

各論 化学療法

術前化学療法の適応と限界

Indications and limitations of primary systemic therapy
for operable breast cancer

山本尚人 鈴木正人 田辺直人

Key words : 術前化学療法, 手術可能原発性乳癌, primary systemic therapy, operable breast cancer

はじめに

手術可能な原発性乳癌に対する治療戦略は、21世紀に入り大きな転換期を迎えた。早期原発性乳癌に対しては、従来から根治手術後に術後補助化学療法が行われてきたが、化学療法を術前に施行しても、術後に施行しても、無病生存率および全生存率に有意差は認めないという結果が、National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-18 トライアル¹⁾および European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) 10902 トライアル²⁾から2001年に報告された。また、術前化学療法を行い病理学的完全奏効 (pathological complete response: pCR) が得られた症例は、それ以外の症例と比較して有意に無再発生存期間の延長が認められ、pCRは生存に代わる surrogate endpointとして用いられるようになり、術前化学療法の臨床的有用性が明らかとなった³⁾。このような背景から近年、術前化学療法の重要性を加味してその名称を従来の neoadjuvant/preoperative therapy から primary systemic therapy (PST) とするよう提唱されている。

本稿では、手術可能な原発性乳癌に対する PST をこれまでのエビデンスから考察し、その

適応と限界について言及する。

1. PSTの目的

a. 腫瘍縮小による乳房温存療法の適応拡大

PSTによって原発腫瘍を縮小させ、乳房温存することを目的とする。NSABP B-18 トライアル³⁾では、PST施行群では乳房温存率が67.8%であったのに対し、手術先行群では59.8%で有意に前者の方の温存率が高かった。ただし、乳房内再発率は前者が14.5%、後者が6.9%で、PST後の乳房内再発は約2倍であると報告された¹⁾。しかし、最近ではPST後でも乳房内再発率は高くないという報告もみられる。いずれにしても、PST後の乳房温存療法の適応はMDCTやMRIなどの画像診断を駆使して慎重に決定し、乳房内再発を防止するためには病理組織学的断端陰性を確保することが重要である。

b. 長期無再発生存可能な症例の選別

NSABP B-18¹⁾およびB-27⁵⁾ トライアルにおけるpCR症例は、それ以外の症例と比較して有意に無再発生存期間の延長が認められた。すなわち、原発巣がpCRであれば全身への微小転移も同時に根絶されたと考えられ良好な長期生存が期待できるため、pCRは生存に代わる surrogate endpointとして用いられるようになった。

Naohito Yamamoto, Masato Suzuki, Naoto Tanabe: Division of Breast Surgery, Chiba Cancer Center 千葉県がんセンター 乳腺外科

表1 術前化学療法における代表的無作為化臨床試験

トライアル/著者, 年	n	対象	レジメン	ORR (%)	pCR率 (%)	生存率 (%)
NSABP B-18/ Fisher ら ³⁾ , 1998 Wolmark ら ¹⁾ , 2001	1,523	T1-3N0-1M0	AC×4→S vs S→AC×4	79	13.0	69 (9.5年) [#] 70
EORTC 10902/ von der Hage ら ²⁾ , 2001	698	T1c-4bN0-1M0	FEC×4→S vs S→FEC×4	NA	4.0	82 (4.7年) [#] 84
NSABP B-27/ Bear ら, 2003 ⁴⁾ , 2006 ⁵⁾	2,411	T1c-3N0-1M0	AC×4→S vs AC×4→TXT×4→S vs AC×4→S→TXT×4	85.5 91.1 85.5	13.7 26.1 13.7	81 (6.5年) [#] 82
Aberdeen/ Smith ら ⁶⁾ , 2002 Hutcheon ら ⁷⁾ , 2003	162	T2-4N0-2M0 (T>3cm)	CVAP×4→NR→TXT×4 vs CVAP×4→R→TXT×4 vs CVAP×4→R→CVAP×4	47.0 85.0 64.0	1.8 30.8 15.4	NA (5.4年) [#] 97 78
MD Anderson/ Green ら ⁸⁾ , 2005	258	T1-3N0-1M0	TXLq _w ×12→FAC×4 vs TXLq _{3w} ×4→FAC×4	NA	28.8* 13.6*	NA NA
GEPARDUO/ von Minckwitz ら ⁹⁾ , 2005 Raab ら ¹⁰⁾ , 2004	913	T2-3N0-2M0 ≥2cm	AC×4→TXT×4 vs dose dense AT q2w	85 75	14.3* 7.0*	85 (5年) [#] 81

A: doxorubicin, C: cyclophosphamide, E: epirubicin, S: surgery, TXT: docetaxel, V: vincristine, P: prednisolone, NR: no response, R: response, TXL: paclitaxel, F: fluorouracil, NA: not available, *including nodal status, # (median follow up period)

NSABP トライアルおよびその他の代表的無作為化臨床試験を表1に示す。

2. PSTの適応

術後補助化学療法の適応となるすべての症例がPSTの適応になり得る。すなわち、2005年のザンクトガレンのコンセンサスミーティングにおけるリスク分類でintermediate risk以上に入る症例である。臨床的には35歳未満、明らかなリンパ節転移あり、病理学的には腫瘍径(浸潤径)2cm以上、組織学的異型度II以上、高度脈管侵襲およびHER2/neu(HER2)陽性であり、以上のうち1つでも該当するものは適応になり得る。

しかし、現状では臨床的な条件でその適応を決定するのが一般的であり、Stage IIAでも腫瘍径3cm以上の浸潤癌およびStage IIB以上は適応になる。

3. 至適レジメンと至適投与期間

大多数のトライアルで確認されたことは、

アンスラサイクリン(An)系抗癌剤にタキサン(Tx)系抗癌剤を上乗せした方が、pCRを得る割合が高くなることで、おおよそ20%以上のpCRが得られている。特にAn系抗癌剤の効果が認められている場合でも、同じ治療法を継続するよりもTx系抗癌剤に治療法を変更した方がより高い抗腫瘍効果が期待できることがAberdeen トライアル⁶⁾で確認され、非交差耐性薬剤を早期に導入することが重要であると考えられている。

至適投与期間に関しては、様々なトライアルで8-36週の間で計画され、トライアルによっては手術前後に化学療法を施行するように計画されているものもあるが、少なくとも4サイクルは術前に施行すべきである。

4. pCRの定義

a. 原発巣に対する効果判定

欧米では、癌細胞がすべて消失した場合か乳管内病巣のみが残存した場合、すなわち浸潤巣が消失していればpCRと定義していることが

多い。癌細胞が完全に消失した場合 [pCR(all)] と浸潤巣が消失し乳管内病巣のみが残存した場合 [pCR(inv)] の pCR 率は、同一トライアルの中でもかなりの差がある。NSABP B-27 トライアル⁴⁾では、AC (doxorubicin, cyclophosphamide) 4 サイクルのレジメンと AC 4 サイクルに docetaxel 4 サイクルを加えたレジメンの pCR(all) 率はそれぞれ 9.6%, 18.9% であるのに対し、pCR(inv) 率はそれぞれ 13.7%, 26.1% となり、約 1.5 倍 pCR 率が上昇した。トライアル間での pCR 率の比較や、その予後に関する評価も十分注意する必要がある。

b. 腋窩リンパ節 (Ax LN) に対する効果判定

NSABP のトライアルでは原発巣が pCR であれば Ax LN 転移が残存していても pCR と定義しているが、MD Anderson⁸⁾や GEPARDUO^{9,10)}のトライアルでは原発巣と Ax LN 転移がともに消失した場合を pCR と判定している。NSABP B-18 トライアル³⁾において Ax LN 転移を考慮しない場合の pCR 率は 13% で、考慮した場合は 11% であった。同様に NSABP B-27 トライアル⁴⁾では AC→docetaxel 群における Ax LN を考慮しない場合の pCR 率は 26% であるが、考慮した場合は 22% であった。GEPARDUO トライアル⁹⁾では、dose dense AT (doxorubicin, docetaxel) と AC→docetaxel の pCR 率を比較し、それぞれ 7% と 14% であったが、Ax LN を考慮しない場合それぞれ 12% と 22% で、Ax LN を pCR の条件に組み入れるか否かで pCR 率に大きな差が出ている。

また、今までのトライアルでは PST 前に Ax LN 転移の有無を確実に評価できていなかったため、Ax LN を pCR の判定に組み込むことにより PST 前から Ax LN 転移がなかった症例も pCR に判定された可能性がある。Hennessy ら¹¹⁾は、5つの前向き PST 臨床試験において術前穿刺吸引細胞診にて Ax LN 転移が確認された Stage II/III 原発性乳癌 403 症例について Ax LN に対する効果をみたところ、22% の症例に pCR が得られたと報告している。pCR 群と non-pCR 群の 5 年無再発生存率はそれぞれ 87%, 60% で、生存率はそれぞれ 93%, 72% であり、pCR

