

胃癌における腫瘍内分子生物学的heterogeneityと 治療抵抗性機序の解明および新たな治療戦略の開発

公益財団法人がん研究会有明病院 消化器化学療法科

副医長 若槻 尊

(共同研究者)

がん研究会病理部

主任研究員 山本 智理子

がん研究会化学療法センター分子生物治療部

主任研究員 馬島 哲夫

はじめに

近年、腫瘍内におけるmolecular heterogeneityが分子標的治療薬における薬剤耐性機序の一つとして注目されている。胃癌は病理学的にもまた分子生物学的にもheterogeneityの頻度が高い事が知られており、これらが進行胃癌における分子標的治療薬開発の障壁となってきた可能性が示唆されている^[3, 6]。具体的には抗HER2薬剤であるラパチニブ、T-DM1は、HER2陽性乳癌ではその有用性が示されたが、HER2陽性胃癌においては優越性が証明できなかった^[2, 7]。その理由として、胃癌ではHER2の発現パターンにheterogeneityがある事が知られ診断上しばしば問題となってきた^[1]。一方、乳癌においてはHER2の発現パターンが均一である症例が多い事が知られており、抗HER2薬の臨床試験における乳癌と胃癌の異なる結果に関してHER2のheterogeneityの存在が示唆されている。

これまで術後の予後因子としてHER2の腫瘍内発現パターンが検討されてきたがTrastuzumab併用化学療法の治療効果に及ぼす影響は不明であった^[4, 5]。我々は、HER2腫瘍内発現パターンがTrastuzumab併用化学療法の治療効果に及ぼす影響を明らかにするために①Trastuzumabの治療効果を切除検体およびTrastuzumab併用化学療法の約70%以上を占める生検検体において、免疫染色を用いた腫瘍内HER2発現パターンがTrastuzumab併用化学療法の治療効果に及ぼす影響を検討した。更に近年、HER2陽性胃癌のような染色体不安定性を示す胃癌では、同一腫瘍内にEGFRやMETなどHER2以外の受容体型チロシンキナーゼ(RTK)が共発現する事が報告されている。これらHER2以外のRTKsの発現がTrastuzumabの治療効果に及ぼす影響を明らかにするために②HER2以外のRTKsの発現の有無とHER2の発現パターンとHER2以外のRTKsの発現との相関について検討した。③最後に胃癌切除検体から樹立した細胞株において、HER2の発現にheterogeneityがあるのかも検討した。

結 果

①腫瘍内HER2の発現パターンとTrastuzumab併用化学療法の治療効果について

胃癌切除検体を用いた検討でHER2の典型的な2つの発現パターンを提示する（右：heterogeneousなHER2発現、左：homogeneousなHER2発現（Fig 1）

当院でTrastuzumab併用化学療法が施行され切除検体を有する22例の検討を以下に提示する。切除検体上でhomogeneousにHER2を発現する胃癌の治療成績はheterogeneousにHER2を発現する胃癌よりも有意に良好であった。[PFS:21.0 months vs. 8.0 months, HR0.15 95% CI (0.04-0.57), $p<0.01$. OS: not reached vs. 13.0 months, HR0.18 95% CI (0.06-0.61), $p=0.014$ (Fig 2)

次に生検検体でも同様な結果が得られるかどうかを当院でTrastuzumab併用化学療法が施行され生検にてHER2が診断された57例において検討した。複数の生検が施行されており同一生検組織内でもHER2の発現にheterogeneityを認めるものや生検組織間でもHER2の発現にheterogeneityを認めるものおよびそれらが混在するものが様々であった（Fig 3）。この中で生検組織間/生検組織内にhomogeneousにHER2を発現するものは、最も長い生存期間を呈したがそうではないものと比較し有意差は認めなかった。一方、生検組織間でHER2の発現がheterogeneousなもの、すなわちどれか一つでも生検検体にHER2を発現しない症例は最も生存期間が短く、全ての生検組織にHER2が発現する症例より有意に予後が不良であった（Fig 4）。

