

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09075

研究課題名（和文）革新的な新規リキッドバイオプシー法を用いた新しい乳癌の診断・治療法の探索

研究課題名（英文）Exploration of Novel Diagnostic and Therapeutic Approaches for Breast Cancer Using an Innovative Liquid Biopsy Method

研究代表者

及川 将弘（OIKAWA, Masahiro）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：90612416

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：原発巣/転移巣における変異情報またはHot spot mutationの情報を用いることなく循環腫瘍DNA（circulating tumor DNA: ctDNA）を高感度に検出可能な新規リキッドバイオプシー法（Plasma Exome and Genome Analysis by Size-Selection and Unbiased Sequencing: PEGASUS）を用いて、HER2レセプター陽性乳がん患者の血漿サンプルを解析した。臨床経過に応じてctDNAの出現・消退を確認することが可能であり、今後、治療効果予測やハイリスク症例の層別化等に活用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンサーを用いた、事前の腫瘍情報を用いずに行うctDNA解析を、臨床検体で行うことが可能であった。乳がんのHER2タイプにおいては、ほとんどの症例でERBB2のamplificationであり、sparse genome sequenceを用いた本手法の有用性が示された。血漿検体であるため、サンプルの採取は容易であり、経時的な解析も行いやすい。新たなバイオマーカーとしての活用や、乳がんの治療抵抗性の解明に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using a novel liquid biopsy method, Plasma Exome and Genome Analysis by Size-Selection and Unbiased Sequencing (PEGASUS), which enables high-sensitivity detection of circulating tumor DNA (ctDNA) without relying on mutation information or hotspot mutation data in primary or metastatic lesions, we analyzed plasma samples from patients with HER2 receptor-positive breast cancer. The appearance and disappearance of ctDNA could be confirmed in accordance with clinical progress, suggesting potential applications in predicting treatment efficacy and stratifying high-risk cases in the future.

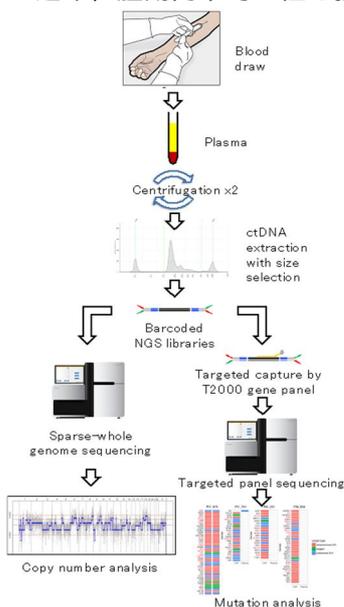
研究分野：乳癌外科学

キーワード：乳癌 circulating tumor DNA Liquid Biopsy 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

乳がんの薬物治療は、これまでの腫瘍径・リンパ節転移の有無などの解剖学的因子よりも、Receptor status や増殖マーカー、多遺伝子アッセイ等の Tumor biology をより重視して行われるようになった。このような治療戦略の変遷の中で、腫瘍内不均一性は乳がんの根治を目指す上で大きな問題となっている。実臨床においても転移巣と原発巣の Biology が異なる事例が多数報告されており、転移巣の Re-biopsy (再生検) が腫瘍内不均一性を克服する手段として試みられている。しかし、転移巣への Re-biopsy は部位によっては患者への負担が大きく、時に致命的な偶発症を伴う。また、ひとつの転移巣の Biology が全体の腫瘍内不均一性を代表しているという保証はなく、Re-biopsy の通常診療への応用は多くの課題を抱えている。

近年、腫瘍内不均一性を捉える有効な手段として、がん組織から漏出し全身を循環する腫瘍



DNA や腫瘍細胞から Biology を検索するリキッドバイオシーが大きな注目を集めている。循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) は循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells: CTC) よりも感度が高く、画像所見より早く病勢を反映するため、リキッドバイオシーの手段として有望である。しかし、血漿中には正常組織由来とがん組織由来の血漿遊離 DNA が混在しているため、がん特有の変化を同定しなければ ctDNA として検出されない。即ち、原発巣または転移巣でのがん特有のゲノム変化、または乳がんでは一般的な Hot spot mutation の情報が無ければ ctDNA として検出ができないことが大きな課題であった。

