

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤原 康弘

平成20（2008）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	
(資料1) 研究成果に関する資料	
(資料2) 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. 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	
小泉史明	35
2. 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	39
3. 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	
田村研治	46
4. 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) の遺伝子およびHER2遺伝子多型解析	
関島 勝	49
5. 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	
清水千佳子、木下貴之、青儀健二郎	51
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	56
IV. 研究成果の刊行物・別刷	65

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

主任研究者 藤原 康弘 国立がんセンター中央病院 臨床検査部長

研究要旨

抗HER2モノクローナル抗体であるトラスツズマブの効果予測因子を、HER2過剰発現乳癌患者を対象とした前向き臨床試験から得られた腫瘍検体又は末梢血液検体を用いて解析した。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析、トラスツズマブの糖鎖修飾に関連する酵素の血清内活性の定量化、血漿中タンパクのN型糖鎖の解析、抗体受容体(FcR)や糖鎖修飾関連酵素の遺伝子多型解析、HER2遺伝子変異解析などを行い、臨床情報との相関性を検討した。Fc γ R IIIa-158 valine (V)/phenylalanine (F)の多型において、V/VのHome型がHetero型およびWild型と比較して、トラスツズマブを含む術前化学療法(N)症例における病理学的完全寛解(pCR)や進行・再発乳癌(M)症例におけるトラスツズマブの奏効が高いことを明らかにした。血清中のフコシダーゼ、フコシルトランスフェラーゼを定量した結果、M症例において、フコシダーゼ活性値が高い群は低い群と比較し有意な無増悪期間の延長が得られることを明らかにした。又、血漿中タンパクのN型糖鎖解析では35種類の糖鎖が得られ、2534糖鎖が高い群では有意にトラスツズマブの奏効が高く、又、有意な無増悪期間の延長を認めた。さらに、マイクロアレイによる遺伝子発現解析により、N症例においてpCRと相関する遺伝子候補プロファイル、M症例において奏効と相関する遺伝子候補プロファイルをそれぞれ同定した。今後、十分な観察期間の後、無再発生存期間や全生存期間との相関性を検討する。今回得られた、複数のバイオマーカーについては、新たな前向き臨床試験において検証する(Validation)ことを計画する。

分担研究者

小泉 史明 国立がんセンター研究所
腫瘍ゲノム解析・情報研究部室長
西尾 和人 近畿大学医学部
ゲノム生物学教室 教授
田村 研治 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
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 乳腺科医長
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
清水千佳子 国立がんセンター中央病院
第一領域外来部 乳腺科医員

A. 研究目的

トラスツズマブの効果予測因子を、HER2過剰発現乳癌患者を対象とした前向き臨床試験から得られた臨床検体を用いて明らかにする。マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析や、トラスツズマブの糖鎖修飾に関連する酵素活性、HER2、FcR、糖鎖修飾関連酵素の遺伝子多型を定量するアッセイ系を確立し、臨床情報との相関性を検討する。これら予測因子の確立は、治療成績の

向上、個別化治療の発展による医療費の節減につながると思われる。

B. 研究方法

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う。バイオマーカー情報と臨床情報を用いて相関解析を行う。

1. 各種バイオマーカーの測定系の確立

以下の項目について測定系を確立を目指す。

- ① 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 γ R) の遺伝子多型解析。 α 1-6 フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) の遺伝子多型解析
- ② 糖鎖修飾関連酵素である α -L フコシダーゼ (FUCA) および FUT8 の血清内活性測定
- ③ 血漿中タンパクの N 型糖鎖の解析
- ④ 腫瘍組織、末梢血単核球の遺伝子発現解析

2. 臨床サンプルの収集と臨床試験の実施

HER2過剰発現乳癌患者の内、トラスツズマブを含む術前化学療法を予定されている局所進行乳癌患者 (N症例) 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（M症例）の2種類を対象とした前向き臨床試験を施行する。N症例に関しては、化学療法前腫瘍組織およびアンスラサイクリン系抗癌剤を含む化学療法の投与前、パクリタキセル/トラスツズマブ投与後1週後、8週後の血液検体を採取し、M症例に関しては、トラスツズマブ単剤の投与前、投与後1週後、8週後の血液検体を採取する。

3. バイオマーカーと臨床情報との関連解析

以下に挙げるバイオマーカーの情報と、トラスツズマブの臨床効果（奏効、無増悪生存期間、生存期間など）との相関性を検証した。

- ① HER2、Fc γ R、FUT8 の遺伝子多型
- ② FUCA および FUT8 の血清内活性
- ③ 血漿中タンパクのN型糖鎖の解析
- ④ 約 54,000 個の遺伝子発現解析

（倫理面への配慮）

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及び遺伝子倫理委員会の承認を得て実施した。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した。

C. 研究結果

1. 各種バイオマーカーの測定系の確立と測定

①HER2、Fc γ R、FUT8 のイントロン、エクソン領域の遺伝子多型についてillumina社製 GOLD EGATE GENOTYPINGにより384SNPsをカスタムデザインした。ビーズアレイによるハイブリダイゼーション法にてSNPs解析を行った。

②血清内フコシダーゼ活性に関しては、酵素反応による生成物（4-nitrophenol;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を、血清内フコシルトランスフェラーゼ活性に関しては、蛍光基質を用いて酵素反応の結果生ずる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方法を確立した。

③血漿中タンパクのN型糖鎖に関しては、血漿をトリプシン、N-グリコシダーゼFと反応させることにより蛋白から修飾糖鎖を遊離させ、これをビーズを用いて選択的に補足しラベル化することに成功した。ビーズに補足された糖鎖を精製分離し、質量分析(MALDI-TOF-MS)で解析した。質量分析で得られた結果からデータベースを用いて糖鎖の構造式を決定した。

④腫瘍組織、末梢血単核球を用いてRNAを抽出後、cDNA、cRNAを得る。cRNAを蛍光標識しこれをプローブとして、Affymetrix gene Chip U133 plu

s 2.0とのハイブリダイゼーションを行う。蛍光強度を可視化し、各遺伝子の発現を数値化することにより遺伝子発現プロファイルの解析が可能であった。

2. 臨床サンプルの収集と臨床試験の実施

平成17年12月1日より症例登録を開始し、平成20年3月11日までにN症例40例、M症例30例が登録された。N症例36例中11例（30%）に病理学的完全寛解(pCR)を認めた。M症例においては奏効評価可能22例中4例(18%)に部分寛解(PR)以上の腫瘍縮小を認めた。

