

乳癌ゲノムの進化に関する最近の知見

京都大学医学部附属病院 乳腺外科 佐藤史顕

1. はじめに

遺伝子変異は、発がんから腫瘍増大、浸潤転移というがん進展の全ての段階で蓄積される。この遺伝子変異は腫瘍内で不均一であり、その多様性のため、転移による場所の変化や、免疫細胞や治療薬による攻撃といった周囲の環境(の変化)に適応して生存し、より増殖に適した細胞クローンが腫瘍内の多数派となって行くと考えられている。この事は、生物の多様性におけるダーウインの進化論と相通じるところがあるため、癌ゲノム進化(Genomic tumor evolution)とも呼ばれる。

近年の高速シーケンサーの発明と解析法の発展にともなって、がんゲノムの進化の状況をつかむことが出来るようになってきた。乳がんにおける癌ゲノムに関する最新の知見をまとめる。

2. 原発巣内での進化

腫瘍内のゲノム不均一性をより細かく同定できれば出来るほどより正確にゲノム進化の過程を推測できる。不均一性を調べるためには、多くの細胞が混じった DNA 標本を深度を高めてシーケンスするか、物理的に腫瘍を分けて別々に DNA を抽出しシーケンスするという大きく2方向の取り組みがある。前者では Nik-Zainal らは 21 症例の乳癌に対して¹、Shah らは 104 症例のトリプルネガティブ乳癌(TNBC)に対して² 高いシーケンス深度で解析を行い、腫瘍が内包するクローンを推測している。その解析には限界がありクローン間の不均一性を示す程度の解像度にとどまっている。

一方後者では、腎癌ではあるが複数に分割した原発巣や転移巣を別途シーケンスをして遺伝子変異の蓄積の順序を予測している³。さらに究極的な分割として単細胞からのゲノム解析も行われている。Navin らの単細胞ゲノム解析の重要な結果は、遺伝子変異の蓄積の様式にある^{4,5}。単塩基変異に関しては、clonal mutation(driver mutation、クローン内に共通)、subclonal mutation(クローン内に複数回検出)、de novo mutation(1回のみ検出)という出現頻度の違う mutation が認められた。この様に、出現頻度が違う変異が混在している事は、これらの変異が長い時間をかけて蓄積されてきている事を物語っている。

元来、発癌から癌の進展過程においてゲノム変異の蓄積は徐々に起こるものと考えられてきた。実際に、単塩基変異は高頻度の clonal mutation から、低頻度の subclonal, de novo mutation まで検出され、確かに多くの細胞分裂の期間を経て緩徐に蓄積されてきているように見える。一方、ゲノム構造異常に関しては、個々のクローン内に複雑なパターンが存在するが、その蓄積は徐々にというよりは断続的であるように見える。これは構造異常を起こすような変化が細胞にあまり発生しないのか、頻繁に起こるが多くの場合その変化を細胞が許容できず死んでいき、稀に生き残る細胞のみが新たな複雑なゲノム構造異常を引き継ぐから結果として断続的に起こっているように見えるのか、どちらかは断定できないがおそらく後者であろう。

また、遺伝子変異の蓄積のスピードに関して、TNBC の一症例で遺伝子変異の頻度は正常上皮の 13 倍と上昇していた⁵。元来ヒトの正常細胞のゲノムには、1 細胞あたり 1 日に、2 万回以上の DNA 損傷と、1 万カ所以上の複製エラーがあると見積もられている⁶。正常細胞

ではDNA修復機構が働いて正常に戻るか、異常が多すぎればアポトーシスとなり恒常性が維持されている。これに対してがん細胞では、DNA複製異常による複製エラーの増加、DNA修復能異常によるDNA変異の蓄積、抗アポトーシス能の上昇、遺伝子編集酵素の発現亢進等によって、1細胞分裂におけるゲノム異常の蓄積のスピードが高くなると考えられている。これを高変異形質(mutator phenotype)という。例えば、APOBPC3Bの発現亢進が、乳癌ゲノムに多いC→T塩基置換を増大させ⁷、BRCA1/2等のDNA double strand break修復分子の機能異常が、50塩基までのdeletion領域数を増やすことがわかっている⁸。

