

according to the formula: cytotoxicity (%) = 100 × (E - S_E - S_T) / (M - S_E), where E is the experimental release, S_E is the spontaneous release of effector cells, S_T is the spontaneous release of target cells, and M is the maximum release of target cells lysed with 9% Triton X-100. ADCC was calculated according to the formula: ADCC (%) = cytotoxicity (%) - antigen-independent cellular cytotoxicity (AICC; %), where AICC is the nonspecific cytotoxicity in the absence of antibody. In some experiments, ADCC was normalized to the number of NK cells (10⁴ cells) by the following equation: ADCC/10⁴ NK (%) = ADCC (%) × 10⁴ / [E:T ratio × target cell number in an experimental well (10⁴) × NK percentage in PBMC].

Fcγ receptor IIIa-158F/V genotyping. Genotyping of the Fcγ receptor IIIa (FCGR3A)-158V/F polymorphism was done by PCR-based allele-specific restriction analysis assay using genomic DNA prepared from aliquots of peripheral blood as described previously (19).

Quantitation of effector cell proportions in PBMC. Quantitation of the NK cells in PBMCs were determined by flow cytometric analysis as follows: PBMCs (1 × 10⁶) were incubated on ice for 30 min with both FITC-labeled anti-CD3 antibody and PE-labeled anti-CD56 antibody (Beckman Coulter) in the presence of 3.8 mg/mL human IgG as blocking reagent. After incubation, cells were washed twice with PBS and analyzed using FACSCalibur flow cytometer (Beckton Dickinson, Mountain View, CA). The CD56⁺CD3⁻ cells were defined as NK cells.

Statistical analysis. Data comparing differences between two groups and three groups were assessed using unpaired Student's *t* test and two-way ANOVA, respectively. Multivariate analysis of patient clinicopathologic factors affecting the ADCC activity was done using a stepwise linear regression model. Differences were considered significant when *P* < 0.05. Statistical analysis was conducted using the StatView 5.0 for Windows program.

Results

Generation and characterization of humanized anti-HER2 antibodies. A fucose-negative variant of trastuzumab was produced with α-1,6 fucosyltransferase gene (FUT8)-knockout Chinese hamster ovary cells (FUT8^{-/-} Chinese hamster ovary cells) transfected with the expression plasmid encoding heavy and light chain sequences identical to those of trastuzumab (2). The antibody purified from the culture supernatant, designated dFu-αHER2, has an identical amino acid sequence to commercially available trastuzumab. Consequently, the two antibodies showed similar binding activities to the surface of HER2⁺ tumor cell lines confirmed by flow cytometry (data not shown).

Oligosaccharide analysis revealed that Asn²⁹⁷-linked oligosaccharides of dFu-αHER2 were of a complex-biantennary type and completely defucosylated (100% nonfucosylated), whereas a large fraction of oligosaccharides of trastuzumab were fucosylated (90.0% fucosylated).

FCGR3A genotyping of the patients. It has been known that FCGR3A gene allelic polymorphism correlates with ADCC intensity, with higher activity for individuals having FCGR3A-158V allele via strong binding of this variant on NK cells to the antibody Fc region (19, 20, 27). Hence, FCGR3A-158F/158V genotyping was conducted for the 20 patients recruited in this study. The number of patients with F/F genotype was 11, 7 patients had F/V genotype, and 2 patients had V/V genotype. The allelic frequency calculated was 0.725 for FCGR3A-158F allele and 0.275 for FCGR3A-158V allele. The distribution observed was similar to that in previous reports of the Japanese population (allelic frequency of FCGR3A-158F was 0.72-0.74; refs. 31, 32). The distribution of FCGR3A genotype among various subgroups based on clinical backgrounds is shown in Fig. 1. The chemotherapy cohort (*n* = 14) included 12 patients with recurrent disease and their profile was composed of six F/F, four F/V, and two V/V genotypes of FCGR3A gene. The remaining two patients, without recurrent tumor, underwent neoadjuvant chemotherapy and were shown to possess the F/V genotype. The nonchemotherapy cohort (*n* = 6) included four patients that had received hormonal therapy all having F/F genotype and two patients (one F/F and one F/V) that had undergone trastuzumab monotherapy.

Enhanced cytotoxicity of fucose-negative variant of trastuzumab mediated by patient's PBMCs. We compared the cytotoxic activities mediated by either commercial trastuzumab or its fucose-negative counterpart, using PBMCs derived from the 20 cancer patients as effector cells (Fig. 1). Two breast cancer cell lines were chosen as the target cells: MCF-7 with low HER2 expression (~2 × 10⁴ molecules per cell; ref. 33) and SK-BR-3 with high HER2 expression (~1 × 10⁶ molecules per cell; Fig. 2A; ref. 33). Cytotoxicity was measured by adding effector cells, target cells (E:T ratio, 15:1), and either anti-HER2 antibody at various concentrations or medium alone. AICC is mainly triggered by interaction of NK receptors expressed on NK cells and MHC-like ligands on tumor cells (34, 35). AICC is experimentally determined as percentage tumor lysis in the presence of tumor cells and PBMCs (without antibody). ADCC

Disease status	Recurrent			Primary	
	12			NAC*	Adjuvant
Therapeutic type				2	6
	Chemotherapy**			Others	
	14			Hormone	Trast***
FCGR3A genotype	FF	FV	VV	FV	FF
	6	4	2	2	5
					1

Fig. 1. Diagram of distribution of FCGR3A genotypes among patients. Distributions of disease status, therapeutic type, and FCGR3A genotype among the 20 patients recruited in this study. These classifications correspond vertically with dashed lines; for example, 14 patients undergoing chemotherapy include 12 patients with recurrent disease composed of six F/F, four F/V, and two V/V genotypes of FCGR3A gene. Numerals indicate number of patients in each group. *, neoadjuvant chemotherapy; **, including combination with hormone therapy (four recurrent patients); and ***, trastuzumab monotherapy.

was calculated by subtracting AICC from cytotoxicity in the presence of antibody. Tumor lysis was calculated by a lactate dehydrogenase release method (29). As shown in Fig. 2B, augmentation of ADCC by fucose-negative antibody (dFu- α HER2) was detected in 18 patients for MCF-7 and in all patients for SK-BR-3 at the concentration of 1 ng/mL as representative data. Overall, the use of fucose-negative antibody showed significant enhancement of cytotoxicity in most of the cancer patients tested. This was seen previously using healthy donors (23–27). In both breast cancer group and healthy donors, augmentation of ADCC by dFu- α HER2 was more pronounced against MCF-7 target cells than against SK-BR-3 target cells. In this regard, the fucose-negative antibody always exhibited enhanced ADCC on MCF-7 at all concentrations; however, enhancement of ADCC with the fucose-negative antibody on SK-BR-3 was evident at the lower concentrations, but not at the higher levels of antibody tested (Fig. 2C).

Comparison of antibody-independent and antibody-dependent cytotoxicity according to various characteristics and backgrounds of the patients. Unlike healthy blood donors, the immune effector cells might be augmented or inhibited by the various types of therapy. Therefore, we reanalyzed the data obtained above to investigate whether various variables (normal or patient, type of therapy, NK percentage in PBMCs, recurrence or primary, HER2 index of the primary tumor tissues, FCGR3A genotype, and age) affect the ADCC of each cohort. The results of ADCC and AICC in each cohort are summarized in Table 2. Values of ADCC at the concentration of 1 ng/mL of either fucose variant antibodies were chosen as representative data. Fourteen patients who had undergone chemotherapy (including 4 patients of combination with hormone

therapy) showed lower AICC in MCF-7 as target cells and ADCC (for both two fucose variants) in SK-BR-3 as target cells than those in 6 patients who had received other types of therapy (4 for hormone therapy and 2 for trastuzumab monotherapy). These data suggested that the type of treatment might modulate cytotoxic activity, including AICC and ADCC. NK cells are thought to be principle mediators in ADCC; thus, activity or the number of NK cells and FCGR3A genotype on the cells possibly affect ADCC activity (27). Multivariate stepwise linear regression analyses showed that ADCC activity significantly depended on the NK percentage in PBMCs, which also significantly depended on the therapy type, such as hormonal treatment or chemotherapy (Table 3).

To provide additional evidence of the effect of treatment type on ADCC, we further compared 10 patients who received chemotherapeutic agent alone and 4 patients who received hormonal treatment alone, each extracted from chemotherapy cohort and other therapy cohort, respectively. Consequently, ADCCs of chemotherapy alone cohort were significantly lower than those of hormone therapy cohort and normal cohort, indicating that the type of therapeutic agent could be an important factor that affects ADCC (Fig. 3). Interestingly, the degree of ADCC enhancement by fucose removal in this case seemed to compensate for the ADCC impairment by chemotherapy; percentage ADCC with dFu- α HER2 by PBMCs of chemotherapy alone was comparable with that with trastuzumab by PBMCs of hormone therapy for SK-BR-3 targets ($35 \pm 12\%$ and $38 \pm 16\%$, respectively) or even higher for MCF-7 targets ($16 \pm 11\%$ and $6.8 \pm 5.2\%$, respectively; Table 2).

