

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 乳癌患者におけるトラスツズマブ抗腫瘍効果予測バイオマーカーとして、N型糖鎖修飾関連酵素の臨床的有用性を検討した。トラスツズマブ療法を受けた24症例において、FUCA 酵素活性値が高い症例は、有意に無増悪期間の延長を認めることを明らかにした。また、質量分析を用いた血漿中のN型糖鎖解析によりトラスツズマブの治療効果を予測可能な糖鎖を同定した。以上の結果により、国内外で初めてN型糖鎖修飾関連酵素がトラスツズマブ治療の新たなバイオマーカーとなる可能性を提示した。

A. 研究目的

本年度における研究目的は、抗体糖鎖修飾に関与する血漿内酵素活性測定系を用いて、臨床検体の酵素活性の測定を行い、臨床情報との相関を検討することである。また、トラスツズマブの抗腫瘍効果に関連する糖鎖修飾を明らかにするため、血漿中のN型糖鎖解析系の確立及びその最適化を検討し、臨床検体の測定及び臨床情報との相関を検討する。

B. 研究方法

(1) FUCA 活性測定

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 α -L-フコシダーゼ (FUCA) 活性は、4-nitrophenyl- α -L-fucopyranosideを用いて、酵素反応の結果生ずる4-nitrophenolの吸光度(405nm)を分光光度計で測定することにより行った(図1)。昨年度までの検討結果より、酵素反応時間は3時間、使用血漿量は90 μ Lとした。各臨床検体で測定し、治療効果との相関を検討した。

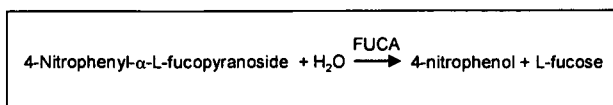


図1 α -L-フコシダーゼの触媒反応

(2) FUT8 活性測定

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)の活性測定は、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、定量することにより測定した(図2)。昨年度までの検討により、酵素反応時間は6時間、使用血漿量は23 μ Lとした。各臨床検体で測定し、治療効果との相関を検討した。

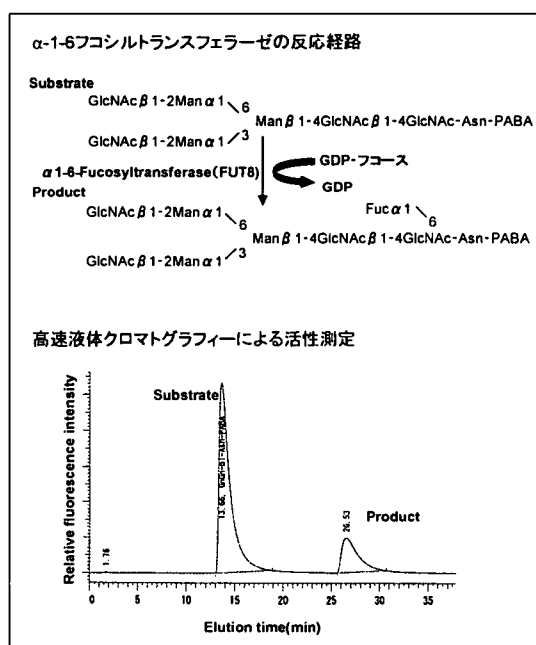


図2 α 1-6フコシルトランスフェラーゼ活性測定系

(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に関連する血漿中タンパクのN型糖鎖を解析するために、MALDI-TOF-MSによる糖鎖解析システムの構築及び最適化の検討を行った。血漿(27 μ L)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を用いて選択的に補足、ラベル化を行った。その後、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。得られたシグナルは、内部標準と比較することにより定量化を行った。さらに質量分析で得られた結果をデータベース(GlycoSuite online database, Proteome Systems)を用いて糖鎖の構造式を決定した。

臨床検体を測定し得られたN型糖鎖と臨床情報との相関を検討し、トラスツズマブの抗腫瘍効

果を予測する糖鎖の解析を行った。

(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。本研究は各施設並びに近畿大学医学部倫理委員会により承認済みである。

C. 研究結果

(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。測定値は生成物である4-nitrophenolの標準曲線を用いることによりUnit/Lに換算した。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3)。

