

論文の内容の要旨

論文題目 **HER2 陽性乳癌のトラスツズマブ治療に対する病理形態学のおよび分子病理学的治療効果予測因子に関する研究**

指導教員 深山正久教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 山内稚佐子

【背景】近年、わが国における乳癌の罹患数および死亡数の増加は著しく 65 歳未満の若い世代では女性の癌死亡の第 1 位となっている。乳癌はホルモン療法、抗がん剤療法などの薬物療法が有用であり、奏効率、生存率の改善がみられている。近年全乳癌の 20-30% を占める **HER2 陽性乳癌** に対するトラスツズマブを中心とする抗体療法などの分子標的療法が行われその有用性が示されており、今後の有力な治療法として期待されている。しかし、トラスツズマブは **HER2 過剰発現乳癌** すべての自然経過を変更するものではないこともわかってきており、初回トラスツズマブ単剤投与に反応する症例は **HER2 過剰発現乳癌** の約 1/3 以下であるといわれている。これと同様に顕微鏡的転移癌の場合、トラスツズマブの術後補助療法による年間ハザード比の減少は 50% にすぎず、かなりの割合の腫瘍がトラスツズマブに耐性であることが示唆される。しかし、トラスツズマブ耐性の機序についてはあまり解明されていない。そこで本研究では、**HER2 陽性乳癌** に対するトラスツズマブの治療効果予測因子および耐性回避の方法について解明することを試みた。

【目的】、**HER2 陽性乳癌** に対するトラスツズマブの治療効果予測因子を臨床病理学検討により明らかにし、耐性回避の方法について解明する

【検討 1】

1. 対象：1993 年から 2007 年までの間に国立がんセンター東病院にて外科治療がなされた **HER2 強陽性乳癌** 186 例中再発にてトラスツズマブが投与された 22 例を対象とした。再発確認以降トラスツズマブ（タキソールとの併用あるいは単剤）が投与されてから病状の進行を伴わず、1 年以上トラスツズマブの投与が継続された症例および病状の進行なく半年以上トラスツズマブが投与されたが、患者の希望あるいは副作用（心毒性）により投与中止となった症例を有効群とし、病状の進行により 1 年未満で投与中止となった例を無効群とした。

2. 方法：初回手術検体ブロックより代表ブロックを選別し tissue microarray 標本作製し

種々の因子について免疫組織学手法を用い検討した。

3. 結果：症例背景を表1に示す。トラスツズマブ投与により治療効果を認めた (response) 群 11 例、効果を認めなかった (resistance) 群 11 例であった。両群間で年齢、腫瘍径、病期、組織学的悪性度、ホルモンレセプター発現の有無、術前あるいは術後化学療法の有無について検討したが、有意な差は認めなかった。免疫組織化学検査では、Foxp3 陽性リンパ球が少ない (<15 個/5HPF) 群および pan-cadherin 陰性群においてトラスツズマブの治療効果を認めた。これまでに報告されている細胞質内のシグナル伝達経路における各因子については差を認めなかった (表2)。

表 1. 症例背景および

病理学的因子についての検討

Case	All	Response	Resistance
No. of patient	22	11	11
Age(years)	55.5±8.2 (42-71)	54.2±9.1 (42-70)	56.7±7.3 (42-71)
Tumor size(cm)	4.4±2.1 (0.5-10.0)	4.2±2.5 (0.5-10.0)	5.0±1.51 (2.0-7.5)
Stage			
I	2	1	0
IIA	3	3	0
IIB	5	2	3
IIIA	4	1	3
IIIB	6	3	3
IIIC	1	0	1
IV	1	1	0
Histological grade			
1	1	0	1
2	5	2	3
3	16	9	7
ER			
positive	8	3	5
negative	14	8	6
PgR			
positive	2	0	2
negative	20	11	9
Neo adjuvant therapy			
present	14	6	8
absent	8	5	3
Adjuvant therapy			
present	17	9	8
absent	5	2	3

