

厚生労働科学研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業

乳癌患者における抗体療法の効果・副作用規定因子  
の探索に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 藤原 康弘

平成18(2006)年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
乳癌患者における抗体療法の効果・副作用規定因子の探索に関する研究 -----	1
藤原康弘	
（資料1）臨床試験プロトコール「乳癌患者におけるトラスツズマブ療法の効果規定因子に関する研究」	
II. 分担研究報告	
1. HER2 陽性乳癌患者におけるトラスツズマブ療法の効果規定因子 に関する研究 -----	31
清水千佳子、木下貴之	
（資料2）参考文献リスト	
2. 原発性乳癌における免疫組織染色法と FISH 法による HER2 検索法の比較 関邦彦、清水千佳子、木下貴之 -----	37
3. 血漿内糖鎖関連酵素の酵素活性測定系の構築 -----	41
西尾和人	
4. HER2陽性乳癌患者の臨床検体を用いた遺伝子多型、 遺伝子発現ならびに蛋白質解析 -----	46
関島勝、西尾和人	
5. 乳癌患者におけるトラスツズマブ療法の効果規定因子に関する研究 -----	50
青儀健二郎	
6. HER2 陽性転移性乳癌患者におけるトラスツズマブ療法の効果規定因子 に関する研究 -----	52
井上浩明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	54
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	58

乳癌患者における抗体療法の効果・副作用規定因子の探索

主任研究者 藤原 康弘

国立がんセンター中央病院 第一領域外来部 通院治療センター医長

**研究要旨** 本研究ではトラスツズマブ(抗HER2モノクローナル抗体)による治療をうけるHER2陽性乳癌患者を対象とした臨床試験の中で得られる腫瘍組織及び末梢血を用いてバイオマーカーの検討を行い、得られた情報と臨床効果、副作用との関連性について統計解析を行い、各種バイオマーカーがトラスツズマブに対する感受性あるいは投与された患者に発現する副作用を予測できるものになるか否かを検討する。本年度は、各種バイオマーカーの解析手法の検証および新規測定系の確立を行った。また、本研究の臨床試験としての体制準備を行った。当該施設の倫理委員会で臨床試験に対する承認が得られ、症例登録を開始し、対象患者から、末梢血、針生検による生検組織を採取、サンプルを収集、蓄積している。一部の症例に対し、臨床効果、副作用と上記測定結果との関連性について統計学的手法を用いて解析した。現在までに少数例ながらフコシルトランスフェラーゼ活性が腫瘍縮小効果に寄与する傾向を認める、などの成果が得られている。

分担研究者

清水千佳子 国立がんセンター中央病院  
第一領域外来部 内科医師

木下 貴之 国立がんセンター中央病院  
第一領域外来部 乳腺科医  
長

関 邦彦 国立がんセンター中央病院  
臨床検査部 病理検査室医  
長

西尾 和人 国立がんセンター研究所  
薬効試験部 室長

関島 勝 (株)三菱化学安全科学研究所  
鹿島研究所 先端技術研究部長

青儀健二郎 独立行政法人国立病院機構

四国がんセンター乳腺科医師

井上 浩明 (株)東洋紡ジーンアナリシス  
敦賀ラボラトリー 部長

A. 研究目的

本邦において女性が罹患する癌のうち最も多いものが乳癌であり、年間約4万人が罹患、約1万人が死亡している。そのうちHER2過剰発現を示す患者は全乳癌患者の25%程度であるものの、HER2過剰発現を示す乳癌患者の予後は通常の乳癌患者に比べて著しく悪いことが知られており、当該患

者の治療成績を向上させ、副作用予測法を開発することは厚生労働行政において重要な課題であると考えられる。

トラスツズマブは抗 HER2 ヒト化モノクローナル抗体で、代表的な分子標的薬であり、HER2 蛋白過剰発現または HER2 遺伝子増幅のある転移性乳癌患者の治療におけるキードラッグである。トラスツズマブは抗体医薬品であり標的部位が明確であることから、投与対象患者は、当該患者の乳癌組織が免疫組織染色法や FISH 法により HER2 蛋白を過剰発現あるいは HER2 遺伝子の増幅を示すことを確認することでスクリーニングされている。しかし、前治療の無い当該患者に単剤投与した場合の奏効率（腫瘍縮小効果の得られる確率）は 20-30%、既存の殺細胞性抗癌剤と併用した場合でもその奏効率は 50-75% であり、初回治療時から治療に不応である症例や当初奏効を示していても治療経過中に不応となる症例が大半であり臨床的に大きな問題となっている。さらにトラスツズマブ投与で 5-20% の頻度で発生する心筋障害や投与時反応も重篤な経過を辿ることがあり臨床的に大きな問題となっている。

しかしトラスツズマブ耐性や副作用の発現機序は十分に解明されておらず、現行の治療前の各種診断法ではトラスツズマブの効果・副作用予測は不十分である。したがって本研究では、当該治療効果の差異や重篤な副作用を生んでいる要因を癌細胞（乳癌組織）のみならず宿主（患者）側因子からも探索することを目的とした。

本研究を通じて、トラスツズマブの効果予測因子が明確にし、心筋障害や投与時反応といった副作用の回避の予測ができる

ようになると乳癌治療体系の変革に大きく貢献する。また、これにより個別化治療が発展することは、高額の治療薬（トラスツズマブ 150mg バイアル 1 本の薬価は 8 万円；体重 50 kg の患者はこの薬を毎週 100mg、年余にわたり投与される）の投与対象の厳選や副作用治療にかかる医療費の節減につながり、医療経済学的な効果も高くなると予想される。

## B. 研究方法

トラスツズマブによる治療をうける乳癌患者を対象とした臨床試験の中で得られる腫瘍組織及び末梢血を用いてバイオマーカーの検討を行い、得られた情報と臨床効果、副作用との関連性について統計解析を行い、各種バイオマーカーがトラスツズマブに対する感受性あるいは投与された患者に発現する副作用を予測できるものになるか否かを検討する。

