

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02870

研究課題名(和文)エクソーム解析によるゲノムプロファイリングに基づいた乳癌個別化治療の開発

研究課題名(英文)The development of personalized treatment for breast cancer based on genome profiling using whole exome sequence

研究代表者

金昇晋(Kim, Seung Jin)

大阪大学・医学系研究科・招へい准教授

研究者番号：90346213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌組織と末梢血からDNAを抽出し全エクソーム解析(WES)を術前化学療法で加療した乳癌120例で行い、抗癌剤感受性予測因子を検討した。Homologous Recombination Deficiency (HRD) 陽性率は25%で、陽性例は陰性例より病理学的完全奏効率(pCR)が有意に高かった(39% vs 10%,  $P=0.003$ )。HRDと腫瘍浸潤リンパ球(TIL)によるpCR予測は、HRD陽性/TIL陽性 56%、陽性/陰性 29%、陰性/陽性 18%、陰性/陰性 6%であった。WESより求めたHRDは、単独またはTILとの組み合わせで抗癌剤感受性予測因子になることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子損傷修復機構の破綻(Homologous Recombination Deficiency, HRD)はがん化だけでなく、PARP阻害剤やプラチナ系抗癌剤の感受性にも関与する。乳癌では特にトリプルネガティブにおいて、HRDは感受性因子になることが報告されている。しかし、本研究はゲノム情報から求めたHRDが、最も汎用されている抗癌剤治療であるタキサン系-アンスラサイクリン系抗癌剤の感受性を、しかも乳癌では最も頻度の高いサブタイプであり抗癌剤感受性の低いルミナル乳癌において予測可能であること示した。本結果は、実臨床の場で多くの乳癌患者に応用できることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study conducted whole exome sequencing analysis of somatic and germline DNAs from biopsied tumor samples and their peripheral blood leukocytes (PBL), respectively, in 120 breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy in order to evaluate the predictive factors. Of 120 tumors, 30 were determined to be homologous repair deficiency (HRD)-high tumors, which had significantly higher pCR rates (39% vs. 10%,  $P = 0.003$ ). When using a combination analysis of HRD and TIL, the pCR rates were different according to subgroups as follows: HRD-high/TIL-high 56%, high/low 29%, low/high 18%, and low/low 6%. This study showed that the HRD might be predictive for neoadjuvant paclitaxel - FEC therapy using alone as well as a combination with TIL.

研究分野：乳癌外科学

キーワード：エクソーム解析 乳癌 術前化学療法 HRD 感受性 予後

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、乳癌の術後再発リスクは、薬物療法の進歩により確実に低下しているが、すべての患者がその恩恵を享受できるわけではない。化学療法の場合、現在世界中で最も汎用されているアンスラサイクリン系とタキサン系抗癌剤による逐次療法を行ったとしても、大規模第3相試験の結果では、術後10年の無病生存率は70%前後であり、約1/3の症例は治療抵抗性を示し再発をきたしている。一方で、無再発症例の中には手術のみで治癒していた症例も40%程度存在すると考えられている。つまり、多くの症例が無効であったり、不必要な化学療法を受けているのが現状であり、精度の高い抗癌剤感受性診断の開発は我々に課せられた大きな課題である。

一方、癌は“ゲノム疾患”であることが最新の研究から明らかとなっているが、Mendel 遺伝性疾患とは違い、様々な遺伝子異常が蓄積し、正常な分子経路が破綻した結果、自律的な細胞増殖や転移が引き起こされている。さらに同じ癌腫、同じ病期であったとしても、個々の腫瘍によって生じているゲノム異常には多様性が大きく、それが治療反応性の違い、ひいては予後の違いとなって実臨床に反映されていると思われる。このように多様性に富んだ癌に対して、個々の症例において的確に病態を把握し、適切な治療(個別化治療)を行うには、従来の感受性因子のみならず、網羅的にゲノム変異を調べ、総合的に解析する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、術前化学療法(NAC)で治療を行った乳癌患者において、化学療法施行前に採取した癌組織を用いて全エクソームシーケンス(WES)を行い、乳癌の遺伝子変異プロファイルを行い、抗癌剤感受性および予後との関係を検討し、ゲノム情報に基づく精度の高い個別化治療の開発を行うことである。

