

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890004

研究課題名（和文） 抗HER2治療抵抗性を示すp95HER2タンパクの測定法の確立と検査実用化の試み

研究課題名（英文） Establishment of assay method for p95HER2 protein that is a Resistance factor in anti-HER2 molecular-targeted therapy

研究代表者

畑中 豊 (HATANAKA YUTAKA)

北海道大学・北海道大学病院・特任助教

研究者番号：30589924

研究成果の概要（和文）：

本研究では抗HER2治療の抵抗性因子であるp95HER2の新規測定法確立のため、モノクローナル抗体の作製を行った。p95HER2のN末端部分の合成ペプチド(Met611-Cys623)をKLHに結合し、免疫原として用いた。ハイブリドーマ作製後、ELISA法を用いたスクリーニングおよびドット・ブロット法を用いた抗体反応性の確認の結果、Met611-Cys623ペプチドへの特異性を示すクローンが得られた。さらにホルマリン固定パラフィン包埋セルブロックを用いて免疫組織化学法における適用性について検討したところ、p95HER2陽性細胞株において、陽性反応が確認された。これらの結果より、本抗体を用いたHER2治療抵抗性予測のための生化学的そして免疫組織化学的診断法の開発が可能と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed a monoclonal antibody to p95HER2 that is a resistance factor in anti-HER2 therapy. N-terminal synthetic peptides of p95HER2 (Met611-Cys623) was conjugated with KLH, and used as immunogens. From the obtained hybridomas, we selected clones specific to the synthetic peptide by ELISA screening and dot blotting. Antibodies generated from the clones were available in formalin-fixed, paraffin-embedded cell block. These results suggest that the antibodies would be useful to establish biochemical and immunohistochemical assays for selecting patients who exhibit resistance to HER2 therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,220,000	366,000	1,586,000
2011年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,340,000	702,000	3,042,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：分子標的治療，治療抵抗性，コンパニオン診断

1. 研究開始当初の背景

(1) HER2 治療薬 (trastuzumab) およびそのコンパニオン診断薬 (HER2 治療対象患者の選別のための検査薬) が 2000 年に承認され、本邦でがん分子標的治療が本格的に導入された。これにより HER2 陽性転移性乳癌における生存率は改善し、また術後化学療法においても有効性が証明され、現在乳癌においてはホルモン治療、化学療法と併せ標準的治療として用いられている。作用機序別に HER2 治療薬は、細胞外ドメイン (ECD) に結合・作用する抗体治療薬と、細胞内ドメイン (ICD) 内のチロシンキナーゼ (TK) 活性をブロックする低分子 TK 阻害薬の 2 種に大別され、本邦では trastuzumab と lapatinib の 2 つがそれぞれ承認薬として用いられている。

(2) 承認が先行した trastuzumab を中心に HER2 治療が普及するなか、HER2 陽性乳癌のなかで治療抵抗性を示すサブグループの存在が次第に明らかとなり、PTEN, IGF1R, そして trastuzumab が結合する細胞外ドメインを欠損した p95HER2 タンパクが原因分子として近年同定されている。これら主要な抵抗性予測因子のうち、PTEN および IGF1R などは通常の免疫組織化学的手法 (IHC 法) により、発現ステータスを容易に検査できる一方、p95HER2 については①IHC 法では野生型の HER2 (p185HER2) と区別することができないこと、②欠失している ECD 部分の測定を行っても p95HER2 発現と関連しないこと、そして③p95HER2 の生成には一般にみられる選択的スプライシングなどは関与しておらず、オルタナティブな翻訳開始に起因していることから mRNA レベルでもこの p95HER2 は捉えることができないなどの理由から、簡便に測定することが困難な状況にある。

2. 研究の目的

本研究では、p95HER2 を特異的に認識するマウス・モノクローナル抗体を開発し、治療抵抗性予測が可能な新規測定法の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) 抗原ペプチド

マウスへの免疫には、複数のタンパク長の存在が知られている p95HER2 群のうち、最も高い細胞増殖シグナル誘導能を示すことが知られている M611-p95HER2 (Pederson, Mol Cell Biol 2009) の N 末端部分の合成ペプチド (611-623; MPIWKFPDEEGAC) を結合した KLH を用いた。またホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体に対し高い反応性を示す抗体を得るため、予めホルマリン変性した M611-C623 結合 KLH (変性 M611-C623 結合 KLH) も免疫原として用いた。