### (1) 各種バイオマーカーの基礎的検討（平成 17-18 年度）（1-2 年目）

現在確立されている解析手法に加えて、以下の各測定項目のアッセイ系を確立する。

- ① 抗腫瘍効果発現の機序と考えられている抗体依存性細胞障害能 (ADCC) に関わる宿主側因子である、患者の抗体受容体部分 (Fc レセプター) の遺伝子多型の測定系の精度検定
- ② ADCC を規定すると考えられる抗体側の因子である糖鎖修飾について、その修飾酵素であるフコシルトランスフェラーゼおよびフコシダーゼの血清中活性測定系の確立
- ③ HER ファミリー等レセプター型チロシンキナーゼの作用に、それら蛋白

質の2量体形成に関わるということが推察される。e-Tag などによる腫瘍組織中の HER2 と他レセプター (EGFR、IGFR 等) との2量体形成量の定量的解析法の標準化

- ④ 同抗体の標的である HER2 遺伝子の遺伝子多型解析検出型の方法論の比較、選定
- ⑤ バイオビーズを用いた、エフェクター細胞である末梢血単核球の遺伝子変動、腫瘍組織および血清中の HER2 およびその下流シグナル蛋白質のリン酸化の網羅的な蛋白質の定量解析系の確率と標準化

トラスツズマブ単独投与例だけでなく、トラスツズマブと化学療法 (5-FU/エピルビシン/シクロホスファミド) の併用治療例において、以下項目に関する追加解析を検討する。

- ⑥ トラスツズマブと化学療法の併用効果評価のため5-FUの標的酵素であるチミジル酸合成酵素に関する遺伝子多型

さらに前記2)の解析を補完する目的で以下項目に関する追加解析を検討する。

- ⑦ フコシルトランスフェラーゼの遺伝子多型解析

## (2) 臨床サンプルの収集と臨床試験の実施 (平成 17-19 年度) (1-3 年目)

本研究は、国立がんセンター中央病院乳腺内科および四国がんセンターにおいてトラスツズマブ投与を受けた患者のうち、文書による同意を得た場合に採取した臨床サンプル (生検による乳がん組織) および末梢血を用いて解析する。当該施設の倫理委

員会で臨床試験に対する承認が得られ、症例登録を開始し、対象患者から、末梢血、針生検による生検組織を採取、サンプルを収集、蓄積している。予定症例数は、レトロスペクティブ解析50例、プロスペクティブ解析80例を予定している。

## (3) 臨床サンプルの解析 (平成 18-19 年度) (2-3 年目)

トラスツズマブによる治療を受けた乳がん患者の腫瘍部および末梢血の臨床検体について上記の項目について測定し、得られた情報と臨床効果、副作用との関連性について統計解析を行う。

### (倫理面への配慮)

本研究は、国立がんセンター、四国がんセンターの各々の倫理委員会の承認を得て実施する。また測定施設にあっても、施設内の倫理委員会の承認を得た後測定を実施する。研究代表者らの研究グループは、既に乳がん患者を対象としたファルマコゲノミクス研究を経験しており、検体の匿名化や管理法などの具体的方法は熟知している。臨床検体の処理・管理は国立がんセンター中央病院支援施設内で行う。臨床検体は臨床試験実施施設内で厳重な匿名化ののち、国立がんセンター、東洋紡ジーンアナリシス、三菱化学安全化学研究所で解析する。

## C. 研究結果

### (1) 基礎的検討

研究初年度の平成 17 年度は、以下の解析手法の検証および新規測定系の確立を行った。

- ① 抗体受容体部分 (FcγR) の遺伝子多型

- ② 糖鎖修飾に関連するフコシルトランスフェラーゼの血清内活性
- ③ 標的となる腫瘍組織における HER2 遺伝子変異
- ④ HER2 蛋白 2 量体形成量
- ⑤ チミジル酸合成酵素に関する遺伝子多型
- ⑥ フコシルトランスフェラーゼの遺伝子多型

に関する解析を検討した。

#### (2) 臨床サンプルの収集と臨床試験の実施

研究初年度の平成 17 年度は、本研究の臨床試験としての体制準備を行った。

国立がんセンター中央病院乳腺内科および四国がんセンター倫理委員会で臨床試験に対する承認が得られ、症例登録を開始し、対象患者から、末梢血、針生検による生検組織を採取、サンプルを収集、蓄積している。

#### (3) 臨床サンプルの解析

平成17年度は、一部の症例に対し、臨床効果、副作用と上記測定結果との関連性について統計学的手法を用いて解析した。

現在までに少数例ながらフコシルトランスフェラーゼ活性が腫瘍縮小効果に寄与する傾向を認める、などの成果が得られている。

### D. 考察

#### (1) 基礎的検討

本年度は、上記の解析手法の検証および新規測定系の確立を行い、当初の計画が達成された。

#### (2) 臨床サンプルの収集と臨床試験の実施

本年度は、本研究の臨床試験としての体制準備を行い、当該施設で臨床試験に対する承認が得られ、症例登録を開始し、サンプルを収集、蓄積している。当初の計画通りに進行している。

平成18年度以降も引き続き、各種バイオマーカーのアッセイ系を確立し、臨床試験における臨床サンプルを収集、蓄積を行い、統計解析による乳癌患者における抗体療法の効果・副作用規定因子を探索する予定である。

本研究結果を踏まえ、治療前の各種診断法に基づき、トラスツズマブの効果・副作用予測が可能になると考えられ、本研究が当該患者の治療成績を向上させ、副作用予測法の開発につながり、個別化治療の発展に寄与すると予想される。

### E. 結論

トラスツズマブに対する感受性あるいは投与された患者に発現する副作用を予測する各種バイオマーカーの基礎的検討を行った。

トラスツズマブによる治療をうける乳癌患者を対象とした臨床試験を実施し、バイオマーカーの検討を行うための腫瘍組織及び末梢血の収集を開始した。

一部のサンプルに対して、得られた情報と臨床効果、副作用との関連性について統計解析を行った結果、各種バイオマーカーがトラスツズマブに対する感受性あるいは投与された患者に発現する副作用を予測できるものとなる可能性が考えられた。