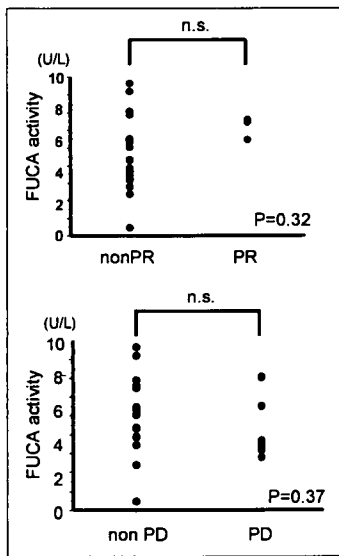


図3 FUCA活性と治療効果

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4)。

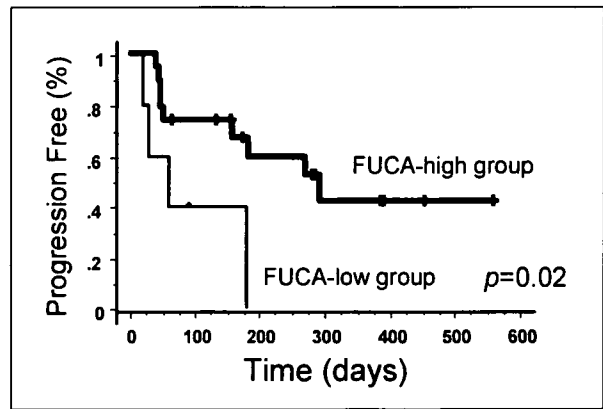


図4 FUCA活性と無増悪期間

(2) FUT8 活性測定

血漿中のα1-6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。酵素活性値は標準サンプル(FUT8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。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5)。

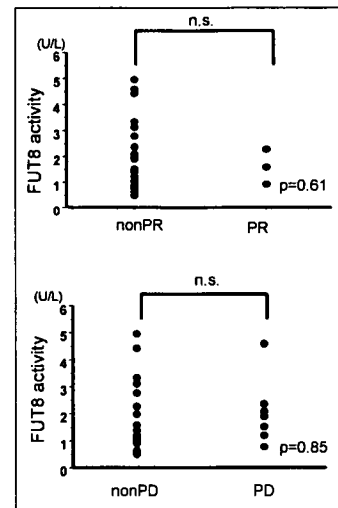
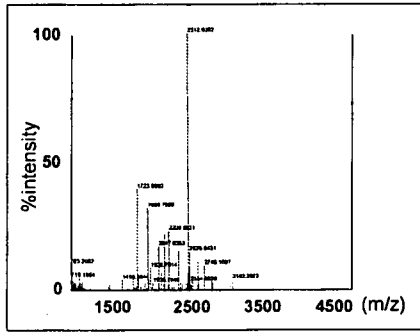


図5 FUT8活性と臨床効果

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6)。



1387	HD	2400	HD
1397	Hex2 HexNAc2 (Desphorose)2	2405	Hex1 HexNAc2 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2
1408	Hex2 HexNAc2	2410	Hex2 HexNAc2 (Desphorose)1 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2
1850	Hex1 Hex3 GlcNAc2	2515	HD
1702	HD	2517	Hex2 HexNAc2 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2
1750	HexNAc2 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2	2520	HD
1740	Hex1 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2	2520	Hex1 HexNAc2 (Desphorose)2 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2
1812	Hex2 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2	2520	HD
1880	Hex1 HexNAc2 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2	2520	HD
1827	Hex2 HexNAc2	2520	HexNAc1 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2
1827	Hex2 HexNAc2	2550	Hex2 HexNAc2 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2
1927	HexNAc2 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2	2550	Hex2 HexNAc2 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2
2047	Hex1 HexNAc2 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2	2575	Hex2 HexNAc2 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2
2200	Hex1 HexNAc2 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2	2550	Hex2 HexNAc2 (Desphorose)1 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2
2122	HD	2740	HD
2140	Hex1 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2	2815	Hex2 HexNAc2 (Desphorose)1 HexNAc2 Hex3 GlcNAc2
2300	HD	2875	Hex2 HexNAc2 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2
2387	Hex1 HexNAc2 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2	3152	Hex2 HexNAc2 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2
2221	HD		
2362	Hex2 HexNAc2 HexNAc1 Hex3 GlcNAc2		
	Hex2 HexNAc2 (Desphorose)1 Hex3 GlcNAc2		

図6 MALDI-TOF-MSによる糖鎖解析と特定された35種類の糖鎖

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糖鎖はトラスツズ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7)。

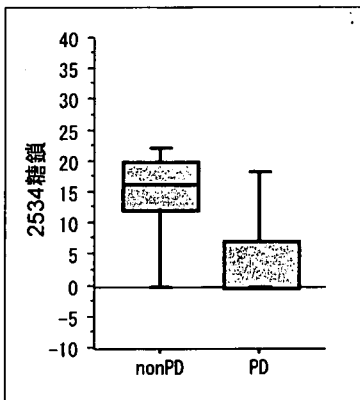


図7 2534糖鎖と治療効果

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8)。この結果は、血漿中の2534糖鎖を用いたトラスツズマブの治療効果予測の可能性を示唆している。

