

乳癌の Multi-gene Assay

(文責:乳癌外科 佐藤史頭)

がんは、遺伝子変異によって自律的な制御不能の増殖と周囲組織への浸潤、遠隔臓器への転移によって患者を死に至らしめる疾患である。このように乳がんの発生や悪性度の原因は遺伝子変異の蓄積によるものであるため、その遺伝子変異そのものや遺伝子変異がもたらす遺伝子発現の変化を検査する事によって、がん細胞の性質を知ることができる。元来、乳がんの診断は視触診・画像検査・病理検査と言った形態学的手法を中心に、少数のバイオマーカーを組み合わせて行われてきた。これに対して遺伝子検査は、今までの形態学を中心とした乳がん診断とは違った次元の情報をもたらす、乳がんの理解を深めるとともに治療法選択への判断基準の提供といった形で臨床への貢献をはじめている。

乳がんのがん組織遺伝子発現検査では複数の遺伝子発現情報を組み合わせて1つの指標を提示する multi-gene assay (別名 IVDMA: in vitro diagnostic multivariate index assay) が開発されてきているが、2013, 14 年の日本乳癌学会総会でのコンセンサスカンファレンスセッションでのアンケートで、最も関心の高い研究領域に選ばれており、臨床からの期待の高さが伺われる。

1. MammaPrint

オランダ Agendia 社が開発した microarray 型の multi-gene assay で、2007 年に米国 FDA の承認を得ている。対象はリンパ節転移 3 個までの stage 1-2 の浸潤性乳癌の女性症例で、予後 (5 年無遠隔再発生存率) を low risk と high risk に分類している。更に、Knauer らが、high risk 症例では術後補助療法としてホルモン療法よりもホルモン療法 + 化学療法群が予後良好な成績である事を後ろ向き試験ではあるが報告し、術後治療法選択に対する指標になりうる可能性を示した。現在、大規模な前向き MINDACT 試験によって治療法選択における有用性の検証が行われている。

2. OncotypeDx

米国 Genomic Health 社によって提供されている、21 遺伝子 (16 がん関連遺伝子と 5 内部コントロール遺伝子) の定量的 RT-PCR による multi-gene assay である。米国 FDA の承認は受けていないものの、NCCN, ASCO, ESMO のガイドラインで採用されている。対象はエストロゲン受容体陽性 pT1-3 症例で、閉経前では pN0、閉経後では pN0-1mi であり、術後 10 年の遠隔再発のリスクを RS (recurrence score) として示している。MammaPrint と同様に、予後予測だけでなく術後補助療法のホルモン療法に加えて化学療法の上乗せ効果を予測する指標として使用されてはじめています。NSABP-20 試験標本の後ろ向き解析にて、RS 高値 (RS \geq 31) 症例では術後タモキシフェン単独群に比べ、術後タモキシフェンに MF 療法/CMF 療法を上乗せした群で予後の改善が認められた。現在、大規模前向き試験として、ホルモン受容体陽性 HER2 陰性乳がん症例で、リンパ節転移陰性群を対象とした TAILORx 試験、リンパ節転移陽性 (1-3 個) 症例を対象とした RxPONDER 試験が進行中である。また、OncotypeDx の日本人に対する有用性は、JBCRG-TR03 試験で示されている。

3. PAM50

2001 年に Sorlie らが乳がんの microarray による mRNA 発現プロファイルの unsupervised の解析で乳がんには複数のサブタイプがあり、それが乳がんの治療選択の為にホルモン受容体と HER2 発現による分類とかなり適合することを報告した。つまり、ホルモン受容体と HER2 発現による分類は人為的なものでなく、乳がん本来備わっているサブタイプであり、これ以降、「Luminal A/B-type」、「HER2-enriched type」、「Basal-like-type」といった用語が乳がんの臨床の場でも普及し定着した。この microarray データから各サブタイプに対する signature 遺伝子を 50 個抽出し RT-PCR でのアッセイにしたものは PAM50 と呼ばれた。Nanostring Technologies 社は、nCounter Analysis システムというプローブにハイブリッドした mRNA 分子数を直接計測するという、遺伝子増幅等の酵素反応を介さない遺伝子発現測定法の技術を有していたが、この手法で PAM50 遺伝子を計測し、乳がんの intrinsic subtype と signature 遺伝子発現データから計算された ROR (risk of recurrence) スコアを算出し提供しており、2013 年に FDA に承認された。

ATAC 試験の標本を用いて、OncotypeDX の RS と PAM50 の ROR の直接比較がされたが、同等の予測精度があることが示された。また、ABC SG-8 試験の標本を使用した TR でも、ROR 値は5年間のホルモン療法後の晩期再発の予測にも有用であった。

