

発現解析を行う。治療前の採血の一部(5ml)は、ex vivo にてトラスツズマブ暴露(20 µg/mL 3 時間)を行う。疾病ゲノムセンター及び(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所に於いて RNA を抽出後、RNA を増幅し、cDNA、cRNA を得る。cRNA を RI または蛍光標識し、これらをプローブとして、affimetrix 社などのマイクロアレイとのハイブリダイゼーションを行う。蛍光あるいは RI 強度を可視化し、各遺伝子の発現を数値化し、遺伝子発現プロファイルを解析する。治療前後に変動を示す遺伝子を捕らえる事により、トラスツズマブの薬力学的効果を分子レベルで捕らえ、患者ごとに変動解析をおこなう。抗腫瘍縮小効果やトラスツズマブ血中濃度と相関を示す遺伝子群を捉えることにより、トラスツズマブの作用機序を遺伝子レベルで解析する。また、治療前の採取血液を、ex vivo にてトラスツズマブを暴露することにより得られるプロファイリングで、治療後の遺伝子変動を治療前に捕らえる事ができるか検証し、腫瘍の遺伝子発現解析データと合わせて、治療効果予測モデルを創出する。

e. 血清タンパク測定

Bio-Plex (BIO-RAD) を使用し、(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所にて患者血清サンプルと各種抗体等と反応し、アビジン-ビオチン反応後に Bio-Plex サスペンションアレイシステムにより測定する。サイトカイン(インターロイキン、TNF など)やチロシンキナーゼ膜型タンパク(HER2、pHER2 など)等の血清タンパクの発現量とトラスツズマブの腫瘍縮小効果、有害反応及び予後との関係を統計的に解析を行う。

4-5 臨床効果の判定

腫瘍縮小効果は①トラスツズマブ単独投与群においては、原則としてトラスツズマブ投与開始8週後に画像診断により判定し、PR 以上の場合は12週後に確認する。②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/トラスツズマブ投与)群及び、同化学療法単独(5FU/エピルビシン/シクロfosファミド投与後、パクリタキセル投与)群においても上記と同様の評価を行うが、手術可能症例は病理学的評価も含める。化学療法併用療法群においては、トラスツズマブ投与群/非投与群の2群において、バイオマーカーによる腫瘍効果の差を検出できるか検討する。

5 予想される結果および危険

本研究の主たる目的はトラスツズマブ療法に対する感受性予測に関わる遺伝子情報の検索である。トラスツズマブによる効果を予測することができれば、将来 HER2 陽性乳癌において、より副作用の少ないレジメンの選択など、治療の個別化が実現されることが期待されると共に、

効果が期待できない患者への無意味な治療を省くことが可能となる。また、本研究においては、実際の治療で用いられる事の多い化学療法との併用療法での検討も行うが、併用療法と単独療法との感受性に関わるマーカーの差異を検討した報告はなく、臨床的にも意義深い。

腫瘍検体の採取について、実地臨床においては術前化学療法施行例には原発巣に対する CNB が必須である。研究目的の CNB を 2 本追加することにより少量の出血や痛みなどのリスクはあるが、その侵襲は健康に影響するものではない。再発時には初発時とホルモン受容体、HER2 発現状況が変化することがあるので、実地臨床でも可能ならば生検を行ってホルモン受容体、HER2 発現状況を検索するのが一般的であり、組織の採取は研究によって生じる不利益には該当しない。

本研究における遺伝子発現解析は、RNA を調べるため、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象ではない。しかしその趣旨を踏まえた上での対応を行い、検体の提供者およびその家族への不利益を最小限に留めるよう配慮する。一方、末梢血単核球における FcyR、HER2 の遺伝子型の測定は正常組織から抽出したゲノム解析に当たる為、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に遵守されなければならない。今回の研究において得られる情報は治療効果などの関連性は必ずしも明らかでなく、また開示することで提供者又は第三者の生命、身体等の権利利益を害する恐れがあるために遺伝情報は開示しない。つまり、FcyR および HER2 の遺伝子多型の有無、またこれによる治療効果との関連性の有無に関わらず、情報提供は行わない。検体提供者個人の識別につながる情報は、個人情報管理者により管理され、第三者に渡ることはない。「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。

