

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461981

研究課題名(和文) マイクロアレイを用いた乳癌腋窩リンパ節転移予測法の開発

研究課題名(英文) Development of a prediction model for lymph node metastasis in luminal A subtype breast cancer

研究代表者

直居 靖人(Naoi, Yasuto)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・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)：本研究は、新たに乳癌腋窩リンパ節転移に関係する遺伝子群を同定し、癌リンパ節転移の分子機構及び病態を解明し、腋窩リンパ節転移予測法を開発することで臨床における治療戦略に応用するというテーマのもとで開始された。

研究成果としては、外部LuminalA乳癌の原発巣マイクロアレイデータ388例をThe training setとして解析して腋窩リンパ節転移に関係する遺伝子群292個を同定し、腋窩リンパ節転移予測法「genomic nodal index (GNI)」を開発した。外部の独立したvalidation setにおいても、「GNI」は良好な再発予後予測法であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to construct a prediction model for axillary lymph node metastasis (ALNM) using a DNA microarray assay for gene expression in breast tumor tissues. Luminal A breast cancers, diagnosed by PAM50 testing, were analyzed, and a prediction model (genomic nodal index (GNI)) consisting of 292 probe sets for ALNM was constructed in a training set of patients (n = 388), and was validated in the first (n = 59) and the second (n = 103) validation sets. AUCs of ROC were 0.820, 0.717, and 0.749 in the training, first, and second validation sets, respectively. GNI was most significantly associated with ALNM, independently of the other conventional clinicopathological parameters in all cohorts. It is suggested that GNI can be used to identify the patients with a low risk for ALNM so that sentinel lymph node biopsy can be spared safely.

研究分野：マイクロアレイを用いた多遺伝子診断法の開発

キーワード：乳癌 マイクロアレイ 多重遺伝子診断 腋窩リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

一般的に乳癌において腋窩リンパ節転移の有無は予後に大きく関係することが知られているが、リンパ節転移のメカニズムは未だ明らかになっておらず、現状ではあらゆる手段を用いても乳癌原発巣の検査により腋窩リンパ節転移を予測するのは困難である。腋窩リンパ節転移予測法を用いて術前に腋窩リンパ節転移の有無を高精度に予測することができれば、実臨床では術前ホルモン療法や術前化学療法の必要性を判断する際にたいへん有用な情報になるものと思われる。また本研究によりリンパ節転移の分子機構が解明されれば、それらを対象にした分子標的治療薬等の開発によりリンパ節転移が未然に防げる可能性がある。以上の背景にて本研究を開始した。

2. 研究の目的

近年マイクロアレイを用いることで数万個のヒト遺伝子の中から、様々な生命事象に関係する遺伝子群を同定することが可能になってきた。本研究では、乳癌原発巣を対象にしたマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、「乳癌の腋窩リンパ節転移に関係する遺伝子群を同定すること」、「その遺伝子群を用いた正確で再現性の高い乳癌腋窩リンパ節転移予測法: GNI (多重遺伝子診断 Multi-gene classifier) を開発すること」を目的にした。

3. 研究の方法

研究の最初に Public data base: GEO より、乳癌原発巣の欧米人マイクロアレイデータを選択しダウンロードを行った。選択基準は以下の通りである。「・U133 2.0 array を使用している。・リンパ節転移の有無の情報が含まれる症例。・術前抗癌剤 (NAC) 施行症例を除く。・stage 症例を除く。・Histology が特殊型のものを除く。・micrometastasis 症例は training set としては省き、validation set として、追加検討する。・CEL file の破損により読み込み不可の data は削除。」

その結果、11 施設 (cohorts) 計 1241 人の乳癌原発巣の欧米人マイクロアレイデータとそれらに関係するリンパ節転移の有無の情報を得ることができた。11 cohorts の内容は以下の通りである (GSE2***, GSE5***, GSE6***, GSE9***, GSE1****, GSE1****, GSE1****, GSE2****, GSE2****, GSE3****, GSE3****) (*: 伏字)。これらを対象に乳癌リンパ節転移に関係する網羅的遺伝子検索を施行した。また大阪大学医学部附属病院における乳癌手術施行例の原発巣のマイクロアレイデータも validation set として作成した。

4. 研究成果

Public data base: GEO より、乳癌原発巣の欧米人マイクロアレイデータを選択しダ

ウンロードを行った総計 1241 人の乳癌原発巣の欧米人マイクロアレイデータ全体に対して網羅的な解析を試みたものの、全体においてリンパ節転移に関係するような遺伝子群を効率よく選択することは困難であった。開発用の Training set において有意差がでて、検証用の Validation set において良好な有意差を示すことは困難であった。その原因として種々の解析を行った結果、以下のような解析困難に関係する理由 1,2 が判明した。

理由 1 「リンパ節転移に関しても、Intrinsic subtype ごとに異なる機構を持つらしいことがわかってきた。」総計 1241 人に対して、Perou らが開発した subtype 分類「PAM50」を適用すると、Luminal A (468), Luminal B (319), HER2-enriched (140), Basal (248), Normal-like (66) 等に分かれ、それぞれにおいてリンパ節転移率が大きく異なった。またそれぞれの subtype において解析を行ったところ、各々でリンパ節転移に関係する Pathway (遺伝子群) の傾向が大きく異なることが判明しつつある。従って全 subtype において共通してリンパ節転移に関係するような遺伝子群を効率よく選択することは困難であると考えられた。

