

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：87102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791382

研究課題名(和文) 乳癌におけるゲノム不安定性を利用した新規診断法・治療法の開発

研究課題名(英文) Novel diagnostic and therapeutic method using genomic instability of breast cancer.

研究代表者

及川 将弘(Oikawa, Masahiro)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・乳腺科フェロー

研究者番号：90612416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム不安定性(GIN)に起因する腫瘍内不均一性をsurrogate markerにすることにより、ER陽性/HER2陰性乳癌の高リスク症例を層別することが可能であった。また、FFPE標本を用いたアレイCGHの結果を予測する因子として、dsDNA比率が有用であることを発見した。術前診断が困難な乳腺嚢胞内腫瘍について、針細胞診の手技で採取したDNAをアレイCGHで解析することにより(FNAB-aCGH)、GINによる術前良悪性診断を行う手法を開発した。PARP阻害薬のOlaparibと相同組み替え阻害作用のあるGimeracilの併用は、GINの高い乳癌細胞株において増殖抑制効果を示した。

研究成果の概要(英文)：High risk patients among ER-positive/HER2-negative breast cancer can be stratified by intra-tumoral heterogeneity as a surrogate marker for genomic instability. The double-stranded DNA ratio of tumor DNA predicted the performance of DNA from FFPE samples on the aCGH analysis. Quality control by this metrics can utilize valuable FFPE archival tissue on aCGH analysis. our novel diagnostic method, which targets genomic instability, can clearly distinguish cancers from benign tumors of breast intracystic lesions with minimum invasion, thereby avoiding the need for surgical excisional biopsy. Novel therapeutic strategy targeting genomic instability in breast cancer, which is dual administration of Olaparib and Gimeracil, showed growth inhibition of breast cancer cell line with high genomic instability.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 外科学一般

キーワード：ゲノム不安定性 乳癌 アレイCGH 染色体構造変化 腫瘍内不均一性

1. 研究開始当初の背景

ゲノム不安定性は悪性腫瘍における大きな生物学的特徴のひとつであり、発癌や悪性化の進展に大きな影響を与えている。乳癌においても、ゲノム不安定性と生物学的および臨床的な悪性度との関連が数多く報告されている。

染色体構造変化を検出する手段として、現在では高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いたアレイ競合ハイブリダイゼーション(アレイ CGH)が主流となっており、より高解像度な検出が可能である。我々は、この技術を用いて先天性疾患の染色体構造異常を多数報告してきたが (Yoshiura KI, et.al. J Hum Gent. 2010, Oikawa M, et.al. Eur J Med Genet 2010)、これは癌ゲノムにおける染色体構造異常の検出にも有用である。

これまでに申請者らは、良悪性鑑別が難しい乳腺腫瘍についてアレイ CGH による細胞遺伝学的な解析を行ったが、乳癌では乳腺良性腫瘍と比べて有意に多くのゲノム構造変化を有し、さらに乳癌の中でも悪性度が進むにしたがってゲノム構造変化が増加するという知見を得た (Oikawa, et.al. Breast J 2011)。すなわち、アレイ CGH によって得られるゲノム構造変化領域の数・大きさによって、腫瘍のゲノム不安定性を定量的に評価できるという事を明らかにした。

以上の研究結果を基に、次項に挙げる3つの臨床的課題について研究を進めたいと考えた。

2. 研究の目的

- (1) HR 陽性/HER2 陰性乳癌における、ゲノム不安定性を指標にしたハイリスク症例の層別化

HR 陽性/HER2 陰性乳癌は基本的には予後良好であり、その多くは術後補助内分泌療法のみで治癒しうるが、10-20%の症例では再発を認める。再発率が低いとはいえ、我が国の乳癌患者の約 65%はこのサブタイプに分類されるため、再発をきたす患者の絶対数としては多い。これらの症例において、ゲノム不安定性を指標にすることによってハイリスク症例を層別化できるかを検討する。

- (2) 診断困難な乳腺腫瘍に対する、ゲノム不安定性を指標にした良悪性鑑別

乳腺腫瘍は多彩な臨床像、放射線学的所見、病理学的所見を示し、通常の画像診断や針細胞診または針生検などの検査では術前の良悪性鑑別が難しい症例がある。このような症例に対しては、悪性病変の見逃しを避けるために切開生検が行われるが、ゲノム不安定性を指標にすることによって針細胞診等の微量な試料から良悪性鑑別が可能かどうかを

