

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32633

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08750

研究課題名（和文）乳癌の再発・転移巣で出現する付加的遺伝子変異の解明

研究課題名（英文）The additional mutation analysis of breast cancer recurrence or metastasis

研究代表者

鹿股 直樹（KANOMATA, Naoki）

聖路加国際大学・聖路加国際病院・医長

研究者番号：60263373

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：QIaseq Human Breast Cancer Panelでの93遺伝子のNGS検索で、乳癌原発巣、転移・再発巣での遺伝子変異を検出することが可能であった。転移・再発巣で、薬剤到達性につながると思われるDNA変異あるいはCNV変化は、82%（9/11）の症例で検出された。乳癌での遺伝子変化を効率よく、また低コストで検出可能であることが示唆された。また、本研究ではホルマリン固定パラフィン包埋ブロックのDNA品質が経年変化を受けることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移・再発乳癌の遺伝子変異を検出し、これを標的とする治療法に結び付けるための研究を行った。入手が容易で、比較的安価な遺伝子パネルでも82%の症例で、薬剤到達性のある遺伝子変異を検出できた。45%の症例では転移・再発巣で新たな遺伝子変異が検出され、（原発巣だけでなく）転移・再発での遺伝子検索の重要性が示唆された。また、本研究ではホルマリン固定パラフィン包埋ブロックのDNA品質が経年変化を受けることも明らかとなった。今後、手術等で得られた病理検体の保管を考慮する上で、有用な情報が得られた。

研究成果の概要（英文）：The QIaseq Human Breast Cancer Panel NGS assay could identify driver mutations in both primary breast tumour tissue and recurrent/metastatic lesions in almost all patients. Actionable mutations and/or copy number variations (CNVs) were detected in 82% (9/11) of recurrent/metastatic breast cancer cases. This method can cost-effectively assist in identifying drug-targetable mutation and CNV in metastatic breast cancers. We also showed that the older formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) materials often had lower DNA quality and could not be analyzed.

研究分野：乳腺病理

キーワード：NGS 遺伝子変異 転移・再発 乳癌 薬剤到達性 DNA品質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

転移性乳癌はホルモン療法、分子標的療法、化学療法の適応となり、現在では種々の薬剤が利用可能となっている。治療法の選択については、エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PgR)、HER2、Ki-67などの値を参考に、閉経状況や全身状態なども考慮して行っている。一方で、個々の症例においてどの薬剤が最適であるかを知る方法は確率されていない。例えば、日本乳癌学会の乳癌診療ガイドラインでは、HER2陰性の転移・再発乳癌に対する一次化学療法は「アンスラサイクリン、タキサン、S-1のいずれかの使用が勧められる」とあり、これらのうちどれを選択すべきかは、転移巣の場所(臓器)とその広がり、再発までの期間、術後薬物療法としてどの薬剤を使用したか、現時点での症状の有無、全身状態、患者自身の希望、などの多様な要素を考慮して行っているのが現状である。従って、生物学的にどの薬剤がもっとも有効かを知る方法が判明すれば、転移性乳癌の治療成績改善が見込まれる。

いわゆる次世代シーケンサー(NGS)による研究では、乳癌の原発巣と転移巣では、異なる遺伝子変異が検出されることがわかってきた。Toy等の研究では、ER陽性の転移性乳癌では*ERBB3*、*RPTOR*、*ESR1*、*GATA3*、*TP53*の変異が原発巣に比して多いことが報告されており、*ESR1*のリガンド結合部位での遺伝子変異がホルモン治療抵抗性の一因としている。また、Goswami等は*TP53*、*PTEN*、*SMAD4*、*PTPN11*、*KRAS*、*PIK3CA*が、乳癌の転移・再発巣で付加的な変異をきたすことがあることを報告している。

乳癌の転移・再発巣での付加的遺伝子変異が、腫瘍の悪性度をより高めている可能性が高いものと推定されるが、現状では、前述の*ESR1*以外では予後や治療抵抗性などとの関連は不明である。また、NGSでの遺伝子検索では頻度がごく低い遺伝子変異が検出されることもあるが、例えば数%程度の頻度の遺伝子変異が、実際にどれほどの臨床的な重要性を持つのかもわかっていない。原発巣と転移・再発腫瘍をペアにして各々を遺伝子解析した報告は少なく、実際に遺伝子変異が「付加」されたのかどうかなどについての詳細な検討はなされていない。

### 2. 研究の目的

乳癌を標的とした遺伝子パネルでのNGS検索を、原発性乳癌と転移・再発巣で行い、これらと比較することで、サブクローナル変化の多様性や遺伝子変異進化についての新たな知見を得る。また、転移・再発乳癌への治療選択についての情報を得る。

