

博士論文（要約）

乳がん、甲状腺がんの原発巣、および循環血中腫瘍由来
DNA における遺伝子変異の検出とその意義に関する研究

佐藤 綾花

背景：末梢循環血中腫瘍由来 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA) は、腫瘍のアポトーシスやネクロシス等によって末梢血中に遊離した腫瘍細胞由来の DNA である。半減期が 1-2 時間と短いことから、腫瘍量や腫瘍の分子遺伝学的な情報をリアルタイムに反映する新規バイオマーカーとして注目されている。近年の技術的革新により、ctDNA に関する研究がにわかに脚光を浴びることとなった。droplet digital PCR (ddPCR) は近年開発された新しい技術であり、サンプルを多数の droplet に分割することで各 droplet あたりのターゲットの存在比率を高め、存在比率の低い希少なターゲットの定量解析を可能とする。このため、多くの野生型バックグラウンドアレルの中から希少な変異アレルを検出することができ、ctDNA の検出や定量に適している。

乳がんは比較的予後の良いがんとして知られているが、一部は転移再発を来し予後不良となる。転移性腫瘍の根治は難しいため、早期の段階で予後不良群を的確に選び出し、適切な治療を提供することは非常に重要である。早期乳がんにおいてはサブタイプに基づいた画一的な治療が行われているが、症例によっては過剰治療、あるいは過少治療である場合も考えられるため、より個別化した治療を提供するための指標が必要である。また、早期乳がんにおいて臨床上有効な腫瘍マーカーがみつかっていない。

この前向き研究では、早期乳がんの原発巣において、ddPCR を用いて遺伝子変異の解析を行った。さらに、術前および術後に採取した血液検体より ctDNA を抽出し、原発巣と同じ遺伝子変異の有無について ddPCR を用いて解析するとともに ctDNA 量を計測した。腫瘍の臨床病理学的特徴と ctDNA との相関関係について検討し、ctDNA が予後予測の指標となる可能性について検討した。

対象患者と方法：東京大学医学部附属病院 乳腺内分泌外科にて 2016 年 1 月から 2017 年 9 月の間に新規に早期原発性乳がんを診断され、手術を施行した 27 例を対象として前向きに検討を行った。原発巣の FFPE 検体より DNA を抽出し、ddPCR を用いて *PIK3CA* 遺伝子変異の 3 つの hot spot (E542K、E545K、H1047R) について解析を行った。また、*PIK3CA* 遺伝子変異をターゲットとして、ddPCR を用いて ctDNA の定量を行い、腫瘍の臨床病理学的特徴との相関関係について統計学的解析を行った。

結果：早期乳がんの 27 例中 13 例 (48%) の原発巣で *PIK3CA* 遺伝子変異を認めた (E542K 8%、E545K 30%、H1047R 54%、E542K と H1047R の二か所に遺伝子変異を認めた例 8%)。サブタイプ別に分けると、luminal type の 25 例中 12 例 (48%)、HER2-enriched の 2 例中 1 例 (50%) で *PIK3CA* 遺伝子変異を認めた。腫瘍の臨床病理学的特徴と原発巣における *PIK3CA* 遺伝子変異の間に有意な相関関係は認められなかった。

原発巣で *PIK3CA* 遺伝子変異を認めた 13 例全例の術前血液検体から ctDNA を抽出し、ddPCR を用いて、術前 ctDNA の *PIK3CA* 遺伝子変異を検出した。13 例中 4 例 (31%) の術前 ctDNA で各原発巣と同じ *PIK3CA* 遺伝子変異を認めた。原発巣の fractional abundance と術前 ctDNA の間に、相関関係は認められなかった。腫瘍の臨床病理学的特徴と術前 ctDNA での *PIK3CA* 遺伝子変異の間にも相関関係を認めなかった。原発巣で *PIK3CA* 遺伝

子変異が検出された 13 例中 12 例で術後採血が行われた。術後 ctDNA 12 例中 2 例(17%)で原発巣と同じ *PIK3CA* 遺伝子変異を認めた。術前 ctDNA で *PIK3CA* 遺伝子変異を認めた 4 例のうち、2 例では術後 ctDNA でも *PIK3CA* 遺伝子変異が検出されたが、2 例では術後 ctDNA では *PIK3CA* 遺伝子変異を認めなかった。術前 ctDNA の fractional abundance は、術後 ctDNA を認めた 2 例で術後 ctDNA を認めなかった 2 例よりも高い傾向にあった。

考察: 早期乳がんの 48% で *PIK3CA* 遺伝子変異を検出することができ、ddPCR の高い検出感度が示された。

早期乳がんの原発巣に *PIK3CA* 遺伝子変異を認めた症例の約 30% で術前 ctDNA が検出された。術前 ctDNA の検出の有無と、リンパ節転移の有無や Ki-67 高値など既知の腫瘍の悪性度を予測させる項目とは相関がなかった。術前 ctDNA を認めた 4 例中、術後にも ctDNA を認めた 2 例では術前 ctDNA の fractional abundance が高い傾向にあり、このことは術前の腫瘍量が多いことを反映していると予測され、予後と相関する可能性があると考えた。

結論: 早期乳がんにおいて、原発巣に遺伝子変異を認める患者の約 3 割で術前 ctDNA が検出されることが明らかとなった。術前 ctDNA における *PIK3CA* 遺伝子変異の fractional abundance が高値であることは、独立した予後予測因子の一つとなり得る可能性が示唆された。術前、術後の血液検体における ctDNA の検出が、術後の治療を考える上での一つの指標となる可能性があり、さらなる症例の蓄積および予後の評価が期待される。