3. バイオマーカーと臨床情報との関連解析

①HER2、Fc γ R、FUT8 の遺伝子多型

Fc γ RIIIa-158 valine(V)/phenylalanine (F)の多型の出現比率は(F/F:F/V:V/V)が6:50:44であった。N症例でpCRが得られた症例におけるV/V型が75%であるのに対し、pCRが得られなかった症例のV/V型は29%であった。又、M症例奏効例のV/V型が75%であるのに対し、非奏効例のV/V型は30%であった(P=0.0578)。これらの結果より、Fc γ RIIIa-158の多型が、トラスツズマブの治療効果規定因子のひとつである可能性が示唆された。

②FUCA 活性測定FUT8 活性測定

血漿中のFUCA活性およびFUT8活性をM症例24例で測定した。酵素活性値と臨床情報との相関を検討したが、血漿中のFUCA活性値およびFUT8活性値と奏効との相関は認められなかった。FUCA活性値が高い群は低い群と比較し有意な無増悪期間の延長をもみとめた。

③血漿中タンパクのN型糖鎖解析

糖鎖解析の結果35種類の糖鎖が得られた。2534糖鎖はトラスツズマブ単独療法非奏効例(PD群)で4.33 \pm 8.13、non-PD群で16.07 \pm 11.60であり、PD群において有意に低い結果が得られた。さらに2534糖鎖においては無増悪期間においても有意差が認められ、2534糖鎖が高い群(High group)は低い群(Low group)と比較し無増悪期間の有意な延長が認められた。

(4) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

クラスター解析により、N症例ではpCRが得られた症例とそれ以外、M症例では奏効が得られた症例とそれ以外で遺伝子群を分離できた。N症例においては、pCRと相関する遺伝子発現プロファイルリングを検討した。術前化学療法の腫瘍検体や血液検体から共通してpCRと相関係数が高い遺伝子群としては、EXOSC1、ATP5B、DMN、C2orf49などを含む9遺伝子群が同定された。又、M症例

においては、CR、PR、long SDと相関する遺伝子発現プロファイリングを検討した。トラスツズマブ投与前、及び投与1週間後の血液検体から共通してCR+PR+long SDと相関係数が高い遺伝子群としては、IREB2、CLEC12A、SAPS2、F5などを含む23遺伝子群が同定された。

D. 考察

現在、トラスツズマブ投与の適応基準とされるHER2遺伝子の過剰発現は、免疫組織染色Fluorescence in-situ hybridization (FISH)法などにより測定されるが、治療効果や副作用には個人差が大きく、個別化治療には不十分である。リツキシマブなどの抗体医薬の効果は、抗体依存性細胞障害能 (ADCC) の影響に強く作用されるとの報告があるが、トラスツズマブに関する報告は国内外において非常に少ない。

本研究の成果は大きく2つの要素に分けられる。1つめは、新規アッセイ系の確立である。最近の報告では、ADCCには抗体薬の糖鎖修飾が重要であるとされる。糖鎖修飾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の定量化や、血漿中タンパクのN型糖鎖の定量化の確立は、トラスツズマブのみならず、他の抗体薬のバイオマーカー研究にも貢献する。又、臨床検体を用いたマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現プロファイル解析は、国内の乳がん領域での報告は希少であり、特に末梢血液を用いた質が高く再現性のある方法の確立は貴重な研究成果と言える。

2つめは、トラスツズマブの臨床効果を予測する複数のバイオマーカーの同定である。抗体受容体部分 (Fc γ R IIIa-158) の多型は、セツキシマブなどでも報告のある部位であり信憑性が高い。又、血漿中タンパクの特定の糖鎖(2534糖鎖)は、中間的な解析ではあるが、トラスツズマブの奏効のみならず無増悪生存期間とも有意に相関をみとめた。マイクロアレイ解析においても、奏効を予想するいくつかの遺伝子プロファイル候補を同定した。これらはいずれも、末梢血からの検体からの解析が可能であり、臨床導入されたときの患者への侵襲が少ない。

今後、進行・再発乳がん(M)症例に関しては症例登録を完遂させる。全体の最終解析については、必要な観察期間の後予後解析を含めて行う予定である。今回得られた、複数のバイオマーカーについては、前向き臨床試験において検証する(Validation)ことを計画する。これらは、トラスツズマブの個別化治療に直結し、当該患者における治療成績の向上、高価な抗体治療の

医療費の節減につながる。

E. 結論

HER2過剰発現乳癌患者を対象とした前向き臨床試験から得られた臨床検体を用いて、以下のトラスツズマブの効果予測因子の候補を同定した。

1)血清内フコシダーゼ活性 2) 血漿中タンパクのN型糖鎖 (2534糖鎖) 3) 抗体受容体(FcR):Fc γ R IIIa-158遺伝子多型 4)マイクロアレイによる特定に遺伝子発現プロファイル

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shien T, Kinoshita T, et al. Usefulness of preoperative multidetector-row computed tomography in evaluation the extent of invasive lobular carcinoma in patients with or without neoadjuvant chemotherapy. Breast Cancer. (in press)
2. Shien T, Kinoshita T, et al. Evaluation of axillary status in patients with breast cancer using thin-section CT. Int JCO. (in press)
3. Shimizu C, Fujiwara Y. Personalized systemic treatment for breast cancer patients: is it a reality? Breast Cancer. [Epub ahead of print] 2008
4. Shien T, Shimizu C, Seki K, Shibata T, Hojo T, Ando M, Kohno T, Katsumata N, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, Fujiwara Y. Comparison among different classification systems regarding the pathological response of preoperative chemotherapy in relation to the long-term outcome. Breast Cancer Res Treat. [Epub ahead of print] 2008
5. Mukai H, Watanabe T, Ando M, Shimizu C, Katsumata N. Assessment of different criteria for the pathological complete response (pCR) to primary chemotherapy in breast cancer: standardization is needed. Breast Cancer Res Treat. [Epub ahead of print] 2008
6. Nishio S, Katsumata N, Matsumoto K, Tanabe H, Yonemori K, Kohno T, Shimizu C, Ando M, Kasamatsu T, Fujiwara Y. Analysis of the clinicopathological prognosis of

