論文選択者：紅林 淳一

選択日：2019年3月29日

論文要約・コメント作成者：河内 麻里子

完成日：2019年4月23日

校閲者：紅林 淳一

校閲終了日：2019年5月7日

出典：J Clin Oncol. 2019 Feb 26: JCO1800925. doi: 10.1200/JCO.18.00925.

表題：Cyclin E1 Expression and Palbociclib Efficacy in Previously Treated Hormone Receptor Positive Metastatic Breast Cancer

著者：Turner NC et al.

【背景】

パルボシクリブは、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）4/6阻害剤で、Rbタンパクのリン酸化を抑制し、細胞周期のG1期からS期への移行を阻害して、乳癌細胞の増殖を抑制する。

大規模の前向き無作為化臨床試験でも、パルボシクリブとレトロゾールまたはフルベストラントの併用療法は有効性と安全性を示しており、閉経前または閉経後のホルモン感受性陽性HER2陰性転移性乳癌の標準治療として、パルボシクリブとアロマターゼ阻害剤またはフルベストラント併用療法の有用性が示されている。

パルボシクリブ併用療法の有効性が最も期待できる患者サブグループの同定や、患者の合理的選択につながり得る耐性メカニズムの解明には、予測因子となるバイオマーカーの同定が有用であると考えられる。前臨床研究は、乳がんおよび卵巣がんの細胞株モデルにおけるパルボシクリブ耐性と相関する高いサイクリンE1（CCNE1）発現を伴う、CDK2のバイパス活性化を含むCDK4 / 6阻害剤に対する耐性の潜在的なメカニズムを示唆している。

他の研究では、CDK6増幅がCDK4/6阻害剤に対する獲得耐性と関連しており、ルミナールサブタイプ乳癌細胞株が非ルミナールサブタイプよりもCDK4/6阻害剤に対してより感受性があることを示している。

また、stageⅡ-Ⅲホルモン感受性陽性乳癌を対象とした術前アナストロゾール・パルボシクリブ併用療法の小規模非無作為化試験 (NeoPalAna)では、探索的分析により、CCNE1およびCDKN2D mRNAの高発現がパルボシクリブへの耐性を予測することが示唆された。

CDK4/6阻害剤の無作為化試験で、効果予測となるバイオマーカーは同定されていない。PALOMA-1では、CCND1増幅、p16欠失いずれもパルボシクリブの有効性を予測するものではなかった。PALOMA-2でも、CDK4とCDK6の発現はパルボシクリブ・レトロゾール併用の有効性の予測因子ではなかった。PALOMA-3においても、ESR1やPIK3CA変異いずれもパルボシクリブ・フルベストラント併用の有効性を予測しなかった。

さらに、術前パルボシクリブ無作為化臨床試験（POP試験）からのデータは、PIK3CA変異およびCCND1増幅がパルボシクリブの有効性を予測するものではないことを示した。

そこで、本研究では、フルベストラントにパルボシクリブを上乗せすることの相対的有効性を予測するバイオマーカーを同定するため、PALOMA-3のbaselineの腫瘍組織のラージパネルを用いて検証した。

【方法】

＜Samples＞

PALOMA-3は内分泌療法の前治療歴のある転移性乳癌患者を対象に、521名をフルベストラント＋パルボシクリブ or プラセボ群に無作為割付けした。

骨転移のみもしくは術後療法施行中に転移再発をきたした症例、登録3年以内に手術を受けており、保存されている原発巣のサンプルを提供可能な患者を除く、すべての患者から転移巣のFFPEサンプルを採取し、HE染色スライドで腫瘍含有量と組織壊死の中央評価を行った。

CCNE1 mRNA発現とパルボシクリブの有効性の関連を検証するため、POP試験に登録されている61人の患者の遺伝子発現データを分析した。

＜Gene Expression Analysis＞

EdgeSeq Oncology BMパネルを用いてmRNAプロファイリングを行い、2534の癌関連遺伝子を評価した。

NextSeq 500 sequencer (Illumina, San Diego, CA) を用いて解析し、解析結果の生データはGEOにdepositしている。

POP試験におけるCCNE1 mRNA発現データの解析には GeneChip Human Gene Array ST2.1 (Affymetrix, Santa Clara, CA) を使用した。

＜Gene Expression Hypothesis-Driven Statistical Analysis＞

遺伝子発現データをquantile normalizationおよびlog2変換し、pathway biologyおよび前臨床試験とNeoPalANA試験のevidenceに基づき、10個の遺伝子に対して解析し、COX比例ハザード回帰分析を行い、連続変数としてもしくは中央値で二分したバイオマーカーレベルと、無増悪生存期間(PFS)の観点から治療効果との相互作用を検証した。

多重比較検定補正のため、Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) を用いてp値を調整した。

治療相互作用によるCCNE1 mRNA発現の変動レベルを、nonparametric subpopulation treatment effect pattern plot (STEPP) 法を用いて評価した。