3. 非浸潤癌での遺伝子変異

乳癌の発癌過程のいつごろからそのゲノム異常は起こっていたのであろうか？ L Hernandezらによると、一部の例外はあるものの、殆どの腫瘍で非浸潤癌成分と浸潤癌成分のゲノムコピー数変異のパターンは良く似ており、このことは浸潤癌で観察されるゲノム構造異常はDCISの時点かそれ以前に起こっている事と示唆された。また変異率の高いdriver mutationに関しても同じ傾向である。PIK3CAの変異は、純粋なDCIS症例、浸潤癌症例、DCIS併存の浸潤性乳癌のDCIS成分と浸潤性成分で、PIK3CA変異(hot spot)の検出頻度は殆ど同じ(約30%)である⁹。p53の変異も、DCIS併存の浸潤性乳癌症例のほぼ半数でDCIS成分と浸潤性成分の両方で検出された¹⁰。この様に浸潤癌でclonal mutationになる遺伝子変異は、DCISかそれ以前から起こっていると考えられる。

4. 原発巣から転移巣にかけて

新しい分子標的薬は再発時に投与を開始することが多く、それ故、治療効果はその転移巣の耐性獲得の有無にかかっている。乳癌原発巣と転移巣で臨床的サブタイプが異なっている症例は臨床ではしばしば遭遇し腫瘍間heterogeneityとしてとらえられている。ゲノム変異の観点から見ても、転移巣でのゲノム変異のパターンは原発巣のパターンに新たな変異が加わったものになっている¹¹。この事は転移巣は原発巣より後でできたことを意味している。

5. 全身療法とがんゲノムの進化

抗癌治療に対して、治療耐性関連のゲノム変異を持つクローンが組織内に増大し組織として治療耐性となる。薬剤耐性は初期耐性と獲得耐性に分類される。前者が治療前から耐性の形質・耐性関連ゲノム変異をもっている場合で、後者はそれらを治療中に獲得するものである。臨床的に獲得耐性と思われる症例で、治療後に増加している新たなゲノム変異は、一般的に治療中に新たに発生したゲノム変異であると考えられてきた。が、治療前の腫瘍ゲノムを深くシーケンスをすると、その耐性関連ゲノム変異はごく僅かに存在し、治療という圧力下で耐性癌細胞が増大してきた場合が多いようである(26)。

治療耐性に関わる遺伝子変異としてエストロゲン受容体遺伝子(ESR1)がある。乳癌原発巣を網羅的に解析したTCGA(The Cancer Genome Atlas)の解析ではESR1遺伝子変異は1%もなかった。が、乳癌のアロマターゼ阻害薬(AI剤)によるホルモン療法後の再発巣には20%以上の症例で認められた。その多くがLigand binding domain(LBD)に起こっておりhotspotを形成している。Y537S, Y537C, Y537N, D538GといったLBD変異は、エストロゲン枯渇状態でも下流の遺伝子発現を活性化することができ、それがAI剤耐性に関与していると考えられている。

6. 血液標本によるがん細胞進化の検出

転移性乳癌の治療を考える時転移巣の情報を得ることは重要な事である。転移巣の生検は困難なことが多く、仮に可能であっても経時的に複数回生検することはさらに難しい。それ故、より低侵襲で得られる血液標本内の血中循環腫瘍細胞(circulating tumor cell, CTC)と血中循環腫瘍 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)から体内の腫瘍の情報を得ようとする試みが行われている。

転移性乳癌症例の CTC を回収し CNV を検討した論文でも¹²、CTC の CNV のパターンは原発巣の CNV パターンを踏襲しつつも新たな構造異常が付け加わっており、転移巣のパターンを反映しているものと思われる。CTC を高純度で回収できれば、DNA 量が少ないながらも精度の高いゲノム解析も可能になる。