群で有意に予後良好であった。また、Ax LN の pCR 症例の予後は、原発巣の pCR 達成の有無に影響されなかった。すなわち、PST 後に Ax LN の pCR が達成できれば残存原発巣が認められても予後は良好であることから、原発巣と転移巣には生物学的な違いがあることが示唆された。

5. 腫瘍の生物学的特性による治療効果予測

a. ホルモンレセプター (HR) の有無

大部分のトライアルにおける HR 陰性乳癌に対する PST による pCR 率は、それぞれ陽性乳癌の約 2-4 倍と高く、16-42% であった。また、Nakamura ら¹²⁾は、202 例の手術可能原発性乳癌に対して FEC100 (fluorouracil 500 mg/m², epirubicin 100 mg/m², cyclophosphamide 500 mg/m²) 4 サイクルと docetaxel 75 mg/m² 4 サイクルの順次投与を行い、全体の pCR 率は 23% であったが、HR 陽性かつ HER2 陰性乳癌の pCR 率は 13% と低率であったのに対し、HR 陰性かつ HER2 陽性乳癌の pCR 率は 65% と高率であったと報告している。

b. HER2, topoisomerase II α および Ki-67 の発現

HER2 と topoisomerase II α (Topo II) 遺伝子は 17 番染色体の長腕 (q12-q21) 領域に近接して存在し、HER2 遺伝子の過剰発現した乳癌の 20-30% 程度に Topo II 遺伝子の過剰発現がある。An 系抗癌剤は Topo II を阻害することで抗腫瘍効果をもたらすので、Topo II 遺伝子の過剰発現は、An 系抗癌剤を含む化学療法に対する効果予測因子となると考えられている。PST においても同時増幅例に対しては An 系抗癌剤による pCR 率の向上が期待される。

一方 Petit ら¹³⁾は、免疫染色による Ki-67 の高発現 (20% 以上) は、高い細胞増殖能を反映し、An 系抗癌剤を含む PST の効果予測因子として重要であることを報告している。また、Bozzetti ら¹⁴⁾は、An 系抗癌剤の投与量の違い (低用量と高用量)、HER2 遺伝子の過剰発現の有無、HR の有無および免疫染色による Ki-67 の高発現の有無の因子間で PST の臨床効果について

表2 HER2 過剰発現を呈する原発性乳癌に対する trastuzumab 併用術前化学療法

著者, 年	n	対象	レジメン	cRR(%)	pCR(%)
Burstein ら ¹⁸⁾ , 2003	40	T1-3N0-1M0	12Hqw+4P(175)q3w	75	18
Coudert ら ¹⁹⁾ , 2006	33	T1-3N0-1M0	18Hqw+6D(100)q3w	96	41
Hurley ら ²⁰⁾ , 2006	48	Stage II, III, 炎症性	12Hqw +4[D(70)q3w+Cp(70)]q3w	100	23
佐野ら ²¹⁾ , 2006	21	T>3 cm or N+	12Hqw+4D(75)q3w	90	21
Buzdar ら ²²⁾ , 2005	42*	T1-3N0-1M0	4P(225)q3w→4FEC(75)q3w with or without Hqw	87 vs 47	65 vs 26

P: paclitaxel, D: docetaxel, H: trastuzumab, Cp: cisplatin, FEC: fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide, *randomized, (dose) mg/m²

多変量解析した結果, 免疫染色による Ki-67 の高発現の有無が独立した臨床効果予測因子であったと報告している。

c. Triple negative (TN) 腫瘍

エストロゲンおよびプロゲステロンレセプター (ER および PgR) 陰性, かつ HER2 過剰発現のない乳癌を TN 乳癌と呼称している。ER/PgR と HER2 により定義された腫瘍タイプ間での遺伝子発現プロファイルが異なることは幾つかの報告で明らかとなった。Sorlie ら¹⁵⁾ は, 乳癌のサブタイプを確認するように設計された固有の遺伝子リストを確認し, luminal (管腔), basal-like (基底膜様), HER2 サブタイプなど幾つかの確認可能なクラスターに分類した。更に, 固有の遺伝子リストによって確認された乳癌サブタイプは臨床上の特徴, 転帰および治療に対する反応が異なることが示された。なかでも TN 乳癌のおおよそ 80% は basal-like 腫瘍であり, 予後不良である。これらは内分泌療法や trastuzumab 療法などの乳癌標的治療の対象とならずに化学療法のみが治療手段として残る。PST において, MD Anderson の試験¹⁶⁾ では遺伝子プロファイリングが行われた原発性乳癌 83 例の pCR 率は, luminal 腫瘍より basal-like 腫瘍が有意に高かった。また, UNC 試験¹⁷⁾ では 105 例に対して免疫組織化学的にサブタイプ分類が行われ, luminal, basal-like, HER2 タイプは

それぞれ 52%, 27%, 21% であった。術前 AC 療法を行った結果, pCR 率はそれぞれ 13%, 30%, 27% であり, basal-like 腫瘍で一番高かったと報告している。化学療法に対する感受性を考えると basal-like 腫瘍の予後が不良なのは逆説的にみえるが, UNC 試験¹⁷⁾ における観察期間 2.5 年において basal-like 腫瘍は luminal 腫瘍と比較して無遠隔転移生存率が低く, 全生存率で有意に悪かった。これは, PST に奏効しなかった basal-like 腫瘍は他の化学療法にも反応を示さずに不良な予後をたどることを示唆している。

basal-like 腫瘍に代表される TN 腫瘍に対する PST は, 現在の標準的レジメンである An 系抗癌剤と Tx 系抗癌剤を用いることを基本として今後更に有効なレジメンの開発が必要である。

6. HER2 過剰発現を呈する原発性乳癌に対する trastuzumab 併用 PST

Tx 系抗癌剤と trastuzumab の併用療法で pCR 率が報告されている主な phase II トライアルを表 2 に示す。対象症例は Stage II 以上で, なかには Stage IIIb や炎症性乳癌を対象とした試験もあるためそれぞれの効果の比較は困難であるが, pCR 率は 18-41%¹⁸⁻²¹⁾ と比較的高かった。Tx 系抗癌剤は, 4 サイクル^{18,20,21)} または 6 サイクル¹⁹⁾ 投与され, 6 サイクル投与でより高い pCR

率が得られる傾向があった。本レジメンは、期待される治療法であるが症例数も 20-50 例程度と少数であり、今後予後を含めた多数例での検討が必要である。

Buzdar ら²²⁾は、術前に paclitaxel 225 mg/m² を 3 週ごと 4 サイクルのあと FEC75 (fluorouracil 500 mg/m², epirubicin 75 mg/m², cyclophosphamide 500 mg/m²) 3 週ごと 4 サイクル投与するレジメンと、そのレジメンに trastuzumab を毎週 24 回併用したレジメンの 2 群に無作為に分け、化学療法に対する trastuzumab の併用効果を検討した。最終登録数は 42 例で化学療法単独群の pCR 率は 26.3% であるのに対し、trastuzumab 併用群は 65.2% と有意に高率であった。安全性の面で心機能に関しては両群間で差はなかったが、血液学的毒性に関しては Grade 4 の好中球減少が有意に trastuzumab 併用群で多かった。An 系抗癌剤と trastuzumab の併用レジメンの効果は期待されるが、安全性に関してはいまだ確立されたとはいえない。

現在、paclitaxel 毎週投与 12 回に続く FEC 4 サイクル化学療法に最初から trastuzumab を 24 回併用する群と、FEC 4 サイクル後に paclitaxel と trastuzumab を毎週 12 回併用する群で、大規模なランダム化トライアル (NSABP B-41) が行われており、その結果が待たれる。

また、Nakamura ら¹²⁾が報告したような HR 陰性かつ HER2 陽性乳癌である化学療法に感受性の高い症例に対しては、まず An 系抗癌剤を 4 サイクル行い、その治療効果によって Tx 系抗癌剤に trastuzumab を併用するかどうかを考慮するという治療戦略も考えられる。

7. pCR 例に対する予後予測

NSABP B-27 トライアルにおける Bear ら⁹⁾の

報告では、pCR 症例についてそれぞれ Ax LN 転移個数別 (0 個, 1-3 個, 4-9 個, 10 個以上) に予後を検討した結果、原発巣が pCR でも Ax LN 転移が多いほど予後不良であった。また、非 pCR 症例においても同様の結果であった。すなわち、Ax LN 転移個数は原発巣の pCR とは独立した強力な予後因子であったと述べている。