表 2. 免疫組織学的検討結果

Antibodies	Response	Resistance	P-value
Akt			
negative	5	4	
positive	6	7	<i>NS</i>
PTEN			
negative	7	6	
positive	4	5	<i>NS</i>
p27^{Kip1}			
negative	7	6	
positive	4	5	<i>NS</i>
IGF1R			
negative	5	6	
positive	6	5	<i>NS</i>
CD8			
≤9	6	3	
>9	5	8	<i>NS</i>
CD56			
0	6	6	
>0	5	5	<i>NS</i>
CD68			
negative	7	7	
positive	4	4	<i>NS</i>
Foxp3			
<15	10	4	
>15	1	7	0.02
Pan-cadherin			
negative	8	1	
positive	3	10	<0.01

また、トラスツズマブ有効例では全生存率の延長を認めた (図 1 A)。免疫組織学的検討において 2 群間に差を認めた Pan-cadherin にいつにおいても全生存率 に差を認めた (図 1 B)。Foxp3 陽性リンパ球が少ない (<15 個/5HPF) かつ pan-cadherin 陰性症例でも全生存率の延長を認めた。(図 1 C)。

以上より、HER2 陽性乳癌組織の免疫染色において Pan-cadherin 陽性および Foxp3 陽性細胞の多い症例でトラスツズマブに抵抗性である例が有意に多く、生存率にも有意差を認められた。このことより、治療前に Pan-cadherin および Foxp3 を計測することにより、トラスツズマブの効果を期待できない群（できる群）を選別することができる可能性が示唆された。

