

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

乳癌患者における抗体療法の効果・副作用規定因子
の探索に関する総合的研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤原 康弘

平成19（2007）年 3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 に関する総合的研究	----- 1
藤原康弘	
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	----- 7
清水千佳子、木下貴之	
2. 原発性乳癌術前化学療法の効果予測における HER2 および EGFR 発現の意義 関邦彦、清水千佳子、木下貴之	----- 10
3. 血漿内糖鎖関連酵素の酵素活性測定系の構築及び最適化 西尾和人	----- 12
4. HER2 陽性乳癌患者の臨床検体を用いた遺伝子多型解析 関島勝、西尾和人	----- 17
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	----- 20
青儀健二郎 (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」	
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	----- 57
井上浩明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 58
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 63

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

本研究は、抗HER2抗体トラスツマブの効果、有害事象を規定する因子を探索し、それらを予測するモデルを構築することを目的としている。HER2過剰発現乳癌患者を対象とした前向き臨床試験で得られる腫瘍組織、末梢血液を用いて、①抗体受容体の遺伝子多型解析、②HER2の遺伝子変異解析、③フコシルトランスフェラーゼの遺伝子多型解析、④血清内フコシダーゼ、フコシルトランスフェラーゼ活性の測定、⑤腫瘍組織および末梢血単核球の遺伝子発現解析、⑥バイオビーズを用いた血清蛋白質解析を施行している。今年度は血清フコシダーゼ、フコシルトランスフェラーゼ活性の測定系を確立し、その他の項目とともに臨床サンプルを用いて順調に測定を施行している。また平成18年5月に、国立病院機構四国がんセンターにおいて本研究が倫理委員会で承認され、症例登録が開始された。現在引き続き、国立がんセンター、四国がんセンター両施設において症例を集積している。

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 内科医員
木下 貴之 国立がんセンター中央病院
第一領域外来部 外科医長
関 邦彦 国立がんセンター中央病院
臨床検査部 医長
西尾 和人 近畿大学医学部 ゲノム生物学教室
教授
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 外科医長
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

トラスツマブは遺伝子組み換え型ヒト抗p-185^{HER-2}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選択されている。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%にとどまる。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臨床上大きな問題となっている。また、発熱、全身倦怠などの有害事象、さらにはトラスツマブ投与で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問題となっている。しかし、このトラスツ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、分子標的治療薬でありながら、現行の治療前の各種診断法ではトラスツマブの効果・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3万人が罹患、約1万人が死亡している。またトラスツマブの投与対象となる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いる。そのため、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。

本研究を通じて、トラスツマブの効果予測因子を明確にし、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50kg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

HER2過剰発現乳癌患者を対象とした前向き臨床試験で得られる腫瘍組織、末梢血液検体を用いてバイオマーカーの測定を行っている。測定系が確立していないアッセイは測定系の確立をおこなった。測定により得られたバイオマーカー情報と臨床情報を用いて相関解析を行い、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システム構築を目指している。

1. 各種バイオマーカーの測定と測定系の確立（平成17年－18年度）と臨床サンプルの測定（平成18－19年度）

以下の項目についての測定を実施。

- ① 抗腫瘍効果の発現機序として重要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（FcγR）の遺伝子多型解析
- ② トラスツズマブの標的となる腫瘍組織におけるHER2 遺伝子変異解析
- ③ フコシルトランスフェラーゼの遺伝子多型解析
以上①～③は、データベースより SNP の選定を行いプローブ設計を行う。
- ④ 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、その修飾に関連する酵素であるフコシダーゼおよびフコシルトランスフェラーゼの血清内活性測定
- ⑤ Affymetrix gene Chip U133 plus 2.0 を用いた腫瘍組織および末梢血単核球の遺伝子発現解析
- ⑥ バイオビーズを用いた血清中のHER2およびその下流シグナル蛋白質のリン酸化をはじめとする蛋白質の網羅的解析
- ⑦ e-Tag による腫瘍組織中の HER2/IGFR 等の 2 量

体形成量

2. 臨床サンプルの収集と臨床試験の実施（平成17-19年度）

臨床試験を引き続き国立がんセンター中央病院および四国がんセンターにおいて実施し、症例を集積する。採取した臨床サンプルは一定の処理後保管する。また保管された臨床検体については、調整の後、適時解析に供する。平成19年度前半にサンプル収集を終了する。

3. バイオマーカー情報と臨床情報との関連解析（平成18-19年度）

上記バイオマーカー測定結果および臨床情報を統合し、関連性を統計学的に解析する。解析結果より効果・有害事象に関連する因子を同定し、その後予測モデル構築のための提案をおこなう。

（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、三菱化学安全化学研究所で解析する。

C. 研究結果

1. 各種バイオマーカーの測定と測定系の確立（平成17年－18年度）と臨床サンプルの測定（平成18－19年度）

患者の腫瘍組織、末梢血液検体を用いて以下のバイオマーカーについて検討中である。

- ① 患者の抗体受容体部分（FcγR）の遺伝子多型解析
- ② 腫瘍組織におけるHER2 遺伝子変異解析
- ③ フコシルトランスフェラーゼの遺伝子多型解析
- ④ フコシダーゼおよびフコシルトランスフェラーゼの血清内活性測定
- ⑤ 腫瘍組織および末梢血単核球の遺伝子発現解析

⑥ 血清中のHER2およびその下流シグナル蛋白質のリン酸化をはじめとする蛋白質の網羅的解析

⑦ 腫瘍組織中のHER2/IGFR等の2量体形成量測定

④については、本年度に測定系を確立した。血清内フコシダーゼ活性は、酵素反応による生成物

(4-nitrophenol;黄色、吸光度405 nm)の生成量を分光光度計で測定し定量化する方法で、血清内フコシルトランスフェラーゼ活性は、蛍光基質を用いてこの基質にフコースが転移された生成物をHPLCにて検出、定量化する方法で確立した。それぞれの測定に用いる血清量は100 µl以下で、測定は簡便で、定量性、再現性がある。また本方法を用いて健常人の活性を測定したところ活性に個人間のばらつきがあることが確認された。

①、②、③についてはデータベース検索から頻度、人種差、プローブの設計性を考慮して解析対象SNPを選択後、おのおののプローブを作成した。

⑦については、現時点では実施困難と判断され、引き続き測定法の確立を目指している。

その他の項目も含めて、現在測定を順調に進めている。

2. 臨床サンプルの収集と臨床試験の実施（平成17-19年度）

平成18年5月に、国立病院機構四国がんセンターにおいて本研究が倫理委員会で承認され、症例登録が開始された。平成19年3月6日時点で症例登録数は、術前化学療法例が34例（目標40例）、転移・再発例が15例（目標40例）である。

採取した臨床サンプルは血清、血餅分離、RNA安定化処理など施行後いったん国立がんセンター計画治療病棟支援施設に保管している。その後保管された臨床検体は、適時解析に供している。

3. バイオマーカー情報と臨床情報との関連解析（平成18-19年度）

本試験では、臨床検体の収集が最終的に終了するのが治療開始後8週である。すべての検体収集が終了している例が術前化学療法例が23例、転移・再発例が10例である。検体集積が終了した一部症例において臨床情報の収集を開始した。

