

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06851

研究課題名(和文) TP53 signatureの診断キット開発と検証のための後ろ向き観察研究

研究課題名(英文) Development of TP53 signature in vitro diagnostics (IVD)

研究代表者

高橋 信 (Takahashi, Shin)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：20431570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はTP53 signatureの臨床応用を目指し、簡便な診断キットの開発を行うことである。

nCounterを用いたTP53 signatureのプローブセットを作成した。Stage I-IIの早期乳がんコホート(n=174)を用いて、TP53 signatureを取得した。単変量および多変量解析の結果からTP53 signatureが最もRFSと関連する因子であることが明らかとなった。また、網羅的遺伝子発現解析を行い、Mammaprint、OncotypeDXおよびPAM50と予後予測性の比較を行ったところ、TP53 signatureがもっとも予後の予測性が高いことが示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a simple in vitro diagnostic kit aiming at clinical application of TP53 signature.

Probe set of TP53 signature for nCounter was created. TP53 signature data was obtained from the early stage breast cancer cohort (n = 174). Univariate and multivariate analysis results revealed that TP53 signature is the most relevant factor to RFS. In addition, comprehensive gene expression analysis was performed, and the prognostic potential of TP53 signature was compared with Mammaprint, Oncotype DX, and PAM 50. It was shown that TP53 signature had the highest prognostic predictability.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：バイオマーカー 遺伝子発現プロファイル TP53 予後予測 治療効果予測

1. 研究開始当初の背景

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。近年、網羅的遺伝子発現解析が乳がんの生物学的特徴の把握(文献) 予後(文献)および薬剤感受性(文献) 予測に有効であることが明らかとなった。欧米では PAM50、Oncotype DX®、Mammaprint®等が臨床で使用可能となっている。しかし、これらはいずれも約30-40万円程度と非常に高価な検査であり、一般的に利用できるものとはなっていない。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 (TP53 ステータス) を予測できる遺伝子発現プロファイル (TP53 signature) を作成した。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; 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)。また、術前化学療法を行った乳がん 508 例を対象とした研究で、TP53 signature によって、病理学的完全奏効 (pathological CR: pCR) や術後再発の有無の予測性が高いことも示した (Takahashi S. et al. J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr 11069))。このように、TP53 signature は臨床的に有用性が高く、臨床応用が可能となれば乳がんの治療法の選択において重要な情報を提供するものとなりうる。

最近の研究機器の進歩により、遺伝子発現プロファイルをより簡便に、また安価に検討することが可能となってきた。nCounter (NanoString 社) は RNA の発現量を PCR による増幅なしにダイレクトに検出することを可能にしたユニークな遺伝子発現解析装置であり、最大 800 遺伝子の発現を一度に検出可能である。操作は非常に簡便で、データの精度も非常に高いことが示されている。本機器は既に米国 FDA にて臨床検査機器としての承認を得ている。

本邦においても多数のバイオマーカー研究が行われているが、その出口戦略に乏しいことが指摘されている。研究が単なる研究で終わることなく、その知見を国民に還元することが重要である。本研究はこれまでの研究の成果である TP53 signature の臨床応用を目指した研究であり、診断キットの作成と PMDA への承認申請のための検証データ取得を目指すものである。

2. 研究の目的

- ・TP53 signature の臨床応用を目指した簡便な診断キットの開発を行う。
- ・その診断キットを利用したデータ検証のための後ろ向き観察研究を行う

3. 研究の方法

(1) 早期乳がんを対象とした nCounter による TP53 signature の診断精度の検討

nCounter 用 TP53 signature 診断キット (プローブセット) の作成およびデータ精度の検証

nCounter による TP53 signature データの収集

TP53 ステータスと臨床病理学的因子の関連性の検討および予後の予測性の検証

(2) 術前化学療法症例を対象とした TP53 signature と効果予測性の検証

術前化学療法施行症例検体の収集と nCounter による TP53 signature データの収集

TP53 ステータスと術前化学療法の効果および予後の予測性の検証

(3) 上記データを総合的に検討し、診断キットとしての性能評価を行う

【平成 27 年度】

(1) 早期乳がんを対象とした nCounter による TP53 signature の診断精度の検討

nCounter 用 TP53 signature 診断キット (プローブセット) の作成

TP53 signature は 33 遺伝子より構成されるが、この 33 遺伝子と内部コントロール遺伝子 (5 遺伝子程度) の発現を検出可能な nCounter 用のプローブセットを作成する。プローブの作成に当たっては、クロスハイブリダイゼーションの可能性を十分考慮し、その可能性のあるプローブは除外する。