データ解析には、RおよびMATLAB統計ソフトウェアを使用し、特に記載のない限り、いずれの検定も両側検定である。

POP試験のサンプルにおいて、CCNE1 mRNA発現が高いほど、より低い絶対的な抗増殖反応（MKI67遺伝子によってコードされるlnたんぱく [Ki-67]< 1% at day 15）と関連しているかを検証するため、コクランアーミテージの傾向検定を用い、CCNE1 mRNA発現レベルを3分して検討した。

CCNE1 mRNA三分位におけるパルボシクリブ治療群のln Ki-67のベースラインからの変化について、共分散解析を行った。分析は、両側有意水準0.05として行った。

＜Exploratory Unbiased Discovery Statistical Analysis＞

パルボシクリブの上乗せ効果が大きい患者群を同定しうる遺伝子発現バイオマーカーについて、探索的解析を行った。

Cox比例ハザード回帰分析を用いて、連続変数としての発現がパルボシクリブ群の治療効果と有意に関連していた遺伝子群に絞り込み（P <0.01）、次いでこれらの遺伝子群についてcross-arm解析を行った。

さらにパルボシクリブ・フルベストラント併用療法の感受性に関与する潜在的な生物学的プロセスを追跡するため、治療と遺伝子発現の関連を連続変数における係数で分類し、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行った。

【結果】

＜Gene Expression Analysis of PALOMA-3 Tumor Tissue＞

合計521人の患者からの462個の腫瘍サンプルをHTG EdgeSeq Oncologyパネルで解析。302個の腫瘍サンプル（159個の原発巣保存サンプル[53％]および142個の転移性病変生検サンプル[47％]））が評価可能であった。評価可能なサンプルのうち、パルボシクリブ群194（64％）個（102の原発巣保存サンプルおよび92の転移病変サンプル）、プラセボ群 108（36％）個（57の原発巣保存サンプルおよび50の転移病変サンプル）であった。ESR1 mRNAおよびプロゲステロン受容体（PR）mRNAの遺伝子発現は、中央評価した免疫染色でのHスコアと高い相関を示した。ERおよびPgR Hスコア、EdgeSeq Oncologyパネルの全遺伝子におけるそれらの転写物と最も相関していた。

　CDK4、CDK6およびCCND1 mRNAの発現は、パルボシクリブの有効性を予測するものではなかった。 同様に、ESR1 mRNA低発現は両治療群で短いPFSと相関していたが、パルボシクリブの有効性とESR1 mRNA発現レベルには有意な相関はみられなかった。

＜CCNE1 mRNA Expression Is Predictive of Palbociclib Efficacy When Assessed in Metastatic Tissues＞

既知の前臨床研究からのエビデンスと一致して、より低いCCNE1 mRNA発現は、パルボシクリブのより良い有効性と関連していた。 CCNE1 mRNA発現中央値でCCNE1 mRNA発現レベルを高発現群および低発現群に二分すると、CCNE1 mRNA高発現群のPFS中央値が、パルボシクリブ＋フルベストラントで7.6ヶ月、プラセボ＋フルベストラントで4.0ヶ月であった（ハザード比[HR]、0.85； 95％CI、0.58-0.58）。一方、CCNE1 mRNA低発現群のPFS中央値は、パルボシクリブ＋フルベストラントで14.1ヶ月、プラセボ＋フルベストラントで4.8ヶ月（HR、0.32、95％CI、0.20-0.50）であった。 CCNE1 mRNAとの相互作用は、再発タイプ、腫瘍組織採取部位、ベースラインEastern Cooperative Oncology Groupのperformance status、内臓転移、以前の化学療法、アロマターゼ阻害剤治療歴およびタモキシフェン療法治療歴を含むベースラインの臨床病理学的特徴を考慮しても有意であった(p＝0.00167）。

CCNE1 mRNA発現とパルボシクリブの有効性との関連は、転移病変生検サンプルにおいてより予測能が高かったが（n=142; 相互作用p＜0.001）、原発巣の保存サンプルにおいてはわずかであった（n=159; 相互作用p＜0.09）。

＜Intrinsic Subtypes and Efficacy of Palbociclib＞

遺伝子発現データを有する腫瘍のうち、133（44％）がルミナールA、93（31％）がルミナールB、および76（25％）が非ルミナール（5 basal like、63 HER2 enriched、8 normal like）であった。 ルミナールA腫瘍患者のPFS中央値は、パルボシクリブ+フルベストラントで16.6ヵ月、プラセボ+フルベストラントで4.8ヵ月（HR 0.41、95％CI、0.25-0.66）であったのに対し、ルミナールB腫瘍のPFS中央値はそれぞれ9.2ヵ月と3.5ヵ月であった（HR 0.64、95% CI 0.38-1.09）。ルミナールA　vs　ルミナールBで、パルボシクリブの治療効果との間に有意な相互作用は見られなかった（P = 0.20）。 非ルミナールホルモン受容体陽性群では、PFS中央値はパルボシクリブとフルベストラントの併用で9.5ヶ月、プラセボとフルベストラントの併用で5.5ヶ月であった（HR 0.58、95％CI 0.34-0.99）。