Fig 1

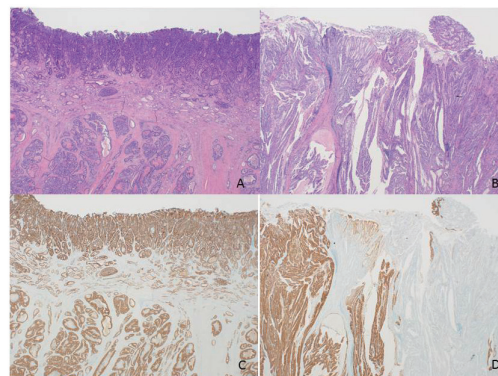


Fig 2

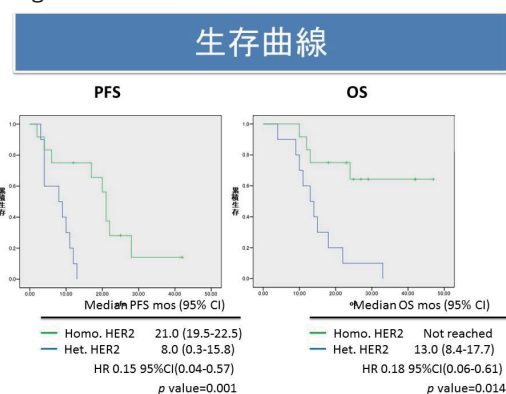


Fig 3

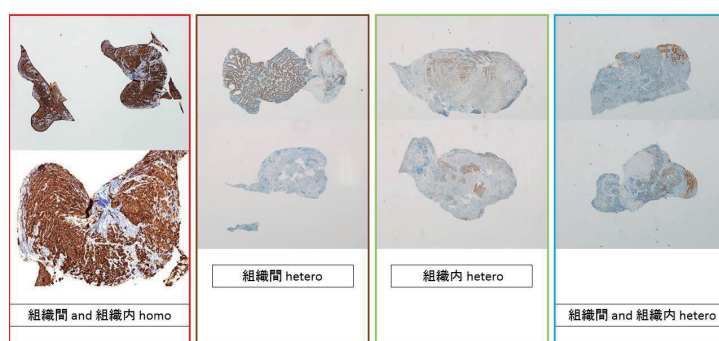
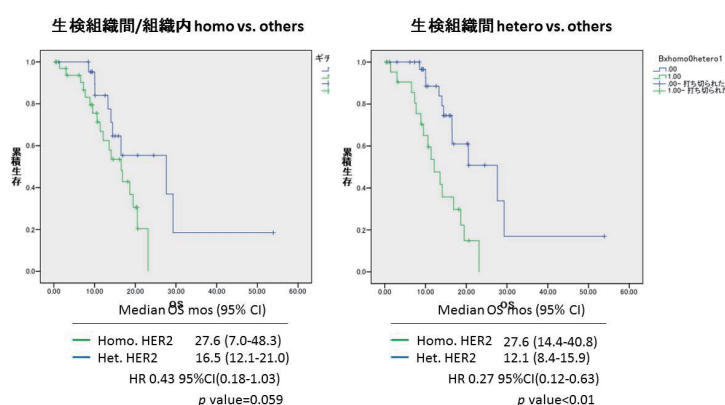
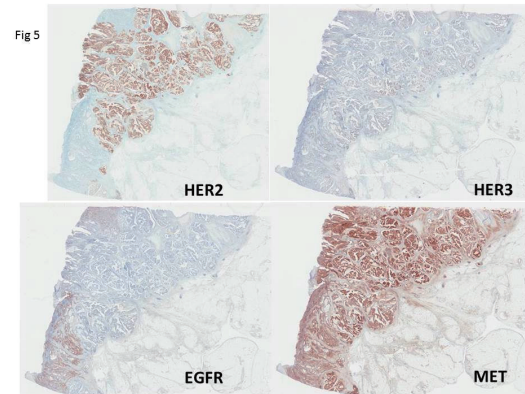