東北大学病院コホート 37 検体ではマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現データおよび multiplex RT-PCR のデータが得られているため、この 37 検体に対して nCounter での TP53 signature を取得し、マイクロアレイデータと比較することでデータ精度の検討を行う。データ精度の低いプローブに関しては、再設計を行い、マイクロアレイデータと相関性の高いプローブセットを作成する。

nCounter による TP53 signature データの収集

星総合病院コホート、宮城県立がんセンターコホートを用いて nCounter による TP53 signature を取得する。これらの症例は、すでに multiplex RT-PCR のデータが得られているため、相互のデータを比較検討し、と同様にデータ精度の検証を行う。

(2) 術前化学療法症例を対象とした TP53 signature と効果予測性の検証

術前化学療法施行症例検体の収集と nCounter による TP53 signature データの収集

共同研究機関である、東北大学病院・乳腺外科、宮城県立がんセンター・乳腺科、星総合病院・外科より、術前補助化学療法を施行した症例を収集する。症例は長期的な予後を検討する必要があるため、手術より5年以上経過した症例で、化学療法施行前の生検 FFPE 組織が入手可能な症例とする。入手できた症例から順に nCounter で TP53 signature を取得する。

【平成 28 年度以降】

(1) 早期乳がんを対象とした nCounter による TP53 signature の診断精度の検討

TP53 ステータスと臨床病理学的因子の関連性の検討および予後の予測性の検証

27 年度までに得られた TP53 signature から TP53 ステータスの診断を行う。診断は TP53 変異型で発現上昇する遺伝子群の発現和と発現低下する遺伝子群の発現和の比を算出する。東北大学病院コホートは TP53 遺伝子変異解析を実施済みであり、そのステータスを元に、適切なカットオフ値を設定する。このカットオフ値に基づき、星総合病院コホート、宮城県立がんセンターコホートの TP53 ステータスを診断する。診断された TP53 ステータスと、患者背景、臨床病理学的因子との関連性解析を行う。また、無再発生存期間 (RFS)、全生存期間 (OS) のデータを用いて Kaplan-Meier 解析を行い、変異型群と野生型群の予後の違いを検証する。この結果、3 つの独立したコホートで予後の予測性の検証を行うことが可能である。

(2) 術前化学療法症例を対象とした TP53 signature と効果予測性の検証

術前化学療法施行症例検体の収集と nCounter による TP53 signature データの収集

引き続き、術前化学療法施行症例の検体の収集を行う。必要症例数は、pCR が得られない症例群において、5 年無再発生存率が wt 群 85%、mt 群 65% と仮定し、エラー 5%、検出力 80%、mt 群 : wt 群 = 1 : 1.5 とすると、100 例 (mt 群 43 例、wt 群 57 例) となる。一般的に、術前補助化学療法の pCR 率を 20% 程度とすると、全体の必要症例数は 125 例となる。検体不良例等を見込み、150 例を目標として収集する。

TP53 ステータスと術前化学療法の効果および予後の予測性の検証

収集した術前化学療法コホートについて、RFS および OS のデータ解析を行う。pCR の有無、TP53 ステータス別の RFS、OS を Kaplan-Meier 解析によって算出する。また、pCR と TP53 ステータスを組み合わせた場合の RFS を算出し、これら 2 つのバイオマーカーを組

み合わせる有用性について検討する。

(3) 上記データを総合的に検討し、診断キットとしての性能評価を行う

得られたデータをまとめ、総合的に検討を行い、診断キットとしての性能評価を行う。

4. 研究成果

(1) 早期乳がんを対象とした nCounter による TP53 signature の診断精度の検討

nCounter 用 TP53 signature 診断キット (プローブセット) の作成

TP53 signature を構成する 33 遺伝子中 32 遺伝子と内部コントロール遺伝子 (5 遺伝子) の発現を検出可能な nCounter 用のプローブセットを作成した。1 遺伝子はクロスハイブリダイゼーションの可能性が除外できず、作成が困難であった。診断は TP53 変異型で発現上昇する遺伝子群の発現和と発現低下する遺伝子群の発現和の比 (TP53 signature score) を算出することとした。TP53 遺伝子変異のステータスが既知の東北大学病院コホート 37 例中 24 例を用いて、TP53 signature の診断のカットオフ値を検討したところ、ROC 解析において 0.78 をカットオフとした場合、AUC 0.9、感度 0.93、特異度 0.88、正診率 0.9 の結果が得られた。

マイクロアレイと nCounter を用いた場合それぞれの TP53 signature の診断結果を比較したところ、診断の一致率は 91.7% (22/24) であった。ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) 組織と新鮮凍結 (fresh frozen; FF) 組織の両方が得られた症例で、FFPE 組織由来 RNA と FF 組織由来 RNA の発現の相関を検討したところ、相関係数 0.902-0.987 と非常に良好な相関が得られた。

nCounter による TP53 signature データの収集

星総合病院コホートおよび宮城県立がんセンターコホート 190 例を用いて nCounter による TP53 signature を取得した。うち Stage I-II の 174 例について解析を行った。174 例中 64 例が TP53-sig 変異型、110 例が TP53-sig 野生型と診断された。同じコホートの multiplex RT-PCR による TP53 signature score の結果との相関を検討したところ、 $R^2=0.6493$ とある程度の一致が認められた。前述の通り、FFPE 組織由来の RNA と FF 組織由来 RNA のデータの結果から推定すると、nCounter のデータの方が信頼性が高いと考えられた。