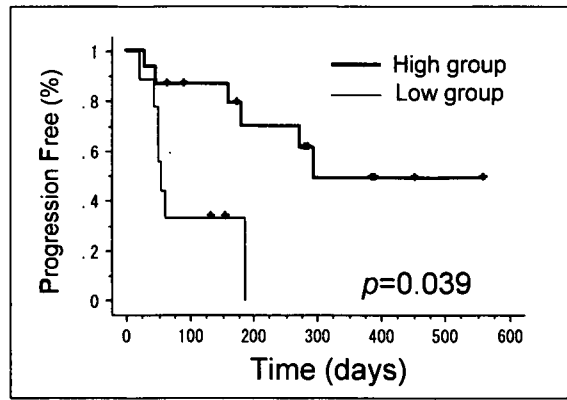


図8 2534糖鎖と無増悪期間

D. 考察

ヒト血漿中の糖鎖修飾関連酵素であるFUCA、FUT8の測定系は使用血漿量が少量(50~100 uL)で測定可能であり、測定方法が簡便であることより、臨床検体における測定は十分に可能であった。臨床情報との相関においては、FUCA活性が高いと無増悪期間を有意に延長する結果が得られた。血漿中のFUCA活性はトラスツズマブの治療予後予測に有用である可能性が示唆された。さらに、血漿中タンパクのN型糖鎖の質量分析による解析は、少量の血漿(30 uL)で網羅的に修飾糖鎖の検出が可能であり、臨床検体の測定も十分に可能であった。臨床情報との相関によりトラスツズマブの治療効果を予測できる2534糖鎖を同定した。症例数が24症例であることを考慮するとさらに大規模な臨床試験で検証することが必要であると考えられるが、血漿中のN型糖鎖並びに関連酵素(FUCA)は、トラスツズマブ治療において新たなバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

E. 結論

トラスツズマブ療法において、血漿中のFUCA酵素活性値及び血漿中タンパクのN型糖鎖解析は、治療効果を予測できる新たなバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. *Cancer Lett.* 2007; 252(2): 225-34.

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; 109(9): 1836-44.
- Basaki Y, Hosoi F, Oda Y, Fotovati A, Maruyama Y, Oie S, Ono M, Izumi H, Kohno K, Sakai K, Shimoyama T, Nishio K, Kuwano M. Akt-dependent nuclear localization of malignant characteristics by ovarian cancer cells. *Oncogene* 2007; 26(19): 2736-46.
- 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.* 2007; 5(4): 393-401.
- Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, Saijo N. Genes regulating the sensitivity of solid tumor cell lines to cytotoxic agents: a literature review. *Jpn J Clin Oncol.* 2007; 37(5): 329-36.
- 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; 13(10): 3051-7.
- 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 on non-small cell lung cancer. *Chest* 2007; 131: 1628-34.
- Igarashi T, 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* 2007; 26(33): 4749-60.
- Oda Y, Ohishi Y, Basaki Y, Kobayashi H, Hirakawa T, Wake N, Ono M, Nishio K, Kuwano M, Tsuneyoshi M. Prognostic implications 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.* 2007; 98(7): 1020-6.
- Morinaga R, Okamoto I, Furuta K, Kawano Y, Sekijima M, Dote K, Satou 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* 2007; 25(3): 411-3.
- 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* 2007; 26(36): 5194-203.
- Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Tamura T, Nishio K. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cell with wild-type of mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Sci.* 2007; 98(8): 1275-80.
- Marco-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 cell lung cancer. *J Proteome Res.* 2007; 6(8): 2925-35.
- 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* 2007; 57(3): 302-10.

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.* 2007; 98(9): 1498-503.

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* 2007; 97(6): 778-84.

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* 2007; 122(7): 1530-8.

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* 2007; E-pub ahead of print.

2. 学会発表

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 Annual Meeting 2007. 2007.4.14-18. Los Angeles.

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 Annual Meeting 2007. 2007.4.14-18. Los Angeles.

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 Annual Meeting 2007. 2007.4.14-18. Los Angeles.

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 Annual Meeting 2007. 2007.4.14-18. Los Angeles.

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-TK I. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2007. 2007.4.14-18. Los Angeles.

Yamanaka R, Arao T, Nishio K. Identification of expressed genes characterizing long-term survival in malignant glioma patients. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2007. 2007.4.14-18. Los Angeles.

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 Annual Meeting 2007. 2007.4.14-18. Los Angeles.

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 Annual Meeting 2007. 2007.4.14-18. Los Angeles.

