

博士論文

転移または再発乳癌の
末梢血循環 DNA 変異解析の検討

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
がん生命科学講座がん治療内科学分野
毛利 朋子

略語一覽

ESR1 : Estrogen Receptor 1

cfDNA: cell free DNA

ctDNA: circulating tumor DNA

NGS: New Generation Sequence

ddPCR: droplet digital PCR

Mol cov: molecular coverage

LOD: limit of detection

PD: Progression Disease

SD: Stable Disease

AF-1: activation function-1

DBD: DNA-binding domain

LBD: ligand-binding domain

SNV: Single Nucleotide Variant

MBC: Metastatic Breast Cancer

AI: Aromatase Inhibitor

SERD: Selective Estrogen Receptor Downregulator

JFCR: Japan Foundation of Cancer Research

I、要約

はじめに: ホルモン受容体陽性乳癌は全乳癌の約 70%を占め、術前もしくは術後に内分泌療法を行う。転移または再発を来した場合には生命を脅かす内臓転移がない限り内分泌療法を単独もしくは分子標的薬と併用で開始するが、いずれは耐性を獲得する。内分泌療法の耐性にはこれまで耐性獲得後の乳癌組織の遺伝子解析により *ESR1* の増幅、融合遺伝子、*ESR1* 遺伝子変異および *ERBB2* 遺伝子変異による耐性の獲得が報告されている。一方、その簡便さから最近では患者の血液を用いた circulating tumor cell (CTC) や circulating tumor DNA (以下 ctDNA) による乳癌細胞由来の遺伝子解析が報告されてきているが、日本人乳癌患者の遺伝子変異データは未だに少ない。また全エクソンシーケンスは治療経過の検討においては高コストとなり、現実的ではない。目的: 全エクソンシーケンスと比較してコストの低い乳癌用の遺伝子パネルを用いた ctDNA によるホルモン受容体陽性転移または再発乳がんの遺伝子変異について次世代シーケンサーを用いて解析し、当該パネルの有用性と臨床的因子との関連性について検討する。対象と方法: がん研有明病院乳腺センターにて内分泌療法または化学療法を受けている転移または再発乳癌 56 例に対し任意の時点で ctDNA の遺伝子変異について次世代シーケンサー(以下 NGS)を用いて解析した。さらに検出された遺伝子変異を digital droplet PCR (以下 ddPCR) で検証

した。結果：末梢血中の無細胞 DNA 濃度（cfDNA）と ctDNA につき検討した。

cfDNA 濃度は測定可能病変数の中央値以上と以下で検討し有意差は認めなかったが、転移臓器数と相関していた（ $p=0.0018$ ）。また腫瘍マーカーでは CEA と相関が見られた（ $p=0.0015$ ）。cfDNA 2.6 ng/ml plasma 以上の症例は同値以下の症例と比較して無増悪生存期間（以下 PFS）と全生存期間（以下 OS）はともに短かった（それぞれ $p=0.013$ 中央値 395.5、95%信頼区間 268–522、 $p=0.0043$ 中央値 3128、95%信頼区間 1930–3733）。ctDNA の検討では 56 例中 41 例（73.2%）に遺伝子の変異が認められた。検出された変異は *TP53* が最も多く 29/56 例（51.7%）、次いでアロマターゼ阻害剤（AI）の耐性に関連する *ESR1* 遺伝子変異が 9/56 例（16%）に認められ、9 例全てがエストラジオール（E2）の ligand binding domain の変異であった。そのうち 2 症例では 2 箇所 hot spot 変異を認めた。*ESR1* 遺伝子変異は 9 例であり、AI 剤既治療例のみに *ESR1* 遺伝子変異が見られた。*ESR1* 遺伝子変異は他の遺伝子変異を伴いやすく、陽性の症例は陰性の症例と比較して PFS が短かった。*PIK3CA* 遺伝子変異の症例ではこの傾向は見られなかった。AI 暴露の期間と *ESR1* 遺伝子変異には明らかな相関はなかったが、内分泌療法のライン数が増えると *ESR1* 遺伝子変異が多くなっていた。多変量解析では cfDNA 濃度と *ESR1* 遺伝子変異が PFS に影響

を与えていた。ddPCR では *ESR1*、*PIK3CA*、*KRAS* の 3 つの遺伝子変異を解析したところ NGS との結果とほぼ同様であった。考察: ホルモン受容体陽性転移または再発乳癌の cfDNA 濃度、乳癌用遺伝子パネルを用いた ctDNA による遺伝子変異と臨床的関連について検討した。cfDNA 濃度は転移臓器個数と相関することから cfDNA 濃度は体内の腫瘍量を反映していると考えられる。また、腫瘍マーカーが陰性の症例においても、cfDNA 濃度により体内腫瘍量のモニタリングが出来る可能性が考えられた。ctDNA における遺伝子変異の検討では乳癌用遺伝子パネルを用いて、約7割以上の症例で ctDNA を検出することが出来た。AI 抵抗性の要因の一つである *ESR1* 遺伝子変異の有無は AI の暴露期間とは関連なく、内分泌療法のライン数と関連したことより、様々な作用機序を持つ内分泌療法への暴露が変異を惹起する可能性が示唆された。また、*ESR1* 遺伝子変異は予後不良との関連が認められ、治療中の *ESR1* 遺伝子変異検出は治療薬を変更するなど治療方針の決定に有用である可能性が示唆された。この研究の限界として、一つのポイントのみでの採血結果であり、治療ラインも揃っていないことにより多くの症例を用いて患者背景を統一させた検討が必要であると考えられた。また、本研究にて検体を採取したがん研有明病院の特性として他院からの転医症例が多く、原発巣や転移巣の組織標本との比較が出来なかったた

め、前向きに原発巣、転移巣、血漿のペア検体の蓄積が必要である。今後、治療中の定期的な ctDNA を用いた遺伝子変異の解析は予後予測や薬剤の効果予測に有用である可能性があり、新規薬剤使用において継続的な ctDNA の検討をしていく必要がある。

II、研究背景

乳癌は地域がん登録全国統計によると2014年の罹患数は94,848人と推定され、女性の部位別罹患者数では第1位となっている。死亡率は年々増加しており、2015年の人口動態統計では大腸、肺、膵臓、胃に続いて第5位である。欧米では年齢が上がるにつれて罹患率が高くなるが、日本では40-50歳代女性が罹患率、死亡数ともに一番高くなっている。初期治療を受けた原発乳癌の約3割は再発をきたし、初発患者の約5%は進行癌である。進行再発乳癌の予後は非常に悪く、10年生存率は5%ほどで治癒は極めて困難である^{[1, 2][3]}。進行再発乳癌に対する治療の目的は症状緩和やQOLの改善、生存期間の延長である。乳癌では組織免疫染色でエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体が陽性的場合にはホルモン受容体陽性乳癌と診断され、エストロゲン依存性に増殖・進展している^[4]。エストロゲン受容体の発現の有無は

内分泌療法(エストロゲン合成阻害やエストロゲン受容体拮抗薬)に対する非常に強力な治療効果予測因子となっており^[5]、エストロゲン受容体陽性転移性乳癌に対しては抗癌剤治療とともに内分泌療法は非常に有効な治療として確立している^[6]。ホルモン受容体陽性転移または再発乳癌の場合、単に内蔵転移があるだけではなく急速に進行する臨床所見や自覚症状域、検査結果などの悪化があるなどの生命を脅かす状態ではない場合には内分泌療法の単剤もしくは分子標的薬との併用療法から治療を開始する(図1)^{[7][8][9]}。しかしながら当初内分泌療法に感受性を示した症例であってもほぼすべてが最終的には治療抵抗性を獲得する。このような治療過程に伴う耐性獲得の機序としては、エストロゲン受容体発現の低下^[10]、HER2 受容体あるいは IGF 受容体を介した経路の活性化、PI3K/AKT/mTOR 経路の活性化などが考えられていたが^[11]、近年行われた転移部組織を使った次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析によりエストロゲン受容体 (*ESR1*) 自体の遺伝子変異が2次的に出現していることが明らかとなり、新たな耐性機序の一つとして注目されている^{[12][13]}。Jeselsonらは乳癌の原発巣より転移巣で *ESR1* 遺伝子変異の頻度が高くなることから、病状の進行に従いこの遺伝子変異が獲得されていることを報告した^[14]。2016年の米国腫瘍学会での PALOMA-3 試験(転移再発乳癌に対する2次治療での

CDK4/6 阻害剤の臨床試験)の結果より *ESR1*変異を起こしている症例は事前にアロマターゼ阻害剤の既治療歴があり、SERM ではその傾向は見られなかった^[15]。また Schiavon らは術後補助療法としての AI 使用歴よりも転移再発治療としての AI 既治療例で *ESR1*変異が多いことを報告している^[16]。*ESR1*遺伝子変異はアロマターゼ阻害剤や SERD(selective estrogen receptor down regulator)などの内分泌療法既治療例の約 30%に起こり、内分泌療法への耐性の原因となりうることが報告されている^[17]。

[18] [19] [20]。

肺がん、大腸がんなどでは既に一般臨床において遺伝子変異検査が実施され治療方針決定の指針として確立している。例えば、肺がんにおいて *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor)に遺伝子変異が存在した場合は抗 *EGFR* 阻害剤であるエルロチニブやゲフィチニブがまず選択され^[21]、また大腸がんにおいて *RAS* 遺伝子に変異が存在する場合には抗 *EGFR* 抗体であるセツキシマブを使用しない治療方針が選択される^[22]。乳癌領域でも HER2陰性転移再発乳癌において生殖細胞の *BRCA1,2* に遺伝子変異が確認された場合、olapalib の適応となる。これらのことより、腫瘍の遺伝子変異を知ることは治療方針の決定に重要な役割を担うようになってきている。

内分泌療法耐性を示した症例における転移巣の再生検は非常に有用である。既存の報告では原発巣と転移巣ではエストロゲン受容体の発現に約 20%程度の乖離が認められており（図2）^[23]、また上述のようにエストロゲン受容体の遺伝子変異も認められることが明らかとなったことから、可能な限り生検による再評価が勧められるが、侵襲性の問題からその適応が限られるのが現実である。この問題を解決するため、より非侵襲的検査である採血による血中遊離癌細胞（CTC）あるいは血中遊離腫瘍 DNA（ctDNA）での遺伝子変異を評価する Liquid biopsy の研究開発が進められている（図3）^[24]。

ctDNA は腫瘍のアポトーシスやネクローシスにより DNA が血中に放出されたものである^[25]。ctDNA の解析方法については様々なものが報告されている^{[26] [27]}。しかし、主な報告は digital PCR であり、この方法では各 hot spot ごとの特異的なプライマーが必要になるため、一つの遺伝子の包括的な検索は困難である。近年では次世代シーケンサー（NGS）の性能があがり、以前より低コストで検索が出来るようになった。しかしながら現在のところ、次世代シーケンサーによる日本人の乳癌の ctDNA データはまだ報告が少ない。今後、乳癌領域においても ctDNA は予後因子、または薬剤の効果予測因子として研究結果が期待されている。次世代シーケンサーでの DNA 解

析方法としては全ゲノム解析、全エクソーム解析、ターゲットリシーケンスが挙げられるが、今回我々の用いた Oncomine™ Breast cfDNA assay は thermofisher 社が保有する Oncomine™ knowledge database にて乳癌で頻度の高かった 10 遺伝子 (*TP53,PIK3CA,ESR1,AKT1,EGFR,ERBB2,ERBB3,FBXW7,KRAS,SF3B1*) の hotspot を検出するターゲットリシーケンスであり、全ゲノム解析、全エクソーム解析よりも安価に使用することが出来る分子バーコード法を用いたパネルである。このような乳癌用パネルでの日本人の ctDNA 解析の有用性データはまだない。

Ⅲ、研究の目的

ホルモン受容体陽性転移または再発乳癌の ctDNA での遺伝子変異につき Oncomine™ Breast cfDNA assay (図4)という分子バーコード法を用いた乳癌に特化した10遺伝子でのパネルにより NGS で ultradeep sequence を行い、その臨床学的因子や予後との関連を明らかにする。

Ⅳ、研究方法

1、ホルモン受容体陽性の定義

乳癌の原発巣もしくは生検された転移巣の病理検体を ISH 法で ER もしくは PgR を Allred score にて判定し、染色細胞割合 (proportion score) と染色強度 (intensity score) で合計3点以上のものをホルモン受容体陽性とした。