TP53 ステータスと臨床病理学的因子の関連性の検討および予後の予測性の検証

臨床病理学的背景の比較では、TP53-sig 変異型は野生型と比較して、ER 陽性例 ($p<0.001$) および PR 陽性例 ($p<0.001$) が有意に少なく、HER2 陽性例は有意に多かった ($p=0.002$)。

Grade は有意に高値例が多かった ($p < 0.001$)。この結果は既報と一致した結果であった。一方、Stage、腫瘍径およびリンパ節転移の有無は有意差を認めなかった。また、術後補助化学療法の実施割合は有意に高く ($p < 0.001$)、逆に術後補助内分泌療法の実施割合は有意に低かった ($p < 0.001$)。

TP53 signature ステータスによる無再発生存期間 (RFS) の解析を行ったところ、*TP53*-sig 変異型は野生型と比較して有意に無再発生存期間が不良であった ($p = 0.002$, 図 1)。

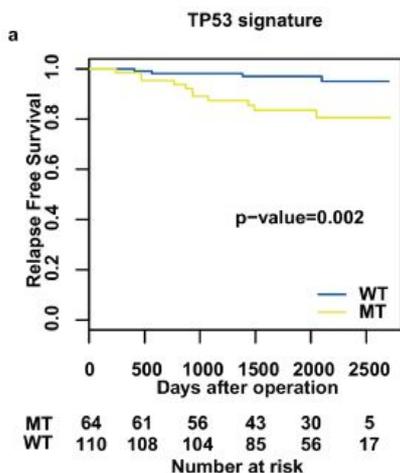


図 1. *TP53* signature による無再発生存期間カプランマイヤー法を用いて、log-rank 検定を施行。

全生存期間についてはイベント数が 10 に限られていることもあり、*TP53* signature ステータス間で有意差を認めなかった ($p = 0.128$) が、乳癌特異的生存期間 (乳癌による死亡のみをイベントとしてカウント) の解析では *TP53*-sig 変異型は有意に不良であった ($p = 0.0179$)。

RFS と関連する因子を探索するため、*TP53* signature および臨床病理学的因子について単変量解析を実施したところ、*TP53* signature および pStage のみが RFS と有意に関連した。この 2 因子を用いて多変量解析を実施したところ、*TP53* signature のみが有意に RFS と関連した (Table 1)。

Variable	Univariate		
	HR	95% CI	p value
<i>TP53</i> status by signature (versus wild type)	4.94	1.57-15.5	0.003
pStage (versus Stage I)	3.94	1.11-13.9	0.018
Node (versus negative)	3.49	1.24-9.82	0.017
Pathological tumor size (versus T1)	1.68	0.61-4.64	0.322
Grade (versus 1-2)	1.51	0.54-4.26	0.439
ER (versus positive)	1.68	0.60-4.72	0.338
PgR (versus positive)	2.47	0.84-7.24	0.088
HER2 (versus negative)	1.54	0.35-6.80	0.590
Adjuvant chemotherapy (versus non-therapy)	1.39	0.50-3.82	0.529
Adjuvant endocrine therapy (versus non-therapy)	0.84	0.29-2.45	0.747

Variable	Multivariate		
	HR	95% CI	p value
<i>TP53</i> status by signature (versus wild type)	4.2	1.33-13.3	0.015
pStage (versus Stage I)	3.15	0.88-11.3	0.078

Abbreviations: pStage, pathological stage; Node, lymph node metastasis; ER, estrogen receptor; PgR, progesterone receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor type 2; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

Table 1. RFS に関する臨床病理学的因子の単変量および多変量解析

本コホート 174 例のうち、120 例で RNA シー

クエンス法による網羅的遺伝子発現解析を実施した。得られた遺伝子発現データより、既存の多遺伝子アッセイである Mammprint、OncoTypeDX、PAM50 のリスクスコアを算出した。*TP53* signature score および多遺伝子アッセイのリスクスコアと RFS の concordance index を算出し比較したところ、*TP53* signature score が最も RFS と関連した。また *TP53* signature score は RNA シークエンスより得られた遺伝子発現データを使用した場合よりも nCounter より得られた遺伝子発現データを使用した方が RFS との関連が良好であった (図 2)。