### 3. 研究の方法

大阪大学医学部附属病院において、paclitaxel-FEC ± trastuzumab で NAC を施行した原発性乳癌120例を対象とした < Luminal type (HR+/HER2-, n=61)、HER2 type (HR ± /HER2+, n=44)、triple negative 乳癌 (TNBC) (HR-/HER2-, n=15 例) >。NAC 前に採取した生検乳癌組織と末梢血から DNA を抽出し WES で homologous repair deficiency (HRD) score (cut-off 値 42) を解析し、臨床病学的因子及び抗癌剤感受性との相関について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) HRD score

WES と SNP array (OncoScan) による HRD score の相関を、両検査法で測定した 47 例を対象に検討したところ、非常に高い相関を認めた (Pearson  $r = 0.909$ ,  $P = 9.95e-19$ )。

#### (2) HRD 高値群の臨床病理学的特徴

120 例中、HRD 高値群は、30 例、低値群は 90 例であった。HRD 高値群の臨床病理学的特徴について検討を行った。HRD 高値群は低値群に比べて、有意に cN0 例 ( $P = 0.010$ )、Ki67 高値例 ( $P = 0.014$ )、ER 陰性例 ( $P = 0.007$ )、PR 陰性例 ( $P = 0.021$ ) を多く認めたが、HER2 発現とは有意の相関を示さなかった ( $P = 0.662$ )。

ER/PR/HER2 の発現に基づく subtype 別の HRD score では、TN type の HRD score (median: 44, range: 3 - 85) は、luminal type (median: 20, range: 0 - 85)、luminal - HER2 type (median: 23, range: 1 - 70)、HER2 type (median: 28, range: 1 - 61) に比べてそれぞれ有意に高値であった ( $P = 0.023, 0.016, 0.033$ , respectively) (Figure 1.)。HRD 高値群の割合においても、TN type は 66.7% (10/15 例) で、luminal type 16.4% (10/61 例)、luminal - HER2 type 21.7% (5/23 例)、HER2 type 23.8% (5/21 例) に比べて有意に高率であった ( $P = 2.78e-4, 0.015, 0.026$ , respectively)。一方、luminal type、luminal - HER2 type、HER2 type の間では HRD score に有意差は見られなかった (luminal vs. luminal - HER2,  $P = 0.802$ ; luminal vs. HER2,  $P = 0.667$ ; luminal - HER2 vs. HER2,  $P = 1.000$ )。

