

エストロゲン受容体関連遺伝子発現に基づいて HER2陽性乳癌に対して化学療法個別化治療を目指す基盤構築

兵庫県立がんセンター腫瘍内科

医長 谷岡 真樹

(共同研究者)

近畿大学ゲノム生物学教室	助教 坂井 和子
兵庫県立がんセンター研究部	部長 須藤 保
兵庫県立がんセンター病理部	部長 佐久間 淑子
兵庫県立がんセンター腫瘍内科	部長 根来 俊一
兵庫県立がんセンター乳腺外科	医長 広利 浩一
兵庫県立がんセンター乳腺外科	部長 高尾 信太郎
神戸大学大学院医学部腫瘍・血液内科学	教授 南 博信
近畿大学医学部腫瘍内科	教授 中川 和彦
近畿大学ゲノム生物学教室	教授 西尾 和人

はじめに

乳癌患者に対する術前化学療法後に原発巣および腋窩リンパ節の浸潤癌が消失した場合、病理学的完全寛解 (pathologic complete response; pCR) とされる。Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 陽性乳癌患者では術前化学療法後pCRが予後因子とされ (Untch M, et al. J Clin Oncol 2011;29:3351)、pCRを全生存期間のSurrogate endpointとする臨床試験が広く行われている。しかし、HER2陽性患者をさらにエストロゲン受容体 (Estrogen receptor; ER) 発現別に分けるとpCR割合が大きく異なる結果が繰り返し報告されている。2011年のAmerican Society of Clinical Oncology (ASCO) 年次総会において術前化学療法を施行された6,377名についてサブグループ別にpCR後の無再発生存期間が報告された (von Minckwitz G, et al. ASCO 2011 Abst.1028)。HER2陽性ER陰性患者298名では98名 (33%) がpCRを獲得したが、HER2陽性ER陽性患者356名ではpCR獲得は79名 (22%) と少なかった。これを受けて2003-10年に兵庫県立がんセンター・国立がん研究センター東病院・近畿大学医学部附属病院・虎の門病院・埼玉医科大学国際医療センター・県立広島病院においてHER2陽性かつ術前化学療法を施行された366名を後方視的に調べた。pCR達成の効果予測因子に関するロジスティック回帰分析による多変量解析ではホルモン受容体陽性はpCRに関する独立した効果予測因子であった (オッズ比;0.37、 $P<.001$)。以上からHER2陽性乳癌ではホルモン受容体陽性群はホルモン受容体陰性群と比較して術前化学

療法後pCR率は低い。しかしその原因については明確ではない。そこでHER2陽性乳癌を対象として、術前化学療法前の乳房生検組織を用いてこれまでに効果予測因子として報告されている遺伝子発現、変異、蛋白発現を網羅的に調べることで、特にホルモン受容体陽性HER2陽性乳癌における術前化学療法の効果予測因子を見出し、最終的にさらに抗腫瘍効果を高める治療を開発することが目的である。

研究方法

2005－13年に兵庫県立がんセンターにおいてトラスツズマブ、アンストラサイクリン、タキサンをすべてを術前化学療法として施行された75名のHER2陽性乳癌患者を対象として、成長因子受容体、ホルモン受容体関連因子、PI3/MAP kinase経路関連因子、増殖関連因子、T細胞の制御因子を網羅的に調べ、①HER2陽性ER陽性群とHER2陽性ER陰性群の比較、②HER2陽性ER陽性群内での比較を通じて、pCRを指標とする効果予測因子を特定する。その結果からトラスツズマブと化学療法の効果は期待できないが予後良好であり、化学療法をホルモン療法に置換可能と予想される患者群を見出す。

1) 測定項目

診断時に採取された腫瘍組織検体を用いる。以下に測定項目候補を挙げるが、優先順位を設ける(下表)。使用できる腫瘍組織検体、費用、技術的問題により制限される場合には優先順位を考慮して測定項目が決められる。