6 インフォームドコンセント

研究責任者または研究担当者は提供者に対し、本研究の意義、目的、方法、予想される結果、提供者が蒙る可能性のある不利益、資料の保存及び使用方法などについて、十分な説明を行い、文書による同意を取得する。

提供者は自らが与えた同意について、随時、不利益を受けることなく撤回することができる。研究責任者は提供者から同意の撤回があった場合には、当該提供者に関わる資料や結果を廃棄する。ただし、すでに結果が公表されている場合には、研究結果については廃棄しなくてもよい。

7 説明・同意文書

説明同意文書は本研究計画書に添付する。同意文書は原本を診療記録へ保管する。また、コピーを患者本人へ手渡す。

8 遺伝情報開示に関する考え方

本研究において得られる遺伝情報は提供者の状態を評価するための情報として精度や確実性に欠く可能性があり、提供者に還元する情報としては未成熟である。従って、提供者に解析結果は開示しない。その為、遺伝子カウンセリングは行わない。提供者本人の同意がない場合には、提供者以外の人に対し情報は開示しない。

9 本研究の grant support について

本研究は平成17年度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:ファーマコゲノミクス分野、研究課題「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」(H17-ファーマコー006、研究代表者:藤原康弘)によりサポートされる。

10 研究結果の発表

研究の結果は研究責任者あるいは共同研究者がしかるべき英語論文発表及び学会発表の形で発表する。共著者は、投稿前に論文内容をレビューのうえ発表内容に合意した者に限る。

11 研究組織および研究者

研究責任者

国立がんセンター中央病院 内科 藤原康弘

研究事務局

国立がんセンター中央病院 内科 清水千佳子

共同研究者

国立がんセンター中央病院 支援施設 西尾和人

横手秀行

下山 達

武田真幸

国立がんセンター中央病院 病理部 関 邦彦

国立がんセンター中央病院 外科 木下 貴之

四国がんセンター 外科 青儀健二郎

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所 関島 勝

(株)東洋紡ジーンアナリシス 敦賀ラボラトリー 井上浩明

曾根義博

国立がんセンター研究所 情報研究部 山本精一郎

柴田大朗

国立がんセンター研究所疾病ゲノムセンター 吉田輝彦

ViroLogic 社 Mike Dunn

Sharat Singh

研究協力者

国立がんセンター中央病院 内科 勝俣範之

安藤正志

河野 勤

松本光史

米盛 勸

14 参考文献

- 1 Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D et al. Multinational study of the efficacy of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-2648, 1999.
- 2 Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 719-726, 2002.
- 3 Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapy plus monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344: 783-792, 2001.
- 4 Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel chemotherapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 19: 2587-2595, 2001.
- 5 Esteva FJ, Valero V, Booser D et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 1800-1808, 2002.
- 6 Burstein HJ, Kuter I, Campos SM et al. Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 19: 2722-2730, 2001.
- 7 Clynes RA, Towers TL, Presta LG et al. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nature Med* 6: 443-446, 2000.
- 8 Wu J, Edberg JC, Redecha PB et al. A novel polymorphism of Fc γ RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* 100: 1059-1070, 1997.
- 9 Koene HR, Kleijer M, Algra J et al. Fc γ RIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γ RIIIa, independently of the Fc γ RIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90:1109-1114, 1997.
- 10 Carton G, Dacheux L, Salles G et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism of IgG Fc receptor Fc γ RIIIa. *Blood* 99: 754-758, 2002.
- 11 Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E et al. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of Fc γ RIIIa functional polymorphism. *Clin Cancer Res* 10: 6248-6255, 2004.
- 12 Lu Y, Xi X, Zhao Y et al. Insulin-like growth factor-1 receptor signaling and resistance to trastuzumab (HERceptin). *J Natl Cancer Inst* 93: 1852-1857, 2001.
- 13 Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y et al. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. *Hum Pathol* 35:1537-1542, 2004.
- 14 Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y et al. Relation between insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) expression and the efficacy of trastuzumab monotherapy for hormone resistant HER2-positive metastatic breast cancer.