- stage IVb cervical carcinoma. *Oncol Rep.* 19(2): 497-503, 2008
7. Yonemori K, Yamaguchi U, Kaneko M, Uno H, Takeuchi M, Ando M, Fujiwara Y, Hosono A, Makimoto A, Hasegawa T, Yokoyama R, Nakatani F, Kawai A, Beppu Y, Chuman H. Prediction of response and prognostic factors for Ewing family of tumors in a low incidence population. *J Cancer Res Clin Oncol.* 134(3): 389-395, 2008
 8. Shien T, Shimizu C, Akashi-Tanaka S, Yonemori K, Kohno T, Hojo T, Ando M, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Clinically efficacy of S-1 in pretreated metastatic breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol.* 38(3): 172-175, 2008
 9. Nakajima TE, Yasunaga M, Kano Y, Koizumi E, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, Matsumura Y. Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer.* 122(9): 2148-2153, 2008
 10. Yoshida T, Okamoto I, Okabe T, Iwasa T, Satoh T, Nishio K, Fukuoka M, Nakagawa K. Matuzumab and cetuximab activate the epidermal growth factor receptor but fail to trigger downstream signaling by Akt or Erk. *Int J Cancer.* 122(7): 1530-1538, 2008
 11. Okabe T, Okamoto I, Tsukioka S, Uchida J, Iwasa T, Yoshida T, Hatashita E, Yamada Y, Satoh T, Tamura K, Fukuoka M, Nakagawa K. Synergistic antitumor effect of S-1 and the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines: role of gefitinib-induced down-regulation of thymidylate synthase. *Mol Cancer Ther.* 7(3): 599-606, 2008
 12. Tamura K, Okamoto I, Kashii T, Negoro S, Hirashima T, Kudoh S, Ichinose Y, Ebi N, Shibata K, Nishimura T, Katakami N, Sawa T, Shimizu E, Fukuoka J, Satoh T, Fukuoka M. Multicenter prospective phase II trial of gefitinib for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations: Results of the West Japan Thoracic Oncology Group trial (WJTOG0403). *Br J Cancer.* 98(5): 907-914, 2008
 13. Nakayama T, Hieshima K, Arao T, Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa A-K, Yamada Y, Fujii M, Oiso N, Kawada A, Nishio K, Yoshie O. Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. *Oncogene.* [Epub ahead of print] 2007
 14. Yonemori K, Tateishi U, Uno H, Yonemori Y, Tsuta K, Takeuchi M, Mastuno Y, Fujiwara Y, Asamura H, Kusumoto M. Development and validation of diagnostic prediction model for solitary pulmonary nodules. *Respirology.* 12(6): 856-862, 2007
 15. Yonemori K, Kunitoh H, Tsuta K, Tamura T, Arai Y, Shimada Y, Fujiwara Y, Sasajima Y, Asamura H, Tamura T. Prognostic factors for malignant pericardial effusion treated by pericardial drainage in solid-malignancy patients. *Med Oncol.* 24(4): 425-430, 2007
 16. Ito Y, Fujiwara Y, Ohashi Y. The Q-Q plot of p-values for predicting outcomes with the gene expression data. *Jpn J Biometrics.* 28:(1) 37-46, 2007
 17. Kouno T, Ando M, Yonemori K, Matsumoto K, Shimizu C, Katsumata N, Komiyama M, Okajima E, Matsuoka N, Fujimoto H, Fujiwara Y. Weekly paclitaxel and carboplatin against advanced urotelial carcinoma after failure of a platinum-based regimen. *Eur Urol.* 52(4): 1115-1122, 2007
 18. Akashi-Tanaka S, Omatsu M, Shimizu C, Ando M, Terada K, Shien T, Kinoshita T, Fujiwara Y, Seki K, Hasegawa T, Fukutomi T. Favorable outcome in patients with breast cancer in the presence of pathological response after neoadjuvant endocrine therapy. *The Breast.* 16(5): 482-488, 2007
 19. 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.* 37(1): 1-8, 2007

20. 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.* 103(3): 313-318, 2007
21. Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, Sone T, Araya T, Tamori S, Koizumi F, Nishio K, Miyamoto K, Fujimura M, Nakao S. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer.* 97(6): 778-784, 2007
22. 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.* 252(2): 225-234, 2007
23. 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.* 109(9): 1836-1844, 2007
24. Basaki Y, Hosoi F, Oda Y, Fotovati A, Maruyama Y, Oie S, Ono M, Izuimi H, Kohno K, Sakai K, Shimoyama T, Nishio K, Kuwano M. Akt-dependent nuclear localization of malignant characteristics by ovarian cancer cells. *Oncogene.* 26(19): 2736-2746, 2007
25. Maegawa M, Takeuchi K, Funakoshi E, Kawasaki K, Nishio K, Shimizu N, Ito F. Growth stimulation of non-small cell lung cancer cell lines by antibody against epidermal growth factor receptor promoting formation of ErbB2/ErbB3 heterodimers. *Mol Cancer Res.* 5(4): 393-401, 2007
26. Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, Saijo N. Genes regulating sensitivity of solid tumor cell lines to cytotoxic agents: a literature review. *Jpn J Clin Oncol.* 37(5): 329-336, 2007
27. 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.* 13(10): 3051-3057, 2007
28. 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.* 131(6): 1628-1634, 2007
29. Igarashi Y, Izumi H, Uchiumi T, Nishio K, Arao T, Tanabe M, Uramoto H, Sugio K, Yasumoto K, Sasaguri Y, Wang KY, Otsuji Y, Kohno K. Clock and ATF4 transcription system regulates drug resistance in human cancer cell lines. *Oncogene.* 26(33): 4749-4760, 2007
30. Oda Y, Ohishi Y, Basaki Y, Koabayashi H, Hirakawa T, Wake N, Ono M, Nishio K, Kuwano M, Tsuneyoshi M. Prognostic implication of the nuclear localization of Y-box-binding protein-1 and CXCR4 expression in ovarian cancer: Their correlation with activated Akt, LRP/MVP and P-glycoprotein expression. *Cancer Sci.* 98(7): 1020-1026, 2007
31. Wakasugi T, Izumi H, Uchiumi T, Suzuki H, Arao T, Nishio K, Kohno K. ZNF143 interacts with p73 and is involved in cisplatin resistance. *Oncogene.* 26(36): 5194-5203, 2007
32. Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Tamura T, Nishio K. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type of mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Sci.* 98(8): 1275-1280, 2007
33. Marko-Varga G, Ogiwara A, Nishimura T, Kawamura T, Fujii K, Kawakami T, Kyono Y, Tu H, Anyoji H, Kanazawa M, Akimoto S, Hirano T, Tsuboi M, Nishio K, Hada S, Jiang H, Fukuoka M, Nakata K, Nishiwaki Y,

