HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた遺伝子解析と臨床的特徴に関する研究
Author(s)	萩尾, 加奈子
Description	配架番号：2618
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14497号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14497
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/84304
Type	doctoral thesis
File Information	Kanako_Hagio.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた遺伝子解析と
臨床的特徴に関する研究

(Studies on genetic alterations and clinical characteristics
in breast cancer by clinical targeted sequencing)

2021 年 3 月

北　海　道　大　学

萩尾　加奈子

学　位　論　文

乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた遺伝子解析と
臨床的特徴に関する研究

(Studies on genetic alterations and clinical characteristics
in breast cancer by clinical targeted sequencing)

2021 年 3 月

北　海　道　大　学

萩尾　加奈子

目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁
要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6 頁

1. 転移再発乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討
方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28 頁

2. 若年乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討
方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32 頁
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46 頁

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・49 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・50 頁
利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・51 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・52 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文へ投稿中である。

1. Kanako Hagio, Toraji Amano, Hideyuki Hayashi, Takashi Takeshita, Tomohiro Oshino, Junko Kikuchi, Yoshihito Ohhara, Ichiro Yabe, Ichiro Kinoshita, Hiroshi Nishihara, Hiroko Yamashita

   Impact of clinical targeted sequencing on endocrine responsiveness in estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer

   Scientific Reports

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 萩尾　加奈子、髙﨑　恵美、押野　智博、鈴木　はる菜、山下　啓子
   当院における乳癌症例の遺伝子パネルを用いた網羅的遺伝子解析の検討
   第 27 回日本乳癌学会学術総会　2019 年 7 月 11-13 日　（東京）

2. 萩尾　加奈子、髙﨑　恵美、押野　智博、鈴木　はる菜、山下　啓子
   転移再発乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた網羅的遺伝子解析の検討
   第 57 回日本癌治療学会学術総会　2019 年 10 月 24-26 日　（福岡）

3. 萩尾　加奈子、竹下　卓志、押野　智博、守谷　結美、李　東、
   山下　啓子
   ER 陽性 HER2 陰性転移再発乳癌の治療におけるがん遺伝子検査の活用性
   第 28 回日本乳癌学会学術総会　2020 年 10 月 9-18 日　（Web 開催）

要旨

【背景と目的】

乳癌は通常、乳管内増殖性病変から非浸潤癌、浸潤癌と進展していくが、発生から顕在化するまで 20 年以上かかると考えられている。一方で若年乳癌（初発時 35 歳未満）は、発生から顕在化するまでの期間が短く、遺伝的要因の関与が強く推測される。

乳癌は estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PgR)、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) の 3 受容体および Ki67 の発現状況に基づいてサブタイプ分類され、サブタイプに応じて治療が選択される。乳癌全体のおよそ 80%を占める ER 陽性乳癌の治療は内分泌療法に対する感受性が重要であるが、感受性が低く進行の早い症例は治療選択に難渋することが多く、臨床上大きな問題である。最近は、このような標準治療が奏効しない症例に対し、がん遺伝子パネル検査が施行されるようになったが、治療に結びつく結果が得られることは少ない。また、がん遺伝子パネル検査結果と治療または予後について検討した報告は少ない。

がん遺伝子パネル検査結果の臨床的有用性を明らかにするため、本研究では、「1. 転移再発乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討」として、次世代シークエンサー (NGS) によるがん遺伝子の網羅的解析と臨床的特徴をレトロスペクティブに検討した。また、どのような遺伝子異常（クローン変化）が乳癌進展に関わるのかを明らかにするため、特に遺伝的要因の関与が強く推測される若年乳癌について、「2. 若年乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討」として、個々の症例のサブクローン構築を検討し、進展に伴うドライバー遺伝子などについて解析した。

＜1. 転移再発乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討＞

【対象と方法】

2016 年 4 月 から 2018 年 3 月に北海道大学病院でがん遺伝子パネル検査を受けた転移再発乳癌 29 症例の遺伝子結果を再解析し、遺伝子解析結果と臨床的特徴をレトロスペクティブに検討した。その中でも特に多いサブタイプである ER 陽性 HER2 陰性乳癌については、内分泌療法感受性に注目し、治療抵抗性と遺伝子異常との関係について検討した。

【結果】

全 29 症例における体細胞遺伝子異常としては *TP53*、*PIK3CA*、*AKT1*、*ESR1*、*MYC* の順に多く認め、過去の報告と概ね変わりなかった。生殖細胞系列変異

のうち病的変異であった遺伝子は *BRCA1* と *BRCA2*、*PTEN* 遺伝子であった。ER 陽性 HER2 陰性乳癌 24 症例での検討では、内分泌療法感受性を低い順から very low、low、medium、high の四段階に分けた。内分泌療法感受性が低い程有意に予後不良であった（$P = 0.0275$）。体細胞遺伝子異常として、*TP53*、*PIK3CA*、*AKT1*、*ESR1* 遺伝子異常を多く認めた。特に、*TP53* 遺伝子異常は内分泌療法感受性 very low や low で多く認められ、また *TP53* 遺伝子異常がある方が有意に予後不良であった（$P = 0.0284$）。原発巣に *TP53* 遺伝子異常を認めた 4 症例全て 5 年以内に再発していた。転移巣の遺伝子異常に関わらず、転移巣に対して手術あるいは照射といった局所療法が行われた症例は長期生存していた。

【考察】

ER 陽性乳癌は、エストロゲンが ER と結合することにより誘導されるエストロゲンシグナルだけではなく、PI3K/AKT/mTOR 経路、MAPK/JNK 経路のような細胞内のリン酸化経路から ER のリン酸化を引き起こし、エストロゲン非依存性に ER の転写活性を上げる経路がある。この経路に関与する遺伝子として *ESR1*、*PIK3CA*、*PTEN*、*AKT1* などがあり、これらの遺伝子異常による増殖因子シグナルの活性化は内分泌療法抵抗性の原因の一つとなる。*TP53* 遺伝子異常は内分泌療法感受性が低いほど多く認められ、それが治療抵抗性や生存率低下に関係していると推測された。また、原発巣で *TP53* 遺伝子異常を同定することにより治療抵抗性や予後を予測することができる可能性がある。転移巣の遺伝子異常に関わらず、転移巣に対する局所療法は腫瘍量を減らすという点からも有効になる場合もあると考える。

＜2. 若年乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討＞

【対象と方法】

2012 年 5 月から 2016 年 8 月の間に初発時 35 歳未満で乳癌と診断された 13 症例について、血液および原発巣（非浸潤部、浸潤部）、転移リンパ節の複数箇所から DNA を抽出し、NGS を用いて網羅的がん遺伝子解析を行った。腫瘍部分では腫瘍細胞含有割合を、正常乳腺（非腫瘍）では乳管上皮細胞の含有割合を評価した。DNA 抽出部位において、ER、PgR、HER2、Ki67 の発現を免疫組織化学法により評価し、遺伝子解析結果と免疫染色結果、さらに診療情報を用いた臨床的特徴をレトロスペクティブに検討した。

【結果】

全ての症例で非浸潤部と浸潤部、転移リンパ節のサブタイプ（ER、PgR、HER2 の陽陰性）は一致していた。正常乳腺、非浸潤部、浸潤部、転移リンパ

節で遺伝子異常が共通する症例と全く異なる症例が存在し、化学療法の前後の乳癌細胞では遺伝子異常の消失や獲得が確認できた。生殖細胞系列変異は*PTEN*、*BRCA2*などがあり、これらは検査した部位全てに共通して認められた。また、若年乳癌と非若年乳癌(「1. 転移再発乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討」の 35 歳以上の症例)を比較検討したところ、生殖細胞系列変異は両者で大きな違いは認められず、体細胞遺伝子異常は若年乳癌の方が遺伝子異常の数が少なく、一般的な乳癌関連遺伝子とは異なる遺伝子異常を多く認めた。

【考察】

乳癌は進展に伴い個々の細胞毎に遺伝子異常が積み重なりサブクローンが形成されるが、サブクローン構築は症例毎に異なる。本研究では、非浸潤部、浸潤部、転移リンパ節の各部位における腫瘍含有割合と変異率から、遺伝子異常がどのように乳癌の進展に関わったかを推測した。異常のあった遺伝子の種類や遺伝子異常の変化は、全ての症例で異なっており、進展の過程において各部位でクローンが共通する症例と全く異なる症例が存在した。しかしながら、若年乳癌では、今回検討した 160 遺伝子以外の別の遺伝子異常が癌の発生や進展に関わっている可能性もあり、乳癌進展に伴う遺伝子異常とクローンの変化をより詳細に検討するには、検査する遺伝子や検査部位を増やすなどの検証が必要と考える。

【結論】

ER 陽性 HER2 陰性乳癌において、*TP53*遺伝子異常は治療選択のバイオマーカーや予後予測因子になり得ると考えられた。

乳癌の進展に伴う遺伝子異常は、個々の症例で全く異なっていた。診療目的に合わせて、検査する遺伝子や検査部位、検査時期を選択することにより、遺伝子検査をより有効に活用できる可能性がある。また、若年乳癌は非若年乳癌とは異なる遺伝子が関与している可能性があり、若年乳癌を対象としたがん遺伝子パネルの必要性が示唆された。

略語表

AKT	protein kinase B
ANA	anastrozole
CAF	cyclophosphamide + adriamycin + fluorouracil
CBDCA	carboplatin
CDK4/6	cyclin-dependent kinase 4/6
CT	chemotherapy
DFS	disease-free survival
DNA	deoxyribonucleic acid
DTX	docetaxel
EC	epirubicin + cyclophosphamide
ER	estrogen receptor
ET	endocrine therapy
EXE	exemestane
FEC	fluorouracil + epirubicin + cyclophosphamide
FFPE	formalin fixed paraffin-embedded
HER	human epidermal growth factor receptor
IHC	immunohistochemistry
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LET	letrozole
LHRH	luteinizing hormone-releasing hormone
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
OS	overall survival
PgR	progesterone receptor
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PTX	paclitaxel
SNP	single nucleotide polymorphism
TAM	tamoxifen
UFT	tegafur uracil

緒言

1. 乳癌の進展と遺伝子異常

乳癌は通常、乳管内増殖性病変から非浸潤癌、浸潤癌と進展していくが、発生から顕在化するまで 20 年以上かかると考えられている（Umar et al., 2012)。乳癌の進展に伴い遺伝子異常が積み重なりサブクローンが形成されるが、サブクローン構築は個々の症例により異なっている（Yates et al., 2015)。また、1 つの腫瘍内で癌細胞ごとに異なる遺伝子変異が生じてサブクローンが形成され、薬物療法の反応性もサブクローンごとに異なり、抵抗性を獲得したクローンが増殖すると言われている（Kleppe et al., 2014)。

一方で若年乳癌（初発時 35 歳未満）は、発生から顕在化するまでの期間が短く、遺伝的要因の関与が強く推測される。非若年乳癌に比べ若年乳癌は生殖細胞系列変異を伴う場合が多く、遺伝性乳癌卵巣癌症候群の原因遺伝子である *BRCA1* や *BRCA2* 以外にも、日本人における遺伝性乳癌の原因となる遺伝子が複数見出されている（Momozawa et al., 2018)。

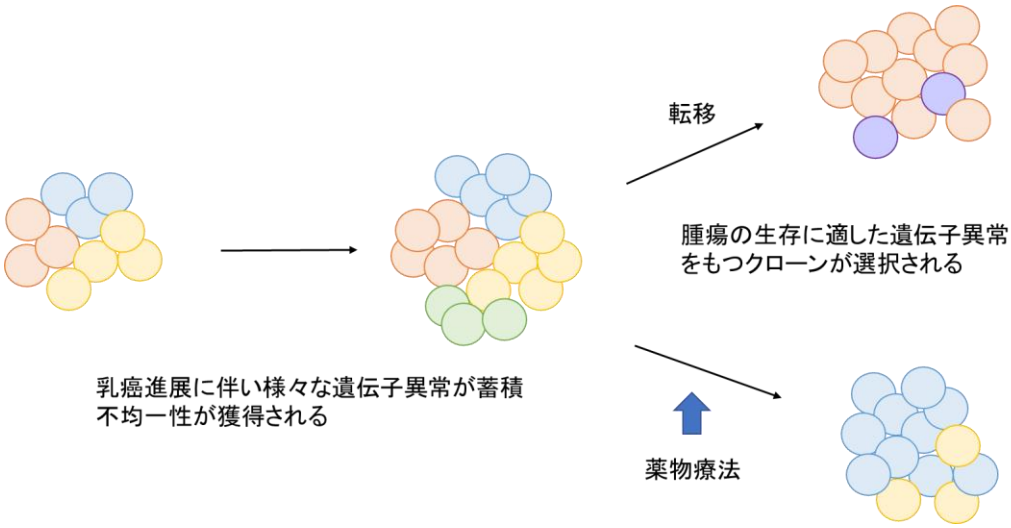


図 1　乳癌の進展と遺伝子異常、クローン変化
（Kleppe et al., 2014）より引用・改編

2. 乳癌の分類と薬物療法

乳癌の治療はサブタイプに応じて選択される。2000 年代初頭、網羅的遺伝子発現解析による発現プロファイルから乳癌を 4 つのサブタイプに分類することが提唱された（Perou et al., 2000)。この概念は現在も広く支持されており、サブタイプは、乳癌の治療戦略を決定付ける重要な因子に位置づけられている。しかしながら遺伝子発現プロファイルの確認を日常診療で

行うことは現実的ではないので、臨床では乳癌組織におけるホルモン受容体（エストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER)、プロゲステロン受容体 (progesterone receptor, PgR)）と human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) の 3 受容体および Ki67 の発現状況に基づく代替的 intrinsic subtype に応じて治療が選択される（表 1)。

表 1　乳癌の分類（サブタイプ)と薬物療法

代替的 intrinsic subtype (サブタイプ)	ER	PgR	HER2	Ki67	薬物療法
Luminal A like	＋	±	－	低	内分泌療法
Luminal B like	＋	±	－	高	内分泌療法＋化学療法
HER2 陽性	±	±	＋		抗 HER2療法＋化学療法
Triple negative	－	－	－		化学療法

ホルモン受容体は内分泌療法の、また HER2 は抗 HER2 療法の標的である。ホルモン受容体も HER2 も発現していない場合(トリプルネガティブ乳癌)は化学療法が選択される。ホルモン受容体陽性乳癌の薬物療法の選択の基本は内分泌療法であるが、周術期薬物療法においては化学療法が追加される場合もある。化学療法追加の明確な基準はないが、腫瘍径や腋窩リンパ節転移の有無、グレードや Ki67 などの病理学的所見や多遺伝子アッセイの結果を参考にして、化学療法を追加するかを検討している。

転移再発乳癌の薬物療法については、サブタイプに応じた治療に加え、新規の分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬、また *BRCA1*、*BRCA2* 遺伝子検査による遺伝性乳癌卵巣癌症候群への PARP 阻害薬など、次々と新たな治療薬が開発されてきている。しかしながら、これらの標準治療を行っていても治療が奏効せず進行の早い症例が存在し、治療選択に難渋することがある。

3. ER 陽性乳癌と内分泌療法感受性

乳癌全体のおよそ 80%を占める ER 陽性乳癌は、最も予後のよいサブタイプであり、早くから内分泌療法が行われていたが、一方で内分泌療法に対する抵抗性など未だ解決されていない問題もある。ER 陽性転移再発乳癌の治療においては、内分泌療法に対する感受性が考慮され、治療選択においても重要となる。ER 陽性再発乳癌は術後 5 年以降に再発する晩期再発もみられ

るが、特に早期再発（術後　5 年以内の再発）では、内分泌療法に対する感受性が低く標準治療が奏効せず進行の早い症例も存在する。最近は、内分泌療法抵抗性に関わる複数の活性経路における分子を標的とした、新規の分子標的薬（mTOR 阻害薬、CDK4/6 阻害薬）が次々に承認されている(Brufsky et al., 2018; Araki et al., 2018)。しかしながら、これらの薬剤を使い分けるバイオマーカーや効果予測因子などは必ずしも明らかになっていない。

4. がん遺伝子パネル検査

2019 年 6 月にこのような標準治療の奏効しない症例に対し、がん遺伝子パネル検査が保険適用された。がん遺伝子パネル検査の意義として、コンパニオン診断薬としての分析学的･臨床的妥当性が示されたコンパニオン診断機能や、特定のバイオマーカーの有無ではなく検出された遺伝子異常を総合的に判断して治療選択につなげるがんゲノムプロファイリング機能がある。乳癌症例の検査数も増えてきているが、遺伝子検査で治療薬が見つかることは少なく、遺伝子解析結果をどのように診療に反映させていくかは今後の課題である。乳癌における個々の遺伝子異常と予後についての報告は数多くあるが、がん遺伝子パネル検査のような網羅的がん遺伝子解析結果と治療または予後について検討した報告は少ない。

5. この研究で明らかにすること

がん遺伝子パネル検査結果を、治療法を見つけるだけでなく、治療の感受性や予後因子としての活用など、実臨床における有用性を明らかにする。また、乳癌の進展に伴う遺伝子異常を解析し、どのようなクローン変化が乳癌進展に関わるのかを明らかにする。

本研究では、まず、「1. 転移再発乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討」として、当院にてがん遺伝子パネル検査を施行した転移再発乳癌 29 症例について、遺伝子結果を再解析し、臨床的特徴と合わせてレトロスペクティブに検討した。さらに、その中でも特に多いサブタイプである ER 陽性 HER2 陰性乳癌については、内分泌療法感受性に注目し、治療抵抗性と遺伝子異常との関係について検討した。

次に、遺伝子異常が乳癌進展にどのように関わってくるのか、特に遺伝的要因の関与が強く推測される若年乳癌を対象に、「2. 若年乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討」として、個々の症例のサブクローン構築を検討し、進展に伴うドライバー遺伝子などについて解析した。