検討する。

- (3) 細胞株・動物モデルを用いた、ゲノム不安定性を標的とした新規薬剤治療の開発

正常細胞と癌細胞はゲノム不安定性において大きな差がある。よって、ゲノム不安定性を標的とした治療法を開発すれば、副作用が少なく、癌にのみ効果のある治療となる可能性がある。本研究では細胞の DNA 修復機構に着目し、DNA 修復を阻害する薬剤を投与することによって癌細胞の増殖を抑えることが出来るかを検討する。

3. 研究の方法

- (1) HR 陽性/HER2 陰性乳癌における、ゲノム不安定性を指標にしたハイリスク症例の層別化

当施設で外科治療と補助内分泌療法を行った症例を、再発を来した群(ケース群)と再発を来さなかった群(コントロール群)に分類し、年齢・腫瘍径・リンパ節転移・閉経状態・腫瘍マーカー等の臨床因子の差異を明らかにする。

両群における、組織型・脈管侵襲・病理学的 Grade・HR 発現強度・Ki-67 labeling index・IHC-intrinsic subtype 等の病理学的因子の差異を明らかにする。

アレイ CGH により得られたゲノム変化量を指標としてゲノム不安定性を定量化し、両群間での差異を明らかにする。上述の因子の関連を解析し、両群を層別化するためのモデルを明らかにする。また、ケース群に特異的な細胞遺伝学的変化を明らかにすることにより、再発を予測する遺伝子を探索する。

- (2) 診断困難な乳腺腫瘍に対する、ゲノム不安定性を指標にした良悪性鑑別

当施設で診断のために切除生検が行われる乳腺腫瘍より、穿刺吸引細胞診の手法で細胞を採取し、ゲノム DNA を抽出する。

アレイ CGH による細胞遺伝学的プロファイルと最終病理診断の関連を解析し、ゲノム不安定性を指標にして良悪性鑑別が可能かを検討する。各々の腫瘍の細胞遺伝学的プロファイルを比較することにより、発癌に関わる染色体構造変化を発見する。

- (3) 細胞株・動物モデルを用いた、ゲノム不安定性を標的とした乳癌の新規薬剤治療の開発

種々の乳癌細胞株および各々の抗

癌剤耐性株にアレイ CGH を行い、ゲノム不安定性の変化を評価する。これらの細胞株に一本鎖 DNA 修復阻害剤である PARP 阻害剤および二本鎖 DNA 修復阻害剤である Gimeracil を投与し、増殖抑制効果および他抗癌剤との相乗効果、効果とゲノム不安定性の関係を明らかにする。これらの細胞株を移植したヌードマウスにおいて、上記薬剤投与がどの程度有用かを検討する。

4. 研究成果

(1) HR 陽性/HER2 陰性乳癌における、ゲノム不安定性を指標にしたハイリスク症例の層別化

HR 陽性/HER2 陰性乳癌の臨床病理学的検討を行い、その特徴を全国学会で報告した(第 20 回日本乳癌学会学術総会)。また、多数の FFPE 標本から DNA を抽出してアレイ CGH 解析を行なう過程で、アレイ CGH 解析における品質予測因子を探索した。長崎大学病院および関連施設にて手術が行われた 63 例の FFPE 標本から DNA を抽出し、Agilent 社の高密度 DNA マイクロアレイを用いてアレイ CGH 解析を行った。解析の質を表す Derivative log ratio spread (DLRSread) を最も正確に予測したのは抽出 DNA 中に含まれる二本鎖 DNA の比率で、これまでの目安とされていた保管期間、260nm/280nm 吸光度比、260nm/230nm 吸光度比、ラベル化効率よりも優れていた(表 1, 図 1)。

Features	r _s
A260/A280 ratio	0.237 (0.0589)
A260/A230 ratio	-0.087 (0.4953)
dsDNA ratio	-0.796 (<0.0001)
Storage time (years)	0.551 (<0.0001)
Degree of labeling (Cy5)	-0.481 (<0.0001)

P-values are shown in parentheses. A260/A280 ratio: The ratio of the absorbance at 260 and 280nm. A260/A230 ratio: The ratio of the absorbance at 260 and 230nm. dsDNA ratio: The ratio of the amount of double-strand DNA and total DNA in tumor DNA.

表 1. DLRSread と 様々な因子の相関

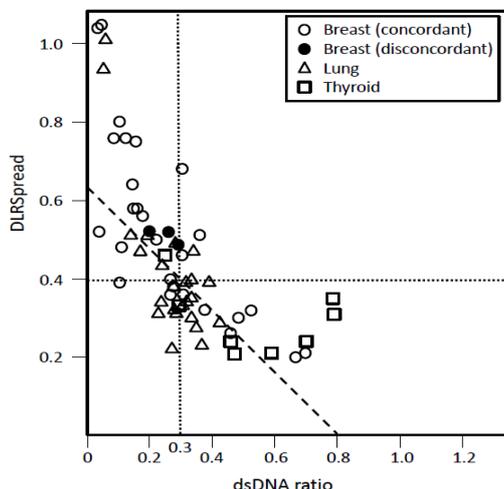


図 1. DLRSread と二本鎖 DNA 比率

本成果は全国学会・国際学会にて発表され(ESMO2012, 第 20 回日本乳癌学会学術総会)、学術雑誌に掲載された(Diagn Mol Pathol. 2013)。この知見により、困難とされる FFPE 標本を用いた aCGH についての品質管理が可能となり、膨大なアーカイブを活用可能となった。

本研究ではゲノム不安定性の定量解析にアレイ CGH を用いるが、コストと時間がかかることが実地臨床応用に向けては障害となった。そこで、ゲノム不安定の定量解析において、アレイ CGH に替わる、より安価・簡便な surrogate marker の探索を行い、Ki67 と TP53 の共発現及びゲノム不安定性から導かれる腫瘍内不均一性に注目した。2001 年から 2012 年までに九州がんセンターで手術を行った原発性乳癌症例のうち、ER 陽性/HER2 陰性を対象にした。非浸潤癌、多発癌、FISH の再検討により HER2 陽性と診断された症例は除外した。2008 年以降の HER2 の IHC が 2+ の症例では、HER2/CEP17 シグナル比 3.0 以上の clone を認める症例(MC あり群)と認めない症例(MC なし群)に分類し、臨床病理学的因子と再発・予後について解析を行った。全 1418 例中、HER2-IHC 2+ は 298 例(21%)、0 or 1+ は 1064 例(75%)、未施行は 66 例(4.7%)であった。リンパ節転移陽性症例において、HER2 2+ 症例は有意に DFS が不良であり、晩期再発と関連していた(P= 0.035)(図 2)。

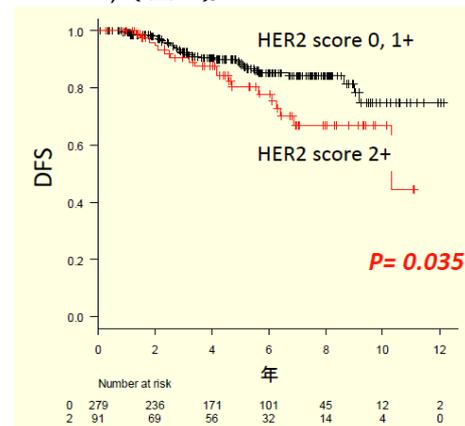


図 2. LN 転移陽性症例の DFS

2008 年以降の IHC 2+ 149 例中、87 例が MC あり群、62 例が MC なし群に分類された。MC あり群は Ki67LI が高く(32% vs 22%, P= 0.036)、DFS・OS とともに悪い傾向を認めた(各々 P= 0.17, P= 0.064)(図 3)。

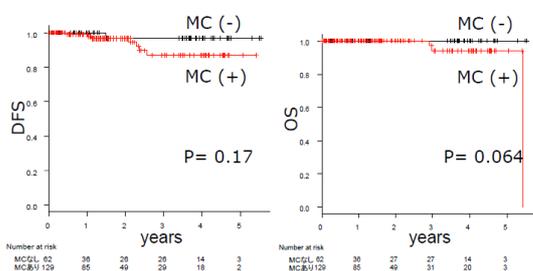


図3. MCの有無とDFS, OS.

本成果は全国学会・国際学会にて発表された(ASCO2014, 第114回日本外科学会定期学術集会, 第22回日本乳癌学会学術総会)。ER陽性/HER2陰性乳癌における、腫瘍内不均一性をゲノム不安定性の surrogate marker としたハイリスク症例の層別についての可能性が示唆された。

(2) 診断困難な乳腺腫瘍に対する、ゲノム不安定性を指標にした良悪性鑑別

2010年4月から2012年12月までに長崎大学病院腫瘍外科及び関連施設で手術を行った乳腺嚢胞内腫瘍の10例を対象にした。4例が悪性病変(嚢胞内乳癌)で6例が良性腫瘍(乳頭腫5例、乳管腺腫1例)であった(表2)。

Case	Age	Final diagnosis	Cytology	CNB	Total amount of DNA (µg)	dsDNA ratio	Ratio of CNA region (%)	Number of CNA region	Overlap of FNAB-aCGH and FFPE-aCGH (%)
1	58	IDC	V	Malignancy	8.6	0.74	3.57	20	99.7
2	40	Papilloma	III	NA	1.8	0.76	0.07	3	99.9
3	63	Ductal adenoma	V	Indeterminate	4.1	0.81	0.004	1	100
4	41	Papilloma	III	NA	5.9	0.74	0.05	2	99.9
5	67	Sclerosing Papilloma	III	NA	0.24	0.48	0.17	10	NA
6	57	Papilloma	III	NA	25.0	0.93	0.007	1	100
7	74	Papilloma	III	NA	0.71	0.57	1.90	42	98.1
8	75	IDC	V	NA	18.0	0.88	65.1	79	81.2
9	49	IDC	III	NA	16.1	0.95	9.12	16	99.1
10	68	Papilloma	NA	NA	1.21	0.63	0.36	15	99.7
11	67	IDC	V	Malignancy	5.81	0.51	6.20	15	98.8
12	67	DCIS	V	Malignancy	4.34	0.79	3.65	4	96.3
13	89	Ductal adenoma	III	NA	0.41	0.31	0.15	17	99.8

IDC invasive ductal carcinoma, CNB core needle biopsy, dsDNA double-stranded DNA, CNA copy number alteration, FNAB fine-needle aspiration biopsy, aCGH array comparative genomic hybridization, FFPE formalin-fixed paraffin-embedded, NA not analyzed

表2. 症例の臨床病理学的特徴

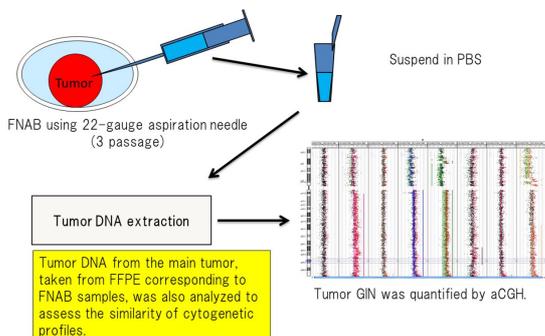


図4. FNAB-aCGHのシエーマ

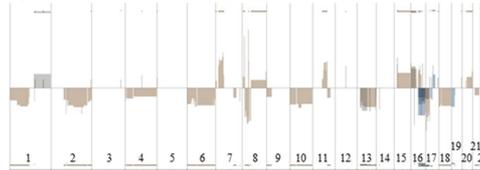
切除前または切除後に穿刺吸引細胞診(FNAB)の手法で細胞を採取し、tumor DNAを抽出した。ULS法によるアレイCGH解析(Agilent SurePrint G3 8x60K)を行い、各症例の増幅および欠失の数と大きさを指標にGINを定量化した

(FNAB-aCGH, 図4)。また、FFPEの主腫瘍からも tumor DNAを抽出し、同様にアレイCGH解析を行った。3 passageのFNABにより平均10.1 µg (0.42-19.0 µg)の tumor DNAが抽出され、260nm/280nm吸光度比、260nm/230nm吸光度比、二本鎖DNA比率平均はそれぞれ1.85 (1.73-1.89)、2.11 (1.40-2.30)、0.68 (0.57-0.95)と高品質であった。Derivative Log Ratio Spread (DLRSread)は平均0.20 (0.15-0.26)とアレイCGHの結果も良好であった。FNAB及び主腫瘍から抽出したDNAの cytogenetic profileは高率に一致し、各症例の全ゲノムにおけるコピー数一致率は平均97.3% (81.2-100%)であった。ゲノム変化領域の割合は悪性病変で25.9% (3.58-65.1%)、良性病変で0.41% (0-1.90%)と有意差を認めた(P=0.036)(図5)。