### 3. 研究の方法

乳癌の原発巣、正常乳腺および1つ以上の転移・再発巣のパラフィンブロックが利用可能な症例で、それらのいずれもが20%以上の腫瘍含有率である35例を研究対象とした。10 $\mu$ mのパラフィン切片4枚から、Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA purification kits (#AS1130, Promega, Madison, WI, USA)を用いてDNAを抽出した。DNA品質は、Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)とQubit® dsDNA BR assay kits (#Q32850, Thermo Fisher Scientific)で検討、QCスコアを算出した。DNAライブラリ作成のための増幅はQIaseq DNA Quantimize Assay Kits (#DNQC-100Y-R, Qiagen, Hilden, Germany)で、qPCRを施行した。DNAライブラリ作成は、QIaseq Human Breast Cancer Panel (93 genes, DHS-001Z, Qiagen)を用いて行い、MiSeq シーケンサー (Illumina, San Diego, CA, USA)で検討した。データ解析には、Qiagen web portal (<https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>)を使い、アライメントにはGenomeBrowse (<http://goldenhelix.com/products/GenomeBrowse/index.html>)を使用した。ヒトゲノム参照基準としてはGRCH37を用いた。CNVは腫瘍割合で補正し、4以上あるいは1以下を「異常」とした。統計解析にはIBM SPSS Statistics for Windows (v 25; IBM Corp., Armonk, NY, USA)を使用した。

### 4. 研究成果

良い品質のDNAが得られ解析が可能であった11例では、年齢の中央値が52.5歳(乳癌の診断年齢)で、再発までの中央値は11か月、生存期間の中央値は39か月であった。1人を除いて、全員が乳癌で死亡していた。6例がトリプルネガティブ、4例がルミナルタイプ、1例がHER2タイプであった。10例で化学療法およびまたはホルモン療法が施行されていた。

パラフィンブロックは6か月から17年間保存されていたが、5年以上の古いブロックでは66.7%(38/57)がQC score > 0.04であった。QC score > 0.04の検体でも14件でライブラリ作成を試みたが、遺伝子変異の同定には至らなかった。分子タグのついた遺伝子と、全遺伝子のシーケンズ深度は、いずれも保管年数との相関関係がみられた(前者はP < 0.0005, r = -0.586, 後者はP = 0.004, r = -0.412, Spearman's correlation)。

QIaseq Human Breast Cancer Panelでは、1例を除き全例で、ドライバー遺伝子を検出できた。原発巣と、転移・再発巣で共通の変異として検出されたものは、*TP53* (5例)、*PIK3CA* (3例)、*CDH1* (1例)、*ESR1* (1例)、*GATA3* (1例)、*PTEN* (1例)であった。5例(45.4%)では、転移・再発巣で付加的な遺伝子変異を認めた。内訳は、*TP53*が3例、*ATR*、*BLM*、*CBFB*、*EP300*、*ERBB2*、*MUC16*、*PBRM1*、*PIK3CA*が各々1例ずつであった。手術後92か月の長期生存を得ている症例(K23)では、付加的遺伝子変異は認められなかった。

CNV変化は局所再発よりも遠隔転移で多い傾向であったが、統計的には有意差は認めなかつ

た。(P=0.091)。

原発乳癌と転移・再発巣における遺伝子変異とコピー数変化

症例 ID	原発あるいは再発	腫瘍割合 † (%)	遺伝子変異	変異頻度 (%)	代表的なコピー数変化(CN)
K18	乳腺原発巣	40	TP53 p.P152fs	17.95	CDKN2A (0.78)
					PTEN (0.8)
	局所再発	50	PBRM1 c.996-4G>A	27.12	CCND1 (8.25)
					CDKN2A (0)
K20	乳腺原発巣	20	PIK3CA p.H1047R	9.3	TP53 (0.76)
					RB1 (0.3)
	胸水	60	PIK3CA p.S6L	17.71	MAP2K4 (0.47)
					ERBB2 (8.37)
K21	乳腺原発巣	70	GATA3 p.X308_splice	31.4	PMS1 (0.03)
					ESR1 p.D538G
	局所再発	60	GATA3 p.X308_splice	20.65	RB1 (0.3)
					ESR1 p.D538G
局所再発 #2	70	GATA3 p.X308_splice	39.74	ERBB2 (14.83)	
				ESR1 p.D538G	38.12
K22	乳腺原発巣	20	CDH1 p.Q264*	8.46	PTEN (0.3)
					RB1 (0.92)
	胸水	50	ERBB2 p.S310F	20.69	TP53 (0.87)
					CBFB p.X27_splice