Fig 4



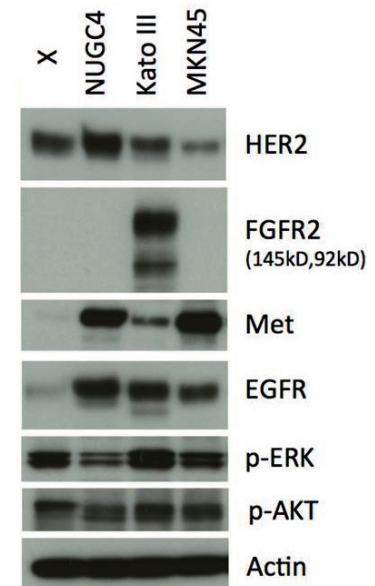
②切除検体を用いてHER2以外のRTKsの発現について検討した。典型的な1例を提示する(Fig 5)。本症例はHeterogeneousにHER2を発現している症例である。腫瘍部に一致してMETの高発現およびHER3の軽度の発現を認めた。またHER2と相互排他的なEGFRの発現が認められた。HER2陽性胃癌においてEGFRは90%において蛋白過剰発現を認め、4例においてHER2と相互排他的に2例においてHER2と一致した部位に発現を認めた。他のRTKsに関しては現在解析中である。またEGFRおよびMETに関してはDISH法による遺伝子増幅の検討を今後予定している。

Fig 5



③我々は化学療法センターと共同で胃癌切除検体から胃癌幹細胞の樹立を試みている。Fig 6はWestern blotであるが樹立した胃癌細胞株にHER2の発現を認めた(図左端)。フローサイトメトリーを行うと細胞株のレベルにおいてもHER2発現の不均一性が確認された(Fig 7)。

Fig 6

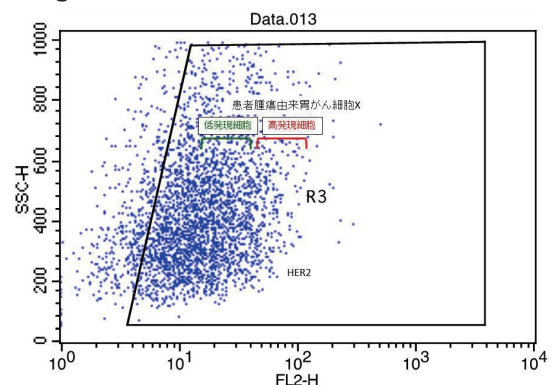


考 察

切除検体を用いた検討から腫瘍内のHER2の発現パターンとTrasutuzumab併用化学療法治療効果との間には有意な相関がある事が認められた。即ち、切除検体でhomogeneousにHER2が発現している腫瘍は治療効果が非常に高い結果であった。一方、生検検体を用いた検討では全ての生検検体にhomogeneousにHER2が発現している症例は最も長い生存期間を示したが有意差は示されなかった。逆に複数の生検検体のうち一つでも全くHER2の発現が認められない症例は、全ての生検検体に何らかのHER2の発現を認める症例と比較し有意に生存期間が短かった。

まとめると切除検体でhomogeneousなHER2の発現を認めた場合、非常に良好な治療効果が期待でき、逆に一つでもHER2の発現を含まない生検検体を有する症例は治療効果が不良であると言え、切除検体を用いた場合、治療効果良好症例を生検検体を用いた場合、治療効果不良症例の予測に役立つことが示唆された。その理由として生検検体では腫瘍全体のHER2の発

Fig 7



現パターンを反映していない事が予想され、現在生検検体と切除検体が両方採取された症例においてHER2発現パターンの一致率を検討中である。

以前からHER2陽性胃癌にはHER2以外のRTKsの共発現が認められる事が報告されていたが、Trastuzumab併用化学療法に及ぼす影響については明らかではなかった^[3, 6]。我々は、HeterogeneousにHER2を発現する胃癌において、HER2以外のRTKsの共発現率が高く結果的にTrastuzumab耐性を来すと推測したが、HER2陽性胃癌の90%にEGFRの蛋白過剰発現を認め、HER2の発現パターンとEGFRの共発現には相関を認めなかった。しかしながら、EGFRの蛋白発現も腫瘍内にheterogeneityが認められており、HER2の発現パターンとEGFRが腫瘍内に占める発現率との比較やMET、FGFR2など他のRTKsの発現との相関は今後の検討課題である。また、これらのRTKsにおいてDISH法による遺伝子増幅解析も予定しており、蛋白発現と合わせて更なる検討を予定している。