- 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. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- 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. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- Kawaishi M, Yokote H, Fukai J, Fukui T, Kato T, Nishio K, Koizumi F. The regulation of STAT activity by ErbB family members. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- 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. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- Katsuno M, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H, Nishio K. Study of cisplatin resistant factor in arsenic-resistant cell lines. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- 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. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- 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. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- Maegawa M, Yokote H, Matsumoto K, Tanaka K, Kaneda Y, Fujita Y, Develasco M, Arao T, Koizumi F, Nishio K. A novel signaling pathway of deletional mutant EGFR. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- 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. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- 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. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- 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. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- 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. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- Ito F, Nishio K, Takeuchi K. Insulin-induced resistance of non-small cell lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitor. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市
- Ohkawa Y, Koyama K, Suzuki T, Togawa T, Nishio K. Search for angiogenesis inhibitors from marine fungi. 第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5. 横浜市

Basaki Y, Fujii T, Nakano K, Sirouzu K,
Yamada H, Nishio K, Kohno K, Ono M,
Kuвано M. Association of nuclear YB-1
localization with HER2, ER alpha and
CXCR4 expression in human breast cancer.
第66回日本癌学会学術総会 2007.10-3-5.
横浜市

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 (2007) 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

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 (2007) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特許出願中

- 抗癌剤の有効性予測法（特願2007-218815）

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

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 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

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および末梢血液検体を用いて解析した。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）の遺伝子多型解析や、糖鎖修飾関連酵素であるα1-6フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）の遺伝子多型解析、HER2遺伝子の変異解析を行った。又、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。FcγRの多型のひとつであるIIIa-158 valine (V)/phenylalanine (F)において、トラスツズマブを含む術前化学療法により病理学的完全寛解（pCR）を得た症例や、進行・再発乳がんにおけるトラスツズマブ療法における奏効を得た症例に、V/V型が多いことが明らかとなった。又、マイクロアレイによる遺伝子発現解析により、トラスツズマブを含む術前化学療法によるpCRと相関する遺伝子候補プロファイル、進行・再発乳がんに対するトラスツズマブ療法により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、再発までの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、前向き臨床試験において検証する（Validation）ことを計画する。

A. 研究目的

トラスツズマブは抗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り有意に生存期間を延長することが報告されている。また、術後化学療法においても、従来の化学療法（アントラサイクリンを含むレジメンまたはそれにタキサンを追加したレジメン）にトラスツズマブを追加することにより、有意に無病再発期間を延長することが報告されている。よって、トラスツズマブは、乳がんに対する抗悪性分子標的薬剤の中心的な位置づけとなっているといえる。

一方、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。

トラスツズマブの効果は、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。ADCC活性に影響を与えるものとしてはさまざまなものがあるが、宿主側因子である、患者の抗体受容体部分（FcγR）の状況や、ト

ラスツズマブの糖鎖修飾が関連しているとの報告がある。

又、腫瘍検体や末梢血単核球検体を用いたマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析は、すでに乳がん領域で盛んに試されている手法であり、その有用性が検証されつつある。しかしながら、トラスツズマブにより臨床効果や副作用に焦点をあてた報告は少ない。

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検体）を用いて、FcγR、糖鎖修飾関連酵素であるα1-6フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）の遺伝子多型解析、HER2遺伝子の変異解析を行った。又、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。これら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した。

B. 研究方法

1. 臨床検体の収集と治療計画

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した。N症例に関しては、化学療法前腫瘍組織

およびアンスト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した。

2. バイオマーカー解析項目

①HER2、Fc γ R、FUT8 の遺伝子多型解析

HER2、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 GOLDEGATE 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ゼーション法にてSNPs解析を行った。

②遺伝子発現解析

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 plus 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約54,000個の遺伝子発現プロファイルの解析を行った。

3. 臨床試験の登録・臨床検体の収集

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。臨床検体はほぼ前例で、予定したポイントでの収集が可能であった。

(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する。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

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

リツキシマブの腫瘍効果規定因子として報告されている、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。

2. 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、longSD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+longSD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

抗体受容体部分(Fc γ RIIIa-158)の多型は、セツキシマブで抗腫瘍効果との相関が報告されている部位である。今回の結果は、トラスツズマブにおいてもセツキシマブと同様に、ADCC活性がその抗腫瘍効果に密接に関連していること、又、抗体受容体部分の遺伝子多型を調べることにより、トラスツズマブの臨床効果を予測できる可能性があることを示している。