また、MD Anderson Cancer Center における PST 後に Ax LN も含む pCR を得た原発性乳癌 226 例のレトロスペクティブな多変量解析の検討では、遠隔転移再発に影響を及ぼす独立した因子は Stage IIIB, IIIC および炎症性乳癌、閉経前、Ax LN 郭清個数 10 個以下の 3 つであった²³⁾。3 つの独立した予測因子に 1 つも当てはまらない群、1 因子の群、2 因子の群および 3 因子の群に分類すると、10 年無遠隔再発率はそれぞれ 97%, 88%, 77%, 31% で、各群間で有意差を認めた。原発巣および Ax LN で pCR を得た比較的予後良好な症例でも、閉経前の局所進行乳癌症例は遠隔再発に対する注意が必要であろう。

おわりに

手術可能原発性乳癌に対する PST について最近のエビデンスを中心に述べ、考察した。今までと同様に高い pCR 率を目指すレジメンの開発が進められる一方で、腫瘍の生物学的特性に合わせたテーラーメイド医療を実現するための探索が今後更に期待される。また、pCR の有無にかかわらず PST 後の予後予測因子を更に検討し、それに基づいた術後補助療法の適応と治療戦略を探求することが今後の重要な課題である。

文献

- 1) Wolmark N, et al: Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: Nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr* 30: 96-102, 2001.
- 2) von der Hage JA, et al: Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: Results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 10902. *J Clin Oncol* 19: 4224-4237, 2001.

- 3) Fisher B, et al: Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 16: 2672-2685, 1998.
- 4) Bear HD, et al: The effect on primary tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: Preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 21: 4165-4174, 2003.
- 5) Bear HD, et al: Sequential preoperative or postoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 24: 2019-2027, 2006.
- 6) Smith IC, et al: Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer significantly enhanced response to docetaxel. *J Clin Oncol* 20: 1456-1466, 2002.
- 7) Hutcheon AW, et al: Docetaxel primary chemotherapy in breast cancer: A five year update of the Aberdeen trial. San Antonio Breast Cancer Symposium (Abstr #11), 2003.
- 8) Green MC, et al: Weekly paclitaxel improves complete remission in operable breast cancer when compared with paclitaxel once every 3 weeks. *J Clin Oncol* 23: 5983-5992, 2005.
- 9) von Minckwitz G, et al: Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPARDUO study of German Breast Group. *J Clin Oncol* 23: 2676-2685, 2005.
- 10) Raab G, et al: Three weekly doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel (AC→T) versus 2 weekly doxorubicin and docetaxel (AT) as preoperative treatment in operable breast cancer: First analysis of the event-free survival of the GEPARDUO study. San Antonio Breast Cancer Symposium (Abstr #5047), 2004.
- 11) Hennessy BT, et al: Outcome after pathologic complete eradication of cytologically proven breast cancer axillary node metastases following primary chemotherapy. *J Clin Oncol* 23: 9304-9311, 2005.
- 12) Nakamura S, et al: The effect of pathological response of multicenter phase II trial of fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide (FEC100) followed by docetaxel (DOC75) in primary operable breast cancer. European Breast Cancer Conference (Abstr #370), 2006.
- 13) Petit T, et al: Comparative value of tumor grade, hormonal receptor, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer* 40: 205-211, 2004.
- 14) Bozzetti C, et al: Evaluation of HER-2/neu amplification and other biological markers as predictors of response to neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy in primary breast cancer. *Am J Clin Oncol* 29: 171-177, 2006.
- 15) Sorlie T, et al: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10869-10874, 2001.
- 16) Rouzier R, et al: Basal and luminal types of breast cancer defined by gene expression patterns respond differently to neoadjuvant chemotherapy. San Antonio Breast Cancer Symposium (Abstr #201), 2004.
- 17) Carey LA, et al: The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of the basal-like breast cancer (BBC) phenotype. San Antonio Breast Cancer Symposium (Abstr #1023), 2004.
- 18) Burstein HJ, et al: Preoperative therapy with trastuzumab and paclitaxel followed by sequential adjuvant doxorubicin/cyclophosphamide for HER2 overexpressing stage II or III breast cancer: A pilot study. *J Clin Oncol* 21: 46-53, 2003.
- 19) Coudert B, et al: Pre-operative systemic (neo-adjuvant) therapy with trastuzumab and docetaxel for HER-2 over expressing stage II or III breast cancer: results of a multicenter phase II trial. *Ann Oncol* 17: 409-414, 2006.
- 20) Hurley J, et al: Docetaxel, cisplatin, and trastuzumab as primary systemic therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 24(12): 1831-1838, 2006.
- 21) 佐野宗明ほか: HER2 過剰発現を呈する進行乳癌に対する Docetaxel と Trastuzumab 併用による術前化学療法の検討—JECBC-02 Trial—. *癌と化学療法* 33(10): 1411-1415, 2006.
- 22) Buzdar AU, 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* 23: 3676-3685, 2005.
- 23) Gonzales-Angulo AM, et al: Factors predictive of distant metastases in patients with breast cancer who have a pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 23: 7098-7104, 2005.

医師主導 治験業務 の 実際

はじめの一歩

通知・様式
CD-ROM付

国立がんセンター中央病院臨床検査部長
治験管理室長

藤原康弘

[編]

国立がんセンター中央病院初の医師主導治験での
経験を踏まえ、実務的な問題点の洗い出し、対応策の
検討、治験に関するQ&Aなどを記した書籍

内容構成

- 1章 医師主導治験の制度の概略
- 2章 日本医師会治験促進センターおよび大規模治験ネットワーク
- 3章 国立がんセンターにおける医師主導治験
- 4章 医師主導治験の実施の実際
- 5章 医師主導治験Q&A

通知・様式
CD-ROM付



4. 医師主導治験の実施の実際

1. 治験の実際

本治験は、厚生労働科学研究費補助金「治験推進研究事業」に基づく日本医師会による大規模治験ネットワークによる医師主導型治験の実施計画に関する研究〔がん〕に関する研究（課題番号 CCT 1501）による grant support を受け、大規模治験ネットワークに公募したうち9施設が参加する多施設共同試験である。

1) 再発あるいは治療抵抗性の c-kit あるいは PDGFR 陽性肉腫に対するイマチニブ第Ⅱ相試験について

わが国の成人および小児における骨・軟部組織発生の悪性腫瘍による死亡数は約2,035人（平成13年）であり、悪性新生物での死亡総数29万人の0.8%を占める（平成6年度；がんの統計，編集委員会編，財団法人がん研究振興財団，平成11年）。悪性腫瘍の中では症例数は少ないが，青年期に多い悪性腫瘍である。骨・軟部腫瘍のうち，切除不能の局所進行例や遠隔転移例は現時点で治癒が得られる例は少なく，また抗がん剤，放射線治療等の標準的治療後の再発あるいは治療抵抗例には有効な薬剤が存在しないのが現状である。

最近では，分子生物学の進歩に伴い，腫瘍細胞に発現し腫瘍の増殖に関わる特定の分子の働きを阻害する分子標的薬が臨床導入されている。c-kit および PDGFR (Platelet derived growth factor receptor) はチロシンキナーゼ活性を有する細胞表面型受容体をコードする遺伝子であり，分子標的薬のイマチニブはこれらの受容体のチロシンキナーゼ活性を抑制し，c-kit を発現する GIST (Gastrointestinal stromal tumor) への有効性が示されている (N Engl J Med 347 : 472, 2002)。GIST 以外の肉腫における c-kit あるいは PDGFR の発現頻度はおおよそ 20~30% と推定される (Am J Surg Pathol 26 : 486, 2002, Am J Clin Pathol 117 : 188, 2002, 118 : 470, 2002)。

今回，イマチニブがターゲットとしている c-kit，あるいは PDGFR 受容体を発現している肉腫 (GIST を除く) に対して有効な薬剤の探索を目的とした第Ⅱ相試験を計画した。本試験の主評価項目は腫瘍縮小率，副評価項目は無増悪生存期間，有害事象の頻度である。また，附随研究として青年期症例 (12 から 18 歳) におけるイマチニブの薬物動態の解析〔血中濃度測定を米国 Oittsburg 大学 Egorin 教授 (Medicine and Pharmacology) へ委託〕，および c-kit 関連の遺伝子発現状況と腫瘍縮小効果の相関の検討を行うこととした。