D. 考察

一部の測定項目を除いては、ほぼ臨床検体を用いた測定系は確立された。これらの測定系を用いたバイオマーカーの測定は当初の計画通りに進んでいる。また症例登録はおおむね順調であるが、今回の解析対象である転移・再発例の症例登録が予定より若干の遅れが生じているため、研究班内担当者に積極的に症例登録を進めてもらうことを確認した。今後は、乳癌の症例登録を完了し次第、トランスクリプトーム情報を初めとする各種バイオマーカー解析を終了しデータを固定する。次に登録例全例において臨床情報を入手し、各種バイオマーカーと共通のプラットフォーム上で関連付け、統計学的手法によりバイオマーカーを選定する。さらにそれらを用いてトラスツズマブに対する感受性、副作用を予測するためのシステム構築を目指す。

2007年2月にAgendia社のMammaPrint®が、FDAで承認された。本システムは乳癌手術検体を用いてマイクロアレイベースで癌のリスクを予測するシステムであり、一部本研究との共通部分もみられる。しかし我々の検討では手術検体は切除後10分以内に処理を開始してもRNAの崩壊が著しく、解析には不適切であると報告した(分担研究者:清水千佳子、木下貴之)。従って我々は、本研究のシステムをベースにした臨床応用を今後も目指していく。

E. 結論

乳癌の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ためのシステムの構築を目指し、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たバイオマーカーの検討を行っている。これまでにバイオマーカーの測定系を確立し、各種項目の測定を順調に施行している。今後、臨床情報を入手し関連解析を進めていく。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeda M, Arao T, Yokote H, Komatsu T,

- Yanagihara K, Sasaki H, Yamada Y, Tamura T, Fukuoka K, Kimura H, Saijo N, Nishio K. AZD2171 shows potent antitumor activity against gastric cancer over-expressing FGFR2/KGFR. Clin Cancer Res, 2007; (in press)
2. Horiike A, Kimura H, Nishio K, Ohyanagi F, Satoh Y, Okumura S, Ishikawa Y, Nakagawa K, Horai T, Nishio M. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in transbronchial needle aspirates of non-small cell lung cancer. Chest, 2007; (in press)
 3. Sone T, Kasahara K, Kimura H, Nishio K, Mizuguchi M, Nakatsumi Y, Shibata K, Waseda Y, Fujimura M, Nakao S. Comparative analysis of epithelial growth factor receptor mutations and gene amplification as predictors of gefitinib efficacy in Japanese patients with non-small-cell lung cancer. Cancer, 2007; (in press)
 4. Sekine I, Nishio K, Tamura T, Saijo N. A literature review of genes regulating the sensitivity of solid tumor cell lines to cytotoxic agents. Jpn J Clin Oncol, 2007; (in press)
 5. Shimizu C, Ando M, Kouno T, Katsumata N, Fujiwara Y. Current trends and controversies over pre-operative chemotherapy for women with operable breast cancer. Jpn J Clin Oncol, 2007; 37: 1-8.
 6. Yonemori K, Katsumata N, Kaneko M, Uno H, Matsumoto K, Kouno T, Shimizu C, Ando M, Takeuchi M, Fujiwara Y. Prediction of response to repeat utilization of anthracycline in recurrent breast cancer patients previously administered anthracycline-containing chemotherapeutic regimens as neoadjuvant or adjuvant chemotherapy. Breast Cancer Res Treat, 2006; Oct 25; [Epub ahead of print].
 7. Yonemori K, Hasegawa T, Shimizu C, Shibata T, Matsumoto K, Kouno T, Ando M, Katsumata N, Fujiwara Y. Correlation of p53 and MIB-1 expression with both the systemic recurrence and survival in cases of phyllodes tumors of the breast. Pathol Res Pract, 2006; 202: 705-712.
 8. Yonemori K, Ando M, Shibata T, Katsumata N, Matsumoto K, Yamanaka Y, Kouno T, Shimizu C, Fujiwara Y. Tumor-marker analysis and verification of prognostic models in patients with cancer of unknown primary, receiving platinum-based combination chemotherapy. J Cancer Res Clin Oncol, 2006; 132: 635-642.
 9. Matsumoto K, Shimizu C, Fujiwara Y. The next step to approaching central nervous system metastasis in HER2-positive metastatic breast cancer patients. Asia-Pacific J Clin Oncol, 2006; 2: 6-8.
 10. Ohashi R, Takahashi F, Cui R, Yoshioka M, Gu T, Sasaki S, Tominaga S, Nishio K, Tanabe K, Takahashi K. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. Cancer Lett, 2006; (Epub ahead of print)
 11. Nishio K, Arai T. Progress in the field of molecular biology and application of biotechnology to medical oncology. Acta Med Kinki Univ, 2006; 31: 57-62.
 12. Kawaishi M, Yokote H, Kimura H, Kasahara K, Nishio K. Development and characterization of an antibody specifically recognizing a mutant EGFR (L858R) protein expressed frequently in non-small cell lung cancer. Acta Med Kinki Univ, 2006; 31: 67-74.
 13. Nishio M, Taguchi F, Ohyanagi F, Horiike A, Ishikawa Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Nishio K. Gefitinib efficacy associated with multiple expression of HER family in non-small cell lung cancer. Anticancer Res, 2006; 26: 3761-3765.
 14. Kato T, Nishio K. Clinical aspects of epidermal growth factor receptor inhibitors: Benefit and

- risk. *Respirology*, 2006; 11: 693-698.
15. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunito H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. EGFR mutation status in tumor-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting response to gefitinib. *Br J Cancer*, 2006; 95: 1390-1395.
 16. Basaki Y, Hosoi F, Oda Y, Fotovati A, Maruyama Y, Oie S, Ono M, Izumi H, Kohno K, Sakai K, Shikmoyama T, Nishio K, Kuwano M. Akt-dependent nuclear localization of malignant characteristics by ovarian cancer cells. *Oncogene*, 2006; (Epub ahead of print)
 17. Nishio K, Arao T, Kato T, Yokote H. EGFR mutation in various tissues. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006; 58: 39-41.
 18. Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya T. A photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res*, 2006; 66: 7532-7539.
 19. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, Nishio K. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 3915-3921.
 20. Kimura H, Kasahara K, Shibata K, Sone T, Yoshimoto A, Kita K, Ichikawa Y, Waseda Y, Watanabe K, Shirasaki H, Ishiura Y, Mizuguchi M, Nakatsumi Y, Kashii T, Kobayashi M, Kunitoh H, Tamura T, Nishio K, Fujimura M, Nakao S. EGFR mutation of tumor and serum in the gefitinib treated patients with chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer. *Int Thoracic Oncol*, 2006; 1: 260-267.
 21. Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Kinoshita T, Kohno T, Katsumata N, Kang YK, Nishio K, Fujiwara Y. Gene expression profiling of ATP binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 2006; 99: 9-17.
 22. Shimoyama T, Koizumi F, Fukumoto H, Kiura K, Tanimoto M, Saijo N, Nishio K. Effects of different combinations of gefitinib and irinotecan in lung cancer cell lines expressing wild or deletional EGFR. *Lung Cancer*, 2006; 53: 13-21.
 23. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci*, 2006; 97: 642-648.
 24. Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Murofushi K, Sekijima M, Kaji N, Tamura T, Saijo N, Nishio K. Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor. *FASEB J*, 2006; 20: 311-313.
 25. Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, Saijo N. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer. *Int Thoracic Oncol*, 2006; 1: 31-37.
 26. Yamanaka R, Arao T, Yajima N, Homma J, Genkai N, Sano M, Sekijima M, Nishio K. Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients. *Oncogene*, 2006; 25: 5994-6002.
 27. Sakai K, Yokote H, Murakami-Murofushi K, Tamura T, Saijo N, Nishio K. In-frame deletion in the EGF receptor alters kinase inhibition by gefitinib. *Biochem J*, 2006; 397: 537-543.
 28. Shimoyama T, Hamano T, Natsume T, Koizumi F, Kiura K, Tanimoto M, Nishio K. Reference profiling of the genomic response induced by an antimicrotubule agent, TZT-1027 (Soblidotin),