1. 転移再発乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討

方法

2016 年 4 月から 2018 年 3 月の間に北海道大学病院で、がん遺伝子パネル検査である CLHURC (Clinical Sequence System in Hokkaido University Hospital for Cancer Individualized Medicine)もしくは OncoPrime (EA Genomics, Morrisville, NC, USA) を受けた転移再発乳癌 29 症例について、遺伝子結果を再解析し、解析結果 (生殖細胞系列変異および乳癌組織における体細胞遺伝子異常)と診療情報を用いた臨床的特徴をレトロスペクティブに検討した。臨床情報としては、年齢、性別、既往歴、家族歴などに加え、原発巣や再発巣の病理組織学的所見、さらに手術、薬物療法、放射線療法などを含む治療歴、再発/生存の有無等を調べ、追跡予後調査も併せて行った。家族歴についは、NCCN ガイドラインに記載されている乳癌・卵巣癌の遺伝学的評価に基づいて分類した。

尚、この研究は北海道大学の医の倫理委員会で承認されている (医 18-049「乳がんにおけるがん遺伝子パネルを用いた網羅的遺伝子解析」)。

1. がん遺伝子パネル検査

CLHURC とは、北海道大学病院独自の院内完結型網羅的がん遺伝子解析であり、2016 年 4 月から運用されている。CLHURC (L) (GeneRead DNAseq Panel PCR Kit V2 (Qiagen, Hilden, Germany)) は腫瘍特異的遺伝子パネルで、血液と腫瘍組織を用いて 160 のがん関連遺伝子異常を調べる (図 1)。本検討では、既にシークエンスが終了した後の遺伝子結果を用いているため、実際の DNA 抽出からシークエンスまで方法は「2. 若年乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討」に記載した。

OncoPrime は腫瘍組織のみを用いて 223 のがん関連遺伝子異常を解析する。遺伝子変異および融合遺伝子の検出が可能で、がんに関連する 215 遺伝子の変異および 17 遺伝子の転座が検出対象となる (図 2)。がん関連遺伝子のエクソン領域上の体細胞変異数を解析し、TMB (腫瘍遺伝子変異量) のスコア測定も行われる。検査は米国 Q2 Solutions および三井情報株式会社により実施された。

ABL1	*BUB1B*	*DDR2*	*FGFR2*	*IDH2*	*MEN1*	*PDGFRA*	*SMARCA4*
AKT1	*CARD11*	*DICER1*	*FGFR3*	*IKZF1*	*MET*	*PHF6*	*SMARCB1*
AKT2	*CBL*	*DNMT3A*	*FH*	*IL6ST*	*MLH1*	*PIK3CA*	*SMO*
ALK	*CBLB*	*ECT2L*	*FLCN*	*IL7R*	*MSH2*	*PIK3R1*	*SPOP*
AMER1	*CD79A*	*EGFR*	*FLT3*	*JAK1*	*MSH6*	*PMS2*	*SRC*
APC	*CD79B*	*EP300*	*FUBP1*	*JAK2*	*MTOR*	*PPP2R1A*	*STK11*
AR	*CDC73*	*EPCAM*	*GATA1*	*JAK3*	*MUTYH*	*PRDM1*	*SUFU*
ARID1A	*CDH1*	*ERBB2*	*GATA2*	*KDM6A*	*MYC*	*PRKAR1A*	*TERT*
ARID2	*CDK12*	*ERBB3*	*GATA3*	*KDR*	*MYD88*	*PTCH1*	*TNFAIP3*
ASXL1	*CDK4*	*ERBB4*	*GNA11*	*KIT*	*NF1*	*PTEN*	*TNFRSF14*
ATM	*CDKN2A*	*ERCC5*	*GNAQ*	*KLF6*	*NF2*	*PTPN11*	*TP53*
ATRX	*CHEK2*	*ESR1*	*GNAS*	*KMT2D*	*NFE2L2*	*RAC1*	*TSC1*
BAP1	*CIC*	*EZH2*	*GPC3*	*KRAS*	*NFKBIA*	*RB1*	*TSC2*
BCL6	*CREBBP*	*FAM46C*	*GRIN2A*	*MAP2K1*	*NOTCH1*	*RET*	*TSHR*
BCOR	*CRLF2*	*FANCA*	*H3F3A*	*MAP2K2*	*NOTCH2*	*ROS1*	*U2AF1*
BRAF	*CSF1R*	*FANCD2*	*HIST1H3B*	*MAP2K4*	*NPM1*	*SDHB*	*VHL*
BRCA1	*CTNNB1*	*FANCE*	*HNF1A*	*MAP3K1*	*NRAS*	*SETD2*	*WT1*
BRCA2	*CYLD*	*FAS*	*HRAS*	*MAP4K3*	*PALB2*	*SF3B1*	*XPC*
BRIP1	*DAXX*	*FBXO11*	*HSPH1*	*MDM2*	*PAX5*	*SLC7A8*	*ZNF2*
BTK	*DDB2*	*FBXW7*	*IDH1*	*MED12*	*PBRM1*	*SMAD4*	*ZRSR2*

図 2　CLHURC（L）で使用する 160 遺伝子パネル
（Hayashi et al., 2018）より引用

ABL	ABL2	ACVR1B	AKT1	AKT2	AKT3	ALK	APC	AR	ARAF
ARID1A	ARID1B	ASXL1	ATM	ATR	ATRX	AURKA	AURKB	AXIN1	BAP1
BCL2	BCOR	BLM	BRAF	BRCA1	BRCA2	BTK	CARD11	CASP8	CBL
CCND1	CCND2	CCND3	CCNE1	CDC73	CDH1	CDK4	CDK6	CDKN2A	CDKN2B
CEBPA	CHEK1	CHEK2	CREBBP	CRLF2	CSF1R	CTNNA1	CTNNB1	CYP1A2	CYP2C19
CYP2C9	CYP2D6	DAXX	DDR2	DNMT3A	DPYD	EGFR	EP300	ERBB2	ERBB3
ERBB4	ERCC1	ERCC2	ERCC3	ERG	ERRFI1	ESR1	EZH2	FAM123B	FANCA
FBXW7	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4	FLT1	FLT3	FLT4	FOXL2	G6PD
GATA1	GATA2	GATA3	GLI1	GNA11	GNAQ	GNAS	GRIN2A	H3F3A	HNF1A
HRAS	IDH1	IDH2	IGF1R	IGF2R	IKZF1	IL7R	INSR	JAK1	JAK2
JAK3	KDM6A	KDR	KIT	KLF4	KRAS	MAML1	MAP2K1	MAP2K2	MAP2K4
MAP3K1	MAPK1	MDM2	MDM4	MED12	MEN1	MET	MITF	MLH1	MLL
MPL	MRE11A	MSH2	MSH6	MTHFR	MTOR	MYC	MYCN	MYD88	NBN
NF1	NF2	NFE2L2	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	NOTCH4	NPM1	NRAS	NTRK1
NTRK2	NTRK3	PALB2	PARP1	PAX5	PBRM1	PDGFRA	PDGFRB	PDK1	PGR
PHF6	PIK3CA	PIK3CG	PIK3R1	PIK3R2	PIK3R5	PMS1	PMS2	PPP2R1A	PRDM1
PTCH1	PTCH2	PTEN	PTPN11	RAD50	RAD51	RAF1	RB1	RET	RICTOR
RNF43	ROS1	RPTOR	RSPO2	RSPO3	RUNX1	SETD2	SF3B1	SMAD2	SMAD3
SMAD4	SMARCA4	SMARCB1	SMO	SOCS1	SRC	SRSF2	STAG2	STAT1	STAT3
STK11	SUFU	TERT	TET2	TGFBR2	TNFAIP3	TOP1	TOP2A	TP53	TP63
TP73	TPMT	TRAF7	TSC1	TSC2	TSHR	TYMS	U2AF1	UGT1A1	VHL
VKORC1	WRN	WT1	XPC	XRCC1					

ALK	BCR	ETV4	MLL	RARA	BRAF	EGFR	ETV6	PDGFRB	ROS1
ETV5	ETV1	EWSR1	RAF1	TMPRSS2	PDGFRA	RET			

図 3　オンコプライムで使用する 223 遺伝子パネル
(https://www.rikengenesis.jp/dcms_media/image/OncoPrime_gene.png)
より引用

2. バイオインフォマティクス解析

本研究では、次世代シークエンサー MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) から検出されたシークエンスデータを以下の手順で再解析した。

MiSeq によって検出されたシーケンスデータは、最初に MiSeq Reporter により解析処理され、FASTQ ファイルが作成される。作成された FASTQ ファイルに対して、Trim-galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) を用い、アダプタートリミングおよび不良リードのフィルタリング処理を行った。Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (Li et al., 2009a) を使用して、マッピング (hg19) を行い BAM ファイルを作成した。BAM ファイルのソートやインデックスファイル作成には、SAMtools (v1.6)(Li et al., 2009b)を使用した。Genome Analysis ToolKit (GATK 3.4-46) (McKenna et

al., 2010）によるリアライメント及びリキャリブレーションを実施した。

シーケンスの品質チェックには、Illumina InterOp library (https://illumina.github.io/interop/index.html)、FastQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)(v0.11.6)、GATK DepthOfCoverage、QualiMap2(v2.2.2) (Okonechnikov et al., 2016) を用いて評価を行なった。

遺伝子変異(一塩基置換および挿入/欠失)の検出には、VarScan2(Koboldt et al., 2012) を用い、正常対照サンプルがある場合にはペア解析を実施した。Copy number variants（コピー数変異解析）には CNVkit (Yao et al., 2019) を使用し、正常対照データがない場合には、既存正常データのプールデータセットを使用し解析を行なった。

生殖細胞系列の遺伝子変異の除外には、Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/)、genomAD database (https://gnomad.broadinstitute.org/)および ToMMo 4.7KJPN database (https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/ijgvd/) を用いた。

検出された変異のフィルタリングは、bcftools (Li et al., 2011) を用いて、変異アレル数、変異アレル頻度、読み取り深度、および今回使用したライブラリキットの正常データのプールデータセットを使用して実施した。Integrative Genomics Viewer (v2.3.57) (IGV) (Thorvaldsdottir et al., 2013) および BAF プロットによる、マニュアルレビューを行った。

変異の生物学的意義付け(アノテーション)は、 Ensembl Variant Effect Predector (VEP)(v95) (McLaren et al., 2016) を使用した。

生殖細胞系列変異は、American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)ガイドライン (Kalia et al., 2017)に従って分類され、ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/)(Landrum et al., 2016)で病的意義を評価した。

3. 統計学的解析

生存解析に Kaplan-Meier 法を用い、生存曲線の差の検定にログランク検定を用いた。統計解析には Excel ソフトウェア(Microsoft corp., Albuquerque, MX, USA) を使用した。$P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

結果

1. 患者背景

全 29 症例の患者背景を表 2 に示す。初発時年齢は 28～72 歳 (中央値 48 歳)、検査時年齢は 33～78 歳 (中央値 64 歳)。家族歴は、乳癌または卵巣癌あるいは両方が 12 例、それ以外の癌が 21 例、全く家族歴がない症例は 7 例であった(重複含む)。臨床病期は、Stage Ⅰが 1 例 (3.4%)、ⅡA が 8 例(27.6%)、ⅡB が 6 例(20.7%)、ⅢA が 3 例(10.3%)、ⅢC が 3 例(10.3%)、Ⅳが 6 例 (20.7%)、不明が 2 例であった。組織型は浸潤性乳管癌が 28 例(96.9%)、浸潤性小葉癌が 1 例 (3.4%) であった。腋窩リンパ節転移ありが 13 例 (44.8%)、リンパ節転移なしが 7 例 (24.1%) であった。サブタイプは ER 陽性 HER2 陰性が 24 例 (82.8%)、ER 陽性 HER2 陽性が 2 例 (6.9%)、ER 陰性 HER2 陰性が 2 例 (6.9%)、不明が 1 例であった。DFS は 1～252 ヶ月(中央値 56 ヶ月)、再発部位は多岐に渡っていた。

パネル検査の使用検体は原発巣が 15 例(51.7%)、転移巣が 14 例(48.3%)であり、転移巣では肺、肝臓、リンパ節が多かった (表 3)。遺伝子パネル検査を受けた時期は、再発後 1 次治療中が 7 例 (24.1%)、2 次治療中が 7 例 (24.1%)、3 次治療以降が 15 例 (51.7%) であった。使用したパネル検査は CLHURC (L) が 26 例 (89.7%)、オンコプライムが 3 例 (10.3%) であった。

表 2　患者背景（全 29 症例）

初発時年齢（歳）	中央値	48
	範囲	28-72
Performance status	0	15（51.7%）
	1	8（27.6%）
	2	4（13.8%）
	3	2（6.9%）
家族歴	乳癌または卵巣癌あるいは両方	12
（重複あり）	以下の家族歴*が3つ以上	4
	上記以外(家族歴が2つ以下、その他の癌)	17
	なし	7
喫煙歴	あり	10（34.5%）
	なし	19（65.5%）
臨床病期（初発時）	Ⅰ	1（3.4%）
	ⅡA	8（27.6%）
	ⅡB	6（20.7%）
	ⅢA	3（10.3%）
	ⅢB	0（0%）
	ⅢC	3（10.3%）
	Ⅳ	6（20.7%）
	不明	2（6.9%）
組織型	浸潤性乳管癌	28（96.6%）
	浸潤性小葉癌	1（3.4%）
腋窩リンパ節転移（初発時）	あり	13（44.8%）
	なし	7（24.1%）
	不明	3（10.3%）
	手術未施行（Stage Ⅳ）	6（20.7%）
サブタイプ	ER 陽性 HER2 陰性	24（82.8%）
	ER 陽性 HER2 陽性	2（6.9%）
	ER 陰性 HER2 陰性	2（6.9%）
	不明	1（3.4%）
Disease-free survival（月）	中央値	56
	範囲	1 - 252
転移部位	肺	18
（重複あり）	リンパ節	16
	骨	13
	肝臓	10
	胸壁	8
	脳	4
	卵巣	1
	脾臓	1

* 乳癌、膵癌、前立腺癌、黒色腫、肉腫、副腎皮質癌、脳腫瘍、白血病、びまん性胃癌、大腸癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、腎癌、皮膚症状、かつ/または巨頭症、消化管の過誤腫性ポリープ

表 3　がん遺伝子パネル検査に使用した検体、検査時期、パネル検査の種類（全 29 症例）

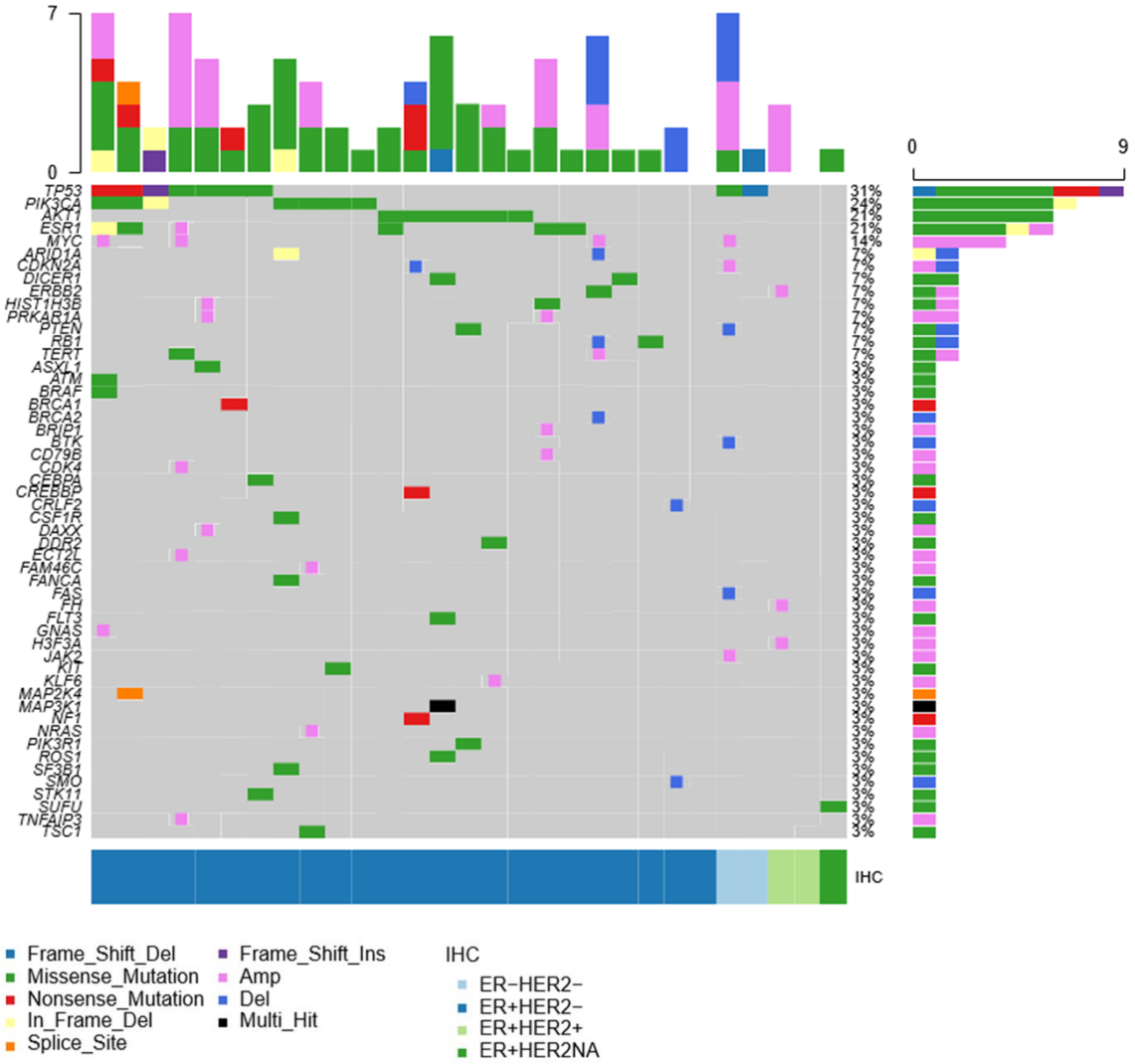
使用検体	原発巣	15（51.7%）
	転移巣	14（48.3%）
	肺	4（13.8%）
	肝臓	3（10.3%）
	リンパ節	3（10.3%）
	胸壁	2（6.9%）
	骨	1（3.4%）
	脳	1（3.4%）
	卵巣	1（3.4%）
検査時期	再発後1次治療中	7（24.1%）
	再発後2次治療中	7（24.1%）
	再発後3次治療以降	15（51.7%）
使用したパネル検査	CLHURC（L）	26（89.7%）
	オンコプライム	3（10.3%）