上述の Unmet-needs を解決する方法として、Nicholas Navin らは原発巣/転移巣における変異情報または Hot spot mutation の情報を用いることなく血漿循環がん DNA を高感度に検出可能な新規リキッドバイオシー法 (Plasma Exome and Genome Analysis by Size-Selection and Unbiased Sequencing: PEGASUS) を開発した。本手法によって、血液サンプルのみから ctDNA の Whole-genome copy number profile および Whole-exome mutation profile を解析することが可能であり、これを研究に応用しようと考えた。

図 1. PEGASUS 概要

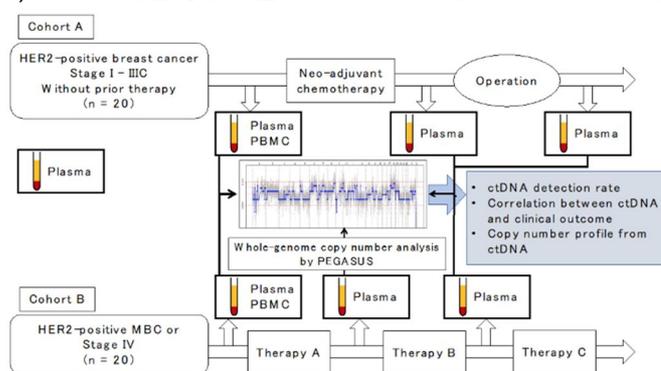
2. 研究の目的

本研究の核心となる技術である PEGASUS の概要を図 1 に示す。これまでのリキッドバイオシー研究は、原発巣/転移巣の Bulk sequence により得られた体細胞変異または Hot spot mutation として広く知られている変異が血液中の遊離 DNA に含まれるかどうかを、Digital PCR や Target deep sequence 等の高感度な手技によって検出するものであった。一方、本手法は単一癌細胞シーケンスで培われた極微量な DNA より全ゲノム解析を行うノウハウを ctDNA 解析に応用したものであり、血液サンプルのみで高感度かつ網羅的なゲノム解析を行える点で革新的である。また、本手法を臨床検体に応用した臨床研究の報告は未だ無く、高い独自性を有している。

本研究の目的は、この革新的な新規リキッドバイオシー法により乳がんの腫瘍内不均一性を捉え、これを克服する新規診断法・治療法を探索することであり、次項で述べる研究課題を明らかにする。

3. 研究の方法

(1). HER2 陽性乳がん症例における新規リキッドバイオシー法を用いた治療効果の予測



これまでに HER2 陽性乳がん患者における ctDNA 検出に関わる研究は数報あるが、いずれも ERBB2 遺伝子増幅を Real time PCR もしくは Digital PCR により評価している。しかし、がんゲノムは高度の染色体不安定性を示すため、対照遺伝子座が Diploid である保証はなく、再現性が高いとは言いがたい。よって、がんゲノム中の遺伝子増幅を評価するためには、ゲノム全体のコピー数を評価可能である次世代シーケンサーを利用したコピーナンバー解析が最適である。本

図 2. 研究デザイン

課題では、初期治療または転移再発治療を行う HER2 陽性乳がん患者を対象に、血液サンプルから PEGASUS にて ctDNA を検出して ERBB2 遺伝子増幅の有無を調べる(図2)。ctDNA 中の ERBB2 遺伝子増幅の検出感度、治療効果との関連、予後の関連を明らかにする。保存検体の検出系を確立させた後は、これまでに蓄積した保存検体を用いた解析を追加する。

(2). トリプルネガティブ進行再発乳がん症例における新規リキッドバイオプシー法を用いた治療抵抗性の解析

トリプルネガティブ乳がんは確立された標的治療がないため、進行再発症例の治療では抗がん剤が選択される。しかし、このタイプの乳がんは腫瘍内不均一性が高いことが知られており、容易に治療抵抗性を獲得するために予後不良である。これまでも Re-biopsy やリキッドバイオプシーによる治療抵抗性のメカニズムの解析が試みられてきたが、大きな成果を上げるには至っていない。