症例選択基準は，①組織学的に転移性あるいは切除不能の局所進行肉腫であることが確認されている，②組織免疫学的検査にて c-kit あるいは，PDGFR 陽性が確認されている，③対象組織型は，ユーイング肉腫/PNET，滑膜肉腫，神経芽細胞腫，線維性小円形細胞腫瘍，平滑筋肉腫，横紋筋

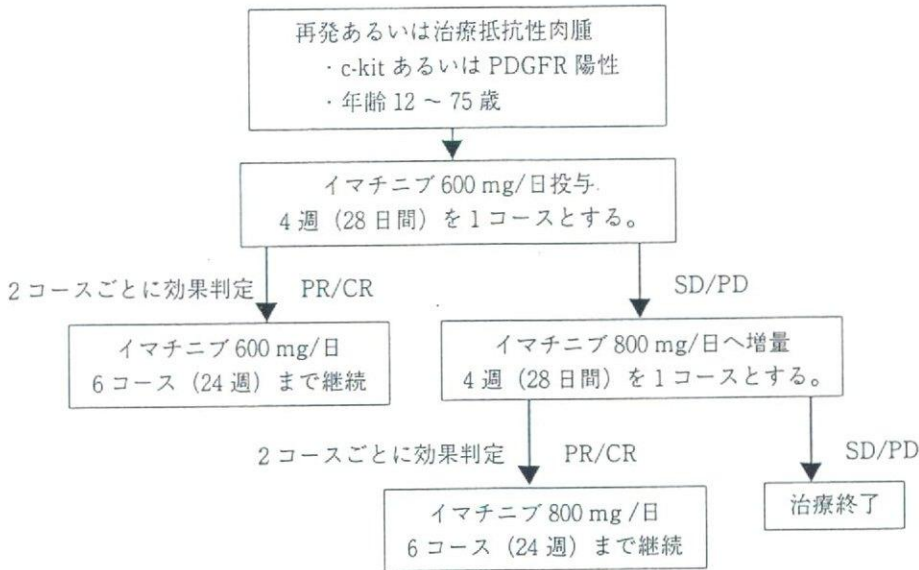


図1 再発あるいは治療抵抗性の c-kit あるいは PDGFR 陽性肉腫に対するイマチニブの第Ⅱ相試験 シェーマ

肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、血管肉腫、悪性線維組織球腫、悪性末梢神経鞘性腫瘍、骨肉腫、胞巣状軟部肉腫、類上皮肉腫および明細胞肉腫、④免疫染色の検討が可能な病理組織ブロックが得られる症例、⑤各組織型に応じた標準的化学療法に治療抵抗性、あるいは治療後の再発例、⑥計測可能病変を有する症例、⑦ Performance status 0~2、⑧年齢は12以上75未満、である。治療レジメンは、イマチニブ 600 mg/日、1日1回内服を28日間継続し、6カ月間まで継続する。600 mg/日を内服中に腫瘍増悪を認めた場合、800 mg/日、1日2回へ増量することとした(図1)。

評価基準は、腫瘍縮小効果は RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, J Natl Cancer Inst 91:523, 1999) で評価し、さらに有害事象は NCI-CTC version 2.0 日本語版 (National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, 癌と化療 28:1993, 2001) にて評価を行うこととした。

遠隔転移を来した肉腫に対する既存の抗がん剤単剤の奏効率は10~30%であることより、本試験では、イマチニブの期待奏効率を30%、閾値奏効率を10%と設定した。期待および閾値奏効率より算出される必要症例数は35例であり、若干の不適合例を見込み、目標症例数を40例と設定した。また、本試験の対象となる症例は少ないため、多施設共同試験で行うこととし、実行可能性より、症例集積期間を2年、追跡期間を1年、総試験期間3年と設定した。

2) 治験の実施体制について

本治験の実施体制は以下に示すとおりである。

- ① 治験調整業務 (国立がんセンター中央病院): 治験実施計画書の作成, 各種標準手順書の作成, 有害事象報告の受領, およびその対応の判断, 治験薬管理, 病理検体の受領, 業務の外部委託 (データマネージメント, モニタリング, 監査, および治験総括報告書作成) に関する契約, 治験薬提供に関する契約, 治験実施施設との連絡, および契約業務など。
- ② 治験実施施設 9 施設 (新潟大学医歯学総合病院, 慶應義塾大学病院, 日本大学医学部附属病院板橋病院, 千葉県がんセンター, 神奈川県立がんセンター, 愛知県がんセンター, 岡山大学

医学部・歯学部附属病院, 国立病院機構 九州がんセンター, および国立がんセンター中央病院)

- ③ 治験薬提供者 (ノバルティス株式会社, 安全性情報の提供も行う)
- ④ データマネジメント業務 (社団法人北里研究所 臨床薬理研究所) : 試験への登録, 安全性情報の各施設への重篤な有害事象の規制当局への報告業務, 試験に関するデータ管理, CRF (Case Report form) 作成, 説明・同意文書作成, モニタリング業務の補助および有害事象/治験届の規制当局への提出の業務
- ⑤ モニタリング業務 : CRO (Contract Research Organization) へ外部委託
- ⑥ 監査業務 : 公立機関へ外部委託
- ⑦ 治験総括報告書の作成業務 : CRO へ外部委託
- ⑧ 病理中央診断パネル (国立がんセンター中央病院外の病理医 3 名) : 病理組織, c-kit, および PDGFR の染色状況の中央診断
- ⑨ 効果・安全性評価委員会 (国立がんセンター中央病院内の医師 1 名, および外部の医師 2 名) : 重篤な有害事象に関する審査, 治験の継続, 変更, および中止に関する助言
- ⑩ 効果判定委員会 (国立がんセンター中央病院内の医師 1 名, および外部の医師 1 名) : 腫瘍縮小効果に関する画像評価
- ⑪ 日本医師会 治験促進センター : 研究費の配分, 業務の外部委託に関する公募など

3) 安全性情報の取り扱い

当該治験に関する重篤な有害事象, 海外からの重篤な有害事象症例報告 (CIOMS (Council for

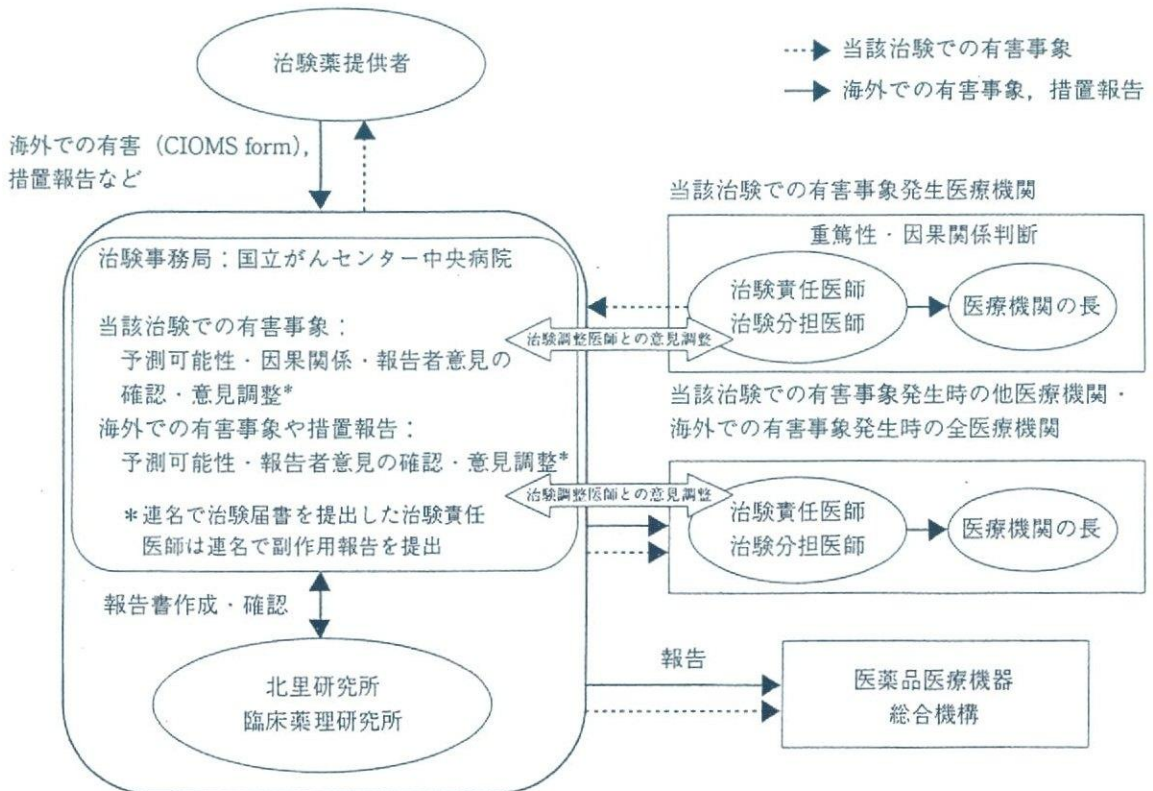


図2 有害事象報告の流れ

International Organizations of Medical Sciences) formにて入手), 国内外での研究報告および措置の情報について, 安全性情報の伝達を示す(図2)。社団法人北里研究所 臨床薬理研究所は治験調整医師の代行として重篤な有害事象について各治験責任医師への報告書の配信, 意見の収集および, 治験薬提供者, モニターへの情報提供を行う。また, 規制当局への報告書の作成支援および提出の代行を行っている。