Inconsistent with earlier reports using healthy PBMC donors (23–27), no apparent difference on ADCC was found in any

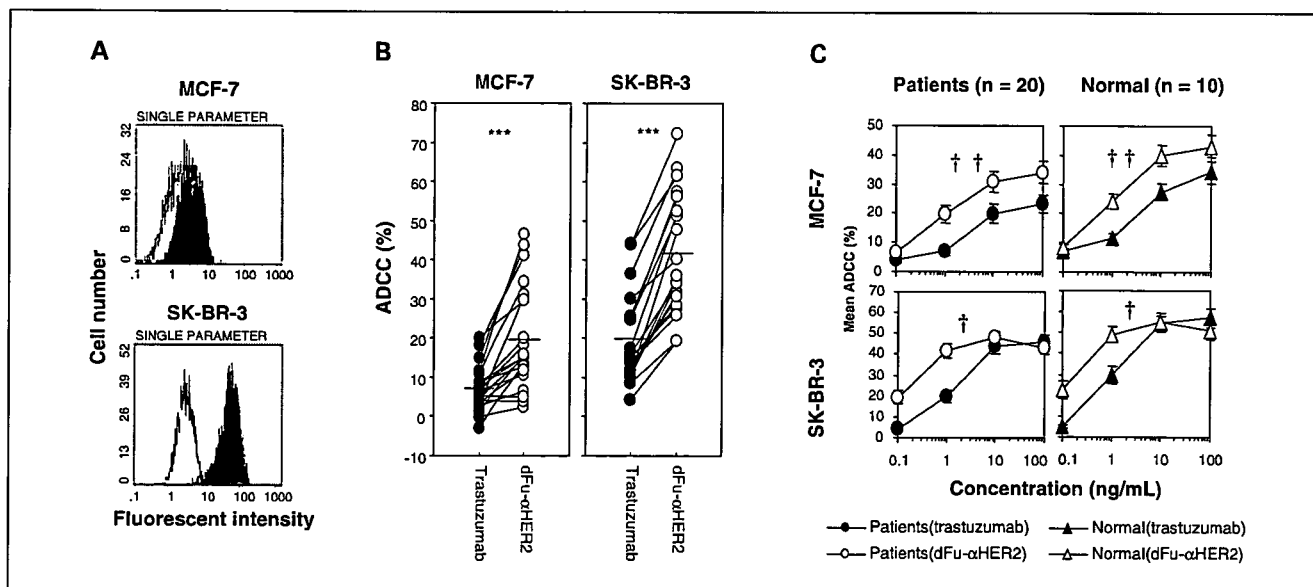


Fig. 2. ADCC of anti-HER2 antibodies against breast cancer cell lines mediated by PBMCs from patients. A, HER2 expression in MCF-7 cells (top) and SK-BR-3 cells (bottom) as shown by trastuzumab binding using flow cytometer. B, ADCC of trastuzumab and dFu- α HER2 (1 ng/mL each) in the presence of patient PBMCs as effector cells determined by 4-h lactate dehydrogenase release assay. Target cell lines used are shown above each panel. The plots of the same donor are connected with solid lines. C, mean ADCC of patients ($n = 20$; left) and that of healthy normal donors ($n = 10$; right). Target cell lines used (left). ***, $P < 0.0001$, statistically significant differences between ADCC of the two antibodies, as determined by two-tailed paired t test (B and C). †, $P < 0.001$; ††, $P < 0.0001$, the enhancement of cytotoxicity found by two-way ANOVA (C).

Table 2. Percentage of NK cells and cytotoxicity separated by various clinical variables

Index	Cohort	n	NK%	% Cytotoxicity (target: MCF-7)			% Cytotoxicity (target: SK-BR-3)		
				AICC	ADCC(+fuc) [*]	ADCC(-fuc) [†]	AICC	ADCC(+fuc) [*]	ADCC(-fuc) [†]
Status	Patient	20	11 ± 7.4 [‡]	7.0 ± 15	7.1 ± 5.9 [‡]	20 ± 14 [‡]	3.2 ± 8.3 [‡]	21 ± 14 [‡]	43 ± 18 [‡]
	Normal	10	13 ± 4.8	5.5 ± 14	12 ± 4.6	24 ± 8.0	4.4 ± 8.9	30 ± 12	49 ± 22
Therapy type [§]	Chemotherapy	14	9.0 ± 6.2 [‡]	-1.0 ± 7.1 [‡]	6.5 ± 5.8 [‡]	17 ± 11 [‡]	1.0 ± 7.9 [‡]	16 ± 10 [‡]	36 ± 12 ^{**}
	Others	6	15 ± 8.8	25 ± 13	8.4 ± 6.3	26 ± 17	8.2 ± 7.4	32 ± 16	58 ± 20
Chemo or hormone [§]	Chemo alone	10	8.0 ± 4.3 [‡]	-3.4 ± 4.7 [‡]	6.4 ± 4.6 [‡]	16 ± 11 [‡]	-1.8 ± 5.3 [‡]	15 ± 11 ^{**}	35 ± 12 [‡]
	Hormone alone	4	18 ± 9.5	23 ± 16	6.8 ± 5.2	27 ± 16	11 ± 3.7	38 ± 16	68 ± 14
Disease status [§]	Primary	8	13 ± 9.0 [‡]	18 ± 17 ^{**}	7.4 ± 5.7 [‡]	22 ± 17 [‡]	5.0 ± 8.7 [‡]	26 ± 17 [‡]	50 ± 23 [‡]
	Recurrent	12	10 ± 6.3	-0.2 ± 7.6	6.8 ± 6.2	19 ± 23	0.9 ± 8.2	17 ± 11	38 ± 12
HER2 index ^{§ ††}	Negative (0 or 1+)	14	10 ± 7.3 [‡]	3.2 ± 14 [‡]	6.9 ± 5.8 [‡]	19 ± 13 [‡]	1.5 ± 7.3 [‡]	21 ± 16 [‡]	43 ± 19 [‡]
	Positive (3+)	4	15 ± 7.6	19 ± 12	7.6 ± 7.2	23 ± 16	6.4 ± 12	19 ± 5.8	43 ± 15
FCGR3A genotype [§]	F/F	11	12 ± 7.8 [‡]	13 ± 16 [‡]	5.0 ± 4.5 [‡]	17 ± 13 [‡]	5.6 ± 8.7 [‡]	22 ± 17 [‡]	47 ± 21 [‡]
	V/V + F/V	9	10 ± 7.1	-0.2 ± 9.4	10 ± 6.5	23 ± 14	0.2 ± 7.1	20 ± 12	39 ± 14
Age [§]	Under 55	10	11 ± 6.6 [‡]	1.3 ± 11 [‡]	9.2 ± 7.1 [‡]	23 ± 13 [‡]	3.7 ± 10 [‡]	24 ± 18 [‡]	45 ± 20 [‡]
	Over 55	10	11 ± 8.4	13 ± 17	4.9 ± 3.5	16 ± 14	2.6 ± 6.0	19 ± 10	41 ± 17

NOTE: Percentage ADCC was calculated by subtracting AICC from experimental cytotoxicity in the presence of antibody.

Abbreviation: fuc, fucose.

^{*}Percentage ADCC of 1 ng/mL trastuzumab.

[†]Percentage ADCC of 1 ng/mL dFu-aHER2.

[‡]Not significant.

[§]Indexes for patients.

^{††}*P* < 0.001 (two-tailed unpaired *t* test).

[‡]*P* < 0.05.

^{**}*P* < 0.01.

^{††}Determined by immunohistochemistry.

genotypes of FCGR3A in the current study. Heterogeneous background of the patients might mask the potential effect of FCGR3A genotype on ADCC; for example, 158Val carriers (F/V or V/V) associated with the strong ADCC induction were apparently biased toward chemotherapy cohort, which was shown to be associated with weak ADCC in this study, although it is not clear whether this deflection was related or

not. Age of the patients and HER2 expression in primary tumor tissues determined by immunohistochemistry did not affect NK percentage, AICC, and ADCC.

Type of therapeutic agents might affect NK cell number in PBMCs and thus affects ADCC. The type of therapeutic agent seemed to have influence on NK cell number and ADCC. To understand whether the change in NK cell number was the

Table 3. Multivariate analysis revealed the factor affecting ADCC activity

(A) Stepwise linear regression to ADCC

Step	Variable added	Coefficient	SE	F	Adjusted R ²
1	Fucose (+ = 1; - = 0)	-16.2	3.52	21.3	0.227
2	NK%	1.07	0.20	27.7	0.445
3	Target cell (MCF-7 = 1; SK-BR-3 = 0)	-16.0	2.27	49.8	0.679

(B) Stepwise linear regression to NK%

Step	Variable added	Coefficient	SE	F	Adjusted R ²
1	Hormone alone (yes = 1; others = 0)	13.1	1.73	57.4	0.443
2	HER2 index (positive = 1; negative = 0)	8.51	1.24	46.9	0.633
3	Therapy type (chemotherapy = 1; others = 0)	10.9	1.69	41.1	0.787

NOTE: A: *N* = 70, forward selection method, critical *F* = 4.0. Other variables considered: therapy type (chemotherapy = 1; others = 0), chemo alone (yes = 1; others = 0), hormone alone (yes = 1; others = 0), disease status (recurrent = 1; primary = 0), HER2 index (positive = 1; negative = 0), FCGR3A genotype (V/V+F/V = 1; FF = 0), and age. B: *N* = 72, forward selection method, critical *F* = 4.0. Other variables considered: Chemo alone (yes = 1; others = 0), disease status (recurrent = 1; primary = 0), FCGR3A genotype (V/V+F/V = 1; FF = 0), age, fucose (+ = 1; - = 0), and target cell (MCF-7 = 1; SK-BR-3 = 0).

major cause of modulation of cytotoxicity by therapeutic agents, we first analyzed the relationships between NK percentage in PBMC and AICC or ADCC for all patients (Fig. 4A). Although the relationship between AICC and NK percentage was unclear with no significant correlation for MCF-7 target and weak correlation for SK-BR-3 target ($P < 0.05$), ADCC mediated by the two antibodies was strongly correlated with NK percentage for both targets, suggesting that the change in NK cell number by therapeutic agents might be one of factors in the modulation of ADCC.