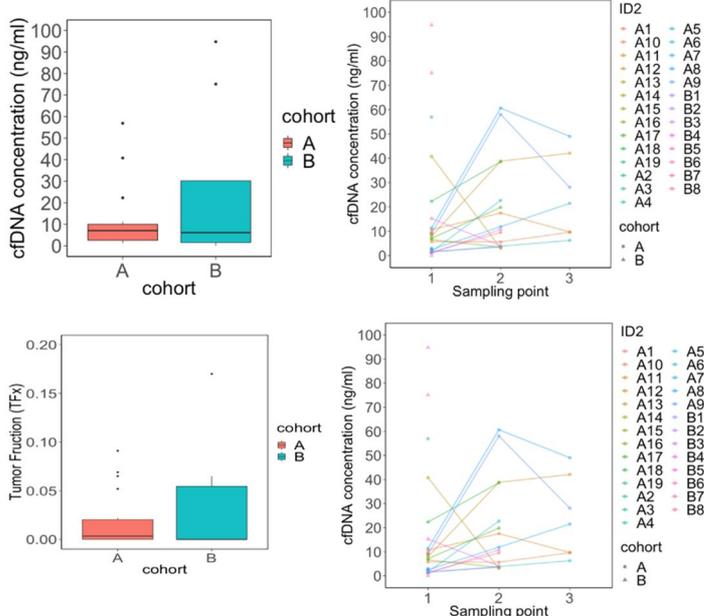
本課題では、進行再発のトリプルネガティブ乳がん患者を対象に、通常診療で行う採血に合わせて最大で 20 回連続で血液サンプルを採取する。PEGASUS によって ctDNA を検出し、各時点での Whole-genome copy number profile と Whole-exome profile を明らかにする。治療効果との関連を解析することにより、抗がん剤に対する治療抵抗性のメカニズムを解明し、新たな治療法の探索を行う。また、Buffy coat も同時に保管するため、保存検体からの CTC 分離法が確立された際は ctDNA との比較も可能である。

(3). 末期乳がん症例における新規リキッドバイオプシー法を用いた ctDNA 解析と予後予測

再発乳がん症例では根治を得られることは稀であり、患者の生活の質 (QOL) を保ちながら効果が続く限り薬物療法を継続し、耐性となった場合は次の薬物治療に移行する。しかし、患者が治療継続を望まない場合や Performance Status (PS) が低下して薬物の効果が見込めない場合は、がんに対する積極的な治療は中止され、主に Best Supportive Care (BSC) を中心に治療が行われる。この様な末期乳がん患者における予後予測は、人生を終える準備を行うにあたって有用であり、Palliative Prognostic Score や Palliative Prognostic index 等の指標が用いられているが、その予測能は十分であるとは言い難い。一方、末期乳がん患者におけるリキッドバイオプシー研究は殆ど行われておらず、末梢血中の CTC の個数と予後が関連していたとする報告を認めるのみである。本課題では、乳がんに対する積極的な治療を中止し、ホスピス病棟へ入院した末期乳がん患者より血液サンプルを採取し、PEGASUS によって Whole-genome copy number profile と Whole-exome profile, 血漿中の Tumor fraction (血漿遊離 DNA における ctDNA の比率) を明らかにし、予後との関連を解析する。他の臨床因子も含めて解析を行い、より正確な予後予測モデルを確立する。

4. 研究成果

(1). HER2 陽性乳癌におけるリキッドバイオプシー解析では、周術期乳癌 20 例、転移再発の 16 例から 86 の経時的血漿サンプルを収集した。Stage I-IIIc までの HER2 陽性乳癌患者でこれから治療を開始する患者 (コホート A) について、治療開始前および治療中、治療開始後に血漿サンプルを採取した。Stage IV および転移再発の HER2 陽性乳癌患者 (コホート B) について、登録時および現治療進行時に最大で 3 ポイントで血漿サンプルを採取した。cfDNA は LabChip GX (PerkinElmer) にて 100-250bp で gating を行い、濃度を測定した。Magnetic beads による size-selection 後に barcoded library を作成し、MiSeq による sparse whole-genome sequence を行い、bowtie2 にて hg19 にアライメントさせ自家製スクリプトにより Whole-genome copy number profile を得た。Tumor fraction (TFx) は ichorCNA にて計算した。TFx = 0.03 を ctDNA 検出の cut-off とした。cfDNA 濃度の平均はコホート A の治療開始前で 11.1ng/mL、コホート B の登録時で 26.3ng/mL で、転移再発症例で高い傾向を認めた。