2．全 29 症例における遺伝子解析結果

2-1．体細胞遺伝子異常

体細胞遺伝子異常を遺伝子名、変異の有無、変異頻度のデータなどについて三次元プロットにより可視化する oncoplot を作成した（図 3）。全 29 症例中 27 症例で遺伝子異常（1 症例につき 1～7 個）を認めた。遺伝子異常を認めなかった症例が、ER 陽性 HER2 陰性で 1 例、ER 陽性 HER2 陽性で 1 例存在した。

2 症例以上で異常を認めた頻度の高い上位 14 遺伝子の使用検体別の症例数をまとめた（図 4 a）。体細胞遺伝子異常としては *TP53*、*PIK3CA*、*AKT1*、*ESR1*、*MYC* の順に多くなっていた。それぞれの遺伝子異常が原発巣あるいは転移巣どちらで多く見られたかは、各遺伝子により異なっていた。ミスセンス変異が最も多く、大部分が一塩基置換（SNP）であった（図 4 b）。


7
0
0
9
TP53
PIK3CA
AKT1
ESR1
MYC
ARID1A
CDKN2A
DICER1
ERBB2
HIST1H3B
PRKAR1A
PTEN
RB1
TERT
ASXL1
ATM
BRAF
BRCA1
BRCA2
BRIP1
BTK
CD79B
CDK4
CEBPA
CREBBP
CRLF2
CSF1R
DAXX
DDR2
ECT2L
FAM46C
FANCA
FAS
FH
FLT3
GNAS
H3F3A
JAK2
KIT
KLF6
MAP2K4
MAP3K1
NF1
NRAS
PIK3R1
ROS1
SF3B1
SMO
STK11
SUFU
TNFAIP3
TSC1
31%
24%
21%
21%
14%
7%
7%
7%
7%
7%
7%
7%
7%
7%
7%
3%
3%
3

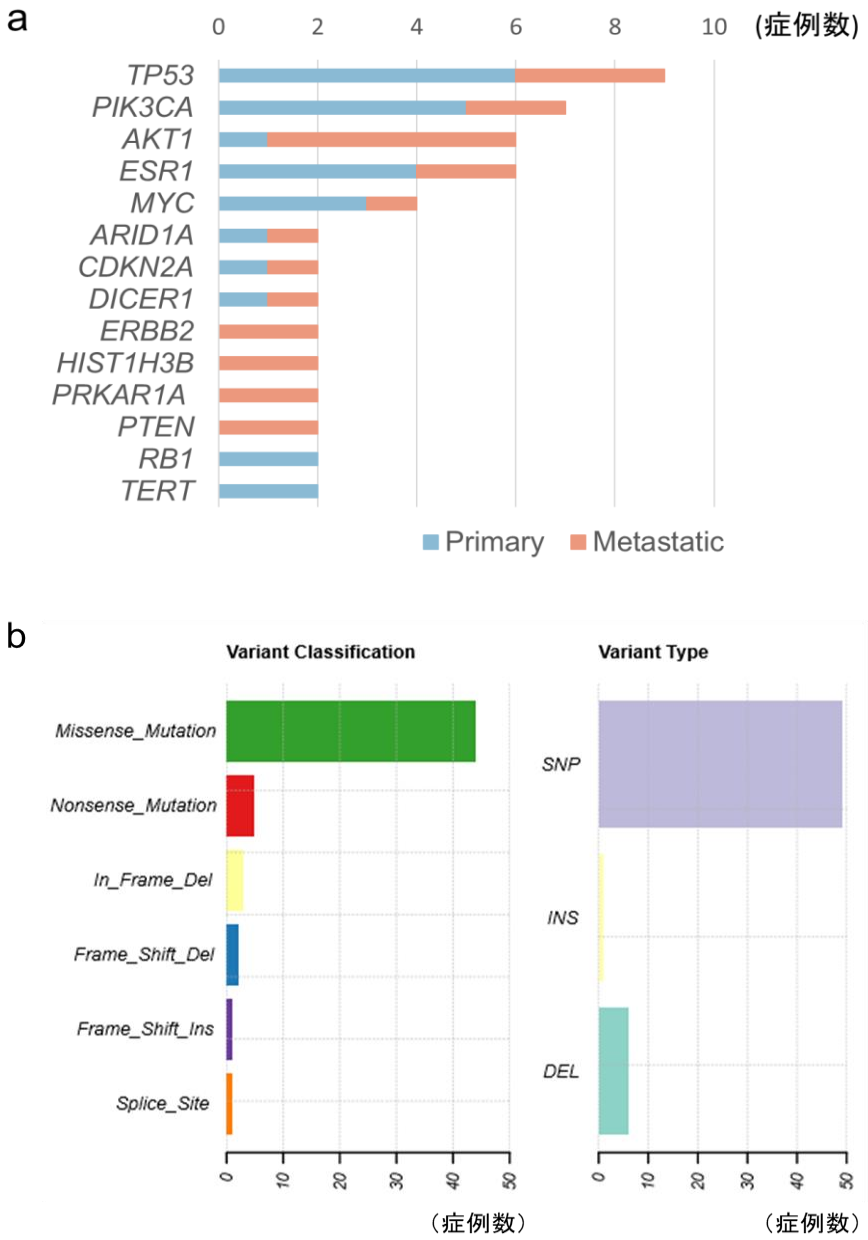


図 5　mutation summary（全 29 症例）

(a) 遺伝子異常の頻度が高い上位 14 遺伝子の使用検体(原発巣/転移巣)別の症例数

(b) Variant classification、Variant type 別の症例数

Variant classification は、Missense_Mutation:ミスセンス変異、Nonsense_Mutation:ナンセンス変異、In_Frame_Del:インフレーム欠失変異、Frame_Shift_Del:フレームシフト欠失変異、Frame_Shift_Ins:フレームシフト挿入変異、Splice_Site:スプライス部位変異。Variant type は、SNP:一塩基置換、INS:塩基挿入、Del:塩基欠失。

原発巣で検査した 15 症例中、遺伝子異常を認めた 13 症例について、遺伝子異常とその後の転移部位を検討した（図 5)。3 症例（症例 4、8、12）以外は各症例 2 つ以上の遺伝子異常を認め、2 症例（症例 7、10）以外は複数臓器に転移していた。転移部位の遺伝子検査を行っていないため、個々の遺伝子異常と転移臓器の関係性を検討することは難しかった。

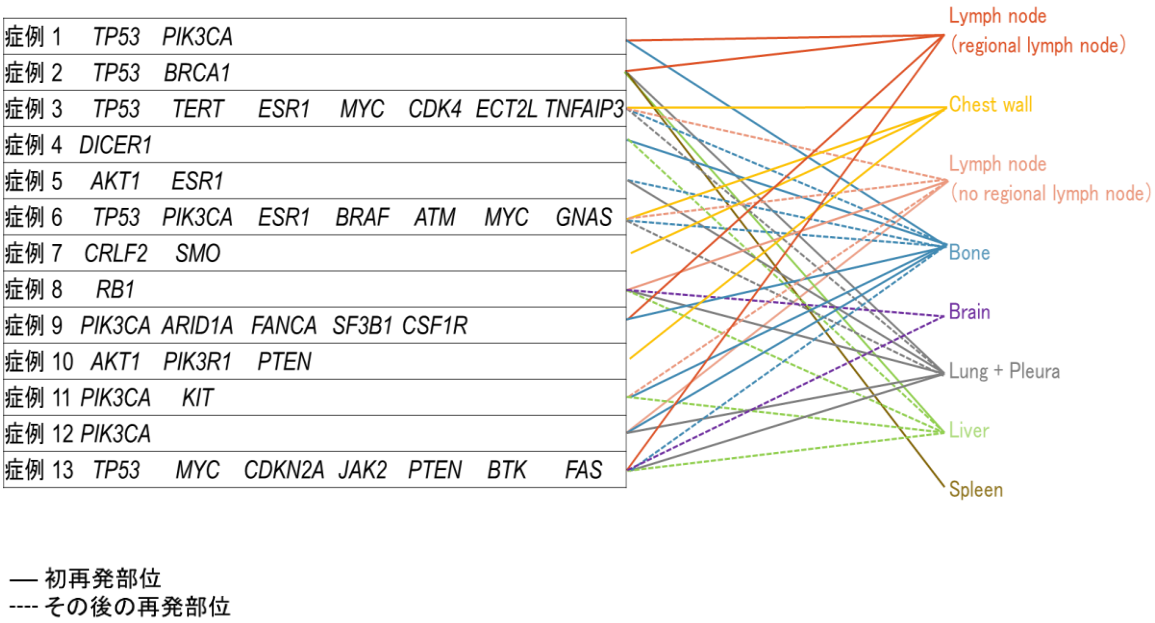


図 6　原発巣に遺伝子異常を認めた 13 症例の転移部位

2-2. 生殖細胞系列変異と家族歴

生殖細胞系列変異を調べた 19 症例の遺伝子結果を年齢順に並べた（表 4)。家族歴は、NCCN ガイドライン 2019 年 第 3 版における乳癌の遺伝学的リスク評価の基準を参考に分類している。ClinVar で pathogenic（病的変異）の評価であった遺伝子は *BRCA1*、*BRCA2* と *PTEN* のみであり、それ以外の遺伝子は Uncertain significance:VUS(病的意義不明)の評価であった。病的変異は全て 45 歳以下の症例に認められた。*BRCA1* が 3 例、*BRCA2* が 2 例であり、1 例（症例 10）を除き、乳癌あるいは卵巣癌または両方の家族歴を認めた。*PTEN* 遺伝子に病的変異を認めた症例（症例 2）は、乳癌以外の既往歴がなく Cowden 症候群の診断基準を満たさなかった。

生殖細胞系列変異の有無と生存率には関連は認められなかった（図 6)。

表 4　生殖細胞系列変異を検討した 19 症例の病的変異と VUS、家族歴

症例 No.	発症年齢	Pathogenic (病的変異)	Uncertain significance (病的意義不明)	乳癌または卵巣癌あるいは両方	下記の家族歴*が3つ以上	それ以外 (家族歴が2つ以下、その他の癌)
1	28	*BRCA2* p.D252Vfs*24		母:乳癌		叔母:子宮体癌
2	32	*PTEN* p.R130*		祖母:乳癌、大叔母:乳癌、大伯母:乳癌		祖父:大腸癌
3	33			祖母:乳癌		父:肝癌
4	41	*BRCA2* p.T630Nfs*6		叔母:乳癌、叔母:乳癌	父:前立腺癌、妹:大腸癌、叔父:胃癌	
5	42			叔母:乳癌		父:肝癌・前立腺癌、叔父:肺癌
6	42				父:胃癌、祖父:大腸癌、叔父:膵癌、叔父:前立腺癌、叔父:胃癌	祖母:食道癌
7	42					叔母(母方):肺癌
8	43	*BRCA1* p.Q1447Rfs*22		母:卵巣癌・乳癌、叔母:乳癌、叔母:乳癌		父:胃癌、叔母:膵癌
9	43	*BRCA1* p.Q81*		母:乳癌、姉:乳癌		
10	45	*BRCA1* p.L63*				叔父:大腸癌
11	46		*EZH2* p.R213H			父:肺癌、母:肝細胞癌、姉:肝細胞癌、姉:肝細胞癌、姉:胃癌
12	51		*CHEK2* p.D339Y		母:子宮体癌、兄:前立腺癌、叔父:胃癌	
13	57			姉:乳癌	母:大腸癌、祖母:子宮癌、叔父:胃癌、叔父:胃癌	
14	58		*NF1* p.M1073V	従妹:乳癌		兄:胃癌
15	58					
16	61		*MSH2* p.T803A			祖母:胃癌
17	61					
18	63			母:乳癌、姉:乳癌		父:食道癌、兄:胃癌
19	67		*APC* p.L662I			弟:十二指腸癌

* 乳癌、膵癌、前立腺癌、黒色腫、肉腫、副腎皮質癌、脳腫瘍、白血病、びまん性胃癌、大腸癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、腎癌、皮膚症状、かつ/または巨頭症、消化管の過誤腫性ポリープ

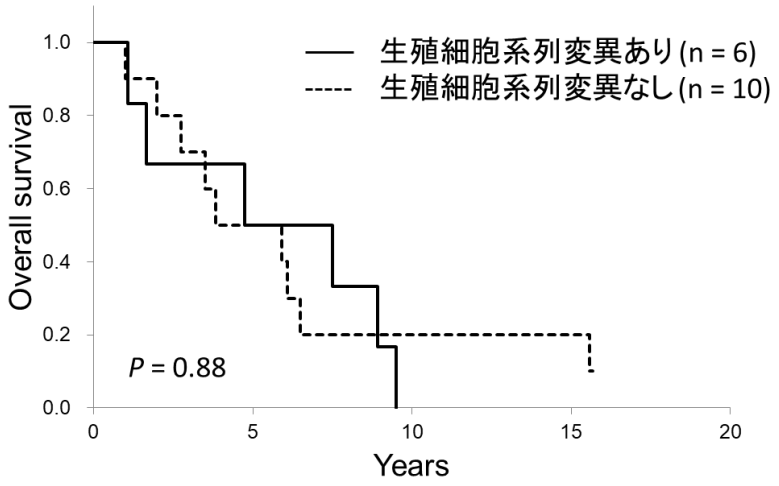


図 7　生殖細胞系列変異の有無と生存期間

生殖細胞系列変異を調べた 19 症例のうち、転帰が判明している 16 症例の生存曲線。ClinVar での評価が Pathogenic（病的変異）であった遺伝子のみを変異ありとした。

3. ER 陽性 HER2 陰性乳癌における遺伝子解析結果

次に、全 29 症例中、症例数の最も多いサブタイプである ER 陽性 HER2 陰性乳癌 24 症例について検討した。

3-1. 内分泌療法感受性と予後

内分泌療法の感受性（反応性）は、術後内分泌療法から再発までの期間、あるいは転移乳癌に対する一次内分泌療法の奏効期間によって四段階に分けた（Cardoso et al., 2014; Cardoso et al., 2017; Tryfonidis et al., 2016）（表 5）。感受性の低い順に very low が 7 例、low が 5 例、medium が 3 例、high が 9 例であった。

表 5　ER 陽性 HER2 陰性乳癌 24 症例の内分泌療法感受性

内分泌療法感受性	再発時期 Stage Ⅰ-Ⅲ（n = 20）	症例数	奏効期間 Stage Ⅳ（n = 4）	症例数	合計 （n = 24）
very low	術後内分泌療法 1-24ヶ月未満	7	一次内分泌療法 3ヶ月以内にPD	0	7
low	術後内分泌療法 24-60ヶ月未満	4	一次内分泌療法 3-9ヶ月でPD	1	5
medium	術後内分泌療法後 12ヶ月未満	2	一次内分泌療法 9-24ヶ月でPD	1	3
high	術後内分泌療法後 12ヶ月以上	7	一次内分泌療法 24ヶ月以上でPD	2	9

感受性別に生存率を比較すると、統計学的に有意な差をもって内分泌療法感受性が低い程予後不良であった（P = 0.0275）（図 7）。

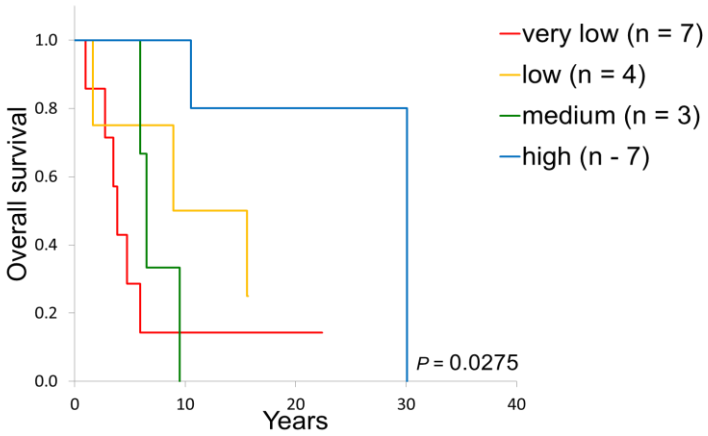


図 8　内分泌療法感受性別の生存期間

ER 陽性 HER2 陰性 24 症例のうち、転帰が判明している 21 症例の生存曲線。

3-2. 体細胞遺伝子異常と生殖細胞系列変異結果

ER 陽性 HER2 陰性乳癌 24 症例について、体細胞遺伝子異常を oncoplot として作成した（図 8)。体細胞遺伝子異常としては *TP53*、*PIK3CA*、*AKT1*、*ESR1*、*MYC* を多く認め、全 29 症例と変わらなかった。