2、対象

がん研究会有明病院乳腺内科にて、2015年11月より2017年9月までで初診時に転移のあった症例を含めてホルモン受容体陽性転移または再発乳癌と診断され治療が開始されている56例が登録された。本研究は、がん研究会の医学系研究倫理審査委員会で承認 (IRB No.2015-1056) されたものであり、ヘルシンキ宣言に基づき行われた。

3、臨床・病理学的情報

後ろ向きカルテ調査により基本的な臨床情報 (年齢、月経状態、既往歴、家族歴、採血結果、CT、MRI、PET、骨シンチなどの画像所見、術前後の治療の有無及び内容、化学療法、内分泌療法、分子標的剤療法の有無及び内容、転帰など) を収集した。画像所見の評価については RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid

Tumors) version1.1 に基づき行った。これらの治療効果との相関をIV章8節に示すような統計学的手法を用いて解析を行った。

4、検体採取

採血は内分泌療法、化学療法中の任意のタイミングで施行した。通常治療における採血に加えて7ml EDTA-2Na tube で2本、計 14 ml を採取した。検体採取後2時間以内に 2000 g、10 分間 4 °Cの環境下で遠心分離し、血清と buffy coat を採取、その後 16000 g10 分間 4 °Cで遠心分離し沈殿物を除き DNA 抽出まで-80 °Cの冷凍庫にて保存した。

5、DNA 抽出 (図5)

DNA は MagMAX cell-free DNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用した。精製された血漿に magnetic beads を混和し cfDNA を結合させるように良く振盪、マグネットスタンドに立ててマグネットに吸着されなかった余剰液を廃棄した。その後に MagMAX™ Cell Free DNA Wash Solution を beads とともに混和、振盪させてマグネットに吸着し、余剰液を破棄し 80 %エタノールで洗浄し不純物を除外した。60 μ l の MagMAX™ Cell Free DNA Elution Solution を加え DNA を溶液に溶解

させマグネットスタンドにて beads を吸着した。elution 液中に精製された cfDNA を採取した。抽出した DNA は全症例で Qubit 3.0 fluorometer (Thermo Fisher) を用いて DNA 濃度を測定した。また純度については Nano Vue (GE Healthcare UK Ltd. Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, England) を用いて A260/A280 吸光度比で測定した。cfDNA のクオリティチェックは Tape Station® (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)を用いて断片サイズが 200 bp 前後であることを確認した。

6、ライブラリの作成 (図6)

次世代シーケンサーによる解析の準備として、Oncomine Breast cfDNA assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いてライブラリーを作成した。この assay は *TP53*, *PIK3CA*, *ESR1*, *ERBB2*, *ERBB3*, *KRAS*, *EGFR*, *AKT*, *SFB1*, *FBXW7* の 10 遺伝子の 160 hotspot の変異を検出出来るものである。当該 assay は4~6bp ほどの短い塩基を tag として付与し、PCR エラーを防ぐ手法を用いている。抽出された cfDNA の濃度を計算し 10 ng を使用し、cfDNA から目的遺伝子を増幅するために 96 well プレートに分注し cfDNA Library PCR Master Mix 15 μ l、 cfDNA Panel 2 μ l、

10 ng の cfDNA に Nuclease free water を加えサーマルサイクラーで増幅した。

Agencourt™ AMPure™ XP Reagent を各検体に加え増幅物を beads に吸着させたのち、80 %エタノールで洗浄し 24 μ l of Low TE buffer にて溶解した。溶解液 23 μ l 中を採取し、各検体を識別するための Tag Sequencing BC (#1-48)、cfDNA Library Primer を加え PCR にてターゲットを増幅した。バーコードを付加された検体は Agencourt™ AMPure™ XP Reagent で精製され、80 %エタノールで洗浄されたのちに Low TE buffer 28 μ l 中に溶解された。ライブラリは Ion Library TaqMan® Quantitation Kit にて qPCR で定量を行った。定量にて得られた結果を元に cfDNA 濃度を計算し 10 ng の DNA を用い、Ion Chef™ system にてエマルジョン PCR を行った。NGS 解析(図7)はがん研究所 CPM センターの ION S5 system (Thermo Fisher) にて行い、Torrent Suite Software Ver 5.2.2 にて解析を行った。Quality チェックは Target Median Molecular Coverage が 60 %以上あるものを有効とした。

7 、 Digital droplet PCR

NGS で得られた *ESR*, *PIK3CA*, *KRAS* 遺伝子変異の結果を検証するために残余検体が採取可能な検体において 10 ng の DNA を用い digital PCR を行った。デバイス

は QX200 Droplet Digital PCR system (Bio-Rad, CA USA) を使用した。*ESR1* Y537/538 の検出には LBx® Probe *ESR1* Multi を使用し、*PIK3CA* E545 と H1047L の検出には LBx® Probe *PIK3CA* (Riken Genesis, Tokyo, Japan) を使用した。*KRAS* G12D の検出には Thermo fisher probe を使用した。PCR は血漿 1ml あたりのコピー数にて計算し、アレル頻度の計算には QuantaSoft software (Bio-Rad laboratories) を用いた。

8、統計学的解析

PFS は起点日を一次治療開始日とし Progression Disease と診断された日、もしくは最終受診日までと規定した。OS は一次治療開始日から死亡日もしくは最終受診日までとした。OS、PFS は Kaplan-Meier 法を用い、2群間の比較には log-rank 検定にて有意差検定を行った。腫瘍マーカーと cfDNA 量の解析には分散分析を用いた。各々の因子との関連性を検討するために Spearman の順位相関係数を使用した。単変量解析にはカイ二乗検定を用い、多変量解析では cox 比例ハザードモデルを使用し検討した。また、二つの変数の相関を見るときには相関係数と t 検定を用いた。多重比較には Kruskal Wallis 検定を用いた。全ての統計学的検討の有意水準は $P < 0.05$ とし

た。画像判定は採血直前の画像評価と直後の画像評価にて病状が進行している症例を Progression Disease (PD)、増大が 20 %以内の症例を Stable Disease (SD)とした。cfDNA と腫瘍マーカーにおける検討においては cfDNA 濃度が非常に低かったため、対数グラフにて表示した。腫瘍マーカーの変化率は採血日の計測値/前月の計測値-1にて計算した。

V、研究結果

1、臨床病理学的特徴

2015 年 11 月より 2017 年 9 月までがん研究会有明病院 乳腺内科に通院中の転移もしくは再発乳癌症例のうち、同意を得られた 56 例が登録された。患者背景は表 1 に示す。症例は全例女性で 48 歳から 92 歳、年齢中央値は 64 歳であった。初診時に転移乳癌と診断された症例は 10 例 (17.6%) であった。術後 24 ヶ月以内に再発を来したのは残りの 46 例中 4 例 (8.7%) であった。再発時の月経状態は閉経前 23 例 (41.1%) 閉経後 33 例 (58.9%)であった。検体採取時点での内分泌療法の治療歴は治療歴なし 5 例 (8.9%)、1 レジメン 10 例 (17.9%)、2 レジメン 19 例 (33.9%)、3 レジメン以

上は 22 例 (39.2%)であり、39 例 (69.6%)が転移または再発乳癌の治療としてアロマターゼ阻害剤の治療歴を有していた。内臓転移を有していたのは 40 例 (78.6%)であり、転移臓器数については1臓器 9 例 (16%)、2 臓器 (26.8%)、3 臓器 31 例 (55.2%)であり、半数以上の症例で 3 臓器以上の転移巣を有していた。内臓転移はなく、骨転移、リンパ節転移のみの症例は 16 例 (28.6%)であった。採血タイミングは PD 症例 23 例 (41%)、SD 症例 (59%)であった。採血後の CDK4/6 阻害剤使用症例は 15 例 (26.8%)、化学療法使用症例は 35 例 (62.5%)であった。追跡中央期間は 16 ヶ月であった (表1)。

2、cfDNA 濃度と臨床学的特徴

56 例から 56 検体が採取された。採取した 14 ml の血液検体から得られた平均の血漿量は 7.25 ml であった。平均の cfDNA 濃度は 16.85 ng/ml plasma (1.22 -194 ng/ml)であった。内臓転移の有無においては cfDNA 濃度に有意な差は認められなかった (t 検定 $p=0.16$)(図 8A)。画像診断による測定可能病変をもつ症例にて転移巣の中央値 4.5cm で比較したところ、cfDNA 濃度には有意な差は認められなかったが、転移巣が大きいほど cfDNA 濃度が高くなる傾向が見られた ($p=0.77$)(図 8B)。さ

らに転移臓器数で検討したところ、転移臓器数と cfDNA 濃度に相関が見られた (p=0.0018)(図 8C)。転移臓器数3以上の症例にて SD 症例よりも PD 症例の方が高い結果となり、転移臓器数が多くても SD 症例では cfDNA 濃度は低い結果となった (p=0.05) (図 8D)。腫瘍マーカーである CEA、CA15-3 で検討したところ、CEA において cfDNA 濃度との相関が見られた (それぞれ p=0.0015, p=0.17) (図 8E)。さらに腫瘍マーカーの変化率と cfDNA 量とで検討したところ CEA、CA15-3 共に相関がみられ (それぞれ $r^2=0.27, p=0.001$ 、 $r^2=0.40, p=0.001$) マーカーが上昇するにつれ cfDNA 量が多くなる結果となった。cfDNA 濃度と予後との関連においては cfDNA 濃度が 2.6 ng/ml plasma 以上では 2.6 ng/ml 以下の症例と比較して PFS、OS ともに相関があった (それぞれ p=0.013 中央値 395.5、95%信頼区間 268-522、p=0.0043 中央値 3128、95%信頼区間 1930-3733)(図 8G,H)。

3、 ctDNA 遺伝子変異の解析

今回使用した遺伝子パネルにて 56 例中 41 例 (73.2%)で ctDNA の遺伝子変異を検出した。検出された変異数は 68 (表 4)、変異の平均は1症例につき 1.65 (0-10)であった (図 9A)。NGS での overall depth 中央値は 49648 X (18520-73023)で分子バー

コードを付加した molecular depth 中央値は 2444 X (1078–4397)、検出限界 (limit of detection)は 0.15 であった (図 9B 表3)。それぞれの変異については *TP53* 29/56 例 (51.7%)、*PIK3CA* 17/56 例 (30.3%)、*KRAS* 9/56 例 (16%)、*ESR1* 9/56 例 (16%)、*AKT* 2/56 例 (3.5%)、*FBXW7* 1/56 例 (1.7%)、*ERBB3* 1/56 例 (1.7%)、*SFB1* 0/56 例、*ERBB2* 0/56 例、*EGFR* 0/56 例であった。そのうちアロマターゼ阻害剤の既治療例 39 例では *PIK3CA* の変異は 12 例に見られた。*ESR1* 遺伝子変異は 9 例であり、アロマターゼ阻害剤既治療例のみに *ESR1* 遺伝子変異が見られた。これは Lefebvre らのホルモン受容体転移または再発のデータとほぼ同じ頻度であったが^[28]、*TP53*、*KRAS* においては本研究のデータの方が高い結果となった (図 9C)。変異頻度は *PIK3CA* が最も高く 2.9% であり、ついで *TP53* 1.7% *ESR1* 1.2% であった。*ESR1* 遺伝子変異は hotspot でのみ検出され、そのすべてが ligand binding domain (LBD) に存在していた (図 9D)。アロマターゼ阻害剤既治療例は 42 例であったが、その内転移または再発乳癌の治療として使用されたのは 39 例であり、この内 8 例で *ESR1* 遺伝子の変異が認められた (17.9%)。一方、術後補助療法としてのみアロマターゼ阻害剤を使用し、転移または再発してからは使用していない 1 例において *ESR1* 遺伝子の変異が認められた (図 9D)。*ESR1* 遺伝子の変異は全て ligand binding

domain の hotspot に認められ、2症例では2箇所の変異を、残りの7症例では変異は一つのみであった。Hot spot の場所は Y537S (5/9, 55.5%)、D538G (2/9, 22.2%)、E380Q (3/9, 33.3%)であった。*ESR1* 遺伝子変異のあった症例では全てアロマターゼ阻害剤の治療歴を有していた。薬剤の暴露期間と *ESR1* 遺伝子変異には関連性がなかったが ($p=0.493$)(図 10A)、内分泌療法のライン数とは相関していた ($p=0.012$)(図 10B)。*ESR1* 遺伝子変異がある症例では有意に他の遺伝子も変異を有していた(図 10C)。*ESR1* 遺伝子変異を有している症例では変異のない症例と比較して有意に PFS が短い結果となっていたが、*PIK3CA* では差がなく、*ESR1* が予後予測因子となる可能性が示唆された(図 11AB)。多変量解析では ctDNA 濃度と *ESR1* 遺伝子変異の存在が PFS に寄与していた(それぞれ $p=0.006$, $p=0.027$)(表2)