- Proc Am Soc Clin Oncol 22: abstr 9578, 2004.
- 15 Harris LN, Witkiewicz A, Freidman P et al. Breast Cancer Res Treat 82 suppl 1: Abstr 316, 2003.
- 16 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Eng J Med 350: 2129-2139, 2004.
- 17 Cancer Genome Project and Collaborative Group. Intragenic ErbB-2 kinase mutation in tumours. Nature 431: 525-526, 2004.
- 18 A case-control study of the HER2 Ile655Val polymorphism in relation to risk of invasive breast cancer. Breast Cancer Research 7: 357-364, 2005
19. Milano GA, Lescaut W, Formento JL et al. HER2 genetic polymorphism and pharmacodynamics of trastuzumab-based treatment in breast cancer patients. Abs#500: proc ASCO, 2005

「乳癌患者におけるトラスツツマブ療法の効果規定因子に 関する研究」への参加のお願い

1. はじめに

私たちは、乳がんに対するよりよい治療法を開発していくため、「乳癌患者におけるトラスツツマブ療法の効果規定因子に関する研究」を計画いたしました。この説明書は、研究の目的や方法について患者さんのご理解をいただき、研究へ参加を検討していただくために作成したものです。お読みになってわからないことなどがありましたら、担当医または研究事務局に遠慮なくお尋ねください。

2. 研究の目的

ハーセプチンは、HER2 タンパクというがん細胞の表面にあるタンパク質に対する抗体であり、HER2 タンパクをたくさん発現している乳がん（これを過剰発現といいます）の治療薬として近年定着してきました。

しかしハーセプチンの効果は、かならずしも HER2 タンパクを過剰発現しているすべての方に得られるわけではありません。ハーセプチンは、基礎的な研究ではがん細胞の表面にある HER2 タンパクに結合し、免疫反応をおこしたり、がんの細胞増殖をうながす細胞内の情報伝達を遮断したりすることによって治療効果を発揮すると考えられていますが、どのような方に効果が出やすく、どのような方に効果がでにくいかということについてはまだ十分わかっていません。

今回の研究ではハーセプチンの働きを分子レベルで捉えることを目標として

います。実際に、患者さんの免疫反応やがん細胞そのものを分子レベルで調べ

ることによって、ハーセプチンに効く「がん」のタイプをより正確に予測でき

るようにしたいと思っています。これらの研究によって、ハーセプチンの効果

や副作用に関わるメカニズムを見つけ出すことが出来れば、将来、患者さんが
ハーセプチンの治療を受ける前に、効果や副作用をより正確に予測できるよう
になると考えています。

3. 研究の方法

この研究ではこれからハーセプチン単独療法での治療を受ける患者さんと、ハーセプチンを含むまたは含まない術前化学療法を受ける患者さんを対象にしています。

ハーセプチン単独療法を受ける患者さんには、治療前に1回(15 ml)、治療後2回(1週間後と8週間後 各7ml)の採血をお願いします。治療前に治療方針を決定するための生検(組織を採取すること)を行った場合には、その生検の検体を研究目的に利用させていただきます。

術前化学療法を受ける患者さんについては、治療内容にハーセプチンを含む場合、抗がん剤治療前、ハーセプチン併用化学療法の投与1週間後、8週間後に、それぞれ15ml、7ml、7mlの採血をお願いします。ハーセプチンを含まない術前化学療法を受ける患者さんには、ハーセプチンを投与した患者さんと比較するため、ハーセプチンを投与される場合と同じタイミングで同じ量の採血をお願いします。また術前化学療法を行う方は、治療方針を決定するために太い針を用いて乳がん組織を採取します(針生検)が、その際に研究目的に2本余分に組織を採取することをお願いいたします。