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。

E. 結論

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解析した。Fc γ RIIIaの遺伝子多型は、効果予測因子候補のひとつとなる。遺伝子発現解析の結果、効果予測因子の候補となる遺伝子群の同定が可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akashi, Y., Okamoto, I., Suzuki, M., Tamura, K., Iwasa, T., Hisada, S., Satoh, T., Nakagawa, K., Ono, K and Fukuoka M. The novel microtubule-interfering agent TZT-1027 enhances the anticancer effect of radiation *in vitro* and *in vivo*. Br. J. Cancer. 96: 1532-1539, 2007.
- 2) Shimizu, T., Satoh, T., Tamura, K., Ozaki, T., Okamoto, T., Fukuoka, M., Nakagawa, K. Oxaliplatin/fluorouracil/leucovorin (FOLFOX4 and modified FOLFOX6) in patients with refractory or advanced colorectal cancer: post-approval Japanese population experience. In J Clin Oncol. 12: 218-223, 2007.
- 3) Ozaki, T., Tamura, K., Satoh, T., Kurata, T., Shimizu T., Miyazaki, M., Okamoto, I., Nakagawa, K. and Fukuoka. M. Phase I study of combination therapy with S-1 and weekly docetaxel for advanced gastric cancer. Anticancer Res. 27: 2657-2666, 2007.
- 4) Tamura, K., Nakagawa, K., Kurata, T., Satoh, T., Nogami, T., Takeda, K., Mitsuoka, S., Yoshimura, N., Kudoh, S., Negoro, S. and 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. Clin Chemother Pharmacol. 60:285-293, 2007.
- 5) Kurata, T., Okamoto, I., Tamura, K. and Fukuoka, M. Amurubicin for non-small-cell lung cancer and small-cell lung cancer. Invest new Drugs. 25: 499-504, 2007
- 6) Tsuya, A., Kurata, T., Tamura, K. and Fukuoka, M. Skeletal metastases in non-small cell lung cancer: a retrospective study. Lung cancer 57: 229-232, 2007
- 7) 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. and

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: 907-914, 2008

- 8) Okabe, T., Okamoto, I., Tsukioka, S., Uchida, J., Iwasa, T., Yoshida, T., Hatashita, E., Yamada, Y., Satoh, T., Tamura, K., Fukuoka, M. and 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. 7:599-606, 2008

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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

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

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

分担研究者 関島 勝 (株)三菱化学安全科学研究所先端技術研究部 部長

研究要旨 マウス抗HER2ヒト化モノクローナル抗体のトラスツズマブの効果規定因子を探索する目的で、抗体依存性細胞障害能 (ADCC) に関連する抗体Fc部分に対する受容体遺伝子 *fc γ RI*, *fc γ RII*, *fc γ RIII* と Fc γ R の糖鎖修飾に関わるフコシルトランスフェラーゼ (*ft*) および標的分子の *her2* について遺伝子多型を解析した。解析SNPsは、イントロン領域317, エクソン領域67の総数384をHapMapプロジェクトデータベースから設計した。トラスツズマブ単独療法もしくは併用療法の投与群の乳癌患者の末梢血ゲノムDNAおよび国際HapMapで使用したアジア人の標準ゲノムDNAを測定解析した。Fc γ 遺伝子44SNPsのMajor home, Hetero, Minor Homoの出現比率の平均値は54.9 : 26.1 : 19, FTは, 81.8 : 11.7 : 6.5, Her2は, 98.1 : 1.3 : 0.6であった。リツキシマブの腫瘍効果規定因子の解析で報告されているFCG3AのPhe (F) と Val (V) の出現比率 (F/F:F/V:V/V) が6:50:44であった。また, Her2 (ERBB2) のチロシンキナーゼ活性ドメインに局在するHer2のexon20のIle (I) と Val (V) の出現比率 (I/I:I/V:V/V) は78:20:2であった。一方, Fc γ Rの糖鎖修飾に関わるFT遺伝子ではexon11の3'末非翻訳領域でSNPsによる多型が認められたが, 殆どがMajor homeで一部Hetero型であった。これらのバリエーションとトラスツズマブの効果規定因子との関係を解析することは, トラスツズマブの作用機序を解明する上で重要な知見となることが期待できる。

A. 研究目的

マウス抗HER2ヒト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、抗体依存性細胞障害能 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) の関与が示唆されている。免疫細胞の殺細胞性細胞表面に発現する抗体Fc部分に対する受容体 (Fc γ R) がADCC活性に重要な因子となっていることが解明されてきた。また標的分子のHER2蛋白のチロシンキナーゼ活性ドメインの遺伝子変異に加え、SNPと治療成績との関連も指摘されており、チロシンキナーゼリン酸化部位の変異がトラスツズマブ感受性に関わっている可能性が示唆されている。さらに、Fc γ Rの糖鎖修飾に関わるフコシルトランスフェラーゼ (FT) もトラスツズマブの抗腫瘍活性の規定因子となっていることから、Fc γ R、HER2、FUTの遺伝子多型解析を行うことで、治療開始前にトラスツズマブの効果或いは有害事象を予測できるようになる可能性がある。そこで、患者ゲノムDNA (gDNA) について、これらの遺伝子多型と薬剤効果を比較検討する目的で、これらの遺伝子に限定したSNPs解析を行った。