4、digital PCR での解析結果

NGS にて得られた結果をもとに、特に *ESR1* 遺伝子変異が陽性であった症例と既存のデータベースよりも頻度が高い結果となった *KRAS* 遺伝子変異について、残余検体がある症例で droplet digital PCR で validation を行った。Br06 の症例では *ESR1* 遺伝子の NGS によるアレル頻度が 14.5 %、ddPCR は 17.56 %であり、Br23 では

12.6 %と 16.7 %であり、Br40 は次世代シーケンサーにて Y537,Y538 の変異を認めため2箇所の変異を検出出来るプローベを用いて検証したところ、ほぼ同頻度で検出することが出来た (図 12)。アレル頻度の少ない Br30 においても、NGS と ddPCR ではほぼ同様の頻度で検出された (図 12 右下)。NGS にて *ESR1* 遺伝子の変異が検出出来なかった症例においては、残余検体が少なく、ddPCR で検証し直すことが出来なかった。また、*KRAS* 遺伝子変異においてもコピー数は少ないものの、NGS と ddPCR では同様の結果を得ることが出来 (図 13)、今回使用したパネルの検出については妥当性があると考えられた。*KRAS*、*ESR1*、*PIK3CA* 遺伝子の NGS と ddPCR は $R^2=0.92$ で高い一致率を得ることが出来た (図 1)。

VI、考察

この研究の目的は NGS での遺伝子パネルを用いた ultradeep target resequence を用いて ctDNA の有用性につき検討することであった。ctDNA の検出には whole genome sequence、target re-sequence^[29]、BEAMing^[30]、ddPCR^[31, 32]による方法などが報告されている。これらの方法にはそれぞれ利点と欠点があるが^[33]、分子バーコードを用いた NGS は PCR エラーによる読み取りのミスを減少させ、検出感度を上昇

させる^[34]。今回の検討では OncoPrint™ Breast cfDNA assay という分子バーコードを用いた乳癌に特化した遺伝子パネルでホルモン陽性の転移もしくは再発乳癌の頻度の高い 10 遺伝子について検討した。図2B に示すように今回の結果では overall depth 中央値が 49648 X、分子バーコードをつけた molecular depth 中央値は 2444 X で平均検出限界は 0.15 であり 3000 コピーの野生対立遺伝子に対して 2 コピーの突然対立遺伝子が検出出来る計算となる。既報では 1 ml 血漿中の cfDNA 平均値は 5400 コピーであり^[34]、今回の研究での平均血漿量が 7.25ml であることより、当該パネルではレアな変異バリエーションを検出できることが検証出来た。これまで ctDNA 研究に最も多く用いられてきた ddPCR の検出感度は 0.1%とされているが^[35]、一度に解析できるのは一つの遺伝子の 1 もしくは 2 hotspots のみとなる。今回のパネルでは、総数は少ないものの一度に 10 の乳癌に関連する遺伝子を解析し、ddPCR とほぼ同等の検出感度を得られることが出来た。これにより、ctDNA の変異遺伝子解析においては遺伝子パネルが主に用いられるようになる可能性がある。

血漿中の cfDNA 濃度は病期の進行につれて増加し、cfDNA のモニタリングは臨床的にも重要であることが報告されている^[36-38]。今回の検討で cfDNA 濃度は転移臓器数が多いほど上昇しており、CEA と有意に相関していた。cfDNA 濃度は転移臓器個

数と相関することから cfDNA 濃度は転移を起こす体内の循環腫瘍量を反映していると考えられる。しかし、転移臓器数が多くても SD 症例では cfDNA 濃度が低いことが示され、また腫瘍マーカーの変化率とも相関していたことから、転移臓器が多く、cfDNA 濃度が低くてもその後の経過観察により cfDNA 濃度が上昇していくような場合には病状が進行している可能性が示唆された。また、腫瘍マーカーが陰性の症例においても、cfDNA 濃度により体内腫瘍量のモニタリングが出来る可能性が考えられた。多変量解析の結果、cfDNA 濃度と *ESR1* 遺伝子変異は有用な予後因子となる可能性があることが示された。一方で cfDNA 濃度は治療の効果予測とはならないという報告もあり^[39]、ctDNA での遺伝子の変化を捉えることが重要である。ctDNA は個体間、腫瘍間の heterogeneity を反映していると言われ、治療中にリアルタイムに測定することが可能である^{[38][40]}。

今研究では *TP53*、*PIK3CA*、*ESR1* 遺伝子変異の頻度が高かった。*TP53* 遺伝子の体細胞変異は cell cycle、アポトーシス、DNA 修復に関連し、乳癌においては進行度が上がるにつれて変異が上昇する^[41, 42]。既報では *TP53* の乳癌における体細胞変異の割合は 15-71%とされ^[41] 今回の結果では 51.7 %であった。*PIK3CA* 遺伝子変異は 30.3 %の症例に検出された。*PIK3CA* 遺伝子変異は健常人では見られず、非浸潤が

んと浸潤がんでほぼ頻度が同じことから、乳癌発生のドライバー遺伝子であることが推測されるが^[43]、変異の有無による予後への影響に差がないことが報告されている^[44]。今回の検討においても *PIK3CA* 変異の有無による PFS の差は見られなかった。

ホルモン受容体陽性転移もしくは再発乳癌の約 30 %に *ESR1* 遺伝子変異が見られ、アロマターゼ阻害剤への耐性や予後への影響などが報告されている^{[19] [45]}。*ESR1*は activation function domain、DNA binding domain、Hinge 領域、LBD で構成されエストロゲンが LBD に結合することで構造変化を起こし転写が活性化される。*ESR1*遺伝子変異は LBD のホットスポットに約 74%の変異が集中していることが知られており^[18]^{[19] [20] [46]}、エストロゲンの存在に関わらず構造変化を起こし転写を促進する。今回の検討において変異は 16%で LBD の hotspot に認められたが、ホルモン陽性転移乳癌の ctDNA による *ESR1* 遺伝子変異は 25.3 %-39.1 %で^{[47] [15]}、今回の検討では 16 %と変異の頻度が少なかったが、当検討では全体の組み入れ数が少なく、AI 既治療例の数が少なかったことなどが考えられた。今回の検討では *ESR1*遺伝子変異を持つ症例が少なかったため、変異数や hotspot による予後の解析は出来なかった。今検討では、*ESR1*遺伝子変異があると他の遺伝子変異が有意に多くなっていた

が、*ESR1* 遺伝子変異が他の遺伝子にも何らかの影響を与え、細胞増殖を促進していたのか、他の遺伝子変異の影響を受けていたかは不明なため、今後 *ESR1* 遺伝子変異の機能的検討が必要であると考えられた。*ESR1* 遺伝子変異が陽性であった症例は全例アロマターゼ阻害剤での治療歴を有していた。アロマターゼ阻害剤の暴露期間が長くなるにつれ、*ESR1* 遺伝子変異率が高くなるという報告が見られるが^[45]、今回の検討では関連がなく、暴露期間とは関連がないが、治療ラインとの関係についてはホルモン療法のライン数と関連が見られたことより、様々な作用機序をもつ内分泌療法に暴露し、エストラジオールに対するシグナルが枯渇することが *ESR1* 遺伝子変異クローンの増加と関わる可能性が考えられた。

ESR1 遺伝子変異陽性例は野生型と比較して予後が悪いことが報告されている^[15]。

今回の検討でも *ESR1* 遺伝子変異は予後不良との関連が認められ、治療中の *ESR1* 遺伝子変異検出は治療薬を変更するなど治療方針の決定に有用である可能性が示唆された。

今回の検討では他のデータベースと比較して *KRAS* 遺伝子変異が高い結果となっていた。患者背景については単変量解析にて *KRAS* 遺伝子変異の有無には有意な差はなく、また他癌の既往のある症例はなかった。*KRAS* は EMT 誘導因子となる TGF-

β の発現を上昇させ^[48]、癌化に寄与しているが、転移再発乳癌における役割は不明である。今回の検討では原発巣との比較がないため、どの時点で *KRAS* の変異が起きたかは不明である。今回の検討での分子バーコードを付加され読まれた *KRAS* 変異の変異アレルは 2-4 であったが（表3）、デジタル PCR でも検出できたことより、今後 deep sequence 法により *KRAS* 遺伝子の頻度が変わる可能性がある。

ctDNA と腫瘍 DNA での一致率は 50-88%とされ^{[49] [50]}、乳癌領域ではまだ ctDNA での臨床応用はされていないが、現在患者の ctDNA 変異により治療法を選択する basket trial や治療中の ctDNA 遺伝子変化を追跡する試験などが進行している。

2019 年のサンアントニオ乳癌シンポジウムにおいて plasma MATCH 試験という進行乳癌の ctDNA での遺伝子変異により治療を選択する phase2 試験の結果が発表された。当該試験では ctDNA での HER2 変異に対する neratinib と AKT1 変異に対する capivasertib の有効性が示され、ctDNA での遺伝子変異の検討が有用であった。

この研究では Gardant 360 という遺伝子パネルが用いられたが、このパネルは現在保険適用外で1検体あたりおよそ 40 万円の検査日がかかり、検出限界は 0.1%と報告されている^[51]。今回の研究で用いたパネルまた検出限界がほぼ同等でありながら検査費用が低いことが利点である。しかしながら、CDK4/6 阻害剤の効果予測に関

連すると考えられる *RB* 遺伝子が含まれないなど、遺伝子の選択に関しては改善の余地があると考えられる。

これまで ctDNA での遺伝子変異検索の検討は ddPCR での報告が多く、近年になり NGS での報告が増えてきている。日本における分子バーコードを用いた NGS での報告は増永ら^[34]によりされているがパネルではなく、*ESR1* 遺伝子のみを対象としていた。今検討で使用した OncoPrint™ Breast cfDNA assay での検討は健常人とがん症例での方法検討の報告があるが^[52]現在のところホルモン陽性転移または再発乳癌に対しての日本人の報告はない。

この研究の限界として、一つのポイントのみでの採血結果であり、治療ラインも揃っていないことにより多くの症例を用いて患者背景を統一させた検討が必要であると考えられた。また、本研究で検体を採取したがん研有明病院の特性として他院からの転医症例が多く、原発巣や転移巣の組織標本との比較が出来なかった。また、cfDNA は運動や炎症、加齢などにより増加することがあり、予後に影響を与えている可能性も考えられる。2017 年 12 月に CDK4/6 阻害剤が保険収載され、がん研有明病院では 2018 年 1 月より使用開始となった。今回 early line での CDK4/6 阻害剤使用例はなかったが、採血後に CDK4/6 阻害剤もしくは化学療法を使用した症例と未

使用例では予後が異なり、OSに影響を及ぼした可能性がある。今後前向きに原発巣、転移巣、血漿のペア検体の蓄積が必要である。治療中の定期的な ctDNA を用いた遺伝子変異の解析は予後予測や薬剤の効果予測に有用である可能性があり、新規薬剤使用において継続的な ctDNA の検討をしていく必要がある。次世代シーケンサーは一度に計測できる遺伝子数が多いが、コストが高く、ddPCR はコストは低いものの遺伝子ごとにプライマーが必要になり、検討遺伝子数が多くなると血液が大量に必要ななどそれぞれ利点と欠点がある。今研究において、次世代シーケンサーと ddPCR の検出は同等であることがわかったため、時系列による ctDNA 研究の際には最初に網羅的に次世代シーケンサーで遺伝子変異を検索し、その後 ddPCR で追跡するなどそれらをうまく組み合わせることが今後の臨床応用に向けて重要であると思われる。

VII、結論

ホルモン陽性転移または再発乳癌に対して、NGS での遺伝子パネルによる ctDNA 解析を行った。cfDNA 量は予後と相関していた。また *ESR1* 遺伝子変異の存在は予後不良因子であった。当該パネルは ddPCR の結果と良く相関していた。

Ⅷ、文献

1. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL *et al*: **Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 1996, 14(8):2197-2205.
2. Rahman ZU, Frye DK, Smith TL *et al*: **Results and long term follow-up for 1581 patients with metastatic breast carcinoma treated with standard dose doxorubicin-containing chemotherapy: a reference.** *Cancer* 1999, 85(1):104-111.
3. Iwata H, Saji S, Ikeda M *et al*: **The Japanese Breast Cancer Society Clinical Practice Guidelines, 2018 edition: the tool for shared decision making between doctor and patient.** *Breast Cancer* 2019.
4. Dickson RB, Lippman ME: **Growth factors in breast cancer.** *Endocr Rev* 1995, 16(5):559-589.
5. Badve S, Nakshatri H: **Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications.** *J Clin Pathol* 2009, 62(1):6-12.
6. Hortobagyi GN: **Treatment of breast cancer.** *N Engl J Med* 1998, 339(14):974-984.
7. Toss A, Cristofanilli M: **Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2015, 17:60.
8. **NCCN Guidelines Insights: Breast Cancer, Version 1.2017.** 2017, 15(4):433-451.
9. Cardoso F, Senkus E, Costa A *et al*: **4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)**dagger. *Ann Oncol* 2018, 29(8):1634-1657.
10. Drury SC, Detre S, Leary A *et al*: **Changes in breast cancer biomarkers in the IGF1R/PI3K pathway in recurrent breast cancer after tamoxifen treatment.** *Endocr Relat Cancer* 2011, 18(5):565-577.
11. Ignatiadis M, Sotiriou C: **Luminal breast cancer: from biology to treatment.** *Nat Rev Clin Oncol* 2013, 10(9):494-506.

12. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, Dvir A *et al*: **D538G mutation in estrogen receptor-alpha: A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer.** *Cancer Res* 2013, **73**(23):6856-6864.
13. Dustin D, Gu G, Fuqua SAW: **ESR1 mutations in breast cancer.** *Cancer* 2019, **125**(21):3714-3728.
14. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G *et al*: **Emergence of constitutively active estrogen receptor-alpha mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2014, **20**(7):1757-1767.
15. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, Hrebien S *et al*: **Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer.** *J Clin Oncol* 2016, **34**(25):2961-2968.
16. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I *et al*: **Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer.** *Sci Transl Med* 2015, **7**(313):313ra182.
17. Osborne CK, Schiff R: **Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer.** *Annu Rev Med* 2011, **62**:233-247.
18. Li S, Shen D, Shao J, Crowder R *et al*: **Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts.** *Cell Rep* 2013, **4**(6):1116-1130.
19. Robinson DR, Wu YM, Vats P *et al*: **Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer.** *Nat Genet* 2013, **45**(12):1446-1451.
20. Toy W, Shen Y, Won H *et al*: **ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer.** *Nat Genet* 2013, **45**(12):1439-1445.
21. Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M *et al*: **Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naive non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002).** *Ann Oncol* 2013, **24**(1):54-59.
22. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ *et al*: **K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer.** *N Engl J Med* 2008, **359**(17):1757-1765.
23. Curtit E, Nerich V, Mansi L *et al*: **Discordances in estrogen receptor status,**

- progesterone receptor status, and HER2 status between primary breast cancer and metastasis. *Oncologist* 2013, **18**(6):667-674.
24. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW *et al*: **Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA.** *Nature* 2013, **497**(7447):108-112.
 25. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K: **Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**(6):426-437.
 26. Board RE, Wardley AM, Dixon JM *et al*: **Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **120**(2):461-467.
 27. Thress KS, Brant R, Carr TH *et al*: **EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291.** *Lung Cancer* 2015, **90**(3):509-515.
 28. Lefebvre C, Bachelot T, Filleron T *et al*: **Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis.** *PLoS Med* 2016, **13**(12):e1002201.
 29. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C *et al*: **Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA.** *Sci Transl Med* 2012, **4**(136):136ra168.
 30. Dressman D, Yan H, Traverso G *et al*: **Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(15):8817-8822.
 31. Vogelstein B, Kinzler KW: **Digital PCR.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(16):9236-9241.
 32. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK *et al*: **Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients.** *Clin Chem* 2013, **59**(12):1722-1731.
 33. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J *et al*: **Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA.** *Nat Rev Cancer* 2017, **17**(4):223-238.
 34. Masunaga N, Kagara N, Motooka D *et al*: **Highly sensitive detection of**

- ESR1 mutations in cell-free DNA from patients with metastatic breast cancer using molecular barcode sequencing. *Breast Cancer Res Treat* 2018, 167(1):49-58.
35. Elazezy M, Joosse SA: Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J* 2018, 16:370-378.
 36. Goodall J, Mateo J, Yuan W *et al*: Circulating Cell-Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition. *Cancer Discov* 2017, 7(9):1006-1017.
 37. Miao Y, Fan Y, Zhang L *et al*: Clinical value of plasma cfDNA concentration and integrity in breast cancer patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2019, 65(6):64-72.
 38. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ *et al*: Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014, 6(224):224ra224.
 39. Hyun MH, Sung JS, Kang E *et al*: Quantification of circulating cell-free DNA to predict patient survival in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017, 8(55):94417-94430.
 40. Heitzer E, Auer M, Ulz P *et al*: Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome Med* 2013, 5(8):73.
 41. Pharoah PD, Day NE, Caldas C: Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999, 80(12):1968-1973.
 42. Williams AB, Schumacher B: p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016, 6(5).
 43. Miron A, Varadi M, Carrasco D *et al*: PIK3CA mutations in in situ and invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 2010, 70(14):5674-5678.
 44. Zardavas D, Te Marvelde L, Milne RL *et al*: Tumor PIK3CA Genotype and Prognosis in Early-Stage Breast Cancer: A Pooled Analysis of Individual Patient Data. *J Clin Oncol* 2018, 36(10):981-990.
 45. Allouchery V, Beaussire L, Perdrix A *et al*: Circulating ESR1 mutations at the end of aromatase inhibitor adjuvant treatment and after relapse in

- breast cancer patients.** *Breast Cancer Res* 2018, **20**(1):40.
46. Segal CV, Dowsett M: **Estrogen receptor mutations in breast cancer--new focus on an old target.** *Clin Cancer Res* 2014, **20**(7):1724-1726.
 47. Chandarlapaty S, Chen D, He W *et al*: **Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial.** *JAMA Oncol* 2016, **2**(10):1310-1315.
 48. Jung SY, Malhotra P, Nguyen KC *et al*: **The KRAS-variant and its impact on normal breast epithelial cell biology.** *Cell Death Differ* 2019, **26**(12):2568-2576.
 49. Adalsteinsson VA, Ha G, Freeman SS *et al*: **Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors.** *Nat Commun* 2017, **8**(1):1324.
 50. Chae YK, Davis AA, Jain S *et al*: **Concordance of Genomic Alterations by Next-Generation Sequencing in Tumor Tissue versus Circulating Tumor DNA in Breast Cancer.** *Mol Cancer Ther* 2017, **16**(7):1412-1420.
 51. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA *et al*: **Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA.** *PLoS One* 2015, **10**(10):e0140712.
 52. Alborelli I, Generali D, Jermann P *et al*: **Cell-free DNA analysis in healthy individuals by next-generation sequencing: a proof of concept and technical validation study.** *Cell Death Dis* 2019, **10**(7):534.

図の説明

図1: 転移再発乳癌の治療戦略(NCCN ガイドライン Ver3, 2019 を改変)

図2: 原発巣と転移巣の subtype の乖離

図3: 組織生検と liquid biopsy の特長

図4: Oncomine™ Breast cfDNA assay 遺伝子リスト

図5: DNA 抽出方法模式図

図6: ライブラリー作成手順

図7: NGS workflow

図8: cfDNA 量と臨床的因子の相関

- A) 内蔵転移の有無と cfDNA 量
- B) 測定可能病変の腫瘍径と cfDNA 量
- C) 転移臓器数と cfDNA 量
- D) 検体採取タイミングと cfDNA 量
- E) 腫瘍マーカーと cfDNA 量の相関
- F) 前回採血日からの腫瘍マーカーの変化率と cfDNA 量との相関
- G) cfDNA 量と無増悪生存期間
- H) cfDNA 量と全生存期間

図9: 変異スペクトラム

- A) 各症例の遺伝子変異と頻度
41 例/56 例 (73.2 %) で ctDNA 遺伝子変異を検出した。
変異の総数は 68 箇所であった。
- B) Ultradeep sequence により得られた深度