To further confirm this hypothesis, ADCC values were recalculated by normalizing to a fixed number of NK cells (10^4 cells). No significant difference on ADCC between chemotherapy alone and hormonal therapy alone groups (especially for SK-BR-3 target) was found after the normalization (Fig. 4B). This may support the hypothesis that the major cause of the impaired ADCC in chemotherapy cohort was the reduced number of NK cells.

Discussion

The current study indicates that enhancement of ADCC by fucose removal from the structure of antibody molecules is shown using PBMCs from both healthy donors and cancer patients. Importantly, the defucosylated anti-HER2 antibody required roughly 10-fold less amount of antibody to achieve the comparable ADCC mediated by trastuzumab, as estimated from mean percentage cytotoxicity of all 20 patients (Fig. 2C). In particular, the difference in the efficacy was

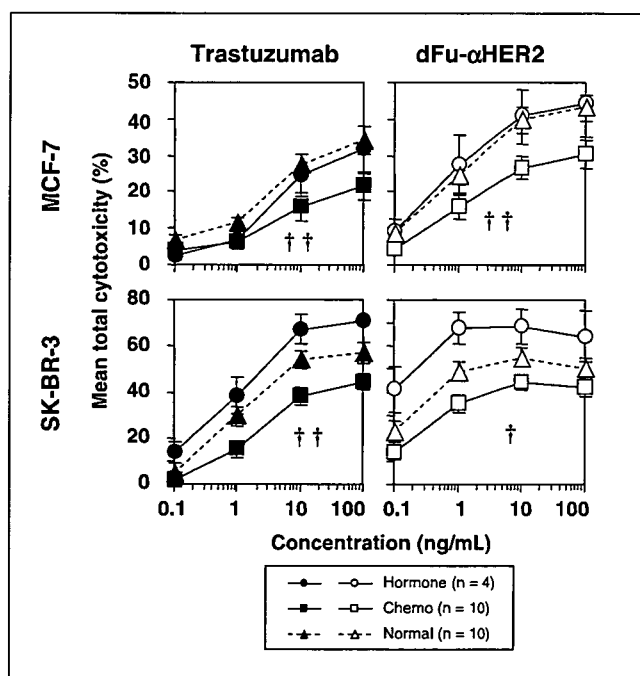


Fig. 3. Cytotoxicity according to the therapeutic types. Mean value of the ADCC of patients receiving hormone agent alone (*Hormone*), patients receiving chemotherapeutic agent alone (*Chemo*), and healthy normal donors (*Normal*) are separately plotted. Anti-HER2 antibodies and target cell lines used are shown above and left side of each panel, respectively. †, $P < 0.01$; ††, $P < 0.001$, statistically significant differences of ADCC versus chemotherapy cohort found by two-way ANOVA.

more pronounced for MCF-7 cells with less HER2 expression, with higher maximal (saturating) cytotoxicity for defucosylated antibody. Although the experimental *in vitro* data on augmentation of ADCC with fucose-negative trastuzumab may have no relevance in clinical setting, these data suggest that fucose-negative version of trastuzumab might show better clinical outcome in HER2-overexpressing breast cancer patients.

The second interesting finding is that the type of therapeutic agent might modulate ADCC. Patients who received chemotherapy alone ($n = 10$) showed reduced NK cell number and this might consequently have impaired AICC and ADCC. Fucose removal from trastuzumab could compensate for this ADCC impairment by elevating ADCC of chemotherapy cohort to the similar or higher level compared with that of hormonal therapy cohort. Enhancement of ADCC by fucose removal from the antibody structure may have some clinical importance because trastuzumab therapy is universally used in combination with chemotherapy and has been shown to exert clinical benefit (4–8).

Using two target cell lines, it was shown that ADCC of patients or healthy donors consistently showed higher level against the HER2-overexpressing SK-BR-3 cells than for MCF-7 cells, which express less HER2. Interestingly, ADCC activity in MCF-7 treated with dFu- α HER2 was comparable with that in SK-BR-3 treated with conventional trastuzumab, and this tendency was seen for any grouping of the patients as shown in Table 2. It is surprising because the difference in HER2 expression between both targets has been estimated to be two orders of magnitude ($\sim 2 \times 10^4$ and $\sim 1 \times 10^6$ molecules per cell for MCF-7 and SK-BR-3, respectively; ref. 33). These data might suggest that dFu- α HER2 could overcome heterogeneous efficacy of antibody therapy for breast cancer depending on HER2 expression level, although it is unclear whether the antigen expression level is the sole factor that determines ADCC, and the use of target cell lines of different origins may not be an adequate system to investigate the quantitative relationships between antigen expression and ADCC (36). The reduction of antigen amount necessary for ADCC induction by fucose removal can be analyzed more quantitatively by using experimental target cell clones with different expression levels of exogenously transfected antigen gene (36).

As for effect of FCGR3A genotype on ADCC, in contrast to previous reports, in this study, variant of FCGR3A on PBMC did not affect ADCC activity. This could be explained by unexpected distribution of V carrier that is apparently biased toward chemotherapy that would decrease ADCC activity. Supporting this, after being normalized to NK cell number, ADCC showed a tendency of V carrier $>$ F/F (data not shown) that is consistent with the fact that the presence of V allele is associated with higher ADCC (19, 20).

In conclusion, removal of a fucose from the antibody structure enhanced ADCC activity *in vitro* against two breast cancer cell lines with different HER2 expression levels as target cells. This may result in an improvement in the clinical effectiveness for therapeutic antibodies, although other effector functions of antibodies, such as complement-mediated cytotoxicity and apoptosis induction, should be taken into account to fully predict the clinical benefits. It is also suggested that nonfucosylated antibodies are more potent in ADCC compared

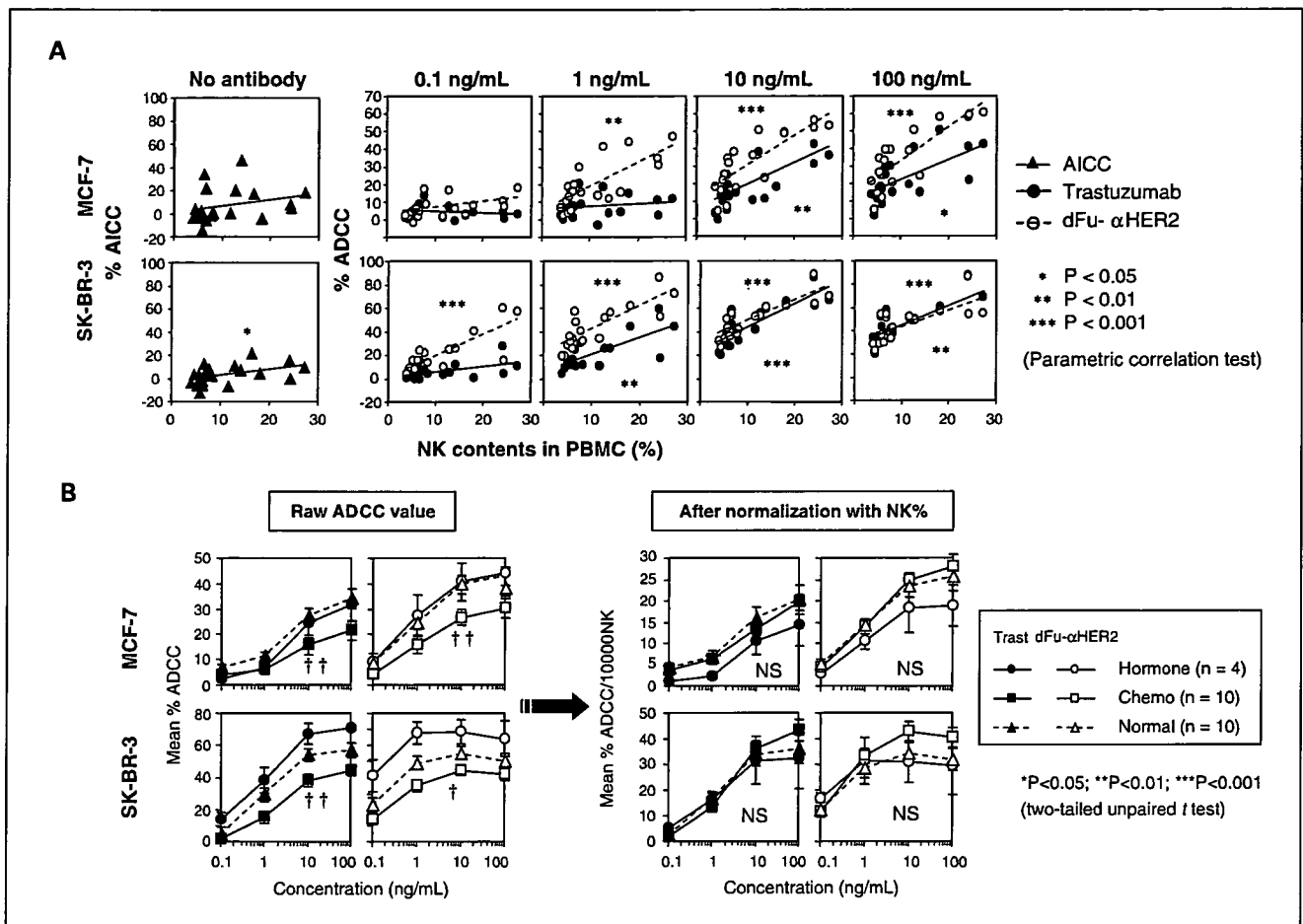


Fig. 4. Analyses on the effect of NK cell content on cytotoxicity. *A*, correlation between cytotoxicity and the percentage of NK cells in PBMCs. Cytotoxicity of all 20 patients recruited in the present study in the absence (AICC; *left*) or presence of antibodies (ADCC; *right*) and the regression lines. Concentrations of each antibody and target cell lines used are shown above and left side of each panel, respectively. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, statistically significant correlations, as determined by parametric correlation test. *B*, ADCC normalized to a fixed number (10^4) of NK cells. Mean values of ADCC of each cohort (*left*) were recalculated to normalize the individual heterogeneity of NK cell content (*right*). Differences of cytotoxicity found by two-way ANOVA (*left*) are diminished after the normalization (*right*).

with conventional fucosylated antibodies; therefore, the less amount of antibody compared with conventional trastuzumab may be required for treatment. Future clinical studies should be investigated to address these questions.