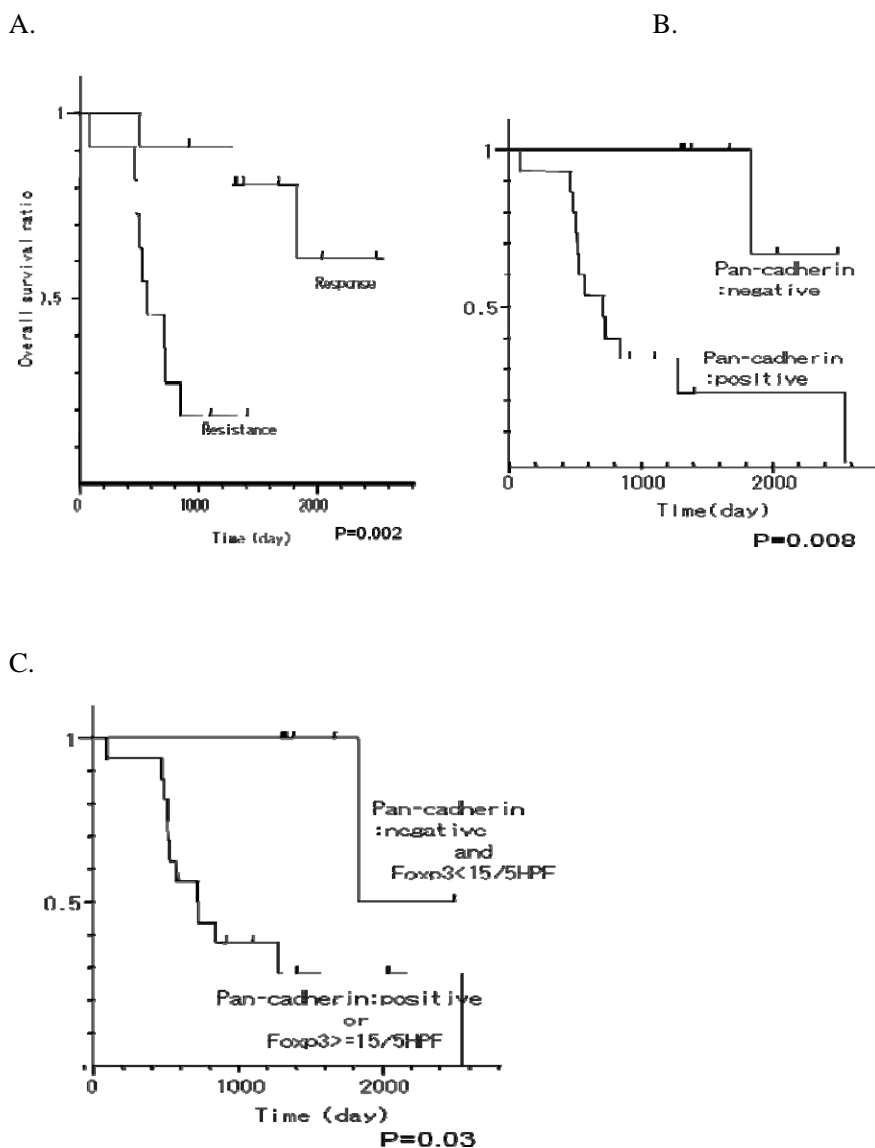


図1. トラスツズマブ治療乳癌症例22例に関する生存率の検討

これまでにトラスツズマブの腫瘍細胞に対する作用機序の一つとして抗体依存性細胞傷害の作用が知られている。抗体依存性細胞傷害の中心的役割を担うNK細胞に発現する抑制性レセプターのリガンドとしてカドヘリンファミリーが報告されており、今回の結果はそ

の関与を裏付けるものであった。そこで、腫瘍細胞におけるカドヘリン発現の有無によるトラスツズマブを介する抗体依存性細胞傷害の違いについて検討した。

【検討 2】

1. 対象：HER2 陽性乳癌細胞株 SKBR3 (Pan-cadherin negative)

HCC1569 (Pan-cadherin positive: E-cadherin positive, N-cadherin positive)

2. 方法：カドヘリンの発現状態の異なる 2 種類の HER2 陽性乳癌細胞株を用い以下の検討を行った。

①. 各細胞について 35mmdish に 1×10^5 ずつ腫瘍細胞 (T) を巻き、24 時間後にトラスツズマブおよび健常者から採取した末梢血単核球 (E) を加え、その 24 時間後に生腫瘍細胞数を計測した。なお、トラスツズマブは 0、0.021 mg/ml、0.105 mg/ml と加える濃度を変え検討した。また末梢血単核球は T:E を 1:0、1:1、1:20 と変え検討を行った。

②. HCC1569 (Pan-cadherin positive: E-cadherin positive, N-cadherin positive) について E-cadherin (CDH1)、N-cadherin (CDH2) を、siRNA の手法を用いて、それぞれあるいは同時にノックダウンし、方法①. と同様の検討を行った。

③. 末梢血単核球カドヘリンをリガンドとする NK 細胞の抑制性レセプターである killer cell lectin-like receptorG1:KLRG1 発現細胞を除去し、方法①. と同様の検討を行った。

3. 結果：SKBR3 (Pan-cadherin negative) では末梢血単核球の数依存的に腫瘍細胞生存率の低下を認めた (図 2A)。

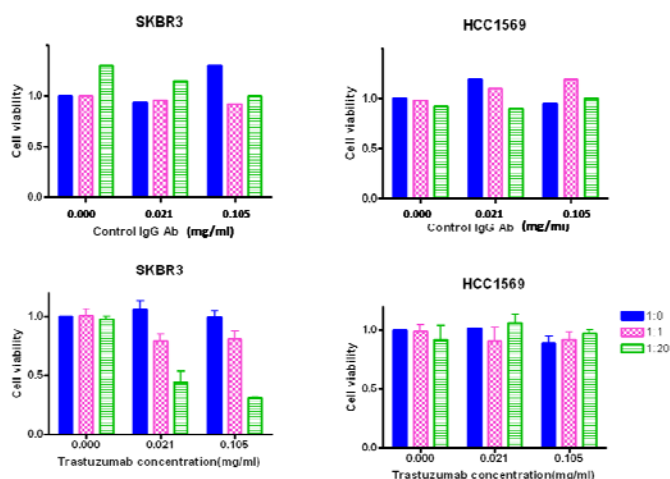
HCC1569 (Pan-cadherin positive: E-cadherin positive, N-cadherin positive) では末梢血単核球の数に関わりなく腫瘍細胞生存率の低下を認めなかった (図 2A)。しかし、HCC1569 について E-cadherin (CDH1) をノックダウンしたところ、末梢血単核球の数依存的に腫瘍細胞生存率の低下を認めた。N-cadherin(CDH2)のみをノックダウンした群では T:E が 1:20 までの比率ではコントロール群と差を認めなかった。E-cadherin (CDH1) および N-cadherin(CDH2) をダブルノックダウンした群においては E-cadherin (CDH1) のみをノックダウンした群と同様の結果を認めた (図 2B)。