- in vitro*. Pharmacogenomics J, 2006; 6: 388-396.
29. Arao T, Yanagihara K, Takigahira M, Takeda M, Koizumi F, Shiratori Y, Nishio K. ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. Int J Cancer, 2006; 118: 483-489.
30. 青儀健二郎、高嶋成光：各種がんに対する薬物療法 乳がん薬物療法の現状と今後 特集/がん薬物療法の最前線：臨床と研究 83(5)：647-651, 2006.
31. 青儀健二郎、高嶋成光：乳癌に対する分子標的療法 特集ここまできた分子標的療法：総合臨床 55(6)：1643-1647, 2006.

2. 学会発表

国際学会

1. Shien T, Shimizu C, Matsumoto K, Shibata T, Seki K, Akashi-Tanaka S, Kohno T, Andou M, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Correlation between the pathological response classification systems of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in breast cancer patients. San Antonio Breast Cancer Symposium, Dec 14-17, 2006. Abstract 3038.
2. Shimizu C, Seki K, Yonemori K, Ando M, Tanaka SA, Fujiwara Y. Loss of progesterone receptor expression is related to response to preoperative anastrozole in both estrogen-receptor- and progesterone-receptor-positive breast cancer. San Antonio Breast Cancer Symposium, Dec 14-17, 2006. Abstract 4060.
3. Sakai K, Koizumi F, Yokote H, Tamura T, Saijo N, Nishio K. Pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, inhibits the growth of human lung cancer cells mediated by the HER3 signaling pathway. The Joint Meeting of The 3rd ISC International Conference on Cancer Therapeutics and The 11th International

Symposium on Cancer Chemotherapy. Dec 6-8, 2006. Tokyo.

4. Sekine I, Nishio K, Saijo N, Tamura T. A literature review of genes regulating the sensitivity of solid tumor cell lines to cytotoxic agents. The Joint Meeting of The 3rd ISC International Conference on Cancer Therapeutics and The 11th International Symposium on Cancer Chemotherapy. Dec 6-8, 2006. Tokyo.
5. Kenjiro Aogi, Masakazu Toi, Hiroji Iwata, Yoshinori Ito, Muneaki Sano, Yasuyuki Sato, Toshiaki Saeki, and Shigemitsu Takashima. Multicenter phase I/II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of vinorelbine and trastuzumab as first-line therapy for HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. 31st ESMO Congress, Istanbul, Oct 1, 2006.
6. Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Kasahara K, Nishio K. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild- and mutant EFR. American Association for Cancer Research 97th Annual Meeting. Apr 1-5, 2006. Washington DC USA.

国内学会

1. 清水千佳子、下山達、木下貴之、西尾和人、藤原康弘。術前CEFに引き続き paclitaxel 療法と治療前後検体を用いた効果予測マーカーの研究。2006年日本乳癌学会総会（金沢）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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 内科医員
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、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。本研究は平成17年9月22日に国立がんセンター倫理審査委員会により承認され、平成16年12月1日より症例の登録が開始された。また平成18年5月30日には国立病院機構四国がんセンター倫理審査委員会で承認され、症例登録が開始された。平成19年3月6日までに術前化学療法例34例、転移・再発乳癌症例15例（転移・再発乳癌のうち3例は四国がんセンターからの登録）が登録された。今後も症例集積を継続し、平成19年度に臨床検体を用いた解析を行う予定である。

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。また、最近ではトラスツズマブによる術後薬物療法が、予後不良とされるHER2陽性早期乳癌の生命予後を改善することが報告されている。

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、ビン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りがある。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。

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¹⁾。一般にトラスツズマブを含む抗体療法は高価であり、治療効果を事前により正確に予測することが期待されている。

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、ヤ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。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°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。

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。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°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。

3. 測定項目

本研究では以下の項目とトラスツズマブの臨床効果(腫瘍縮小効果)との関連について検討する。

- 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 (Fc γ R) の遺伝子多型解析

- 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
- 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
- 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
- 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)
- 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)
- 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)

4. 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:

- トラスツズマブ単独療法を受ける再発・進行乳癌患者 : 目標40例
- 術前化学療法併用療法 (5FU/エピルピシン/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) : 目標各40例

(倫理面への配慮)

臨床検体は、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、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近畿大学ゲノム生物学講座(西尾和人教授)にて測定を行う。症例・符号対照表は、検体管理責任者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。

遺伝子多型解析に関する項目については、「国立がんセンター遺伝子解析研究取扱規定」に従い、別途遺伝子解析研究倫理審査委員会での承認が得られた後に解析を行う予定である。

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34例、転移・再発乳癌症例12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。

先行研究(平成14-16年度 厚生労働科学研究補助金萌芽的先端医療技術推進研究事業トキシコゲノミクス分野 cDNAアレイを用いた新しい乳癌治療体系この構築に関する研究)にて術前化学療法後の手術標本より回収されたmRNAの質が低いことが指摘されていた。そこで今回手術治療を受けた最初の3例について、乳がん組織、正常乳腺組織から抽出したRNAの質を、マイクロチップ電気泳動(コスモアイ、日立)を用いて検討した。検体は、最初の2例が病理部で確保し(切除後約15分)、3例目は手術室にて切除後直ちに確保して(切除後約10分)RNA抽出処理を行った。いずれの検体においても電気泳動で18sと28sのピークが確認されず、RNAの崩壊が高度であると判断された。以上より手術検体は、マイクロアレイ解析には不適であると判断し、以後解析対象から除外した。切除から短時間で処理を施行しているにもかかわらず、がん組織、正常組織ともにRNAの質の低下が著しいことから、手術時の虚血が原因であることが示唆された。

D. 考察

今回、HER2陽性乳癌におけるトラ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。

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ており、症例集積の進捗速度は増すことが予想される。次年度、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。

術前化学療法後の手術検体について、可及的速やかに検体回収を行い、mRNAの品質を検討したが、回収されたmRNAの崩壊は高度であり、手術検体の発現解析への利用は妥当でないと判断した。

E. 結論

HER2陽性乳癌患者におけるトラツズマブ療法の効果規定因子に関する研究の症例集積を継続中である。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimizu C, Ando M, Kouno T, Katsumata N, Fujiwara Y. Current trends and controversies over preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 2007; 37: 1-8.
2. Matsumoto K, Shimizu C, Fujiwara Y. The next step to approaching central nervous system metastasis in HER2-positive metastatic breast cancer patients. *Asia-Pacific J Clin Oncol*, 2006; 2: 6-8.