引き続き、アッセイ系の確立、臨床サンプルの蓄積を行い、統計解析による乳癌患者における抗体療法の効果・副作用規定因

子を探査する予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K and Nishio K. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci.* (in press)
2. Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Kinoshita T, Kohno T, Katsumata N, Kang YK, Nishio K and Fujiwara Y. Gene expression profilint of ATP binding cassette (ATP) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* (in press)
3. Shimoyama T, Hamano T, Natsume T, Koizumi F, Kiura K, Tanimoto M and Nishio K. Reference profiling of the genomic response induced by an anti-microtubule agent TZT-1027 (Soblidotin) in vitro. *Pharmacogenomics J.* (in press)
4. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B and Nishio K. Epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* (in press)
5. Sakuma N, Komatsubara Y, Takeda H, Hirose H, Sekijima M, Nojima T and Miyakoshi J. DNA strand breaks are not induced in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields allocated to mobile radio base stations. *Bioelectromagnetics* 27:51-57, 2006.
6. Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Murofushi K, Sekijima M, Kaji N, Tamura T, Saijo N and Nishio K. Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor. *FASEB J.* 20:311-313, 2006.
7. Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T and Saijo N. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer. *Int Thoracic Oncol* 1:31-37, 2006.
8. Arao T, Yanagihara K, Takigahira M, Takeda M, Koizumi F, Shiratori Y and Nishio K. ZD3474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. *Int J Cancer* 118:483-489, 2006.
9. Matsumoto K, Shimizu C, Fujiwara Y. The next step to approaching central nervous system metastasis in HER-2 positive metastatic breast cancer patients. *Asia-Pacific J Clin Oncol*, 2006; 2, 6-8.
10. Ando K, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Hosaka T, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, and Kuroki T. enhancement of sensitivity to tumor nectrosis factor  $\alpha$  in non-small cell lung cancer cells with acquired resitance to gefitinib. *Clin Cancer Res* 11:8872-8879, 2005.
11. Nishio K, Arao T, Shimoyama T, Fujiwara Y, Tamura T and Saijo N. Translational studies for target-based drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 56: s90-s93, 2005.
12. Kimura H, Kasahara K, Sekijima M, Tamura T and Nishio K. Plasma MIP-1  $\beta$  levels and skin toxicitiy in Japanes non-small cell lung cancer patients treated with the EGFR-targeted tyrosine kinase inhibitor, gefitinib. *Lung Cancer* 50: 393-399, 2005.
13. Korfee S, Eberhardt W, Fujiwara Y and Nishio K. The role of DNA microarray in translational cancer

research. *Curr Pharmacogenomics* 3: 201-216, 2005.

14. Shimura M, Saito A, Matsuyama S, Sakuma T, Terui Y, Ueno K, Yumoto H, Yamauchi K, Yamamura K, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Tamasaku K, Nishio K, Nishino Y, Endo K, Hatake K, Mori Y, Ishizaka Y, and Ishikawa T. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum(II) treatment. *Cancer Res.* 65: 4998-5002, 2005.

15. Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, and Hirohashi S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer Sci.* 96: 323-332, 2005.

16. Nishio M, Ohyanagi F, Horiike A, Ishikawa Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Nishio K, and Horai T. Gefitinib treatment affects androgen levels in non-small-cell lung cancer patients. *Br. J. Cancer* 92: 1877-1880, 2005.

17. Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, Saijo N, and Nishio K. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. *Int. J. Cancer* 116: 36-44, 2005.

18. Yamamoto N, Tamura T, Murakami H, Shimoyama T, Nokihara H, Ueda Y, Sekine I, Kunitoh H, Ohe Y, Kodama T, Shimizu M, Nishio K, Ishizuka N, and Saijo N. Randomized pharmacokinetic and pharmacodynamic study of docetaxel: dosing based on body-surface area compared with individualized dosing based on cytochrome p450 activity estimated using a urinary metabolite of exogenous cortisol. *J. Clin. Oncol.* 23: 1061-1069, 2005.

## 2. 学会発表

1. Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Nishio K, Hasegawa T, Ando M, Katsumata N, Kono T, and Fujiwara Y. I

dentification of prediction marker for drug response in gene expression analysis combined with the pharmacodynamic profile in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. The 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2005.12.8-11. San Antonio Texas.

2. Fujiwara Y, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Nishio K, Hasegawa T, Ando M, Katsumata N, and Kono T. Identification pharmacogenomic markers for predicting paclitaxel-related toxicity in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. The 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2005.12.8-11. San Antonio Texas.

3. Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Fukumoto H, and Nishio K. Gene expression profile of ATP binding cassette (ABC) transporter in breast cancer patient in relation to the response to neoadjuvant chemotherapy. The 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2005.12.8-11. San Antonio Texas.

4. Kasahara K, Kimura H, Yoshimoto A, Sone T, Shibata K, Ishiura Y, Kunitoh H, Nishio K, Tamura T, Fujimura M, and Nakao S. A phase □ study of gefitinib monotherapy for chemotherapy-naïve patients with non-small cell lung cancer. American Society Clinical Oncology meeting. 2005.5.13-17. Orlando FL.

5. Shimoyama T, Yamamoto N, Hamano T, Tamura T, and Nishio K. Gene expression analysis to identify the pharmacodynamic effects of docetaxel on the Rho signal pathway in human lung cancer patients. American Society Clinical Oncology meeting. 2005.5.13-17. Orlando FL.

6. Ando K, Ohmori T, Hosaka T, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Ohnishi T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, Arteaga CL, and Kuroki T. Enhancement of TNF- $\alpha$ -sensitivity in gefitinib-acquired resistant non-small cell lung cancer cell lines. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.



