

日本人AYA世代乳癌患者の生物学的特徴の解明

Elucidation of the biology of adolescent & young adult breast cancer in Japan

横浜市立大学附属病院 消化器・腫瘍外科学 助教 押 正徳

要 約

本邦の乳癌発症年齢は40-60歳代がもっとも多いとされている一方で Adolescents and Young Adults (AYA) 世代 (15歳~40歳未満) における乳癌の発症率も他国と比較し高い傾向にある。AYA 世代は、中高年の乳癌と比較して臨床的・病理学的特徴が異なることが示唆されているにも関わらず、AYA 世代における乳癌の分子病態や進行・増悪の機序に対する理解は依然として不十分である。その理由の一つとして臨床研究の中心にある欧米ではAYA 世代の乳癌割合が低く、割合の高い年齢層に焦点をあてた治療薬の開発が進められている点が挙げられる。人種間で治療抵抗性や遺伝学的特性が異なることが注目されていることから、本邦のAYA 世代乳癌患者の予後改善を目指すためには、本邦でのAYA 世代乳癌研究が急務である。そこで本研究では遺伝子発現を用いたAYA 世代ホルモン陽性乳癌、特に日本人における生物学的特徴の解明を目的とした。AYA 世代の特徴としてはpublic databaseを用いた解析により他の年齢層と比較し、エストロゲン応答シグナル伝達のみならず細胞増殖伝達経路 (G2M checkpoint, E2F targets, MYC target v1, p53 pathway) の有意な活性化、DNA repair signalingやBRCAnessにおいても高い状態であることが示された。次に自施設で手術を施行したAYA 世代 (40歳未満) と Perimenopausal 群の乳癌患者 (40-55歳) の腫瘍を用いて生物学的特徴を比較した。するとpublic databaseによる結果とは異なり、Perimenopausal 群においてエストロゲン反応シグナル伝達は高い傾向にあり、細胞増殖伝達経路の活性度も高かった。免疫関連伝達経路に関しては閉経前群で活性化が高い傾向にあった。このことから、ホルモン陽性乳癌の生物学的特徴は年齢によるものではなくホルモン反応シグナル伝達の活性度に最も影響される可能性が示唆された。また、腫瘍微小環境における免疫関連に関しては年齢による影響が示唆された。現在、DNA の変化、血中エストロゲン濃度を含めた解析を進めている。今後もデータを集積し、日本人AYA 世代乳癌患者の予後・QOLの向上につなげていく予定である。

諸 言

AYA 世代 (Adolescents and Young Adults) は、15歳から40歳未満の年齢層を指し、乳癌を含めた様々な癌腫において重要な年齢群として注目されている¹。他の年齢層の癌と比較し特有の病理学的特徴や発症率・予後を持つことが知られており、更に発症年齢が若いことから治療法の選択肢や治療後の長期的な影響を慎重に考慮する必要がある。それにも関わらず、AYA 世代における乳癌の分子病態や進行・増悪の機序に対する理解は依然として不十分である。その理由の一つは現在臨床応用される薬剤のもととなる臨床研究は多くが欧米諸国で検討されたものである点があげられる。欧米では日本と異なりAYA 世代乳癌の割合は低く年齢が上がるごとに罹患率は上昇している。そのため、治療薬開発のターゲッ

トはより対象の広い年齢層となってしまう。AYA 世代は臨床試験参加率が低く、結局高齢の年代が多くの割合を占める臨床研究結果を踏襲しているのが現状である。また、近年人種間で治療抵抗性や腫瘍の遺伝子発現が異なることも注目されていることから、本邦のAYA 世代乳癌患者の予後改善を目指すためには、本邦でのAYA 世代乳癌研究が急務である。そしてその結果がひいては世界中のAYA 世代乳癌に対する予後改善につながると期待できる。そこで本研究は、特に乳癌で重要となる血中エストロゲン濃度を考慮し、AYA 世代ホルモン陽性乳癌、特に日本人における特性を遺伝子発現レベルで探索し、解明することを目的とした。