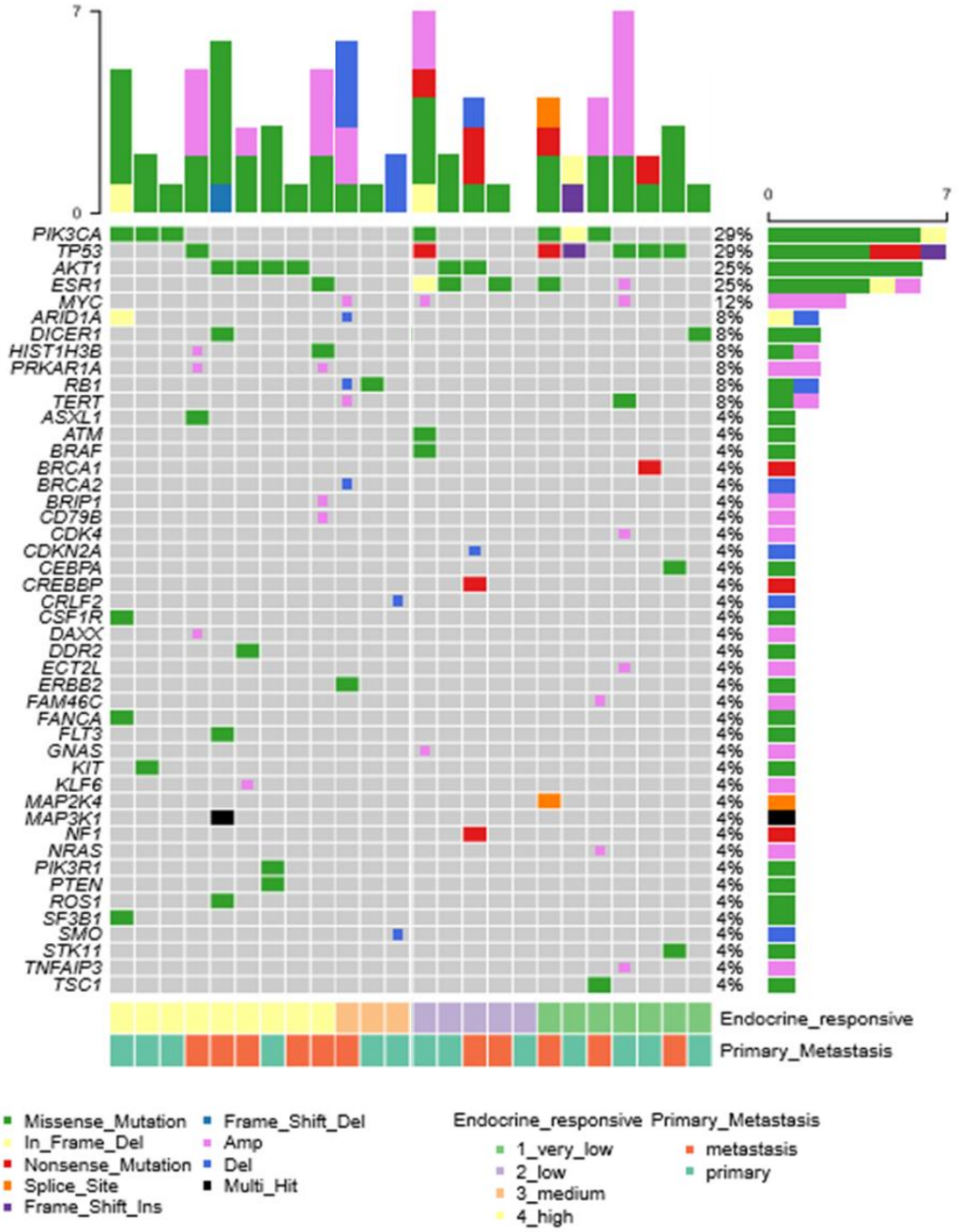


図 9　oncoplot（ER 陽性 HER2 陰性乳癌 24 症例）

ER 陽性 HER2 陰性乳癌 24 症例の体細胞遺伝子異常。縦軸が遺伝子名、横軸が各症例となっており、遺伝子異常は遺伝子変異やコピー数異常などで色分けした。縦軸の遺伝子名は、上から順に *PIC3CA* から *TERT* までは、遺伝子異常の多い順に並んでおり、*ASXL1* 以降は 1 症例のみに認められた遺伝

子異常で、アルファベット順に表記した。横軸の症例は、内分泌療法感受性別に並んでおり、左から内分泌療法感受性 high、medium、low、very low となっており、さらにその下にそれぞれ検査部位（原発巣/転移巣）での色分けをした。また、上の棒グラフは症例毎の遺伝子異常の合計数、右の棒グラフは各遺伝子異常を認めた症例数と割合を示している。

内分泌療法感受性別の体細胞遺伝子異常、生殖細胞系列変異をまとめた（図 9）。内分泌療法感受性別の遺伝子異常の頻度をみると、*TP53* と *ESR1* 遺伝子異常は内分泌療法感受性 very low や low で多く見られたが、*AKT1* 遺伝子異常は high に多く、*PIK3CA* 遺伝子異常は感受性に関係なく遺伝子異常が存在していた。*ESR1* 遺伝子異常は転移巣で多いと言われているが、原発巣でも 2 例に認められており、いずれも内分泌療法感受性は low であった。生殖細胞系列変異は very low や low で多く認めた。very low の症例に、*BRCA1* の生殖細胞系列変異は認めなかったが、*BRCA1* の体細胞遺伝子異常を認めた症例が 1 例存在した。

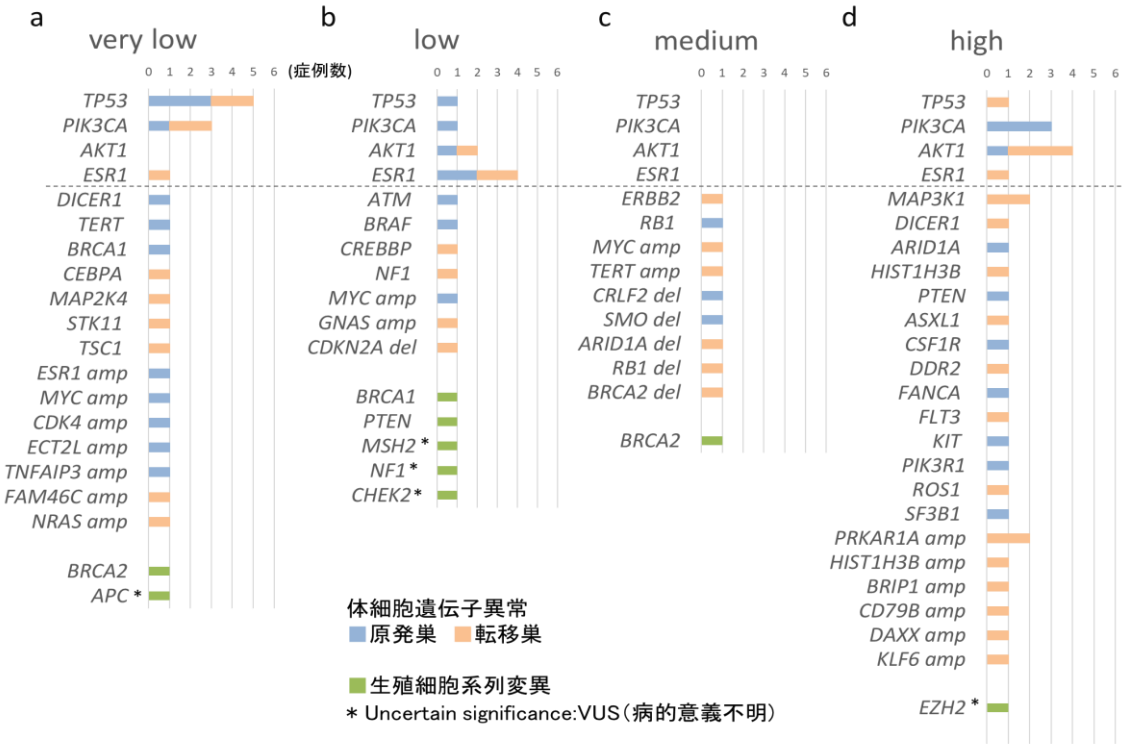


図 10　内分泌療法感受性別の遺伝子異常の頻度

ER 陽性 HER2 陰性 24 症例の内分泌療法感受性別の体細胞遺伝子異常、生殖細胞系列変異のまとめ。体細胞遺伝子異常は使用検体（原発巣/転移巣）別に記載した。

内分泌療法感受性　(a) very low、(b) low、(c) medium、(d) high

3-3. *TP53*、*PIK3CA*、*AKT1*、*ESR1* 遺伝子異常と予後

遺伝子異常の頻度が高い上位 4 遺伝子 *TP53*、*PIK3CA*、*AKT1*、*ESR1* について、それぞれの遺伝子異常の有無による生存率を比較した（図 10）。統計学的に有意な差をもって、*TP53* 遺伝子異常がある方が予後不良であった（図 10 a、$P = 0.0284$）。*PIK3CA*、*AKT1*、*ESR1* 遺伝子異常の有無では、生存率に統計学的有意な差を認めなかった。

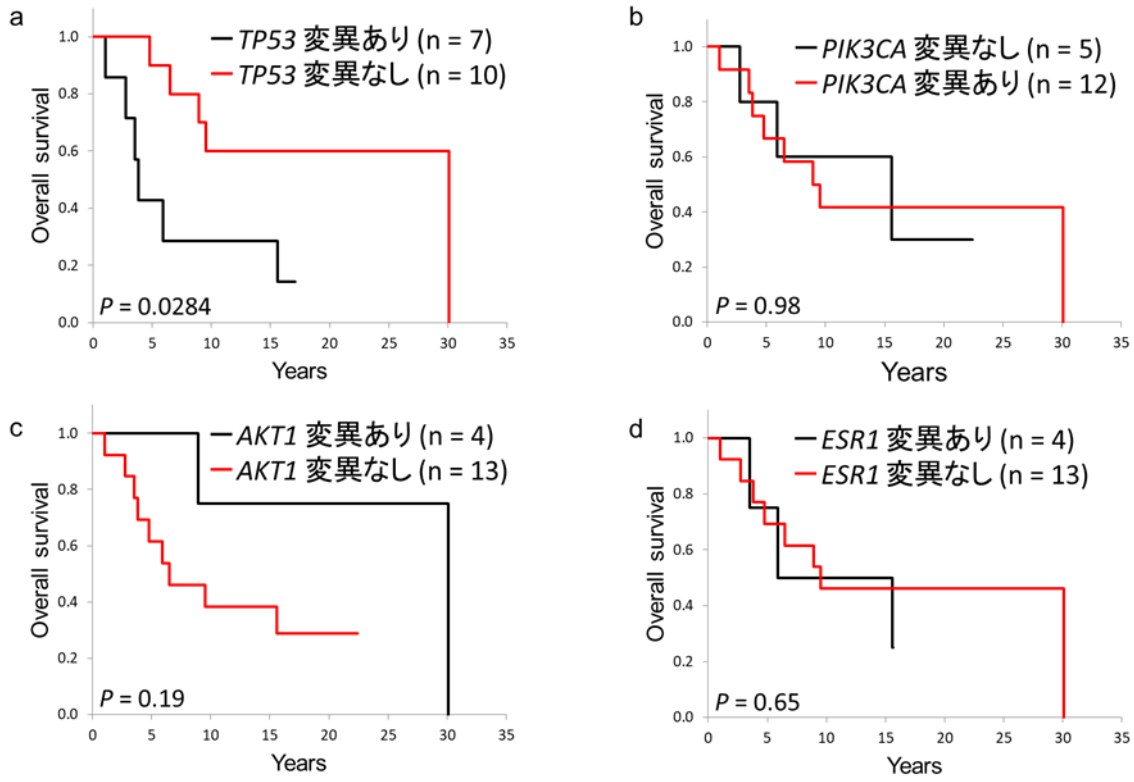


図 11　体細胞遺伝子異常と生存期間

Stege Ⅳを除く ER 陽性 HER2 陰性乳癌 20 症例のうち、転帰が分かっている 17 症例の遺伝子異常の有無と生存曲線。

(a) *TP53*、(b) *PIK3CA*、(c) *AKT1*、(d) *ESR1*

同じく 4 遺伝子について、アミノ酸変化の位置とその頻度を表した lollipop を作成した（図 11）。*TP53* は 3 つのドメインそれぞれに変異を認めた（図 11 a）。反対に、*AKT1* はホットスポットとされる PH (Plekstrin Homology) domain の E17K でのみ変異を認めた（図 11 c）。*PIK3CA* と *ESR1* は、それぞれホットスポットである Kinase domain の H1047R と ligand biding domain の D538G と、ホットスポット以外にも変異を認めた（図 11 b、d）。内分泌療法感受性や検査部位（原発巣もしくは転移巣）で特徴的な違いはなかった。

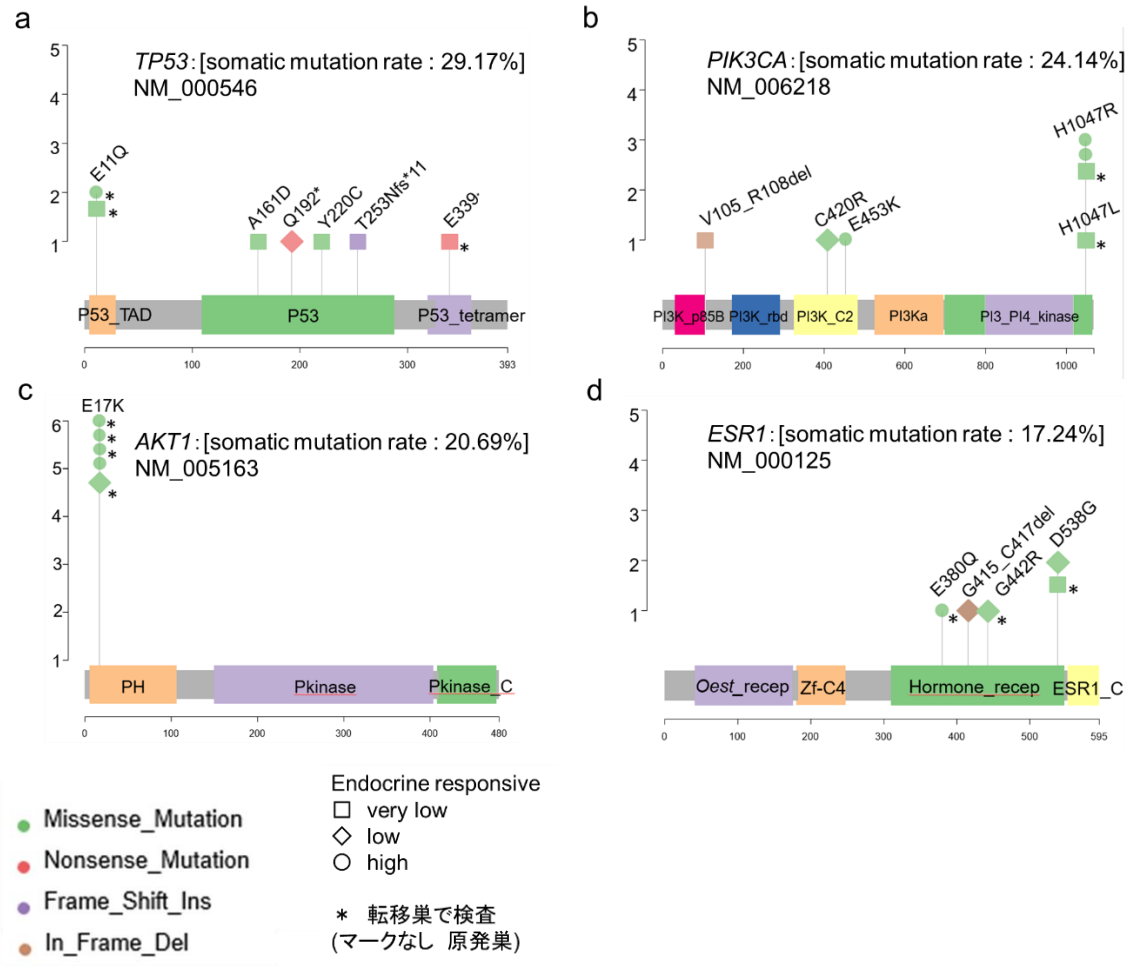


図 12　遺伝子異常の頻度が高い 4 遺伝子の lollipop

ER 陽性 HER2 陰性乳癌 24 症例中、遺伝子異常の頻度が高い上位 4 遺伝子におけるアミノ酸変化の位置とその頻度（lollipop）。

（a）*TP53*、（b）*PIK3CA*、（c）*AKT1*、（d）*ESR1*

3-4. 遺伝子検査部位別（原発巣/転移巣）の検討

原発巣で検討した早期乳癌（Stage Ⅰ～Ⅲ）症例について、原発巣の病理組織学的所見と遺伝子異常、周術期薬物療法と予後を検討した（表 6)。本研究の遺伝子検査は再発後に施行されているため、周術期薬物療法はその当時の病理結果に基づいて行われている。DFS（disease-free survival）が 60 ヶ月未満、つまり内分泌療法感受性 very low または low である 6 症例中 4 例に *TP53* 遺伝子異常を認めた（症例 1、2、3、6)。原発巣に *TP53* 遺伝子異常のあった 4 症例中 3 例が、周術期薬物療法として内分泌療法に化学療法を追加されているが、4 例とも全て 5 年以内に再発していた。特にうち 2 例（症例 1、2）は術後 2 ヶ月以内に再発していた。

次に、転移巣での遺伝子異常と治療内容、その後の転帰を検討した(表 7)。内分泌療法感受性が低い程生存率は下がるが、内分泌療法感受性 very low や low でも現在まで生存中の症例が存在した（症例 6、9)。また、*TP53* 遺伝子異常があると生存率は下がるが、脳転移に *TP53* 遺伝子異常があっても長期生存している症例が存在した（症例 8)。生存中の 4 症例（症例 6～9）は、それぞれ転移巣の遺伝子異常は異なっていたが、転移巣に対して手術あるいは照射といった局所療法も行われていた。