(2) ハイブリドーマ作製およびクローニング

6 週齢 BALB/c 雌性マウスに M611-C623 結合 KLH および変性 M611-C623 結合 KLH をそれぞれ 3 匹ずつに合計 5 回免疫を行い、その後試採血による力価確認により、各免疫群から 1 匹ずつを選抜し、常法に従いハイブリドーマの作製を行った。ハイブリドーマの培養上清を用いて一次クローニングを行い、M611-C623 免疫マウスから 3 クローン、変性 M611-C623 免疫マウスから 2 クローンをそれぞれ得た。さらに二次クローニングを行った後、図 1 に示すペプチド結合 BSA を用いて、免疫原に対する特異性確認を ELISA 法およびドット・プロット法によって行い、最終 2 クローンを得た。

(3) ウェスタン・ブロッティング

ウェスタン・ブロッティングは常法に従って行った。図 1 に示すペプチド結合 BSA

200ng を各レーンへアプライして SDS-PAGE を行い、その後ゲル中のタンパクをセミドライ法にて PVDF 膜へ転写した。転写後の PVDF 膜は 0.1% Tween-20 を含むブロックエース/TBS でブロッキングを行い、その後 1:25 倍希釈した培養上清を一次抗体として、HRP 標識抗マウス IgG 抗体を二次抗体として反応させ、化学発光法による検出を行った。

(4) 細胞株を用いた FFPE 細胞ブロックの作製

p95HER2 陰性および陽性乳癌細胞株 (MCF-7 細胞および HCC-2218 細胞) はそれぞれ RIKEN および ATCC 細胞バンクからそれぞれ入手した。培養した細胞株をそれぞれ 10%中性緩衝ホルマリンにて 15 分間固定し、2%アガロースにて前包埋した後に、パラフィン包埋し、細胞ブロックを作製した。

(5) 乳癌組織を用いた組織マイクロアレイ (TMA) の作製

2000 年から 2003 年に北海道大学病院において外科的に切除後に、病理部に提出され、病理診断された乳癌 167 症例 (うち HER2 陽性は 13 症例) の FFPE 検体を用いて、φ 2.0mm コアの TMA ブロックを作製した。

(6) IHC 法

細胞ブロックおよび TMA ブロックは、5 μm に薄切した後、脱パラフィン・親水化を行い、その後抗原賦活処理を行った。3% 過酸化水素により内因性パーオキシダーゼの不活化を行ったのち、1:2 倍希釈した培養上清を一次抗体として、HRP 標識検出ポリマー試薬を二次抗体として反応させ、DAB 発色により検出を行った。

4. 研究成果

(1) 抗体反応性の確認

作製されたハイブリドーマから、一次クローニングにより選択された 5 クローン (clone

1E8, 5B8, 5F1, 7D7, 10H11) について、免疫原として用いた M611-C623 ペプチド (peptide C)、およびこれに数アミノ酸の付加あるいは削除を行ったペプチド (peptide A, B, D) を用いて、ELISA 法による抗体の反応性確認を行った (図 1-A)。その結果 5B8 および 5F11 の培養上清において、M611-C623 ペプチド特異的な反応が認められた (図 1-B)。