一方、血液内には、細胞から遊離した DNA(cfDNA)が浮遊し循環しており、がん患者では ctDNA がその中に含まれている。1977 年に既に血清中浮遊 DNA 濃度が正常個体で平均 13ng/mL で、担癌症例では 180ng/mL と有意に上昇している事が報告されている¹³。その上昇分の全てが ctDNA というわけではないようである。Vogelstein らのグループは大腸がん症例の cfDNA 内の ctDNA の割合を発癌過程の早期に遺伝子変異をおこす APC の変異率で検討している¹⁴。cfDNA 中の ctDNA の割合は T1-2N0M0 症例では平均 0.04%、T3N0M0 で 1.28%、M1 症例で 8.05%であり、cfDNA 濃度の上昇には、非癌細胞からの DNA 流出も増えていることがわかる。従って ctDNA の率が高い場合は cfDNA の CNV パターンが転移巣の CNV パターンを反映するが¹⁵、低い症例では検出が困難となる。

それに対して、Driver mutation は腫瘍内での存在比率が高く癌細胞固有のもので、ctDNA の比率が低い場合でも検出が可能で、偽陽性の低いバイオマーカーになり得る。Dawson らは、乳癌の臨床で使用されているモニタリングマーカーとしての CA15-3 や CTC カウントに比べて、ctDNA はより高い検出感度がある事を示した¹⁶。現在、臨床応用に向けた技術開発が進んでおり、アレイ CGH や NGS による網羅的解析から^{15,17}、既知の hot spot mutation を検出する PCR 系アッセイ等が開発されている¹⁸。

7. おわりに

次世代高速シーケンサーが登場してから約 10 年が経とうとしている。乳がんの遺伝子情報は急速に蓄積されつつあるが、病理診断や画像診断ほどに体系化されるまでは、まだまだ時間がかかる。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。

Reference

- 1 Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, *et al.* The life history of 21 breast cancers. *Cell* 2012; **149**: 994-1007.
- 2 Shah SP, Roth A, Goya R, *et al.* The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012; **486**: 395-9.
- 3 Gerlinger M, Rowan A, Horswell S, *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; **366**: 883-92.
- 4 Navin N, Kendall J, Troge J, *et al.* Tumour evolution inferred by single-cell sequencing.

- Nature* 2011; **472**: 90–4.
- 5 Wang Y, Waters J, Leung ML, *et al.* Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature* 2014; **512**: 155–60.
- 6 Loeb L a. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 450–7.
- 7 Harris RS. Molecular mechanism and clinical impact of APOBEC3B-catalyzed mutagenesis in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2015; **17**: 1–10.
- 8 Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; **500**: 415–21.
- 9 Miron A, Varadi M, Carrasco D, *et al.* PIK3CA mutations in in situ and invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 2010; **70**: 5674–8.
- 10 Zhou W, Muggerud A a, Vu P, *et al.* Full sequencing of TP53 identifies identical mutations within in situ and invasive components in breast cancer suggesting clonal evolution. *Mol Oncol* 2009; **3**: 214–9.
- 11 Ding L, Ellis MJ, Li S, *et al.* Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* 2010; **464**: 999–1005.
- 12 Magbanua MJM, Sosa E V., Roy R, *et al.* Genomic profiling of isolated circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Cancer Res* 2013; **73**: 30–40.
- 13 Leon S, Shapiro B, Sklaroff D, Yaros M. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; **37**: 646–50.
- 14 Diehl F, Li M, Dressman D, *et al.* Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 16368–73.
- 15 Murtaza M, Dawson S–J, Tsui DWY, *et al.* Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013; **497**: 108–12.
- 16 Dawson S–J, Tsui DWY, Murtaza M, *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; **368**: 1199–209.
- 17 Leary RJ, Sausen M, Kinde I, *et al.* Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* 2012; **4**: 162ra154.
- 18 Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, *et al.* Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 3462–9.