4. Curebest 95GC Breast

大阪大学で開発され、Sysmex 社より研究用に商業化された国産の multi-gene assay である。公共データベース上にある Affymetrix 社の microarray データより ER 陽性リンパ節転移陰性の乳がん組織の遺伝子発現データを取得し、再発に関連する 95 遺伝子を同定し、症例を high/low risk 群に分類する再発予測モデルを開発された。その後、独立した日本人コホートで検証しその有用性を示している。また、OncotypeDX との予測精度の比較検討がされており、OncotypeDX で治療方針決定に苦慮する intermediate risk のグループでの再発を予測できることが示されている。

この様に、乳がん領域で実用化されている多くの multi-gene assay が ER 陽性乳がんの予後の予測のアルゴリズムとして開発され、術後補助療法選択の指標としての応用がなされはじめています。複数のプラットフォームで ER 陽性乳がんの予後の予測に成功していることから、Sorlie らが ER 陽性乳がんに予後の差のある mRNA プロファイルの異なるサブセット、Luminal A 型、Luminal B 型が存在することが、確かめられたことになる。

5. トリプルネガティブ乳がんのサブタイプ

ルミナル型乳がん以外のサブタイプに関する multi-gene assay で商業化されたものは、MammaPrint が ER 発現を規定していない事を除けば、ほぼ無いと言っていい。研究レベルではあるが Vanderbilt 大の Lehmann らは、トリプルネガティブ乳がんには 6 つのサブタイプ、BL(basal-like)1、BL2、IM(immunomodulatory)、M(mesenchymal-like)、MS(mesenchymal-stem-like)、LAR(luminal AR)がある事を示している。更に MD アンダーソンがんセンターの増田らは、これらのサブタイプの術前化学療法の奏効率を比較したが、BL1 は pCR 率が高いのに対して BL2 と LAR は pCR 率が低く、トリプルネガティブ型乳がんの治療法選択に対して、この分類が指標になりうると報告した。

乳がん領域は、他のがん種に比較して multi-gene assay の開発が盛んである。その理由として、乳がん領域では mRNA 発現プロファイルによるサブタイピングの概念が早い段階で臨床に取り入れられたこと、そして、はじめて FDA が承認した multi-gene assay が MammaPrint であった事などがあげられる。が、乳がんはルミナル A/B 型、HER2 型、Basal-like 型等を含む heterogenous な疾患であり、1種類の multi-gene assay ではすべてのタイプの乳がんをカバーすることができない。実際に実用化されているのは ER 陽性乳がんの予後、治療効果予測に対する領域で、特に HER2 陽性乳がんに関する multi-gene assay の開発は遅れている。