B. 研究方法

予めインフォームド・コンセントにより、遺伝子解析の同意を得た患者から採血されたトラスツズマブ単独療法もしくは併用療法の投与群42人乳癌患者の末梢血検体は、

国立がんセンターで匿名化符号番号が割り当てられ、測定開始まで保管管理した。単塩基遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism; SNPs) 測定解析は、国立がんセンターの遺伝子解析研究倫理審査委員会及び三菱化学安全科学研究所遺伝子解析倫理審査委員会の承認 (2007年度) を経た後、国立がんセンター中央病院計画治療病支援施設より検体のID番号と検体が三菱化学安全科学研究所鹿島研究所に送付され、鹿島研究所内で更にMSI-IDが付与した。鹿島研究所内での検体とデータ管理はMSI-IDによって行われた。また、被験者ゲノムが乳癌患者 (42名) に限定されているため、特に日本人の標準ゲノムとの比較するため、国際HapMapで使用したアジア人12人 (漢民族3名, 日本人9名) の標準gDNAを同時に測定解析した (Table1-1, 1-2)。SNPsの測定は、抗体Fc部分に対する受容体遺伝 *fc γ RI*, *fc γ RII*, *fc γ RIII* と Fc γ R の糖鎖修飾に関わるフコシルトランスフェラーゼ (*ft*) および標的分子の *her2* について、イントロン、エクソン領域についてillumina社製 GOLDEGATE GENOTYPINGにより384SNPsをカスタムデザインした (Appendix)。エクソン領域でデザインされたSNPsは67カ所である (Table2)。各末梢血 (血餅) サンプルから、gDNAを抽出した。GOLDEGATE GENOTYPINGには、gDNA250ngを用いたが、250ngに満たない場合は、Whole-Genome Amplification (WGA) 法にて、全gDNAを増

幅した。gDNAはillumina- GOLDEGATE GENOTYPING Assayマニュアルに従い、ビーズアレイにてハイブリダイゼーションし、BeadArray Readerにて各SNPsのコール値を解析した。デザインしたSNPsの発現頻度のクラスター解析は、乳癌患者42症例と標準ゲノム12例を合わせた54例について実施した。

(倫理面への配慮)

本研究で解析されたSNPsは、ADCCに関連する限定した5種類の遺伝子多型を対象にし、トラスツズマブの効果規定に関して探索的にSNPsの有無を比較解析しているため、被験者の個人情報や遺伝的素因を言及するものでない。また、提供された被験者のゲノムDNAは、本研究終了後、測定機関の三菱化学安全科学研究所から国立がんセンター中央病院計画治療病支援施設にて返送し管理した。

C. 研究結果

抗体Fc部分に対する受容体遺伝子 $fc\gamma RI$, $fc\gamma RII$, $fc\gamma RIII$ と $Fc\gamma R$ の糖鎖修飾に関わるフコシルトランスフェラーゼ(ft)および標的分子の $her2$ について、イントロン、エクソン領域についてillumina社製 GOLDEGATE GENOTYPINGによりデザインした384SNPsのうち、全測定検体でSNPsコールが得られなかった3SNPs ($FCGR2C$, $intron5$, 159829689 ; $ERBB2$, $intron3$, 35109644 $exon23$, 35134523)を除く381SNPsのコールレート平均値は、癌患者99.8%, 標準ゲノム99.7%, 全測定検体99.8%であった (Table 1, Appendix)。対象遺伝子のエクソン領域のSNPsタイピングでは、 $Fc\gamma$ 遺伝子44SNPsアレルのMajor home, Hetero, Minor Homoの出現比率の平均値は54.9 : 26.1 : 19であった。FT8遺伝子6SNPsアレルでは、81.8 : 11.7 : 6.5, Her2 ($ERBB2$) 遺伝子17SNPsアレルでは、98.1 : 1.3 : 0.6であった (Table 3, Table4-1~4-8)。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腫瘍効果規定因子の解析で報告されている $Fc\gamma$ 遺伝子上のSNPsの $FCG3A$ の $exon4$ のPhe (F)とVal (V)の出現比率 (F/F:F/V:V/V) が6:50:44であった。また、Her2 ($ERBB2$) のチロシンキナーゼ活性ドメインに局在するHer2の $exon20$ のIle (I)とVal (V)の出現比率 (I/I:I/V:V/V) は78:20:2であった。一方、 $Fc\gamma R$ の糖鎖修飾に関わるFT遺伝子では $exon11$ の3'末非翻訳領域でSNPsによる多型が認められたが、殆どがMajor homeで一部Hetero型であった。