TFx = 0.03 を ctDNA 検出の cut-off とした。cfDNA 濃度の平均はコホート A の治療開始前で 11.1ng/mL、コホート B の登録時で 26.3ng/mL で、転移再発症例で高い傾向を認めた。

図 3. 上段：各コホートごとの cfDNA 濃度 (ng/mL) と経時的変化
下段：各コホートごとの Tumor Fraction (TFx) と経時的変化

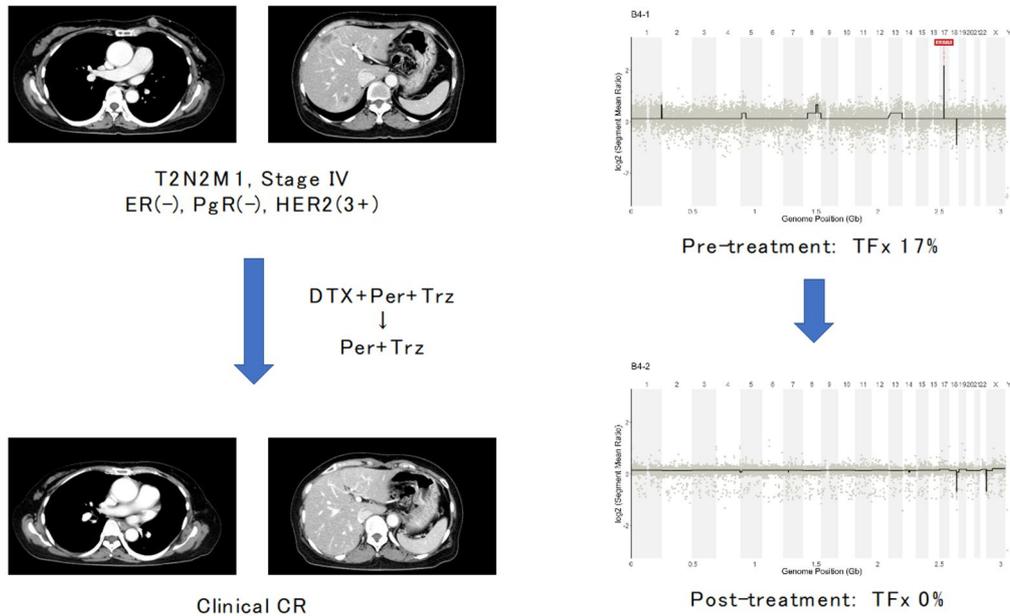


図 4. コホート B で治療奏功後に ctDNA が消失した症例。全身療法により原発巣・肝転移とも画像上は消失した(右パネル)。画像の時点での血中 ctDNA の copy number 解析。奏功と共に ERBB2 の amplification が消失している (左パネル)。

