

Washington DC USA.

6. Kimura H, Fujiwara Y, Kawaishi M, Tamura T, Nishio K. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in pleural effusion from non-small cell lung cancer patients. American Association for Cancer Research 97<sup>th</sup> Annual Meeting. Apr 1-5, 2006. Washington DC USA.

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

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

分担研究者 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

研究要旨 乳癌患者におけるトラスツヅマブ療法の効果を規定する因子として、患者末梢血単核球における薬剤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）を検討し、その臨床効果の予測、評価を行う。この研究に平成18年度にHER2タンパク陽性でトラスツヅマブ単独療法を受ける3例の再発・進行乳癌患者の登録を行った。

A. 研究目的

トラスツヅマブは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。トラスツヅ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、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）を検討し、その臨床効果の予測、評価を行う。

B. 研究方法

本研究では以下の項目とトラスツヅマブの臨床効果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（FcγR）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
- 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
- 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）
- 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）
- 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）

対象は、①トラスツヅ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/トラスツヅマブ投与など）および術前化学療法単独（5FU/エピルピシン/シクロフォスファミド投与後、パクリタキセル投

与）を受ける乳癌患者（併用群）、であり、当院は①の症例登録を担当している。予定研究期間は2005年8月1日より2008年3月31日、①群の目標は40例である。

（倫理面への配慮）

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FcγR、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、FcγR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、第三者に渡ることではない。

C. 研究結果

予定研究期間：2007年1月19日現在15例の登録がなされており、3例の再発・進行乳癌患者の登録を行った。

D. 考察

トラスツヅ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。研究結果が待たれる。

E. 結論

本研究により、乳癌患者に対しトラスツヅマブにより効果的あるいはquality of life (QOL) の高い治療の提供を目指す方針が明らかになる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 青儀健二郎、高嶋成光：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 各種がんに対する薬物療法：臨床と研究 83(5)：647-651, 2006.
2. 青儀健二郎、高嶋成光：乳癌に対する分子標的療法 特集/ここまでの分子標的療法：総合臨床 55(6)：1643-1647, 2006.

### 2. 学会発表

1. 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 trasutuzumab as first-line therapy for HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. 31<sup>st</sup> ESMO Congress, Istanbul, Oct 1, 2006.

## 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

資料 1

# 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<sup>1-3</sup>。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たりがある<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いたらず、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ズ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 (トラスツズマブ) 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ズ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) チロシン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、チロシン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、蛋白質・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/シクロフォスファミド投与後、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）