方法

AYA世代乳癌の特徴を探究するため、初めに、主に欧米・及び欧州の乳癌患者データが含まれた大規模public data base (METABRIC, SCAN-B) を用いて5000人以上の乳癌サンプルの臨床病理学的因子・遺伝子発現データからAYA世代と他年齢層との特徴を比較した。より詳細な検討を行うためにホルモン陽性乳癌で重要となるホルモン状態の背景を考慮し40歳未満のAYA群、40-55歳のperimenopausal群、55-65歳のmenopausal群、65歳以上のold群の4群間での比較検討を行った。次に、日本人AYA世代乳癌患者の検討を行うために、当院で手術を施行したAYA群 (n=11)、perimenopausal群 (n=11) ホルモン陽性乳癌症例の手術検体からmRNAを抽出しNext-Generation Sequencingを用いてトランスクリプトーム解析を行った。生物学的特徴の解析にはGene Set Variation Analysis (GSVA) を用いた²。また、腫瘍微小環境の解析にはデコンボリューションツールであるxCellアルゴリズムを使用した³。本研究は横浜市立大学の倫理審査委員会による承認を得ている (承認番号: F230900024)。

結果

public databaseでの解析では、ホルモン陽性乳癌においてAYA世代は病理学的リンパ節陽性率や核グレード3の割合が高く ($p < 0.001$)、AYA患者は特にperimenopausal群と比較して、疾患特異的生存率および全体的生存率が低い傾向を示した。エストロゲン反応シグナル伝達は年齢とともに低下し (all

$p \leq 0.001$)、AYA世代は他の群と比較して遺伝性乳癌卵巣癌に深く関与するBRCAnessおよびDNA修復シグナル伝達が有意に高い状態であった (all $p < 0.05$)。更にAYA世代は、細胞増殖に関連する遺伝子セット (E2F targets, G2M checkpoints, MYC target v1, p53 pathway) のみならず、他の癌促進伝達経路 (mTORC1, ROS pathway, PI3K/AKT/mTORシグナル伝達) も有意に高く発現していた。興味深いことに、これらの特徴は2cm未満の腫瘍でも同様に示された。腫瘍微小環境においては、AYA世代乳癌はCD8+細胞、制御性T細胞、helper T (type2) 細胞、M1マクロファージの浸潤が高く、M2マクロファージは低かった (all $p < 0.03$)。DNAを用いた解析では、ホルモン陽性乳癌AYA世代患者には、*AHNAK2*、*GATA3*、*HERC2*、*TG*といった遺伝子変異が他の年齢群と比較して高い頻度で観察され、*KMT2C*はAYAにおいて低い頻度で観察された。これらの結果から、AYA世代と年齢が近いにもかかわらず有意に異なる予後・生物学的特徴を示すperimenopausal群に注目し、実際に当教室で手術を施行したこの2群の腫瘍サンプルを用いて生物学的特徴の違いを検討した。初めに、2群間におけるDifferentially expressed genes (DEG) 解析を行った。するとAYA世代においては免疫に関連する遺伝子が有意に発現上昇していた (Figure1A & B: 有意差のある遺伝子のうち17.7%)。一方でperimenopausal群においては癌細胞増殖シグナル伝達関連遺伝子が有意に発現上昇していた (Figure1A & B: 有意差のある遺伝子のうち25%)。次いで神経系・感覚機能関

