

平成 31 年 4 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16511

研究課題名(和文) 乳癌におけるリキッドバイオプシー法の開発と臨床応用への取り組み

研究課題名(英文) Development of liquid biopsy method for breast cancer clinical application.

研究代表者

竹下 卓志 (Takashi, Takeshita)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60736289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ER陽性進行・再発乳癌患者に対して、より効果的に内分泌療法剤を使用して治療を行うために、内分泌療法耐性化にかかわる遺伝子型の解明が注目されている。今回我々は、liquid biopsy法の開発として、当科にストックされているER陽性転移・再発患者の血液検体の遺伝子解析(ESR1、PIK3CA、AKT1、HER2)をDigital PCR法を用いて行った。ESR1変異およびPIK3CA変異は、治療効果予測および治療効果モニタリングツールとして有用であることを見出した。またHER2変異が内分泌療法耐性化に寄与している可能性が報告されてきており、我々も自家検体を用いてその臨床的意義を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織生検に加えて、非侵襲的で連続的に患者の遺伝子情報を取得できるLiquid biopsy(血液、尿など)の臨床応用が検討され、肺がんでは既に実用化されている。乳癌でもLiquid biopsyの臨床応用へ向けて、臨床試験が組まれ、その有用性が明らかとなってきている。今回我々は内分泌療法耐性に関わる遺伝子達に注目し、ER陽性進行、再発乳癌において、ESR1変異およびPIK3CA変異が治療効果を予測するのに有用な因子であることを明らかにした。今後これらの遺伝子変異を計測するにより、対象者により効果的な治療を提供することができる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In order to treat ER-positive advanced / recurrent breast cancer patients more effectively with endocrine therapy, elucidation of genotypes involved in endocrine therapy resistance has attracted attention. Here, as a development of the liquid biopsy method, we performed genetic analysis (ESR1, PIK3CA, AKT1, HER2) of blood samples of patients with ER positive metastatic / recurrence stocked in our department using Digital PCR. The ESR1 and PIK3CA mutations were found to be useful as therapeutic effect prediction and therapeutic effect monitoring tools. In addition, it has been reported that the HER2 mutation may contribute to endocrine therapy resistance, and we are also examining its clinical significance.

研究分野：乳癌

キーワード：liquid biopsy metastatic breast cancer ESR1 PIK3CA HER2 ddPCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ER 陽性乳癌は、乳癌全体の 70-80%を占め、QOL に大きな影響を与えず、十分な効果を発揮する内分泌療法が治療の中心となる。しかし、ER 陽性進行・再発乳癌において、そのほとんどがいずれ耐性化してしまうため、内分泌療法耐性化にかかわる遺伝子型の解明が急務となっている。内分泌療法への耐性化は、治療効果を制御している遺伝子または経路の異常によって引き起こされることが明らかになってきており、liquid biopsy によるそれら遺伝子異常の検索は、乳癌の治療戦略の上で強力な武器となる可能性を秘めている。その中で、cell-free DNA (cfDNA) を用いた *ESR1* 変異および PI3K / AKT 経路異常の検出は、内分泌療法耐性乳癌の進行または治療効果を迅速に評価およびモニタリングするための非侵襲的な方法として注目され、複数の第 相無作為化試験において、その有用性が報告されている。BOLERO-2 試験において Chandralapaty らは、ER(estrogen receptor)陽性の再発乳癌患者の 28.8% (155/541) が血漿 cfDNA に *ESR1* 変異を有し、*ESR1* 変異陽性群では、mTOR 阻害薬エベロリムスの無増悪生存期間は、有意に短縮されたと報告している。また、Fribbens らは、SoFEA 試験においては 39.1%(63/161) PALOMA3 試験では 25.3% (91/360) の患者が血漿 cfDNA 中に *ESR1* 変異を有し、SoFEA 試験では、*ESR1* 変異陽性患者において、選択的 ER 機能抑制物質フルベストラント含有治療群は、アロマターゼ阻害薬エキセメスタン投与群と比較して無増悪生存期間が改善した。一方、PALOMA3 試験では、*ESR1* 変異の有無にかかわらず、フルベストラント+CDK4/6 阻害剤パルボシクリプは無増悪生存期間を改善した。以上より循環腫瘍 DNA (ctDNA) は、がん細胞の遺伝子異常の情報を保持しており、迅速かつ低侵襲に、また連続的に採取できるため、内分泌療法の実施の判断基準として使用できる可能性がある。

2. 研究の目的

ER 陽性転移・再発患者の連続的に採取された血液検体から抽出された遺伝子の変異を Digital PCR 法を用いて解析し、それらが治療効果予測および治療効果モニタリングツールとして臨床的に有用であるかどうか検討する。

3. 研究の方法

ER 陽性転移・再発患者の連続的に採取された血液検体から抽出された遺伝子変異の内、内分泌療法耐性化に関わる遺伝子変異 (*ESR1*、*PIK3CA*、*AKT1*、*HER2*) を Digital PCR 法を用いて解析し、それらの治療効果予測および治療効果モニタリングツールとしての臨床的意義を以下の計画で検証した。当教室では原発乳癌患者の約 300 名、転移乳癌の 69 名から、許諾を得た上で腫瘍組織 (一部は凍結組織も含む)、血液 (血清、血漿、全血 RNA) 保存している。