(1) 当該治験において発生した重篤な有害事象

治験責任医師は, 自らが所属する医療機関内で重篤な有害事象が発生した場合, 因果関係の有無に関わらず, 発生を知ってから24時間以内に口頭または文書にて所属医療機関の長および治験調整医師に連絡する。国立がんセンター中央病院は情報入手後, 直ちに治験薬提供者へ報告を行う。治験責任医師は早急に「有害事象報告書」(初回報告)を作成し, 治験調整医師へ報告する。

治験調整医師は, 治験責任医師から報告された内容に対し医学的判断, 薬事法施行規則第66条の7に規定された, 規制当局への報告の必要性を検討し「意見書」にコメントを記載する。規制当局への報告の必要性の判断に際しては, 当該事象の重篤性, 治験薬概要書などから推定される予測性の有無(既知, あるいは未知), 治験薬との因果関係の有無を検討する。規制当局への報告が必要と判断した場合にはさらに, 医学的考察を加える。治験調整医師は「有害事象報告書」と「意見書」を, 全治験責任医師に情報を提供する。

治験責任医師は, 治験調整医師の意見に対し「意見書」の治験責任医師コメントに同意・不同意を表記し, 確認日記入および記名・捺印または署名を行う。治験調整医師に不同意の場合は必ず情報入手後2日以内に医学的判断および医学的考察を記入し, 治験調整医師に報告しなければならない。

重篤な有害事象の報告者あるいは他の治験責任医師が薬事法施行規則第66条の7に該当する厚生労働省への報告対象と判断した場合, 治験調整医師は各治験責任医師による意見をまとめ, 規制当局の定める「治験薬副作用・感染症症例報告書」, および「治験薬副作用・感染症症例票」を作成する。薬事法施行規則第66条の7に規定された7日報告, あるいは15日報告に従い, 当該事象が発生した医療機関の治験責任医師が情報を入手した日から, それぞれ, 7日, あるいは15日以内に規制当局に提出する。報告した内容および報告日は治験調整医師から全治験責任医師に連絡される。

さらに当該事象が発生した医療機関の治験責任医師は, 重篤な有害事象の詳細を得たときには「有害事象報告書」(追加報告)において治験調整医師に報告し, 治験調整医師は初回報告と同様の手順に準じ, 全治験責任医師に報告, 意見収集後, 必要時に「治験薬副作用・感染症症例報告書」「治験薬副作用・感染症症例票」(追加報告)を完成し, 規制当局に提出する。また, 国立がんセンター中央病院は情報入手後, 直ちに治験薬提供者に報告する。

各治験責任医師は, 報告されたすべての安全性情報に対し各施設の手順に則り, 医療機関の長へ提出する。

(2) 海外の重篤な有害事象

治験薬提供者は, CIOMS formにて海外の重篤な有害事象を入手した場合, 入手当日に治験調整医師へ情報の提供を行う。

治験調整医師は医学的判断, 規制当局への報告の必要性を検討し「意見書」へコメントを記載する。規制当局への報告が必要と判断した場合にはさらに, 医学的考察を加える。治験調整医師は,

CIOMS form と「意見書」を全治験責任医師に情報提供する。

治験責任医師は、治験調整医師の意見に対して「意見書」の治験責任医師コメントに同意・不同意を表記し、確認日の記入および記名・捺印または署名を行う。治験調整医師に不同意の場合は必ず2日以内に医学的判断および医学的考察を治験調整医師に報告しなくてはならない。

薬事法施行規則第66条の7が規定する7日/15日報告が必要と判断に至った場合、治験調整医師は各治験責任医師による意見をまとめ、「治験薬副作用・感染症症例報告書」(様式7)「治験薬副作用・感染症症例票」を作成し、治験責任医師が情報を入手した日から7日/15日以内に規制当局に提出する。報告した内容および報告日は治験調整医師から全治験責任医師に連絡される。

さらに治験薬提供者は、詳細な情報の記載されたCIOMS formを入手した場合には治験調整医師に追加報告し、治験調整医師は初回報告と同様の手順に準じ、全治験責任医師に報告、意見収集後、必要時に「治験薬副作用・感染症症例報告書」「治験薬副作用・感染症症例票」(追加報告)を完成し、規制当局に提出する。

各治験責任医師は報告されたすべての安全性情報に対し各施設の手順に則り、医療機関の長へ提出する。

(3) 国内外の研究報告および措置報告

治験薬提供者は学術雑誌等に掲載された研究報告または安全性に係る問題により、治験薬提供者が実施している治験の中止、中断が発生した場合および治験の再開等に関する情報を入手した場合や製造・輸入中止など措置報告の情報を得た場合、入手当日に治験調整医師に報告する。治験調整医師は、(2)海外の重篤な有害事象と同様の手順に従って、安全性情報の伝達・処理を行う。

4) 治験の進捗状況

本治験の進捗状況は平成16年5月19日、治験調整業務を担う国立がんセンター中央病院受託研究審査委員会へ本治験の審査を提出し、平成16年6月28日、委員会の承認を取得した。その後、本治験の参加施設における倫理審査委員会への承認申請手続きが行われ、平行して各種手順書の作成や業務の外部委託内容や委託先の選定が行われた。平成16年11月2日、厚生労働省へ治験届(7施設分)を提出し、国立がんセンター中央病院が治験薬提供者より海外での有害事象報告(CIOMS form)の受領を開始した。その後、平成16年12月14日、治験変更届の提出(2施設分追加)が行われた。平成17年1月18日、国立がんセンター中央病院への治験薬の搬入が行われ、3月9日、国立がんセンター中央病院より他施設へ治験薬の搬入が完了し、3月14日、第1例目の登録が行われた。平成17年4月14日現在で、6例の登録が行われた。有害事象報告について、平成16年11月2日より平成17年3月31日までに、治験薬提供者より受領したCIOMS formは、それぞれ(15日/7日報告)、平成16年11月159件(42/3)、12月190件(17/1)、平成17年1月218件(13/0)、2月187件(11/0)、および3月281件(11/0)であり、平成17年3月14日より4月14日までに当該治験で1件の重篤な有害事象を規制当局へ報告(15日報告)した。

5) 考 察

医師主導型治験を多施設共同試験の形式で実施するに当たり、各施設における医師主導型治験の実施体制の整備など治験調整業務、および治験薬提供者との薬剤提供に関わる契約の締結等に時間

を必要とし、治験届を規制当局へ提出してから症例登録まで4カ月が経過した。今後、医師主導型治験が普及するためには、各施設における治験実施体制の整備、および医師主導治験の開始に際して必要な業務の簡略化を図る必要があると思われる。

また、治験届提出と同時に、当該治験以外で発生した重篤な有害事象（海外）の情報を治験薬提供者より受領し、規制当局への報告の必要性を判断し、規制当局へ報告を行った。治験薬提供者からの有害事象の報告件数は1日当たり約20件であり、当該事象の規制当局への報告の必要性の判断、治験実施施設への伝達、および規制当局への報告など、膨大な業務量となった。当該事象について同様の報告を治験薬提供者が規制当局へ行っている。医師主導治験を行う医師へ当該治験以外で発生した重篤な有害事象について規制当局への報告義務を課することは、治験薬提供者が同様の報告を行っており、二度手間であること、および医師主導治験における少ない人的資源を圧迫すること、より今後の医師主導治験の普及のために、規制当局への有害事象報告の簡略化等について早急に見直しを図るべきと考えられる。

2. 医師主導治験におけるセントラル業務とローカル業務

医師主導治験は、自ら治験を実施しようとする者、自ら治験を実施する者（以下、責任医師と略す）が治験を計画・実施・管理することである。ここでは、「再発あるいは治療抵抗性のC-kitあるいはPDGFR陽性肉腫に対するイマチニブ第Ⅱ相試験」での、治験の計画・管理を「セントラル業務」、治験の実施を「ローカル業務」とし、(1) 治験開始前、(2) 治験実施中、(3) 治験終了後に分け、業務の一部を記載した。