			<b>TP53 p.R248Q</b>	<b>18.3</b>	
<b>K23</b>	乳腺原発巣	<b>60</b>	<b>PTEN p.A328fs*15</b>	<b>52</b>	
	局所再発	<b>40</b>	<b>PTEN p.A328fs*15</b>	<b>22.81</b>	<b>PTEN (0.95)</b>
<b>K25†</b>	乳腺原発巣	<b>70</b>	<b>TP53 p.P36fs*7</b>	<b>48.94</b>	<b>PTEN (0.44)</b>
			<b>KMT2C p.Y816fs* (VUS)</b>	<b>28.95</b>	
	局所再発	<b>60</b>	<b>TP53 p.P36fs*7</b>	<b>54.07</b>	<b>MYC (5.07)</b>
			<b>KMT2C p.Y816fs* (VUS)</b>	<b>29.25</b>	<b>PTEN (0.33)</b>
<b>K27</b>	乳腺原発巣	<b>30</b>	<b>TP53 p.X306_splice</b>	<b>32.22</b>	<b>MYC (6.9)</b>
	局所再発	<b>40</b>	<b>TP53 p.X306_splice</b>	<b>20.33</b>	<b>MYC (4.98)</b>
<b>K28</b>	乳腺原発巣	<b>70</b>	<b>TP53 p.R213*</b>	<b>30.3</b>	<b>MYC (4.16)</b> <b>CCND1 (7.8)</b>
	局所再発	<b>30</b>	<b>TP53 p.R213*</b>	<b>29.7</b>	<b>PTEN (0.55)</b> <b>CCND1 (10.73)</b>
<b>K30</b>	乳腺原発巣	<b>60</b>	<b>TP53 p.R342fs*3</b>	<b>21.25</b>	<b>PMS1 (0.73)</b> <b>MYC (6.85)</b> <b>PTEN (0.28)</b> <b>ATM (0.8)</b> <b>RB1 (0.67)</b>
	胸水	<b>80</b>	<b>TP53 p.R342fs*3</b>	<b>75.86</b>	<b>MYC (7.41)</b>
	胸水 #2	<b>80</b>	<b>TP53 p.R342fs*3</b>	<b>71.11</b>	<b>FGFR1 (4.4)</b> <b>MYC (8.2)</b> <b>ATM (0.91)</b>
<b>K31</b>	乳腺原発巣	<b>20</b>	<b>TP53 p.R146*</b>	<b>8.5</b>	<b>CDKN2A (0.95)</b>
	心嚢液	<b>90</b>	<b>TP53 p.R146*</b>	<b>56.52</b>	<b>MYC (4.11)</b>
			<b>TP53 p.I195T</b>	<b>32.29</b>	
	胸水	<b>90</b>	<b>TP53 p.R146*</b>	<b>70</b>	<b>MYC (5.99)</b>
<b>TP53 p.I195T</b>			<b>25</b>		
<b>K32</b>	乳腺原発巣	<b>70</b>	<b>PIK3CA p.H1047R</b>	<b>71.43</b>	
			<b>TP53 p.R196*</b>	<b>34.09</b>	
	肺転移	<b>60</b>	<b>PIK3CA p.H1047R</b>	<b>62.62</b>	<b>EGFR (4.57)</b> <b>FGFR1 (11.67)</b> <b>CDKN2A (0.98)</b>
			<b>TP53 p.R196*</b>	<b>59.73</b>	<b>ATM (0.95)</b>
			<b>BLM p.N525fs*16</b>	<b>11.03</b>	

†腫瘍割合は HE 染色標本の鏡見で算定した

‡**K25** は非腫瘍組織からも **TP53** と **KMT2C** の変異が検出された。

Red: “実行可能な” 変異。

## (1) 考察

QIAseq Human Breast Cancer Panel の実現可能性について

古いパラフィン包埋検体は、しばしば DNA 品質が低く解析不可能であった。分子タグのついた遺伝子と、全遺伝子とのシーケンス深度に違いがみられたのは興味深い。Spearman の相関指数は、前者は-0.586 で後者は-0.412 であった。分子タグは、DNA の経年劣化に敏感なようにデザインされているのかもしれない

66/107 (61.7%) では、標本中の腫瘍割合が 20% 以下しかないため検討対象から除外せざるを得なかった。腔水から作成したセルブロックは、しばしば多くの炎症細胞や反応性中皮を含んでいた。また、乳腺の癌発巣でもリンパ球・形質細胞浸潤の強いものや、線維化反応が強い症例でも腫瘍 DNA の回収が困難であった。効率の良いマイクロダイセクション法の開発が必要と思われる。

乳癌原発巣と転移・再発巣での遺伝子変異と CNV

QIAseq Human Breast Cancer Panel を用いた NGS では、**TP53** 生殖細胞変異を有する症例(ただし、古典的な Li-Fraumeni 症候群の診断基準は満たさない)以外では、全てでドライバー変異を検出できた。