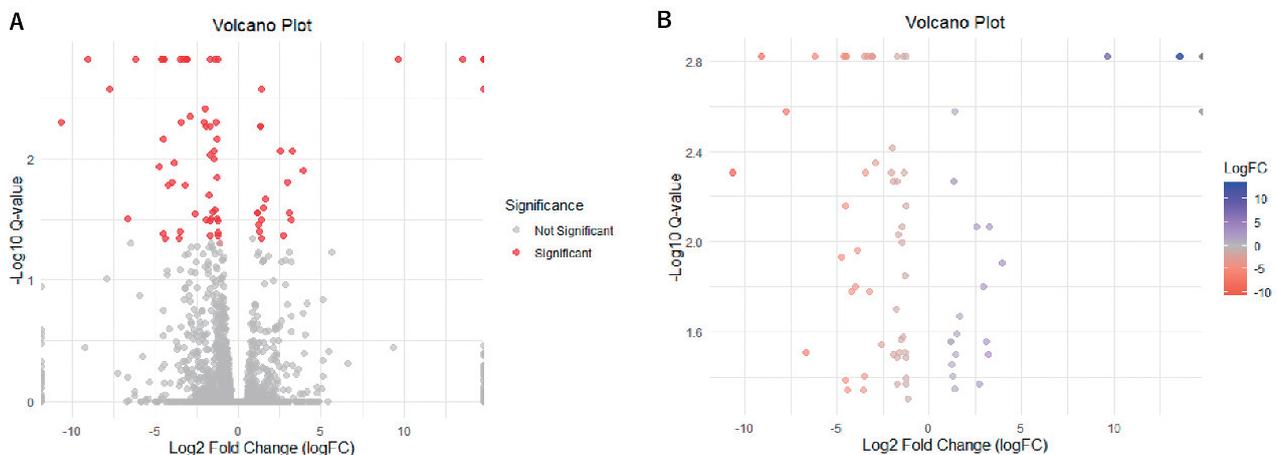


Figure 1. Differentially expressed genes between AYA and Perimenopausal groups. Volcano plot of (A) whole genes and (B) significant difference genes between two groups (q -value < 0.05 & $|\log$ Fold Change(FC)| > 1).

連遺伝子、代謝関連遺伝子の発現に有意差を認めた。

次にGSVAを用いてバイオロジー解析を行うと public databaseの結果とは異なり、当科のサンプルではAYA世代よりもperimenopausal群においてホルモン反応シグナル伝達の活性度は高い傾向にあり (Figure 2A)、細胞増殖関連シグナル伝達活性度も

高い傾向にあった (Figure 2B)。

その一方で、免疫関連シグナル伝達 (Figure 3: Inflammatory response, IFN- α , IFN- γ , Coagulation, Complement, Allograft rejection, IL2/STAT5 signaling) の活性度においてはAYA世代で高い傾向にあった。

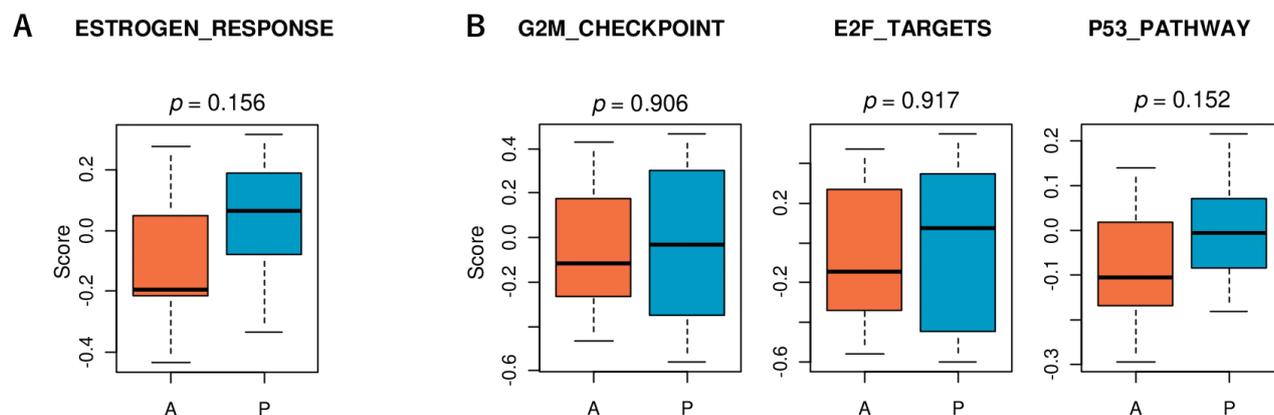


Figure 2. Comparison of the level of estrogen response, and cell proliferation-related signaling between AYA and Perimenopausal groups. (A) Boxplots of estrogen response signaling score, and (B) cell proliferation-related gene sets; G2M checkpoint, E2F targets, and p53 pathway, by AYA(A) and Perimenopausal(P) groups.