表1に本治験の計画立案より治験終了までの経緯と業務を大まかに記した。

表1 再発あるいは抵抗性のc-kitあるいはPDGFR陽性肉腫に対するイマチニブの第Ⅱ相試験の経緯

平成14年	7月31日	改正GCP公布	
平成15年	7月30日	改正GCP施行	
平成16年	10月		治験薬提供者への依頼・合意
	7月		大規模ネットワーク事業に採択、参加施設の選定
			治験薬提供者との合同meeting
	8月		国立がんセンター中央病院IRB承認
			Start-up meeting
			業務委託先の選定
	9~11月		実施施設でのIRB承認
	10月		第1回kick-off meeting
	11月		治験計画届提出 7施設
	12月		第2回kick-off meeting
平成17年	12月		治験計画届提出 2施設
	1月		治験薬搬入
	3月		登録開始
	3月31日	特定療養費に関する通知改正	
	4月		治験実施計画書・登録票・IC文書改訂
	6月		第2回治験計画変更届提出（以降終了まで8回提出）
	7月		第1回中間meeting開催



Topoisomerase IIalpha-positive and BRCA1-negative phenotype: Association with favorable response to epirubicin-based regimens for human breast cancers

Yasuo Miyoshi^a, Masafumi Kurosumi^b, Junichi Kurebayashi^c, Nariaki Matsuura^d, Masato Takahashi^e, Eriko Tokunaga^f, Chiyomi Egawa^g, Norikazu Masuda^h, Seung Jin Kim^a, Masatsugu Okishiro^a, Tetsu Yanagisawa^a, Satsuki Ueda^a, Tetsuya Taguchi^a, Yasuhiro Tamaki^a, Shinzaburo Noguchi^{a,*}, From the Collaborative Study Group of Scientific Research of the Japanese Breast Cancer Society

^a Department of Breast and Endocrine Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Department of Pathology, Saitama Cancer Center, Saitama, Japan

^c Department of Breast and Thyroid Surgery, Kawasaki Medical School, Matsushima, Kurashiki, Okayama, Japan

^d Department of Pathology, School of Allied Health Science, Faculty of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

^e First Department of Surgery, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan

^f Department of Surgery and Science, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan

^g Department of Surgery, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Osaka, Japan

^h Department of Surgery, Osaka National Hospital, Osaka, Japan

Received 20 October 2007; received in revised form 4 January 2008; accepted 8 January 2008

Abstract

Epirubicin exerts its anti-tumor effect through binding to topoisomerase IIalpha (TOP2A) and inducing DNA double-strand breaks. BRCA1 is involved in the repair of these breaks. We investigated the relationship between TOP2A or BRCA1 immunohistochemical expression and pathological response in 108 primary breast cancers treated with epirubicin-based regimens. The pCR (pathological complete response) rate for TOP2A-positive (17%) was significantly ($P < 0.005$) higher than for TOP2A-negative (2%), while the pCR rate for BRCA1-negative (11%) was non-significantly higher than for BRCA1-positive (5%). The pCR rate of TOP2A-positive and BRCA1-negative (30%) was significantly higher than for TOP2A-negative and BRCA1-positive (3%; $P < 0.05$), or TOP2A-negative and BRCA1-negative (0%; $P < 0.005$). The TOP2A-positive and BRCA1-negative phenotype associates with a favorable response to epirubicin-based regimens.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: BRCA1; Breast cancer; Epirubicin; Pathological response; Topoisomerase IIalpha

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6879 3772; fax: +81 6 6879 3779.

E-mail address: noguchi@onsurg.med.osaka-u.ac.jp (S. Noguchi).

1. Introduction

Epirubicin, which belongs to the anthracycline family, is one of the most aggressive drugs against breast cancer and epirubicin-based regimens such as 5-FU plus epirubicin pulse cyclophosphamide (FEC) and epirubicin plus cyclophosphamide (EC) are widely used in adjuvant and neoadjuvant as well as in metastatic settings. These epirubicin-based regimens, however, although very active, are not necessarily effective for all patients. In fact, response rates of metastatic breast cancers to epirubicin-based regimens reportedly range from 50% to 60% [1,2]. On the other hand, adverse events such as leucopenia and alopecia are observed in virtually all patients treated with these regimens although their severity differs from patient to patient. In addition, a small but significant proportion of patients develop serious adverse events such as cardiac failure and myeloproliferative diseases. In order to increase the efficiency of chemotherapy and avoid unnecessary adverse events, it is therefore very important to administer chemotherapy to those patients who are likely to respond and not to those who are unlikely to respond. For purpose, reliable predictive factors for response to chemotherapy need to be developed. Until now, various biological parameters, including HER-2 [3], p-glycoprotein [4], p53 [5], estrogen receptor (ER) [6], S-phase fraction [7], Ki-67 [7], have been proposed as candidate predictive factors for response to epirubicin-based and doxorubicin-based regimens (doxorubicin is another anthracycline) but their clinical value remains controversial so that they have not yet been integrated in daily practice.

Among the predictive factors so far studied, *HER-2* gene amplification and *HER-2* overexpression have been attracting a great deal of attention, and a significant association between *HER-2* gene amplification or *HER-2* overexpression and a favorable response to epirubicin-based regimens has been reported [3,8,9]. However, recent studies have shown that such an association between response and *HER-2* is indirect and that the direct association occurs between response and the expression of topoisomerase II α (TOP2A), which is a target molecule of epirubicin [10,11]. The *TOP2A* gene is localized close to the *HER-2* gene and is often coamplified with the *HER-2* gene [12]. TOP2A plays a pivotal role in DNA replication and catalyzes the transport of one DNA double helix through another by the transient introduction of DNA double-strand

breaks [13]. Anthracyclines including epirubicin and doxorubicin bind to TOP2A and stabilize the DNA double-strand breaks, resulting in cell cycle arrest and apoptosis [13,14]. In fact, an in vitro study has shown that breast cancer cells with TOP2A overexpression are more sensitive to doxorubicin [12]. It has also been reported that TOP2A expression is observed in 20–62% [11,15–19] and TOP2A gene amplification in 12–24% of human breast cancers [11,16,18,20,21]. Several lines of evidence have suggested that anti-tumor activity of the epirubicin-based regimens is associated with TOP2A expression or *TOP2A* gene amplification, although the contradictory results have also been reported [21–24].

In addition to TOP2A, BRCA1 has recently been gaining attention as a predictive factor for response to epirubicin-based regimens. BRCA1 plays an important role in double-strand DNA repair [25], and because epirubicin induces DNA double-strand breaks, it is possible that BRCA1 may modulate the response to epirubicin. In this connection, it has been reported that a mouse cell line deficient in BRCA1 displayed an increased sensitivity to the agents, including doxorubicin, which cause double-strand DNA breaks, and that induction of wild-type BRCA1 resulted in a reduced level of apoptotic cell death after treatment with DNA-damaging agents [26]. It has also been found that overexpression of BRCA1 in murine ovarian cancer cells increased the resistance to doxorubicin [27]. Furthermore, Delaloge et al. reported that 53% of locally advanced breast cancers carrying a BRCA1 mutation showed complete response to the anthracycline-based regimens while only 14% of sporadic breast cancers did, indicating that breast cancers lacking a BRCA1 function due to its mutation are more sensitive to anthracycline-based regimens [28]. Although BRCA1 mutation is rare, a significant proportion of sporadic breast cancers lack BRCA1 expression due to hypermethylation of the promoter region of the *BRCA1* gene [29], overexpression of HMGAI [30], or overexpression of ID4 [31]. Thus, it is possible that BRCA1 expression may influence the sensitivity of sporadic breast cancers to epirubicin-based regimens. However, this possibility has hardly been investigated.

As mentioned earlier, it has been speculated that TOP2A and BRCA1 may be associated with sensitivity to epirubicin-based regimens, and thus are potentially useful as predictive factors for these regimens. Nevertheless, the association between

BRCA1 and response to epirubicin-based regimens in sporadic breast cancers has yet to be reported. This prompted us to immunohistochemically investigate TOP2A and BRCA1 expression simultaneously in breast cancer tissues obtained before the administration of epirubicin-based regimens (preoperative setting), and to study the relationship between the expression of these two markers and pathological response.