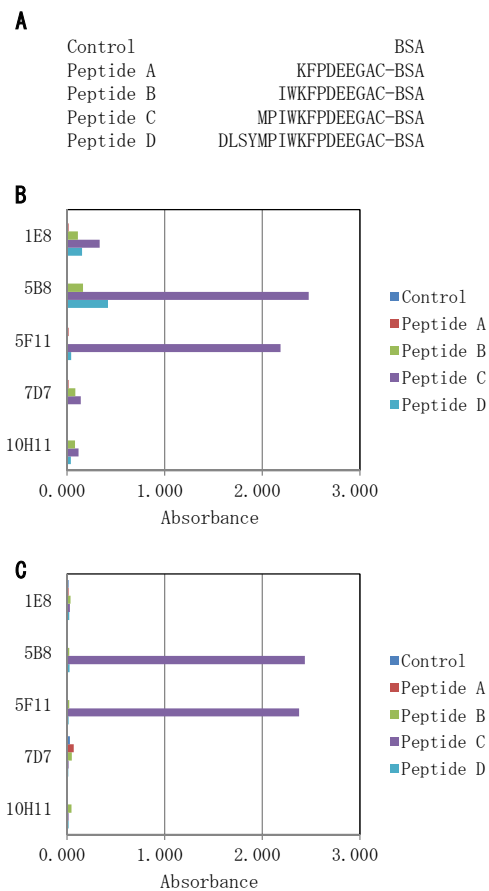


図 1 ELISA 法における抗体反応性の確認
A: ELISA 法によるスクリーニングに用いた BSA 結合ペプチド。**B:** ペプチド結合 BSA を用いた 5 クローンの培養上清中の抗体反応性。1E8, 5B8, 5F11 は M611-C623 免疫マウスから得られたクローン。7D7, 10H11 はホルマリン変性 M611-C623 免疫マウスから得られたクローン。各 well には 0.25ng のペプチド結合 BSA をコーティング。**C:** ホルマリン変性に対する抗体反応性。上記と同様のコーティングを行った後、10%ホルマリン液を用いて 24 時間処理を行い、ELISA 法に供した。

また FFPE 検体での利用を想定し、ホルマリン処理を施した上記ペプチド結合 BSA に対す

る抗体反応性を確認したところ、未変性ペプチドと同様に 5B8 および 5F11 の培養上清において、M611-C623 ペプチド特異的な反応が認められた (図 1-C)。

ELISA 法において、M611-C623 ペプチド特異的な抗体反応性を示した clone 5B8 および 5F11 について、さらにドット・ブロット法を用いて、最終クローニング後の培養上清の抗体反応性を確認したところ、M611-C623 ペプチドに特異的であることが明らかとなった (図 2)。

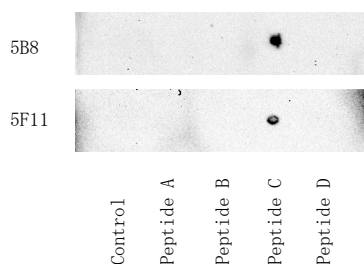


図 2 ドット・ブロット法における反応性確認
各ペプチド結合 BSA はメタノール・親水化処理した PVDF 膜上にそれぞれ 100ng をブロットし、化学発光法にて検出した。

(2) ウェスタン・ブロッティング適用性

最終クローニングによって得られた 2 クローンについて、ウェスタン・ブロッティングでの適用性を評価した。その結果、両クローン (clones 5B8 および 5F11) 共に、SDS-PAGE 後の M611-C623 ペプチド BSA の特異的検出が可能であった。

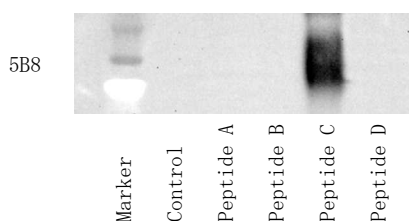


図 3 ウェスタン・ブロッティング適用性の確認

(3) FFPE 検体を用いた IHC 適用性

p95HER2 抗体を用いた IHC 測定法を確立す

る上で、FFPE 検体における適用の可否は、極めて重要となる。そこでまず p95HER2 発現の有無が明らかな細胞株を用いて FFPE 細胞ブロックを作製し、IHC 法による検討を行った。その結果、p95HER2 陽性細胞株 (HCC-2218 細胞) においてやや染色強度は弱かったものの陽性反応が認められた。一方陰性細胞株 (MCF-7 細胞) においては反応が認められなかった (図 4)。乳癌切除組織から作製した TMA ブロックを用いた検討では、野生型 HER2 陽性 13 症例のうち、いずれの症例においても p95HER2 の陽性反応は認められなかった (データ示さず)。