H29 年度は、ER 陽性再発・転移乳癌患者の連続的に採取した血液検体から抽出した遺伝子を分析し、*ESR1* 変異、*PIK3CA* 変異、*AKT1* 変異の治療効果予測因子としての意義、および治療効果モニタリングツールとして有用であるかを検討した。

H30 年度以降は、*ESR1* 変異、*PIK3CA* 変異、*AKT1* 変異に加え *HER2* 変異がどのように内分泌療法耐性に関わっているか、またそれが臨床学的に有用かどうか解析中である。

4. 研究成果

我々は、高感度に遺伝子変異を検出できる Digital PCR 法を用いて、*ESR1* 変異および *PIK3CA* 変異と *AKT1* 変異の臨床的意義を報告できた。当科保有の乳癌組織検体 325 例の検討では、*ESR1* 変異の頻度は、先の報告通り、初発乳癌での 2.5% に対し、再発乳癌では 20% に認められ

た。ER 陽性乳癌 86 症例（初発 17 例、再発 69 例）、185 血液検体を対象とした研究において、*ESR1* 変異は、先の報告通り、初発検体では認められなかったが、再発検体では、28.9%に認められた。内臓転移があるもの、内分泌療法の治療歴のあるもの、内分泌療法レジメン数の多いもの、において高頻度に *ESR1* 変異が認められた。*ESR1* 変異を認めた症例では、全内分泌療法投与期間が有意に短かった。一方、*PIK3CA* 変異は、初発乳癌検体では、23.5%に対し、再発乳癌検体では 24.6%に認められ、先の報告通り、初発、再発間で *PIK3CA* 変異の発現の差を認めなかった。*PIK3CA* 変異を認めた症例では、全内分泌療法投与期間が有意に短かった。また *PIK3CA* 変異は、subtype によりその臨床学的意義が異なるとされている。我々は、ER 陰性 HER2 陰性乳癌において、cfDNA 中の *PIK3CA* 変異は予後良好因子であると報告している。

また、cfDNA 中の遺伝子異常を検出する技術は、非侵襲的に、かつ、腫瘍に起こる遺伝子変化をモニタリングできるため、臨床的に意義を有する可能性がある。前述の Snapshot study に次いで、治療経過中少なくとも 2 セット以上血液検体を有する再発 52 症例を対象とし、治療経過中の *ESR1* 変異と *PIK3CA* 変異の追跡計測の意義を検討した。治療経過中に *ESR1* 変異が陰性化した症例は 17.3%に認められ、それらの群は、*ESR1* 変異常時陽性群より、全内分泌療法有効期間が有意に長かった。*PIK3CA* 変異は、3 例のみの陰性化であった。また、ER 陽性乳癌 119 症例（初発 77 例、再発 42 例）、253 血液検体を対象とした研究では、治療経過中の cfDNA における *ESR1* 変異の頻度の増加が、28.6%に認められ、それは 60%以上が内分泌治療である後治療に抵抗性を示した。さらに我々は、ER 陽性初発、再発乳癌症例を対象に、*PIK3CA*、*AKT1*、および *ESR1* 変異の臨床学的意義を治療ライン別に検討した。ER 陽性乳癌患者 128 症例（初発 73 例、再発 68 例）、251 血漿検体を対象とした研究において、初発検体では、*PIK3CA* 変異は、15.1%、*AKT1* 変異は 1.4%、*ESR1* 変異は 2.7%で認められた。*PIK3CA* 変異の有無は、臨床転帰に影響しなかった。再発検体では、治療ラインが進むにつれ、*PIK3CA* 変異は、16%から 32%、*ESR1* 変異は 23%から 41.9%と頻度が増加した。さらに治療早期群と治療後期群に分け、60%以上が内分泌療法である後治療の治療成功期間（TTF）を検証した結果、治療早期群では、*PIK3CA* 変異陽性症例は、後治療に抵抗を示したが、*ESR1* 変異陽性症例は後治療に抵抗を示さなかった。一方、治療後期群では、*ESR1* 変異陽性症例は、後治療に治療抵抗性を示したが、*PIK3CA* 変異陽性症例は後治療に抵抗を示さなかった。*AKT1* 変異は、初発、再発を通じて低発現であったため、その予後への影響は不明であった。