- (1) 成長因子受容体：EGFR、HER2、HER3、IGF1R (mRNA定量)、HER2遺伝子変異
- (2) ホルモン受容体関連因子:ESR1, PgR, FOXA1, LMTK3(mRNA定量)、Ki67発現(免疫染色)
- (3) PI3/MAP kinase経路(ERとHER2のクロストーク)：PTEN, INPP4B、SRC-1, DUSP4(mRNA定量)、PIK3CA、Akt1遺伝子変異、PTEN (蛋白発現)
- (4) 増殖関連因子：Bcl-2, c-myc, cyclin D1 (mRNA発現)
- (5) T細胞の制御因子：PD 1, PDL1, CTLA4 (mRNA発現)

	①蛋白発現	②遺伝子発現	③遺伝子変異
スライド1枚 5μ厚	FFPE 4枚	FFPE 6枚	FFPE 3枚
	HE PTEN Bcl-2	MassARRAY QGE assay 成長因子受容体：EGFR, HER2, HER3, IGF1R ホルモン受容体関連因子：ESR1, PgR, FOXA1, LMTK3 PI3/MAP kinase経路：PTEN, INPP4B, SRC-1, DUSP4 増殖関連因子：Bcl-2, c-myc, cyclin D1 T細胞の制御因子：PD1, PDL1, CTLA4	PIK3CA mutation (5か所) HER2, Akt1

2) 測定方法

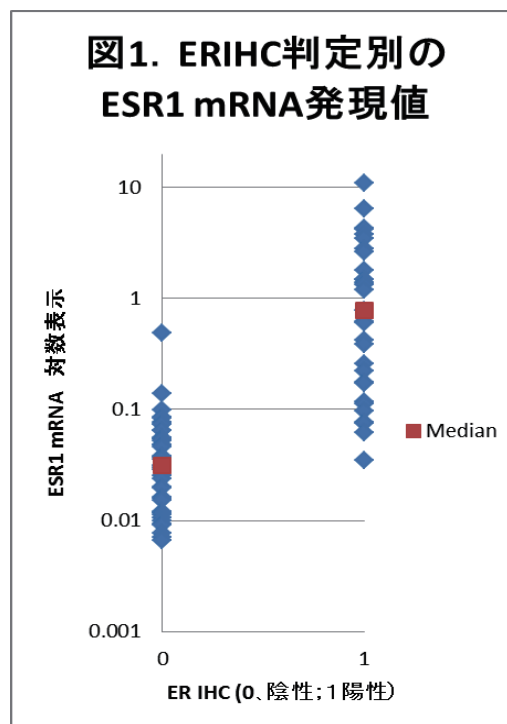
兵庫県立がんセンターにて、5 μ mのパラフィン切片を各々13枚作製し、近畿大学ゲノム生物学教室にそれぞれ必要枚数分送付する。用いることができる腫瘍組織が限られパラフィン切片を17枚作成できない場合には、できるだけパラフィン切片を作成し、優先順位に従って測定項目が選ばれる。

1. 遺伝子発現：パラフィンスライドからRNAを回収し、MassArrayを用いて遺伝子発現の検討を行う。測定結果と臨床情報との相関を解析しバイオマーカーを探索する。近畿大学ゲノム生物学教室にてRNA抽出および測定を行い、測定結果と臨床情報との相関を解析する。必要に応じて正常組織を除き、癌組織のみを測定するためのMacrodissectionを行う。
2. 蛋白発現：免疫組織染色法を用いる。兵庫県立がんセンターにて測定し、研究事務局にて測定結果と臨床情報との相関を解析する。
3. 体細胞変異：兵庫県立がんセンターで組織標本からDNAを抽出し、近畿大学ゲノム生物学教室にてMassarrayを用いて検出する。測定結果と臨床情報との相関を解析する。

結 果

報告書作成時点ですべての症例の薄切標本の作成、DNA, RNAの抽出、MassarrayによるmRNA発現解析が終了している。臨床情報と合わせ解析した結果を報告する。

まず免疫染色によるER免疫染色による判定（10%以上の癌細胞で発現していれば陽性）とmRNAの値は非常に相関していた（図1）。



次にロジスティック解析を用いてER免疫染色での判定別にpCRとの相関を解析した。mRNA発現値は $\beta 2$ ミクログロブリンをコントロールとして調整を行い、中央値をカットオフ値とした。まずER陽性群31名の解析では、多重解析を考慮して $p = 0.01$ 以下の因子を有意とした場合、Bcl-2またはIGF1Rの発現が高値であれば、有意にpCRを得にくいという結果であった (Table 1)。