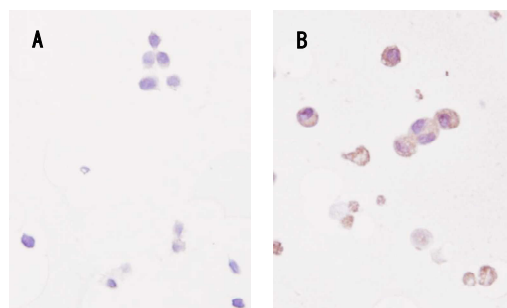


図 4 FFPE 細胞ブロック検体における IHC 適用性
A: p95HER2 陰性細胞株 (MCF-7 細胞) における染色。
B: 陽性細胞株 (HCC2218 細胞) における染色。

p95HER2 測定法の確立にあたり特異抗体の利用は第一選択といえるが、この抗体開発は難度が高いと判断したため、本研究開始年度 (H22 年度) は 2 種類の抗体を組み合わせたマルチプレックス IHC 法による測定法の確立を目指した。しかし 2010 年 8 月 Sperinde らにより抗 p95HER2 モノクローナル抗体が開発・報告 (Clin Cancer Res) されたため、やや複雑なマルチプレックス IHC 法を用いた測定法では実用化は難しいと考え、H23 年度は計画を変更し病理組織検体での使用が可能なマウス・モノクローナル抗体の作製を試みることにした。この計画変更に伴い、エンドポイントであるヒト乳癌組織における IHC 法の適用性について、十分な結果を得るに至

らなかったものの、本研究において、ELISA法を用いた生化学的測定に利用可能なマウス・モノクローナル抗体の作製に成功した。また細胞株を用いた FFPE 検体においても特異的な反応が得られたため、免疫組織化学的測定法への利用が期待された。今後病理組織検体を用いた条件検討を追加し、ヒト乳癌組織における IHC 法での適用可能を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- [1] 畑中 豊, 久保田 佳奈子, 松野 吉宏. 診断病理の精度管理: 分子病理診断の標準化と精度管理. 病理と臨床, 29, 346-352, 2011. (査読無・総説)
- [2] Yoshida A, Tsuta K, Nitta H, Hatanaka Y, Asamura H, Sekine I, Grogan T M, Fukayama M, Shibata T, Furuta K, Kohno T, Tsuda H. Bright-field dual-color chromogenic in situ hybridization for diagnosing echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase-positive lung adenocarcinomas. J Thorac Oncol. 6, 1677-86, 2011. (査読有)
- [3] Yonemori K, Tsuta K, Shimizu C, Hatanaka Y, Hirakawa A, Ono M, Kouno T, Katsumata N, Ando M, Tamura K, Hasegawa T, Kinoshita T, Fujiwara Y. Immunohistochemical expression of HER1, HER3, and HER4 in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. J Surg Oncol, 101, 222-7, 2010. (査読有)
- [4] Yonemori K, Tsuta K, Ono M, Shimizu C, Hirakawa A, Hasegawa T, Hatanaka Y, Nakanishi Y, Miyakita Y, Narita Y, Shibui S, Fujiwara Y. Disruption of the blood brain barrier by brain metastases of triple negative and basal-type breast cancer but not HER2/neu-positive breast cancer. Cancer, 116, 302-8, 2010. (査読有)
- [5] Kato N, Itoh H, Serizawa A, Hatanaka Y, Umemura S, Osamura RY. Pathol Int. 2010 Jul;60(7):510-5. Evaluation of HER2 gene amplification in invasive

breast cancer using a dual-color chromogenic in situ hybridization (dual CISH). Pathol Int, 60, 510-5, 2010. (査読有)

[学会発表] (計2件)

- [1] 畑中 豊, 松野 吉宏. 分子病理診断の標準化と精度管理における課題と取り組み. 日本病理学会総会. 2012年4月27日, 京王プラザ (東京)
- [2] 藤田 裕美, 畑中 豊, 鈴木 雄太, 久保田 佳奈子, 大庭 幸治, 三橋 智子, 笠原 正典, 松野 吉宏. ヒト乳癌における NKG2D リガンドの発現に関する検討. 日本病理学会総会. 2012年4月27日, 京王プラザ (東京)

[図書] (計1件)

- [1] 畑中 豊, 松野吉宏. 治療薬開発およびコンパニオン診断薬との同時開発の現状と今後. 技術情報協会出版, 346-361, 2010. (査読無: 共著本)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑中 豊 (HATANAKA YUTAKA)

北海道大学・北海道大学病院・特任助教

研究者番号: 30589924

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし