

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	岡崎 智
-------	-----	-----	------

学 位 論 文 題 目

The feasibility of circulating tumor DNA analysis as a marker of recurrence
in triple-negative breast cancer

(トリプルネガティブ乳癌における、血中循環腫瘍DNAの遺伝子解析と
再発マーカーとしての可能性に関する検討)

共 著 者 名

佐々木 高明, 安田 俊輔, 阿部 昌宏, 吉田 奈七, 吉田 遼平, 石橋 佳, 南 幸範,
奥村 俊介, 千葉 伸一, 武井 英博, 林 隆介, 長門 利純, 小林 博也, 杉谷 歩,
小野 裕介, 水上 裕輔, 北田 正博, 大崎 能伸

Oncology letters, 掲載時期未定

研 究 目 的

女性ホルモン非依存性, HER2陰性であるTriple Negative乳癌(以下TNBC)症例は全乳癌の約15%を占める. 薬物療法の選択肢が少なく予後不良な臨床経過をとり, 再発時の早期診断マーカーが求められている. 現在, 血中の腫瘍マーカーやCTが再発診断に活用されているが, より高感度なツールとして血中の遊離DNAを解析する液体生検が注目されている. 次世代シーケンサー(NGS)を用いることで網羅的な遺伝子解析が可能となるが, これは高価かつ時間がかかる. 一方, ドロップレットデジタルPCR(ddPCR)は網羅的な解析が不可能であるが, NGSよりも高感度で安価, かつ解析結果を迅速に得られる利点がある.

TNBCにおいては, 血中の循環腫瘍DNA(ctDNA)量と全生存率との関連は指摘されているものの, 特定の遺伝子変異に着目した報告は少ない.

そこで我々は, TNBCにおいて特徴的な遺伝子変異をNGS解析により探索し, 見出した遺伝子変異をddPCRにより高感度に検出する系を確立することを目的とした. さらに, その検出系を用いて再発の早期診断が可能か検討した.

材 料 ・ 方 法

1. TNBC症例の集積

2000年4月～2017年3月において当科で手術を施行したTNBC症例のうち、術後2年以内に再発した症例の原発巣および転移巣を対象として集積した。倫理委員会承認（#18118）の上で患者から同意を得た。すでに死亡している患者検体についてはオプトアウト文書を作成し集積した。

2. NGSによる遺伝子解析

1. で集積した検体のホルマリン包埋切片からゲノムDNAを抽出し、50個の癌関連遺伝子パネル（Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2）を用いて解析を行った。機器はIon PGM Systemを使用し、変異検出はIon Reporter ver.5.0.4を用いて解析した。

3. ddPCRによる遺伝子解析

細胞株由来のDNAによる検証が可能である、PIK3CA H1047R, TP53 R175H/R248Q変異を認識するprobeおよびprimerについては、IDT社にデザインを依頼し用いた。AKT1変異についてはprobe/primerセット（Bio-Rad）を用いた。2. で抽出したゲノムDNAのうち、上記の変異を有する検体を対象として、QX200 Droplet Readerを使用し再度解析を行った。

4. 免疫染色

1. で集積した検体のホルマリン包埋切片を用い、1次抗体としてリン酸化AKTおよびAKTの下流分子であるリン酸化S6リボソームタンパクを用いた。染色の強度を、0：陰性～3：強陽性の4段階で評価した。

5. TNBC患者を対象とした液体生検

術後2年以内に再発したTNBC症例において3か月に1度程度採血を施行した。遠心分離によって血球を除去した後、血漿中の遊離DNAを抽出した。3. と同様にddPCRによる解析を施行した。倫理委員会承認（#17043）の上で患者から同意を得た。

6. 統計処理

免疫染色スコアの比較にはMann-Whitney U検定を用い、NGSおよびddPCRによって得られた変異の類似度については、ピアソンの相関係数を用いて評価した。P値0.05未満を統計学的有意差ありと判定した。

1. TNBC症例の集積

術後2年以内に再発した症例は36例存在した。手術施行時年齢の平均値は56.6歳であり、術後5年の全生存率は19%と予後不良であった。23例(63.9%)は閉経後症例であり、32例(89.0%)が浸潤性乳管癌の組織像を呈していた。4例(11.1%)は初診時に遠隔転移を来しているstageIVの症例であった。無増悪生存期間および全生存期間の平均値は、それぞれ12.6ヵ月(0-24ヵ月)、31.9ヵ月(1-175ヵ月)であった。