7. Ohira T, Tsuboi M, Hirano T, Usuda J, Miyajima K, Suga Y, Honda H, Nakajima N, Kataba H, Ikeda N, Nishio K, Saijo N, and Kato H. Characterization of Gefitinib sensitive human lung cancer cell lines. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
8. Hosaka T, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Ando K, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Onishi T, Horichi N, Nishio K, Fukumoto H, Saijo N, Adachi M, Nakadate T, Arteaga CL, and Kuroki T. Active mutant epidermal growth factor receptor undergoes less protein degradation due to diminished binding to c-Cbl ubiquitin ligase. Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
9. Ishida H, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Ando K, Hosaka T, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Ohnishi T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, Arteaga CL, and Kuroki T. Long term exposure of gefitinib (IRESSA) may induce alternation of activating signaling on MAPK signaling pathway and may cause gefitinib-resistance. Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
10. Arao T, Fukumoto H, Sakai K, Park S, Takeda M, Kimura H, Shimoyama T, Hayama N, Saijo N, and Nishio K. A small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor increases the cellular sensitivity to ZD6474. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
11. Shimoyama T, Yamamoto N, Hamano T, Tamura T, and Nishio K. Gene expression analysis to identify the pharmacodynamic effects of docetaxel on the Rho signal pathway in human lung cancer patients. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
12. Kimura H, Fukumoto H, Park S, Kunito H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. Deletional mutant EGFR detected in circulating tumor-derived DNA from lung cancer patients treated with gefitinib. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
13. Sone T, Kimura H, Yoshimoto A, Sekijima M, Tamura T, Nishio K, and Kasahara K. A new biomarker for skin rash in Japanese NSCLC patients treated with first line monotherapy of gefitinib. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
14. Takeda M, Arao T, Kimura H, Shimoyama T, Hayama N, Sakai K, Park S, Fukumoto H, Fukuoka K, Kimura H, and Nishio K. Molecular determinants for transfection efficiency of siRNA lipofection. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
15. Nishio K. Preclinical and molecular correlative study for EGFR-specific tyrosine kinase inhibitors in Japan. The 20th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium & Meet the Expert. 2005.3.10-12. Nagoya.
16. 清水千佳子、関邦彦、村田有也、古田耕、木下貴之、明石定子、福富隆志、河野勤、安藤正志、勝俣範之、藤原康弘。乳癌におけるHER2スクリーニング：免疫組織染色法(IHC)とFluorescent in situ hybridization(FISH)法の比較。日本癌治療学会総会。2005.10月,名古屋。
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

## 資料1

臨床試験プロトコル「乳癌患者におけるトラスツヅマブ療法の効果規定因子に関する研究」

# 乳癌患者におけるトラスツヅマブ療法の効果 規定因子に関する研究

研究代表者

藤原康弘

国立がんセンター中央病院 内科

連絡先: 〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

TEL : 03-3542-2511

FAX : 03-3542-3815

E-mail : yfujiwar@ncc.go.jp

研究事務局

清水千佳子

国立がんセンター中央病院 内科

E-mail : cshimizu@ncc.go.jp

試験計画書第1案作成

平成16年12月1日

試験計画書第2案作成

平成17年05月10日

試験計画書第3案作成

平成17年07月3日

## 目次

1. 研究の意義
  2. 研究の目的
  3. 対象者の選択
  4. 研究方法
  5. 予想される結果および危険
  6. インフォームドコンセント
  7. 説明・同意文書
  8. 遺伝情報の開示に関する考え方
  9. 本研究の grant support
  10. 研究結果の発表
  11. 研究組織および研究責任者
  12. 参考文献
- 添付 説明同意文書

## 1. 研究の意義

### 1-1 研究の背景

トラスツマブはマウス抗 HER2 ヒト化モノクローナル抗体であり、HER2 タンパク過剰発現または HER2 遺伝子増幅のある転移性乳癌において、単剤投与による腫瘍縮小と、アントラサイクリンまたはタキサンとの併用による化学療法の効果増強が報告されている<sup>1-3</sup>。しかし、トラスツマブ単剤での奏効率は 20-30%程度であり、トラスツマブにパクリタキセル、ドセタキセル、アントラサイクリン、ビンoreルビンなどの殺細胞性抗癌剤との併用で得られる 50-75%の奏効率とは大きな隔りがある<sup>1-6</sup>。また単剤投与、化学療法剤との併用療法のいずれにおいても、不応性の個体が存在し、また奏効例もやがて耐性となり再発癌を根治するにはならず、現在トラスツマブ投与の適応患者のスクリーニングに使用されている免疫組織染色 (Immunohistochemistry, IHC) や Fluorescence in-situ hybridization (FISH) 法などの測定法はトラスツマブの効果予測には不十分であるといえる。

### 1-2 ADCC 活性 (FcγR 遺伝子多型とフコシル化)

モノクローナル抗体であるトラスツマブの作用機序の一つとして、基礎実験においては抗体依存性細胞障害能 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) が基礎的実験にて示唆されている<sup>7</sup>。癌抗体療法における ADCC は、癌細胞表面に接着した免疫グロブリン IgG 抗原 (トラスツマブ) と、殺細胞性細胞 が結合することにより免疫反応が励起される。この ADCC 活性を規定する因子として、近年 FcγR 遺伝子多型と抗体フコシル化が指摘されている。

FcγR は殺細胞性細胞表面に発現している抗体 Fc 部分に対する受容体であり、FcγRI、FcγRII、FcγRIII の3つのクラスが同定されている。その発現は、第1染色体の長腕に存在する8つの遺伝子により調節されている。FcγR の遺伝子多型は自己免疫疾患や感染症の易罹患性に関与している事が報告されており<sup>8</sup>、癌細胞に対する ADCC 活性にも関与している事が期待される。FcγRIIIa をコードする *FCGR3A* 遺伝子多型については 158 塩基の valine (V) と phenylalanine (F) の single nucleotide polymorphism (SNP) が報告されており<sup>9</sup>、Carton らは CD20 に対するキメラモノクローナル抗体であるリツキシマブの抗腫瘍効果と *FCGR3A* の遺伝子多型を検討している<sup>10</sup>。これによるとリツキシマブによって初回治療を受けた 49 名の濾胞性リンパ腫患者において、V/V、F/F、V/F の患者はそれぞれ 20%、35%、45% であり、リツキシマブの 2ヶ月、12ヶ月での奏効率は、V/V の患者で 100%、90%であったのに対し、158F キャリアー (V/F、F/F) 患者においては 67%、51%であった。また末梢血および骨髄における BCL2-JH 遺伝子の rearrangement の消失も V/V 患者において有意に多く認められた。このことから *FCGR3A* の遺伝子型がリツキシマブの臨床的腫瘍縮小効果および分

子生物学的な効果に関与する可能性が示唆された。同じモノクローナル抗体であるトラスツマブに関してはリツキシマブと同様に FcγR の遺伝子多型がトラスツマブの臨床効果に寄与している可能性がある。