表6　原発巣で検討した早期乳癌（Stage Ⅰ～Ⅲ）症例の病理組織学的所見と遺伝子異常、周術期薬物療法と予後

症例 No.	病理組織学的所見								遺伝子結果		周術期薬物療法	DFS（月）	内分泌療法感受性
	浸潤径（mm）	リンパ節転移	核グレード	組織学的治療効果	ER	PgR	HER2	Ki67	生殖細胞変異	体細胞遺伝子異常			
1	5	あり（2/16）		2a	100%	0%	1+	92%		*TP53* p.T253Nfs*11 *PIK3CA* p.V105_R108del	CT（FEC, DTX）	1	very low
2	55	あり（8/16）		0 or 1a	5%	<1%	0	75%		*TP53* p.Y220C *BRCA1* p.L63*	術前 CT（EC, PTX） 術後 CT（DOC, CBDCA）	2	very low
3	50	なし	3（2+3）		80%	0%	0	32%	*APC* p.L662I*	*TP53* p.A161D *ESR1* amp *TERT* p.V299M *MYC* amp *CDK4* amp *ECT2L* amp *TNFAIP3* amp	ET（ANA）	3	very low
4	10	あり（1/1 micro）	3（3+3）		90%	30%	0%	31%	*BRCA2* p.T630Nfs*6	*DICER1* p.A518V	CT（FEC）、ET（TAM+LHRHa）	16	very low
5	20	なし	2（2+2）		>66%	>66%	1+	未施行	*MSH2* p.T803A*	*AKT1* p.E17K *ESR1* p.D538G	ET（LET）	36	low
6	27	あり（7/14）	不明		+	−	−	不明	*NF1* p.M1073V*	*TP53* p.Q192* *PIK3CA* p.C420R *ESR1* p.G415_C417del *BRAF* p.R389C *ATM* p.S1863F *MYC* amp *GNAS* amp	CT（CAF, UFT）、ET（TAM）	54	low
7	不明	不明	不明		+	不明	−	17%		*CRLF2* del *SMO* del	ET（TAM → ANA）	60	medium
8	11	なし	2		>66%	33-66%	1+	未施行		*PIK3CA* p.H1047R *ARID1A* p.Q1334del *FANCA* p.P1411L *SF3B1* p.K700E *CSF1R* p.A245T	ET（TAM）	97	high
9	60	あり（9/13）	1（2+1）		60%	60%	1+	9%	*EZH2* p.R213H*	*AKT1* p.E17K *PIK3R1* p.R534Q *PTEN* p.L325F	CT（EC, PTX）、ET（LET）	128	high

ER陽性 HER2陰性乳癌 24症例のうち、原発巣で遺伝子検査をした早期乳癌（Stage Ⅰ～Ⅲ） 9症例。
原発巣の病理組織学的所見と遺伝子異常、周術期薬物療法と予後（内分泌療法感受性）。
＊ ClinVarでの評価が Uncertain significance:VUS（病的意義不明）
ET:Endocrine therapy、CT:Chemotherapy（薬剤名は略語表を参照）、DFS:disease-free survival

表7　転移巣で検討した症例の遺伝子異常と治療、予後

症例 No.	DFS（月）	内分泌療法感受性	生殖細胞系列変異	初再発部位	体細胞遺伝子異常	治療	その後の再発部位	体細胞遺伝子異常	治療	OS（月）
1	11	very low		リンパ節（同側腋窩）		手術（腋窩郭清術） ET	胸壁*、 肺	*TP53* p.E11Q *STK11* p.T189I *CEBPA* p.S190P	手術（追加Bt） ET → CT	46
2	23	very low		肝臓*、 骨	*PIK3CA* p.H1047R *TP53* p.E339* *ESR1* p.D538G *MAP2K4* p.R75Tfs*7	ET → CT				71
3	56	low	*BRCA1* p.Q1447Rfs*22	リンパ節（鎖骨上）*	*AKT1* p.E17K *CREBBP* p.Q1259* *NF1* p.W561* *CDKN2A* del	照射（リンパ節） ET → ET + Everolimus → CT → ET + Palbociclib				107
4	65	medium	*BRCA2* p.D252Vfs*24	リンパ節（縦隔）、 骨		ET → CT	肝臓*	*ERBB2* p.G727A *MYC* amp *TERT* amp *ARID1A* del *RB1* del *BRCA2* del	CT → ET + Everolimus	114
5	247	high		リンパ節（同側腋窩）*	*AKT1* p.E17K *DDR2* p.T283I *KLF6* amp	手術（腋窩郭清術） ET	肺		ET	361
6	58	low	*CHEK2* p.D339Y†	リンパ節（同側腋窩）		手術（腋窩郭清術） 照射（リンパ節） CT → ET	肺*、 リンパ節（縦隔）	*ESR1* p.G442R	手術（VATS） ET → ET + Everolimus → ET + Palbociclib	生存（>188）
7	124	high		肺*	*AKT1* p.E17K	手術（VATS） ET				生存（>204）
8	148	high		脳*、 肺	*TP53* p.E11Q *ASXL1* p.E1033V *HIST1H3B* amp *PRKAR1A* amp *DAXX* amp	手術（頭蓋骨腫瘤切除術） 照射（脳） ET				生存（>205）
9	7	very low		肺		照射（肺） ET	卵巣*、	*PIK3CA* p.H1047L *TSC1* p.A84T *FAM46C* amp *NRAS* amp	手術（卵巣切除術） ET → CT	生存（>269）

ER陽性 HER2陰性乳癌 24症例のうち、転移巣で遺伝子検査をし、転帰が判明している 9症例。再発部位と遺伝子異常、治療内容とその後の転帰。
* 遺伝子検査に使用した検体
† ClinVarでの評価が Uncertain significance:VUS（病的意義不明）
Bt:Total mastectomy、VATS:Video assisted thoracic surgery、ET:Endocrine therapy、CT:Chemotherapy（薬剤名は略語表を参照）、OS: overall survival

考察

Cancer Genome Atlas Network による 507 症例の早期乳癌の全エクソンシーケンス解析の報告によると、原発性乳癌において *TP53*（37%）、*PIK3CA*（36%）、*GATA3*（11%）遺伝子に高頻度に異常を認め、その他にも 10%以下で *MAP3K1*、*MAP2K2*、*MLL3*、*CDH1*、*PTEN*、*PIK3R1*、*AKT1* などの遺伝子にも異常が認められた（Cancer Genome Atlas., 2012)。他の研究でも同様の傾向が報告されており、乳癌 560 症例の全ゲノム配列の解析では、*TP53*、*PIK3CA*、*MYC*、*CCND1*、*PTEN*、*ERBB2*、*GATA3*、*RB1*、*MAP3K1* などの遺伝子に高頻度に異常を認めた （Nik-Zainal et al., 2016)。サブタイプにより遺伝子異常の頻度は異なり、*TP53* 遺伝子異常は luminal タイプ（ER 陽性）で少なく、*PIK3CA* 遺伝子異常はトリプルネガティブタイプで少ないと報告されている（Cancer Genome Atlas., 2012)。本研究の転移再発乳癌の検討では、全 29 症例での遺伝子異常としては、*TP53*、*PIK3CA*、*AKT1*、*ESR1*、*MYC* が多く、早期乳癌で報告されている遺伝子異常と概ね変わりなかった。

本研究では、実臨床において最も多いサブタイプである ER 陽性 HER2 陰性乳癌について、内分泌療法の感受性と遺伝子異常に注目して検討した。内分泌療法感受性については明確な基準はないが、2013 年の Advanced Breast Cancer Consensus Conference（ABC2）にて、術後内分泌療法から再発までの期間、または転移乳癌における一次内分泌療法の奏効期間によって、内分泌療法の感受性（反応性）を段階的に分けることが提唱され（Cardoso et al., 2014)、この考え方は日本のガイドラインでも次治療を考える上で参考となっている（Cardoso et al., 2017)。ER 陽性 HER2 陰性転移再発乳癌の治療選択においては、転移部位や腫瘍量などに加え、この内分泌療法感受性を考慮する必要がある。本研究では、内分泌療法の感受性により四段階に分類した（Tryfonidis et al., 2016)。ER 陽性 HER2 陰性乳癌においては、術後 5 年以内に再発する早期再発症例に比べ、術後 5 年以降に再発する晩期再発症例の方が再発後の生存期間が長く、内分泌療法感受性は再発後の生存期間の予後予測因子であることが報告されている（Ogiya et al., 2017)。本研究でも、内分泌療法感受性別に生存率を比較すると、感受性が低いほど有意に予後不良であった。

ER 陽性乳癌の場合、エストロゲンが ER と結合することにより誘導されるエストロゲンシグナル(genomic action)だけではなく、phosphoinositide

3-kinase(PI3K)/protein kinase B(AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR)シグナル経路、Mitogen-activated protein kinase(MAPK)/c-Jun N-terminal kinase(JNK)シグナル経路のような細胞内のリン酸化経路から ER のリン酸化を引き起こし、エストロゲン非依存性に ER の転写活性を上げる経路がある（non-genomic action）（図 12)。(Iwase H, 2015)。

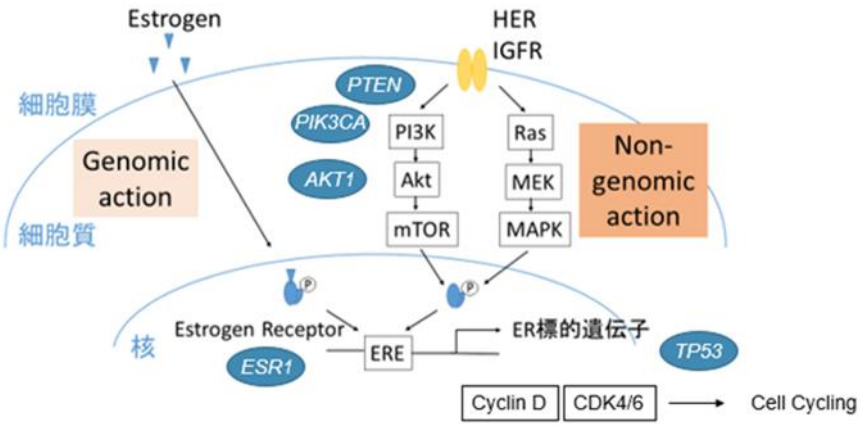


図 13　乳癌増殖因子シグナルと関連遺伝子

PI3K/AKT/mTOR 経路は、細胞増殖、細胞死の制御、遊走や血管新生など多岐に渡る作用に関与している。*PIK3CA* をはじめこの経路に関与する遺伝子として *PTEN*、*PIK3R1*、*AKT1* などがある。*ESR1* は ER をコードする遺伝子であり、変異が生じるとリガンド（エストロゲン）非依存的に ER を活性化できるようになる。これらの遺伝子異常による増殖因子シグナルの活性化は内分泌療法抵抗性の原因の一つとなる（Cavazzoni et al., 2012; Razavi et al., 2018; Mosele et al., 2020)。また、がん抑制遺伝子である *TP53* は、ER 陽性乳癌において内分泌療法抵抗性に関与することが報告されており（Ellis et al., 2012)、原発巣と転移巣いずれにおいても予後不良因子であると報告されている（Meric et al., 2018; Kim et al., 2017)。

本研究でも、ER 陽性乳癌の体細胞遺伝子異常として、*TP53* と同頻度で *PIK3CA* 遺伝子異常を認め（29%)、*AKT1* や *ESR1* 遺伝子がそれに次ぐ頻度で異常を認めた（25%)。これらの遺伝子異常は、いずれも内分泌療法抵抗性の原因となり得る。特に *TP53* 遺伝子異常は内分泌療法感受性 very low や low に多く認められ、また、*TP53* 遺伝子異常がある方が有意に予後不良であった。*TP53* 遺伝子異常は内分泌療法感受性が低いほど多く認められ、それが治療抵抗性や生存率低下に関係していると推測された。しかし、本研究は少数例の検討であることを limitation として考慮しなければならず、また他の遺伝子が関与している可能性も否定できない。

TP53 遺伝子は、癌腫を超えて高頻度に体細胞変異が認められるがん抑制遺伝子であり、核内タンパク質 p53 をコードしている。p53 の主な分子機能は転写活性因子であり、細胞周期調節やアポトーシス誘導、DNA 修復促進や血管新生抑制などの機能を担うと考えられる複数の下流遺伝子の転写を活性化する（Donehower et al., 2019)。多くの腫瘍において p53 シグナル伝達経路が破綻していることから、p53 の活性化を介した新しい治療法が研究されているが、*TP53* 遺伝子異常には多数の変異が存在し、変異した p53 により各機能がどのような機序で調節されているか十分に解明されておらず、治療の実用化には至っていない。現在、p53 シグナル伝達経路における MDM2 阻害薬などいくつかの分子標的治療薬が開発されており、乳癌においても p53 タンパク質を再活性化するいくつかの化合物が抗腫瘍効果を示すことが分かってきている（Duffy et al., 2018)。

本研究では、遺伝子異常と治療がどのように関係しているのか、症例毎に臨床経過を中心に詳細に検討した。原発巣に *TP53* 遺伝子異常を認めた 4 例全て 5 年以内に再発していた。原発巣で *TP53* 遺伝子異常を同定することにより治療抵抗性や予後を予測することができる可能性がある。しかしながら、現在の術後薬物療法（内分泌療法や化学療法）に代わる有効な治療はまだ開発されていない。現在、転移再発乳癌に使用されている CDK4/6 阻害薬を周術期に用いる臨床試験がいくつか進行中であるが、有効であるという結果はまだ得られていない。

一方、転移巣に対して手術あるいは照射といった局所療法が行われた症例は、*TP53* を含む転移巣の遺伝子異常に関わらず長期生存していた。ガイドライン上は遠隔臓器転移に対する外科的切除は勧められていないが、孤立性あるいは少数の転移が同一臓器のみにみられる oligometastatic disease の場合は手術などの局所療法が予後改善に有効であるという報告がある(Pagani et al., 2010)。手術の低侵襲化で転移巣に対する外科的療法も変わってきており、また、薬物療法では治療性に抵抗をもつサブクローンが増大することもあるため（Kleppe et al., 2014)、腫瘍量を減らすという点からも外科的治療が有効になる場合もあると考える。

がん遺伝子パネル検査は、単一遺伝子のみに着目するのではなく、腫瘍全体のもつ性質を評価し治療戦略を考えることが重要と考えられる。臨床研究や治験を含む治療薬剤を見つけるだけではなく、治療抵抗性を示唆する遺伝子異常の情報やゲノム不安定性などの患者個々の腫瘍全体像を掴み治療効果予測を行っていく必要がある。

腫瘍細胞を用いたがん遺伝子パネル検査から、生殖細胞系列変異（二次的所見）が検出される割合は約 2～5%と報告されている（Kalia et al., 2017; Pezo et al., 2018; Dorschner et al., 2013; Amendola et al., 2015; Dewey et al., 2016)。本研究では、pathogenic（病的変異）として *BRCA1*、*BRCA2* と *PTEN* 遺伝子のいずれかが 24 症例中 4 症例（17%）で認められ、4 症例ともに乳癌あるいは卵巣癌または両方の家族歴があった。これらの生殖細胞系列変異を認めた症例では、内分泌療法高感受性 high の症例はなかった。*BRCA1* の生殖細胞系列変異は認めなかったが、*BRCA1* の体細胞遺伝子異常を認めた症例が 1 例存在した。乳癌における *BRCA1*、*BRCA2* の体細胞変異は珍しく、*BRCA1* は 1.55%、*BRCA2* は 1.68%と報告されている(Wang L, 2014)。現在、生殖細胞系列変異として *BRCA1* または *BRCA2* に病的変異のある転移乳癌症例に対し PARP 阻害薬が適応となっているが、体細胞変異については PARP 阻害薬の効果は不明である。

2. 若年乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討

方法

2012 年 5 月 12 日から 2016 年 8 月 31 日の間に研究目的で試料を保管した乳癌患者で、初発時 35 歳未満の 13 症例について、血液および原発巣（非浸潤部、浸潤部)、転移リンパ節の複数箇所から DNA を抽出し、次世代シークエンサー（Next generation sequence; NGS）を用いて網羅的がん遺伝子解析を行った。腫瘍部分では腫瘍細胞含有割合を、正常乳腺（非腫瘍）では乳管上皮細胞の含有割合を評価した。DNA 抽出部位において、ER、PgR、HER2、Ki67 の発現を免疫組織化学法により評価し、遺伝子解析結果と免疫染色結果、さらに診療情報を用いた臨床的特徴をレトロスペクティブに検討した。

尚、この研究は北海道大学の医の倫理委員会で承認されている（医 16-033「若年乳がんにおけるがん遺伝子パネルを用いた遺伝子解析」)。

1. 解析対象選択

手術検体あるいは生検検体を用いて、正常乳腺、非浸潤部（乳管内病変)、浸潤部、転移リンパ節それぞれ DNA 抽出に最適な標本を選定した。対象となる腫瘍細胞もしくは正常乳管上皮細胞の数、割合を十分確保できる標本を選択した。壊死組織や非腫瘍細胞であるリンパ球や脂肪細胞の混在の多い標本はできるだけ避けた。正常乳腺（非腫瘍）は腫瘍からなるべく離れた部位を選んだ。ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織から DNA 抽出用と免疫組織化学法による染色用に 5μm 薄切切片を 5～10 枚作製した。選定した HE 標本上に検討部位（該当病変部もしくは正常部）のマッピングを行い、FFPE 薄切切片からマッピング領域のマイクロダイセクションを行った。

2. DNA 抽出

組織検体から、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) (CLHURC (L)) を用いて DNA を抽出した。一部の検体は QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (Qiagen) を用い、自動核酸抽出装置 QIAsymphony (Qiagen)にて DNA を抽出した。また、血液検体は QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。

3. DNA の濃度測定と品質確認

抽出 DNA は Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度測定を行った。次に Genomic DNA Screen Tape システム (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いて抽出 DNA の品質を確認した。DNA の分解度に応じスコア化した DNA Integrity Number(DIN) 値 3.1 以上の検体を、以降の検討に用いた。