ご提供いただいた血液からは、①ハーセプチンの免疫反応にかかわる血液中の酵素活性と、免疫に関わると考えられる蛋白の測定、②血液中単核球の遺伝子発現解析、④血液中単核球の抗体受容体部分の遺伝子解析、⑤血液中単核球のHER2遺伝子の遺伝子解析を行います。ご提供いただいた腫瘍組織からは、⑥乳がん細胞内の情報伝達経路に関連する蛋白の測定、これらの測定結果を実際のハーセプチンの治療効果と比較し、治療効果に関連する因子を検討します

4. 予測される不利益

ハーセプチン治療を受けられる患者さんに対しては3回の採血がありますが、通常の診療の採血と同時に行うようにいたします。採血によって健康状態が影響されることはありません。また生検を行う場合には、出血や痛みがある可能性はありますが、出血が健康へ与える影響はほとんどありませんし、痛みに対しては局所麻酔をしてなるべく苦痛がないよう配慮いたします。

患者さん自身の個人情報、病院内担当医師以外には知らされません。実際血液や生検のサンプルの測定や解析を行う研究者には、患者さんのお名前や病歴番号を数字などの記号にして検体を渡すため、患者さん個人を特定することはできません。また、測定は外部の測定機関によって行われること

もありますが、患者さんのお名前や臨床経過などの個人的な情報が外部に漏れることのないよう厳重に配慮いたします。

今回の研究において一部、正常細胞の遺伝子情報（DNA）を調べさせていただきます。しかし、この情報は研究途上の段階であり、得られる情報は治療効果などの関連性は必ずしも明らかではありません。またこの情報を開示することで患者さんご自身の権利利益を損なう可能性も考えられますので、個々の患者さんに対して遺伝情報を開示することはありません。

5. 研究成果の発表について

研究の結果はしかるべき医学雑誌あるいは学会において公表いたします。研究成果を公表するにあたって、あなたのお名前や個人を特定できるような情報が使用されることはありません。またこの研究はまだ初期の検討段階であり、この研究の結果をもって治療方法が変更されるということはありません。

6. 研究にかかる費用

この研究の費用は、厚生労働省の科学研究費によってまかなわれます。ハーセプチンなどの薬剤を含め治療にかかる費用は、通常の保険診療でおこなわれます。

7. 臨床試験の科学的・倫理的妥当性について

臨床試験の科学的倫理的妥当性についてこの臨床試験の計画内容について、人権と安全性に最大限の配慮を行うため、国立がんセンター倫理審査委員会において科学的および倫理的な側面が審議され、承認を受けています。

8. 研究への参加について

この研究へ参加されるかどうかは患者さまご自身の自由な気持ちでお決めください。研究に参加されなくても、今後の治療の内容や対応には影響しませんのでご安心ください。またいちど研究への同意をいただいた場合にも、いつでも同意を取り消すことができますので、担当医にお申し出ください。但し、同意の取り消しの要求があった場合、すでに結果が公表されている場合には、研究結果については破棄できないことをご容赦ください。

なお、この研究に関してわからない言葉や疑問がありましたら、担当医師に遠慮なくご質問ください。

研究責任者

国立がんセンター中央病院

内科

藤原康弘

研究事務局

国立がんセンター中央病院

内科

清水千佳子

〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

電話番号 03-3542-2511 (代表)

同意文書

国立がんセンター中央病院長 殿

私は「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」について、

研究の背景と目的

研究の方法

予想される不利益

プライバシーの保護

研究にかかる費用

研究への参加と同意の自由

臨床試験の科学的・倫理的妥当性について

その他（ ）

上記の内容を担当医より十分に説明を受け、理解いたしましたので、研究への参加に

- 同意します。
 同意しません。

説明日 年 月 日 担当医署名 _____
同意日 年 月 日 本人署名 _____

平成 17 年度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)
分担研究報告書

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

分担研究者 清水千佳子 国立がんセンター中央病院 内科医師
分担研究者 木下 貴之 国立がんセンター中央病院 乳腺科医長

研究要旨 HER2 陽性乳癌患者におけるトラスツズマブの効果予測規定因子を検討するため、術前化学療法を予定されている患者、およびトラスツズマブ単独療法を予定されている転移・再発乳癌患者において、腫瘍組織およびトラスツズマブの投与前、投与後 1 週後、8 週後の血液検体を採取し、トラスツズマブの治療効果と ADCC 活性 (FcγR 遺伝子多型、抗体のフコース修飾)、HER-family 二量体形成、血清サイトカイン等トラスツズマブの効果を規定する可能性のある因子との関連性を検討する臨床研究を計画した。本研究は国立がんセンター中央病院乳腺グループの院内研究として計画され、平成 17 年 9 月 22 日に国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。平成 16 年 12 月 1 日より症例の登録が開始され、平成 17 年 2 月 28 日までに術前化学療法例 8 例、転移・再発乳癌症例 5 例が登録された。

A. 研究目的

トラスツズマブはマウス抗 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¹⁻³。しかし、トラスツズマブ単剤での奏効率は 20-30%程度であり、トラスツズマブにパクリタキセル、ドセタキセル、アトラサイクリン、ビノレ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たりがある¹⁻⁶。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いたらない。一方現在トラスツズ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ズマブの効果予測には不十分である^{7,8}。

このようにトラスツズマブは 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。トラスツ

ズマブ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) はトラスツズマブの臨床効果に関連している可能性がある⁹⁻²¹。

本研究では実際にトラスツズマブの投与をうける患者より得た臨床検体 (腫瘍組織または血液) を用いて、これらの因子と臨床効果との関連性を評価し、トラスツズマブの効果規定因子を検討する。

B. 研究方法

1. 研究の対象

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。

2. 検体の採取

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、可及的速やかに破碎処理を行った後、-80℃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。

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℃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。

3. 検体・個人情報の取り扱い

臨床検体は、登録された時点で、がんセンター中央病院内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. 測定項目

本研究では以下の項目とトラスツヅマブの臨床効果（腫瘍縮小効果）と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. トラスツヅ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ヅマブの臨床効果、有害反応との相関解析

e. 患者腫瘍組織を用いた、トラスツヅ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、トラスツヅ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、トラスツヅ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）

5. 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トラスツヅ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/シクロフォスファミド投与後、パクリタキセル+/-トラスツヅマブ投与）：目標各40例

C. 研究結果

本研究は国立がんセンター中央病院乳腺グループおよび国立病院機構四国がんセンターの二施設による臨床研究として計画され、平成17年9月22日に国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。国立がんセンター中央病院においては検体の管理、運搬などのシステムを構築し、平成17年12月1日より症例登録を開始した。平成18年2月28日までに国立がんセンター中央病院において術前化学療法例8例、転移・再発乳癌症例5例が登録された。現在のところ登録にともなう問題は発生しておらず、検体採取も順調である。国立病院機構四国がんセンターにおいても平成18年1月に本研究プロトコールを倫理審査委員会に提出した。

D. 考察

今回、HER2陽性乳癌におけるトラスツズマブ療法の効果規定因子に関する臨床研究を計画した。平成17年12月より国立がんセンター中央病院での登録が開始されたが、現在のところ症例集積は順調である。また

臨床検体の取り扱いに関しても特に問題は認められない。

今後、国立病院機構四国がんセンターにおいても同センターの倫理審査委員会の承認を経て症例登録が開始される予定であり、症例集積の進捗速度は増すことが予想される。予定症例数が集積した段階で、各測定項目の測定を実施する予定である。

E. 結論

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を開始した。科学性および倫理性を十分に配慮しながら、今後も症例集積を継続していく。