Total coverage depth: 読まれた全てのリード数

Molecular coverage depth: 分子バーコードが付与され読まれたリード数

C) 当院と既報とのデータ比較

Mutational profiles of MBC(転移組織のデータ)^[28]と今検討での比較

D) *ESR1*遺伝子変異の hotspot

図 10: *ESR1*遺伝子変異との関連

A) 治療ラインと *ESR1*遺伝子変異

B) アロマターゼ阻害剤暴露期間と *ESR1*遺伝子変異

C) *ESR1*遺伝子変異と他の遺伝子変異との関連

図 11: 遺伝子変異の有無と PFS の関連

A) *ESR1*変異の有無による PFS

B) *PIK3CA* 変異の有無による PFS

図 12: NGS と ddPCR とのアレル頻度の比較

右上、左上) *ESR1* Y537 の probe を使用

左下) NGS にて二つの変異が検出されたため、対応した multi probe を使用

右下) NGS での少量アレル頻度に対する ddPCR での検討

図 13: ddPCR による *KRAS* 遺伝子変異の検証

図 14: NGS と ddPCR との一致率

PIK3CA, ESR1, KRAS 遺伝子について分散分析を行った。

表1:患者背景

表2:各因子における単変量と多変量

単変量解析はカイ二乗検定にて、多変量解析はcox 比例ハザードモデルにて解析した

表3:KRAS 解析結果

表4:各症例の検出結果

図1

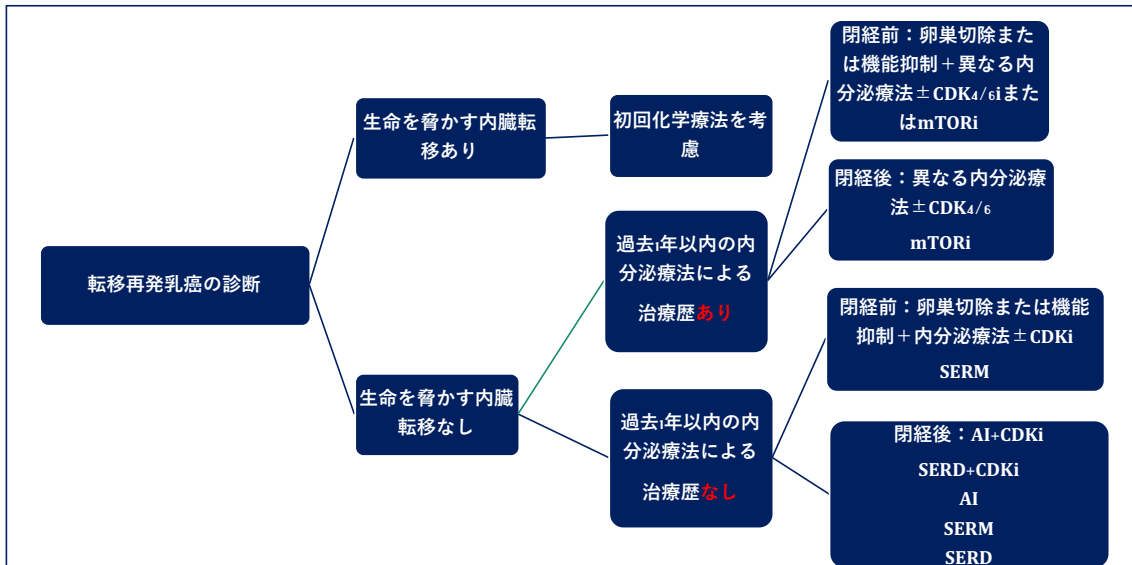


図2

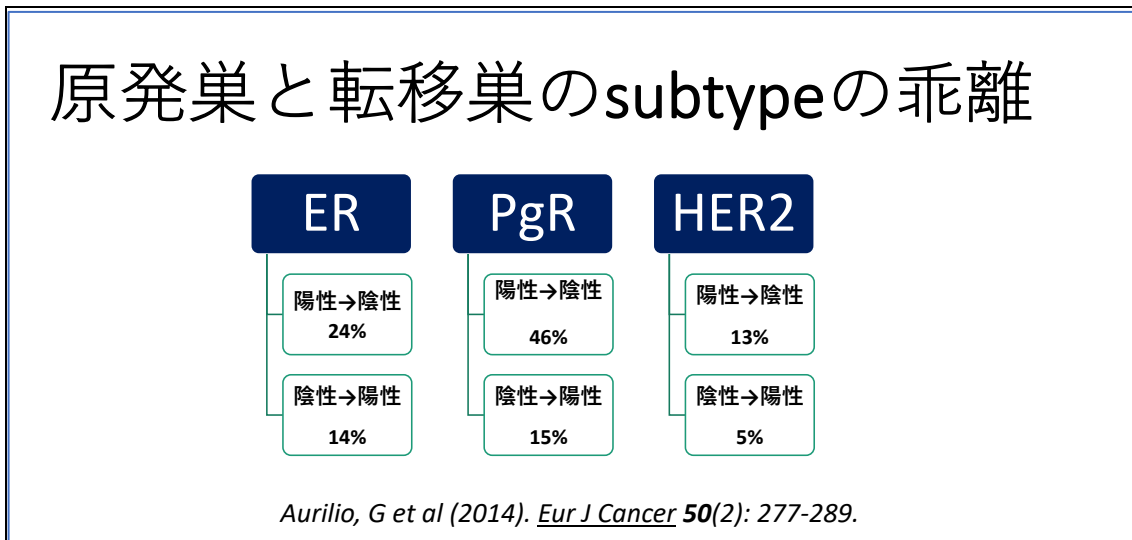


図3

	組織生検	Liquid Biopsy
手技	高侵襲、反復困難	低侵襲、連続採取可能
特性	組織の一部分の情報のみ	体内腫瘍全体を反映出来る
技術	確立している 高度な技術が必要	標準化必要 手技は容易
臨床有用性	実臨床で治療選択の際に 使用している	エビデンス蓄積が必要

図4

Oncomine™ Breast cfDNA assay 遺伝子リスト

<i>AKT1</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB2</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ESR1</i>
<i>FBXW7</i>	<i>KRAS</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SF3B1</i>	<i>TP53</i>

図5:

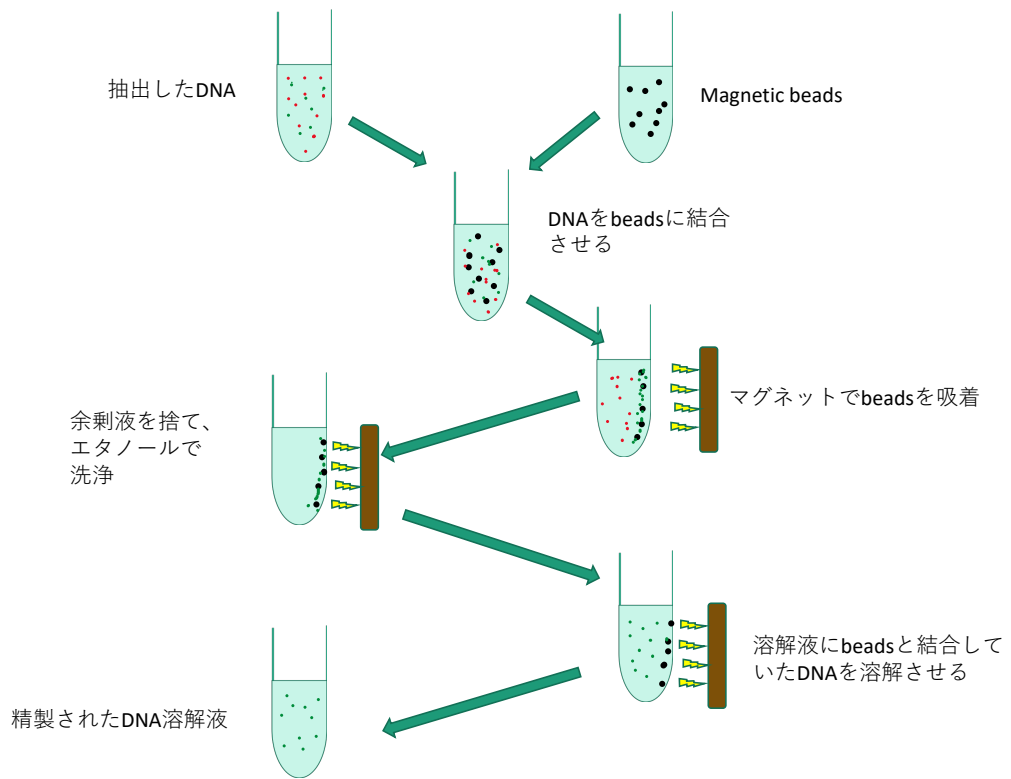


図6

Library 作成手順概念

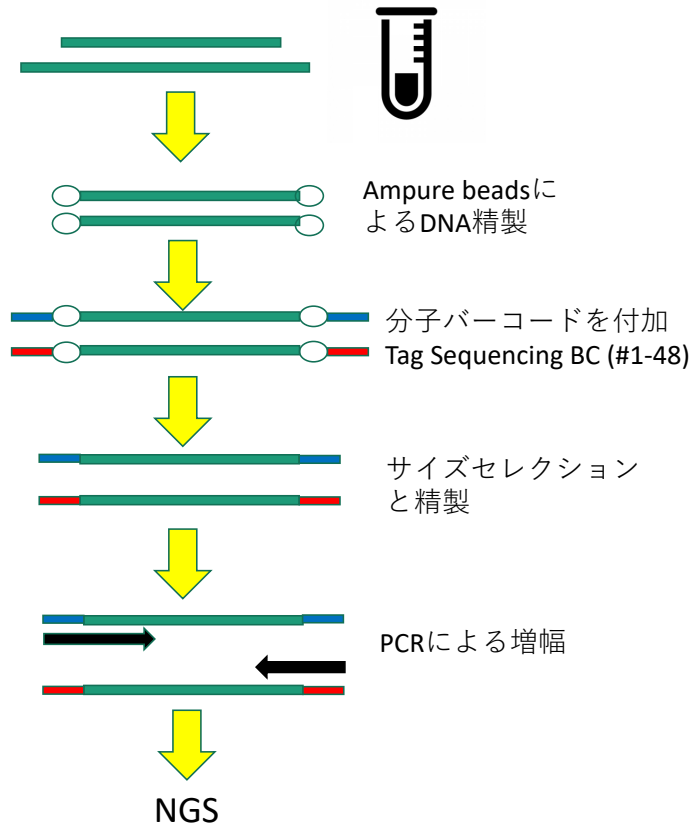


図7

NGSのworkflow

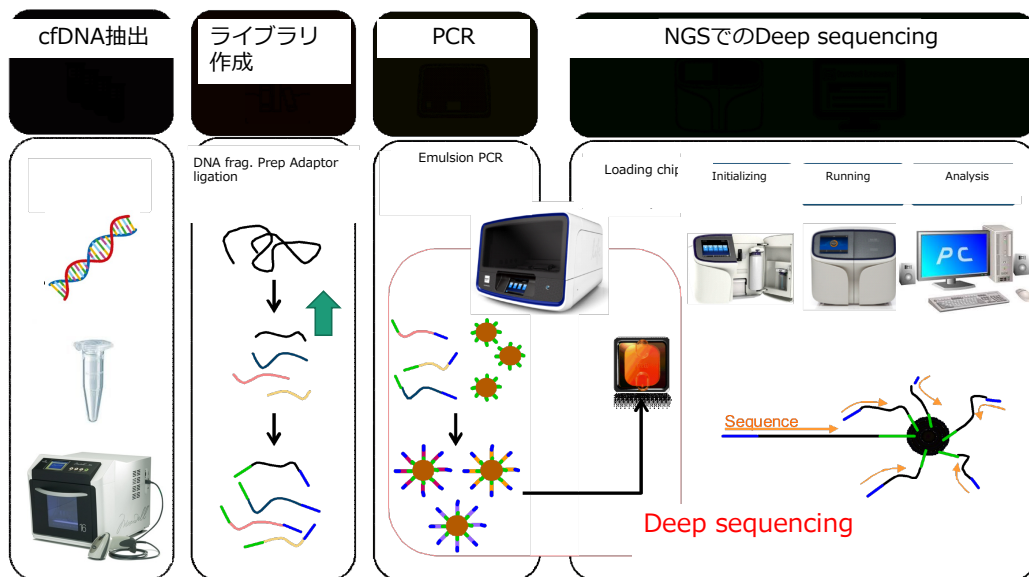
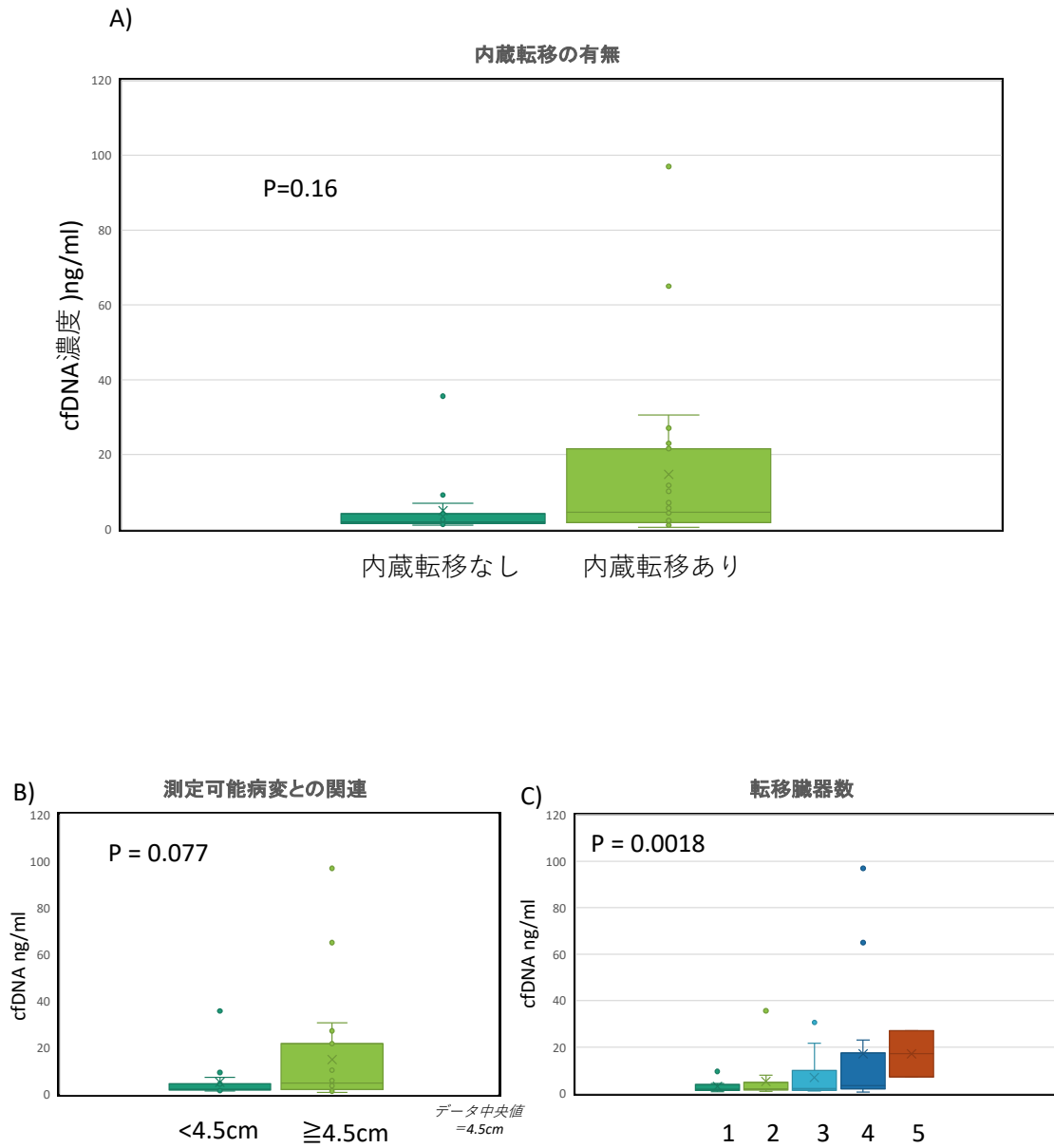
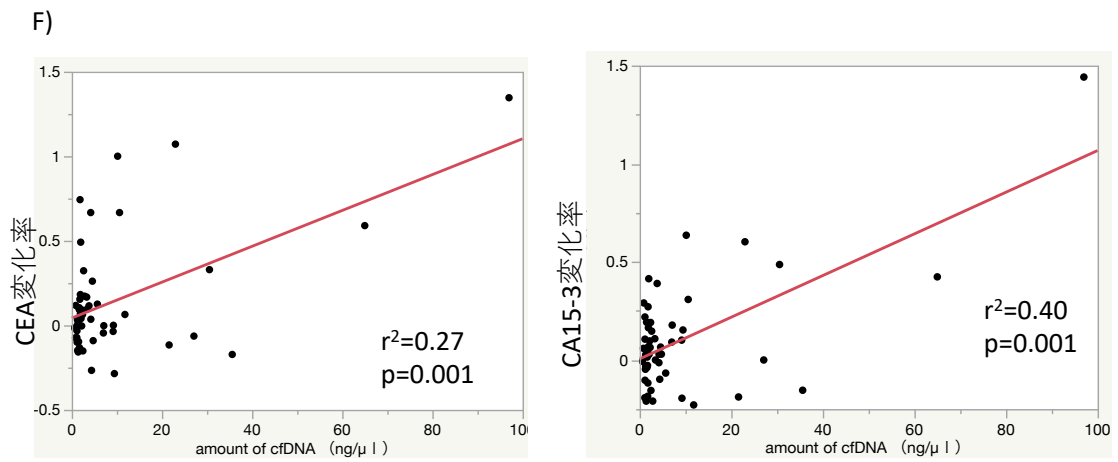
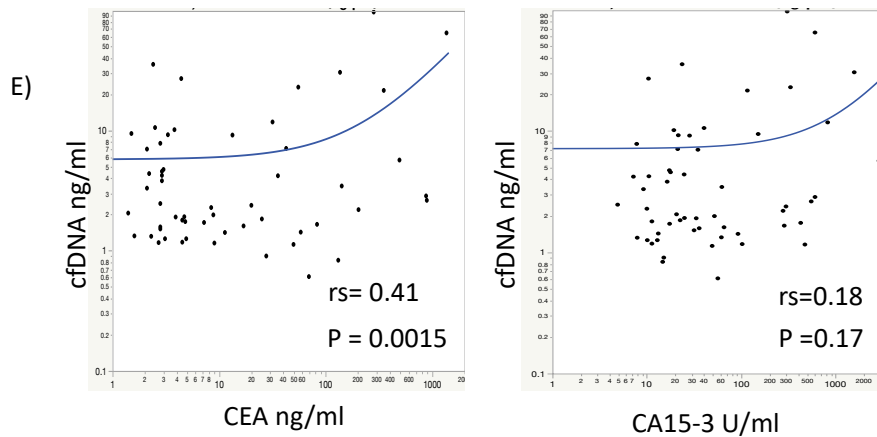
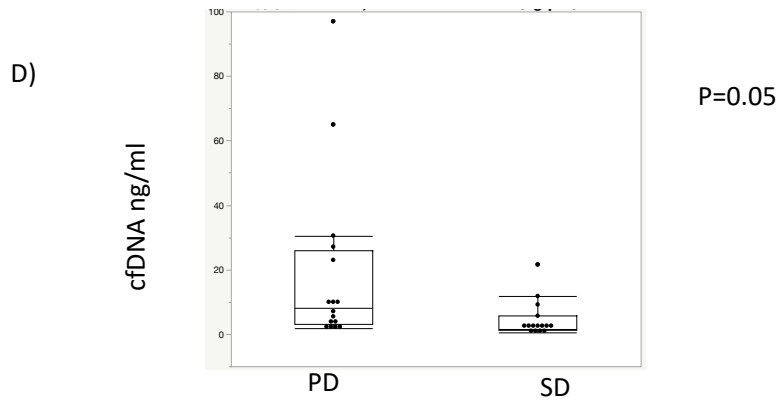