(a). FNAB-aCGH, carcinoma (n=5)



(b). FFPE-aCGH, carcinoma (n=5)



(c). FNAB-aCGH, benign (n=8)

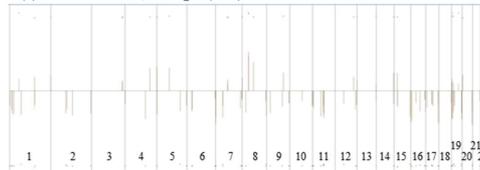


図5. 各群の cytogenetic profile. (a): 癌のFNAB-aCGHによる結果. (b): 癌のFFPE標本を用いたaCGHによる結果. (c): 良性病変のFNAB-aCGHによる結果.

16番染色体長腕の欠失は全ての悪性病変で認め、嚢胞内乳癌に特徴的な profileと考えられた。FNAB-aCGH法により、診断困難な乳腺嚢胞内腫瘍であっても術前に良悪性鑑別が可能であった。本成果は全国学会・国際学会にて発表され(SABCS2013, 第21回日本乳癌学会学術総会, 第113回日本外科学会定期学術集会) 学術雑誌に掲載された(Breast Cancer, 2014)。また、乳腺腫瘍の良悪性鑑別を最新の分子遺伝学的手法により行った、世界で初めての的向き試験の

試みであり、その臨床的意義は大きい。

(3) 細胞株・動物モデルを用いた、ゲノム不安定性を標的とした新規薬剤治療の開発

Subtype の異なる乳癌細胞株 (MCF7, MDA-MB436, MDA-MB468) においてゲノム不安定性をターゲットとした合成致死を評価すべく、Olaparib と Gimeracil の相乗効果を検討した。ゲノム不安定性の高い MDA-MB436 (TN, BRCA1 mut+) では Olaparib のみで増殖抑制を認め、MDA-MB468 (TN, p53 mut+) では併用において増殖抑制を認めた。MCF7 では併用においても増殖抑制は認めなかった。

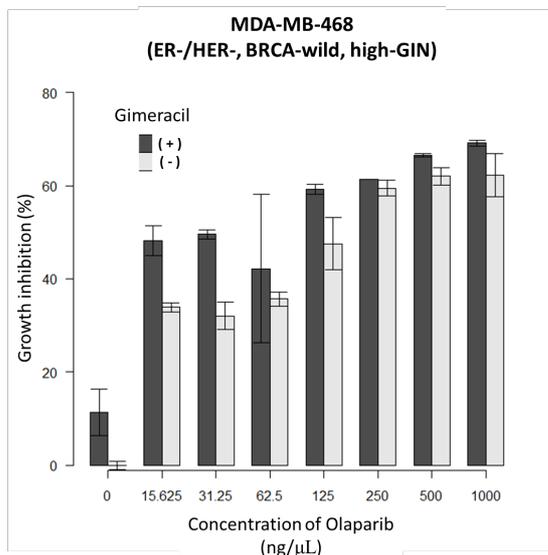


図 6. MDA-MB468 における Olaparib と Gimeracil の増殖抑制効果

今回の結果より、ゲノム不安定性を標的とした治療法を開発すれば、副作用が少なく、癌にのみ効果のある治療となる可能性が示唆された。

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6件)

Oikawa M, Yano H, Matsumoto M, Otsubo R, Shibata K, Hayashi T, Abe K, Kinoshita N, Yoshiura KI, Nagayasu T. A novel diagnostic method targeting genomic instability in intracystic tumors of the breast. Breast Cancer. 2014 Jan 9. [Epub ahead of print]. 査読あり

及川将弘, 大野真司. ホルモン療法における新しい展開. Pharma Medica. 2014, 32(5): 7-11. 査読なし

Matsumoto A, Yano H, Matsumoto M,

Oikawa M, Kinoshita N, Abe K, Satoh N, Anami M, Hayashi T, Nagayasu T. A case of immediate reconstruction using autologous free dermal fat graft after breast conservative surgery. Nagasaki Medical Journal. 2013, 88(2): 153-157. 査読あり