2. 学会発表

国際学会

1. Shien T, Shimizu C, Matsumoto K, Shibata T, Seki K, Akashi-Tanaka S, Kohno T, Andou M, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Correlation between the pathological response classification systems of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in breast cancer patients. *San Antonio Breast Cancer Symposium*, Dec 14-17, 2006. Abstract 3038.
2. Shimizu C, Seki K, Yonemori K, Ando M, Tanaka SA, Fujiwara Y. Loss of progesterone receptor expression is related to response to preoperative anastrozole in both estrogen-receptor- and progesterone-receptor-positive breast cancer. *San Antonio Breast Cancer Symposium*, Dec 14-17, 2006. Abstract 4060.

国内学会

1. 清水千佳子、下山達、木下貴之、西尾和人、藤原康弘。術前CEFに引き続くpaclitaxel療法と治療前後検体を用いた効果予測マーカーの研究。2006年日本乳癌学会総会(金沢)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

原発性乳癌術前化学療法の効果予測におけるHER2およびEGFR発現の意義

分担研究者 関 邦彦 国立がんセンター中央病院 臨床検査部医長
分担研究者 清水千佳子 国立がんセンター中央病院 内科医員
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 現在原発性乳癌に対して広く術前化学療法が行われ抗がん剤の進歩とともに良好な効果が報告され、中には腫瘍の病理学的完全消失を認めるものもある。しかし逆に、抗がん剤に対してまったく反応しないものもあり、それらを区別する有用なマーカーは決定的なものはない。今回我々は術前化学療法の効果予測因子としての治療前針生検検体におけるHER2とEGFRの発現の有用性について検討を行った。

A. 研究目的

原発性乳癌に対する治療戦略は、手術、放射線治療そして抗がん剤治療またはホルモン剤治療を効率的に組み合わせ、最大限の効果を得ることが目標とされる。そして、それぞれの治療の適応は多くの研究報告により裏付けられたエビデンスに基づいて決定される。そのような状況の中で、抗がん剤治療の進歩に伴い、原発性乳癌治療における抗がん剤の役割は日々大きくなっている。

局所進行性乳癌に対して、乳房温存療法を目標とした術前化学療法(NAC)はこれまで、広く行われ良好な成績が数々報告されている。また、近年NACによる原発巣の病理学的完全消失(pCR)が報告され始め、さらにそれらの症例が、他の症例と比較して予後が良いことが報告されて以来局所進行乳癌のみならず、比較的小さな乳癌に対してもpCRを目指したNACが広く行われるようになった。しかし、その適応は未だ決定的なものはない。NACによりpCRの効果が認められるのと反対に治療に抵抗性を示し、腫瘍の増大を認める症例も多く存在する。これらの、治療効果を予測する因子を明らかにすることは、今後の乳癌治療における急務であり、現在研究が行われ始めている治療の個別化において欠かせない命題である。

今回われわれは、NACの治療効果の予測因子を明らかにするために、当院においてこれまで行われたNAC症例において治療抵抗性を示した症例および非常に効果を認めたpCR症例について、免疫病理学的検討特にHER2およびEGFRの発現を中心に検討を行った。

B. 研究方法

当院において2001年から2005年に術前化学療法を行った後根治術を施行した403例中、臨床的に抗がん剤に抵抗性で腫瘍の縮小効果を認めなかった(cNC)または腫瘍の増大を認めた(cPD)症例61例と抗がん剤による良好な効果を認め、術後病理検査結果にて腫瘍の完

全消失を認めた(pCR)症例34例を対象とし、治療前に行った針生検の組織検体の免疫病理学的検査結果をこれら2群間で比較検討した。また、抗がん剤に抵抗性であった症例について治療前の針生検による組織と手術により切除された組織の免疫病理学的検査結果を比較し治療前針生検の妥当性も検討した。

免疫病理学的検査項目として、エストロゲンレセプター(ER)、プロゲステロンレセプター(PgR)、HER2およびEGFRを検討し、さらに組織型および組織学的悪性度も比較検討した。

HER2およびEGFR免疫染色とその判定

HER2に対するポリクローナル抗体であるHerceptTest(ダコ)のキットとEGFRに対するモノクローナル抗体であるEGFR pharmDx Kit(ダコ)を用い、ホルマリン固定パラフィン方埋材料から薄切した組織片上で、Autostainer S3400(ダコ)を用いて染色した。判定はともに、3+：大部分の腫瘍細胞膜に強く反応、2+：10%以上の細胞の細胞膜に中等度の反応、1+：10%以上の腫瘍細胞の細胞膜に弱反応、0：陰性とした。ともに3+以上を陽性と判定した。

(倫理面への配慮)

本研究は診療目的に得られた標本を用いるため対象者が蒙る身体的な不利益はない。また検体けんさはすべて院内で行われるため個人情報流出のリスクは低い。研究の結果はしかるべき雑誌誌上・学会において公表するが、個人情報については十分配慮する。

C. 研究結果

NACのregimenは全例、anthracyclineおよびtaxaneの両者が投与されており、さらにHER2陽性の症例にはHerceptinが併用されていた。

治療前針生検の免疫病理学的検査結果において、ER陰性(p<0.0001)、PgR陰性(p=0.025)、Histological grade 3(p<0.0001)、solid tubular type(p=0.024)で優位にpCRの治療効果を認めた。HER2の陽性率は

cPD, cNC群で23%, pCR群で38%、EGFRの陽性率はcPD, cNC群で7%、cCR群で12%とややどちらもcCR群で多く陽性の症例を認めたが、NACの治療効果予測においては優位な因子とはいえなかった。また、上記のNACに効果的な予測因子を持つ症例の中でも治療抵抗性を示す症例があり、それらに絞って再度検討を行ったが、やはりHER2およびEGFRは治療効果を優位に予測可能とはいえなかった。

NACに対して抵抗性を示したcNCおよびcPD症例において、治療前針生検により得られた検体と手術により得られた治療後の検体の免疫病理学的検査結果の比較では両者の結果の一致率はER, PgR, HER2, EGFRでそれぞれ75%, 77%, 79%, 83%であった。また、組織型の一致率は63%であった。