Table 1. Logistic regression analysis of predictors of pCR (ypT0/is ypN0) in HER2+ER+ patients

		n = 31	Univariate p value	Odds Ratio (95% CI)
Age (yr)	≥50	23	0.48	1.93 (0.32 - 11.74)
	<50	8		
Primary tumor	T1	10	0.25	0.47 (0.12 - 1.83)
	T2 - 4	21		
Nodal status	N0	6	0.41	0.47 (0.077 - 2.87)
	N1 - 3	25		
Stage	I - II	24	0.44	0.60 (0.16 - 2.21)
	III	20		
PgR IHC	Negative	18	0.018	0.067 (0.007 - 0.63)
	Positive	13		
ESR1 mRNA	Low	15	0.029	0.14 (0.022 - 0.82)
	High	15		
PgR mRNA	Low	15	0.029	0.14 (0.022 - 0.82)
	High	15		
LMTK3 mRNA	Low	15	0.21	0.38 (0.08 - 1.74)
	High	16		
FOXA1 mRNA	Low	15	0.61	0.68 (0.16 - 2.99)
	High	16		
ERBB2 mRNA	Low	16	0.052	4.95 (0.99 - 24.9)
	High	15		
ERBB3 mRNA	Low	15	0.61	0.68

	High	16		(0.16 – 2.99)
EGFR mRNA	Low	15	0.13	0.28
	High	15		(0.06 – 1.45)
FGFR1 mRNA	Low	15	0.052	0.20
	High	16		(0.04 – 1.01)
IGF1R mRNA	Low	15	0.004	0.033
	High	16		(0.003 – 0.33)
PTEN mRNA	Low	15	0.32	2.14
	High	16		(0.47 – 9.70)
INPP4B mRNA	Low	15	0.052	0.20
	High	16		(0.04 – 1.01)
SRC-1 mRNA	Low	15	0.61	0.68
	High	16		(0.16 – 2.99)
DUSP4 mRNA	Low	15	0.32	2.14
	High	16		(0.47 – 9.70)
PDL-1 mRNA	Low	14	0.037	6.86
	High	15		(1.12 – 41.8)
CTLA4 mRNA	Low	15	0.44	1.83
	High	15		(0.39 – 8.57)
Bcl-2 mRNA	Low	16	0.006	0.043
	High	15		(0.004 – 0.41)
Cyclin D1 mRNA	Low	16	0.020	0.12
	High	15		(0.02 – 0.71)

IHC, immunohistochemistry; CI, confidence interval

一方、ER陰性群44名の解析では、どの項目も有意ではなかった (Table 2)。

尚、PD-1発現はほとんど発現がなく、解析を行うことは困難であった。しかし、これは腫瘍内に浸潤するリンパ球のみ発現するため、ある程度予想された。わずかな発現であっても捉えられるか検討することが目的であったが結果として困難であった。

Table 2. Logistic regression analysis of predictors of pCR (ypT0/is ypN0) in HER2+ER- patients

			Univariate	Odds Ratio
			p value	(95% CI)
n = 44				
Age (yr)	≥50	36	0.82	1.20
	<50	8		(0.24 - 5.97)
Primary tumor	T1 - 2	31	0.27	0.47
	T3 - 4	13		(0.12 - 1.83)
Nodal status	N0	30	0.40	0.56
	N1 - 3	14		(0.15 - 2.15)
Stage	I - II	24	0.44	0.60
	III	20		(0.16 - 2.21)
ESR1 mRNA	Low	20	0.62	1.40
	High	21		(0.37 - 5.27)
PgR mRNA	Low	19	0.24	0.42
	High	18		(0.10 - 1.80)
LMTK3 mRNA	Low	20	0.82	0.86
	High	20		(0.22 - 3.32)
FOXA1 mRNA	Low	21	1.00	1.00
	High	21		(0.26 - 3.80)
ERBB2 mRNA	Low	22	0.44	1.67
	High	22		(0.45 - 6.13)
ERBB3 mRNA	Low	22	0.75	0.81
	High	22		(0.22 - 2.96)
EGFR mRNA	Low	21	0.053	0.25
	High	22		(0.061 - 1.02)
FGFR1 mRNA	Low	22	0.74	1.25
	High	22		(0.34 - 4.56)
IGF1R mRNA	Low	22	0.75	0.81
	High	22		(0.22 - 2.96)

