

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591904

研究課題名(和文) 乳癌の個別化治療を目指した新しい感受性診断

研究課題名(英文) Novel prediction diagnosis for personalized treatment of breast cancer

研究代表者

金昇晋(KIM, Seung Jin)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90346213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌術前化学療法における抗癌剤感受性について検討した。多遺伝子発現解析において免疫系の23遺伝子の発現が非常に優れたpCR予測因子であることが明らかとなった。また血中メチル化DNAや、総DNA量はpCRの予測因子になりえなかったが、無病生存率および全生存率において両マーカーは予後不良の予測因子であった。さらに、化学療法前に撮影した造影MRI検査における乳癌の形態分類(round + oval vs. irregular)も、pCRの有力な予測因子であることが明らかとなった。また、この形態分類は、他の病理組織学的因子と組み合わせるとさらに予測診断能が向上することが示された。

研究成果の概要(英文)：Prediction for response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) was evaluated in breast cancers. Our study demonstrated that immune-related 23-gene signature (IRSN-23) in breast cancer tissues before NAC, which was one of the multigene assays, was able to predict pCR after NAC highly accurately. Whereas methylated DNA and high total DNA levels in the serum were not significantly associated with pCR, these two markers were significantly associated with unfavorable prognosis. Baseline MRI morphology also appeared to be a significant predictor for pCR. In addition, the performance of MRI morphology in the combination analyses of other clinicopathological parameters improved better than each parameter alone.

研究分野：外科学

キーワード：乳癌 抗癌剤 分子標的薬 感受性予測 cell cycle profiling

1. 研究開始当初の背景

2010年代になり、乳癌術後補助療法の治療方針は、再発リスク(prognostic factor)に基づいた治療から、治療反応性(predictive factor)に基づいた治療へと大きな変革が起った。具体的には、乳癌組織中のエストロゲンやプロゲステロンレセプター(ER, PR)、HER2の発現パターンにより下記の4つのsubtypeに分類し治療戦略を立てるようになった。

luminal A (ER+/PR+/HER2-) : 内分泌療法には反応性が高いが、抗癌剤感受性は低い。

luminal B (ER+/PR-/HER2±) : luminal A に比べると抗癌剤の感受性は高いが、その分内分泌療法の感受性は低い。

triple negative (ER-/PR-/HER2-) : 抗癌剤に対する感受性は高いが、予後は不良である。

HER2 type (ER-/PR-/HER2+) : 悪性度は高いが、抗癌剤感受性が高く、特異的中和抗体薬であるtrastuzumabの併用により抗腫瘍効果はさらに増強され、予後も著しく改善する。

このサブタイプ分類は、多様性の大きな乳癌を4つのグループに分類し、効率よく治療を行うのに大きな進歩をもたらした。しかし、各サブタイプ群は決して均質な乳癌の集まりではなく、その中でも乳癌の特徴、例えば抗癌剤感受性やtrastuzumabに対する感受性、また予後に関しても大きな違いがあり、乳癌の個別化治療にはこれら4つのサブタイプ分類だけでは不十分である。特にluminal乳癌は、乳癌の50-60%を占め、予後良好で内分泌治療に感受性が高く予後良好なタイプAが多いが、中には増殖能が早く内分泌療法の感受性が低く予後不良なタイプBも存在する。そして問題は、この両者の鑑別がしばしば困難なことである。この鑑別に有用な検査方法として、種々の多遺伝子発現解析が開発され、一部の検査はすでにコマーシャルに利用できる。また、これらの検査法は抗癌剤感受性予測にも有用であるとの後ろ向き試験の結果が報告されている。しかし、本来はluminal乳癌における予後予測のために開発された診断ツールであり、抗癌剤の感受性に特化した検査法ではない。

申請者らも、ER、PR、HER2以外の抗癌剤感受性予測因子を、術前化学療法(paclitaxel - FEC療法)のモデルにおいて検討を行ってきた。Cell Cycle Profiling assay (C2P)法によるサイクリン依存性キナーゼ(CDK)1および2の比活性(活性値/発現量)からC2P-risk score(C2P-RS)を求め、C2P-RSが高い症例は有意にpaclitaxel-FEC療法で病理学的完全奏功(pCR)になり易いことを明らかにした(Kim SJ, et al. Ann Oncol 23: 891-7, 2011)。また、マイクロアレイを用いた多遺伝子解析では、70遺伝子の発現から、同じくpaclitaxel - FEC療法でpCRになり易い乳癌を予測できる検査法を開発した(Naoi Y, et al. Cancer 117: 3682-90, 2011)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、乳癌の個別化治療を目指した新しい感受性診断法の開発である。術前化学療法施行前の乳癌患者から、針生検により癌組織を採取し、遺伝子発現解析を含め種々のバイオマーカーを測定し、抗癌剤感受性との相関を検討する。また、末梢血中のDNA量やメチル化DNA、さらには術前化学療法前に撮影した乳腺造影MRI所見などとpCRとの関係を検討し、より精度の高い抗癌剤感受性診断システムの構築を目的とする。