乳癌組織における HER2(human epidermal growth factor receptor 2)の評価は、免疫組織化学法、および in situ hybridization で判定されている。一方、再発乳癌などでは転移病巣の組織採取が困難である場合もあり、初発検体の HER2 判定に基づいて治療を決定する。しかし、再発治療時の遺伝子異常を治療に反映させるためには、血液を用いた liquid biopsy が重要である。さらに我々は、当科にストックされている血液検体を用いて、血漿 cfDNA 中の HER2 Copy Number (CN) assay を試み、血清 HER2 蛋白測定結果と比較検討した。HER2 CN assay および血清 HER2 蛋白解析を初発乳癌症例 113 例、再発乳癌症例 37 例に行った。結果、HER2 CN assay では血清 HER2 蛋白と比較して、腫瘍の HER2 状況の評価や術前治療効果との関連が低いことが示唆された。この相違は内部コントロールの選択など、測定法に起因することも考えられるが、さらに HER2 CN 高値例の長期予後との関連など別の臨床病理学的因子との関連を検討する必要がある。

本研究は、ER 陽性転移再発乳癌で脚光を浴びている *ESR1* 変異および PI3K / AKT 経路異常を引き起こす *PIK3CA* 変異と *AKT1* 変異を腫瘍組織だけでなく、cfDNA 中에서도検出し、それらが治療戦略上重要な意義がある可能性を示した重要な研究である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. 竹下卓志、岩瀬弘敬*: 転移乳癌におけるリキッドバイオプシーの診断技術、1項-7項
(PHARMSTAGE、技術情報協会、東京) 2017
2. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, Omoto Y, Iwase H*.: Comparison of ESR1 Mutations in Tumor Tissue and Matched Plasma Samples from Metastatic Breast Cancer Patients. Transl Oncol., 10(5):766-771, 2017
doi: 10.1016/j.tranon.2017.07.004.
3. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, Omoto Y, Iwase H*.: Analysis of ESR1 and PIK3CA mutations in plasma cell-free DNA from ER-positive breast cancer patients. Oncotarget, 8(32):52142-52155, 2017 doi: 10.18632/oncotarget.18479.
4. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Sueta A, Tomiguchi M, Murakami K, Omoto Y, Iwase H*.: Prevalence of ESR1 E380Q mutation in tumor tissue and plasma from Japanese breast cancer patients. BMC Cancer, 22:17(1):786, 2017 doi: 10.1186/s12885-017-3779-2
5. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, Iwase H*.: Clinical significance of plasma cell-free DNA mutations in PIK3CA, AKT1, and ESR1 gene according to treatment lines in ER-positive breast cancer. Mol Cancer, 17(1):67, 2018
doi: 10.1186/s12943-018-0808-y.
6. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Iwase H*.: ESR1 and PIK3CA mutational status in serum and plasma from metastatic breast cancer patients: A comparative study. Cancer Biomark., 22(2):345-350, 2018
doi: 10.3233/CBM-171161.
7. Takeshita T, Iwase H*.: dPCR Mutational Analyses in Cell-Free DNA: A Comparison with Tissues. Methods Mol Biol., 1909:105-118, 2019
doi: 10.1007/978-1-4939-8973-7_8.

〔学会発表〕(計7件)

1. 竹下卓志、富口麻衣、末田愛子、西村純子、指宿睦子、山本豊、岩瀬弘敬: ER陽性乳癌における Droplet Digital PCRを用いた cell-free DNA内の ESR1 遺伝子変異の Multiplex 検出、**第117回日本外科学会定期学術集会、横浜**、2017
2. 竹下卓志: ER陽性転移・再発乳癌における ESR1 および PIK3CA 体細胞突然変異の臨床的意義に関する研究、**第25回日本乳癌学会学術総会、福岡**、2017
3. 竹下卓志、富口麻衣、末田愛子、村上敬一、指宿睦子、山本豊、岩瀬弘敬: Incidence and clinical relevance of ESR1 mutations in estrogen receptor positive breast cancer patients. **第15回日本臨床腫瘍学会学術集会、神戸**、2017
4. 竹下卓志、富口麻衣、末田愛子、村上敬一、指宿睦子、山本豊、岩瀬弘敬: ER陽性乳癌患者における ESR1 mutation のスポットおよび連続検索の臨床的意義、**第76回日本癌学会学術総会、横浜**、2017
5. 竹下卓志、富口麻衣、末田愛子、藤木義敬、後藤理沙、指宿睦子、山本豊、岩瀬弘敬: ER陽性乳癌における治療ライン毎の cell-free DNA PIK3CA および ESR1 突然変異の臨床的意義、**第118回日本外科学会定期学術集会、東京**、2018
6. 竹下卓志、藤木義敬、富口麻衣、末田愛子、後藤理沙、指宿睦子、山本豊、岩瀬弘敬: リキッドバイ

オブシイ: ctDNA, CTC, microRNAなど ER陽性乳癌血漿cell-free DNA中 PIK3CA、AKT1、ESR1 mutationの治療ライン毎の臨床学的意義、第26回日本乳癌学会学術総会、京都、2018

7. Takeshita T, Tomiguchi M, Sueta A, Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Iwase H: Clinical significance of plasma cell-free DNA mutations in PIK3CA, AKT1, and ESR1 gene according to treatment lines in ER-positive breast cancer patients. AACR Annual Meeting 2018, Chicago, IL, 2018

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岩瀬弘敬

ローマ字氏名：Hiroataka Iwase

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。