今回、胃癌切除検体樹立細胞株を用いた検討でHER2の発現において細胞レベルでのheterogeneityが認められる事が明らかとなった。今後の*in vivo*およびPDXモデル等を用いてTrastuzumab併用化学療法の耐性機序の解明およびマルチキナーゼ阻害剤や併用療法を用いた耐性の克服についても検討する予定である。

要 約

胃癌においては比較的高頻度にHER2の腫瘍内不均一発現が認められる。しかしながら、Trastuzumab併用化学療法における臨床的な意義に関しては明らかではなかった。本研究では、切除検体および生検検体におけるHER2の不均一発現について解析した。切除検体ではhomogeneousなHER2の発現が認められる場合、良好な治療効果と相関し、一方、生検検体では検体内にHER2の発現を認めない場合、治療効果が有意に不良であった。HER2陽性胃癌ではHER2以外の受容体型チロシンキナーゼの発現が高頻度に認められ、本コホートでも90%の症例にEGFRの蛋白過剰発現を認めた。また、切除検体から樹立した細胞株を用いた検討でも、胃癌細胞株レベルでHER2の細胞膜での発現にheterogeneityが存在する事が明らかとなり、今後更なる検討を行い耐性機序の解明および新たな治療戦略の開発を行う予定である。

文 献

- [1] M. Hofmann, O. Stoss, T. Gaiser, H. Kneitz, P. Heinmoller, T. Gutjahr, M. Kaufmann, T. Henkel, J. Ruschoff, Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy, Journal of clinical pathology, 61 (2008) 89-94.
- [2] Y. Kang, Shah MA, Ohtsu A, et al., A randomized, open-label, multicenter, adaptive phase 2/3

- study of trastuzumab emtansine (T-DM1) versus a taxane (TAX) in patients (pts) with previously treated HER2-positive locally advanced or metastatic gastric/gastroesophageal junction adenocarcinoma (LA/MGC/GEJC) . *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34 (2016) .
- [3] Y. Kuboki, S. Yamashita, T. Niwa, T. Ushijima, A. Nagatsuma, T. Kuwata, T. Yoshino, T. Doi, A. Ochiai, A. Ohtsu, Comprehensive analyses using next-generation sequencing and immunohistochemistry enable precise treatment in advanced gastric cancer, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 27 (2016) 127-133.
- [4] Y. Kurokawa, N. Matsuura, Y. Kimura, S. Adachi, J. Fujita, H. Imamura, K. Kobayashi, Y. Yokoyama, M.N. Shaker, S. Takiguchi, M. Mori, Y. Doki, Multicenter large-scale study of prognostic impact of HER2 expression in patients with resectable gastric cancer, *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, (2014) .
- [5] H.E. Lee, K.U. Park, S.B. Yoo, S.K. Nam, J. Park do, H.H. Kim, H.S. Lee, Clinical significance of intratumoral HER2 heterogeneity in gastric cancer, *European journal of cancer*, 49 (2013) 1448-1457.
- [6] A.K. Nagatsuma, M. Aizawa, T. Kuwata, T. Doi, A. Ohtsu, H. Fujii, A. Ochiai, Expression profiles of HER2, EGFR, MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma, *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, (2014) .
- [7] T. Satoh, R.H. Xu, H.C. Chung, G.P. Sun, T. Doi, J.M. Xu, A. Tsuji, Y. Omuro, J. Li, J.W. Wang, H. Miwa, S.K. Qin, I.J. Chung, K.H. Yeh, J.F. Feng, A. Mukaiyama, M. Kobayashi, A. Ohtsu, Y.J. Bang, Lapatinib plus paclitaxel versus paclitaxel alone in the second-line treatment of HER2-amplified advanced gastric cancer in Asian populations: TyTAN--a randomized, phase III study, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32 (2014) 2039-2049.