Acknowledgments

We thank Dr. George Spitalny for helpful suggestions and critical reading of the manuscript.

References

- Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198:165–84.
- Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4285–9.
- 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* 2002;20:719–26.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783–92.
- Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al. Randomised phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005;23:4265–74.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673–84.
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1659–72.
- Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3676–85.
- Pauletti G, Dandekar S, Rong H, et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000;18:3651–64.
- Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (Herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61: 4744–9.
- Le XF, Claret FX, Lammayot A, et al. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G₁ cell cycle arrest and tumour growth inhibition. *J Biol Chem* 2003;278: 23441–50.
- Jackson JG, St Clair P, Sliwkowski MX, Brattain MG. Blockade of epidermal growth factor- or heregulin-dependent ErbB2 activation with the anti-ErbB2 monoclonal antibody 2C4 has divergent downstream

- signaling and growth effects. *Cancer Res* 2004;64:2601–9.
13. Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and anti-tumour action. *Cancer Res* 2002;62:4132–41.
 14. Mohsin SK, Weiss HL, Gutierrez MC, et al. Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol* 2005;23:2460–8.
 15. Lewis GD, Figari I, Fendly B, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 1993;37:255–63.
 16. Leget GA, Czuczman MS. Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. *Curr Opin Oncol* 1998;10:548–51.
 17. Gopal AK, Press OW. Clinical applications of anti-CD20 antibodies. *J Lab Clin Med* 1999;134:445–50.
 18. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 2003;22:7359–68.
 19. Koene HR, Kleijer M, Algra J, von Roos D, den Born AE, de Haas M. FcγRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell FcγRIIIa, independently of the FcγRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 1997;90:1109–14.
 20. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, et al. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* 1997;100:1059–70.
 21. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumours overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 2004;10:5650–5.
 22. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 2006;94:259–67.
 23. Shields RL, Lai J, Keck R, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002;277:26733–40.
 24. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting *N*-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 2003;278:3466–73.
 25. Niwa R, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, et al. Defucosylated anti-CC chemokine receptor 4 IgG1 with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity shows potent therapeutic activity to T cell leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 2004;64:2127–33.
 26. Okazaki A, Shoji-Hosaka E, Nakamura K, et al. Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcγRIIIa. *J Mol Biol* 2004;336:1239–49.
 27. Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E, et al. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of FcγRIIIa functional polymorphism. *Clin Cancer Res* 2004;10:6248–55.
 28. Nakamura K, Tanaka Y, Fujino I, Hirayama N, Shitara K, Hanai N. Dissection and optimization of immune effector functions of humanized anti-ganglioside GM2 monoclonal antibody. *Mol Immunol* 2000;37:1035–46.
 29. Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, et al. Establishment of FUT8 knock-out CHO cells; an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced ADCC. *Biotechnol Bioeng* 2004;87:614–22.
 30. Kanda Y, Yamane-Ohnuki N, Sakai N, et al. Comparison of cell lines for stable production of fucose-negative antibodies with enhanced ADCC. *Biotechnol Bioeng* 2006;94:680–8.
 31. Leppers-van de Straat FGJ, van der Pol WL, Jansen MD, et al. A novel PCR-based method for direct Fcγ receptor IIIa (CD16) allotyping. *J Immunol Methods* 2000;242:127–32.
 32. Kobayashi T, Sugita N, van der Pol WL, et al. The Fcγ receptor genotype as a risk factor for generalized early-onset periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol* 2000;71:1425–32.
 33. Prang N, Preithner S, Brischwein K, et al. Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2005;92:342–9.
 34. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:197–223.
 35. Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 2002;3:6–8.
 36. Niwa R, Sakurada M, Kobayashi Y, et al. Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clin Cancer Res* 2005;11:2327–36.

はじめに

Introduction



戸井雅和

Masakazu Toi

京都大学医学部附属病院乳腺外科

原発性乳癌の約7割はホルモン受容体を発現し、本来ホルモン感受性を有する。ホルモン受容体陽性の乳癌はホルモン療法に反応するが、その効果にはかなり大きなグラデーションがある。また、ホルモン感受性は腫瘍の進展とともに低下し、晩期の癌では効果が少ない。

ホルモン療法は乳癌の発症予防、再発予防などにおいては非常に大きな力を発揮する。抗エストロゲン剤 tamoxifen は、数ある固形癌の治療薬のなかでも腫瘍特異性、再発抑制効果においてもっとも優れた薬剤のひとつといわれ、現在の分子標的治療薬の臨床開発モデルにもなっている。癌の治療だけでなく、癌の予防にも用いられる。

100年以上の臨床研究の歴史を有する乳癌のホルモン療法であるが、現在も進化を続けており、つぎつぎと新しい診療概念や治療法、手法がでてくる。それらは散発的に出るのではなく、一定の脈絡を保ちながら系統的に現れる。理詰めで、科学的で、息が長く、完成に数百年を要するヨーロッパの建造物の感がある。さて本特集では、現在の乳癌のホルモン研究に関するトピックス、課題、将来展望が取り上げられた。基礎から臨床への展開、効果予測と耐性などトランスレーショナルな側面と、化学療法との関連性を含む術前術後の補助療法、骨の問題などの臨床的側面に大別されるが、いずれもいまの乳癌のホルモン療法を考える、あるいは行うにあたって、必要不可欠な情報が含まれている。

ホルモン感受性は単にホルモン療法において重要であるだけでなく、その他の治療法においても大切である。化学療法の効果に深く関与し、基礎的には抗HER療法や抗血管新生療法の効果にもかかわることが指摘されている。ホルモン療法を理解することは、その他の治療法を理解することにもつながる。

はじめに

Introduction



戸井 雅和

Masakazu Toi

京都大学大学院医学研究科外科学講座乳腺外科学

現在開発中、あるいは今後開発が予定されている薬剤の大多数がいわゆる分子標的治療薬である。臓器別にみれば、血液、乳腺、消化管の腫瘍等では一標的複数治療薬の時代に入っている。すでに確立された治療法では治療の適性化と個別化、そして耐性への対応が最重要の課題であり、そのなかで新たな治療標的を模索し、新規治療法を開発することが一般的に行われるようになった。一見すると従来型の薬剤開発とあまり差がないように思えるが、対象となる主要な標的が定まっている場合の治療法開発の速度は驚くほど速い。HER2 陽性乳癌に対する治療を例にとれば、抗 HER2 抗体 trastuzumab が臨床導入されて以降、それまで最も予後不良であった乳癌サブグループが、むしろ予後良好の範疇に加えられるようになり、HER 受容体 tyrosine kinase 阻害剤 lapatinib の導入によって、乳癌のなかでも最も治癒率の高いサブグループになるのではないかという推測が現実味を帯びている。同時に、化学療法との併用を必要とする癌と必ずしも併用を必要としない癌との識別や、投与期間の検討、さらにはコストの問題等が、新規薬剤の開発による治療効果の追求とともに真剣に討議されるようになった。この数年間の変化には本当に目を見張るものがある。

このような分子標的治療法に関する治療の適性化、治療個別化の探求、効率性への配慮は、状況は異なるにしろ、各治療法、各領域で一斉に始まっている。したがって、臨床試験においても、単に抗腫瘍効果や生存に関する検討だけでなく、付随研究、なかでも proof of concept に関わるような translational research を含む試験が、著しく増加している。理詰めの臨床試験が増えてきたとも言えるかもしれない。そのような観点から、様々な治療法開発の現状、最先端をみることはおおいに興味深いと考えられる。

抗VEGF療法(乳腺)

—原発性乳癌に対する治療応用が視野に

Anti VEGF therapy



戸井雅和

Masakazu Toi

京都大学大学院医学研究科外科学講座乳腺外科学

◎抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 療法をどのように臨床応用するか、現在の重要な課題である。HER2 発現のような癌と正常との間の大きな threshold は存在せず、タキサンを中心とする化学療法との併用、HER2 陽性乳癌における trastuzumab との併用、ホルモン受容体陽性乳癌におけるホルモン療法との併用が原発性乳癌の臨床試験において検討されている。なかでも軸となる治療法がないホルモン受容体陰性、HER2 陰性の乳癌に対する有用性が期待されている。効果の予測はまだ難しく、効果のモニタリングが種々のアッセイ系を用いて試みられている。併用抗癌剤の選択、投与期間、投与のタイミングなどに関するさまざまな角度からの検討も行われている。