- Kunito H, Peers IS, Harbron CG, South MC, Higenbottam T, Nyberg F, Kudoh S, Kato H. Personalized medicine and proteomics-lessons from non-small lung cancer. *J Proteome Res.* 6(8): 2925-2935, 2007
34. Cui R, Takahashi F, Ohashi R, Gu T, Yoshioka M, Nishio K, Ohe Y, Tominaga S, Takagi Y, Sasaki S, Fukuchi Y, Takahashi K. Abrogation of the interaction between osteopontin and $\alpha v \beta 3$ integrin reduces tumor growth of human lung cancer cells in mice. *Lung Cancer.* 57(3): 302-310, 2007
35. Sakai K, Yokote H, Murakami-Murofushi K, 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. *Cancer Sci.* 98(9): 1498-1503, 2007
36. Morinaga R, Okamoto I, Furuta K, Kawano Y, Sekijima M, Dote K, Stou T, Nishio K, Fukuoka M, Nakagawa K. Sequential occurrence of non-small cell and small cell lung cancer with the same EGFR mutation. *Lung Cancer.* 58(3): 411-413, 2007
37. Tsuya A, Kurata T, Tamura K, Fukuoka M. Skeletal metastases in non-small cell lung cancer: a retrospective study. *Lung Cancer.* 57(2): 229-232, 2007
38. Akashi Y, Okamoto I, Suzuki M, Tamura K, Iwasa T, Hisada S, Satoh T, Nakagawa K, Ono K, Fukuoka M. The novel microtubule-interfering agent TZT-1027 enhances the anticancer effect of radiation *in vitro* and *in vivo*. *Br J Cancer.* 96(10): 1532-1539, 2007
39. Shimizu T, Satoh T, Tamura K, Ozaki T, Okamoto I, Fukuoka M, Nakagawa K. Oxaliplatin/fluorouracil/leucovorin (FOLFOX4 and modified FOLFOX6) in patients with refractory or advanced colorectal cancer: post-approval Japanese population experience. *Int J Clin Oncol.* 12(3): 218-223, 2007
40. Ozaki T, Tamura K, Satoh T, Kurata T, Shimizu T, Miyazaki M, Okamoto I, Nakagawa K, Fukuoka M. Phase I study of combination therapy with S-1 and weekly docetaxel for advanced gastric cancer. *Anticancer Res.* 27(4C): 2657-2665, 2007
41. Tamura K, Nakagawa K, Kurata T, Satoh T, Nogami T, Takeda K, Mitsuoka S, Yoshimura N, Kudoh S, Negoro S, Fukuoka M. Phase I study of TZT-1027, a novel synthetic dolastatin 10 derivative and inhibitor of tubulin polymerization, administered weekly in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 60(2): 285-293, 2007
42. Kurata T, Okamoto I, Tamura K, Fukuoka M. Amurubicin for non-small-cell lung cancer and small-cell lung cancer. *Invest New Drugs.* 25(5): 499-504, 2007
43. Saeki T, Nomizu T, Toi M, Ito Y, Noguchi S, Kobayashi T, Asaga T, Minami H, Yamamoto N, Aogi K, Ikeda T, Ohashi Y, Sato W, Tsuruo T. Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J Clin Oncol.* 25(4): 411-417, 2007
44. Kinoshita T. Sentinel lymph node biopsy is feasible for breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer.* 14(1): 10-15, 2007
45. Kurebayashi J, Moriya T, Ishida T, Hirakawa H, Kurosumi M, Akiyama F, Kinoshita T, Takei H, Takahashi K, Ikeda M, Nakashima K. The prevalence of intrinsic subtypes and prognosis in breast cancer patients of different races. *Breast.* 16(Suppl 2): S72-S77, 2007
46. Tsukamoto S, Akashi-Tanaka S, Shien T, Terada K, Kinoshita T. Brain metastases after achieving local pathological complete responses with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer.* 14(4): 420-424, 2007
2. 学会発表
国際
1. Nakajima T, Matsumura Y, Yasunaga M, Koizumi F, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y. Synergistic antitumor activity of novel polymeric micelles incorporating SN-38(NK012) combined with 5FU in colon cancer. 66th

- Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.
2. Yamamoto Y, Koizumi F, Ochiya T. MicroRNA involvement in liver development and hepatocarcinoma. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.
 3. Kawaishi M, Yokote H, Fukai J, Fukui T, Kato T, Nishio K, Koizumi F. The regulation of STAT activity by ErbB family members. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.
 4. Fukai J, Kodera Y, Fukui T, Kawaishi M, Kato T, Taguchi F, Yokote H, Nishio K, Koizumi F. Anti-tumor activity of cetuximab in malignant glioma cells overexpressing EGFR deletion mutant variant III. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.
 5. Maegawa M, Yokote H, Matsumoto K, Tanaka K, Kaneda H, Fujita Y, De Velasco M, Arao T, Koizumi F, Ito F, Nishio K. A novel signaling pathway of deletional mutant EGFR. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.
 6. Fukui T, Masuda N, Nishio K, Taguchi F, Kato T, Kawaishi M, Fukai J, Kodera Y, Yoshida T, Sakamoto H, Watanabe T, Koizumi F. Synergistic interactions between the synthetic retinoid TM411(Tamibarotene) and Glucocorticoids in human myeloma cells. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.
 7. Develasco M, Tanaka M, Anai S, Tomioka A, Sugiyama I, Sudzuka Y, Nishio K, Uemura H. Use of image analysis of treatment response in mouse orthotopic bladder cancer. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
 8. Hosoi F, Izumi H, Maruyama Y, Watari K, Basaki Y, Abbas F, Nishio K, Kohno K, Kuwano M, Ono M. Contribution of NDRG1/Cap43 to angiogenesis and macrophage infiltration in human pancreatic cancer cells. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
 9. Katsuno M, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H, Nishio K. Study of cisplatin resistant factor in arsenic-resistant cell lines. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
 10. Kawamata M, Yamamoto Y, Namatame N, Honma K, Takeshita F, Nishio K, Ochiya T. Inhibition of RPN2 restores drug sensibility in cisplatin-resisted lung cancer cell. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
 11. Tanaka K, Arao T, Maegawa M, Matsumoto K, Kaneda Y, Abe Y, Fujita Y, Yokote H, Yanagihara K, Yamada Y, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. Suppression of SRPX2 mRNA expression inhibits cellular growth and adhesion in gastric cancer. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
 12. Matsumoto K, Yokote H, Maegawa M, Tanaka K, Kaneda Y, Develasco M, Fujita Y, Arao T, Nishio K. Regulation of EGFR activity through N-glycan fucosylation and effect on the sensitivity of EGFR-TKI. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
 13. Kadofuku T, Kanome T, Kusumoto S, Ando K, Hosaka T, Ishida H, Hirose T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, Kuroki T, Ohmori T. Difference of EGFR-binding proteins between wild type EGFR and mutant EGFR. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
 14. Kusumoto S, Sugiyama T, Nakashima M, Yamaoka T, Hirose T, Ohnishi T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, Ohmori T. Drug accumulation and efflux do not contribute to acquired gefitinib resistance. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5,

2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
15. Ito F, Nishio K, Takeuchi K. Insulin-induced resistance of non-small cell lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitor. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
 16. Ohkawa Y, Koyama K, Suzuki T, Togawa T, Nishio K. Search for angiogenesis inhibitors from marine fungi. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
 17. Basaki Y, Fujii T, Nakano K, Sirouzu K, Yamada H, Nishio K, Kohno K, Ono M, Kuwano M. Association of nuclear YB-1 localization with HER2, ER alpha and CXCR4 expression in human breast cancer. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama
 18. Minami-Shimmyo M, Shimizu C, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Kohno T, Ando M, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Hospital-based analysis of adjuvant paclitaxel (PTX) in breast cancer: tolerability and the long-term impact of PTX-induced peripheral neuropathy (PN). ASCO Breast Symposium, Boston, U.S.A., Sep 7-8, 2007.
 19. Ono M, Yonemori K, Shimizu C, Nakano E, Shien T, Hojo T, Akashi S, Kouno T, Ando M, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Pattern of recurrence in patients with breast cancer who had a pathologic complete response (pCR) after neoadjuvant chemotherapy. ASCO Breast Symposium, Boston, U.S.A., Sep 7-8, 2007
 20. Fukai J, Sakai K, Kimura H, Kuroda J, Fukui T, Kawaishi M, Kato T, Taguchi F, Yokote H, Itakura T, Koizumi F, Nishio K. Anti-tumor activity of cetuximab in malignant glioma cells overexpressing deletion mutant EGFR variant III. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA.
 21. Kawaishi M, Yokote H, Fukai J, Fukui T, Kato T, Nishio K, Koizumi F. The regulation of STAT activity by ErbB family members. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA.
 22. Nakajima T, Matsumura Y, Koizumi F, Yasunaga M, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y. Synergistic antitumor activity of novel polymeric micelles incorporating SN-38 (NK012) in combination with 5-fluorouracil (5-FU) in mouse model of colon cancer. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA.
 23. Arao T, Yamada Y, Tanaka K, Matsumoto K, Maegawa M, Fujita Y, Yokote H, Nishio K. KIAA1199 is involved a novel therapeutic target for gastric cancer. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA.
 24. Tanaka K, Arao T, Maegawa M, Matsumoto K, Fujita Y, Yokote H, Yanagihara K, Yamada Y, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. SRPX2 is a novel therapeutic target for gastric cancer. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA.
 25. Maegawa M, Yokote H, Matsumoto K, Tanaka K, Arao T, Fujita Y, Fukuoka K, Nishio K. EphA4-RYK interaction stimulates Wnt signaling and promotes glioma cell proliferation and migration. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA.
 26. Matsumoto K, Yokote H, Tanaka K, Maegawa M, Arao T, Fujita Y, Nishio K. Regulation of EGFR activity through N-glycan fucosylation and effect on the sensitivity of EGFR-TKI. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA.
 27. Yamanaka R, Arao T, Nishio K. Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA.

28. Kimura H, Kasahara K, Suminoe M, Sone T, Araya T, Tamori S, Fujimura M, Miyamoto K, Nishio K. Epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA is useful as a predictive marker of gefitinib (IRESSA) treatment. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA.

国内

1. 河石真、横手秀行、福井朋也、加藤晃史、西尾和人、小泉史明. The regulation of STAT activity by ErbB family members in non-small cell lung cancer cell line. 第 48 回日本肺癌学会総会、2007 年 11 月 8-9 日、名古屋市
2. 住友誠、小泉史明、黒田健司、浅野貴子、伊藤敬一、佐藤全伯、松村保広、垣添忠生、早川正道. 新規 DDS 抗癌剤 SN-38 内包ミセル-NK012 の腫瘍血管増生腎細胞癌モデルにおける抗腫瘍効果. 第 95 回日本泌尿器科学会総会、2007 年 4 月 14-17 日、神戸市
3. 青儀健二郎、平成人、高嶋成光. ER-, PR-, HER2-(triple negative) 乳癌症例の長期予後と分子生物学的特徴. 第 45 回日本癌治療学会総会 (京都) 2007 年 10 月 24 日
4. 清水千佳子、藤原康弘. Targeted therapy for breast cancer: current evidence and future prospects. 第 69 回日本血液学会・第 49 回臨床血液学会合同総会 (横浜) 2007 年 10 月 13 日
5. 田村研治. Targeted therapy for lung cancer: current evidence and future prospects. 第 69 回日本血液学会・第 49 回臨床血液学会合同総会 (横浜) 2007 年 10 月 13 日
6. 田村研治、中川和彦、平島智徳、菓子井達彦、久保昭仁、福岡正博. ゲフィチニブ治療を受ける非小細胞肺癌患者における EGFR 変異、発現量、リン酸化レベルの検討 (WJTOG0203A) P8-1 第 11 回がん分子標的治療研究会 (大阪) 2007 年 7 月 6 日
7. 青儀健二郎、佐伯俊昭、南博信、戸井雅和、藤井博文. 進行・再発乳癌患者を対象としたカペシタビンとドセタキセルの併用第 1 相臨床試験. 第 15 回日本乳癌学会学術総会 (横浜) 2007 年 6 月 30 日
8. 清水千佳子、藤原康弘. 薬物療法における乳癌の個性診断. 第 15 回日本乳癌学会 (横