D. 考察

われわれはこれまで、NACの効果予測因子としてER, PgR, Histological gradeおよび組織型の有用性を報告してきた。これらの予測因子は当院における、NAC施行症例において多変量解析で優位にNACの良好な効果を予測していた。今回の、cPD, cNC症例とcCR症例の検討においてもそれらの因子はやはり予測因子として非常に優位な結果であった。しかし、これらの性質を持つ乳癌であっても、NACに抵抗性を示す症例が依然認められ、これらの因子のみでは治療効果を予測し治療方針を決定するのに十分ではない。われわれは、これらの因子に加えてさらに、詳細に適応を決定する目的でHER2およびEGFRに注目し検討を行った。HER2およびEGFRは現在広く使用され始め、良好な効果が報告されている分子標的治療薬のHerceptinやLapatinibのtargetとなるreceptorである。すでにHerceptinについては当院においてもHER2陽性の乳癌に対しては全例投与されている。これらの、因子が今後乳癌治療においてホルモンレセプター同様に重要な役割結果を果たすことは間違いない。しかし、今回の検討においてはどちらも有意に治療効果を予測するものではなかった。他の報告では、Herceptin投与例で優位にpCRの効果を示すといわれておりこれらに関しては今後さらに症例を重ねて検討する必要があると考えた。

治療前の針生検検体と手術後の病理検体の検査結果の比較では、いずれの因子においても同様に80%近い一致率をえられており、NACによる原発巣の性質変化を踏まえて治療前針生検の正確性はある程度保障され、治療前の針生検による治療効果予測は有用であると考えた。

E. 結論

NACの効果予測においてER, PgR, Histological gradeおよび組織型は非常に有用な因子であった。HER2およびEGFRは今回の検討では優位な予測因子とは言えず、subset解析においてもそれらをさらに補充す

る因子とはなり得なかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimizu C, Ando M, Kouno T, Katsumata N, Fujiwara Y. Current trends and controversies over preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. Jpn J Clin Oncol, 2007; 37: 1-8.
2. Matsumoto K, Shimizu C, Fujiwara Y. The next step to approaching central nervous system metastasis in HER2-positive metastatic breast cancer patients. Asia-Pacific J Clin Oncol, 2006; 2: 6-8.

2. 学会発表

1. Shien T, Shimizu C, Matsumoto K, Shibata T, Seki K, Akashi-Tanaka S, Kohno T, Andou M, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Correlation between the pathological response classification systems of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in breast cancer patients. San Antonio Breast Cancer Symposium, Dec 14-17, 2006. Abstract 3038.
2. Shimizu C, Seki K, Yonemori K, Ando M, Tanaka SA, Fujiwara Y. Loss of progesterone receptor expression is related to response to preoperative anastrozole in both estrogen-receptor- and progesterone-receptor-positive breast cancer. San Antonio Breast Cancer Symposium, Dec 14-17, 2006. Abstract 4060.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

血漿内糖鎖関連酵素の酵素活性測定系の構築及び最適化

分担研究者 西尾 和人 近畿大学医学部 ゲノム生物学教室教授

研究要旨 抗体依存性細胞障害 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) は抗HER2モノクローナル抗体トラスツズマブの主要な抗腫瘍効果発現機序である。ADCC活性を規定する抗体側の構造因子として、N-グリコシド結合複合型糖鎖のフコース修飾が重要視されており抗腫瘍効果を左右しうる因子の一つと考えられる。本研究ではHER2陽性乳癌患者において、トラスツズマブの抗腫瘍効果と生体内で受けるフコース修飾の関連性を検討するため、糖鎖修飾関連酵素の血漿内酵素活性測定系の確立、最適化および抗体修飾糖鎖解析システムの構築を行った。

A. 研究目的

本年度における研究実施目標は、抗体糖鎖修飾に関与する血漿内酵素活性測定系の確立とその最適化及び抗体の糖鎖修飾解析系の構築である。

B. 研究方法

(1) 昨年度の結果を踏まえて、糖鎖中のフコシド結合を加水分解しフコースを遊離する酵素であるフコシダーゼ (FUCA) 活性測定系の最適化に関する検討を行った。本酵素の活性は合成基質である 4-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (無色) を用いて、酵素反応の結果生ずる生成物、4-nitrophenol (黄色、吸光度 405nm) を分光光度計で測定することにより測定した。
(2) 糖残基にフコースを転移する糖転移酵素である α 1-6 フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 活性測定系を確立した。本酵素の活性は、蛍光基質を用いて、 α 1-6 フコシルトランスフェラーゼにより GDP-フコースからフコースが転移された生成物を逆層高速液体クロマトグラフィーにて分離し、定量することにより酵素活性を測定した。
(3) トラスツズマブ修飾糖鎖を質量分析により検討した。トラスツズマブをトリプシン、N-グリコシダーゼ F と反応させることにより、修飾糖鎖を遊離させ、遊離した糖鎖を糖鎖補足ビーズにより選択的に補足、ラベル化を行った。ラベル化された遊離糖鎖を MALDI-TOF MS を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はタンパク解析のため、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」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。健常人の血漿は、研究グループのボランティアから得られたものであり、個々人の同意は得られている。

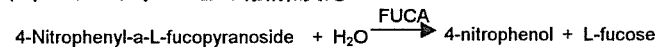
C. 研究結果

血漿中のフコシダーゼ活性を健常人血漿を用いて検

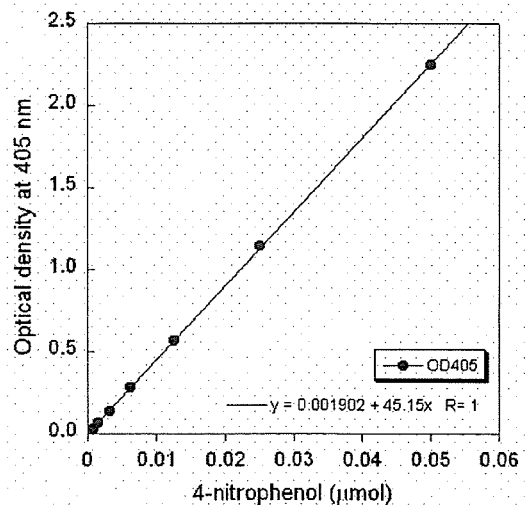
討した。測定値は 4-nitrophenol の標準曲線を用いることにより酵素活性 Unit/L に換算した (図 1)。

図1 フコシダーゼ活性

(A) フコシダーゼの触媒反応

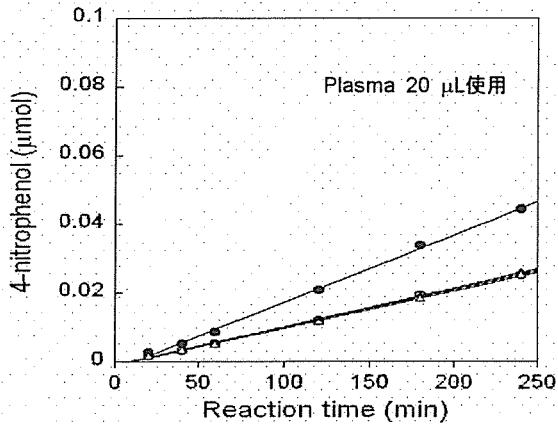


(B) 4-nitrophenolの標準曲線



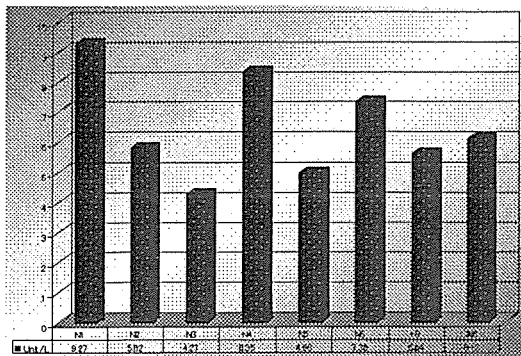
酵素反応による生成物 (4-nitrophenol) の生成量は反応開始 20 分から 240 分まで時間依存的な増加が認められた (図 2)。