抗VEGF療法, 乳癌, ホルモン

Vascular endothelial growth factor (VEGF) の乳癌における重要性が指摘されて十数年になる。再発乳癌における臨床試験、有用性の検証を経て、現在では原発性乳癌、なかでも確立された治療法がまだなくもっとも治療困難な乳癌の亜群である triple negative (estrogen receptor negative : progesterone receptor negative, HER2 negative) 乳癌に対する有用性を検討する臨床試験がスタートしようとしている。

乳癌治療全体を通して非常に重要な試みであり、今後の乳癌治療法開発全体にも大きな影響を与える臨床試験である。過去の成績からみれば効果を期待できるが、一方で課題や問題点も指摘されている。これらの現状について展望も踏まえながら考察する。

乳癌の予後とVEGF

VEGF は種々の固形癌で高発現することが知られていたが、予後因子としての意義については1994年ごろから指摘され、1990年代後半にほぼ確立した。ELISA法を用いた検討から、リンパ節転

移を有さず全身治療を行っていない原発性乳癌における腫瘍組織内 VEGF 蛋白発現量が、有意の独立した予後因子になることが証明された。また、リンパ節転移を有する癌でも予後因子になることが指摘されてきたが、術後の薬物療法との関連性においてきめ細かく考える必要があることも同時に判明した。たとえば、ホルモン療法存在下では VEGF 発現はホルモン療法耐性に関与する傾向があり、化学療法では種類などによってその臨床的意義が異なる可能性がある^{1,2)}。最近、高用量化学療法施行時の VEGF の意義が報告されたが、治療対象に偏りがあるにせよ、腫瘍組織内微小血管密度は有意の予後因子であったが、VEGF はそうではなかったと報告されている³⁾。

ホルモンとVEGF

ホルモン依存性増殖と VEGF 発現が密接に関与することは以前から指摘されており、estradiol 刺激により VEGF 系の活性化が起こることはよく知られている。培養細胞系では estradiol の除去は VEGF 産生抑制を惹起する。Anti-estrogen,

あって、したがって、特異性の面では VEGF 受容体だけを抑制するのではなく、しばしば他の受容体や分子のチロシンキナーゼも阻害する。マルチチロシンキナーゼ阻害剤として、複数の受容体を同時に抑制することを目的としているものもある。臨床開発においてはその詳細はきわめて重要で、とくに platelet derived growth factor receptor (PDGFR) のように周皮細胞や血管透過性、さらには組織間質圧などに密接にかかわる分子が調節される場合には毒性面、また化学療法剤との併用の場合には腫瘍内薬物濃度に大きな影響を与えるため、注意が必要である。

抗 VEGF 療法に共通して出現する毒性は、高血圧などの血管性の異常、耳鳴りや頭痛などの中枢神経系の症状、腎に関する毒性、また出血などで、単剤で使う場合にはこれらが dose-limiting となる。一方、どれほどの薬物濃度があれば十分な効果を期待できるか、biological optimal dose はかならずしもよくわかっていない。とくに抗体療法の場合、重要な課題と考えられている。

再発乳癌での成績

乳癌における抗 VEGF 療法の臨床開発は単剤の効果が限られたものであったため、併用が主体となった。中和抗体 bevacizumab 併用はまず、capecitabine との間で行われた。当時の状況においてアンストラサイクリン、タキサン既治療例で検証することが妥当と考えられたためである。実験的にはタキサンとの併用が強力であることを示す知見がすでに多数存在していた。Capecitabine との併用試験は抗腫瘍効果においては有意の併用作用を示した⁷⁾。したがって、けっしてネガティブトリアルではないが、病勢増悪までの期間などの生存に及ぼす影響は有意とはいえ、明らかな予後延長効果は証明されなかった。しかし、安全性はおおむね問題ないことが確認され、再発乳癌の 1st-line 治療においてタキサン、weekly paclitaxel との併用効果を検証する試験が企画遂行された。この試験においては抗腫瘍効果、生存に及ぼすインパクト双方において有用性が確認され、乳癌における bevacizumab の有用性がほぼ確立したといえる。Bevacizumab に続いて VEGF trap の臨床開

発も進んでいる。Genetic engineering による作成された大分子阻害剤であるが、bevacizumab とは異なる活性を示す可能性もあり、今後の展開が興味深い⁸⁾。

低分子阻害剤では sunitinib, axitinib, TSU6668 などの臨床開発が再発乳癌を対象に精力的に行われている。そのなかで sunitinib は、アンストラサイクリン、タキサン既治療例で単剤でありながら高い有用性を示している。毒性もあるため化学療法の併用においてある程度制限があるかもしれないが、きわめて有望である。TSU compound はタキサンとの併用が検証されている。Axitinib は、VEGFR のほかに PDGFR, cKIT なども抑制するチロシンキナーゼ阻害剤である。2007 年のアメリカ臨床腫瘍学会で、ドセタキセルとの併用に関する比較試験の成績が公表された。168 例が検討され、抗腫瘍効果はドセタキセル群 23% に対し axitinib 併用群 40% で有意に良好な成績が得られた。しかし、生存に及ぼす影響に関してはこれまでのところ有意には至っておらず、効果の持続性に関する課題が指摘された。最近報告された基礎実験によると、axitinib 治療は腫瘍血管の退縮を強力に誘導する。しかし、薬剤接触を止めると腫瘍血管は急速に新生し 1 週間ほどで元に戻ってしまうという。腫瘍血管の退縮と回復新生はきわめてダイナミックに行われていることが知れる⁹⁾。

臨床的に考察すると、いわゆる drug-off の期間では急速な腫瘍血管のリカバリーが起こっている可能性がある。また、抗癌剤はアポトーシスなどを惹起する一方で、血管新生を誘導するメカニズムを活性化することも知られている。したがって、drug の on-off をどのように計画するか、前述の biological optimal dose と密接に関係するが再度慎重に考慮する必要がある。

原発性乳癌における検討、臨床試験

原発性乳癌に対しては比較的大きな腫瘍を対象に術前の治療が試みられてきた。効果もさることながら最近、きわめて興味深い translational research の結果が報告された。Bevacizumab 接触により VEGFR のリン酸化が顕著に抑制され、腫瘍のアポトーシスの誘導が生じていた。短期間の接触では

selective estrogen receptor modulator (SERM) と接触すると、VEGF の産生低下よりも細胞外への分泌抑制が起こる。興味深いことに、VEGF の強力な内因性阻害蛋白である soluble VEGF receptor (sVEGFR1) の挙動で、estradiol 除去時、SERM 接触時 VEGF とはまったく逆の挙動を示す^{4,5)}。したがって、血管新生の主要なプレイヤーである VEGF のアクセラとブレーキがホルモン療法時には連動して機能している。また、乳癌細胞が VEGFRs を発現していることも重要な知見である。

原発性乳癌を対象に VEGF と sVEGFR1 の臨床的意義を検討した研究では、VEGF と sVEGFR1 の意義はホルモン受容体陽性の乳癌と陰性の乳癌では異なり、ホルモン受容体陽性乳癌では VEGF の予後因子としての意義は明確であったが、sVEGFR1 は有意の予後因子ではなかった。ホルモン療法の存在下での解析であり、ホルモン療法の影響がもっとも示唆される。VEGF はホルモン療法耐性に密接にかかわることが臨床的にも示唆される。他方、ホルモン非依存性の乳癌では VEGF も sVEGFR1 いずれも強力な予後因子であった。VEGF 発現は予後不良、sVEGFR1 過剰発現は予後良好の指標である。これらを組み合わせ、比をとると VEGF が高く sVEGFR1 が低い症例はきわめて予後不良であった。このような腫瘍では VEGF 系がきわめてドミナントに機能していることがう

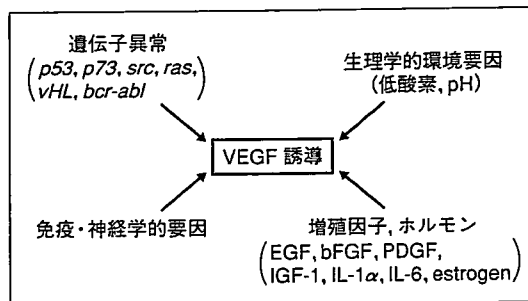


図 1 VEGFの誘導

かがい知れる。なお、sVEGFR1 の発現量は VEGF のそれと平均値において変わらない。したがって、ヒトの乳癌組織内においては、すでに内因性阻害蛋白が相対的に優位である腫瘍が少なからず存在する。sVEGFR1 の VEGF に対する親和性は非常に高いため、組織中に存在する sVEGFR1 が何らかの修飾を受けず作用しているとすれば、VEGF を中和できる量が存在していることになる⁶⁾(図 1, 2)。

抗VEGF療法

抗 VEGF 療法には大きく、細胞の外で VEGF を中和する方法と、VEGF 受容体の機能を抑制する方法がある。前者は抗体や VEGF をトラップする分子で、大分子量である。VEGFR 阻害は受容体チロシキナーゼ阻害を主体とする低分子阻害剤で