D. 考察

トラスツズマブの作用機序及び効果規定因子としてADCC活性と $Fc\gamma R$ のSNPsの関係を探索する目的で、 $Fc\gamma RIII$ をコードする遺伝子領域を含めたSNPsを測定したところ、

リツキシマブで報告されているVerのバリエーションは、44%, heteroを含めると94%と高頻度に出現していた。このバリエーションがトラスツズマブの効果規定因子として作用しているかどうかは、今後の臨床研究の結果を見る必要がある。

一方、トラスツズマブの標的分子であるHER2蛋白のチロシンキナーゼドメインの $exon20$ のIle (I)とVal (V)のバリエーションは、Minor Homeが2% (1名), heteroが20% (10名)であったことから、これらのバリエーションと $Fc\gamma RIII$ のVerのバリエーション変異との相乗作用についても、トラスツズマブの作用機序を解明する上で重要な知見となることが期待される。

E. 結論

トラスツズマブの作用機序効果規定因子の一つとしてとして、乳癌患者のgDNAについて $Fc\gamma R$, Ft , $Her2$ の多型解析を実施、抗腫瘍効果に関連する $Fc\gamma RIII$ のVerのバリエーションおよび標的分子遺伝子HER2蛋白のチロシンキナーゼドメインIle (I)とVal (V)のバリエーションを検出した。

F. 研究発表

1. 論文発表
特に無し。

2. 学会発表
特に無し。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特に無し

2. 実用新案登録
特に無し

3. その他

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 第一領域外来部 乳腺科医員
分担研究者 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
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 乳腺科医長

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。本研究は国立がんセンター中央病院および国立病院機構四国がんセンターの倫理委員会および遺伝子解析研究倫理審査委員会により承認されている。平成16年12月1日より症例登録が開始され、平成20年3月11日までに術前化学療法例40例、転移・再発乳癌症例30例（転移・再発乳癌のうち11例は四国がんセンターからの登録）が登録され、トランスレーショナルリサーチを目的とした検体を収集し、測定・解析を行った。

A. 研究目的

トラスツズマブはマウス抗HER2ヒト化モノクローナル抗体であり、HER2タンパク過剰発現またはHER2遺伝子増幅のある転移性乳癌において、単剤投与による腫瘍縮小と、アントラサイクリンまたはタキサンとの併用による化学療法の効果増強が報告されている。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、アントラサイクリン、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⁷。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、やフコシダーゼやフコシルトランスフェラーゼ活性）、その標的分子であるHER2タンパクの評価（HER2の2量体status、HER2遺伝子多型）、そして網羅的アプローチによるバイオマーカーの探索（遺伝子発現、タンパク）はトラスツズマブの臨床効果に関する可能性がある。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℃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℃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。

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

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:

- ① 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
- 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):目標各40例

(倫理面への配慮)

本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を踏まえて実施され、検体提供者お

よびその家族への不利益が最小限に留まるよう配慮する。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、測定・解析担当者を含む第三者にわたることはない。

なお、本研究によって得られる遺伝子情報は提供者または第三者の生命、身体等の権利利益を害するおそれがあるため、開示しない。

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。

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20年3月11日までに国立がんセンター中央病院および国立病院機構四国がんセンターより術前化学療法例40例、進行・再発乳癌症例30例が登録された（うち四国登録例は進行・再発乳癌症例11例）。

術前化学療法を予定して登録された40例中4例は、病理診断により術前化学療法の適応が不適切と判明し、プロトコール治療を行わなかった。術前化学療法を実施した36例中、17例はHER2陽性でトラスツズマブを併用し、19例は併用しなかった。プロトコール治療を実施した36例中11例（30%）に病理学的完全寛解を認めた。

進行・再発乳癌症例においては、トラスツズマブ単剤での最大奏効を確認できた22例中4例（18%）に部分寛解（PR）以上の腫瘍縮小を認めた。

二施設にて臨床検体の収集および処理を行ったが、運用および収集された検体の質には問題はなく、今回、HER2およびFcγの遺伝子多型、フコシルトランスフェラーゼ活性およびマイクロアレイによる腫瘍・末梢血単核球の遺伝子発現等のバイオマーカーと臨床情報との関連の解析を行った。

D. 考察

今回、HER2陽性乳癌におけるトラスツズマブ療法の効果規定因子に関する臨床研究を計画し、国立がんセンター中央病院および国立病院機構四国がんセンターにおいて症例を集積した。術前化学療法症例は目標症例数の集積を達成し、全症例において手術を終了した。進行・再発症例の症例集積も比較的順調であり、得られた検体よりバイオマーカーの測定を行い、臨床情報