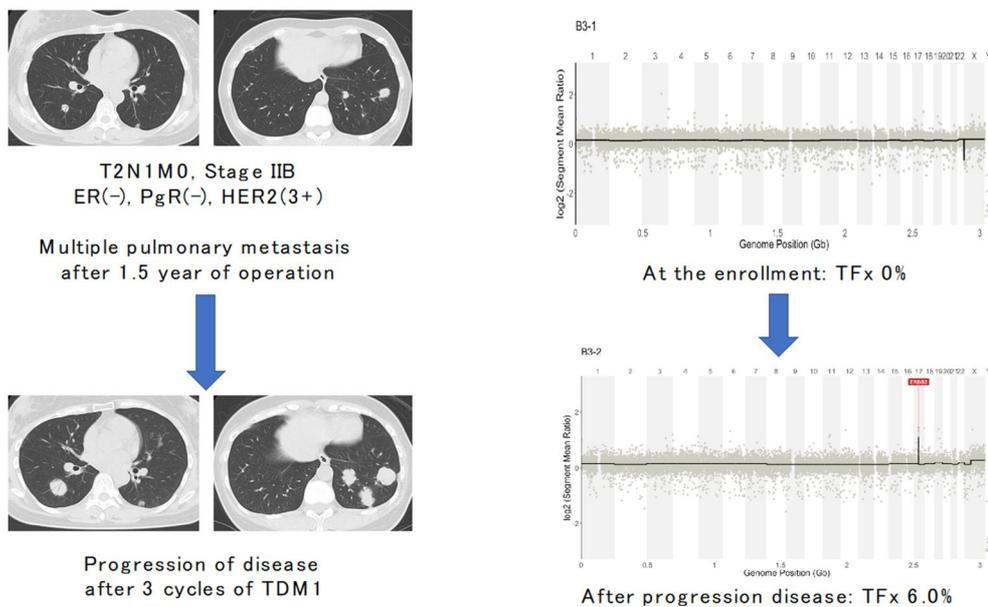


図 5. コホート A で再発後に ctDNA が出現した症例。初期薬物・手術療法後、1.5 年で多発肺転移を認めた(右パネル)。転移再発巣の出現後、ERBB2 の amplification が出現している(右パネル)。

治療前後の比較が可能であったコホート A の 13 例において、治療前の平均 cfDNA 濃度は 11.1ng/mL、治療後は 24.1ng/mL と、治療後に上昇を認めた (図 3)。NGS による copy number 解析を行ったコホート A の 11 症例中 2 例(18%)で ctDNA を検出し、1 例で HER2 増幅を認めた。コホート B の 6 症例中 4 例(67%)で ctDNA を検出し、うち 2 例で HER2 増幅を認めた。コホート A の 1 例では治療後に ctDNA が消失しており、病理学的にも奏功が得られた。コホート B で治療により CR となった 1 例でも ctDNA が消失し、経過と一致した(図 4)。本手法を HER2 陽性乳癌患者の診療に応用することにより、治療効果予測やハイリスク症例の層別化等に活用できる可能性が示唆された。

(2). トリプルネガティブ進行再発乳がん症例における新規リキッドバイオプシー法を用いた治療抵抗性の解析では、これまでに 5 症例 26 サンプルを回収し Deep freezer で保管中であるが、サンプルの集積が進まず、いまだ解析にも至っていない。研究期間中にトリプルネガティブ進行再発乳がんの初期治療として免疫チェックポイント阻害薬を用いたレジメンが標準治療となったことで、研究施設での症例集積が難しくなってしまったことが原因である。これまでに収集したサンプルについて解析を行うかどうか要検討である。

図6. 入院後生存期間
PPI score 6 以上

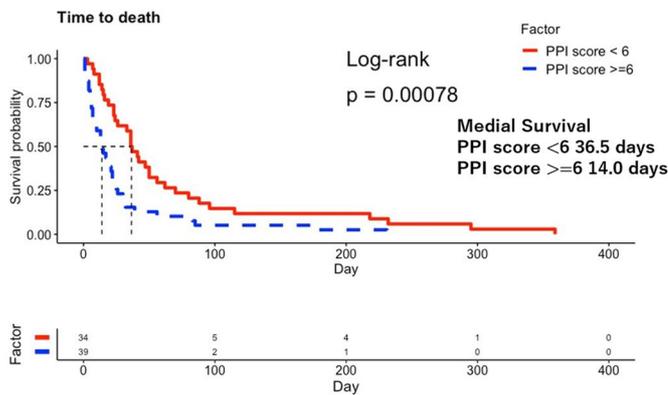
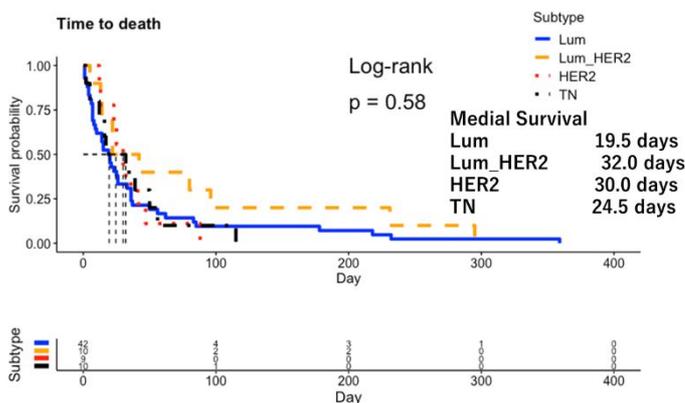