次に KLRG1 発現細胞を除去した末梢血単核球を用いて同様の検討を行ったところ、カドヘリン発現の消失しているあるいは減弱している SKBR3 および E-cadherin (CDH1) あるいは N-cadherin (CDH2) をノックダウンした HCC1569 では未処理の末梢血単核球を用いて行った検討と同様にトラスツズマブの濃度に関わらず、末梢血単核球数に依存して腫瘍細胞生存率の低下を認めた。さらにカドヘリン発現を伴う未処理の HCC1569 では、未処理の末梢血単核球を用いた場合と異なり、トラスツズマブの濃度に依らず、末梢血単核球の数依存的に腫瘍細胞生存率の低下を認めた (図 3)。

以上の結果より、HER2 陽性ヒト乳癌細胞株において E-cadherin あるいは N-cadherin を発現する細胞株はトラスツズマブ濃度や末梢血単核球数に関わらず、トラスツズマブに対し耐性を示すことが判明した。しかし、E,N-cadherin の発現を減弱させることにより、これら

の細胞株のトラスツズマブに対する耐性は消失した。また、末梢血単核球から E,N-cadherin をリガンドとする KLRG1 を発現する細胞を除去することによりトラスツズマブに対する耐性は消失することが確認できた。

A



B.

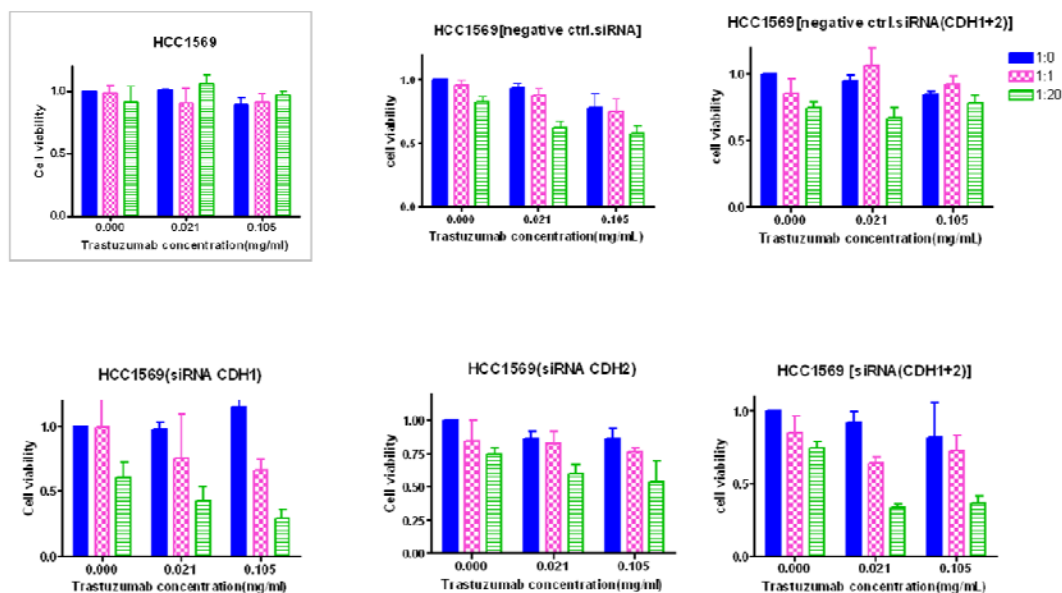
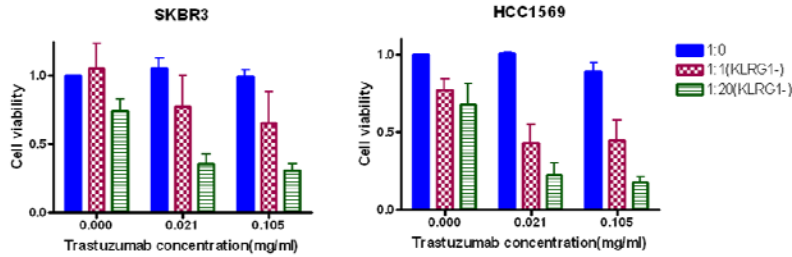