図 8: cfDNA 量と臨床因子との関連





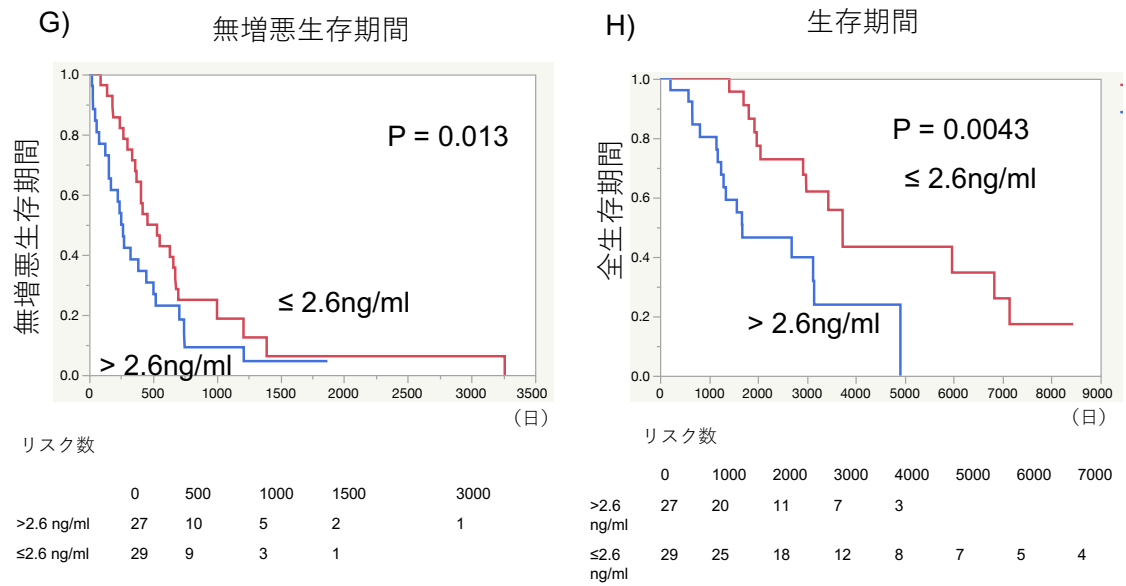
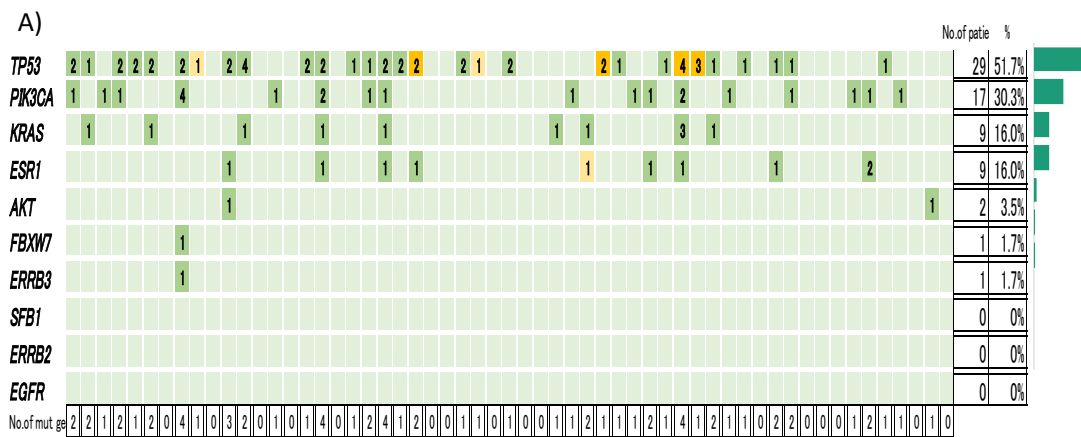


図 9: 変異スペクトラム

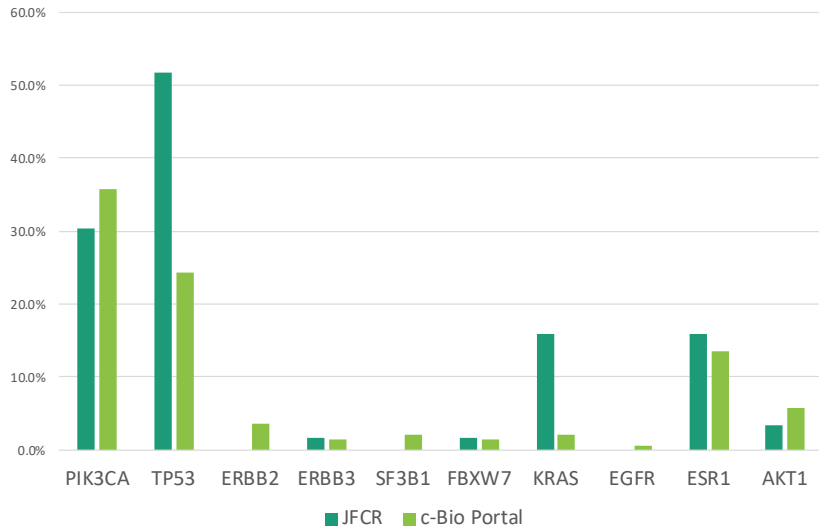


- SNV
- Insertion
- SNV&Insertion

B)

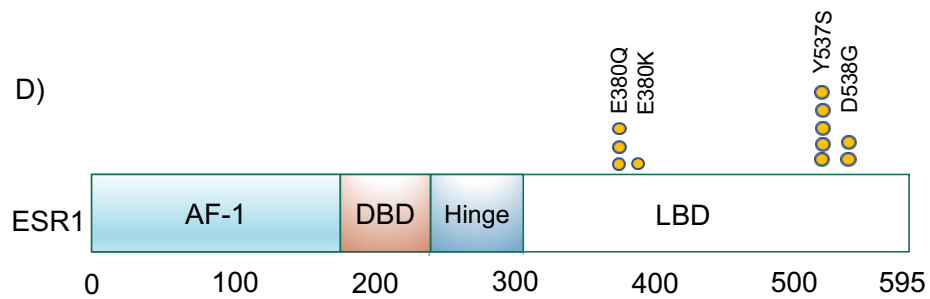
Total coverage depth	平均 56,933 X (38,758–79,718 X)
Molecular coverage depth	平均 4,442 X (2,786–5,569 X)

C)



	PIK3CA	TP53	ERBB2	ERBB3	SF3B1	FBXW7	KRAS	EGFR	ESR1	AKT1
JFCR(ER+) ctDNA	30.3%	51.7%	0.0%	1.7%	0.0%	1.7%	16.0%	0.0%	16.0%	3.5%
cBioPortal(ER+MBC) 腫瘍検体	37.9%	27.1%	3.6%	1.4%	2.1%	1.4%	2.1%	0.7%	14.3%	5.7%

D)



症例	hotspot
1	E380Q
2	E380Q
3	Y537S
4	D538G
5 (only use at adj.)	p.Ala380_Met381insT
6	Y537S
7	E380Q,E380K,Y537S
8	Y537S
9	Y537S,D538G