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

資料 2

参考論文リスト

- 1 Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D et al. Multinational study of the efficacy of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-2648, 1999.
- 2 Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 719-726, 2002.
- 3 Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapeutic plus monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344: 783-792, 2001.
- 4 Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel chemotherapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 19: 2587-2595, 2001.
- 5 Esteva FJ, Valero V, Booser D et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 1800-1808, 2002.
- 6 Burstein HJ, Kuter I, Campos SM et al. Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 19: 2722-2730, 2001.
- 7 Wiley EL, Diaz LK. High-quality HER2-testing: Setting a standard for oncologic biomarker assessment. *JAMA*, 2004; 291: 2019-2020.
- 8 Mass R, Sanders C, Charlene K et al. The concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization in the Herceptin pivotal trials. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2000 (Abst #291) Vogel C, Cobleigh M, Tripathy D et al. Superior Outcomes with Herceptin (trastuzumab) in fluorescence in situ hybridization (FISH)-selected patients. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2001 (Abst #86).
- 9 Clynes RA, Towers TL, Presta LG et al. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nature Med* 6: 443-446, 2000.
- 10 Wu J, Edberg JC, Redecha PB et al. A novel polymorphism of Fc γ RIIIa(CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* 100: 1059-1070, 1997.
- 11 Koene HR, Kleijer M, Algra J et al. Fc γ RIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γ RIIIa, independently of the Fc γ RIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90:1109-1114, 1997.
- 12 Carton G, Dacheux L, Salles G et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism of IgG Fc receptor Fc γ RIIIa. *Blood* 99: 754-758, 2002.
- 13 Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E et al. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of Fc γ RIIIa functional polymorphism. *Clin Cancer Res* 10: 6248-6255, 2004.
- 14 Lu Y, Xi X, Zhao Y et al. Insulin-like growth factor-1 receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 93: 1852-1857, 2001.
- 15 Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y et al. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. *Hum Pathol* 35:1537-1542, 2004.

- 16 Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y et al. Relation between insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) expression and the efficacy of trastuzumab monotherapy for hormone resistant HER2-positive metastatic breast cancer. Proc Am Soc Clin Oncol 22: abstr 9578, 2004.
- 17 Harris LN, Witkiewicz A, Freidman P et al. Breast Cancer Res Treat 82 suppl 1: Abstr 316, 2003.
- 18 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med 350: 2129-2139, 2004.
- 19 Cancer Genome Project and Collaborative Group. Intragenic ErbB-2 kinase mutation in tumours. Nature 431: 525-526, 2004.
- 20 A case-control study of the HER2 Ile655Val polymorphism in relation to risk of invasive breast cancer. Breast Cancer Research 7: 357-364, 2005
21. Milano GA, Lescaut W, Formento JL et al. HER2 genetic polymorphism and pharmacodynamics of trastuzumab-based treatment in breast cancer patients. Abs#500: proc ASCO, 2005.

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

分担研究者 関 邦彦 国立がんセンター中央病院 病理部医師

分担研究者 清水千佳子 国立がんセンター中央病院 内科医師

分担研究者 木下 貴之 国立がんセンター中央病院 外科医長

研究要旨 HER2 陽性乳癌患者におけるトラスツズマブの適応決定にあたり、HER2 の発現状況に関する情報は重要である。現在国内および海外では免疫組織化学染色(IHC)と Fluorescence in-situ hybridization (FISH)が HER2 検索法として推奨されている。今回、我々は HER2 陽性乳癌患者におけるトラスツズマブ療法のスクリーニング法として、FISH を” golden standard” としたときの IHC の妥当性を検討し、IHC, FISH の結果の不一致例についての考察を行った。

A. 研究目的

HER2 は 185kDa の膜貫通型タンパクであり、内因性の TK を介して細胞増殖に関与していると考えられている¹。臨床的に HER2 が過剰発現した乳癌の予後は不良であることが知られており²、また HER2 に対するマウスヒト化モノクローナル抗体である trastuzumab は、HER2 陽性の転移性乳癌における単剤投与で、1st line では 26%³、化学療法耐性例では 15%⁴の奏効率が報告されている。また 1st line で trastuzumab と化学療法と併用することにより、化学療法単独群に比べ生存期間の有意な延長が認められた⁵。これら転移性乳癌における有効性から、HER2 陽性乳癌の術後補助療法としての trastuzumab の意義を検討する大規模臨床試験が現在進行中で