浜) 2007 年 6 月 29 日

9. 青儀健二郎. 転移性乳癌に対する外科的アプローチ シンポジウム 9 転移性乳癌に対する外科治療: 第 32 回日本外科系連合学会学術集会 (東京) 2007 年 6 月 22 日
10. 清水千佳子、河野勤、安藤正志、勝俣範之、藤原康弘. Anthracycline(A), taxane(T) 既治療転移性乳癌に対する vinorelbine(VNR) 療法の後方視的検討. 第 5 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (札幌) 2007 年 3 月 23 日
11. 松本和子、横手秀行、前川麻里、田中薫、藤田至彦、荒尾徳三、小泉史明、藤原康弘、西尾和人. 抗体治療における血清内糖鎖修飾酵素活性の検討. 第 3 回日本臨床プロテオーム研究会 (2007)
12. 松本和子、横手秀行、前川麻里、田中薫、藤田至彦、荒尾徳三、小泉史明、藤原康弘、西尾和人. Trastuzumab 投与患者における血清内糖鎖修飾酵素活性の検討. 第 11 回がん分子標的治療研究会総会 (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 特許出願中
 - 抗癌剤の有効性予測法 (特願2007-218815)
- 2) 特許取得
 - 中枢神経系原発悪例リンパ腫マーカーおよびその用途 (特許公開2007-185127)
 - 脳腫瘍患者の予後を予測するための脳腫瘍マーカーおよびその用途 (特許公開2007-089547)
 - 悪性脳腫瘍マーカー遺伝子およびその用途 (特許公開2007-082433)
 - 「糖鎖を用いたトラスツズマブ効果予測バイオマーカー (仮)」特許出願準備中

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究成果に関する資料 (図・表)

1. 糖鎖に関連する解析

(1) FUCA 活性測定

血漿中の α -Lフコシダーゼ(FUCA)活性をトラスツズマブ単独療法群24症例で測定した。血漿中のFUCA活性値は、1.5~9.7 Unit/Lであった。酵素活性値と臨床情報との相関を検討したところ、血漿中のFUCA酵素活性値と治療効果との相関は認められなかった(図1)。

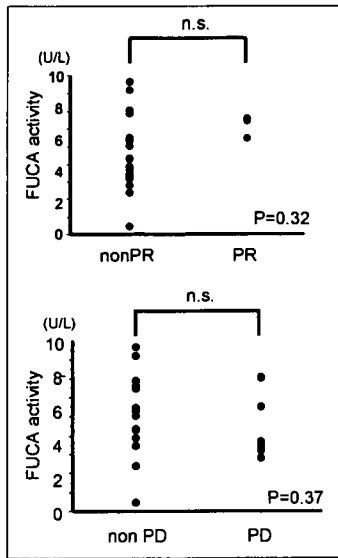


図1 FUCA活性と治療効果

n.s.: not significant, PR: partial response
PD: progressive disease

FUCA酵素活性値を4.3 Unit/Lの閾値で群別化すると、FUCA活性値が高い群(FUCA high group)は低い群(FUCA low group)と比較し、無増悪期間の有意な延長が認められた ($p=0.02$)。この結果は、血漿中のFUCA活性値が高いとトラスツズマブの治療予後が良いことを示している(図2)。

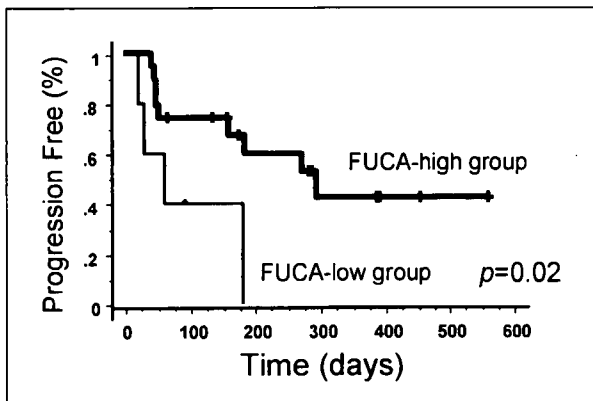


図2 FUCA活性と無増悪期間

(2) FUT8 活性測定

血漿中の α 1-6フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)をトラスツズマブ単独療法群24症例で測定した。血漿中のFUT8活性値は0.5~5.0 Unit/Lであった。酵素活性値と臨床情報との相関を検討したが、血漿中のFUT8酵素活性値と臨床効果及び無増悪期間との相関は認められなかった(図3)。

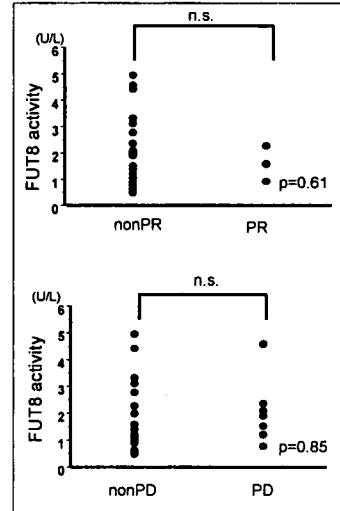
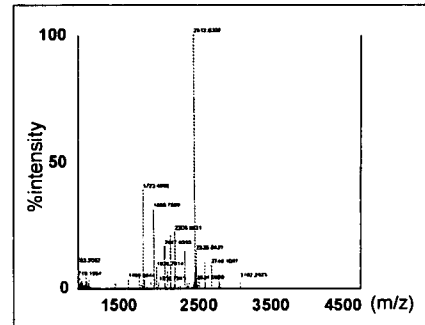