ADCC 活性を規定する抗体側の構造的因子としては、糖鎖修飾が報告されている<sup>11</sup>。特にフコースの抗体修飾が ADCC 活性を規定することが報告されており、トラスツマブの生体内におけるフコース修飾の程度と抗腫瘍効果を検討する事は、重要であると考えられる。

### 1-3 HER2 シグナル阻害

トラスツマブの作用機序としては、抗体免疫反応である ADCC の他に、HER2 との抗体結合によるシグナル伝達阻害作用が報告されている。HER2 の構造解析より、HER2 の機能は、リガンド刺激に依存しない 2 量体形成であると考えられ、トラスツマブはその 2 量体形成を阻害する事により下流シグナルを阻害すると考えられている。よって、がん細胞における HER2、もしくはその 2 量体の status を検討する事は、トラスツマブの治療効果の予測に重要である。HER2 と 2 量体を形成する膜型レセプターとしては HER family の他、Insulin-like Growth Factor Receptor (IGFR)などが報告されている。

HER2 の主要な 2 量体形成膜型レセプターは HER family であり、その 2 量体形成阻害により HER1、HER3 などの下流シグナルが阻害される事が報告されている。HER2 を標的としたモノクローナル抗体であるパーツマブは、*in vitro* において、HER3 の下流シグナル阻害が報告されており、2 量体を形成阻害が HER2 以外の下流シグナルを阻害する作用に結びつく事が示唆されている。HER family 以外の膜型レセプターに関する基礎的検討としては、Luらによるトラスツマブの細胞増殖抑制作用とIGFR過剰発現の関与の報告がある<sup>12</sup>。この報告によると、HER2 および IGFR が過剰発現しているヒト乳癌細胞株において、IGF 刺激依存性に、トラスツマブによる細胞増殖抑制効果が示されている。トラスツマブによる HER2 の 2 量体形成阻害は IGFR の下流シグナルを阻害している事が示唆されたことから、トラスツマブの臨床効果予測においては、腫瘍検体に発現している、IGFR などの HER2 と 2 量体を形成する膜型レセプターの status を検討する事が、重要であると考えられる。トラスツマブの臨床効果に関する IGFR の検討としては、Shimizu らによる原発性乳癌と転移性乳癌の手術標本での報告がある<sup>13,14</sup>。しかし、免疫染色による IGFR 単独の発現量とトラスツマブの奏効期間との間に相関は認めなかった。トラスツマブの作用は HER2 阻害を介して生じる事より、臨床効果との相関には、HER family や IGFR などの膜型レセプターと HER2 との 2 量体形成量を直接測定する事が必要であると考えられる。

また、近年、HER family を標的とした薬剤である、EGFR (HER1) チロシキナーゼ阻害薬のゲフィチニブは、そのリン酸化部位の遺伝子変異により、リン酸化阻害効果が異なる事が報告された<sup>16</sup>。HER2 においても、チロシキナーゼ部位の遺伝子変異が報告されており<sup>17</sup>、乳がんにおいては、HER2 の SNP と予後との相関が報告され<sup>18</sup>、HER2 の SNP による機能的変化が示唆されている。よって、ゲフィチニブ同様、トラスツマブにおいてもがん細胞に

おける HER2 リン酸化部位の遺伝子変異が薬剤感受性に関わっている可能性が指摘されている。最近、トラスツズマブと心毒性とに HER2 遺伝子多型が関与しているという報告がなされており<sup>18</sup>、HER2 の遺伝子多型とトラスツズマブとの感受性の関係を強く示唆している。

#### 1-4 バイオマーカー

近年、標的分子薬剤の台頭に伴い、その感受性を予測するバイオマーカーの探索が重要になってきている。ゲフィチニブの感受性バイオマーカーとして、その標的分子である EGFR が絶対的なバイオマーカーでない事が報告されており、hypothesis free のアプローチがバイオマーカーの探索には重要である。臨床検体を用いた、臨床効果に関連するバイオマーカーの同定については、機能が未知のものを含め多数の蛋白質・遺伝子発現情報を網羅的に検出する研究手法として、蛋白・DNA アレイや質量解析の技術がある近年抗がん剤感受性因子の探索に用いられつつある。

cDNA, オリゴヌクレオチドを用いたトランスクリプトーム研究では、網羅的遺伝子発現解析による、抗悪性腫瘍薬の効果予測、予後予測に関わる遺伝子群を同定することが可能となってきている。治療前もしくは治療前後の腫瘍細胞の遺伝子発現解析により、未知の治療効果予測因子、薬剤の作用メカニズムの探索が可能となる。またトラスツズマブの作用機序の一つと考えられる ADCC は、リンパ球等の免疫細胞によって引き起こされる免疫反応であり、患者末梢血単核球は ADCC 活性のサロゲート組織として有効であると考えられる。治療前後末梢血単核球の遺伝子発現変動を解析することにより、薬剤の薬力学的効果を評価する手法が近年報告されており、新しい抗腫瘍効果を予測、評価するバイオマーカーが得られる可能性がある。

一方、血清タンパクはその採取法の簡易さの面においては、バイオマーカーとして最適であるが、従来そのタンパク測定手法は限定されたものであった。近年 bioplex などの抗体反応を利用したタンパク解析技術が実用化してきており、タンパクの網羅的解析が一部可能となりつつある。がん細胞由来の血清中 HER タンパクなどのリン酸化状態や ADCC に付随して放出されるサイトカインの血清濃度は、トラスツズマブの効果予測、評価のバイオマーカーとして期待されるものであり、従来報告されていない新しいバイオマーカーとなる可能性がある。

#### 1-5 研究の意義

冒頭で述べたとおりトラスツズマブは HER2 陽性乳癌患者の予後の改善に寄与するもの、その効果はまだ十分とはいえない。本研究はトラスツズマブ投与をうける患者において、薬剤の生体内での活性の評価 (FcγR の遺伝子多型、やフコシダーゼやフコシルトランスフェラーゼ活性)、その標的分子である HER2 タンパクの評価 (HER2 の 2 量体 status、HER2 遺伝子多型)、そして網羅的アプローチによるバイオマーカーの探索 (遺伝子発現、タンパク) を検討し、その臨床効果の予測、評価を行うものである。上記の手法にてトラスツズマブの効果を正確に予測・評価するファクターを提示することができれば、臨床的には HER2 陽性乳癌患