との関連性について解析を行った。本研究の結果はトラスツズマブを併用した乳癌薬物療法、あるいはトラスツズマブを含む抗体療法を受ける癌患者のenrichmentにつながるものと考えられる。

E. 結論

HER2陽性乳癌患者におけるトラスツズマブ療法の効果規定因子に関する研究のため、乳癌患者より腫瘍・血液検体と臨床情報を前向きに集積し、トランスレーショナルリサーチを実施した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shien T, Shimizu C, Seki K, Shibata T, Ando T, Tsutomu K, 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* (in press)
2. Shimizu C, Fujiwara Y. Personalized systemic treatment for breast cancer patients: is it a reality? *Breast Cancer*. 2008 Feb 15; [Epub ahead of print]
3. Mukai H, Watanabe T, Shimizu C, et al. Assessment of different criteria for the pathological complete response (pCR) to primary chemotherapy in breast cancer: Standardization is needed. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Jan 10; [Epub ahead of print]
4. 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)
5. Shien T, Kinoshita T, et al. Evaluation of axillary status in patients with breast cancer using thin-section CT. *Int JCO*. (in press)
6. Shien T, Shimizu C, Akashi-Tanaka S, Yonemori K, Kohno T, Hojo T, Ando M, Katsumata N, Kinoshita T, Fujiwara Y. Clinical

Efficacy of S-1 in Pretreated Metastatic Breast Cancer Patients. *Jpn J Clin Oncol* 2008 38(3): 172-175.

7. 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*. 2007 16(5): 482-488.

8. Kinoshita T. Sentinel lymph node biopsy is feasible for breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer*. 2007 14(1): 10-15.

9. 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*. 2007 16(Suppl 2): S72-S77.

10. Tsukamoto S, Akashi-Tanaka S, Shien T, Terada K, Kinoshita T. Brain metastases after achieving local pathological complete responses with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer*. 2007 14(4): 420-424.

11. 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. 2007 *J Clin Oncol*. 25(4): 411-417.

2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

Aogi K, Toi M, Iwata H, Ito Y, Sano M, Sato Y, Saeki T, Takashima S. Multicenter phase I/II study of efficacy, safety and pharmacokinetics of vinorelbine and trastuzumab as the first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. 31st ESMO Congress, Istanbul, Turkey, Oct 1, 2006.

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.

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

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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shien T, <u>Kinoshita T</u> , 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		(別刷なし)
Shien T, <u>Kinoshita T</u> , et al.	Evaluation of axillary status in patients with breast cancer using thin-section CT.	Int JCO	in press		(別刷なし)
<u>Shimizu C</u> , <u>Fujiwara Y.</u>	Personalized systemic treatment for breast cancer patients: is it a reality?	Breast Cancer	Epub ahead of print		2008 (別刷なし)
Shien T, <u>Shimizu C</u> , Seki K, Shibata T, Hojo T, Ando M, Kohno T, Katsumata N, Akashi-Tanaka S, <u>Kinoshita T</u> , <u>Fujiwara Y.</u>	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
Mukai H, Watanabe T, Ando M, <u>Shimizu C</u> , 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
Nishio S, Katsumata N, Matsumoto K, Tanabe H, Yonemori K, Kohno T, <u>Shimizu C</u> , Ando M, Kasamatsu T, <u>Fujiwara Y.</u>	Analysis of the clinicopathological prognosis of stage IVb cervical carcinoma.	Oncol Rep	19(2)	497-503	2008

Yonemori K, Yamaguchi U, Kaneko M, Uno H, Takeuchi M, Ando M, <u>Fujiwara Y</u> , 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
Shien T, <u>Shimizu</u> C, Akashi-Tanaka S, Yonemori K, Kohno T, Hojo T, Ando M, Katsumata N, <u>Kinoshita T</u> , <u>Fujiwara Y</u> .	Clinically efficacy of S-1 in pretreated metastatic breast cancer patients.	Jpn J Clin Oncol	38(3)	172-175	2008
Nakajima TE, Yasunaga M, Kano Y, <u>Koizumi F</u> , 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
Yoshida T, Okamoto I, Okabe T, Iwasa T, Satoh T, <u>Nishio K</u> , 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
Okabe T, Okamoto I, Tsukioka S, Uchida J, Iwasa T, Yoshida T, Hatashita E, Yamada Y, Satoh T, <u>Tamura K</u> , 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

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
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
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
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
Ito Y, Fujiwara Y, Ohashi Y.	The Q-Q plot of p-values for predicting outcomes with the gene expression data.	Jpn J Biomtetrics	28(1)	37-46	2007
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