図3 FUT8活性と臨床効果

n.s.: not significant, PR: partial response
PD: progressive disease

(3) 血漿中タンパクのN型糖鎖解析

トラスツズマブの抗腫瘍効果を予測する血漿中タンパクのN型糖鎖修飾について検討するために、質量分析(MALDI-TOF-MS)を用いて各症例の糖鎖解析を行った。その結果35種類の糖鎖が得られた(図4)。



1297	ND	2488	ND
1301	Hex2 HexNAc2 Deoxyhexose2	2490	Hex1 HexNAc1 Deoxyhexose1 HexNAc2HexNAc2
1408	Hex2 HexNAc2HexNAc2	2498	Hex2 HexNAc2 Deoxyhexose1 HexNAc1 HexNAc2HexNAc2
1458	Hex1 HexNAc1HexNAc2	2518	ND
1702	ND	2519	Hex2 HexNAc2 HexNAc2 HexNAc2HexNAc2
1738	HexNAc2 Deoxyhexose1 HexNAc2HexNAc2	2528	ND
1748	HexNAc2 HexNAc2 HexNAc2HexNAc2	2529	Hex1 HexNAc1 Deoxyhexose2 HexNAc1 HexNAc2HexNAc2
1812	Hex2 HexNAc2 Deoxyhexose1 HexNAc2HexNAc2	2529	ND
1882	Hex1 HexNAc2 Deoxyhexose1 HexNAc2HexNAc2	2534	HexNAc2 Deoxyhexose2 HexNAc2HexNAc2
1902	Hex2 HexNAc2 HexNAc2HexNAc2	2540	Hex2 HexNAc2 HexNAc1 HexNAc1 HexNAc2HexNAc2
1917	HexNAc2 Deoxyhexose1 HexNAc2HexNAc2	2542	Hex2 HexNAc2 Deoxyhexose2 HexNAc2 HexNAc2HexNAc2
2048	Hex2 HexNAc2 Deoxyhexose1 HexNAc2HexNAc2	2572	HexNAc2 HexNAc2 Deoxyhexose1 HexNAc2HexNAc2
2098	Hex1 HexNAc1 Deoxyhexose1 HexNAc2HexNAc2	2608	Hex2 HexNAc2 Deoxyhexose1 HexNAc2 HexNAc2HexNAc2
2129	ND	2748	ND
2148	Hex1 HexNAc1 HexNAc2HexNAc2	2881	Hex2 HexNAc2 Deoxyhexose1 HexNAc2 HexNAc2HexNAc2
2209	ND	2877	Hex2 HexNAc2 HexNAc2 HexNAc2HexNAc2
2207	Hex2 HexNAc2 Deoxyhexose1 HexNAc2HexNAc2	3182	Hex2 HexNAc2 HexNAc2 HexNAc2 HexNAc2HexNAc2
2221	ND		
2262	Hex2 HexNAc2 HexNAc1 HexNAc2HexNAc2		
2262	Hex2 HexNAc2 Deoxyhexose2 HexNAc2HexNAc2		

図4 MALDI-TOF-MSによる糖鎖解析

これらの糖鎖について臨床情報との相関を検討したところ、2534糖鎖はトラスツマブ単独療法非奏効例(PD群)で 4.33 ± 8.13 、non-PD群で 16.07 ± 11.60 であり、PD群において有意に低い結果が得られた(図5)。

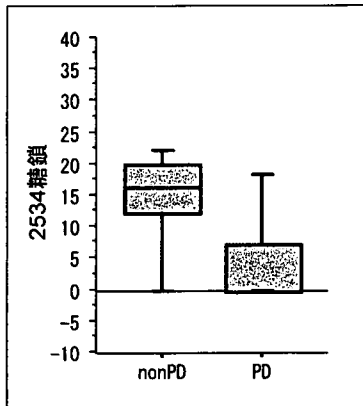


図5 2534糖鎖と治療効果

さらに2534糖鎖においては無増悪期間においても有意差が認められ、2534糖鎖が高い群(High group)は低い群(Low group)と比較し無増悪期間の有意な延長が認められた(図6)。

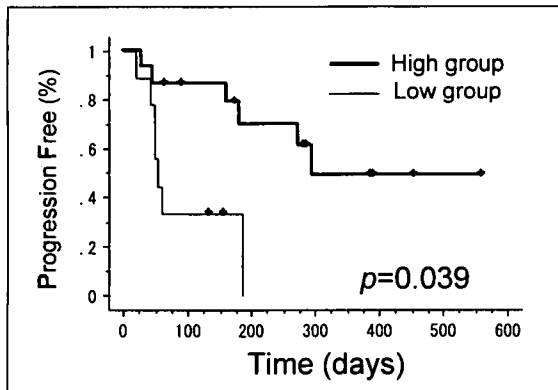


図6 2534糖鎖と無増悪期間

2. 遺伝子多型に関する解析

(1) N症例(術前化学療法症例)

症例番号	6	19	27	39%	8	9	21	10	22	36	2	%	
pCR	有	有	有	有	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし		
治療効果	3	3	3	3	2	2	2	1b	1b	1b	1a		
Fc γ RIIIa-158	CC	AC	CC	CC	75	CC	AC	AC	AC	CC	AC	AC	29

図7 Fc γ RIIIa-158多型とpCR

(2) M症例(進行・再発乳がん)

症例番号	15	1	9	3	14	18	8	12	%
奏効	CR	PR	PR	LSD	LSD	LSD	LSD	LSD	
FCGR3A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	AC	AC	75
FCGR2A	AA	AA	AG	AA	AA	AG	AA	AG	63
FCGR1B	AA	AG	AA	AA	AG	AA	AG	AG	50

症例番号	10	11	20	4	7	16	2	5	17	22	%
奏効	SD	SD	SD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	PD	
FCGR3A	AC	AC	AC	CC	CC	CC	AC	AC	AC	AC	30
FCGR2A	AA	AA	AG	AG	AG	AG	GG	AG	AG	AA	30
FCGR1B	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AG	AA	AA	AA	90