図7. 入院後生存期間
Subtype_primary



DFI は短い症例の方が予後良好と逆の結果であり、治療の修飾による性質の変化が推測された。

(3). 2014年から2018年の間に当院緩和ケア病棟に入院し、死亡退院となった転移再発乳癌患者73例を対象とした。入院時から死亡までの日数をend pointとして、年齢・PPI・Disease free interval (DFI)・治療ライン・転移箇所・原発巣及び転移巣のサブタイプ等の臨床病理学的因子は診療録より抽出した。サブタイプはReceptor statusにより、Lum/Lum-HER2/HER2/TNの4種類に分類した。

生存期間中央値は23日(1-359日)であった。単変量解析にてPPI score 6点未満は有意に生存期間が短かった(図6:14日 vs 36.5日, P= 0.001)。その他、Lum-HER2、肝転移がない、DFIが短い、治療ライン4未満、63歳以上は生存期間が長い傾向を認めた。これらをロジスティック回帰分析した結果、PPI score 6点未満(P= 0.001)、Lum-HER2タイプ(P= 0.003)、肝転移がない(P= 0.001)、DFI3ヶ月未満(P= 0.028)が有意に生存期間延長に寄与していた(図7)。

PPIに加え、サブタイプ等の臨床病理学的因子を加えることにより、より精密に終末期乳癌患者の予後予測が可能であった。治療が行われていない状況でもLum-HER2タイプの予後は良好であり、何らかの免疫学的修飾が示唆された。転移再発乳癌の予後研究と同様に、肝転移の無い症例の予後は良好であったが、

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Naoi Yasuto, Tsunashima Ryo, Shimazu Kenzo, Oikawa Masahiro, Imanishi Seiichi, Koyama Hiroshi, Kamada Yoshihiko, Ishihara Kazuhiro, Suzuki Masahiko, Osako Tomo, Kinoshita Takayuki, Suto Akihiko, Nakamura Seigo, Tsuda Hitoshi, Noguchi Shinzaburo	4. 巻 25
2. 論文標題 Validation of the prognosis of patients with ER-positive, HER2-negative and node-negative invasive breast cancer classified as low risk by Curebest 95GC Breast in a multi-institutional registry study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2023.13794	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 -

1. 著者名 及川将弘, 濱田哲夫, 及川達司	4. 巻 36
2. 論文標題 乳癌再発予測と画像所見の対比 (多重遺伝子解析をふくめて) (2) 乳癌のMulti-gene assayと石灰化病変との関連解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 乳癌の臨床	6. 最初と最後の頁 273-279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oikawa Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 The history, present situation, and future directions of neoadjuvant chemotherapy for HER2-negative breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chinese Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 29 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/cco-20-12	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 -

1. 著者名 Kuba Sayaka, Moriuchi Hiroki, Yamanouchi Kosho, Shibata Kenichiro, Yano Hiroshi, Oikawa Masahiro, Maeda Shigeto, Meng Xiangyue, Morita Michi, Hatachi Toshiko, Otsubo Ryota, Matsumoto Megumi, Miyamoto Junya, Kanetaka Kengo, Taniguchi Hideki, Nagayasu Takeshi, Eguchi Susumu	4. 巻 21
2. 論文標題 Protocol for studying the efficiency of ChemoCalc software in helping patients to understand drug treatment costs for breast cancer: A multicenter, open-label, randomized phase 2 study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Contemporary Clinical Trials Communications	6. 最初と最後の頁 100739 ~ 100739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.conctc.2021.100739	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 -