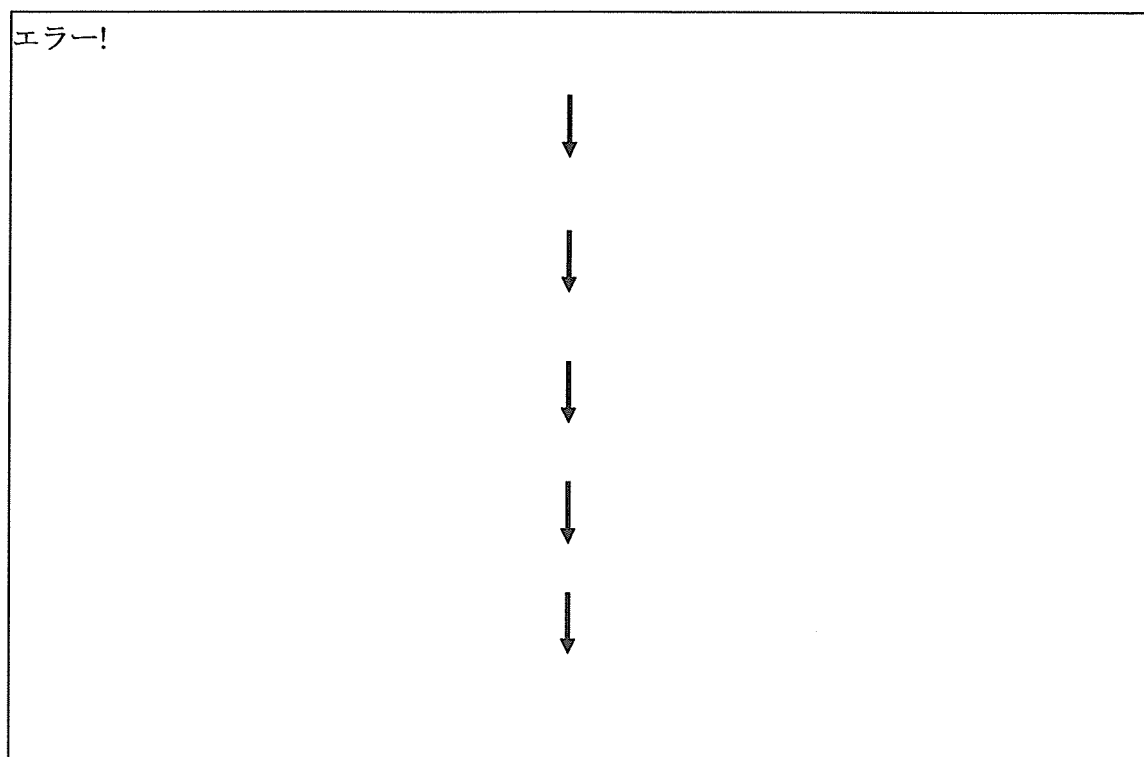
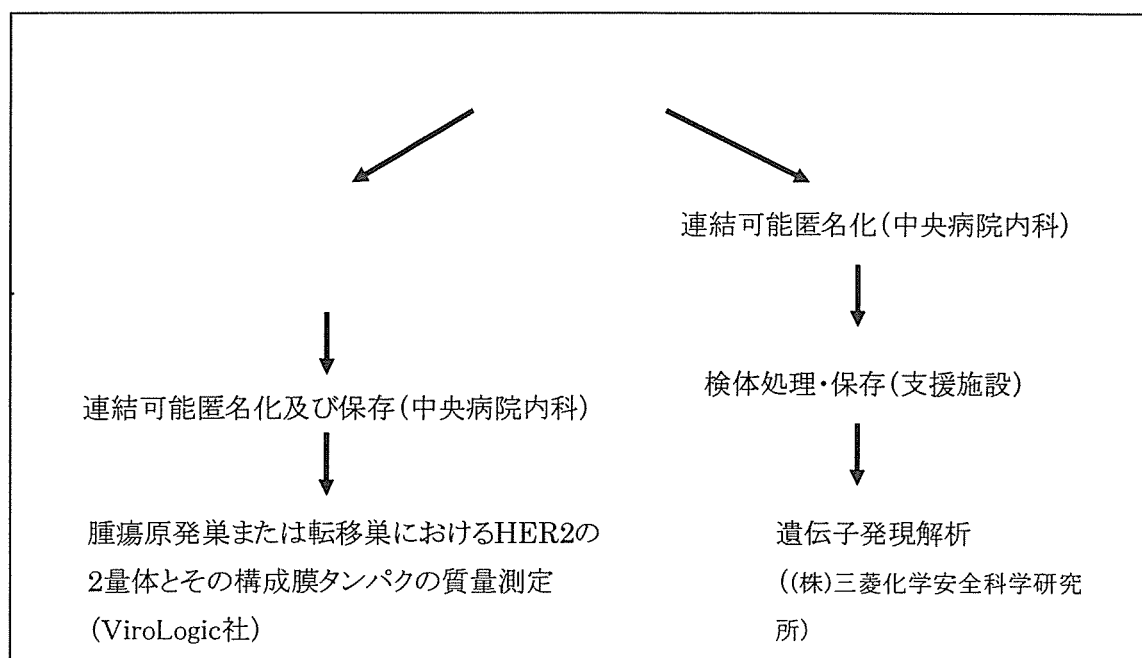