もっとも頻度の高い変異は **TP53** であった。**TP53** 変異を有する乳癌は予後不良であることが知られており、残念なことに、現在は治療標的ではない。**PI3K** 阻害薬は、**PIK3CA** 変異を有する症例に対する有効性が期待できる。**Alpelisib** は、**PIK3CA** 変異があり、**ER** 陽性、**HER2** 陰性の乳癌症例の予後を改善する、と報告されている。また、既に米国 FDA の承認を受けている。経口の **AKT** 阻害薬である **ipatasertib** は、**PIK3CA/AKT/PTEN** 変異のある症例の生存改善に有効と報告されている。**Ipatasertib** と **paclitaxel** を用いた治験(**IPATunity130**)が実施中である。また、**PIK3CA** 変異のある乳癌は予後良好である。**CDH1** 変異のある乳癌細胞(セルライン)は、**ROS1** 阻害薬である **foretinib** と **crizotinib** に感受性を示す、と報告されている。**ESR1** 変異は、**アロマターゼ** 阻害薬や **tamoxifen** 治療の施行後にしばしば出現することが知られている。**SoFEA** 試験では、**ESR1** 変異を有する症例では、**exemestane** よりも **fulvestrant** がより有効、とされている。**ERBB2 p.S310F** は、**HER2** 蛋白の過剰発現を伴わない **HER2** 活性化変異であり、注目に値する。**G660D**, **R678Q**, **E693K**, **Q709** とともに、**neratinib** への感受性があるものと思われる。既に治験も開始されている。**PBRM1** 変異は免疫療法への抵抗性を惹起する可能性が報告されている。**PTEN** 発現低下をきたした症例では、**PI3K/AKT** 阻害薬が有効かもしれない。症例 **K18** と **K28** では、**CCND1** の増幅がみられ、**CDK4/6** 阻害薬の効果が期待される。一方、**FGFR** 増幅、**EGFR** 増幅のある症例では、各々、**erdafitinib** と **cetuximab** が有効かもしれない。症例 **K30** と **K32** では、**ATM** 発現低下があり、**topotecan** あるいは **poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP)** 阻害薬である **olaparib** への感受性が期待される。**CDKN2A** または **RBI** の低下は **palbociclib** の標的となる可能性がある。

今回の研究では 93 の遺伝子しか検索できていないが、82%(9/11)の転移・再発病変で、薬剤到達可能性のある遺伝子変異や CNV を検出できた。これは **MSK-IMPACT** (61%)や、**Vasan** 等の研究(84%)、**Muller** の研究(45%)と同等あるいは上回るものである。

症例数が少ないことと、乳癌サブタイプのバイアスがあることが、本研究の欠点である。これは DNA の経年劣化が主因である。ルミナルタイプの乳癌はしばしば、晩期再発を示し、本研究でも 18 年までの経過を持つ症例が含まれている。こういった症例の原発巣のブロックの DNA 品質は劣化が激しい。一方で、トリプルネガティブ乳癌の多くは通常、術後早期に再発を示すため、DNA 経年劣化の影響を受けにくい。CNV の閾値をどのように決めるか、も問題である。薬剤選択と CNV の関係は今後の検討が必要と考える。**EGFR**、**FGFR** の CNV 変化がみられた症例については、免疫染色で確認すべきかもしれない。今回、5 例のトリプルネガティブ乳癌のドライバー遺伝子変異や生殖細胞変異を検出できたが、トリプルネガティブ乳癌での遺伝子変異には多様性があるため、QIAseq Human Breast Cancer Panel は適切ではないかもしれない。

## (2) 結論

QIAseq Human Breast Cancer Panel での NGS 検索で、生殖細胞変異のある 1 例を除けば、乳癌原発巣、転移・再発巣でのドライバー変異を検出可能であった。薬剤到達性のある変異や CNV 変化の検出に有効と考えられる。薬剤感受性なども考慮した大規模な研究が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鹿股直樹
2. 発表標題 再発・転移病変と乳癌原発巣との比較ターゲット次世代シーケンサー解析
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019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	赤羽 俊章  (AKAHANE Toshiaki)  (70754480)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任研究員   (17701)	
研究分担者	山下 哲正  (YAMASHITA Tetsumasa)  (00584939)	川崎医科大学・医学部・講師   (35303)	
連携研究者	紅林 淳一  (KUREBAYASHI Junichi)  (10248255)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	
連携研究者	森谷 卓也  (MORIYA Takuya)  (00230160)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	山口 倫 (YAMAGUCHI Rin)  (10309750)	久留米大学・医学部・准教授  (37104)	
連携研究者	小塚 裕司 (KOZUKA Yuji)  (50378311)	三重大学・医学部・講師  (14101)	