図2 フコシダーゼ活性の反応時間依存性



反応時間の検討においては、60分、120分、180分で検討したが、いずれの反応時間においてもほぼ一定の酵素活性値が得られた。使用血漿量の検討では、20 μl、40 μl の血漿量で検討を行いどちらもほぼ一定の酵素活性値が得られた。以上の結果を踏まえて、反応時間 180分、使用血漿量 20 μl で健康人血漿中のフコシダーゼ活性を測定したところ、酵素活性値は 4.3~9.3 Unit/L であった (図3)。

図3 健康人血漿におけるフコシダーゼ活性



測定誤差は十分に許容できる範囲であり、本測定系を用いてヒト血漿中のフコシダーゼ活性が測定可能であった。

α1-6 フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 活性を FUT8 発現細胞の細胞抽出液を用いて検討した (図4)。

図4 α1-6フコシルトランスフェラーゼ活性

(A) α1-6フコシルトランスフェラーゼ の反応経路

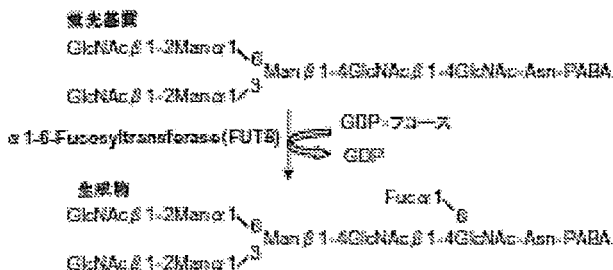
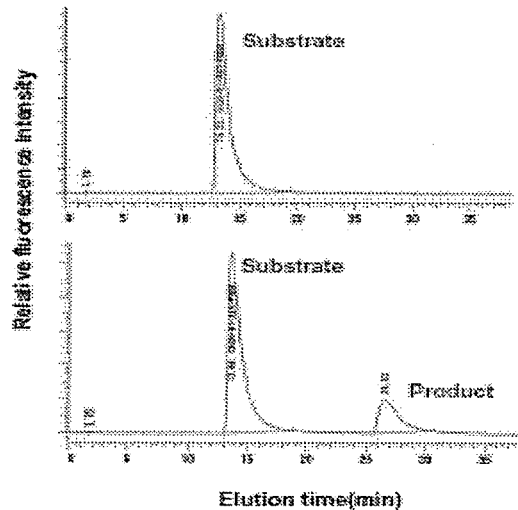
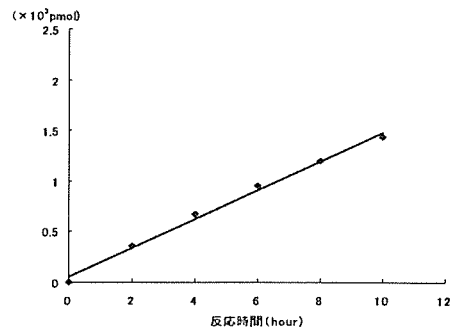


図5 逆相高速液体クロマトグラフィーによる活性測定



酵素反応による生成物は反応時間 10 時間まで時間依存的に増加していた (図5)。

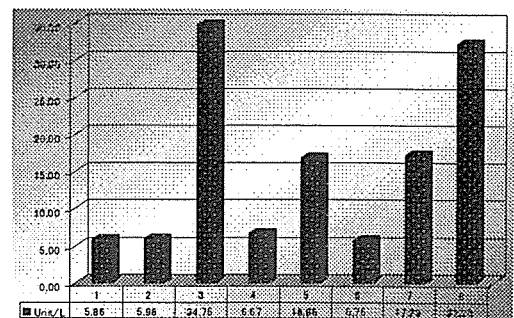
図5 FUT8による生成物の時間



酵素活性値は、標準サンプル (FUT 発現細胞) の活性値と比較することにより Unit/L に換算した。本測定系を用いて健康人血漿中の FUT8 活性を測定したところ、酵素活性値は 5.8~35.4 Unit/L であった (図6)。

測定誤差は十分に許容できるものであった。以上の結

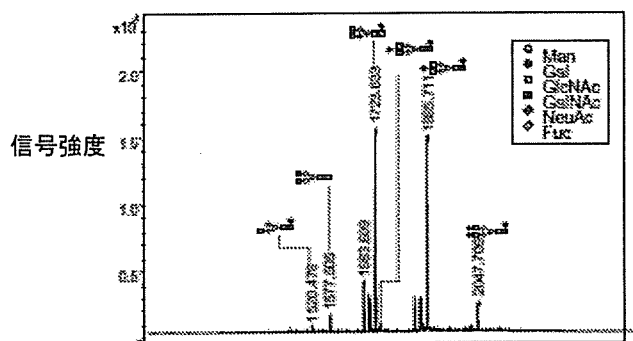
図6 健康人におけるFUT8活性



果より、本測定系を用いて、ヒト血漿中の FUT8 活性の測定が可能であった。

上記の結果を踏まえて、トラスツズマブが生体内で受けるフコース修飾を検討するため、トラスツズマブおよび健康人血漿の糖鎖解析を行った (図7)。

図7 トラスツズマブの糖鎖 (MALDI-TOF/MS)



質量分析 (MALDI-TOF MS) により検出されたトラスツズマブの糖鎖は現在まで報告されている主な修飾糖鎖と一致しており、本測定系を用いて抗体修飾糖鎖の解析が可能であった。

D. 考察

ヒト血漿中のフコシダーゼ、 α 1-6フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 活性測定において、本測定系は必要血漿量がフコシダーゼ活性において90 μ l、FUT8活性において23 μ lと少量の検体で検出可能であった。健常人血漿を用いた酵素活性の検討では、いずれの酵素も個人間において差が認められ、本測定系は、簡便であり臨床検体の測定において有用であると考えられた。さらに、今回検討を行った糖鎖補足ビーズを用いた抗体修飾糖鎖の解析では、今後、トラスツズマブが生体内で受けるフコース修飾の検討において、反応条件、糖鎖の定量化などさらなる検討が必要と思われるが、質量分析を用いて十分に検出可能であり、有用であると考えられた。