図2. トラスツズマブと末梢血単核球による HER2 陽性乳癌細胞に対する細胞傷害性
35mmdish に 1×10^5 ずつ腫瘍細胞 (T) を巻き、24 時間後にトラスツズマブおよび健常者から採取した末梢血単核球 (E) を加えた。その 24 時間後に生腫瘍細胞数を計測した。
A: SKBR3、未処理の HCC1569。B: siRNA にて CDH1、CDH2 をノックダウンした HCC1569。

A



B

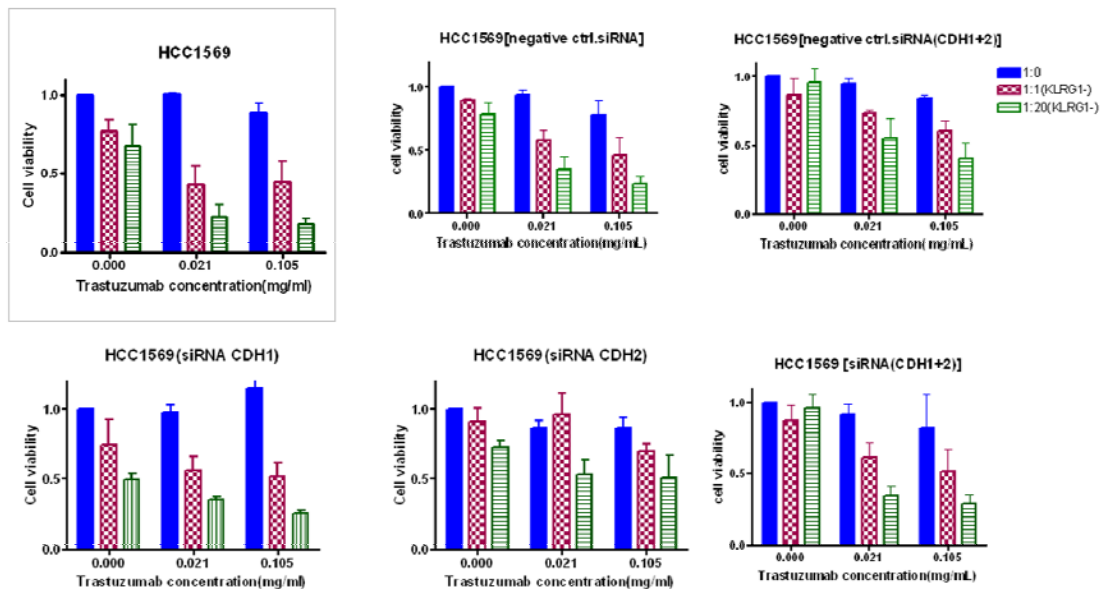


図3. トラスツズマブと KLRG1 発現細胞を除去した末梢血単核球による HER2 陽性乳癌細胞の細胞傷害性

35mmdish に 1×10^5 ずつ腫瘍細胞 (T) を巻き、24 時間後にトラスツズマブおよび健常者から採取した末梢血単核球をソーティングし、KLRG1 発現細胞を除去した末梢血単核球 (E) を加えた。その 24 時間後に生腫瘍細胞数を計測した。

A: SKBR3、未処理の HCC1569。B: siRNA にて CDH1、CDH2 をノックダウンした HCC1569。

【総括】臨床症例を検討することにより、pan-cadherin および foxp3 が効果予測因子であることを見出し、治療前に Pan-cadherin および Foxp3 を計測することにより、トラスツズマブの効果を期待できる群の抽出が可能ではないかと考えた。さらにこの結果よりトラスツズマブに対する耐性に関して免疫学的機構が強く関与していることが予想された。そこでトラスツズマブの主たる作用機序の 1 つである抗体依存性細胞傷害活性について検討したと

ころ、末梢血単核球中の E. N-cadherin をリガンドとする抑制性レセプターKLRG1 を発現する免疫担当細胞により抗体依存性細胞傷害活性が抑制されることを見出し、この KLRG1 発現細胞を除去することによりトラスツズマブ耐性を回避できる可能性があることを見出した。