図 10: *ESR1*遺伝子変異との関連

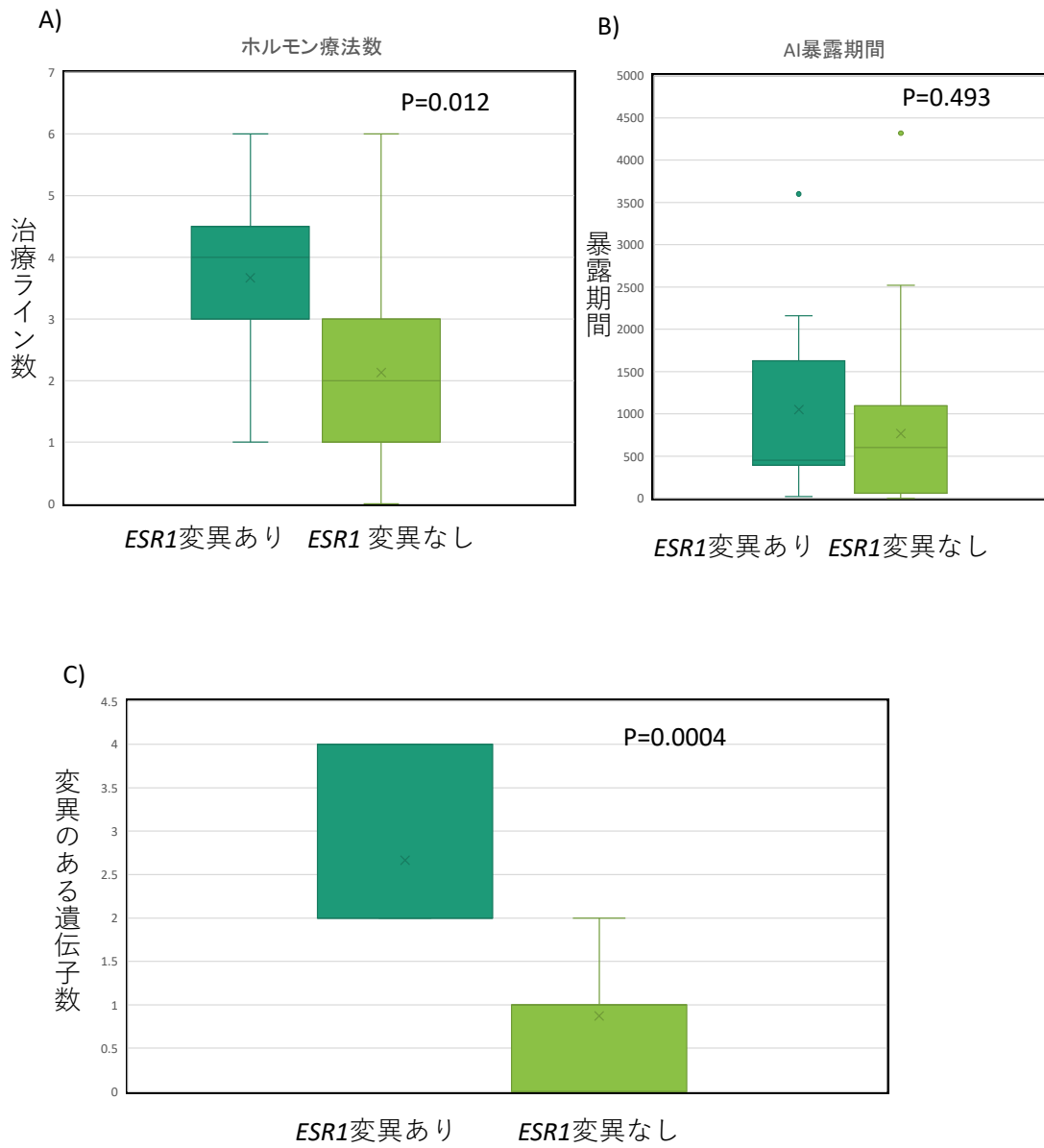


図 11: 遺伝子変異の有無と PFS の関連

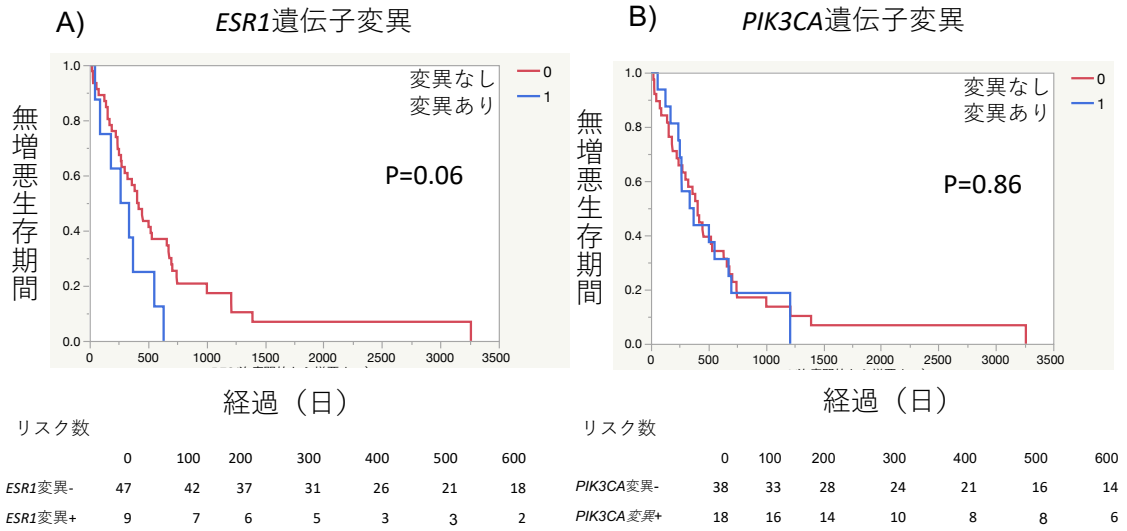


図 12: NGS と ddPCR とのアレル頻度の比較

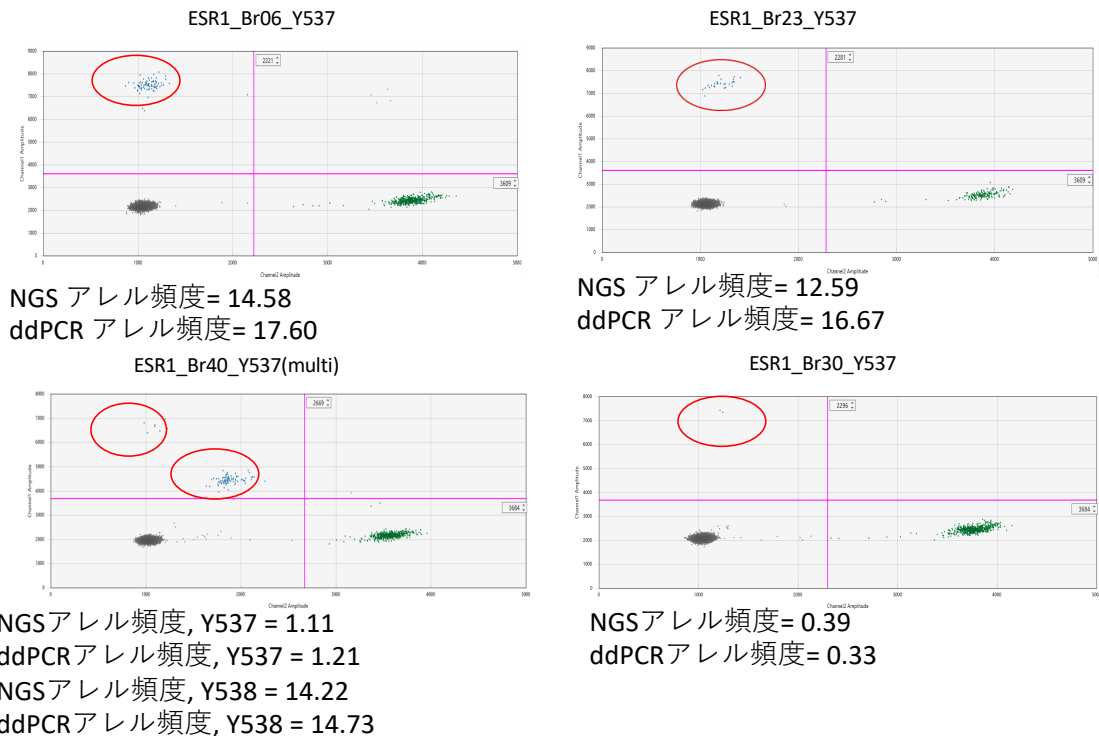


図 13: ddPCR による *KRAS* 遺伝子変異の検証

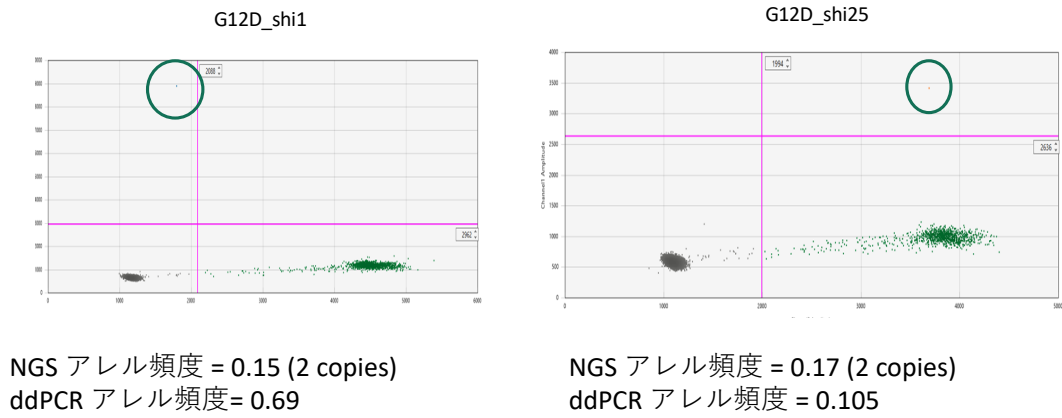


図 14: NGS と ddPCR との一致率

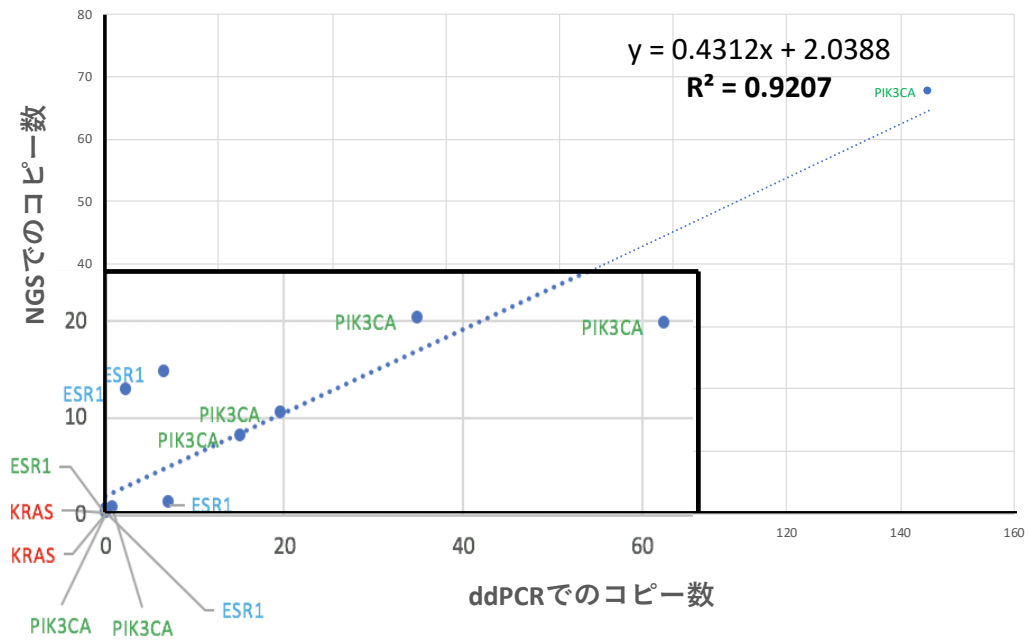


表1: 患者背景

年齢		軟部組織/リンパ節再発	
中央値 (範囲)	64 (48-92)	あり	25 (44.6)
		なし	31 (55.4)
初診時StageIV 再発までの期間		骨転移	
≤24ヶ月	10 (17.6) N=46	あり	44 (78.6)
>24ヶ月	4 (8.7)	なし	12 (21.4)
42 (91.3)			
月経状態		内臓転移	
閉経前	N (%) 23 (41.1)	あり	40 (71.4)
閉経後	33 (58.9)	なし	16 (28.6)
MBCに対する内分泌療法ライン数		転移臓器数	
0	N (%) 5 (8.9)	1	9 (16.0)
1	10 (17.9)	2	15 (26.8)
2	19 (33.9)	3臓器以上	31 (55.2)
3ライン以上	22 (39.2)		
MBCに対する既内分泌療法治療薬		検体採取タイミング	
AI	N (%) 39 (69.6)	PD	23(41%)
SERD	39 (69.6)	SD	33(59%)
SERM	36(64.2%)		
CDK4/6阻害剤	0(0%)	採血後のCDK4/6阻害剤使用	15(26.8%)
		採血後の化学療法使用	35(62.5%)
		観察中央値	16 (0.3-20)ヶ月