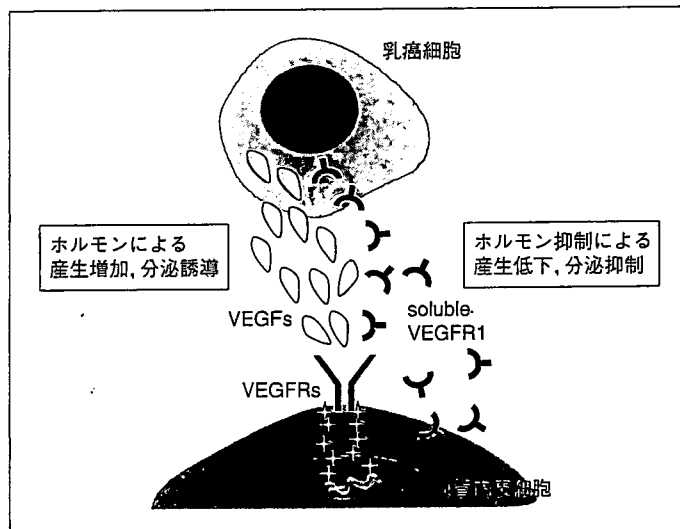


図 2 VEGFとホルモン

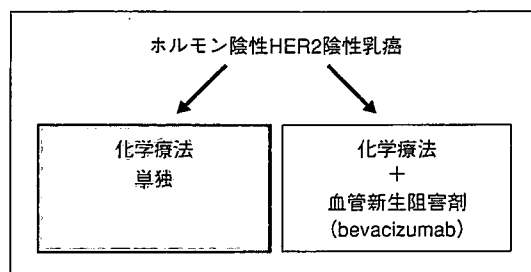


図 3 BEATRICE試験

表 1 Bevacizumabの臨床試験

・ AVADO and RIBBONI	taxane or anthra. +/- bevacizumab (HER2-ve 1st line 再発乳癌)
・ AVEREL	trastuzumab + docetaxel +/- bevacizumab (HER2+ve 1st line 再発乳癌)
・ E5103 BEATRICE	chemotherapy +/- bevacizumab (Her2-ve PBC) (triple-negative 原発性乳癌)
・ BETH	trastuzumab + chemo. +/- bevacizumab (HER2+ve 原発性乳癌)

あるが、proof of concept 研究として意義深い結果である。

術後の検討についてはさまざまな臨床試験が企画され、すでにいくつかの試験が進行している。大規模試験としては、冒頭に触れた triple negative を対象に化学療法との併用の有用性を検証する試験、HER2 陰性を対象として同様に化学療法上乗せ、ホルモン療法上乗せを検証する試験、そして HER2 陽性乳癌を対象に trastuzumab との併用を検証する試験などがある。3 年ほどで結果はでてくるであろう(図 3, 表 1)。

課題, 問題点

課題としては、まず optimal biological dose をどのように考えるか、モニターするかの問題が大きい。かならずしも抗 VEGF 療法に限った問題ではないが、それぞれの標的に応じてこの問題は考える必要がある。最近では circulating endothelial cell や circulating endothelial progenitor cell の挙動をモニターして血管新生の抑制の度合いを測定しようとする試みが進んでいる。これは血管新生阻害剤の drug-off やリバウンドとの問題にも直結し、循環血液中の内皮関連細胞を測定することで、血管新生阻害療法を調節しようとする戦略である。血管新生阻害による癌のメトロニック治療

とも密接にかかわる¹⁰⁾。

投与期間の問題も重要である。上述のメトロニック治療の概念からすれば、ある程度長期の投与が必要である。現在の原発性乳癌に対する臨床試験では、bevacizumab の投与期間は多くが 1 年としている。一方、最近公表された再発乳癌を対象にした beyond disease progression に対する bevacizumab 投与の有用性をみる観察試験では、病勢が増悪しても長期に bevacizumab 投与を行った症例、あるいは行いえた症例の予後は病勢増悪時に bevacizumab 投与を終了した症例に比べ有意に良好である。乳癌ではホルモン療法の投与期間は最低 5 年が必要と考えられている。Trastuzumab の至適投与期間がどれほどかについては現在種々の臨床試験が進行している。投与期間の問題は血管新生阻害剤においては crucial な課題であり、今後検討すべきと考える。

文献

- 1) Toi, M. et al. : Vascular endothelial growth factor : its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol.*, 11 : 667-673, 2001. (review)
- 2) Gasparini, G. et al. : Angiogenic inhibitors : a new therapeutic strategy in oncology. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 11 : 562-577, 2005. (review)
- 3) Nieto, Y. et al. : Prognostic analysis of tumour angi-

ogenesis, determined by microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *Br. J. Cancer*, 97 : 391-397, 2007.

- 4) Garvin, S. and Dabrosin, C. : Tamoxifen inhibits secretion of vascular endothelial growth factor in breast cancer *in vivo*. *Cancer Res.*, 63 : 8742-8748, 2003.
- 5) Elkin, M. et al. : An angiogenic switch in breast cancer involves estrogen and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *J. Natl. Cancer Inst.*, 96 : 875-878, 2004.
- 6) Bando, H. et al. : Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 92 : 553-561, 2005.
- 7) Miller, K. D. et al. : Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23 : 792-799, 2005.
- 8) Baka, S. et al. : A review of the latest clinical compounds to inhibit VEGF in pathological angiogenesis. *Expert Opin. Ther. Targets*, 6 : 867-876, 2006. (review)
- 9) Mancuso, M. R. et al. : Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J. Clin. Invest.*, 116 : 2610-2621, 2006.
- 10) Shaked, Y. and Kerbel, R. S. : Antiangiogenic strategies on defense : on the possibility of blocking rebounds by the tumor vasculature after chemotherapy. *Cancer Res.*, 67 : 7055-7058, 2007. (review)

* * *

がん分子標的治療

Theme

HER familyをターゲットとした分子標的治療

Vol.5 No.1

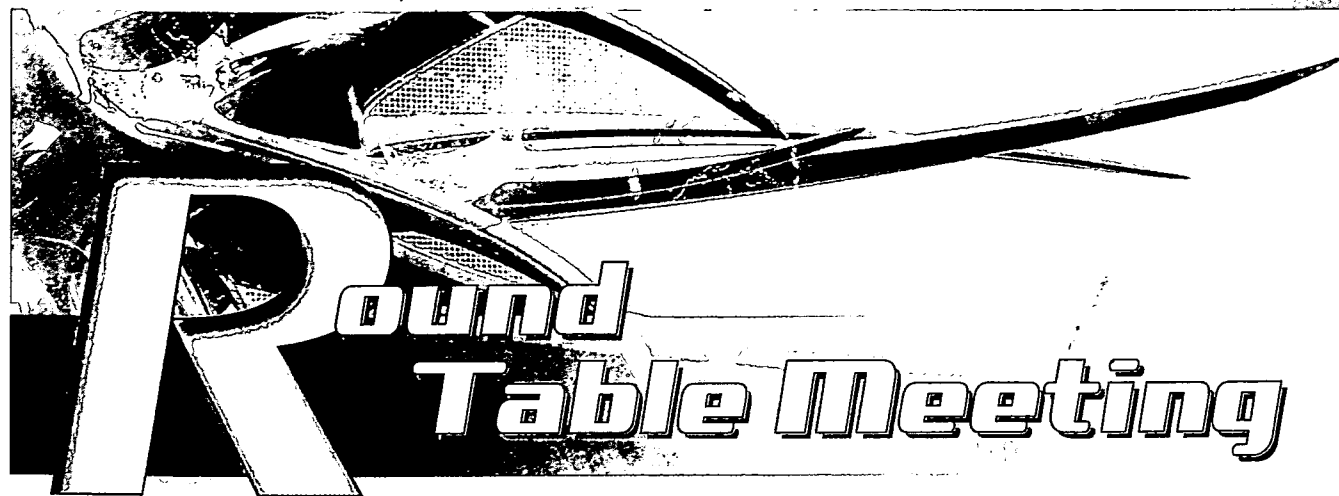
2007

1

Molecular Targeted Therapy For Cancer

For Cancer

カルチャー社



Anti-HER therapy

司会

東京都立駒込病院外科・臨床試験科部長(現 京都大学大学院医学研究科乳腺外科学教授)

戸井 雅和

Masakazu Toi

愛知県がんセンター中央病院乳腺科部長

岩田 広治

Hiroji Iwata

Breast Cancer Research Professor of Oncology and Director of the Breast Cancer Program at the Johns Hopkins University School of Medicine

Nancy E. Davidson

ABSTRACT

分子標的治療薬のなかでもいち早く世に出た抗HER2抗体であるトラスツズマブは、HER2陽性乳がんの治療に大きく貢献してきた。本座談会では、トラスツズマブの臨床研究の第一人者、東京都立駒込病院外科・臨床試験科部長(現 京都大学大学院医学研究科乳腺外科学教授)戸井雅和先生の司会のもと、HERA trialなどの臨床試験にも積極的に関わり、新しいデータを提供されている愛知県がんセンター中央病院乳腺科部長 岩田広治先生、そして、米国における乳がんの臨床研究の中心的存在であり、細胞レベルの検討でも成果をあげているBreast Cancer Research Professor of Oncology and Director of the Breast Cancer Program at the Johns Hopkins University School of Medicine, Nancy E. Davidson