4. NGS ライブラリ調整

5～10 ng/μl に調整したゲノム DNA を 18 μl 準備し、GeneRead DNAseq Panel PCR Kit V2 (Qiagen) と Human Comprehensive Cancer Panel (Qiagen) を用いて調整した。polymerase chain reaction (PCR)法にてターゲット部位を増幅、精製し、精製済み PCR 産物（アンプリコン）を作製した。次に作製したアンプリコンの DNA 末端修復を行い、A 付加、アダプターライゲーションを行い、ライブラリを作製した。精製後、ライブラリの PCR 増幅を行い増幅後ライブラリの作製・精製を行い、NGS ライブラリを作製した。最後に D1000 Screen Tape システム (Agilent) を用いてライブラリ濃度を測定した。

5. シークエンス

MiSeq Reagent Kit V2 (300cycle)(Illumina)を用いて、次世代シークエンサー MiSeq (Illumina)にて 150bp paired-end reads にてシークエンスを行った。特定遺伝子のエクソンを解析するターゲットシークエンスであり、DNA 断片に対して PCR プローブを用いてマルチプレックス PCR を行い、DNA 配列を解析するアンプリコンシークエンス法としている。

6. バイオインフォマティクス解析

「1.転移再発乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討」と同手法にて解析した。

7. 腫瘍細胞含有割合の評価

DNA 抽出時にマッピングした HE 標本から、非浸潤部（乳管内病変）、浸潤部、転移リンパ節では腫瘍細胞含有割合を、正常乳腺では乳管上皮細胞の含有割合を評価した（図 13）。

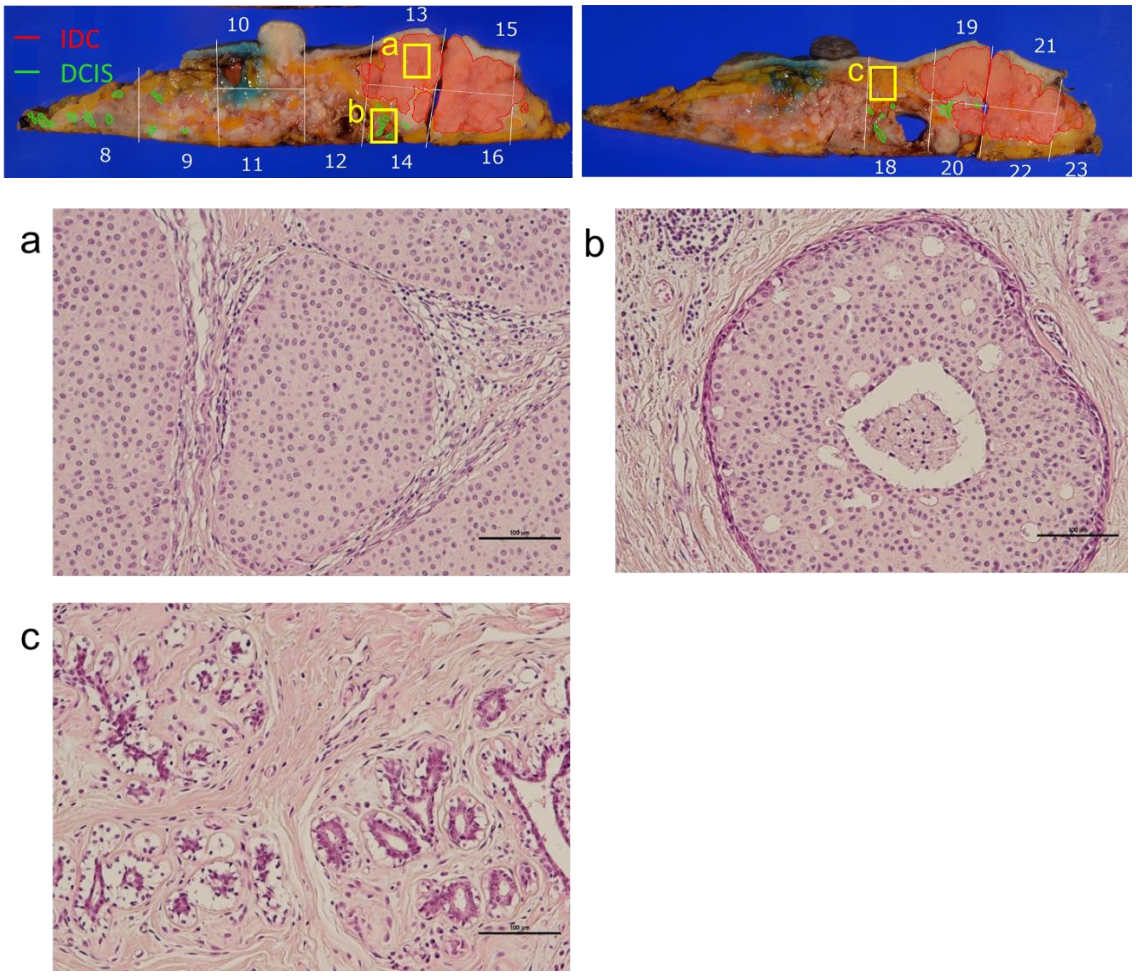


図 14　DNA 抽出部位の腫瘍細胞含有割合と乳管上皮細胞含有割合の評価の一例（症例 2）

（a）浸潤部　腫瘍細胞含有割合 70%、(b) 非浸潤部（乳管内病変）　腫瘍細胞含有割合　60%、(c) 正常乳腺 乳管上皮細胞含有割合　40%（対物 20 倍）。

8. ER、PgR、HER2、Ki67 の発現の検討

DNA を抽出した正常乳腺、非浸潤部 (乳管内病変)、浸潤部、転移リンパ節において、ER、PgR、HER2、Ki67 の発現を免疫組織化学法により評価した。ER、PgR は核染色陽性細胞率 (0-100%) を評価した。HER2 は細胞膜染色をスコア 0、1+、2+、3+で評価した。Ki67 は hot spot の陽性細胞率の labeling index を計測した (表 8、図 14)。

表 8　免疫組織化学法で用いた抗体と評価法

	一次抗体	Species (dilution)	二次抗体	評価法
ER	SP1, Ventana Medical Systems, Tucson, USA	rabbit monoclonal (prediluted)	Ventana iVIEW DAB Detection Kit	percentage of cells showing positive nuclear staining
PgR	1E2, Ventana Medical Systems, Tucson, USA	rabbit monoclonal (prediluted)	Ventana iVIEW DAB Detection Kit	percentage of cells showing positive nuclear staining
HER2	4B5, Ventana Medical Systems, Tucson, USA	rabbit monoclonal (prediluted)	Ventana iVIEW DAB Detection Kit	0, 1+, 2+, 3+ (スコア)
Ki67	MIB-1, DAKO, Glostrup, Denmark	mouse monoclonal (1:200)	Dako EnVison FLEX system	labeling index

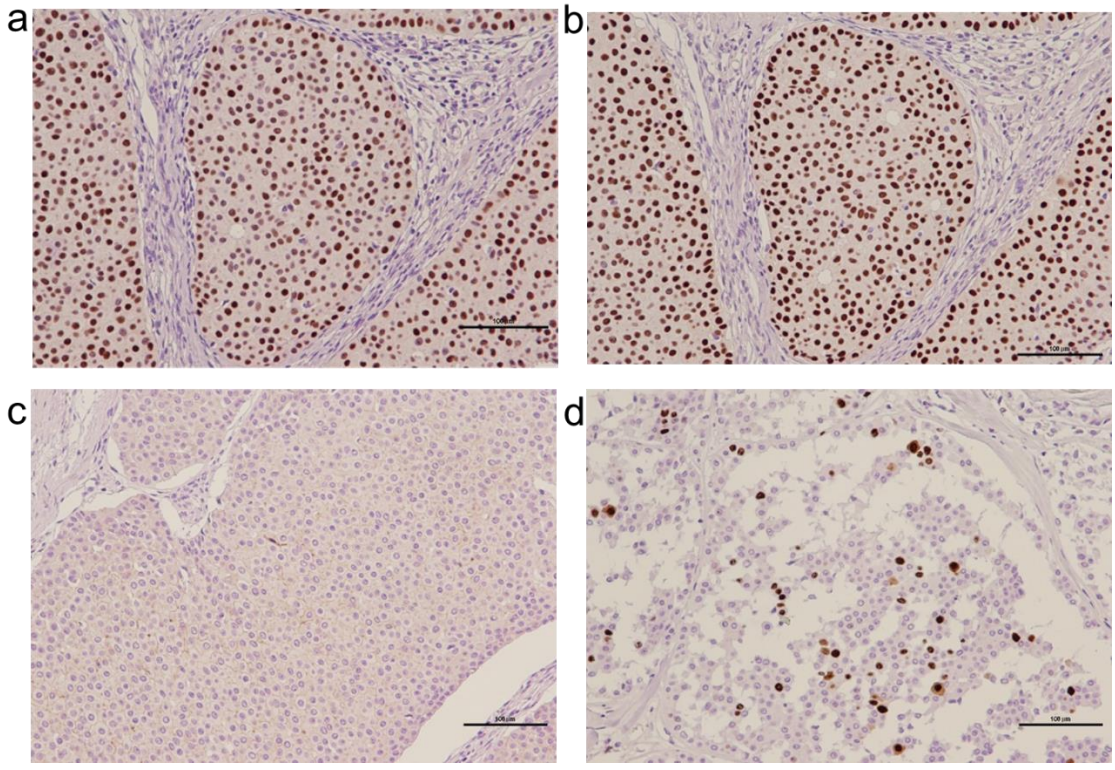


図 15　DNA 抽出部位の免疫染色の一例 (症例 2　浸潤部)

(a) ER 90%、(b)PgR 90%、(c) HER2 1+、(d) Ki67 10% (対物 20 倍)。

結果

1. 患者背景

若年乳癌 13 症例の患者背景を表 9 に示す。初発時年齢は 25～34 歳（中央値 32 歳)。既往歴は、乳癌または卵巣癌が 2 例、その他の癌が 2 例、癌以外が 8 例であった(重複含む)。家族歴は、乳癌または卵巣癌あるいは両方が 6 例、それ以外の癌が 6 例、全く家族歴がない症例は 4 例であった(重複含む)。臨床病期は、Stage 0 が 2 例（15.4%)、ⅡA が 8 例（61.5%)、ⅡB が 3 例（23.1%）であった。組織型は浸潤性乳管癌が 9 例（69.2%)、粘液癌が 3 例（23.1%)、化生癌が 1 例（7.7%）であった。腋窩リンパ節転移ありが 3 例（23.1%)、リンパ節転移なしが 10 例（76.9%）であった。サブタイプは ER 陽性 HER2 陰性が 11 例（84.6%)、ER 陽性 HER2 陽性と ER 陰性 HER2 陰性（トリプルネガティブ）がそれぞれ 1 例（7.7%）ずつであった。ER 陽性 HER2 陰性乳癌 11 症例で、周術期薬物療法が内分泌療法のみは 4 例（36.3%）で、7 例（63.6%）が化学療法追加あるいは化学療法のみを行っていた。13 症例中 3 例（23.1%）が再発しており、DFS はそれぞれ 6 ヶ月、8 ヶ月、41 ヶ月であった。再発した 3 例中 2 例は再発治療中、1 例は死亡された。

表 9　患者背景　（若年乳癌 13 症例）

発症年齢（歳）	中央値	32
	範囲	25-34
既往歴 （重複あり）	乳癌または卵巣癌	2
	その他の癌	2
	癌以外	8
	なし	3
家族歴 （重複あり）	乳癌または卵巣癌あるいは両方	6
	以下の家族歴*が3つ以上	0
	上記以外(家族歴が2つ以下、その他の癌)	6
	なし	4
臨床病期	0	2（15.4%）
	Ⅰ	0（0%）
	ⅡA	8（61.5%）
	ⅡB	3（23.1%）
組織型	浸潤性乳管癌	9（69.2%）
	粘液癌	3（23.1%）
	化生癌	1（7.7%）
腋窩リンパ節転移	あり	3（23.1%）
	なし	10（76.9%）
サブタイプ	ER 陽性 HER2 陰性	11（84.6%）
	ER 陽性 HER2 陽性	1（7.7%）
	ER 陰性 HER2 陰性（トリプルネガティブ）	1（7.7%）
術前薬物療法	化学療法	3（23.1%）
	抗HER2療法＋化学療法	1（7.7%）
術後薬物療法	内分泌療法	7（53.8%）
	内分泌療法＋化学療法	3（23.1%）
	抗HER2療法＋内分泌療法	1（7.7%）
	化学療法	2（15.4%）
再発の有無	あり	3（23.1%）
	なし	10（76.9%）
DFS（月）	中央値	8
	範囲	6 - 41

* 乳癌、膵癌、前立腺癌、黒色腫、肉腫、副腎皮質癌、脳腫瘍、白血病、びまん性胃癌、大腸癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、腎癌、皮膚症状、かつ/または巨頭症、消化管の過誤腫性ポリープ

2. DNA 抽出結果と病理組織学的所見

標本選定の時点で腫瘍量が少なすぎて DNA 抽出を断念した 4 検体と、DNA を抽出したが DIN 値が低く品質的に脱落した 3 検体を除く、組織検体 36 検体と、血液検体 13 検体を合わせて合計 49 検体でシークエンス結果が得られた。DIN 値が低く解析できなかった症例は FFPE ブロック作製から 4、5 年経過したものであり、FFPE ブロックの長期保管により核酸品質が低下したことが原因と考えられた。また、同一症例内（同一検体内）にも関わらず、部位により DIN 値に差が認められた。乳癌組織のホルマリン固定は、通常、腫瘍部分に割を入れるため、部位によってホルマリンの浸透が変わり、固定状況が異なったため、DIN 値に差が生じた可能性がある。

全 13 症例について、手術時（生検時）の病理組織学的所見と、正常乳腺、非浸潤部（乳管内病変）、浸潤部、転移リンパ節のうち DNA が抽出できた 36 検体における ER、PgR、HER2、Ki67 の発現をまとめた（表 10）。13 症例のうち、3 例が粘液癌、1 例が化生癌という特殊型であった。術前の病期とは異なり、全ての症例が 5 ㎜以上の浸潤癌であった。粘液癌を除く 10 症例中 6 症例が Grade 2 または 3 であり、13 症例中 3 症例が腋窩リンパ節転移陽性であった。全ての症例で非浸潤部と浸潤部、転移リンパ節のサブタイプ（ER、PgR、HER2 の陽陰性）は一致していた。正常乳腺は全例 ER 陽性 HER2 陰性であった。

表10　病理組織学的所見と DNA抽出部位の免疫染色結果

症例 No.	組織型	浸潤径 (mm)	核グレード	組織学的治療効果	リンパ節転移	免疫染色															
						正常乳腺				非浸潤部				浸潤部				転移リンパ節 (n = 3)			
						ER (%)	PgR (%)	HER2	Ki67 (%)	ER (%)	PgR (%)	HER2	Ki67 (%)	ER (%)	PgR (%)	HER2	Ki67 (%)	ER (%)	PgR (%)	HER2	Ki67 (%)
1	浸潤性乳管癌	25	2	−	あり 1(14mm)/1	10	10	0	5	90	90	0	5	90	90	0	25	95	50	1＋	30
2	浸潤性乳管癌	57	3	−	あり 1(0.3mm)/1	10	60	0	10	90	90	1+	15	90	90	1+	10	×	×	×	×
3	浸潤性乳管癌（生検）	−	−	−	−	−	−	−	−	95	0	3+	30	100	0	3+	30	−	−	−	−
	浸潤性乳管癌	16	−	2a	なし 0/1	20	10	0	5	−	−	−	−	>90	2	2+	1.5	−	−	−	−
4	浸潤性乳管癌	28	3	−	なし 0/2	20	5	0	10	90	20	1+	30	70	20	1+	60	−	−	−	−
5	浸潤性乳管癌	13	1	−	なし 0/1	40	40	0	10	100	70	1+	20	100	80	2+	18	−	−	−	−
6	浸潤性乳管癌	16	3	−	なし 0/1	95	95	0	20	0	0	1+	60	<1	0	1+	99	−	−	−	−
7	浸潤性乳管癌	21	2	−	なし 0/3	10	5>	0	5	90	90	0	5	90	80	1+	29	−	−	−	−
8	化生癌	47	−	0	なし 0/23	×	×	×	×	×	×	×	×	10	0	0	70	−	−	−	−
9	浸潤性乳管癌	28	2	−	あり 7/14	30	30	0	2	80	50	2+	20	80	<1	1+	40	95	10	0	30
10	浸潤性乳管癌	19	−	0	なし 0/1	80	10	0	1-2	×	×	×	×	100	90	0	10	−	−	−	−
11	粘液癌	26	−	−	なし 0/3	40	40	0	10	95	90	0	10	95	90	1+	5	−	−	−	−
12	粘液癌	34	−	0	なし 0/1	×	×	×	×	×	×	×	×	90	70	0	15	−	−	−	−
13	粘液癌	60	−	−	なし 0/1	30	30	0	5	×	×	×	×	95	95	0	10	−	−	−	−

×はシークエンスまで行うことができなかった症例
(標本選定の時点で腫瘍量が少なすぎてDNA抽出を断念した症例、またはDNAを抽出したがDIN値が低く品質的に脱落した症例)。

3．遺伝子解析結果

3-1．体細胞遺伝子異常

正常乳腺、非浸潤部、浸潤部、転移リンパ節における細胞含有割合と体細胞遺伝子異常、変異率を検討した（表 11)。13 症例中 5 症例（症例 9～13）は体細胞遺伝子異常が検出されなかった。いずれかの部位で遺伝子異常を認めた 8 症例のうち、3 症例（症例 1～３）は非浸潤部と浸潤部で共通する遺伝子異常を認め、4 症例（症例 4～7）は各部位で遺伝子異常が異なっていた。正常乳腺で遺伝子異常を認めた 3 症例（症例 1、3、6）は、非浸潤部、浸潤部では正常乳腺とは全く異なる遺伝子異常が認められた。