2. Materials and methods

2.1. Patients and tumor samples

For this study, 108 primary breast cancer patients at stage II ($n = 73$), III ($n = 22$), and IV ($n = 13$) were consecutively recruited. They were treated with epirubicin-based regimens in the preoperative setting during the period between September 1999 and April 2004 at Osaka University Hospital, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, and Kyushu University Hospital. Treatment with EC was used for 97 and with FEC for 11 patients and all of them were subsequently treated with breast conserving surgery or mastectomy. The epirubicin-based regimens were administered every 3 weeks for 3–6 cycles (3 cycles for 47 patients, 4 cycles for 45 patients, 5 cycles for one patient, and 6 cycles for seven patients). The remaining eight patients were treated with only 2 cycles of EC ($n = 5$) or FEC ($n = 3$) because of disease progression, and were switched to other chemotherapy (paclitaxel or docetaxel) before surgery. The dose of epirubicin for both the EC and FEC regimens was 60 mg/m^2 epirubicin for 107 patients and 100 mg/m^2 for one patient. Tumor tissue samples were obtained from primary tumors by means of vacuum-assisted core needle biopsy prior to preoperative chemotherapy. The samples were subjected to pathological diagnosis for determination of ER, PR, and HER-2 status as well as immunohistochemical study of TOP2A and BRCA1. This study was approved by the IRB of Osaka University Graduate School of Medicine.

2.2. Assessment of tumor grade and pathological response

Nuclear grade, mitotic score, and tubular formation were determined according to the criteria specified by Elston and Ellis [32]. Since the association between pathological response and patient prognosis is much stronger than that between clinical response and patient prognosis [33–35], we adopted pathological response, but not clinical response, to evaluate the effect of epirubicin-based regimens in the present study. Pathological response of breast tumors was evaluated in 100 patients who were treated with three or more cycles of the epirubicin-based regimens

alone. Multiple slides prepared from primary breast tumors after preoperative chemotherapy were examined and chemotherapeutic effect was determined as for the breast tumors according to the criteria specified in the General Rules for Clinical and Pathological Recording of Breast Cancer 2005 [36]. These criteria define Grade 0 as no response (almost no change in cancer cells), Grade 1 as slight response (1a: mild changes in cancer cells regardless of the area; 1b: marked changes in one-third or more but less than two-thirds of tumor cells), Grade 2 as marked response (marked changes in two-thirds or more of tumor cells), and Grade 3 as complete response (necrosis or disappearance of all tumor cells). The eight patients who showed a progressive disease after 2 cycles of the epirubicin-based regimens and were switched to other types of chemotherapy were classified as pathological non-responders.

2.3. Immunohistochemistry of HER-2, TOP2A, and BRCA1 expression

The expression of HER-2, TOP2A, and BRCA1 was evaluated immunohistochemically by using the tumor specimens obtained as described under patients and tumor samples. Sections prepared from the formalin-fixed paraffin-embedded tumor specimens were deparaffinised and rehydrated in graded alcohol. Antigens were retrieved by incubating the sections in 10 mmol/l citrate buffer (pH 6.0) at 95°C for 50 min for TOP2A or by boiling for 15 min in a microwave oven for BRCA1. After quenching endogenous peroxidase with 3% H_2O_2 in methanol for 20 min, the resultant slides were treated with Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharmaceutical, Osaka, Japan) for 30 min at room temperature. The samples were then incubated overnight at 4°C with a polyclonal rabbit anti-c-erbB2 antibody (1:100 dilution; Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) for HER-2, with a mouse monoclonal anti-TOPOII α antibody (1:70 dilution; KiSi1, DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA) for TOP2A, or with a mouse monoclonal anti-BRCA1 antibody (1:70 dilution; Ab-1, Oncogene Science, Cambridge, MA) for BRCA1. They were subsequently incubated at room temperature for 30 min with the ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) using biotinylated anti-rabbit immunoglobulin G antibody for HER-2 or biotinylated anti-mouse immunoglobulin G (IgG) antibody for BRCA1. For TOP2A, incubation was performed with EnVision+ System Peroxidase (DakoCytomation) according to the manufacturer's instructions. Finally, the antibody complex was visualized with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Merck, Darmstadt, Germany) and the sections were counter-stained with hematoxylin.

Positive reactions for HER-2 were scored as four grades, as previously reported [37], according to the intensity and pattern of the staining. The four grades were: 0

(no or less than 10% membrane staining in tumor cells); 1+ (faint membrane staining in more than 10% of tumor cells, partial staining of the membrane); 2+ (weak-to-moderate but complete membrane staining in more than 10% of tumor cells); 3+ (strong and complete membrane staining in more than 10% of tumor cells) Grade 2+ and 3+ tumors were considered to be HER-2 positive. The most actively stained lesions were selected microscopically and nuclear staining was counted in 1000 cancer cells without knowledge of patients outcome, and 5% and 10% were used as the respective cut-off values for TOP2A and BRCA1 according to the method described previously [17,38].

2.4. ER and PR assay

ER and progesterone receptor (PR) protein levels in the tumor specimens obtained before preoperative chemotherapy were determined in 83 cases with immunohistochemistry (cut-off value was 10% for both ER and PR) or in 21 cases with an enzyme immunoassay using kit from Abbott Research Laboratories (Chicago, IL) according to the manufacturer's instructions (cut-off values for ER and PR were 13 and 10 fmol/mg, respectively).

2.5. Statistical methods

The relationship between clinicopathological or biological parameters and pathological response was evaluated with the Fisher's exact test. Multivariate analysis of the relationship of TOP2A and BRCA1 expression with pCR was determined using a logistic regression method to obtain the odds ratio and 95% confidence interval, being adjusted for menopausal status, tumor size, lymph node metastasis, distant metastasis, nuclear grade, ER, PR, and HER-2 status. Statistical significance was assumed for $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Relationship between clinicopathological or biological parameters and pathological response to epirubicin-based regimens

Pathological response was divided into two categories, i.e., pathological complete response (pCR, Grade 3) and non-pCR (Grades 0, 1a, 1b, and 2) for evaluation of its relationship with clinicopathological parameters (Table 1). The pCR rate (13%) of small tumors (≤ 5 cm) was significantly ($P < 0.05$) higher than that (0%) of large tumors (> 5 cm). No statistically significant association was observed between pCR rate and menopausal status, lymph node status, distant disease status, nuclear grade, mitotic score, or tubular formation.

Table 1
Relationship between clinicopathological factors and pathological response to epirubicin-based regimens

Pathological response ^a	Non-pCR	pCR	P-value
Menopausal status			
Pre-	62 (94) ^b	4 (6)	0.30
Post-	37 (88)	5 (12)	
Tumor size			
≤ 5 cm	58 (87)	9 (13)	<0.05
> 5 cm	41 (100)	0 (0)	
Lymph node metastasis			
Negative	31 (91)	3 (9)	0.99
Positive	68 (92)	6 (8)	
Distant metastases			
Negative	86 (91)	9 (9)	0.59
Positive	13 (100)	0 (0)	
Nuclear grade			
I + II	45 (94)	3 (6)	0.71
III	45 (90)	5 (10)	
Unknown	9 (90)	1 (10)	
Mitotic score			
I + II	56 (95)	3 (5)	0.25
III	34 (87)	5 (13)	
Unknown	9 (90)	1 (10)	
Tubular formation			
I + II	19 (90)	2 (10)	0.67
III	71 (92)	6 (8)	
Unknown	9 (90)	1 (10)	

^a Pathological response was classified as described in Section 2.

^b % of patients.

The pathological response was further studied in terms of its relationship with biological parameters including ER, PR, and HER-2, but no significant association with any of these parameters was detected (Table 2).

Table 2
Relationship between biological parameters and pathological response to epirubicin-based regimens

Pathological response ^a	Non-pCR	pCR	P-value
Estrogen receptor			
Positive	28 (90) ^b	3 (10)	0.99
Negative	67 (92)	6 (8)	
Unknown	4 (100)	0 (0)	
Progesterone receptor			
Positive	28 (90)	3 (10)	0.99
Negative	51 (89)	6 (11)	
Unknown	20 (100)	0 (0)	
HER-2 status			
Positive	24 (89)	3 (11)	0.43
Negative	70 (93)	5 (7)	
Unknown	5 (83)	1 (17)	

^a Pathological response was classified as described in Section 2.

^b % of patients.