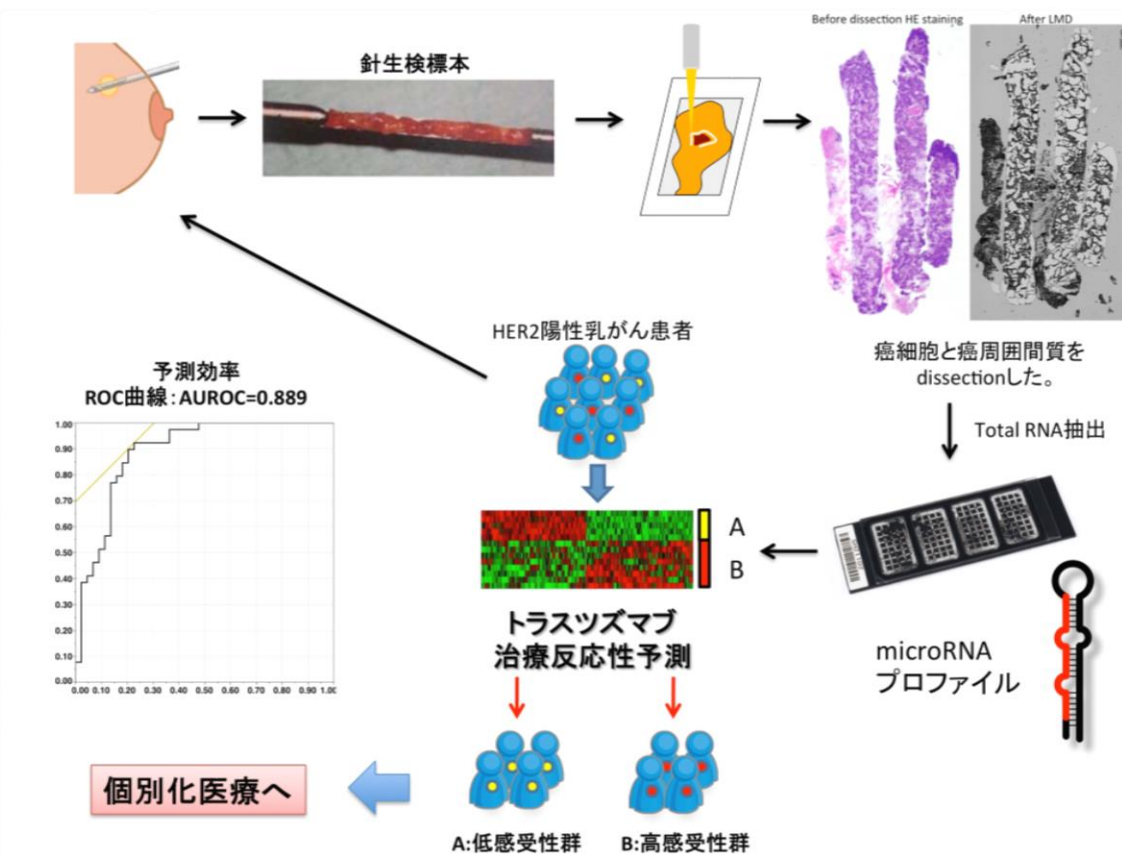
6. 分子標的薬のコンパニオン診断薬としての multi-gene assay

乳がんは別の観点からみると、分子標的薬の開発が盛んながん種と言える。現在までに抗 HER2 薬4種類(トラスツズマブ、ラパチニブ、ペルツズマブ、T-DM1)、抗 VEGF 抗体(ベバシズマブ)、mTOR 阻害薬(エベロミムス)が本邦でも臨床実用化されている。が、分子標的薬の治療効果がある症例を示唆するコンパニオン診断薬というのは、HER2 陽性乳がんであることを検査する HER2 免疫染色キットと HER2 ゲノム増幅検出の In situ hybridization キット(FISH, DISH)のみである。他のがん種の分子標的薬をみても実用化されているコンパニオン診断薬としてのマーカーは、ゲノムバイオマーカーである事が多く、multi-gene assay が分子標的薬のコンパニオン診断として実用化されたものは今の所ない。

PAM50 の proliferation による ROR スコアに HER2 症例の化学療法併用トラスツズマブ治療の効果予測に有用であるという小規模コホートの報告はあるが、まだ実用化はされていない。我々の研究室でも microRNA 発現プロファイルを利用したトラスツズマブ治療反応性予測の体外診断薬を、東レ(株)と共同開発を行っており、近い将来の実用化を目指している。

<HER2 陽性乳がんに対する化学療法併用トラスツズマブ療法の効果予測の Multi-gene Assay の開発>

当科では以前より(株)東レ先端融合研との産学連携共同研究で、microRNA 発現プロファイルに基づくHER2 陽性乳がんのトラスツズマブ治療効果予測法の開発を行ってきた。標本は将来の普及のし易さを考えて数点の工夫を加えて開発した。1)FFPE 標本から microRNA プロファイルを可能にした。2)生検標本内のがん細胞の割合は一定でないのでマイクロダイセクション法にてがん細胞の濃縮を行う。3)医師以外の人材がマイクロダイセクションを正確に迅速に行える様に、汎サイトケラチン抗体(AE1/AE3)による免疫染色で上皮細胞の染色を行う。現在の予測モデルは、JBCRG-10 試験の標本と大阪医療センターの症例を合わせて83症例のデータから Support Vector Machine を用いて構築した。構築した予測モデルの精度を Leave-One-Out Cross Validation 法にて算出し図内に示した。現在、学習検体の増加と検証症例のデータの集積を行っている。今年度内に、(株)東レから受託解析が開始できるように準備中である。



今後このような multi-gene assay が分子標的薬効果予測の領域でコンパニオン診断薬的に活用される事が望まれる。

7. おわりに

現在の乳がん診断の2つの柱である病理診断学と画像診断学は、それぞれ1世紀以上の歴史があり多くの知識が蓄積され体系化されている。網羅的な遺伝子診断学がヒトゲノムプロジェクトの前後から始まったとして、まだ10~20年程度の歴史しかない。技術革新も相まって膨大な量のゲノム・遺伝子発現に関する情報が短期間に蓄積されてきているものの、経過の長い乳がんの臨床情報との関連が明らかになるにはまだまだ時間がかかる。解決しなければならない課題も多いが、遺伝子・ゲノム診断学が乳がん診断の第3の柱として成長する日が待望される。