1. 著者名 Otsubo Ryota, Matsuda Katsuya, Mussazhanova Zhanna, Sato Ayako, Matsumoto Megumi, Yano Hiroshi, Oikawa Masahiro, Kondo Hisayoshi, Ito Masahiro, Miyauchi Akira, Hirokawa Mitsuyoshi, Nagayasu Takeshi, Nakashima Masahiro	4. 巻 29
2. 論文標題 A Novel Diagnostic Method for Thyroid Follicular Tumors Based on Immunofluorescence Analysis of p53-Binding Protein 1 Expression: Detection of Genomic Instability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 657 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2018.0548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Y, Li WX, Wu JH, Chen GH, Yang CM, Lu H, Wang X, Wang SS, Huang H, Cai L, Zhao L, Peng RJ, Lin Y, Tang J, Zeng J, Zhang LH, Ke YL, Wang XM, Liu XM, Zhang AQ, Xu F, Bi XW, Huang JJ, Oikawa M, Yuan ZY, Chen QJ.	4. 巻 Volume 16
2. 論文標題 Does the Dose of Standard Adjuvant Chemotherapy Affect the Triple-negative Breast Cancer Benefit from Extended Capecitabine Metronomic Therapy? An Exploratory Analysis of the SYSUCC-001 Trial	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Breast Cancer: Targets and Therapy	6. 最初と最後の頁 223 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/BCTT.S447290	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 瀬戸口 優美香, 及川 将弘, 榎本 康子, 久松 和史, 濱田 哲夫, 及川 達司
2. 発表標題 マンモグラフィ (MMG) の石灰化カテゴリー診断とRecurrence Score (RS) との関連解析
3. 学会等名 日本乳癌学会学術総会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 及川将弘、瀬戸口優美香、榎本康子、久松和史、濱田哲夫、西村純子、田中俊裕、及川達司
2. 発表標題 2種類の多遺伝子アッセイ (OncotypeDX, CureBest95GC) と臨床病理学的因子の検討
3. 学会等名 日本乳癌学会学術総会2021 (シンポジウム)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 及川将弘、瀬戸口優美香、榎本康子、久松和史、濱田哲夫、及川達司
2. 発表標題 BRACAnalysisにて変異陰性を確認後に卵巣がんを発症した若年乳がんの一例
3. 学会等名 日本乳癌学会九州地方会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Oikawa, Yumika Setoguchi, Yasuko Enomoto, Kazuhumi Hisamatsu, Tetsuaki Inamitsu, Tatsuji Oikawa.
2. 発表標題 The prognostic impact of breast cancer subtype based on hormone receptor (HR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) statuses for end-stage disease
3. 学会等名 San Antonio Breast Cancer Symposium 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 及川将弘、瀬戸口優美香、榎本康子、久松和史、稲光哲明、及川達司
2. 発表標題 終末期乳がん患者の予後とサブタイプの解析
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 及川将弘、瀬戸口優美香、榎本康子、久松和史、濱田哲夫、及川達司
2. 発表標題 腋窩リンパ節微小転移症例に術後化学療法は必要か？ー公開データベースとの統合解析ー
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 及川将弘、瀬戸口優美香、榎本康子、久松和史、濱田哲夫、及川達司
2. 発表標題 ロングレスポonderとなった転移再発トリプルネガティブHBOC乳がんの1例
3. 学会等名 第18回日本乳癌学会九州地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiro Oikawa, Yasuko Enomoto, Kazuhumi Hisamatsu, Tetsuo Hamada, Ryota Otsubo, Hiroshi Yano, Takeshi Nagayasu, Hiroyuki Mishima, Koh-ichiro Yoshiura and Nicholas Navin
2. 発表標題 Unbiased copy number analysis of circulating tumor DNA among HER2-positive breast cancer patients
3. 学会等名 2019 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 及川将弘、榎本康子、久松和史、及川達司、濱田哲夫、大坪竜太、矢野洋、永安武、Nicholas E Navin
2. 発表標題 PEGASUS (Plasma Exome and Genome Analysis by Size-Selection and Unbiased Sequencing) を用いた乳癌のリキッドバイオプシー研究
3. 学会等名 2019年度日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 及川将弘、瀬戸口優美香、榎本康子、久松和史、及川達司、濱田哲夫、大坪竜太、松本恵、矢野洋、永安武、三嶋博之、木下晃、吉浦孝一郎
2. 発表標題 乳癌患者における血漿遊離DNA (cfDNA)濃度と血漿循環腫瘍DNA (ctDNA)の解析
3. 学会等名 2019年度日本人追遺伝学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 及川将弘、瀬戸口優美香、榎本康子、久松和史、濱田哲夫、及川達司
2. 発表標題 乳癌のMulti-gene assayと石灰化病変との関連解析
3. 学会等名 2019年度日本乳癌画像診断研究会（招待講演）
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	三嶋 博之 (MISHIMA Hiroyuki) (10513319)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教 (17301)	
研究分担者	矢野 洋 (YANO Hiroshi) (50380887)	長崎大学・病院(医学系)・講師 (17301)	
研究分担者	大坪 竜太 (OTSUBO Ryota) (80570043)	長崎大学・病院(医学系)・講師 (17301)	
研究分担者	永安 武 (NGAYASU Takeshi) (80284686)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

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
---------	---------