者においてより効果的あるいは quality of life (QOL) の高い治療方針を提示できると考えられる。

## 2 研究の目的

本研究では以下の項目とトラスツズマブの臨床効果の関連について検討する。

- a. 抗腫瘍効果発現の機序と考えられている抗体依存性細胞障害能 (ADCC) に関わる宿主側因子である、患者免疫細胞の抗体受容体部分 (FcγR) の遺伝子多型解析
- b. ADCC を規定すると考えられる抗体側の因子である糖鎖修飾について、その修飾酵素である患者フコシルトランスフェラーゼの活性測定
- c. トラスツズマブの標的分子である腫瘍細胞における HER2 タンパクの 2 量体とその構成レセプタータンパクの解析
- d. HER2 遺伝子多型とトラスツズマブの臨床効果、有害反応との相関解析
- e. 患者腫瘍組織を用いた、トラスツズマブの臨床効果の予測・作用メカニズムのためのバイオマーカーの探索(遺伝子発現解析)
- f. 患者末梢血単核球を用いた、トラスツズマブの臨床効果の予測・評価のためのバイオマーカーの探索(遺伝子発現解析)
- g. 患者末梢血を用いた、トラスツズマブの臨床効果の予測・評価のためのバイオマーカーの探索(タンパク解析)

## 3 対象者の選択

本研究は、

- ① トラスツズマブ単独療法を受ける再発・進行乳癌患者(単独群)
- ② 術前化学療法併用療法(5FU/エピルビシン/シクロフォスファミド投与後、パクリタキセルトラスツズマブ投与など)および術前化学療法単独(5FU/エピルビシン/シクロフォスファミド投与後、パクリタキセル投与)を受ける乳癌患者(併用群)

を対象とする。②の患者群では、①で得られた結果が併用療法においても評価可能か検討すると同時に、併用療法におけるトラスツズマブ投与群/非投与群を比較する事により、バイオマーカーによる感受性差を検出できるかどうかを検討する。対象者には説明文書を用いて研究の説明を行い、文書による同意を取得する。

## 4 研究方法

### 4-1 予定研究期間および症例数

予定研究期間：2005年8月1日より2008年3月31日

予定症例数：

①トラスツマブ単独療法を受ける再発・進行乳癌患者：目標40例

②術前化学療法併用療法(5FU/エピルビシン/シクロfosファミド投与後、パクリタキセル+/トラスツマブ投与)：目標各40例

バイオマーカーの探索・評価においては、症例数が大きい程、その信頼性が増す。しかし、トラスツマブ単独の奏効率が約25%と予測される状況においては、十分な症例数が得られるまで解析を待つよりも、臨床効果の予測・評価因子が生物学的に同定された時点で、その統計的信頼性は前向き臨床試験にて評価すべきである。よって、対象症例は、期間内(2年半年)にて当病院にて集積可能な全症例とする。目標症例数は、網羅的解析において、一定の統計的信頼性が得られると考えられる、奏効症例10例を得る事を目標とした。



図1 本研究の流れ（単独群/併用群）

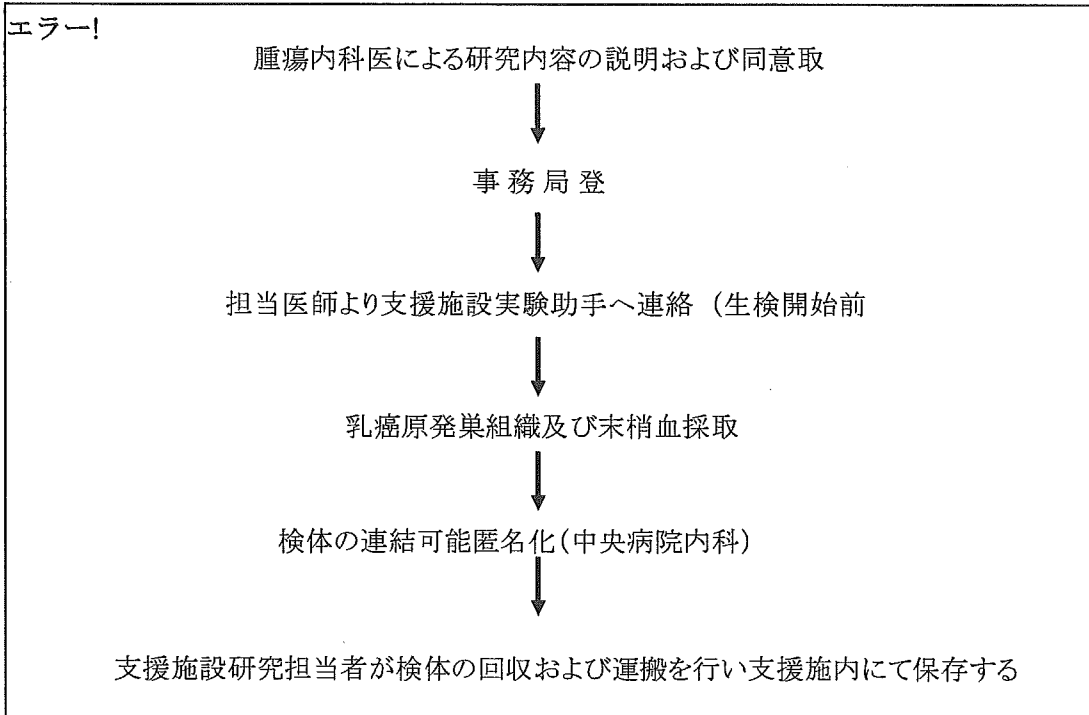
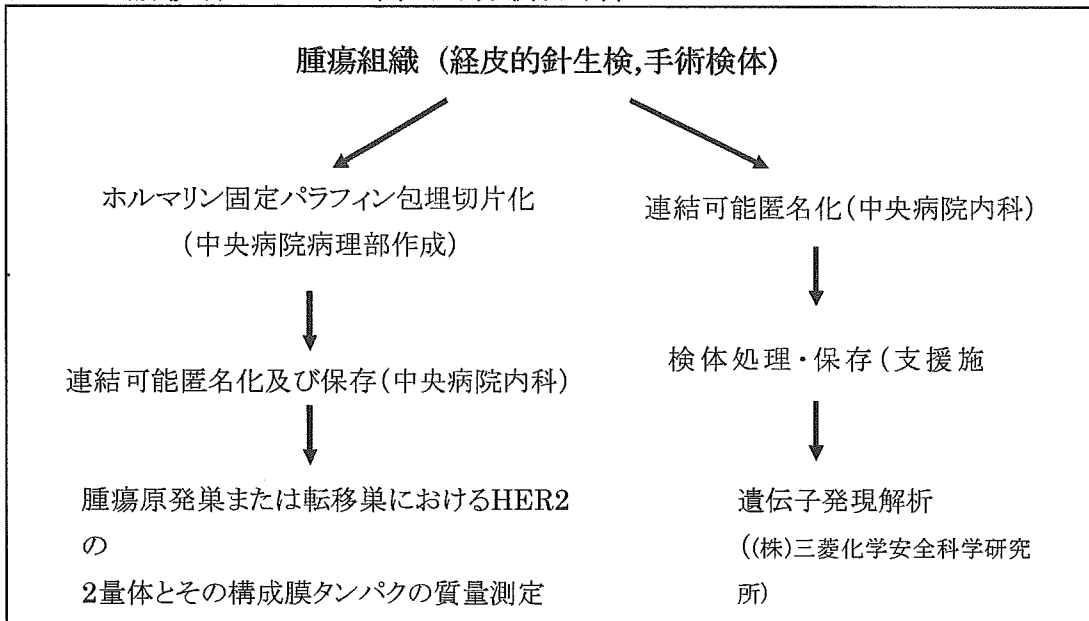