図2 腫瘍検体の流れ（単独群/併用群）



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）

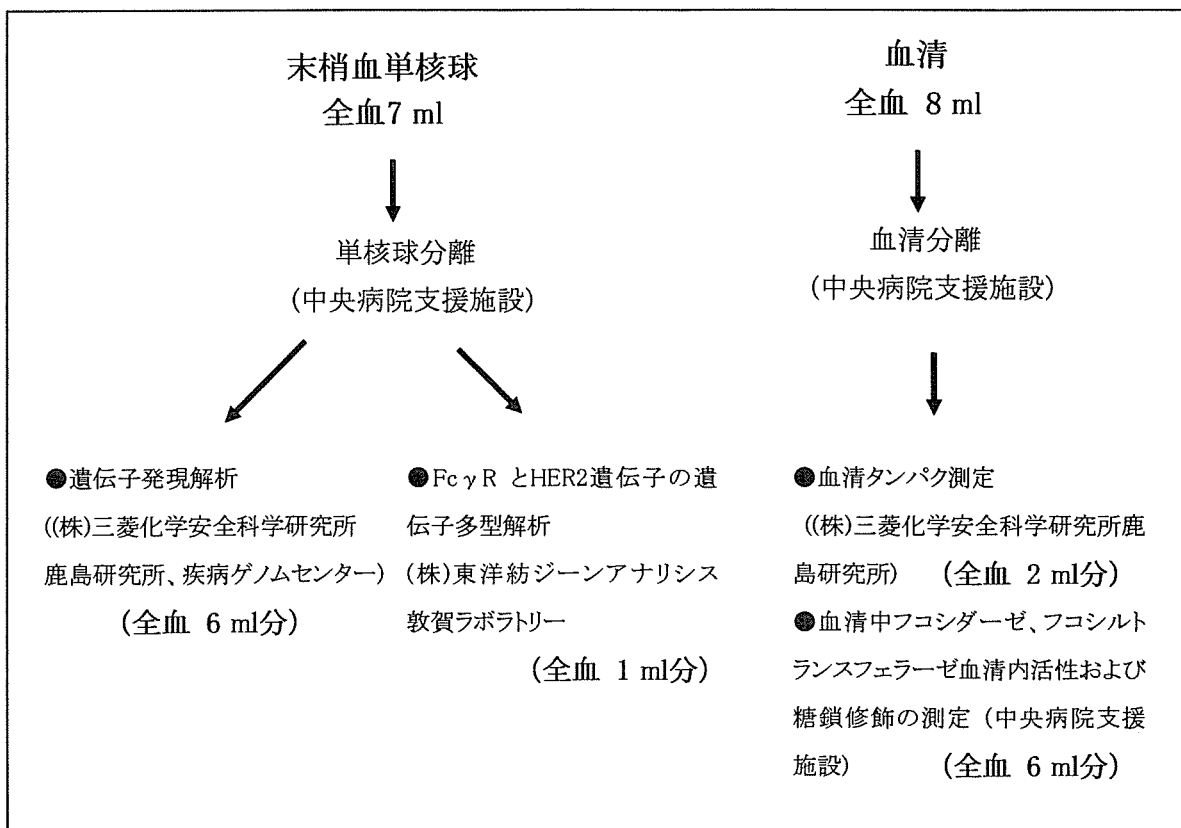
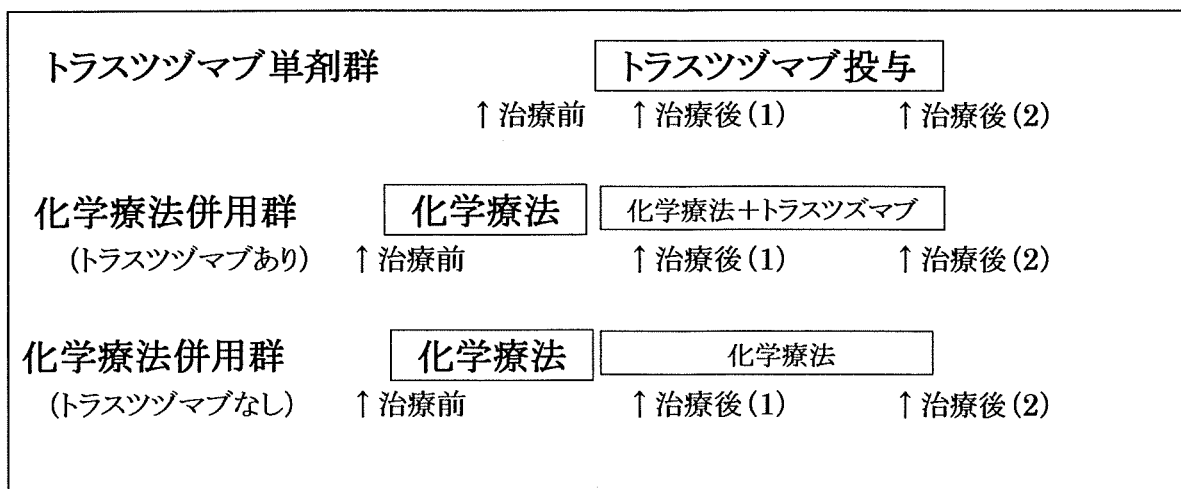


図4 採血ポイント（単独群/併用群）



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、個人情報の取り扱い

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。

### 4-2-1 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℃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、7m、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。

## 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FcγR、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、FcγR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、第三者に渡ることではない。「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-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. Mutinational study of the efficacy of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapeutic 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 therapeutic 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  $\gamma$  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  $\gamma$  RIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc  $\gamma$  RIIIa, independently of the Fc  $\gamma$  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  $\gamma$  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  $\gamma$  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 Engl 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