また、luminal乳癌から内分泌治療だけで予後良好な患者、逆にいうと抗癌剤感受性の乏しいいわゆるタイプA乳癌を選別できるような検査法についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 感受性予測 :

対象は原発性乳癌で、腫瘍径が3cm以上の浸潤性乳癌か、腋窩リンパ節転移を有し術前化学療法を受け、その後手術が施行された患者。術前化学療法施行前に吸引補助下針生検を行い、乳癌組織の採取を行った。乳癌組織中のER、PR、HER2、Ki-67、C2P-RSの測定や、マイクロアレイを用いた多遺伝子発現解析を行った。また、血中のメチル化DNAと総DNA量の測定も行った。さらに、化学療法前に乳房造影MRI検査を行い腫瘍の画像診断(形態分類や造影パラメーター)を行い、これらバイオマーカーと手術後のpCRとの相関について検討を行った。術前化学療法は、多くの症例でpaclitaxel (80 mg/m², weekly, 12回) FEC (5-fluorouracil 500 mg/m² / epirubicin 75 mg/m² / cyclophosphamide 500 mg/m², q3w, 4回)を施行したが、一部の症例ではdocetaxel (60 mg/m², q3w, 4回)や、EC (epirubicin 60 mg/m² / cyclophosphamide 600 mg/m², q3w, 4回) docetaxel (60 mg/m², q3w, 4回)を用いた。

(2) 予後予測 :

我々が開発したC2P-risk score (C2P-RS)は、抗癌剤感受性予測だけでなく、早期乳癌の予後診断にも有用であることを報告してきた。オランダのライデン大学との共同研究で、オランダ人コホートにおいてC2P-RSによるリスク分類が有意の予後因子であることを示した(van Nes JG, Kim SJ, et al. Br J Cancer 2009; 100: 494-500)。また、本邦において、多施設による臨床試験でリンパ節転移陰性でホルモン治療のみを受けた患者を対象に検証試験を行い、C2P-RS高値群は高率にしかも早期に再発し、独立した予後因子であることを明らかにした(要旨は第19回日本乳癌学会総会プレジデンシャルシンポジウムにて発表(発表者:金昇晋)<2011年9月仙台>)。今回、これらのデータを更新し解析を加えた。

4. 研究成果

1) 抗癌剤感受性予測

多遺伝子発現解析: 申請者らはすでに標準的な乳癌術前化学療法であるpaclitaxel - FEC療法に対する抗癌剤感受性予測として、マイクロアレイを用いた70遺伝子の発現(70-GC)による予測モデルの有用性を報告した。今回、診断能をさらに向上させるため、感受性に関連した

遺伝子の機能を解析したところ免疫に関係する遺伝子が最も強く予後と相関していた。そこで免疫系の遺伝子だけで paclitaxel - FEC 療法に対する感受性モデルを作成できないか検討した。術前に paclitaxel - FEC 療法で治療を行った原発性乳癌患者 117 例を、training set (N = 58) と validation set (N = 59) に分けて検討した。まず、training set の多遺伝子発現から、paclitaxel - FEC 療法後の pCR と最も強く相関した免疫系 23 遺伝子による検査モデルを開発した (immune-related 23-gene signature: IRSN-23)。この IRSN-23 を用いた場合、training set では、non-pCR と予測した患者群で pCR になったのは 6% であったのに対し、pCR と予測した患者群では 62% が pCR を獲得した ($P < 0.01$)。次にこのモデルを validation set で検討してみると、non-pCR の予測患者群で pCR になった症例はなく、pCR 予測群での pCR 率は 38% と、training set と同様に非常に優れた pCR 予測診断能を示した ($P < 0.01$)。さらに public dataset の患者 901 例で再度 IRSN-23 の検証を行ったところ、non-pCR 予測群の pCR 率は 11% であったのに対して、pCR 予測群の pCR 率は 40% と有意に高値であった ($P < 0.01$)。また、この pCR 予測能は、乳癌のサブタイプや化学療法の種類に関係なく認められた。