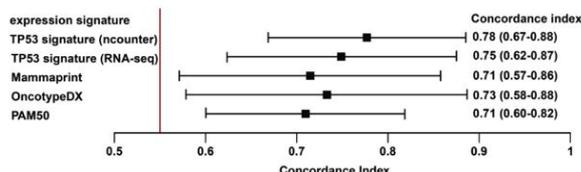


図 2. *TP53* signature score および乳癌に関する既存の多遺伝子アッセイ法のリスクスコアと RFS の関連性の比較

(2) 術前化学療法症例を対象とした *TP53* signature と効果予測性の検証

術前化学療法施行症例検体の収集と nCounter による *TP53* signature データの収集

術前補助化学療法を施行した乳癌症例 100 例を収集した。対象症例は、ホルモン受容体陽性乳がん 38.9%、HER2 陽性乳がん 0%、トリプルネガティブ乳がん 58.3%、不明 2.8% であった。

TP53 ステータスと術前化学療法の効果および予後の予測性の検証

うち 37 例に対して診断時の生検 FFPE 組織より RNA を抽出し、nCounter によって *TP53* signature の診断を行ったところ、*TP53*-sig 変異型 83%、野生型 17% であった。変異型群と野生型群で治療前の T (腫瘍径) \ N (リンパ節転移) および Stage に有意な差を認めなかった。術前化学療法の治療効果の予測性を検討したところ、*TP53*-sig 変異型群では 36.7% に病理学的完全寛解 (Pathological Complete Response; pCR) を認めたが、野生型群では pCR 例は 0% であった。以上の結果より、*TP53* signature は術前化学療法の効果予測因子となることが示された。nCounter 実施症例が少ないため、RFS および OS については有効な解析は不能であった。今後、残りの症例について速やかに解析を行い、RFS および OS に関して *TP53* signature の意義の検証を行う。

(3) 診断キットとしての性能評価

前述の通り、nCounter は FFPE 組織由来、FF 組織由来に関わらず非常に安定した発現データの取得が可能であった。nCounter で診断した *TP53* signature ステータスは RNA シークエンスによって得られた *TP53* signature

ステータスよりも RFS との関連性が高かった。以上の結果より、本研究で使用した TP53 signature 取得のためのプロブセットは TP53 signature の診断キットとして有望な可能性が示唆された。今後、再現性試験、正確性試験、安定性試験等を実施し、性能評価に必要なデータを取得する予定である。

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 1 件)

Yamaguchi S, Takahashi S, Mogushi K, Izumi Y, Nozaki Y, Nomizu T, Kakugawa Y, Ishida T, Ohuchi N, Ishioka C, Kato S. Molecular and clinical features of the TP53 signature gene expression profile in early-stage breast cancer. *Oncotarget*.8;9(18):14193-14206. 2018. doi: 10.18632/oncotarget.24447. 査読あり

[学会発表](計 7 件)

Yamaguchi, S, Takahashi, S, Nomizu, T, Kakugawa, Y, Ishida, T, Kato, S, Ishioka, C. : Molecular feature and clinical use development of gene expression profile “TP53 signature” in early stage breast cancer . ESMO2017 , Sep.11 , 2017 . Madrid (Spain) . Poster

Takahashi, S , Fukui, T. , Nomizu, T. , Kakugawa, Y. , Ishida, T. , Yamaguchi, S. , Kato, S. , Ohuchi, N. , Gondo, N. , Ishioka, C. : Development of TP53 signature diagnostic system using multiplex RT-PCR and observational study to confirm the prognostic value of TP53 signature in breast cancer . ESMO2017 , Sep.11 , 2017 . Madrid (Spain) . Poster

高橋信,野水整,角川陽一郎,石田孝宣,山口茂夫,加藤俊介,大内憲明,石岡千加史:乳がん治療の最適化を目指した TP53 signature の体外診断薬開発.第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会.神戸コンベンションセンター(神戸).2017 年 7 月 28 日.口演

高橋信,野水整,角川陽一郎,山口茂夫,加藤俊介,石田孝宣,大内憲明,石岡千加史:Multiplex RT-PCR 法を利用した TP53 signature による予後予測方法の開発.第 25 回日本乳癌学会学術総会.マリンメッセ福岡(福岡).2017 年 7 月 13 日.ポスター

高橋信:TP53 signature による乳がんの予後予測および治療効果予測.20th Breast Cancer UP-TO-DATE Meeting.グランドニッコー東京(東京).2017 年

3 月 11 日.口演

高橋信,福井崇史,野水整,角川陽一郎,山口茂夫,加藤俊介,石岡千加史:Developing biomarker of early stage breast cancer using expression profile of TP53 mutation status.第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会.神戸コンベンションセンター(神戸).2016 年 7 月 29 日.口演

高橋信,福井崇史,権藤延久,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 112 回日本内科学会講演会.みやこめっせ(京都).2015 年 4 月 13 日.ポスター

[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・大学病院・講師
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:

(4) 研究協力者

()