図8-1 Fc γ RIIIa-158多型と奏効

Fc γ RIIIa-158 valine(V)/phenylalanine(F)の多型において、N症例でpCRが得られた75%がV/V、pCRが得られなかった29%がV/Vであった(図7)。又、M症例奏効例の75%がV/V、非奏効例の30%がV/Vであった(P=0.0578)(図8)。

3. マイクロアレイに関する解析

(1) N症例:pCRと相関する遺伝子群

- 1) 化学療法前腫瘍組織検体より得られた遺伝子発現:相関係数が0.5以上:102 genes
- 2) 化学療法前末梢血検体より得られた遺伝子発現:相関係数が0.5以上:61 genes
- 3) 1),2)の共通、相関係数が0.4以上:9gene
EXOSC1, ATP5B, DMN, C2orf49, MGAT4B, SNAPC3, C16orf14, 2 unknown ESTs
- 4) 2)と3)化学療法後末梢血検体との共通、相関係数が0.5以上:2genes
- 5) 1)と2)と3)との共通、相関係数が0.5以上:1genes
- 6) 1)と2)と3)との共通、相関係数が0.4以上:10genes

(2) M症例:奏効と相関する遺伝子群

- 1) 化学療法前末梢血検体より得られた遺伝子発現:相関係数が0.5以上:167genes
- 2) 1)と2)トラスツマブ開始前末梢血検体との共通、相関係数が0.5以上:23genes
IREB2, CLEC12A, SAPS2, F5, EVI2A, DEFA1, LOC728358, KLRK1, FLOT1, ESD, PHTF2, SERPINB6, HOXA9, ESD, TM6SF1, DNTTIP1, DSC2, DUSP18, SLU', C16orf13, 4 unknown ESTs
- 3) 1)と2)と3)トラスツマブ開始後末梢血検体との共通、相関係数が0.5以上:5genes

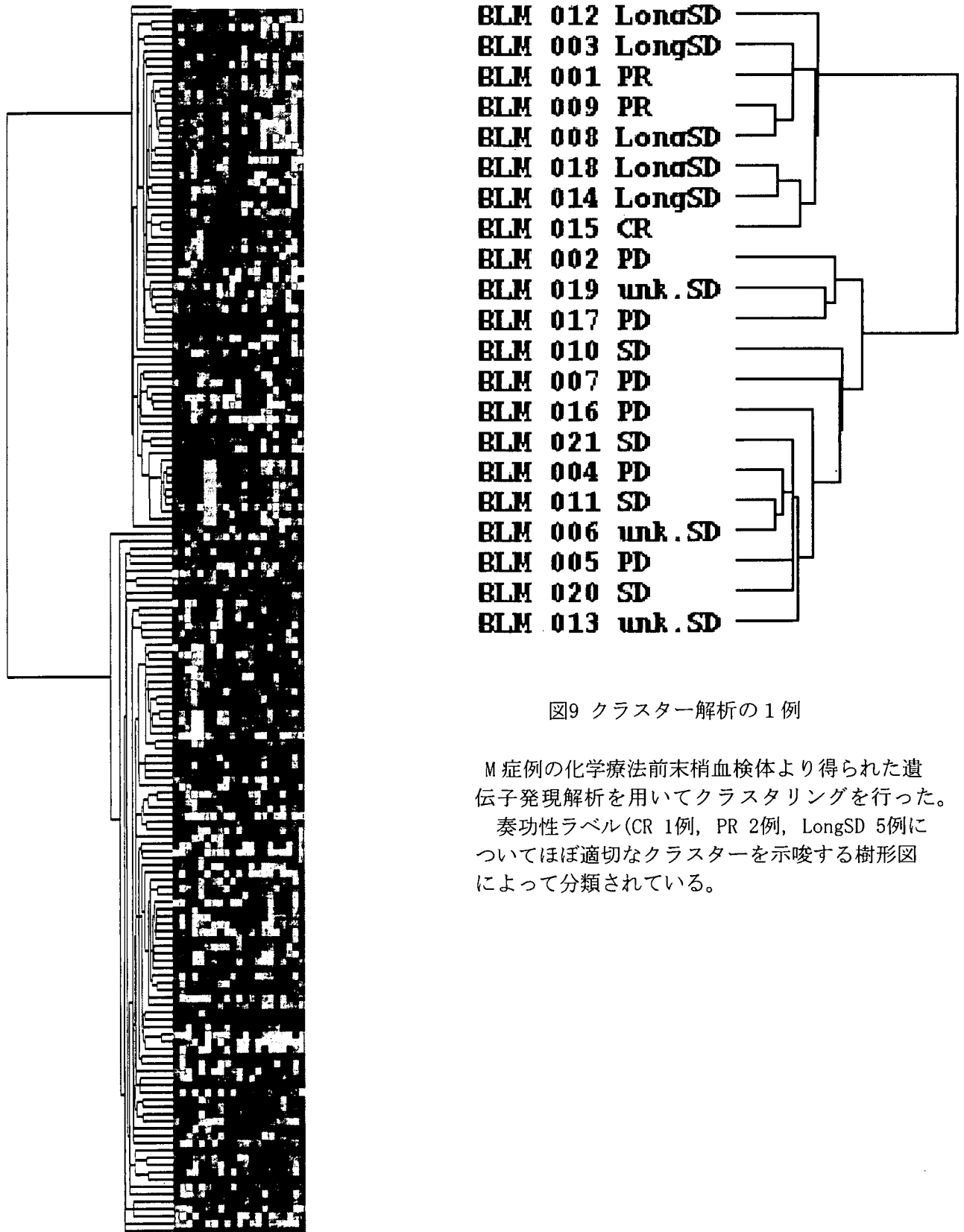


図9 クラスタ解析の1例

M症例の化学療法前末梢血検体より得られた遺伝子発現解析を用いてクラスタリングを行った。

奏功性ラベル(CR 1例, PR 2例, LongSD 5例)についてほぼ適切なクラスターを示唆する樹形図によって分類されている。

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^{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^{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⁷。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⁸、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⁹、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¹⁰。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¹¹。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¹²。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^{13,14}。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¹⁶。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¹⁷、乳がんにおいては、HER2 の SNP と予後との相関が報告され¹⁸、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¹⁸、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・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、