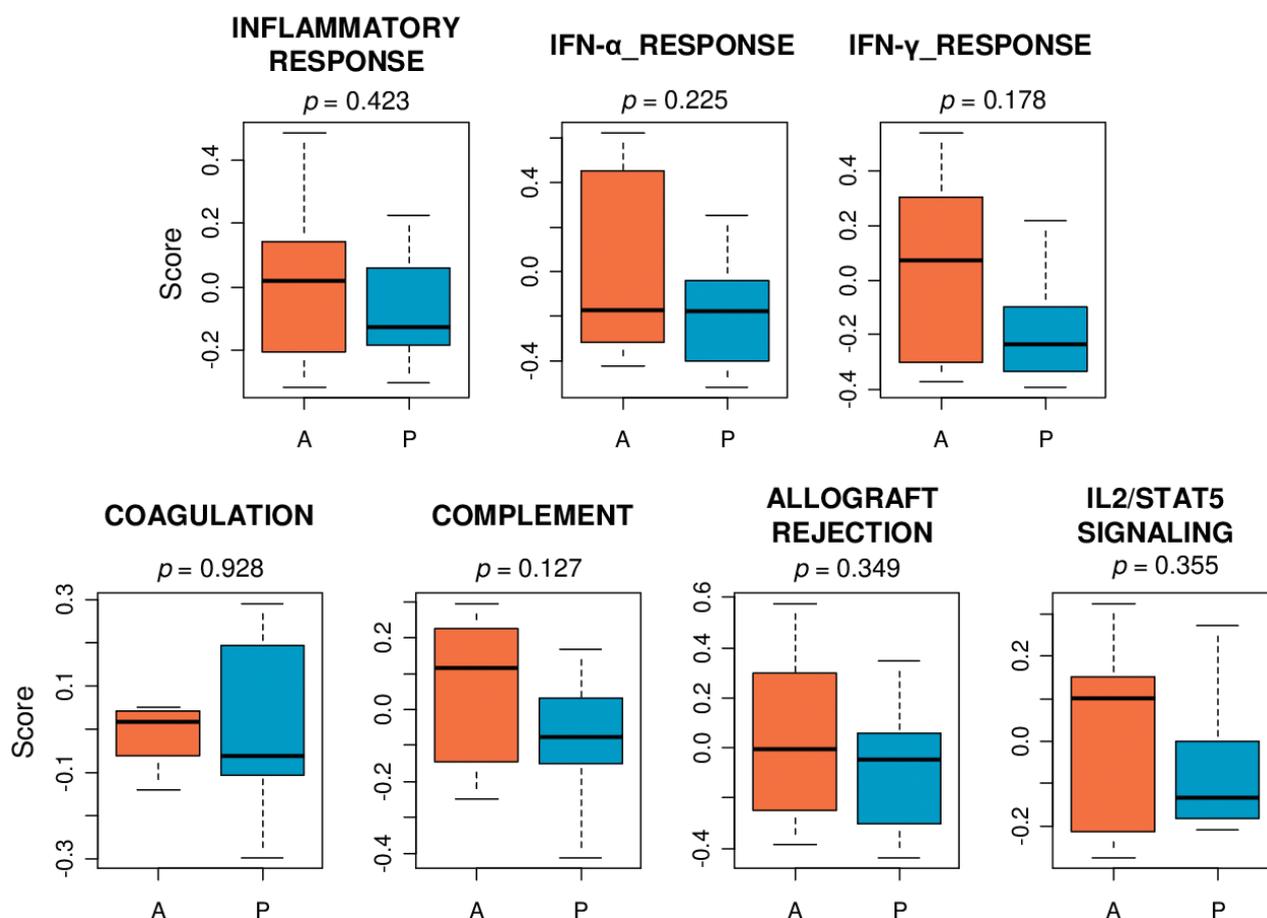


Figure 3. Comparison of the level of immune-related signaling including inflammatory response, interferon(IFN)- α and - γ response, coagulation, complement, allograft rejection, and IL2/STAT5 signaling, between AYA(A) and Perimenopausal(P) groups.

考 察

本研究により、AYA世代ホルモン陽性乳癌は他の年齢層と異なり様々な特異的な生物学的特徴を有する可能性が示されたが、その背景には乳癌のホルモン応答シグナル伝達の活性化の程度が年齢よりもより重要な因子である可能性が示唆された。

本研究では、乳癌において重要なエストロゲンレベルを考慮し患者を4つの年齢群に分けて比較検討を行った。エストロゲンレベルは一日の変動があるため、各患者の状態を正確に把握することが困難であるが、本研究では、乳癌組織におけるエストロゲン応答シグナル伝達の活性度を定量化することを可能とした。Public databaseでは年齢が上がるにしたがってエストロゲン応答シグナル伝達の活性度は有意に低下することが示された。その一方で当院のデータではAYA群と比較しperimenopausal群においてこの活性度は高い傾向にあった。このことは、今回解析に使用したperimenopausal群の9割が閉経前、6割が未婚である点から、依然として高いホルモン状態にあったことが考えられる。エストロゲンレベルと細胞増殖との相関は複数の論文で示されており、今回の研究結果から、若年層の予後不良には年齢による特徴よりもエストロゲンレベルの方がより影響をきたしている可能性が示唆された。また、ここには人種による食生活や環境因子・習慣なども影響していると考えられる。今回使用された海外のPublic databaseは数十年以上前の乳癌患者検体が用いられており、その時代の海外の状況と現代の日本とでは環境が大きく異なり年齢とホルモン状態との関連も大きく異なっていることが考えられる。この点からも現代の日本人AYA世代乳癌コホートを作成することは乳癌患者の予後改善のために重要であると考えられる。