CCNE1 mRNA発現は、少数のbasal likeサブタイプ腫瘍において最も高く、続いてルミナールBであった（全サブタイプにおけるp＜0.001）。ルミナールA腫瘍のCCNE1 mRNA発現レベルは、ルミナールB腫瘍と比較し有意に低かった（P <0.001、マン-ホイットニーU検定）。 探索的なサブタイプ特異的分析では、フルボラントへのパルボシクリブの上乗せによるPFSの改善に対する連続変数としてのCCNE1 mRNAの効果が、ルミナールBおよびノンルミナールサブタイプの両方で観察された（相互作用P =0.03および0.007）が、ルミナールAサブタイプ（交互作用P =0.49）ではみられなかった。

＜Discovery Analysis of Genes and Pathways Associated With Efficacy of Palbociclib＞

FDR p＜0.1で多重比較検定補正を行い、11の相対的耐性マーカーおよび9つの相対的感受性マーカーを含む20の候補遺伝子を検出した結果、パルボシクリブ上乗せの有効性の低さを予測するマーカーとして、 CCNE1 mRNA高発現が2番目に重要な因子として同定され、 CCNE1 mRNA発現よりも重要であった遺伝子マーカーはニューロメジンUのみであった。

MSigDB中の50個の遺伝子セットのうち、E2F targetsは、パルボシクリブの上乗せによるPFS改善の欠如と最も有意な関連を示した(normalized enrichment score -2.36; FDR P＜0.001)。この結果は、フルボラントへのパルボシクリブ上乗せによる相対的な臨床的有効性を決定する際の、E2F転写活性、特にCCNE1 mRNAの重要な役割を裏付けている。

【考察】

我々は、PALOMA-3試験における乳癌組織の遺伝子発現解析を行い、CCNE1 mRNAの低発現がパルボシクリブのより高い有効性と関連していることを示した。

過去の研究においても、原発巣と転移巣で遺伝子プロファイルとHER2、ER、PgR statusの不一致がみられることが示されていた。

PALOMA-3は、骨転移のみもしくは術後補助内分泌療法開始後3年以内での再発で初回手術でのサンプルが提供できる場合を除いて、転移巣の生検をプロトコールに定めた初めてのphaseⅢ試験のうちのひとつである。この試験の結果は、臨床試験登録時点により近い時点での組織採取が予測マーカーの同定を容易にし、phaseⅢの進行乳癌を対象とした臨床試験の標準となり得ることを示唆している。

CCNE1 mRNA高発現は、乳癌および卵巣癌の細胞株モデルにおける治療抵抗性と相関しており、免疫染色によって評価された低分子量CCNE1の高発現は、日常的な臨床診療において、パルボシクリブで治療された患者のコホートを含め、不良な転帰と関連している。CCNE1 ｍRNAとCCNE1タンパクの翻訳後修飾を評価することの重要性について、今後さらなる研究が必要である。

POP試験において、耐性バイオマーカーとしてのCCNE1 mRNA高発現についてAffymetrixアレイを用いて検証し、様々なプラットフォームにわたってCCNE1 mRNA発現が予測的であることを実証した。CCNE1 mRNA発現が早期乳癌においてホルモン療法にパルボシクリブを上乗せすることの利益と関連している可能性があることを示唆している。また、CCNE1 mRNA発現に対する内分泌療法抵抗性の影響を評価し、CCNE1 mRNA発現をCDK4/6活性化から切り離すことを可能にする生物学的プロセスを同定するために、さらなる研究が必要と考えられる。

ルミナールAタイプ、Bタイプいずれもフルベストラントにパルボシクリブを上乗せすることで良好な治療効果を得ることができた。非ルミナールタイプではルミナールタイプ乳癌よりも内分泌療法から得られる利益が少ない可能性があり、異なる治療反応性を持つ別サブタイプとして分類する必要がある可能性が示唆される。また、CDK4/6阻害剤併用療法がHER2-enriched 非ルミナールタイプではPFSを改善しうることが示されている。

探索的解析において、 p19-CDKN2D mRNAならびにp18-CDKN2C mRNAの高発現レベルとパルボシクリブの有効性の低下に関連性のある可能性が同定された。高レベルのCCNE1がパルボシクリブに対する反応の低下を予測する可能性があることを示している。

PALOMA-3で併用された内分泌療法はフルベストラントであり、本研究で同定されたバイオマーカーがアロマターゼ阻害剤との併用でも治療効果と関連するかは不明である。また、本解析は臨床アッセイでは実施されておらず、それらの因子を加味した追加検証なしでは実臨床での治療選択に用いることはできない。

CCNE1 mRNA高発現のサブグループにおいても、実質的には低発現の群より少ない程度ではあるが、パルボシクリブを追加することでPFSが改善する可能性があり、CCNE1 mRNA測定が個々の患者の決定に有用であるかは不透明である。

PALOMA-3試験のサンプルを用いた本解析において、パルボシクリブの有効性に関する予測因子を同定した。

CCNE1 mRNA発現の予測能は保存された原発巣サンプルよりも治療開始時に採取された転移病変サンプルにおいてより明白であり、臨床研究において転移、再発病変の検体を採取することの重要性を示している。

CDK4/6阻害剤のバイオマーカーとしてのCCNE1 mRNA発現の役割を明らかにするためには、さらなる検証が必要である。