あり⁶、trastuzuman 適応症例のスクリーニングはますます重要になってくるものと思われる。

HER2 の発現は、DNA, mRNA, タンパクのレベルで、それぞれ FISH (Fluorescence in-situ hybridization), RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), 免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry, 以下 IHC)など各種の検査で測定可能である。日本では IHC と FISH が HER2 検索法として保険で承認されている。比較的手技が簡便で安価であるため広く普及しているが、種々の抗体があり、必ずしも手技が最適化、標準化されていないこと、定性的検査であり判定が客観性に欠けることなどの問題がある。一方、FISH は蛍光標識した DNA プローブと染色体上の標的 DNA(HER2)をハイブリダイゼーシ

ョンして、蛍光顕微鏡で可視化し半定量的に HER2 遺伝子の増幅の有無を判定する検査であるが、試薬が高価、手技が煩雑で、判定にも時間がかかるなど、大量の検体処理には適していない⁷。

転移性乳癌に対する 1st line の trastuzumab 単独投与の第 II 相試験の奏効率は、IHC スコア (3+)例で 35%、(2+)例で 0%、FISH 陽性例で 34%であった³。また trastuzumab / paclitaxel 併用療法において、FISH 陽性例、陰性例の奏効率はそれぞれ 75%、44%、IHC の場合、(2+)/(3+)、(0)/(1+)それぞれ 67-81%、41-46%であり⁸。IHC では抗体により奏効率のばらつきがあり、FISH がより正確に trastuzumab の効果を予測できるとされる

Mass らの検討では IHC (0), (1+), (2+), (3+)における FISH 陽性率はそれぞれ 3, 7, 24, 89%であった⁹。また trastuzumab の術後補助療法の意義を検討する現在進行中の臨床試験で、登録施設毎にスクリーニングのために行われた HER2 診断と、HER2 陽性の確認のために行われた中央診断の結果が比較された¹⁰。この結果登録施設と中央診断の一致率は IHC において 79.5%、FISH において 85.0%であった。中央診断の FISH は外部検査機関の FISH の一致率は 95.3%であった。また HER2 陽性転移性乳癌に対する 1st line の trastuzumab / paclitaxel 併用療法の臨床試験のスクリーニング検査では、登録施設と中央診断の IHC の一致率は 77%であった¹¹。このことから HER2 スクリーニングとしての IHC の妥当性については検査施設間差があることが示唆され、米国病理学会(College of American Pathologists)からは、各検査施設において①IHC および FISH の

手技の標準化し、②IHC のスコアと FISH の一致率を算出、そして③IHC(1+)と FISH 陰性の一致率が 95%以上あれば FISH を使用しなくてよいであろう、というコンセンサスが発表されている¹²。

このように HER2 の IHC と FISH の判定との一致率について海外からの報告があるが、日本ではまとまったデータはない。国立がんセンター中央病院では、従来 HER2(2+)と報告された転移性乳癌患者に対する、trastuzumab の適応を判断するために、検査会社に外注して FISH を行っていたが、このたび HER2 の FISH 検査が院内検査として導入されることになった。過去に外注検査に提出した検体 30 例について院内で再検し検討したところ、外注 FISH 検査との判定一致率は 97%、HER2/neu / CEP17 シグナル比の相関係数は 0.925 と良好であった。そこで今回われわれが実地臨床で用いている IHC の HER2 スクリーニングとしての妥当性を明らかにするため、IHC と FISH の一致率を検討し、結果不一致例についての考察を行った。

B. 研究方法

当院にて手術を施行された乳癌症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を対象とした。

① HER2 免疫染色とその判定

10%ホルマリン固定組織を 4 μ m で薄切し、シランコーティングスライドガラスに貼付する。抗原賦活化として容器に入れた抗原賦活液 (0.01mol/L クエン酸緩衝液, pH6.0)中に脱パラフィン・親水化を終えたスライドを浸漬し、オートクレーブで 121 $^{\circ}$ C、10 分間加熱処理を行った。自動染色装置 i6000(米国 BioGenex 社)を用いた LSAB(labeled streptavidin biotinylated