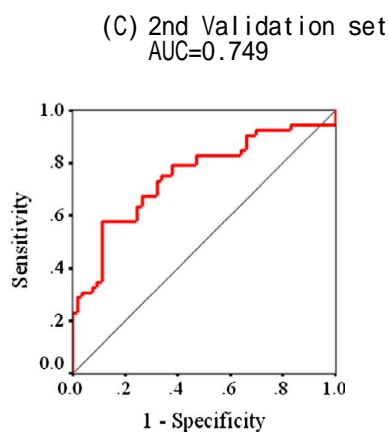
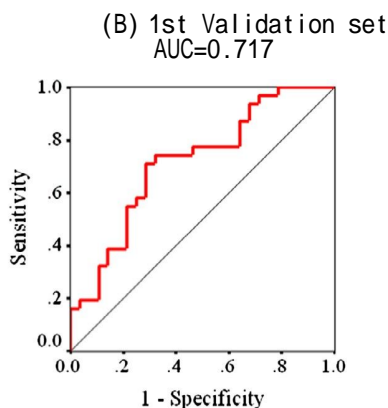
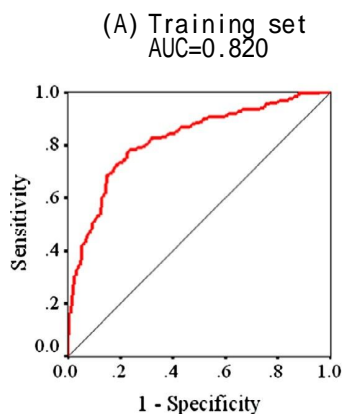
理由 2 「総計 1241 人の乳癌原発巣のマイクロアレイデータは 11 病院施設 (cohorts) において制作されたが、各々の施設間格差が存在することが判明した。」施設間格差は網羅的解析において大きな障壁になり、関連遺伝子群を効率よく選択することが困難になる。

以上 2 つの理由により、総計 1241 人に対して、全 subtype、全病院施設に共通してリンパ節転移に関係する遺伝子群を選択することは困難であると考えられた。

そこで総計 1241 人を各 subtype に分類した上で、各々の subtype において特徴的にリンパ節転移に関係する Pathway (遺伝子群) を探索する方針とした。また、各々の施設間格差に対しては、数学的補正法を複数通り試し、「RMA+Mean-Centering 法」を採用することにした。

次に外部データのうち LuminalA 乳癌の原発巣マイクロアレイデータ 388 例を対象に The training set として解析して腋窩リンパ節転移に関係する遺伝子群 292 個を同定し、腋窩リンパ節転移予測法「genomic nodal index (GNI)」を開発した。次に独立した validation set として、当科 59 例 (The first validation set) と、同じく当科 23 例と外部データを含む計 103 例 (The second validation set) に GNI を適用して性能を検証した。The training set、The first validation set、The second validation set における AUCs of ROC は、それぞれ 0.820, 0.717, 0.749 と良好な結果であった。

(次ページに結果図示)



これらは既存の腋窩リンパ節転移予測法 MSKCC nomogram よりも良好な結果であった。また、多変量解析において「GNI」は他の臨床病理学的因子よりも最も有意水準の高い独立した予後予測法であることが示された。このような結果から、高精度な腋窩リンパ節転移予測法である「GNI」を用いて腋窩リンパ節転移の有無を高精度に予測することで、実臨床では術前ホルモン療法や術前化学療法の必要性を判断する際に有用な情報になる可能性があると思われる。

最後に今後の推進方策を述べる。開発した腋窩リンパ節転移予測法「GNI」は Luminal A 乳癌専用の予測モデルである。今回、The training set、The first validation set、

The second validation set のいずれにおいても良好な予測精度を示すことができたが、実臨床で用いるには前向きにさらに多くの症例で検討を重ねる必要があると思われる。また、乳癌は subtype ごとに生物学的特性が異なるため今回は Luminal A 乳癌専用の予測モデルを開発したが、Luminal B や Basal, HER2-enriched type における腋窩リンパ節転移予測法も続けて開発する必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Development of a prediction model for lymph node metastasis in luminal A subtype breast cancer: The possibility to omit sentinel lymph node biopsy.

Chiaki Nakauchi, Yasuto Naoi, Kenzo Shimazu, Ryo Tsunashima, Minako Nishio, Naomi Maruyama, Atsushi Shimomura, Naofumi Kagara, Masashi Shimoda, Seung Jin Kim, Shinzaburo Noguchi

Cancer Lett. 2014 Oct 10;353(1):52-8.
DOI: 10.1016/j.canlet.2014.07.003.

72-gene classifier for predicting prognosis of estrogen receptor-positive and node-negative breast cancer patients using formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissues.

Nishio M, Naoi Y, Tsunashima R, Nakauchi C, Kagara N, Shimoda M, Shimomura A, Maruyama N, Shimazu K, Kim SJ, Noguchi S

Clin Breast Cancer. 2014 Jun;14(3):e73-80.
DOI: 10.1016/j.clbc.2013.11.006.

Construction of novel immune-related signature for prediction of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer.

Sota Y, Naoi Y, Tsunashima R, Kagara N, Shimazu K, Maruyama N, Shimomura A, Shimoda M, Kishi K, Baba Y, Kim SJ, Noguchi S.

Ann Oncol. 2014 Jan;25(1):100-6.
DOI: 10.1093/annonc/mdt427.

〔学会発表〕(計2件)

直居靖人、疾患マーカーの探索と利用

第 87 回 日本生化学会大会 フォーラム
2014 年 10 月 15 日 ~ 2014 年 10 月 18 日
国立京都国際会館 (京都市)

直居靖人, 95GC as a Predictor
of Recurrence Risk for ER+/Node-
Breast Cancer Patients.

第 114 回 日本外科学会定期学術集会 ワ
ークショップ

2014 年 04 月 03 日 ~ 2014 年 04 月 05 日
国立京都国際会館 (京都市)

6 . 研究組織

(1) 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