図2 腫瘍検体の流れ（単独群/併用群）



手術検体は、可能な場合のみ遺伝子発現解析に用いる

図3 末梢血検体の流れ (単独群/併用群)

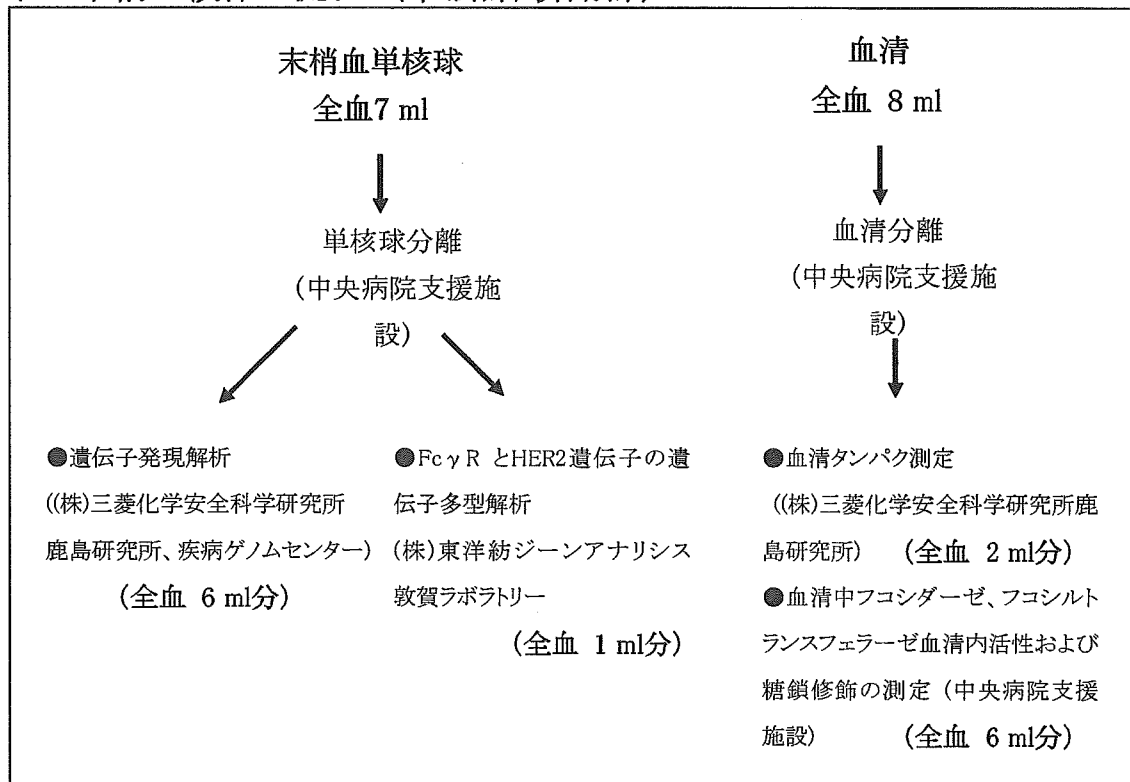
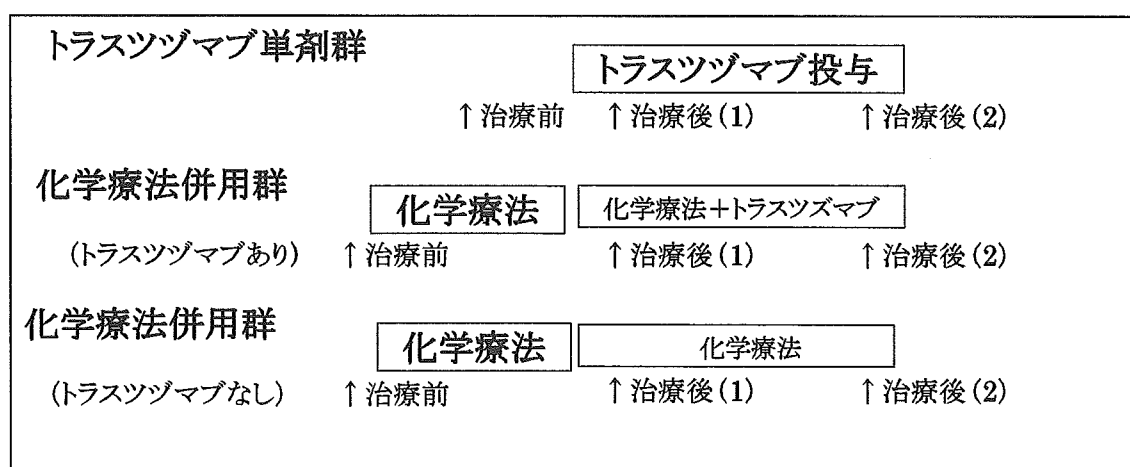


図4 採血ポイント (単独群/併用群)



治療前・・・全項目採血(トータル 15ml)

治療後・・・トラスツズマブ投与後採血、遺伝子発現解析と血清タンパク解析のみ

(トータル 7ml×2 回: 治療後 1(1 週間後)、治療後 2(8 週間

後)).