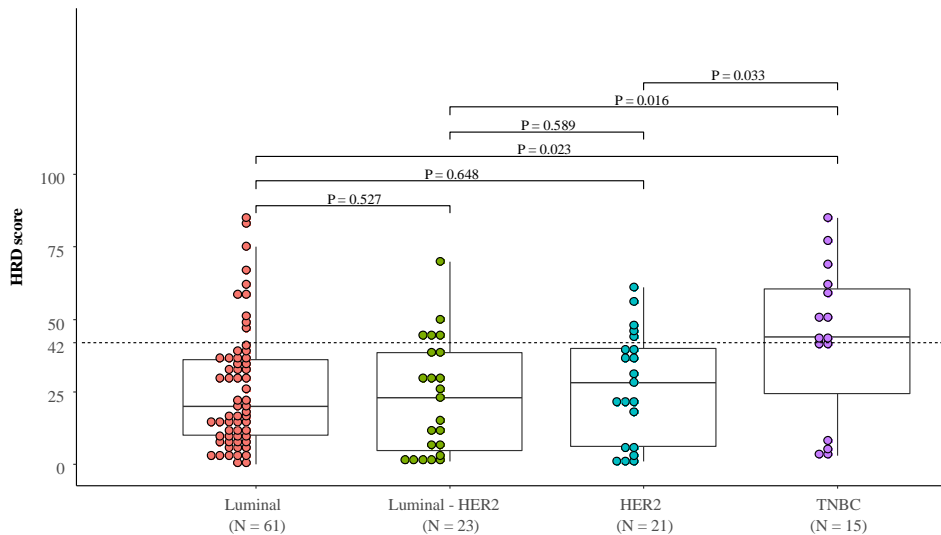


Figure 1. HRD scores according to breast cancer subtypes

### (3) HRR genes の germline mutation および somatic mutation の頻度

今回、120 例において HRR gene mutation を germline および somatic においてそれぞれ検討した。Germline では、BRCA2 8 例 (6.7%)、BRCA1 2 例 (1.7%)、RAD54B 2 例 (1.7%)、PALB2 1 例 (0.8%) の 4 遺伝子に 13 (10.8%) variants (12 例) を認めた。一方、germline mutation 12 例を除く 108 例の somatic mutation 単独群では、29 遺伝子に 40 (37.0%) variants (27 例) を認めた。29 遺伝子の中で最も variant の頻度が高かったのは RECQL4 5 例 (5.0%)、次いで ATM が 3 例 (2.8%)、ATR、FANCG、MUS81、POLQ、TOPBP1 が各 2 例 (1.9%) で、他は各 1 例 (0.9%) であった。次に、この 29 遺伝子を、HRR における機能で見ると、“core” gene が 9 で、“related” gene が 20 であった。

### (4) HRR gene mutation と HRD score との相関

Germline - HRR gene mutation 群の HRD score (median: 50, range: 26 - 85) は、somatic - HRR gene variants 群の HRD score (median: 29, range: 2 - 77) や wild type の HRD score (median: 18, range: 0 - 85) に比べて有意に高値であった ( $P = 0.002$  and  $P = 1.44e-4$ , respectively) (Figure 2.)。また、HRD 高値群の割合でも germline - HRR gene mutation 群は 66.7% (8/12 例) で、somatic - HRR gene mutation 群 22.2% (6/27 例) や wild type 群 19.8% (16/81 例) に比べて有意に高率であった ( $P = 0.012, 0.002$ , respectively)。