その一方で、public databaseでの解析では認めなかった免疫関連シグナル伝達における活性度の違いに傾向があった点は日本人の特徴である可能性が示唆された。エストロゲン自体は免疫反応だけでなくCD8+T細胞やマクロファージ、helper T細胞、制御性T細胞などいくつかの免疫細胞にも影響を与えることが知られている⁴。近年、免疫チェックポイント

阻害剤 (immune checkpoint inhibitors: ICIs) が乳癌治療においても臨床応用され注目されている。このことから今後、日本人AYA世代乳癌におけるICIs治療効果も深く検討する必要があると考える。その他にもDEG解析で神経系関連の遺伝子発現に差があった点も興味深い。腫瘍微小環境には様々な細胞が存在することが知られており、その中には神経細胞等も含まれる。近年病理学的方法では検出困難であった微小な細胞群も遺伝子解析により把握が可能となってきており今後腫瘍微小環境のより詳細な解析が重要となる。

また、近年、ホルモン陽性乳癌の治療にはCDK4/6阻害剤、ESR1阻害剤、PIK3CA/AKT/PTEN阻害剤等、分子標的薬が開発され毎年のように新薬が臨床応用されている。これらの薬剤はDNA変異を調べることによって治療対象が決定される。Public databaseではAYA世代乳癌に特徴的な複数の遺伝子変異を認めた。本研究でも今後DNA変異を用いたAYA世代研究を進めていく方針である。

本研究の限界としてサンプル数の問題が挙げられる。対照群が全年齢層における一部の群のみとなり宿主的要因を考慮した複数群の比較検討が十分に行うことが出来なかった。今後は年齢のみならず各患者におけるホルモン状態にも着目し、さらに症例を集積し検討をすすめ、日本人AYA世代ホルモン陽性乳癌患者の予後・QOL改善につなげていきたい。

引用文献

1. Johnson R.H., Anders C.K., Litton J.K., Ruddy K.J., Bleyer A. Breast cancer in adolescents and young adults. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65 doi: 10.1002/pbc.27397.
2. Hänzelmann S., Castelo R., Guinney J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:7. doi: 10.1186/1471-2105-14-7.
3. Aran D., Hu Z., Butte A.J. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biol*. 2017;18:220. doi: 10.1186/s13059-017-1349-1.
4. Bengtsson A.K., Ryan E.J., Giordano D., Magaletti D.M., Clark E.A. 17beta-estradiol (E2) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2004;104:1404-1410. doi: 10.1182/blood-2003-10-3380.

Abstract

In Japan, the incidence of breast cancer (BC) is highest in individuals aged 40 to 60, but the incidence in the Adolescents and Young Adults (AYA) population (ages 15 to 40) is also relatively high compared to other countries. While AYA-BC exhibits clinical and pathological differences from middle-aged cancer, its molecular pathogenesis and progression remain poorly understood. One reason is that clinical research primarily originates from Western countries, where AYA-BC is less common, leading to treatment development focused on older populations. Given the recognized racial differences in treatment resistance and genetic traits, research on AYA-BC in Japan is critical for improving prognosis. This study aimed to explore the biological characteristics of AYA with hormone receptor-positive BC especially in the Japan using gene expression profiling. Public database analysis revealed significant activation of cell proliferation pathways (G2M checkpoint, E2F targets, MYC target v1, p53 pathway), DNA repair signaling, and BRCAness in AYA-BC compared to other age groups. Next, comparison of tumors from AYA and perimenopausal patients (ages 40–55) using Japanese patients, showed higher estrogen response signaling and greater activation of cell proliferation and immune-related pathways in the perimenopausal group. These findings suggest that estrogen response signaling, rather than age, most strongly influences the biological characteristics of hormone receptor-positive BC. Additionally, immune-related changes in the tumor microenvironment may be influenced by age. Ongoing research will focus on DNA alterations and estrogen levels to improve prognosis and quality of life for Japanese AYA-BC patients.