症例で、かつ TP53 ステータスが変異型の症例の予後が極めて不良であった。さらに、これまでの予後因子で中間型となる Grade2 の症例の予後を予測することが可能であった。また、サブグループ解析として、ER 陽性群や Triple Negative 群においても、pCR の予測および、予後の予測が可能であることが示された。

臨床応用に向けて、FFPE 組織由来の RNA を利用した診断用 multiplex RT-PCR 法を開発した。具体的には、Beckman 社の GeXP システムを利用し、TP53 変異型で発現上昇する遺伝子 16 遺伝子、発現低下する遺伝子 7 遺伝子、内部コントロール遺伝子を選択し、特異的プライマーを FFPE 組織用に再作成した。マイクロアレイの発現データおよびと比較した結果、良好な相関性が確認され、TP53 ステータスを予測することが可能であった。新規に 88 例の Stage I-II の早期乳がんコホートを用い、作成した FFPE 用の TP53 ステータス診断法で検討した結果、変異型群で有意に無再発生存期間が短いことが確認された。これにより臨床応用可能な簡便な診断法が確立できたものとする。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1. Shin Takahashi, Takafumi Fukui, Nobuhisa Gondo, Takanori Ishida, Noriaki Ohuchi, Tadashi Nomizu, Youichiro Kakugawa, Chikashi Ishioka. TP53 signature predicts the efficacy of neoadjuvant chemotherapy (NAC) of breast cancer. 第 12 回日本臨床学会学術集会, 2014 年 7 月 17-19 日, 福岡 (発表確定)

2. Shin Takahashi, Takafumi Fukui, Nobuhisa Gondo, Takanori Ishida, Noriaki Ohuchi, Tadashi Nomizu, Youichiro Kakugawa, Chikashi Ishioka. TP53-mutation status by gene expression signature (TP53 signature) predicts efficacy of neoadjuvant chemotherapy (NAC) and recurrence after surgery in breast cancer. American Society of Clinical Oncology 50th annual meeting, 2014

年 5 月 30 - 6 月 3 日 Chicago, USA.

3. 高橋信, 福井崇史, 榎藤延久, 石岡千加史. TP53 ステータスを利用した乳がんの予後予測バイオマーカーの開発, 第 111 回日本内科学会総会・講演会, 2014 年 4 月 11-13, 東京

4. 高橋信, 福井崇史, 榎藤延久, 石田孝宣, 大内憲明, 野水整, 角川陽一郎, 石岡千加史. 遺伝子発現プロファイルによる TP53 ステータスの臨床的有用性, 第 51 回日本癌治療学会, 2013 年 10 月 24-26 日, 京都

〔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

高橋 信 (TAKAHASHI SHIN)
東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20431570

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：