## 4-2 検体、個人情報取り扱い

本研究の流れを図1に、検体の流れを図2、図3に示す。臨床サンプルは、登録された時点で、がんセンター中央病院にて検体管理責任者(清水)により、連結可能匿名化される。臨床サンプルの処理・管理は研究責任者、国立がんセンター中央病院支援施設内で行う。「国立がんセンター遺伝子解析研究取扱規定」により、個人情報管理者として中央病院副院長を置く。検体の測定および解析は基本的に国立がんセンター中央病院・疾病ゲノムセンターにて実施するが、一部の検体は、(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所および(株)東洋紡ジーンアナリシス 敦賀ラボラトリーにて測定を行う。症例・符号対照表は、国立がんセンター中央病院乳腺内科の検体管理責任者(清水)により厳重に保管するものとし、支援施設や、測定解析担当者に対して個人を特定するような臨床情報は一切伝えない。

### 4-2-1 腫瘍組織

進行・再発乳癌患者において生検を行った場合、腫瘍内科医は当研究内容を説明し同意が得られれば、生検組織の一部を本研究目的に保存する。術前化学療法併用療法を予定されている患者については、腫瘍内科医により当研究内容を説明後、同意を得られた患者について、治療前に本研究目的の core needle biopsy(CNB)標本を2本採取する。治療開始後に生検もしくは当院にて手術治療を受ける患者については、可能な限り腫瘍組織を採取する。

採取された CNB 及び生検検体は、タンパク解析と遺伝子発現解析用に分離し、遺伝子発現解析用は直ちに ISOGEN(RNA 保存液)に浸透させ、可及的速やかに破砕処理を行った後、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて、支援施設内にて保存する。保存チューブには、患者氏名などが特定できない様、提供者識別番号のみを記入する。

タンパク解析用検体は、病理部において、ホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を作成する。プロトコール同意前に診断のために採取された腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いることが可能であれば、それを用いる。プレパラートを病理部より借り受ける場合には、患者氏名などが特定できない様、提供者識別番号のみを記入する。

### 4-2-2 末梢血

腫瘍内科医により当研究内容を説明後、同意を得られた患者のうち、トラスツズマブ投与予定患者から治療前およびトラスツズマブ投与 1、8週間後に、血液それぞれ 15 ml、7ml、7ml 採取する(図 4)。術前化学療法のトラスツズマブ非投与患者においては、トラスツズマブ投与患者と同じタイミングで治療前後の血液を採取する。

採取された検体は、測定項目に応じ、支援施設内にて、末梢血単核球もしくは血清に遠心分離し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存する。末梢血単核球の分離は Lymphocyte Separation Medium (LSM, ICN Biochemical Inc.) 処置を行い、ISOGEN (Nippon Gene)にて保存する。保存チューブには、患者氏名などが特定できない様、提供者識別番号のみを記入する。

#### 4-3 検体等の保存および廃棄

研究期間中は研究実施担当者が研究実施機関である国立がんセンター中央病院支援施設内の冷凍庫内に保管する。提供者の同意が得られた場合には、更なる研究の貴重な資源として、研究期間終了後も同所に保管する。ただし、更なる研究の目的はトラスツマブの効果や有害事象に関連したバイオマーカーの研究に限定したものとする。提供者の希望により試料を廃棄する場合には、しかるべき破壊処理を施した後、廃棄する。

#### 4-4 測定項目

##### a. 末梢血単核球における FcγR 遺伝子、HER2 遺伝子多型の解析

支援施設内にて、分離保存された末梢血単核球サンプルを、(株)東洋紡ジーンアナリシス 敦賀ラボラトリーに於いて、DNA を抽出し、解析を行う。FcγR 遺伝子、HER2 遺伝子ともに遺伝子多型が報告されている領域を含んだプライマー、ビオチン化プライマーを作成し、Allele Specific Primer-PCR (ASP-PCR) 増幅後、プローブに相補的な遺伝子多型を持つ PCR 産物のみをプローブにハイブリダイゼーションさせ、遺伝子多型を解析する。遺伝子多型とトラスツマブの治療効果、有害反応について相関性を統計学的手法により解析を行う。

##### b. フコシダーゼ、フコシルトランスフェラーゼの活性測定およびトラスツマブ糖鎖修飾の測定

患者血清サンプルより、フコシダーゼおよびフコシルトランスフェラーゼ活性を測定する。具体的には、血清をトラスツマブと混和し、PROSEP-A(Millipore)カラムにてトラスツマブを抽出する。トラスツマブの糖鎖修飾の変化は、PA-labeled oligosaccharide standards (TAKARA)を使用し、糖鎖をピリジルアミノ(PA)化し、HPLC にて糖鎖解析を行う。血清中の血清中フコシダーゼ、フコシルトランスフェラーゼの酵素活性は蛍光基質を用いて検出する。

##### c. 腫瘍部における HER2 の 2 量体の測定

ホルマリン固定パラフィン包埋切片 (8μm 切片、10 枚) を使用し、ViroLogic 社に於いて eTag に目的とする抗体を結合し、光刺激にて eTag を遊離させる。これら遊離 eTag をキャピラリー電気泳動装置にて、ピーク位置、高さおよび面積にて標的分子の定量を行う。これにより、HER2 の 2 量体形成量、またその構成タンパク (IGFR など) の定量を行い、トラスツマブの治療効果についての相関解析を行う。

##### d. 遺伝子発現解析

治療前、もしくはトラスツマブ投与後の腫瘍組織、末梢血単核球における遺伝子