症例 1 は非浸潤部、浸潤部、転移リンパ節に共通して *TP53* の遺伝子異常を認め、それぞれ腫瘍細胞含有割合に対する変異率も矛盾しない結果であった。症例 2 は、非浸潤部と浸潤部に共通して *PTEN* と *GATA3* の遺伝子異常を認めたが、非浸潤部の *GATA3* 遺伝子異常は腫瘍細胞含有割合に比べて変異率が低かった。症例 3 は術前化学療法の前後の組織で検討したが、治療前に見られた遺伝子異常 *RET*、*MDM2*、*CDK12*、*ERBB2*、*SPOP*、*BRIP1*、*CD79B* のうち、治療後は *RET*、*SPOP*、*BRIP1*、*CD79B* が認められず、新たに *APC* の遺伝子異常を認めた。症例 4、5、6、7 は正常乳腺、非浸潤部、浸潤部で、それぞれ異なる遺伝子異常を認めた。

表 11　細胞含有割合と体細胞遺伝子異常（変異率）

症例 No.	正常乳腺	非浸潤部	浸潤部	転移リンパ節
	乳管上皮細胞含有割合 遺伝子異常（変異率）	腫瘍細胞含有割合 遺伝子異常（変異率）	腫瘍細胞含有割合 遺伝子異常（変異率）	腫瘍細胞含有割合 遺伝子異常（変異率）
1	20% *ERBB2* p.W169*（5.26%）	50% *TP53* p.R213L（16.79%）	40% *TP53* p.R213L（31.41%）	40% *TP53* p.R213L（5.73%）
2	40%	60% *PTEN* p.E18*（21.52%） *GATA3* p.?（7.2%）	70% *PTEN* p.E18*（27.9%） *GATA3* p.?（28.48%）	×
3	−	50%（術前化学療法前） *RET* p.V906M（12.61%） *MDM2* amp *CDK12* amp *ERBB2* amp *SPOP* amp *BRIP1* amp *CD79B* amp	40%（術前化学療法前） *RET* p.V906M（13.47%） *MDM2* amp *CDK12* amp *ERBB2* amp *SPOP* amp *BRIP1* amp *CD79B* amp	−
	30% *BRCA2* p.R1512H（6.96%）	−	40%（術前化学療法後） *APC* p.S2766*（5.93%） *MDM2* amp *CDK12* amp *ERBB2* amp	−
4	40%	50% *PIK3CA* p.E81K（19.12%）	80% *PTEN* p.R130G（40.11%）	−
5	40%	60% *MAP2K4* del	50% *MYC* amp *CDK12* amp	−
6	30% *TP53* p.P72S（4.19%） *PPP2R1A* p.S256F（16.39%）	10%	20% *BRCA2* p.E2198*（13.54%）	−
7	30%	30%	40% *TP53* p.T230S（33.94%） *DNMT3A* pR320Q（4.4%）	−
8	×	×	80%（術前化学療法後） *PBRM1* p.?（8.07%） *PIK3R1* del *CDKN2A* del *CRLF2* del *ZRSR2* del	−
9	20%	50%	70%	50%
10	40%	×	50%（術前化学療法後）	−
11	20%	30%	60-70%	−
12	×	×	80%（術前化学療法後）	−
13	20%	×	70%	−

3-2. 生殖細胞系列変異

生殖細胞系列変異は Clinvar による評価で分類し、各症例の正常乳腺から非浸潤部、浸潤部、転移リンパ節における変異率を検討した（表 12）。病的変異は *PTEN*（症例 2）、*BRCA2*（症例 9）の 2 症例で認められ、Uncertain significance：VUS（病的意義不明）を *RET*（症例 5）、*TEAT*（症例 6）、*CHEK2*（症例 10）の 3 症例で認めた。生殖細胞系列変異は、検査した部位（正常乳腺、非浸潤部、浸潤部、転移リンパ節）全てにおいて共通して認められ、変異率 50%前後（中央値 50.03%,18.43～87.06%）であった。

表12　生殖細胞系列変異と変異率

症例 NO.	生殖細胞系列変異　(ClinVarでの評価)					変異率 (%)			
	Benign/ Likely benign	Uncertain significance	Pathogenic/ Likely pathogenic	その他の評価	評価なし	正常乳腺	非浸潤部	浸潤部	転移リンパ節
1					*KMT2D* p.P2938L	61.11	58.13	62.83	63.04
					FLT3 p.T382M	50.22	48.36	50.57	49.94
2			*PTEN* p.E242*			50.94	52.54	53.72	×
3					*ASXL1* p.E1033V	−	49.02 (治療前)	47.3 (治療前)	−
						51.43	−	47.6 (治療後)	−
4	*BRCA2* p.I1929V					50.17	33.88	18.53	−
5		*RET* p.E459K				48.41	51.59	47.05	−
				CDH1 p.E880K*		46.95	48.24	50.93	−
6		*TERT* p.R951Q				47.28	50.65	49.89	−
					CDK12 p.L1383I	50	40.85	57.97	−
7					*SETD2* p.E639K	50.81	41.79	40.48	−
				PALB2 p.Q460R*		50.78	49.75	49.88	−
8	*SETD2* p.M761I					×	×	87.06	−
					SLC7A8 p.R181Q	×	×	48.54	−
					EP300 p.M556V	×	×	44.59	−
9			*BRCA2* p.R2336H			51.38	67.01	61.46	53.85
10					*ERBB4* p.G319R	53.21	×	47.47	−
		CHEK2 p.H414Y				44.55	×	53.09	−
11				*FUBP1* p.T601A†		50.06	55.04	51	−
					FLT3 p.T820N	48.55	48.49	47.04	−
				TP53 p.E11Q*		49.48	49.78	50.58	−
12					*BRCA2* p.L1908V	×	×	49.74	−
	ATRX p.?					×	×	67.82	−
13							×		−

* Conflicting interpretations of pathogenicity

† not provided

生殖細胞系列変異（病的変異または VUS のみ）と家族歴、既往歴を詳細に検討した（表 13）。*PTEN* 遺伝子に病的変異を認めた症例（症例 2）は、既に Cowden 病の診断を受けていた。*BRCA2* 遺伝子に病的変異を認めた症例（症例 9）は、乳癌や卵巣癌の家族歴はなかったが、既往歴と家族歴に甲状腺癌があった。VUS を認めた 3 症例（症例 5、6、10）は、乳癌あるいは卵巣癌の家族歴があった。13 症例中 1 症例（症例 13）のみ、病的変異や VUS 以外の評価も含め生殖細胞系列変異を認めず、既往歴や家族歴も認めなかった。

表 13　生殖細胞系列変異と既往歴、家族歴

症例 No.	発症年齢	Pathogenic（病的変異）	Uncertain significance（病的意義不明）	既往歴	家族歴	
					乳癌または卵巣癌あるいは両方	その他の癌
1	33			卵巣腫瘍（良性）		
2	33	*PTEN* p.E242*		左乳癌、 甲状腺腺腫、 子宮体癌（Cowden病）	母方叔母：乳癌	母方祖父：膀胱癌、
3	33			腰椎ヘルニア、 不育症		祖母：胃癌、膵臓癌
4	30			神経線維腫症Ⅰ型	祖母：乳癌、 大叔母：乳癌	祖母：甲状腺癌、 母方叔父：骨髄腫
5	33		*RET* p.E459K		祖母：卵巣癌	
6	32		*TERT* p.R951Q	左乳癌	曾祖母：乳癌	
7	31			子宮内膜症		母：胃癌、 従兄弟：胃癌、 父方祖母・母方祖父：不明癌
8	32			部分肺静脈還流異常		
9	32	*BRCA2* p.R2336H		甲状腺癌		父方祖母：胃癌、 母方祖父：肺癌、 母方祖母：甲状腺癌
10	25		*CHEK2* p.H414Y	右成熟嚢胞奇形腫	母方叔母：乳癌、 母方従姉妹：乳癌	
11	33			全身性エリテマトーデス、 肺高血圧症、 間質性肺炎、 卵巣機能不全		
12	35				父方従姉妹：乳癌	叔父：大腸癌
13	32					

3-3．乳癌の進展と遺伝子異常

正常乳腺、非浸潤部、浸潤部、転移リンパ節（症例 1、2 のみ）でシークエンスが施行でき、かつ 1 カ所以上で遺伝子異常が検出された 7 症例について、正常乳腺、非浸潤部、浸潤部、転移リンパ節における遺伝子異常の変化を示す（図 15）。2 箇所以上で共通した遺伝子異常を認めた症例や、部位毎に遺伝子異常が全く異なる症例など、遺伝子異常の変化は全ての症例で異なっていた。

生殖細胞系列変異は正常乳腺から転移リンパ節まで全ての部位で認められた。病的変異と評価されたものは 7 症例中 *PTEN*（症例 2）のみであった。

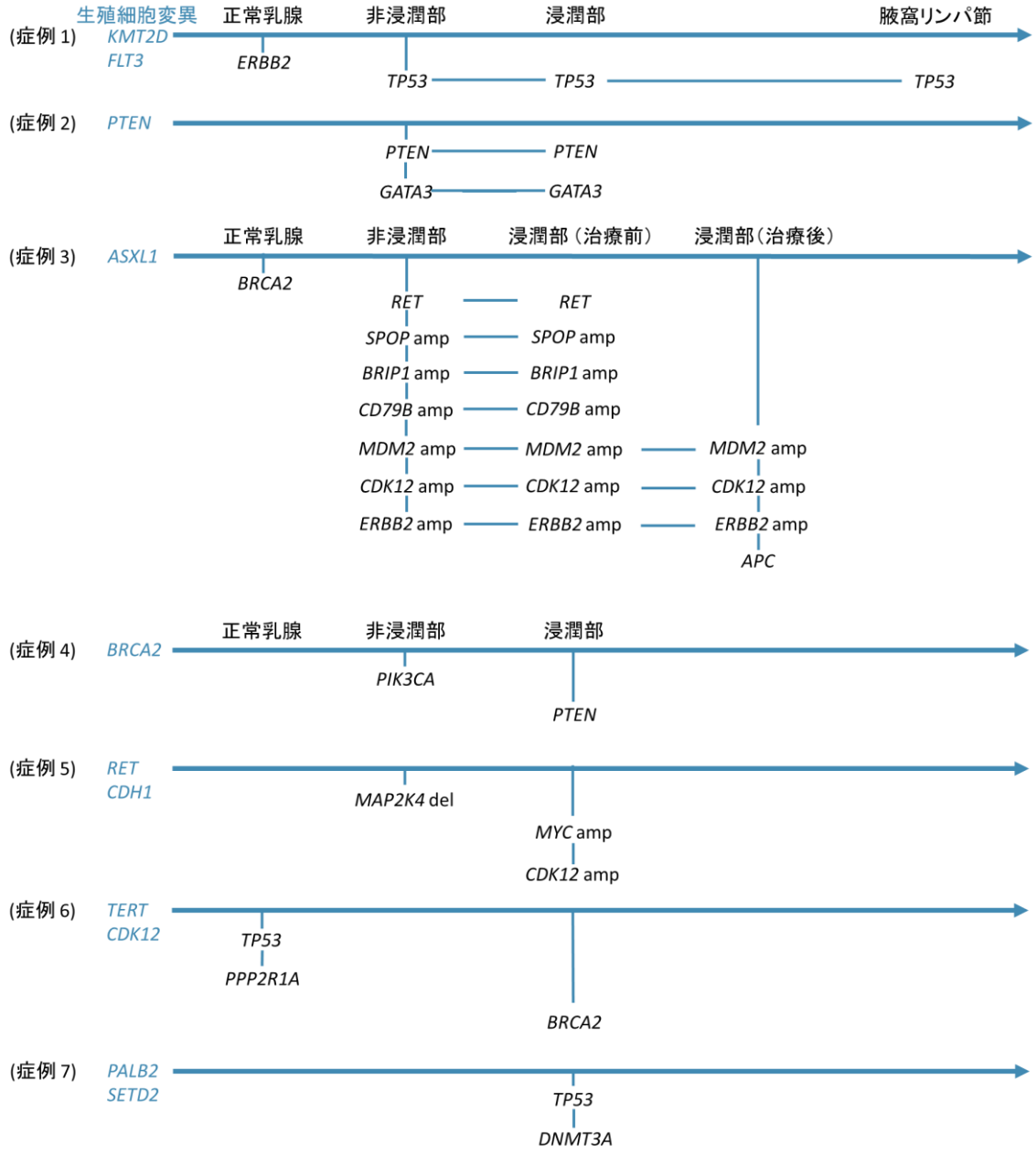


図 16　乳癌の進展と遺伝子異常

4. 若年乳癌と非若年乳癌の遺伝子解析結果の比較

最後に、若年乳癌と非若年乳癌における遺伝子異常を比較検討した（表14)。若年乳癌は本検討での原発巣（浸潤部）における遺伝子異常を表記した。非若年乳癌は「1. 転移再発乳癌におけるがん遺伝子パネルを用いた検討」の 13 症例（35 歳以上、原発巣）を用いた。

DNA 抽出から遺伝子解析まで同じ条件で行われており、また DNA 品質に影響する検体の保管期間も、非若年と若年で平均 52.6 ヶ月と 49.8 ヶ月と変わらなかった。しかしながら、遺伝子異常の数や種類は両者で大きく異なっていた。生殖細胞系列変異については、病的変異は非若年で *BRCA1*、*BRCA2*、若年で *PTEN*、*BRCA2* と、*BRCA2* が共通して認められ、VUS は非若年で *APC*、*NF1*、*EZH2*、*MSH2*、若年で *RET*、*TERT*、*CHEK2* とそれぞれ異なっていた。体細胞遺伝子異常については、非若年で *TP53*、*PIK3CA*、*AKT1*、*ESR1*、*MYC* などを多く認めたが、若年では *TP53* 以外は全て非若年とは異なる遺伝子異常を認めた。また、非若年と若年で、遺伝子異常の総数はそれぞれ 40 遺伝子と 18 遺伝子であり若年の方が少なかった。

表 14　若年乳癌と非若年乳癌における遺伝子異常の比較

症例 No.	検体保存期間（月）	生殖細胞系列変異	体細胞遺伝子異常						
非若年乳癌									
1	39	*APC**	*TP53*	*TERT*	*ESR1* amp	*MYC* amo	*CDK4* amp	*ECT2L* amp	*TNFAIP3* amp
2	64	*NF1**	*PIK3CA*	*TP53*	*ESR1*	*BRAF*	*ATM*	*MYC* amp	*GNAS* amp
3	26	*BRCA1*	*TP53*	*MYC* amp	*CDKN2A* amp	*JAK2* amp	*PTEN* del	*BTK* del	*FAS* del
4	113	-	*PIK3CA*	*ARID1A*	*FANCA*	*SF3B1*	*CSF1R*		
5	143	*EZH2**	*PIK3R1*	*AKT1*	*PTEN*				
6	33		*PIK3CA*	*TP53*					
7	56	*MSH2**	*AKT1*	*ESR1*					
8	69		*CRLF2*	*SMO* del					
9	88	-	*PIK3CA*	*KIT*					
10	5	-	*PIK3CA*						
11	46	*BRCA2*	*DICER1*						
12	35	-	*RB1*						
13	18								
若年乳癌									
1	59		*PBRM1*	*PIK3R1* del	*CDKN2A* del	*CRLF2* del	*ZRSR2* del		
2	59		*APC*	*MDM2* amp	*CDK12* amp	*ERBB2* amp			
3	41	*RET**	*MYC* amp	*CDK12*					
4	46	*PTEN*	*PTEN*	*GATA3*					
5	40		*TP53*	*DNMT3A*					
6	74	*TERT**	*BRCA2*						
7	35		*PTEN*						
8	38		*TP53*						
9	46	*CHEK2**							
10	62								
11	60								
12	37	*BRCA2*							
13	50								

＊ Uncertain significance:VUS（病的意義不明）
- は生殖細胞系列の遺伝子検査を行っていない症例

考察

乳癌は進展に伴い個々の細胞毎に遺伝子異常が積み重なりサブクローンが形成されるが、サブクローン構築は症例毎に異なる。Yates らの報告では、早期乳癌 50 症例それぞれの同一腫瘍の複数部位から得た 303 サンプルを全ゲノム解析し、変異のパターンから遺伝子系統樹を作成した。*PIK3CA*、*TP53*、*PTEN*、*BRCA2*、*MYC* など共通する遺伝子異常もあったが、全ての症例で系統樹は異なっていた（Yates et al., 2015）。1 つの腫瘍内で癌細胞ごとに異なる遺伝子異常が生じてサブクローンが形成され（heterogeneity）、薬物療法の反応性もクローンごとに異なり、抵抗性を獲得したクローンが増殖すると考えられている（Kleppe et al., 2014; Kim et al., 2018）。

乳癌の進展とクローン変化については、乳腺組織内の異なる細胞がそれぞれ独立して、乳管内病変（非浸潤癌）および浸潤性のサブクローンを発生させ、並行して進化するという報告や、乳管内で形成された複数のサブクローンが乳管を出て、隣接する組織に移動して浸潤性の癌を確立するという報告など、いくつかの報告があるが（Yates et al., 2015； Casasent et al., 2018）、どのようなクローン進化を経て乳癌が進展していくのかについては未だ明らかになっていない。

本研究では、非浸潤部（乳管内病変）、浸潤部、転移リンパ節の各部位における腫瘍含有割合と変異率から、遺伝子異常がどのように乳癌の進展に関わったかを推測した（図 16）。異常のあった遺伝子の種類や遺伝子異常の変化は、全ての症例で異なっており、進展の過程において各部位でクローンが共通する症例と全く異なる症例が存在した。