3.2. *TOP2A* and *BRCA1* expression and their relationship with clinicopathological and biological parameters or pathological response

Expression of *TOP2A* and *BRCA1* was examined immunohistochemically in 108 tumor samples obtained before preoperative chemotherapy. Representative immu-

nohistochemical results are shown in Fig. 1. Tumors with a high mitotic score (III) were significantly more likely to show a higher *TOP2A* positivity than tumors with a low mitotic score (I + II) (67% vs. 29%, $P < 0.001$). Tumors with positive *HER-2* were significantly more likely to show a higher *TOP2A* positivity than those with negative *HER-2* (59% vs. 35%, $P < 0.05$) (Table 3). Tumors with

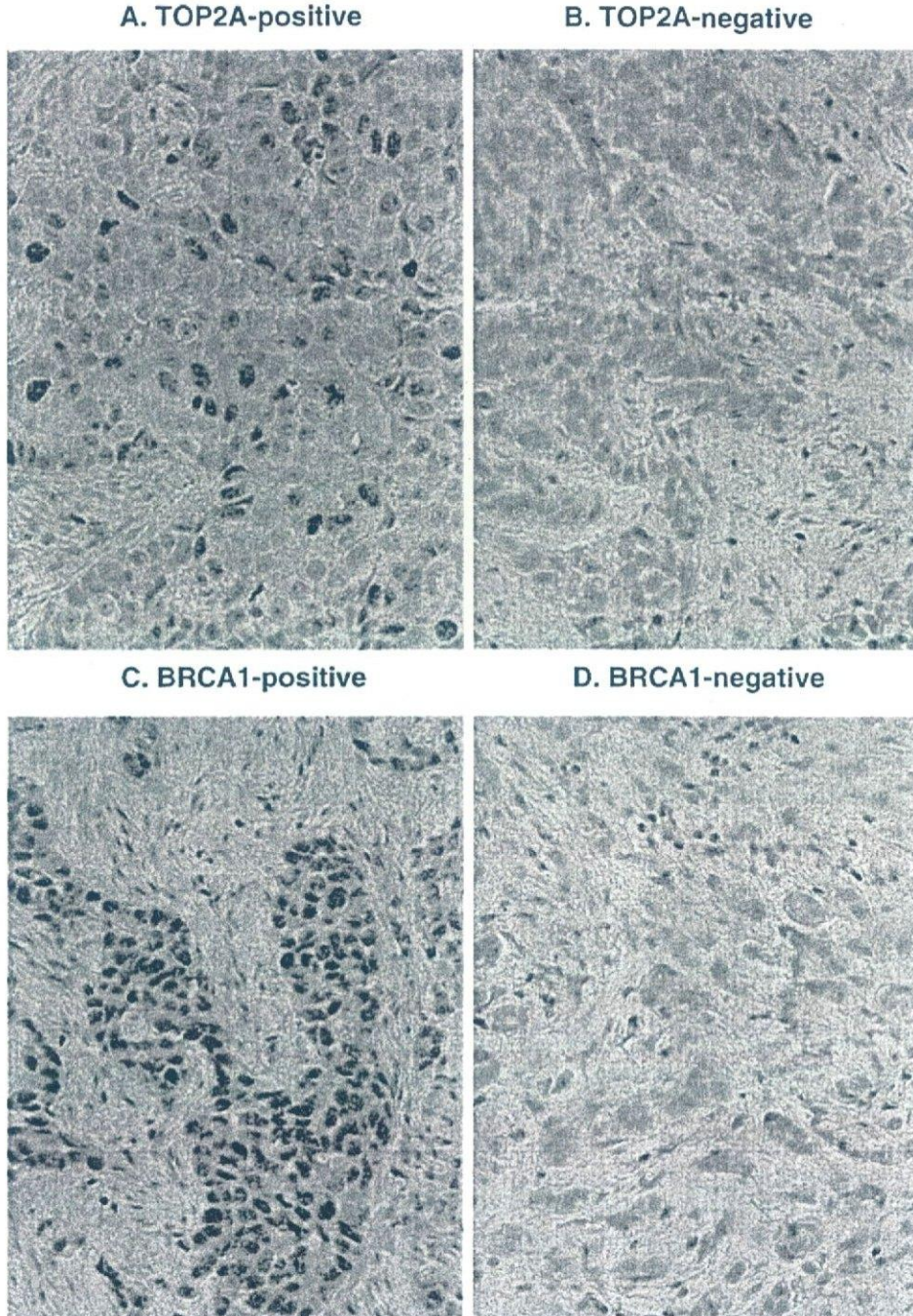


Fig. 1. Immunohistochemical staining of *TOP2A* and *BRCA1*. Representative results of immunohistochemical staining of *TOP2A* and *BRCA1* (400 \times). Nuclear staining of *TOP2A*-positive (A), *TOP2A*-negative (B), *BRCA1*-positive (C), and *BRCA1*-negative (D) is seen in tumor cells.

Table 3
Relationship between TOP2A or BRCA1 positivity and clinico-pathological factors

	TOP2A positivity (%)	P-value	BRCA1 positivity (%)	P-value
Menopausal status				
Pre-	36	0.11	55	0.43
Post-	52		45	
Tumor size				
≤5 cm	43	0.99	52	0.84
>5 cm	41		49	
Lymph node metastasis				
Negative	47	0.53	53	0.83
Positive	41		50	
Nuclear grade				
I + II	35	0.10	63	0.07
III	52		44	
Mitotic score				
I + II	29	<0.001	54	0.83
III	67		51	
Tubular formation				
I + II	52	0.45	62	0.46
III	42		51	
Estrogen receptor				
Positive	29	0.08	52	0.99
Negative	49		51	
Progesterone receptor				
Positive	32	0.07	48	0.82
Negative	53		46	
HER-2 status				
Positive	59	<0.05	52	0.99
Negative	35		51	

negative ER and those with negative PR were also more likely, but not significantly so, to show a higher TOP2A positivity than those with, respectively, positive ER (49% vs. 29%, $P = 0.08$) or positive PR (53% vs. 32%, $P = 0.07$) (Table 3). With respect to BRCA1, tumors with a low nuclear grade (I + II) were more likely to show a higher BRCA1 positivity than those with a high nuclear grade (III) (63% vs. 44%, $P = 0.07$).

The relationship between TOP2A or BRCA1 expression and pathological response is shown in Table 4. The pCR rate for TOP2A-positive tumors (17%) was significantly ($P < 0.005$) higher than that for TOP2A-negative tumors (2%). The pCR rate for BRCA1-negative tumors (11%) was higher than that for BRCA1-positive tumors (5%) but the difference was statistically not significant ($P = 0.31$). Multivariate analysis of TOP2A and BRCA1 expression adjusted for menopausal status, tumor size, lymph node metastasis, distant metastasis, nuclear grade, ER, PR, and HER-2 status showed that TOP2A expression was a significant factor which associated with pCR,

Table 4
Relationship between TOP2A or BRCA1 expression and pathological response to epirubicin-based regimens

Pathological response ^a	Non-pCR	pCR	P-value
TOP2A			
Positive	38 (83) ^b	8 (17)	<0.005
Negative	61 (98)	1 (2)	
BRCA1			
Positive	52 (95)	3 (5)	0.31
Negative	47 (89)	6 (11)	

^a Pathological response was classified as described in Section 2.

^b % of patients.

Table 5
Multivariate analysis of TOP2A and BRCA1 expression with pathological response to epirubicin-based regimens

	Non-pCR ^a	pCR	OR ^b (95% CI ^c)	P-value
TOP2A				
Negative	61	1	1.00	0.02
Positive	38	8	20.1 (1.44–279)	
BRCA1				
Negative	47	6	1.00	0.41
Positive	52	3	0.44 (0.06–3.15)	

^a Pathological response was classified as described in Section 2.

^b Odds ratio adjusted for menopausal status, tumor size, lymph node metastasis, distant metastasis, nuclear grade, ER, PR, and HER2 status.

^c Confidence interval.

being independent of the other factors (Table 5). Results of the combined analysis of TOP2A and BRCA1 expression are shown in Table 6. The pCR rate for TOP2A-positive and BRCA1-negative tumors (30%) was marginally significantly higher than the rates for TOP2A-positive and BRCA1-positive tumors (8%, $P = 0.06$), and significantly higher than TOP2A-negative and BRCA1-positive tumors (3%, $P < 0.05$), or TOP2A-negative and BRCA1-negative tumors (0%, $P < 0.005$).

Table 6
Relationship between combined TOP2A and BRCA1 expression and pathological response to epirubicin-based regimens

TOP2A	BRCA1	Pathological response ^a		P-value
		Non-pCR	pCR	
Positive	Negative	14 (70) ^b	6 (30)	0.06 ^c
Positive	Positive	24 (92)	2 (8)	
Negative	Positive	28 (97)	1 (3)	<0.05 ^c
Negative	Negative	33 (100)	0 (0)	<0.005 ^c

^a Pathological response was classified as described in Section 2.

^b % of patients.

^c P-values represent comparison with TOP2A-positive and BRCA1-negative tumors.