先生をお迎えし、トラスツズマブを中心とする抗HER療法(anti-HER therapy)の現状について、特に臨床試験の動向を中心にご紹介いただいた。

トラスツズマブをアジュバント療法にどのように組み込んでいくか、効果的な併用法や投与期間をいかに見出すか、乳がん以外のHER2陽性腫瘍には適応されるのか——さまざまな角度からの議論が必要とされている。現段階ではごく限られた範囲の適応しか得られていないanti-HER therapyであるが、最近では複数のグループの協力による世界規模の臨床試験も行われるようになってきた。こうした連携の結果として、スムーズな試験の進行、ひいては患者への迅速な成果の還元が期待される。

適応拡大を視野に入れた トラスツズマブの臨床試験

戸井 本日は座談会にご出席いただき、誠にありがとうございます。今回は抗HER療法(anti-HER therapy)に焦点を当て、米国と日本においてさまざまな臨床試験に関わってこられたお2人の先生にお話をうかがいます。

早速ですが、乳がんにおけるanti-HER therapyの最近の動向について簡単にご説明いただきたいと思えます。現在、一般臨床の場で用いられている唯一の薬剤は、HER2に対するモノクローナル抗体であるトラスツズマブですが、米国および日本での使用の現状はどのようになっているのでしょうか。

Davidson 現在FDAの承認を得ているトラスツズマブの適応はHER2を過剰に発現する転移性乳がん、米国内ではすでに一般的な治療法となっています。また、大半の医師は一般診療において早期乳がん患者にもトラスツズマブを使用しているようです。早期乳がんに関しては、リンパ節転移陽性の患者を対象とした4つの国際的な臨床試験で有効性が示唆されており、まだFDAの承認を得られていないのが不思議なくらいですが、まもなく承認される見通しです。日本では、トラスツズマブの適応はどのようになっていますか。

岩田 米国同様、日本でも転移性乳がんについてはすでに承認を得ていますが、早期乳がんではまだ承認されていません。

戸井 現在、一般臨床の場では、トラスツズマブ投与の際にどのような薬剤との併用が認められているのでしょうか。また、トラスツズマブ単剤での用法はありますか。

Davidson 併用療法の唯一の適応は難治性転移性乳がんに対するカベシタピンとの併用療法で、単剤療法はありません。現在、進行性乳がんに対するカベシタピンとの併用試験がFDAの審査を受けており、まもなく承認されるであろうと期待されています。

しかし、適応外の多数の患者がトラスツズマブの使用を希望しているため、こうした患者に対しては、薬剤の例外的な使用を認めるCompassionate Use Programを通して治療を受けることができるようになっ

ています。

戸井 カベシタピン以外にも、トラスツズマブと化学療法剤との併用についてはさまざまな組み合わせが考えられており、実際に多くの試験が行われています。そのうちの1つ、パクリタキセルとの併用についてはどのようにお考えですか。

Davidson われわれも参加したNorth Central Cancer Treatment Group(NCCTG) N9831 trialでは、パクリタキセルと並行してトラスツズマブの投与を開始する群と、すべての化学療法後にトラスツズマブを投与する群との比較を行い、前者のほうが予後が良好であるという所見を得ました。われわれの施設ではこの結果をもとに、パクリタキセルとトラスツズマブの併用療法を行っています。NCCTG N9831 trialはまだフォローアップを終えていませんので、今後はこの状況が持続するかどうかを見極めていく必要があります。

戸井 最近では、アジュバント療法としてトラスツズマブを使用するという考え方も広く注目されていますね。たとえば、すでに開始されている国際的な試験の1つにHERA trialがあります。この試験ではHER2陽性の早期乳がん女性患者を対象とし、アジュバント化学療法前後におけるトラスツズマブ投与の効果を検討しました。世界規模で行われた試験で、もちろん日本も参加しています。

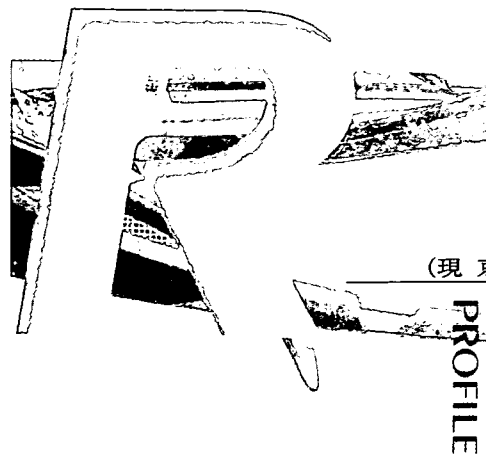
岩田 愛知県がんセンターでは、53名もの患者を登録しました。

戸井 HERA trialの結果からは、トラスツズマブ投与による死亡リスク、再発リスクの軽減が認められていますね。

岩田 はい。この試験ではトラスツズマブ無投与群に対してトラスツズマブ1年間投与と2年間投与の比較を行い、無投与群と1年間投与群の比較の結果では1年間投与群で生存期間の有意な延長を認めました。次の課題としては、適切な投与期間の設定が挙げられると思います。

次世代の抗HER療法、 lapatinib

戸井 開発中の新薬も含めたアジュバント療法の試



戸井 雅和 氏

Masakazu Toi

東京都立駒込病院外科・臨床試験科部長
(現 京都大学大学院医学研究科乳腺外科学教授)

PROFILE

1982年広島大学医学部卒業。1988年広島大学医学博士号取得。同年、広島大学助手。1990～1992年Oxford大学臨床腫瘍学、および分子医学研究所分子血管新生研究室に留学。1992年東京都立駒込病院に赴任。1993～1998年東京大学人類遺伝学非常勤講師。2000年よりHarvard大学、Dana-Farber癌研究所に留学(UICC Yamagiwa-Yoshida fellow)。2002年より東京都立駒込病院部長。乳がんの臨床、トランスレーショナルリサーチ、新しい分子標的治療法の開発に携わる。



験としては、トラスツズマブとlapatinibとの併用をみる新しい試験も注目されています。

Davidson Lapatinibは、HER1分子の上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor; EGFR)とHER2分子との両方を阻害する性質をもつ、新しい薬剤です。ただ、その効果の大半はHER2分子の阻害によるものと考えられ、現在のところ、試験の対象はHER2陽性乳がん患者に限られています。

岩田 日本で行われたlapatinibの第II相試験は、アントラサイクリン系抗がん剤、タキサン系抗がん剤、トラスツズマブすべてを既に行っていた再発患者を対象にlapatinib単剤投与で行われました。患者45例が登録され、24%に効果をえました。米国の試験で報告されている奏効率は10%程度でしたね。

Davidson 米国の試験では、対象患者は事前に複数の療法と多量のトラスツズマブ投与を受けていましたが、日本の試験も同様なのでしょうか。

岩田 ええ、そうです。

Davidson だとすれば、それはすばらしい結果ですね。

戸井 すでに行われた試験の結果から、パクリタキセル単独療法に比べてトラスツズマブとパクリタキセルの併用療法は脳や中枢神経系への転移による死亡の頻度を高めるという問題点が指摘されています。しかし最近では、こうした症例の脳転移に対してlapatinibが効果をあげたとする報告もみられますね。

Davidson 確かにいくつかの試験で、トラスツズマブを投与した患者の一部に脳転移の増加を示す結果

が出ています。私はこの結果を、トラスツズマブは脳にそれほど進入しない代わりに全身疾患の管理という点で効果を発揮し、結果として脳転移を発現するほど患者は長生きする、ということではないかと考えています。Lapatinibの効果については、ご指摘の通りペルーの研究者による試験で、lapatinib投与患者で脳転移が減少したという報告があります。他にも同様の報告がいくつかあり、これが事実ならば非常に興味深いと思います。

戸井 脳転移をきたした症例にlapatinibを併用投与していくという方法も、今後選択されるのではないかと思います。

Davidson そうですね。Lapatinib投与により中枢神経系を保護することができるならば、併用療法は非常に有益なものになるでしょう。

より適切な投与方法・投与期間の確立を目指して

戸井 化学療法とトラスツズマブとの併用療法によって抗腫瘍効果が得られた場合、引き続きトラスツズマブの投与を続けていくべきかどうかの問題になります。Davidson先生はどのような方針で投与されているのでしょうか。

Davidson トラスツズマブが抗腫瘍効果の発現に寄与したと考えられ、それが患者の利益になるのであればすばらしいことです。私ならその後しばらく投与を続けるでしょう。特に腫瘍サイズが大きいか、

悪性度の高い腫瘍ならば、投与を継続する可能性は高いです。実際、われわれは1年間も日常的にトラスツズマブの投与を続けていますし、きわめて腫瘍サイズが小さいか、ステロイド受容体強陽性の腫瘍でない限り、早期乳がん患者にトラスツズマブを投与しています。

岩田 トラスツズマブの投与をいつまで続けるべきか、これに関するエビデンスはありませんね。

Davidson そうですね。効果の得られている療法から薬剤を減らす試験を行おうと考える人はなかなかいませんから、実際の計画は困難であると思います。ただ、そのなかにあつて、Baylor College of MedicineのJenny Chang氏がたいへん興味深い試験を行っています。非常に進行した原発性乳がん患者を対象としたものですが、トラスツズマブの1回投与後に生検を行い、さらにその後の経過も観察したところ、3週間後にはアポトーシスの誘導による腫瘍の部分的縮小が認められたというのです。われわれも含め多くの研究者は1年以上かけて試験を行ってきましたが、これほどの短期間で成果が得られたという事実は、今までの試験方法が正しかったのかを考えさせられる結果となりました。

フィンランドのグループによるFinHer studyも、短期間の投与でトラスツズマブの効果をみた試験です。この試験では、9週間の投与のみで有意差が得られるという、非常に興味深い結果が出ています。現在、投与期間をさらに短く設定した試験が行われており、より短い投与期間での作用が認められれば、すばらしいことではないかと思えます。