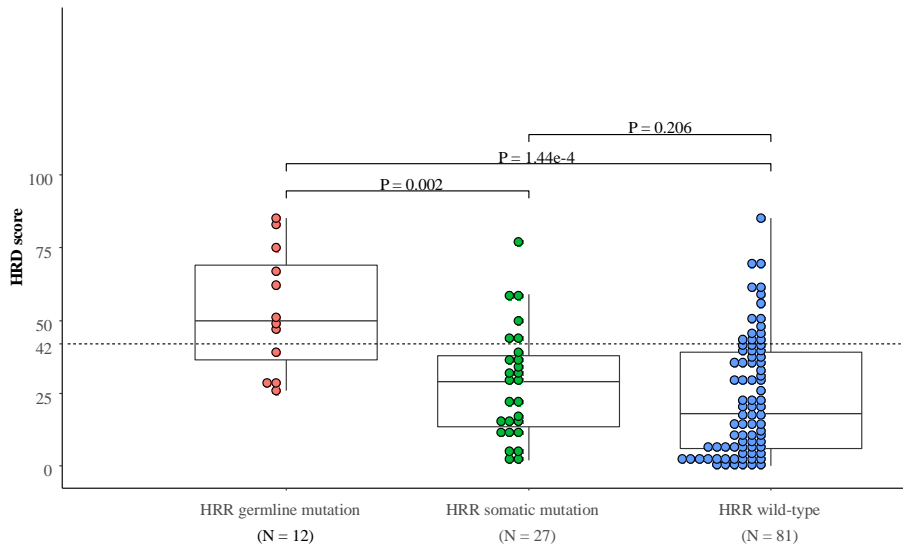


Figure 2. HRD scores according to HRR gene mutations

Germline mutation 群で LOH を認めたのは 11/13 variants (BRCA1 2/2, BRCA2 7/8, PALB2 1/1, RAD54B 1/2)、11 症例で、そのうち 8 例 (72.7%) は HRD 高値群で、LOH を認めなかった 1 例は HRD 低値群であった。一方、somatic mutation 単独群の HRD score は、wild type 群と比較しても有意差を認めなかった。Somatic variants を function から“core” gene と“related” gene に分類して HRD score を検討しても、両群間に有意差を認めなかった ( $P = 0.292$ )。しかし、LOH は 40 variants 中 9 遺伝子、7 症例に認めたが、LOH (+) 群 (7 例) の HRD score は LOH (-) 群 (20 例) に比べて高かったものの (numerically higher) 統計学的に有意差は認めなかった ( $P = 0.103$ )。さらに multiple mutation and/or LOH (+) 群 (9 例) の HRD score は、single mutation and/or LOH (-) 群 (18 例) に比べてより高い傾向を示した ( $P = 0.090$ )。

#### (5) HRD score と抗癌剤感受性との相関

HRD score と NAC の効果との関係について検討した。trastuzumab 併用例は今回の検討からは除外した。Trastuzumab 非使用例 94 例のうち、HRD 高値群は 23 例中 pCR を 9 例 (39.1%) に認め、HRD 低値群 (pCR: 7/71 例 (9.9%)) に比べて有意に高率であった ( $P = 0.003$ )。さらに、subtype 別に HRD score と pCR との相関を検討したが、HER2 type および TN type では HRD score と pCR の間には有意な相関を認めなかった ( $P = 1.000$  and  $0.608$ , respectively)。しかし、luminal type では HRD 高値群の pCR 率は 20% (2/10 例) で、HRD 低値群の 3.9% (2/51 例) に比べて統計学的な有意差は認めないものの高い傾向を認めた ( $P = 0.122$ )。

そこで、luminal および luminal-HER2 type (trastuzumab 使用例は除外) を対象に HRD score と NAC 効果との関係を検討した。この対象者の pCR は 70 例中 4 例と event 数が少ないため、endpoint を near pCR 以上として NAC 高感受性との相関を uni- and multivariate 解析にて検討を行った。Univariate 解析において、NAC 高感受性 (pCR or near pCR) と age、cT、cN、histologic grade、Ki67、PR、HER2 との間には有意な相関は認めなかった。しかし、TIL は高値群が低値群に比べて (OR 3.83, CI: 1.03 - 14.47,  $P = 0.042$ )、HRD score は高値群が低値群に比べて (OR 6.19, CI: 1.46 - 26.61,  $P = 0.012$ )、それぞれ有意に高い NAC 高感受性を認めた。さらに multivariate 解析では、TIL (OR 4.50, CI: 1.10 - 20.14,  $P = 0.038$ ) および HRD score (OR 7.22, CI: 1.57 - 36.22,  $P = 0.012$ ) とともに NAC 高感受性と有意な相関を

認め、独立した効果予測因子であることが示された。そして、この両者を組み合わせて paclitaxel-FEC に対する感受性を検討すると、高感受性の割合は、HRD/TIL が(高/高)66.7%、(高/低)37.5%、(低/高)26.7%、(低/低)6.8%で、HRD/TIL (高/高)群は(低/低)群に比べて有意に高い感受性を認めた ( $P = 0.027$ )。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kim SJ, Sota Y, Naoi Y, Honma K, Kagara N, Miyake T, Shimoda M, Tanei T, Seno S, Matsuda H, Noguchi S, Shimazu K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Determining homologous recombination deficiency scores with whole exome sequencing and their association with responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transl Oncol.	6. 最初と最後の頁 100986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2020.100986.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金 昇晋, 草田 義昭, 直居 靖人, 他、
2. 発表標題 NAC施行乳癌症例を対象としたWhole Exome SequencingによるHomologous Recombination Deficiency Score解析
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 草田 義昭, 金 昇晋, 加々良 尚文, 他
2. 発表標題 術前化学療法施行乳癌症例を対象としたWhole Exome SequencingによるTumor Mutational BurdenとMicrosatellite Instabilityの解析
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	下田 雅史  (Shimoda Masafumi)  (30644455)	大阪大学・医学系研究科・講師    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------