血中メチル化 DNA と総 DNA 量：申請者らは one-step methylation-specific polymerase chain reaction (OS-MSP) assay という、腫瘍由来の血中メチル化 DNA と総 DNA 量を感度よく測定できる方法を開発した。この方法を用いて、術前化学療法 (paclitaxel - FEC 44 例、docetaxel 37 例、EC - docetaxel 29 例、その他 10 例) を施行した乳癌患者 120 例を対象に、化学療法前に採血を行い、これらマーカーと抗癌剤感受性および予後との相関を検討した。メチル化 DNA は、グルタチオン S トランスフェラーゼ P1、Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 (RASSF1A)、retinoic acid receptor 2 の 3 つの遺伝子のうち一つでもメチル化が認められればメチル化陽性と判定した。120 例中メチル化 DNA 陽性は 7 例 (6%)、総 DNA 高値群は 40 例 (33%) であった。メチル化 DNA ($P = 0.595$) および総 DNA 量 ($P = 0.724$) はともに pCR とは有意の相関を認めなかった。しかし、メチル化 DNA 陽性 (43% vs. 85%, $P = 0.002$) および総 DNA 量高値 (65% vs. 91%, $P < 0.001$) はともに術後 5 年の生存率においてそれぞれメチル化 DNA 陰性、総 DNA 量低値に比べて有意に予後不良であった。

乳腺造影 MRI 検査：術前化学療法前に撮影した乳腺造影 MRI 検査所見と pCR との相関について検討を行った。対象は、paclitaxel - FEC で術前化学療法を施行した乳癌患者 229 例で、検討したパラメーターは、腫瘍の形状、辺縁の分類、辺縁の造影効果、腫瘍内部の造影効果、造影効果の

上昇率、造影曲線の分類、造影効果のピークまでの時間。このうち pCR と有意の相関がみられたのは、腫瘍の形状 (pCR 率、round + oval 42% vs. irregular 17%, $P < 0.001$)、辺縁の分類 (circumscribed 31% vs. not circumscribed 18%, $P = 0.019$)、造影効果の上昇率 (低値群 19% vs. 高値群 35%, $P = 0.033$) であった。特に腫瘍の形状はホルモン受容体 (HR) 発現とともに独立した pCR の予測因子であることが明らかとなった。この 2 つのパラメーターを組み合わせると、HR(-)かつ round + oval な腫瘍の pCR 率は 55% と、HR(-)かつ irregular 群 38%、HR(+)かつ round + oval 群 24%、HR(+)かつ irregular 群 9% に比べ有意に高率であり、それぞれ単独で用いるよりも、さらに pCR 予測診断能が向上することが明らかとなった。

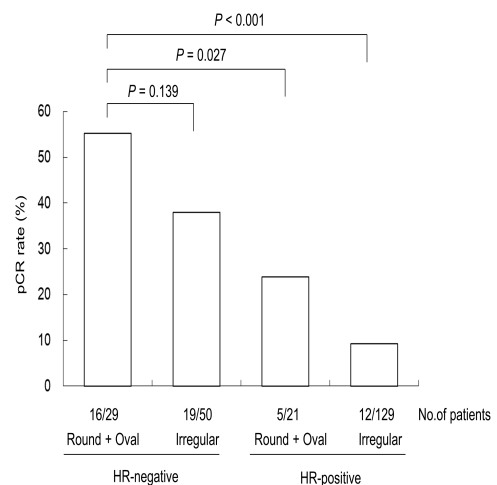


図 造影 MRI による腫瘍の形状分類とホルモン受容体 (HR) 発現による pCR の予測

また、MRI 画像所見と他のバイオマーカーを組み合わせ、最も pCR 診断能の高い検査モデルを ROC 解析により検討した。AUC が 0.8 を超えた検査モデルとしては、(i) HR + HER2 + 腫瘍の形状 + Ki-67 (AUC = 0.807)、(ii) HR + HER2 + 腫瘍の形状 + Ki67 + 造影効果の上昇率 (AUC = 0.814)、(iii) 腫瘍の形状 + 遺伝子解析によるサブタイプ分類 (AUC = 0.828) の 3 つであった。

表 ROC 解析による pCR の予測診断モデル

パラメーター	感度	特異度	Accuracy	AUC
Patients set 1				
HR	67.3%	75.1%	73.4%	0.712
Shape ¹	40.4%	83.6%	73.8%	0.620
HR+Shape	76.9%	66.1%	68.6%	0.747
Patients set 2				
HR	67.6%	74.5%	73.1%	0.710
組織学的グレード	35.1%	79.2%	70.4%	0.572
HER2	40.5%	81.2%	73.1%	0.609
Ki67	86.5%	43.6%	52.2%	0.651
Shape	45.9%	84.6%	76.9%	0.653
Er ²	27.0%	85.9%	74.2%	0.565
Shape+Er	62.2%	72.5%	70.4%	0.692
HR+Shape	81.1%	66.4%	69.4%	0.764
HR+HER2+Shape	81.1%	66.4%	69.4%	0.789
HR+HER2+Shape+Ki67	78.4%	73.2%	74.2%	0.807
HR+HER2+Shape+Ki67+E	73.0%	77.2%	76.3%	0.814
Patients set 3 (N=81)				
Shape	54.5%	79.7%	72.8%	0.671
サブタイプ ³	81.8%	72.9%	75.3%	0.773
Shape+サブタイプ	95.5%	62.7%	71.6%	0.828

¹ Shape: 造影 MRI における腫瘍の形状分類

² Er: 造影効果上昇率

³ サブタイプ: 遺伝子解析によるサブタイプ分類

(2) luminal 乳癌における予後予測

リンパ節転移がなく、HR 陽性で、術後全身補助療法としてはホルモン治療のみを施行された患者 317 例について後ろ向きに解析を行った。腫瘍の凍結サンプルから C2P-RS を測定した。また、パラフィン包埋サンプルからは組織型、組織学的グレード、HR、HER2、Ki-67などを中央解析した。評価対象症例は 266 例。C2P-RS によるリスク分類は、266 例を高リスク群 (C2P-RS 高値群) 16%、中間リスク群 (C2P-RS 中間群) 12%、低リスク群 (C2P-RS 低値群) 72%に分類できた。そしてそれ

ぞれの術後 5 年の無再発生存率は、74%、84%、97%で、C2P-RS 低値群であれば術後ホルモン治療のみでもほとんど再発しないことが明らかとなった。一方、現在 luminal 乳癌のタイプ A と B の分類に汎用されている Ki-67 による再発率は、高値群 (>20%) で 13%、低値群 (20%) で 1%と、Ki-67 が低ければホルモン治療のみで極めて予後が良好であることが示された。しかし、Ki-67 に患者の分類は、高値群 61%、低値群 39%で、低値群として選別できる患者は C2P-RS に比べると少ないため、C2P-RS によるリスク分類の方が 臨床的に有用性が高いと考えられる。

5 主な発表論文など 雑誌論文 (計 3 件)

Kim SJ, Masuda N, Tsukamoto F, et al.

The cell cycle profiling-risk score based on CDK1 and 2 predicts early recurrence in node-negative, hormone receptor-positive breast cancer treated with endocrine therapy.

Cancer Letter 査読有、355(2):217-23, 2014

doi: 10.1016/j.canlet.2014.08.042.

Fujita N, Kagara N, Yamamoto N, Shimazu K, Shimomura A, Shimoda M, Maruyama N, Naoi Y, Morimoto K, Oda N, Kim SJ, Noguchi S.

Methylated DNA and high total DNA levels in the serum of patients with breast cancer following neoadjuvant chemotherapy are predictive of a poor prognosis.

Oncology Letters 査読有、8:397-403, 2014

doi: 10.3892/ol.2014.2068

Sota Y, Naoi Y, Tsunashima R, Kagara N, Shimazu K, Maruyama N, Shimomura A, Shimoda M, Kishi K, Baba Y, Kim SJ, Noguchi S.

Construction of novel immune-related signature for prediction of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer.

Annals of Oncology 査読有、25(1):100-6, 2014

doi: 10.1093/annonc/mdt427.

学会発表（計1件）

道下新太郎、金昇晋、加々良尚文、下田雅史、
直居靖人、丸山尚美、下村淳、島津研三、
野口眞三郎

術前化学療法後のclinical CRとpathological CR
の乖離についての検討．第22回日本乳癌学会総
会、2014年7月11日、大阪

6 研究組織

(1) 研究代表者

金 昇晋 (KIM, Seung Jin)

大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号： 90346213

(2) 研究分担者

下村 淳 (SHIMOMURA, Atsushi)

大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号： 10625841

(3) 連携研究者

なし