E. 結論

ヒト血漿中におけるフコシダーゼ、 α 1-6フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 活性測定において、測定系の確立及び最適化を行った。いずれの酵素も少量の血漿を用いて検出可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeda M, Arai T, Yokote H, Komatsu T, Yanagihara K, Sasaki H, Yamada Y, Tamura T, Fukuoka K, Kimura H, Saijo N, Nishio K. AZD2171 shows potent antitumor activity against gastric cancer over-expressing FGFR2/KGFR. *Clin Cancer Res*, 2007; (in press)
2. Horiike A, Kimura H, Nishio K, Ohyanagi F, Satoh Y, Okumura S, Ishikawa Y, Nakagawa K, Horai T, Nishio M. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in transbronchial needle aspirates of non-small

- cell lung cancer. *Chest*, 2007; (in press)
3. Sone T, Kasahara K, Kimura H, Nishio K, Mizuguchi M, Nakatsumi Y, Shibata K, Waseda Y, Fujimura M, Nakao S. Comparative analysis of epithelial growth factor receptor mutations and gene amplification as predictors of gefitinib efficacy in Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer*, 2007; (in press)
4. Sekine I, Nishio K, Tamura T, Saijo N. A literature review of genes regulating the sensitivity of solid tumor cell lines to cytotoxic agents. *Jpn J Clin Oncol*, 2007; (in press)
5. Ohashi R, Takahashi F, Cui R, Yoshioka M, Gu T, Sasaki S, Tominaga S, Nishio K, Tanabe K, Takahashi K. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer Lett*, 2006; (Epub ahead of print)
6. Nishio K, Arai T. Progress in the field of molecular biology and application of biotechnology to medical oncology. *Acta Med Kinki Univ*, 2006; 31: 57-62.
7. Kawaishi M, Yokote H, Kimura H, Kasahara K, Nishio K. Development and characterization of an antibody specifically recognizing a mutant EGFR (L858R) protein expressed frequently in non-small cell lung cancer. *Acta Med Kinki Univ*, 2006; 31: 67-74.
8. Nishio M, Taguchi F, Ohyanagi F, Horiike A, Ishikawa Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Nishio K. Gefitinib efficacy associated with multiple expression of HER family in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 2006; 26: 3761-3765.
9. Kato T, Nishio K. Clinical aspects of epidermal growth factor receptor inhibitors: Benefit and risk. *Respirology*, 2006; 11: 693-698.
10. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunito H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. EGFR mutation status in tumor-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting response to gefitinib. *Br J Cancer*, 2006; 95: 1390-1395.
11. Basaki Y, Hosoi F, Oda Y, Fotovati A, Maruyama Y, Oie S, Ono M, Izumi H, Kohno K, Sakai K, Shikmoyama T, Nishio K, Kuwano M. Akt-dependent nuclear localization of malignant characteristics by ovarian cancer

- cells. *Oncogene*, 2006; (Epub ahead of print)
12. Nishio K, Arao T, Kato T, Yokote H. EGFR mutation in various tissues. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006; 58: 39-41.
 13. Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya T. A photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res*, 2006; 66: 7532-7539.
 14. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, Nishio K. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 3915-3921.
 15. Kimura H, Kasahara K, Shibata K, Sone T, Yoshimoto A, Kita K, Ichikawa Y, Waseda Y, Watanabe K, Shirasaki H, Ishiura Y, Mizuguchi M, Nakatsumi Y, Kashii T, Kobayashi M, Kunitoh H, Tamura T, Nishio K, Fujimura M, Nakao S. EGFR mutation of tumor and serum in the gefitinib treated patients with chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer. *Int Thoracic Oncol*, 2006; 1: 260-267.
 16. Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Kinoshita T, Kohno T, Katsumata N, Kang YK, Nishio K, Fujiwara Y. Gene expression profiling of ATP binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 2006; 99: 9-17.
 17. Shimoyama T, Koizumi F, Fukumoto H, Kiura K, Tanimoto M, Saijo N, Nishio K. Effects of different combinations of gefitinib and irinotecan in lung cancer cell lines expressing wild or deletional EGFR. *Lung Cancer*, 2006; 53: 13-21.
 18. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci*, 2006; 97: 642-648.
 19. Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Murofushi K, Sekijima M, Kaji N, Tamura T, Saijo N, Nishio K. Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-flame deletion in the epidermal growth factor receptor. *FASEB J*, 2006; 20: 311-313.
 20. Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, Saijo N. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer. *Int Thoracic Oncol*, 2006; 1: 31-37.
 21. Yamanaka R, Arao T, Yajima N, Homma J, Genkai N, Sano M, Sekijima M, Nishio K. Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients. *Oncogene*, 2006; 25: 5994-6002.
 22. Sakai K, Yokote H, Murakami-Murofushi K, Tamura T, Saijo N, Nishio K. In-flame deletion in the EGF receptor alters kinase inhibition by gefitinib. *Biochem J*, 2006; 397: 537-543.
 23. Shimoyama T, Hamano T, Natsume T, Koizumi F, Kiura K, Tanimoto M, Nishio K. Reference profiling of the genomic response induced by an antimicrotubule agent, TZT-1027(Soblidotin), *in vitro*. *Pharmacogenomics J*, 2006; 6: 388-396.
 24. Arao T, Yanagihara K, Takigahira M, Takeda M, Koizumi F, Shiratori Y, Nishio K. ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. *Int J Cancer*, 2006; 118: 483-489.
2. 学会発表
1. Sakai K, Koizumi F, Yokote H, Tamura T, Saijo N, Nishio K. Pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, inhibits the growth of human lung cancer cells mediated by the HER3 signaling pathway. The Joint Meeting of The 3rd ISC International Conference on Cancer Therapeutics and The 11th International Symposium on Cancer Chemotherapy. Dec 6-8, 2006. Tokyo.
 2. Sekine I, Nishio K, Saijo N, Tamura T. A literature review of genes regulating the sensitivity of solid tumor cell lines to cytotoxic agents. The Joint Meeting of The 3rd ISC International Conference on Cancer Therapeutics and The 11th International Symposium on Cancer Chemotherapy. Dec 6-8, 2006. Tokyo.
 3. Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Kasahara K, Nishio K. Antibody-

dependentcellular cytotoxicity of cetuximab
against tumorcells with wild-and mutant EFR.
American Association for Cancer Research
97th Annual Meeting. Apr 1-5, 2006.
Washington DC USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HER2 陽性乳癌患者の臨床検体を用いた遺伝子多型解析

分担研究者 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
分担研究者 西尾 和人 近畿大学医学部 ゲノム生物学教室教授

研究要旨 HER2が過剰発現した転移性乳癌患者の治療において抗HER2抗体トラスツズマブはキードラッグであるが、その治療効果や副作用の程度には個人差が大きい。抗腫瘍効果の機序とされている抗体依存性細胞障害能(ADCC)に影響する宿主側因子として梢血単核球に存在する患者の抗体受容体(FcR)およびトラスツズマブの糖鎖修飾に関わる血清中の酵素(フコシダーゼ、 $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ)の遺伝子多型が考えられる。抗体レセプターFcRの抗体との結合親和性に関わる配列部位および遺伝子多型を検出するため、(1)臨床検体よりDNAの分離、抽出および測定実施までの処理、保管と品質管理を行い、(2)上記遺伝子について遺伝子多型を検出するためのプライマー設計を行った。