PTEN mRNA	Low	22	0.75	0.81
	High	22		(0.22 - 2.96)
INPP4B mRNA	Low	22	0.32	1.94
	High	22		(0.53 - 7.17)
SRC-1 mRNA	Low	22	0.74	1.25
	High	22		(0.34 - 4.56)
DUSP4 mRNA	Low	22	0.91	1.08
	High	22		(0.30 - 3.92)
PDL-1 mRNA	Low	19	0.90	1.09
	High	19		(0.27 - 4.41)
CTLA4 mRNA	Low	20	0.58	0.68
	High	21		(0.17 - 2.65)
Bcl-2 mRNA	Low	20	0.86	0.89
	High	21		(0.24 - 3.35)
Cyclin D1 mRNA	Low	22	0.91	1.08
	High	22		(0.30 - 3.92)
CI, confidence interval;	Low	16	0.020	0.12
	High	15		(0.02 - 0.71)

ICI, confidence interval;

考 察

HER2陽性乳癌患者においては、ER陽性ではBcl-2またはIGF1RのmRNAが高発現している場合、抗腫瘍効果を得にくいという結果であった。一方、ER陰性ではいずれの因子も抗腫瘍効果と関連はなかった。以上の結果から、エストロゲン受容体発現の有無により生物学的に異なると考えられる。Bcl-2またはIGF1Rの制御により抗腫瘍効果が期待される。

IGF1RとBcl-2の発現は互いに相関することが報告されており (Yerushalmi R, et al. *Breast Cancer Res Treat*, 132:131-142, 2013)、HER2陽性乳癌における重要な治療抵抗性因子と考えられているPIK3/mTOR経路を制御した際にIGF1RとBcl-2は共に発現し、いずれかを抑制することで腫瘍増殖を抑制できる (Muranen T, et al. *Cancer Cell* 21:227-239, 2013)。しかしIGF1R抗体薬はかつて期待されたが、どの癌種でも有効性を示せなかった (Yee

D, et al. J Natl Cancer Inst 104 (13) :975-81, 2012)。一方でBcl-2ファミリーを介してIGF1Rがアポトーシスを抑制する (Periyasamy-Thandavan S, et al. Breast Cancer Res 14:R52, 2012)。これらの報告からはIGF1Rよりも分子標的としてのBcl-2阻害により抗腫瘍効果を高めるのではないかと期待される。

2012年のサンアントニオ乳がん学会では、HER2陽性かつER陽性乳癌ではBcl-2が術前化学療法に伴って上昇し、治療抵抗性であることが示されている (Giuliano, et al. San Antonio Breast Cancer Symposium 2012 Dec 8, abstract S5-8)。我々の研究からは術前化学療法治療開始前のBcl-2発現量により、治療開始後に獲得される耐性だけではなく、治療開始前に抵抗性が規定されていることが示唆された。Bcl-2阻害薬は従来Bcl-Xも同時に阻害し血小板減少をきたすため臨床応用されてこなかったが、近年Bcl-2特異的な阻害薬ABT-199が開発されておりエストロゲン受容体陽性乳癌での基礎的検討が行われている (Vaillant F, et al. Cancer Cell 24, 120-129, 2013)。今後HER2陽性ER陽性乳癌での臨床応用が期待される。

今後の研究の方向性としては

- ① Internal controlとして今回は β 2ミクログロブリンを用いたが、GAPDHも含めて補正を行った場合でも同じ結果が得られるか検討する。
- ② 他に重要な耐性機構と考えられているPIK3CA, HER2, Aktの遺伝子変異、PTEN発現 (免疫染色) を探索し、Bcl-2現との関連をみる。
- ③ Bcl-2蛋白発現が今回測定したBcl-2 mRNA発現と相関するのか免疫染色を行い検討する。以上につき、現在継続的に検討している。

要 約

HER2陽性エストロゲン受容体陽性乳癌においては、Bcl-2またはIGF1RのmRNA発現がトラスツズマブを含む術前化学療法に対する治療抵抗性因子であると示唆された。