2. NGSによる遺伝子解析

十分な腫瘍量が得られなかった2例を除く、34例を検討対象とした。転移巣の手術または生検を施行された症例が13例あり、リンパ節8例、肺2例、脳2例、胸膜1例であった。原発巣34検体、転移巣13検体、計47検体の遺伝子解析を施行したところ、最も多く認められたのはTP53変異であり、33例(70.2%)で認められた。また、癌細胞の増殖に関連するPI3K/AKT活性経路に関連する遺伝子である、PIK3CA変異は12例(25.5%)、AKT1変異は7例(14.9%)と比較的多く認められた。PIK3CA変異の中ではH1047R変異が5例、AKT1変異の中ではE17K変異が6例と最多であった。一方、TP53については特徴的な変異はなかった。

3. ddPCRによる遺伝子解析

デザインしたprobeおよびprimerを利用した検出系は、0.01%程度まで変異検出が可能であった。2.と同様の47検体のうち、PIK3CA H1047R、TP53 R175H/R248Q、AKT1 E17K変異のいずれかが陽性だった17検体を対象とした解析において、いずれの変異でもNGS結果とほぼ同等のallele frequencyが得られた ($R = 0.93$, $P < 0.001$)。

4. 免疫染色

染色スコアは、pAKTは0:1例、1:6例、2:34例、3:6例であり、pS6は0:4例、1:2例、2:20例、3:21例だった。PIK3CA H1047RまたはAKT1 E17Kの有無で比較すると、変異陽性群においてpAKTのスコアが有意に高く ($P = 0.044$)、pS6のスコアも高い傾向にあった ($P = 0.105$)。

5. TNBC患者を対象とした液体生検

転移TNBC症例において、原発巣由来のDNAでPIK3CA H1047RまたはAKT1 E17K陽性例で液体生検においても同様の変異を検出できた。定期的に液体生検を施行することで、腫瘍マーカーが陰性の場合でもAllele frequencyの上昇を捉え、病態の悪化を把握することが可能であった。また、PIK3CA H1047R陽性の1例では、転移巣切除後に無再発を維持しているにもかかわらず腫瘍マーカー高値が持続しているが、この症例においてはAllele frequencyが0で経過しており、腫瘍評価における特異度の高さも窺えた。

考 案

血漿中を循環しているDNAはリンパ球など様々な細胞に由来するため、ctDNAはわずかにしか存在しない。このため、液体生検による遺伝子解析には高感度の検出系が必要となる。TNBCの標準治療である術前化学療法施行後にctDNAを検出できた症例は検出できなかった症例に比較して無病生存期間や全生存期間が劣ることがいくつか報告されている。これはctDNAの検出が術前化学療法の奏功を評価するのに有用なツールとなり得る可能性を示唆している。

結 論

ddPCRにより、遺伝子変異の高感度検出系を構築することが可能であった。これは液体生検にも応用可能であり、比較的安価、かつ時間対効率に優れる手法である。また、今回構築した検出系は、臨床的には再発マーカーとしても利用できる可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res. 2007; 13:4429–34.
2. Riva F, Bidard FC, Houy A, Saliou A, Madic J, Rampanou A, et al. Patient-Specific Circulating Tumor DNA Detection during Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. Clinical chemistry 2017;63(3):691-9.
3. Yoshida R, Sasaki T, Umekage Y, Tanno S, Ono Y, Ogata M, et al. Highly sensitive detection of ALK resistance mutations in plasma using droplet digital PCR. BMC Cancer. 2018; 18:1136.

参 考 論 文

1. Jiang YZ, Ma D, Suo C, Shi J, Xue M, Hu X, et al. Genomic and transcriptomic landscape of triple-negative breast cancers: subtypes and treatment strategies. Cancer Cell. 2019; 35:428–40.e5.
2. Hyman DM, Smyth LM, Donoghue MTA, Westin SN, Bedard PL, Dean EJ, et al. AKT inhibition in solid tumors with *AKT1* mutations. J Clin Oncol. 2017; 35:2251–9.