A. 研究目的

本研究の本年度の目的は臨床検体よりDNAの分離、抽出および保管を実施し、品質管理方法に付き検討並びに最適化を図るとともに、抗体受容体(FcR)およびフコシダーゼ、 $\alpha 1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼの遺伝子多型を検出するためのプライマー設計を行った。

B. 研究方法

a) DNAの処理、保管および管理

トラスツズマブ治療前採血9 mlの血液を10分間遠心分離し、血漿を1 mlずつ4本に分注し -80°C で凍結保存する。この血漿は蛋白解析に用いられるが、遠心分離した際の沈殿血液1mlを遺伝子多型解析の検体として -80°C で凍結保存する。ゲノムDNAはゲノムDNA抽出キット(キアゲン社)を用いて抽出後、SNP解析に用いる。

b) SNP解析に用いるプローブ設計

抗体受容体(FCGR1A, FCGR2A, 2B, FCGR2C)と血清中抗体の糖鎖修飾関連酵素(FUCA1, FUCA2, FUT8)についてSNPのプローブを設計した。NCBIデータベースおよびイルミナ社のSNPデータベースより上記遺伝子のSNPをその上流、下流の5kbを含んで抽出し、エクソン、イントロ等の部位、プローブの T_m 値、遺伝子多型の頻度、人種差などを考慮し、絞込みを行った。

(倫理面への配慮)

本年度分担研究では、臨床サンプルを用いることなく実施したため、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針の適用外である。今後、臨床サンプルを解析するに当たっては、各施設の倫理委員会の承認後、連結可能匿名化された検体の解析を実施する。

C. 研究結果

これまで46例の登録が行われ全例から採血等の臨床検体試料が提出されている。計画通り検体の処理並びに保存が行われ、これまで検体処理上のトラブ

ルは生じていない。

SNPプローブは384個を一度に搭載できる基盤(イルミナ社)に載せ、ゴールドゲイト法を用いて遺伝子多型測定を計画し、この測定系に最適化させるべくSNPsプローブを設計した。抗体受容体であるFCGR1A, FCGR2A, FCGR2B&2Cに関しては計175 SNPsを、また糖鎖修飾関連酵素はFUCA1, FUCA2, FUT8より計94 SNPsを絞り込んだ。

D. 考察

少量の末梢血から確実にDNA分離抽出し遺伝子多型解析に供するには、検体採取後個人情報保護に留意し、かつ速やかな搬送と連携が重要である。本研究では臨床試験事務局内に試験治療および検体採取のスケジュール管理専従者を設け、主治医と検体処理チームとの密な連絡を行いスムーズな研究の実施に貢献している。

我々が設計したカスタムSNPセットは抗体治療におけるADCC活性を規定する宿主側因子に特化したSNPセットであり、ADCC活性を主な作用機序とする抗体医薬の抗腫瘍効果の個人差を検出する有用な解析法であると考えられる。

E. 結論

本研究の臨床検体の処理並びに管理は、計画された方法のもと、46例の登録が行われた。

抗体受容体(FCGR1A, FCGR2A, 2B, FCGR2C)と血清中抗体の糖鎖修飾関連酵素(FUCA1, FUCA2, FUT8)について計269個のSNPのプローブを設計した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Horiike A, Kimura H, Nishio K, Ohyanagi F, Satoh Y, Okumura S, Ishikawa Y, Nakagawa K, Horai T, Nishio M. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in

- transbronchial needle aspirates of non-small cell lung cancer. *Chest*, 2007; (in press)
2. Sone T, Kasahara K, Kimura H, Nishio K, Mizuguchi M, Nakatsumi Y, Shibata K, Waseda Y, Fujimura M, Nakao S. Comparative analysis of epithelial growth factor receptor mutations and gene amplification as predictors of gefitinib efficacy in Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer*, 2007; (in press)
 3. Sekine I, Nishio K, Tamura T, Saijo N. A literature review of genes regulating the sensitivity of solid tumor cell lines to cytotoxic agents. *Jpn J Clin Oncol*, 2007; (in press)
 4. Nishio K, Arao T. Progress in the field of molecular biology and application of biotechnology to medical oncology. *Acta Med Kinki Univ*, 2006; 31: 57-62.
 5. Kawaishi M, Yokote H, Kimura H, Kasahara K, Nishio K. Development and characterization of an antibody specifically recognizing a mutant EGFR (L858R) protein expressed frequently in non-small cell lung cancer. *Acta Med Kinki Univ*, 2006; 31: 67-74.
 6. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunito H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. EGFR mutation status in tumor-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting response to gefitinib. *Br J Cancer*, 2006; 95: 1390-1395.
 7. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, Nishio K. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 3915-3921.
 8. Kimura H, Kasahara K, Shibata K, Sone T, Yoshimoto A, Kita K, Ichikawa Y, Waseda Y, Watanabe K, Shirasaki H, Ishiura Y, Mizuguchi M, Nakatsumi Y, Kashii T, Kobayashi M, Kunitoh H, Tamura T, Nishio K, Fujimura M, Nakao S. EGFR mutation of tumor and serum in the gefitinib treated patients with chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer. *Int Thoracic Oncol*, 2006; 1: 260-267.
 9. Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Murofushi K, Sekijima M, Kaji N, Tamura T, Saijo N, Nishio K. Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor. *FASEB J*, 2006; 20: 311-313.
 10. Yamanaka R, Arao T, Yajima N, Homma J, Genkai N, Sano M, Sekijima M, Nishio K. Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients. *Oncogene*, 2006; 25: 5994-6002.
2. 学会発表
1. Yokote H, Kawaishi M, Sakai K, Fukai J, Kato T, Fukui T, Matsumoto K, Maegawa M, Tanaka K, Velasco M, Fujita Y, Arao T, Koizumi F, Saijo N, Nishio K. Development and characterization of a recombinant antibody against active EGFR mutant, L858R. The Joint Meeting of The 3rd ISC International Conference on Cancer Therapeutics and The 11th International Symposium on Cancer Chemotherapy. Dec 6-8, 2006. Tokyo.
 2. Kimura H, Kasahara K, Sone T, Tamori S, Araya T, Nishio K. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum of patients with non-small cell lung cancer. The Joint Meeting of The 3rd ISC International Conference on Cancer Therapeutics and The 11th International Symposium on Cancer Chemotherapy. Dec 6-8, 2006. Tokyo.
 3. Sekine I, Nishio K, Saijo N, Tamura T. A literature review of genes regulating the sensitivity of solid tumor cell lines to cytotoxic agents. The Joint Meeting of The 3rd ISC International Conference on Cancer Therapeutics and The 11th International Symposium on Cancer Chemotherapy. Dec 6-8, 2006. Tokyo.
 4. Sakai K, Yokote H, Tamura T, Saijo N, Nishio K. Pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, inhibits the growth of human lung cancer cells mediated by the HER3 signaling pathway. American Association for Cancer Research 97th Annual Meeting. Apr 1-5, 2006. Washington DC USA.
 5. Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Kasahara K, Nishio K. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild- and mutant EFR. American Association for Cancer Research 97th Annual Meeting. Apr 1-5, 2006.