Otsubo R, Oikawa M (Co-first author), Hirakawa H, Shibata K, Abe K, Hayashi T, Kinoshita N, Shigematsu K, Hatachi T, Yano H, Matsumoto M, Takagi K, Tsuchiya T, Tomoshige K, Nakashima M, Taniguchi H, Omagari T, Itoyanagi N, Nagayasu T. Novel diagnostic procedure for determining metastasis to sentinel lymph nodes in breast cancer using a semi-dry dot-blot (SDB) method. IJC. 2014, Feb; 134(4):905-912. 査読あり

Nakao K, Oikawa M (Corresponding author), Arai J, Mussazhanova Z, Kondo H, Shichijo K, Nakashima M, Hayashi T, Yoshiura K, Hatachi T, Nagayasu T. A predictive factor of microarray comparative genomic hybridization analysis quality for formalin-fixed paraffin-embedded archival tissue. Diagn Mol Pathol. 2013, Sep;22(3):174-180. 査読あり

Arai J, Tsuchiya T, Oikawa M, Mochinaga K, Hayashi T, Yoshiura K, Tsukamoto K, Yamasaki N, Matsumoto K, Miyazaki T, Nagayasu T. Clinical and molecular analysis of synchronous double lung cancers. Lung Cancer 2012, Aug;77(2):281-7. 査読あり

[学会発表](計9件)

Oikawa M, Ishida M, Nakamura Y, Nishimura S, Koga C, Saruwatari A, Igawa A, Akiyoshi S, Koi Y, Ohno S. The impact of intra-tumoral heterogeneity on the prognosis of ER-positive/HER2-negative breast cancer. ASCO2014. 2014年5月30日~6月3日, シカゴ, 米国

Yano H, Oikawa M, Matsumoto M, Otsubo R, Shibata K, Hayashi T, Abe K, Kinoshita N, Nagayasu T. A novel diagnostic method targeting genomic instability in breast intracystic tumors. SABCS2013. 2013年12月10日~14日, サンアントニオ, 米国

及川将弘, 石田真弓, 中村吉昭, 西村純子, 古閑知奈美, 猿渡彰洋, 井川明子, 秋吉清百合, 厚井裕三子, 大野真司. ER陽性/HER2陰性乳癌におけるHER2 scoreの再評価. 第22回日本乳癌学会学術総会. 2014年7月10日~12日, 大阪

研究者番号：

及川将弘, 石田真弓, 中村吉昭, 西村純子, 古閑知奈美, 猿渡彰洋, 井川明子, 秋吉清百合, 厚井裕三子, 大野真司. ER陽性/HER2陰性乳癌におけるIntra-tumoral heterogeneityが予後に与える影響の解析. 第114回日本外科学会定期学術集会. 2014年4月3日~5日, 京都

及川将弘, 矢野洋, 松本恵, 大坪竜太, 林徳真吉, 安倍邦子, 木下直江, 永安武. 両悪性困難な乳腺腫瘍に対するFNAC-aCGH法の有用性の検討. 第21回日本乳癌学会学術総会. 2013年6月27日~28日, 浜松

及川将弘, 矢野洋, 松本恵, 大坪竜太, 林徳真吉, 安倍邦子, 木下直江, 黒木祥司, 及川達司, 永安武. 乳腺嚢胞内腫瘍に対する、ゲノム不安定性を指標にした良悪性鑑別法の検討. 第113回日本外科学会定期学術集会. 2013年4月11日~13日, 福岡

Oikawa M, Arai J, Kondo H, Nakashima M, Hayashi T, Yoshiura KI, Yano H, Nagayasu T. Utilization of formalin-fixed paraffin-embedded archival tissue for cytogenetic analysis of microarray-comparative genomic hybridization. ESMO2012. 2012年9月28日~10月2日, ウィーン, オーストリア

及川将弘, 中尾健次郎, 柴田健一郎, 松本恵, 矢野洋, 木下直江, 安倍邦子, 林徳真吉, 蔵重智美, 三浦史郎, 中島正洋, 永安武. 乳癌 FFPE 標本を用いたアレイ CGH 解析の精度管理. 第20回日本乳癌学会学術総会. 2012年6月28日~30日, 熊本

中尾健次郎, 及川将弘, 柴田健一郎, 松本恵, 林徳真吉, 永安武. HR陽性・HER2陰性乳癌におけるKi67の検討. 第20回日本乳癌学会学術総会. 2012年6月28日~30日, 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 将弘 (OIKAWA MASAHIRO)

独立行政法人国立病院機構 (九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：90612416

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()