戸井 トラスツズマブの早期投与によって再発を低減することが実証できれば、再発予防の観点からも大きな意味がありますね。

Davidson おっしゃる通りです。適応からいえば、HER2陽性乳がん患者は乳がん患者全体のわずか20%にすぎませんが、トラスツズマブの早期投与により、転移性乳がん患者の再発を予防できるならば、治療費の削減にもつながりますし、多くの命を救うことにもなります。今後の研究に期待しています。

岩田 化学療法とトラスツズマブとの併用において特に注意すべき点は、心毒性だと思います。HERA trialでは重篤な心毒性はわずかでしたが、National Surgi-

cal Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP)が実施したパクリタキセルとの併用試験NSABP B-31では心毒性がより高率に認められました。これは複合的な作用によるものと思われます。特に高齢の患者に対しては、化学療法とトラスツズマブの同時併用よりも化学療法実施後のトラスツズマブ単独療法のほうが安全ではないかと思えます。

Davidson 同感です。実際、高齢者などのハイリスク患者に対しては、パクリタキセルとトラスツズマブとの併用療法を実施することも少なくありません。やはりここでも、FinHer studyにおいて短期間の投与で良好な結果が得られたことが注目されます。というのも、FinHer studyではすべての群で化学療法とトラスツズマブを併用しているからです。FinHer studyでフォローアップが行われるのかどうかはわかりませんが、経過を見守りたいところです。

岩田 Breast Cancer International Research Group (BCIRG)が行ったBCIRG006 studyは、ドセタキセル水和物をベースとしたトラスツズマブとの併用療法をみた試験です。この試験では、心毒性を増強するとされるアントラサイクリン系抗がん剤を含むレジメンを除外している点が注目されます。

Davidson はい、AC(アントラサイクリン系抗がん剤+シクロホスファミド)療法の代わりにそれが実施される場合があります。日常的に実施している医師もいますし、患者が希望することもあるようです。カルボプラチン+パクリタキセルの併用療法は一般的ではありませんが、トラスツズマブを投与予定である場合など、アントラサイクリン系抗がん剤の投与を避けたいときにカルボプラチン+パクリタキセルの併用療法を実施するという医師もいます。われわれは従来のCMF(シクロホスファミド+メトトレキサート+フルオロウラシル)療法のみを実施する場合があります。これは非常に効果的な療法ですし、アントラサイクリン系抗がん剤を使用しません。

岩田 私は転移性乳がんの1次治療としてトラスツズマブを投与する場合、化学療法との併用から開始します。その後、経過が良好であれば化学療法を除き、トラスツズマブ単剤療法としています。しかし、乳がん専門医のなかには、1次治療としてトラスツズマブ単剤療法を推奨するという意見もみられます。David-



岩田 広治 氏

Hiroji Iwata

愛知県がんセンター中央病院乳腺科部長

PROFILE

1987年名古屋市立大学医学部卒業。1991年名古屋市立大学医学部第2外科臨床研究医。1994年学位取得(医学博士)。学位論文は「ヒト乳癌組織におけるマトリックスメタロプロテイナーゼとそのインヒビターの解析」。1996年名古屋市立大学医学部第2外科助手。1998年愛知県がんセンター乳腺外科医長。2003年愛知県がんセンター乳腺外科部長。2004年名古屋市立大学医学部臨床助教授(兼任)。2005年愛知県がんセンター中央病院乳腺科部長(施設名称の変更)。



son 先生はどのようにお考えですか。

Davidson 米国の Charles Vogel 氏らによる数年前の試験では、あまり症状がなく内臓機能が正常な乳がん患者に対してトラスツズマブ単剤療法を行い、その結果約30%に寛解を認めています。私自身もこのような患者に対しては、しばしばトラスツズマブ単剤療法から治療を開始していますが、特に問題は生じていませんし、今後も積極的にトラスツズマブ単剤療法を1次治療として実施していくつもりです。もし成果が得られなければ、そのときに化学療法を追加すればよいのですから。しかし、この方法に異議を唱える人も少なくありません。はじめから最も効果の期待される方法で治療を行うべきであり、そのためには2つの療法を同時に実施する必要があるという意見です。もちろん、岩田先生がおっしゃるような方法も1つの選択肢だと思えます。

戸井 では逆に、トラスツズマブを単剤で使用しても効果がみられなかった場合、他の療法とどのように組み合わせていくべきだとお考えでしょうか。

岩田 われわれはトラスツズマブとタキサン系抗がん剤を併用した初期治療を行い、進行を認めた場合にはトラスツズマブ投与を中止してアントラサイクリン系抗がん剤ベースのレジメンを実施します。その後、再びトラスツズマブなどの薬剤を投与するようにしています。

Davidson 最初にアジュバント療法としてアントラサイクリン系抗がん剤を投与し、転移性がん治療のためにトラスツズマブの投与を開始し、それをひたす

ら続けるという方法もあるのではないかと思います。タキサン系抗がん剤や、酒石酸ビンORELビン、塩酸ゲムシタビンと併用したり、プラチナ製剤と併用することも可能かもしれません。私自身は大量のカペシタビンを投与したり、ときにはトラスツズマブとも併用しています。つまり、常に何らかの投与を続けていくということです。

戸井 長期にわたり投与を継続することについて、医療経済の観点からは必ずしもよい評価を得られないと思いますが、その点についてはどのようにお考えでしょうか。

Davidson 必要がないのに長期間投薬を続けることは、よいこととは思いません。医療経済の評価を鑑みるのであれば、適切な投薬時期を突き止める努力が必要でしょう。しかし、少なくとも私自身の臨床経験では、HER2陽性乳がん患者のなかにはトラスツズマブの投与を受け、長期生存する人がいます。現在も私のところには、治療後3~4年で転移性乳がんとなり、化学療法を継続している数名の患者がいます。10年前には、このような例はありませんでした。先生方も、同じような経験をおもちだと思います。こうした患者に関する生存率の経時的推移は、興味深い検討課題といえるでしょう。

戸井 トラスツズマブは、乳がんの予後を変えましたね。

Davidson そう思います。最終的には、米国の国家統計を駆使してそのことが証明されるであろうと期待しています。

Nancy E. Davidson 氏

Breast Cancer Research Professor of Oncology and
Director of the Breast Cancer Program at the
Johns Hopkins University School of Medicine

PROFILE

A graduate of the Harvard Medical School. She trained at the University of Pennsylvania, Johns Hopkins, and National Cancer Institute. An expert in biology and treatment of breast cancer, she has overseen the conduct of many clinical trials and has a special interest in endocrine therapy as well as the management of premenopausal breast cancer. She serves as President-Elect of the American Society of Clinical Oncology.



岩田 近い将来, lapatinib が臨床の現場で使用されるようになってからのアジュバント療法についてうかがいたいのですが, HER2陽性乳がん患者に対しては, トラスツズマブによる治療が世界的な標準になるのでしょうか。

Davidson そうなと思います。

岩田 では, トラスツズマブによるアジュバント療法の後で転移が発生した場合, 続けてトラスツズマブで治療を行うべきでしょうか, あるいは lapatinib への切り替えが推奨されるのでしょうか。

Davidson 難しい問題ですね。トラスツズマブ中止後すぐの再発ならば, 短期間のうちに再びトラスツズマブを投与することは疑問に思います。しかし私は, かなり後になってから再発した場合は, 再び生検を行い, 腫瘍組織を調べることに意味があるのではないかと仮説を立てています。もっとも現在のところ, 腫瘍の生物学的質に経時的変化があることは証明されていません。しかし実験的にせよ, 一連の生検を実施することは, 今後の治療法の方針を決定する助けになるかもしれません。

戸井 確かに, ひとくちに転移性乳がんといっても, さまざまなサブタイプが存在していると考えられます。今後は, それら1つ1つについてどう対応すべきか, 腫瘍組織レベルでの解明が求められるでしょう。

Davidson 米国で現在, 研究者が注目している分野の1つは, エストロゲン受容体陰性, プロゲステロン受容体陰性, HER2陰性という性質を併せもつ triple negative 乳がんです。このタイプの乳がんが乳がん

患者全体に占める割合は, 米国では10~15%で, 特にアフリカ系女性に多い傾向があります。

岩田 日本でも米国同様10~15%の患者が triple negative 乳がんに分類されます。

Davidson このタイプの乳がんは EGFR が高頻度に発現していることが指摘されており, EGFR を標的とする療法が有効ではないかと期待されます。われわれは現在, triple negative 乳がん患者を組み入れた, 転移性がんに対する cetuximab 療法の小規模試験を行っています。1つの群は cetuximab 単剤療法とし, 短期間の観察で疾患進行 (progression disease; PD) がみられた場合はカルボプラチンを加えます。もう1つの群では, 最初からカルボプラチンと cetuximab を併用します。この試験の検討により, triple negative 乳がんではプラチナ製剤ベースの療法で特に効果があり, EGFR 感受性にも富んでいることを証明しようとしています。

腫瘍組織の分析が新たな治療方針を生み出す

戸井 乳がんには HER2のみならず, 今お話にあった EGFR やトポイソメラーゼ II などの要因が深く関わっていることが明らかになっています。検体の分析による, 新たなバイオマーカーの開発も期待されますね。

Davidson BCIRG が行ったアジュバント療法に関する大規模な試験では, HER2の発現に関する検討を