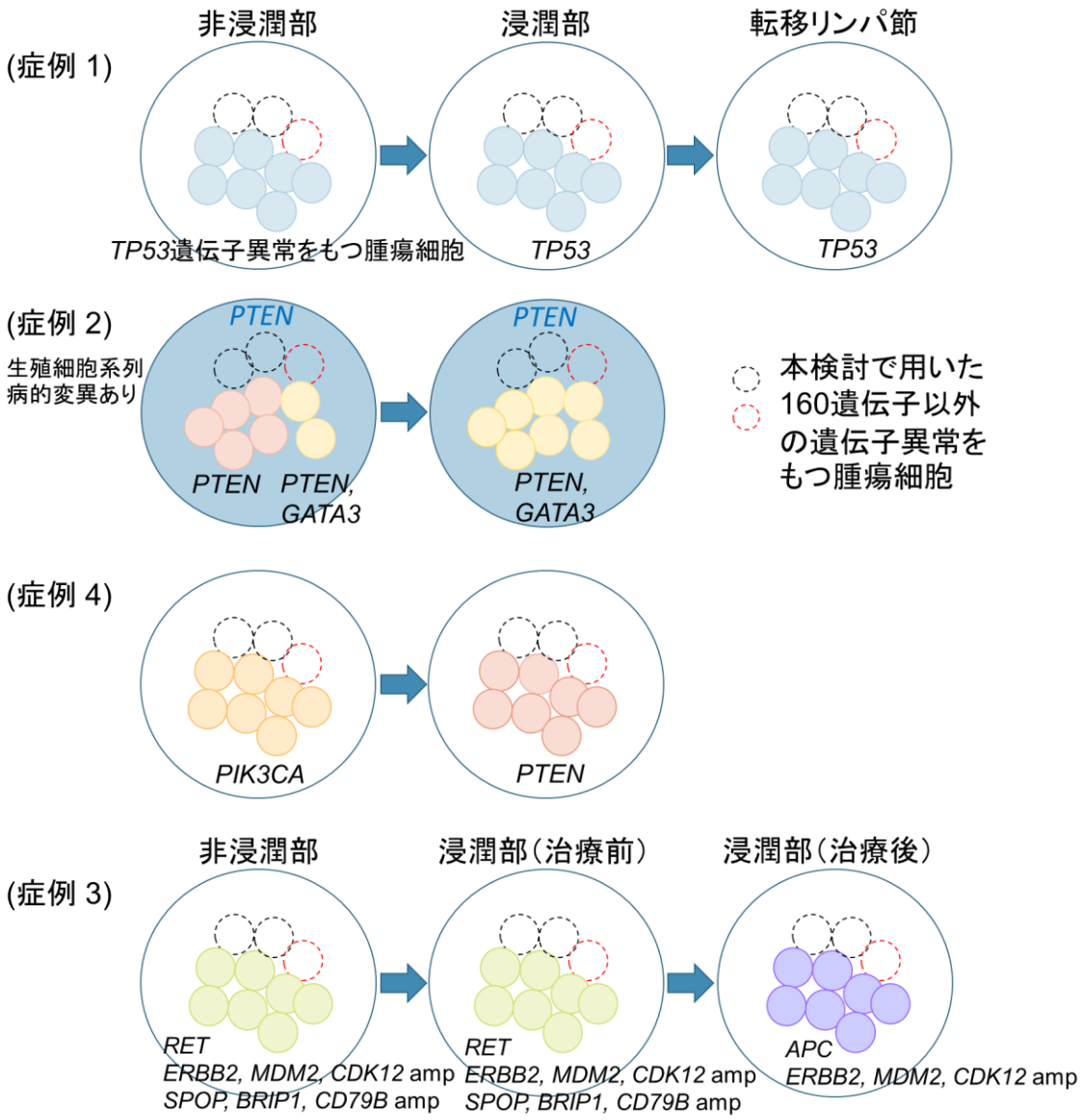


図 17　乳癌の進展に伴う遺伝子異常とクローン変化

症例 1 は、非浸潤部、浸潤部、転移リンパ節の腫瘍細胞全てに *TP53* の体細胞遺伝子異常が認められたことから、*TP53* はドライバー遺伝子と考えられた。*TP53* 遺伝子異常を持つ乳管内病変（非浸潤癌）のクローンから浸潤し、リンパ節転移に至ったと推測される。

症例 2 は、*PTEN* 遺伝子の生殖細胞系列変異を認めた。*GATA3* 遺伝子異常を非浸潤部と浸潤部で認めたが、非浸潤部では変異率 7.5%と低かった。浸潤部では全ての腫瘍細胞に *GATA3* の遺伝子異常を認めたことから、乳管内病変（非浸潤癌）の時は、*GATA3* 遺伝子異常はあるサブクローンにのみ存在したが、浸潤していく際に有利なクローンとなった可能性が考えられた。

症例 4 のように非浸潤部と浸潤部で検出した遺伝子異常が全く異なる場合は、今回検討した非浸潤部と異なる箇所に存在する全く違う遺伝子異常をもつクローンが浸潤したと考えられる。連続した病変であっても細胞毎に異なるクローンが存在した可能性が推測された。ドライバー遺伝子は特定できなかったが、検査していない別の遺伝子がドライバー遺伝子である可能性が考えられた。

症例 3 では、化学療法の前後の乳癌細胞で遺伝子異常の消失や獲得が確認できた。治療後に消失した遺伝子異常をもつクローンは治療に感受性のあったクローンであり、治療後も消失しなかった遺伝子異常をもつクローンは治療に耐性があったクローンであると考えられる。さらに治療により新たな遺伝子異常が獲得され、耐性をもつクローンが新たに生じた可能性がある。

本研究は少数例の検討であり、また腫瘍関連遺伝子とされている 160 遺伝子のみを調べた検討であることを limitation として考慮しなければならず、クローン変化に影響を与える因子を明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

若年乳癌は遺伝的要因の関与が推測されたが、非若年乳癌と比べて生殖細胞系列変異に大きな違いはなく、また、体細胞遺伝子異常についても、同じ条件で検査したにも関わらず、若年乳癌の方が遺伝子異常の数が少なく、一般的な乳癌関連遺伝子とは異なる遺伝子異常を多く認めた。本研究は 160 遺伝子のみを調べた検討であるため、特に若年乳癌では、今回検討した 160 遺伝子以外の別の遺伝子異常が癌の発生や進展に関わっている可能性がある。また、乳癌の発生や進展には、遺伝子そのもの異常だけではなく、DNA のメチル化やヒストン修飾、ヒストンバリアントなどエピゲンムの異常も関与していると推測される（Nussbaum et al., 2017)。乳癌進展に伴う遺伝子異常とクローン変化をより詳細に検討するには、検査する遺伝子や検査部位を増やすなどの検証が必要と考える。

結論

① 本研究全体から得られた新知見

・ER 陽性　HER2 陰性乳癌において、*TP53* 遺伝子異常は内分泌療法低感受性と生存率低下に関与していた。また、原発巣の *TP53* 遺伝子異常は早期再発の予測因子であると考えられた。

・転移巣の遺伝子異常に関わらず、転移巣に対して局所療法が行われた症例は長期生存していた。

・正常乳腺、非浸潤部、浸潤部で異常のあった遺伝子の種類や遺伝子異常の変化は、全ての症例で異なっており、進展の過程において各部位でクローンが共通する症例と全く異なる症例が存在した。

・若年乳癌は、規定のがん遺伝子パネル検査では、非若年乳癌よりも遺伝子異常の数が少なく、一般的な乳癌関連遺伝子とは異なる遺伝子異常を多く認めた。

② 新知見の意義

ER 陽性 HER2 陰性乳癌において、*TP53* 遺伝子異常は治療選択のバイオマーカーや予後予測因子になり得ると考えられた。

乳癌の進展に伴う遺伝子異常は、個々の症例で全く異なっていた。診療目的に合わせて、検査する遺伝子や検査部位、検査時期を選択することにより、遺伝子検査をより有効に活用できる可能性がある。また、若年乳癌は非若年乳癌とは異なる遺伝子が関与している可能性があり、若年乳癌を対象としたがん遺伝子パネルの必要性が示唆された。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

がん遺伝子パネル検査の臨床的有用性を確立するためには、さらなるデータの蓄積と臨床的所見を合わせた検討が必要である。また、乳癌進展に伴う遺伝子異常とクローン変化をより詳細に検討するには、検査する遺伝子や検査部位を増やすなどの検証が必要と考える。

④ 今後の課題

がん遺伝子パネル検査結果を治療に反映させるためには、治療経過に伴う経時的変化を見る必要があり、侵襲性の低いリキッドバイオプシーの活用も有効と考える。腫瘍組織を用いた既存の遺伝子検査との使い分けなどさらなる検討が必要である。

謝辞

本研究の機会を与えていただき、御指導を賜りました北海道大学　乳腺外科　山下啓子教授に深謝致します。また、適切な助言と直接の御指導を賜りました臨床研究開発センター　生体試料管理室　畑中佳奈子先生、臨床研究開発センター　天野虎次先生、ゲノム・コンパニオン診断研究部門　畑中豊先生に心より御礼を申し上げます。 最後に、本研究を支えてくださった、乳腺外科教室、生体試料管理室、ならびにがん遺伝子診断部、臨床遺伝子診療部の全ての皆様に重ねて御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Amendola, L.M., Dorschner, M.O., Robertson, P.D., Salama, J.S., Hart, R., Shirts, B.H., Murray, M.L., Tokita, M.J., Gallego, C.J., Kim, D.S., *et al.* (2015). Actionable exomic incidental findings in 6503 participants: challenges of variant classification. Genome Research *25*, 305-315.

Araki, K., and Miyoshi, Y. (2018). Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. Breast Cancer *25*, 392-401.

Brufsky, A.M., and Dickler, M.N. (2018). Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Exploiting Signaling Pathways Implicated in Endocrine Resistance. Oncologist *23*, 528-539.

Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature *490*, 61-70.

Cardoso, F., Costa, A., Norton, L., Senkus, E., Aapro, M., Andre, F., Barrios, C.H., Bergh, J., Biganzoli, L., Blackwell, K.L., *et al.* (2014). ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2). Annals of Oncology *25*, 1871-1888.

Cardoso, F., Costa, A., Senkus, E., Aapro, M., Andre, F., Barrios, C.H., Bergh, J., Bhattacharyya, G., Biganzoli, L., Cardoso, M.J., *et al.* (2017). 3rd ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). Ann Oncol *28*, 3111.

Casasent, A.K., Schalck, A., Gao, R., Sei, E., Long, A., Pangburn, W., Casasent, T., Meric-Bernstam, F., Edgerton, M.E., and Navin, N.E. (2018). Multiclonal Invasion in Breast Tumors Identified by Topographic Single Cell Sequencing. Cell *172*, 205-217 e212.

Cavazzoni, A., Bonelli, M.A., Fumarola, C., La Monica, S., Airoud, K., Bertoni, R., Alfieri, R.R., Galetti, M., Tramonti, S., Galvani, E., *et al.* (2012). Overcoming acquired resistance to letrozole by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer cell clones. Cancer Lett *323*, 77-87.

Dewey, F.E., Murray, M.F., Overton, J.D., Habegger, L., Leader, J.B., Fetterolf, S.N., O'Dushlaine, C., Van Hout, C.V., Staples, J., Gonzaga-Jauregui, C., *et al.* (2016). Distribution and clinical impact of functional variants in 50,726 whole-exome sequences from the DiscovEHR study. Science *354*.

Donehower, L.A., Soussi, T., Korkut, A., Liu, Y.X., Schultz, A., Cardenas, M., Li, X.B., Babur, O., Hsu, T.K., Lichtarge, O., *et al.* (2019). Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas (vol 28, pg 1370, 2019). Cell Rep *28*, 3010-3010.

Dorschner, M.O., Amendola, L.M., Turner, E.H., Robertson, P.D., Shirts, B.H., Gallego, C.J., Bennett, R.L., Jones, K.L., Tokita, M.J., Bennett, J.T., *et al.* (2013). Actionable, pathogenic incidental findings in 1,000 participants' exomes. Am J Hum Genet *93*, 631-640.

Duffy, M.J., Synnott, N.C., and Crown, J. (2018). Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. Breast Cancer Res Treat *170*, 213-219.

Ellis, M.J., Ding, L., Shen, D., Luo, J., Suman, V.J., Wallis, J.W., Van Tine, B.A., Hoog, J., Goiffon, R.J., Goldstein, T.C., *et al.* (2012). Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. Nature *486*, 353-360.

Hayashi, H., Tanishima, S., Fujii, K., Mori, R., Okamura, Y., Yanagita, E., Matsuoka, R., Amano, T., Kinoshita, I., Komatsu, Y., *et al.* (2018). Genomic testing for pancreatic cancer in clinical

practice as real-world evidence. Pancreatology *18*, 647-654.

Iwase, H. (2015). Treatment strategy for metastatic breast cancer with estrogen receptor-positive tumor. Int J Clin Oncol *20*, 249-252.

Kalia, S.S., Adelman, K., Bale, S.J., Chung, W.K., Eng, C., Evans, J.P., Herman, G.E., Hufnagel, S.B., Klein, T.E., Korf, B.R., *et al.* (2017). Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genet Med *19*, 249-255.

Kim, C., Gao, R., Sei, E., Brandt, R., Hartman, J., Hatschek, T., Crosetto, N., Foukakis, T., and Navin, N.E. (2018). Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. Cell *173*, 879-893 e813.

Kim, J.Y., Lee, E., Park, K., Park, W.Y., Jung, H.H., Ahn, J.S., Im, Y.H., and Park, Y.H. (2017). Clinical implications of genomic profiles in metastatic breast cancer with a focus on TP53 and PIK3CA, the most frequently mutated genes. Oncotarget *8*, 27997-28007.

Kleppe, M., and Levine, R.L. (2014). Tumor heterogeneity confounds and illuminates: assessing the implications. Nat Med *20*, 342-344.

Koboldt, D.C., Zhang, Q., Larson, D.E., Shen, D., McLellan, M.D., Lin, L., Miller, C.A., Mardis, E.R., Ding, L., and Wilson, R.K. (2012). VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. Genome Res *22*, 568-576.

Landrum, M.J., Lee, J.M., Benson, M., Brown, G., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Hoover, J., *et al.* (2016). ClinVar: public archive of interpretations of clinically

relevant variants. Nucleic Acids Res *44*, D862-868.

Li, H., and Durbin, R. (2009a). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics *25*, 1754-1760.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and Genome Project Data Processing, S. (2009b). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics *25*, 2078-2079.
Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. Bioinformatics *27*, 2987-2993.

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., *et al.* (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res *20*, 1297-1303.

McLaren, W., Gil, L., Hunt, S.E., Riat, H.S., Ritchie, G.R., Thormann, A., Flicek, P., and Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. Genome Biol *17*, 122.

Meric-Bernstam, F., Zheng, X., Shariati, M., Damodaran, S., Wathoo, C., Brusco, L., Demirhan, M.E., Tapia, C., Eterovic, A.K., Basho, R.K., *et al.* (2018). Survival Outcomes by TP53 Mutation Status in Metastatic Breast Cancer. JCO Precis Oncol *2018*.

Momozawa, Y., Iwasaki, Y., Parsons, M.T., Kamatani, Y., Takahashi, A., Tamura, C., Katagiri, T., Yoshida, T., Nakamura, S., Sugano, K., *et al.* (2018). Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. Nat Commun *9*.

Mosele, F., Stefanovska, B., Lusque, A., Tran Dien, A., Garberis,

I., Droin, N., Le Tourneau, C., Sablin, M.P., Lacroix, L., Enrico, D., *et al.* (2020). Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. Ann Oncol *31*, 377-386.

Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L.B., Martin, S., Wedge, D.C., *et al.* (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. Nature *534*, 47-54.

Ogiya, A., Yamazaki, K., Horii, R., Shien, T., Horimoto, Y., Masuda, N., Inao, T., Hosoda, M., Ishida, N., Osako, T., *et al.* (2017). Post-relapse survival in patients with the early and late distant recurrence in estrogen receptor-positive HER2-negative breast cancer. Breast Cancer *24*, 473-482.

Okonechnikov, K., Conesa, A., and Garcia-Alcalde, F. (2016). Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. Bioinformatics *32*, 292-294.

Pagani, O., Senkus, E., Wood, W., Colleoni, M., Cufer, T., Kyriakides, S., Costa, A., Winer, E.P., Cardoso, F., and Force, E.-M.T. (2010). International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? J Natl Cancer Inst *102*, 456-463.

Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature *406*, 747-752.

Pezo, R.C., Chen, T.W., Berman, H.K., Mulligan, A.M., Razak, A.A., Siu, L.L., Cescon, D.W., Amir, E., Elser, C., Warr, D.G., *et al.* (2018). Impact of multi-gene mutational profiling on clinical trial outcomes in metastatic breast cancer. Breast Cancer Res Tr *168*, 159-

168.

Razavi, P., Chang, M.T., Xu, G., Bandlamudi, C., Ross, D.S., Vasan, N., Cai, Y., Bielski, C.M., Donoghue, M.T.A., Jonsson, P., *et al.* (2018). The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers. Cancer Cell *34*, 427-438 e426.

Thorvaldsdottir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Brief Bioinform *14*, 178-192.
Tryfonidis, K., Zardavas, D., Katzenellenbogen, B.S., and Piccart, M. (2016). Endocrine treatment in breast cancer: Cure, resistance and beyond. Cancer Treat Rev *50*, 68-81.

Umar, A., Dunn, B.K., and Greenwald, P. (2012). Future directions in cancer prevention. Nat Rev Cancer *12*, 835-848.

Wang L (2014) An exploration of mutation status of cancer genes in breast cancers. Next Generat Sequenc & Applic *1*.

Yao, R., Yu, T., Qing, Y., Wang, J., and Shen, Y. (2019). Evaluation of copy number variant detection from panel-based next-generation sequencing data. Mol Genet Genomic Med *7*, e00513.

Yates, L.R., Gerstung, M., Knappskog, S., Desmedt, C., Gundem, G., Van Loo, P., Aas, T., Alexandrov, L.B., Larsimont, D., Davies, H., *et al.* (2015). Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. Nat Med *21*, 751-759.

Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F. (2017). ヒトゲノム：遺伝子の構造と機能. トンプソン&トンプソン遺伝医学, 福嶋義光, 27-51.