表2: 各因子における単変量と多変量

単変量解析はカイ二乗検定にて、多変量解析は cox 比例ハザードモデルにて解析した

因子		単変量			多変量			
		症例数	割合	p 値	ハザード比	95%信頼区間	p 値	
内臓転移	yes	40	71.4%	0.103				
	no	16	28.6%					
転移臓器数	<2	25	44.6%	0.469				
	>3	31	55.4%					
cfDNA 濃度	>2.6	47	83.9%	0.127	2.16	-0.91	-0.12	0.006*
	<2.59	9	16.1%					
ESR1 遺伝子変異	yes	9	83.9%	0.305	1.56	-0.82	-0.05	0.027*
	no	47	16.1%					

表3: KRAS 解析結果

ID	Gene ID	Allele Name	Region Name	Coverage	Mol Coverage	Copy no.	Allele Mol Freq (%)	LOD (%)
Br01	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	40346	1975	4	0.2	0.1
Br51	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	35015	1364	2	0.15	0.15
Br53	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	31281	1094	2	0.18	0.15
Br57	KRAS	p.G12V	KRAS_SP_5.288759	37471	1867	2	0.11	0.1
Br62	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	37168	2322	2	0.09	0.1
Br64	KRAS	p.G12V	KRAS_SP_5.288759	38551	2510	3	0.12	0.1
Br70	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	36614	2116	2	0.09	0.1
Br78	KRAS	p.G12R	KRAS_SP_5.288759	13271	1305	3	0.23	0.15
Br92	KRAS	---	KRAS_SP_5.288759	22852	1356	3	0.22	0.15

表4: 各症例の検出結果

ID	Gene ID	Allele Name	Region Name	Coverage	Mol Coverage	Allele Mol Cov	Allele Mol Freq (%)	LOD (%)
Br01	ESR1	---	ESR1_chr6_152419923	52109	3923	9	0.23	0.05
Br01	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	40346	1975	4	0.2	0.1
Br02	TP53	---	TP53_chr17_7578479	61152	2007	2	0.1	0.1
Br02	TP53	p.C141R	TP53_chr17_7578479	61040	2007	2	0.1	0.1
Br03	TP53	p.E285K	TP53_chr17_7577118	60690	2423	2	0.08	0.1
Br04	PIK3CA	p.H1047R	PIK3CA_SP_28.120542	42414	2689	96	3.57	0.1
Br06	PIK3CA	p.H1047R	PIK3CA_SP_28.120542	29735	2131	428	20.08	0.15

Br06	ESR1	p.Y537S	ESR1_chr6_152419923	36531	2922	426	14.58	0.1
Br13	TP53	p.R273C	TP53_chr17_7577118	50570	2356	2	0.08	0.1
Br23	PIK3CA	p.E545K	PIK3CA_SP_27.58329	58891	3211	587	18.28	0.05
Br23	PIK3CA	p.E726K	PIK3CA_chr3_178938934	71396	3408	585	17.17	0.05
Br23	ESR1	---	ESR1_chr6_152332832	64527	3469	5	0.14	0.05
Br23	ESR1	p.E380Q	ESR1_chr6_152332832	64527	3469	5	0.14	0.05
Br23	ESR1	p.Y537S	ESR1_chr6_152419923	38294	3168	399	12.59	0.05
Br23	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	35186	2259	2	0.09	0.1
Br23	TP53	p.G266E	TP53_chr17_7577118	78438	2641	2	0.08	0.1
Br23	TP53	p.R249S	TP53_chr17_7577547	56676	2138	3	0.14	0.1
Br23	TP53	p.R213L	TP53_chr17_7578211	53021	3233	4	0.12	0.05
Br23	TP53	---	TP53_chr17_7578268	60221	3337	3	0.09	0.05
Br24	TP53	---	TP53_chr17_7578268	41368	1888	49	2.6	0.1
Br25	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	25918	1174	2	0.17	0.15
Br25	TP53	p.K132E	TP53_chr17_7578479	49441	1861	2	0.11	0.1
Br27	PIK3CA	p.E545K	PIK3CA_SP_27.58329	77924	4041	2733	67.63	0.05
Br28	TP53	p.R248W	TP53_chr17_7577547	39695	1145	13	1.14	0.15
Br30	ESR1	p.Y537S	ESR1_chr6_152419923	35463	2334	9	0.39	0.1
Br30	TP53	---	TP53_chr17_7577118	54012	1564	2	0.13	0.1
Br31	PIK3CA	p.H1047R	PIK3CA_SP_28.120542	50765	2463	26	1.06	0.15
Br31	TP53	p.I195T	TP53_chr17_7578268	59474	3143	64	2.04	0.1
Br39	PIK3CA	p.H1047R	PIK3CA_SP_28.120542	45243	2320	16	0.69	0.15
Br40	PIK3CA	p.Q546P	PIK3CA_SP_27.58329	51846	2585	503	19.46	0.1
Br40	ESR1	p.Y537S	ESR1_chr6_152419923	38192	2695	30	1.11	0.1
Br40	ESR1	p.D538G	ESR1_chr6_152419923	38259	2694	383	14.22	0.1
Br43	TP53	p.V157F	TP53_chr17_7578479	60212	2261	35	1.55	0.15
Br44	PIK3CA	p.E545K	PIK3CA_SP_27.58329	53729	2628	207	7.88	0.1
Br47	AKT1	p.E17K	AKT1_chr14_105246551	24901	1662	1075	64.68	0.2
Br50	PIK3CA	p.E545K	PIK3CA_SP_27.58329	62658	3608	7	0.19	0.05
Br50	TP53	p.R213Q	TP53_chr17_7578211	58530	3658	2	0.05	0.05
Br50	TP53	p.H179Y	TP53_chr17_7578403	52198	3701	2	0.05	0.05
Br51	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	35015	1364	2	0.15	0.15

Br51	TP53	---	TP53_chr17_7578211	52054	2129	62	2.91	0.1
Br53	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	31281	1094	2	0.18	0.15
Br54	PIK3CA	p.N345K	PIK3CA_chr3_178921553	61699	2134	2	0.09	0.1
Br55	PIK3CA	p.E545K	PIK3CA_SP_27.58329	56816	3634	380	10.46	0.05
Br55	TP53	p.E286K	TP53_chr17_7577118	62465	2600	2	0.08	0.1
Br56	TP53	p.G266E	TP53_chr17_7577118	70362	2510	2	0.08	0.1
Br56	TP53	p.R175H	TP53_chr17_7578403	62185	3755	2	0.05	0.05
Br57	KRAS	p.G12V	KRAS_SP_5.288759	37471	1867	2	0.11	0.1
Br57	TP53	p.R213Q	TP53_chr17_7578211	60175	3408	2	0.06	0.05
Br57	TP53	p.R175L	TP53_chr17_7578403	61989	3637	2	0.05	0.05
Br59	PIK3CA	p.E453K	PIK3CA_chr3_178928079	32564	1995	31	1.55	0.1
Br59	PIK3CA	p.E542K	PIK3CA_SP_27.58329	60946	2432	3	0.12	0.1
Br59	PIK3CA	p.E545K	PIK3CA_SP_27.58329	60609	2432	11	0.45	0.1
Br59	PIK3CA	---	PIK3CA_SP_28.120542	49003	2014	2	0.1	0.1
Br59	FBXW7	p.S582L	FBXW7_chr4_153245446	75983	1588	2	0.13	0.1
Br59	ERBB3	---	ERBB3_chr12_56482607	54330	2088	2	0.1	0.1
Br59	TP53	p.G266E	TP53_chr17_7577118	71178	1820	3	0.16	0.1
Br59	TP53	p.R158L	TP53_chr17_7578479	65148	1851	2	0.11	0.1
Br60	TP53	---	TP53_chr17_7578268	31309	1148	2	0.17	0.15
Br62	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	37168	2322	2	0.09	0.1
Br62	TP53	p.Y220C	TP53_chr17_7578211	55181	3269	2	0.06	0.05
Br62	TP53	p.R175H	TP53_chr17_7578403	58141	3467	3	0.09	0.05
Br63	ESR1	p.E380Q	ESR1_chr6_152332832	79454	4608	14	0.3	0.05
Br63	AKT1	p.E17K	AKT1_chr14_105246551	50488	3116	47	1.51	0.05
Br63	TP53	p.P190L	TP53_chr17_7578268	69445	3131	18	0.57	0.05
Br64	KRAS	p.G12V	KRAS_SP_5.288759	38551	2510	3	0.12	0.1
Br64	TP53	p.R248Q	TP53_chr17_7577547	58591	2481	2	0.08	0.1
Br64	TP53	p.V216M	TP53_chr17_7578211	54822	3645	4	0.11	0.05
Br64	TP53	---	TP53_chr17_7578479	76235	3218	2	0.06	0.05
Br66	PIK3CA	---	PIK3CA_SP_28.120542	50245	2724	2	0.07	0.1
Br68	TP53	---	TP53_chr17_7578211	55275	2834	2	0.07	0.1
Br69	ESR1	p.V392I	ESR1_chr6_152332832	66616	4013	4	0.1	0.05

Br69	TP53	---	TP53_chr17_7578268	73399	3210	2	0.06	0.05
Br70	PIK3CA	p.E545G	PIK3CA_SP_27.58329	57252	2834	2	0.07	0.1
Br70	PIK3CA	p.E726K	PIK3CA_chr3_178938934	78690	3332	7	0.21	0.05
Br70	ESR1	p.E380Q	ESR1_chr6_152332832	71293	3983	11	0.28	0.05
Br70	KRAS	p.G12D	KRAS_SP_5.288759	36614	2116	2	0.09	0.1
Br70	TP53	p.Y220C	TP53_chr17_7578211	59640	3149	3	0.1	0.05
Br70	TP53	---	TP53_chr17_7578268	68943	3435	2	0.06	0.05
Br74	TP53	---	TP53_chr17_7578211	62063	2543	2	0.08	0.1
Br75	FBXW7	---	FBXW7_chr4_153245446	57875	1572	2	0.13	0.1
Br75	TP53	---	TP53_chr17_7578211	59105	2213	2	0.09	0.1
Br75	TP53	---	TP53_chr17_7578479	54596	1730	2	0.12	0.1
Br76	TP53	p.R249M	TP53_chr17_7577547	56829	1893	2	0.11	0.1
Br77	PIK3CA	p.H1047R	PIK3CA_SP_28.120542	55992	2473	2	0.08	0.1
Br77	TP53	---	TP53_chr17_7578479	71466	2443	1229	50.31	0.1
Br78	PIK3CA	p.H1047R	PIK3CA_SP_28.120542	19834	2045	165	8.07	0.1
Br78	ESR1	p.Y537S	ESR1_chr6_152419923	21771	2609	187	7.17	0.1
Br78	KRAS	p.G12R	KRAS_SP_5.288759	13271	1305	3	0.23	0.15
Br78	TP53	---	TP53_chr17_7578211	21551	2157	4	0.19	0.1
Br78	TP53	p.H193R	TP53_chr17_7578268	19731	2166	2	0.09	0.1
Br79	TP53	---	TP53_chr17_7578268	68812	2792	3	0.11	0.1
Br80	ESR1	p.D538G	ESR1_chr6_152419923	31106	3277	24	0.73	0.05
Br83	TP53	p.C275Y	TP53_chr17_7577118	49122	3027	3	0.1	0.05
Br84	TP53	p.V216M	TP53_chr17_7578211	50736	5003	4	0.08	0.05
Br86	TP53	p.Y220H	TP53_chr17_7578211	34102	1543	5	0.32	0.1
Br86	TP53	p.H179R	TP53_chr17_7578403	42878	2458	3	0.12	0.1
Br87	TP53	---	TP53_chr17_7578211	34792	1992	2	0.1	0.1
Br88	TP53	---	TP53_chr17_7578211	29601	1835	3	0.16	0.1
Br88	TP53	p.R175H	TP53_chr17_7578403	27681	2232	44	1.97	0.1
Br92	KRAS	---	KRAS_SP_5.288759	22852	1356	3	0.22	0.15
Br93	PIK3CA	p.H1047R	PIK3CA_SP_28.120542	24865	1890	4	0.21	0.1
Br94	TP53	p.R273H	TP53_chr17_7577118	24077	1366	2	0.15	0.15