

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10567

研究課題名(和文) 乳癌におけるHER2不均質性の臨床的意義に関する研究

研究課題名(英文) Clinical significance of HER2 intratumoral heterogeneity in breast cancer

研究代表者

堀井 理絵 (Horii, Rie)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 病理診断科・医長

研究者番号：20446272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：トラスツズマブを含む術前薬物療法を行った乳癌症例を対象に、HER2の腫瘍内不均質性(ITH)を評価し、その結果と術前薬物療法の効果との関連を調べた。GPA標本を用いてカウントした各癌細胞のHER2遺伝子シグナル数とタンパク発現データからHER2-ITHの程度を定量化した。タンパクスコアの平均値とCV値、遺伝子シグナル数の平均値、遺伝子増幅かつタンパク過剰発現の癌細胞の割合、遺伝子増幅のみならずタンパク低発現の癌細胞の割合が、薬物療法の効果と有意に関連していた。臨床病理学的因子とHER2-ITHの指標を組み合わせて作成した診断モデルは、薬物療法の効果に対して高い予測能を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ITHは遺伝子型の多様性に起因するもの(genetic ITH)と遺伝子型は同一だが表現型が多様なもの(non-genetic ITH)とに分けられる。本研究の特色はGPAを用いて遺伝子とタンパク両方を評価しITHを定量化した点にある。遺伝子シグナル数の平均はgenetic ITH、遺伝子増幅のみならずタンパク低発現の癌細胞の割合はnon-genetic ITH、遺伝子増幅かつタンパク過剰発現の癌細胞の割合は両者を組み合わせたITHを示し、夫々がトラスツズマブを含む薬物療法の効果と関連していた。HER2-ITHは抗HER2療法の効果予測に有用で、乳癌症例の治療方針決定に際し評価すべきである。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationships between various indicators for HER2 intratumoral heterogeneity (ITH) and clinical course in HER2-positive breast cancer patients, treated with neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy. The degree of HER2-ITH was quantified using HER2 gene copy number and protein expression of each cancer cell assessed by gene-protein assay slides of pretherapeutic biopsy specimens. Achievement of pCR for neoadjuvant treatments showed positive relationships to the mean gene copy number ($P < 0.001$), the mean protein category ($P < 0.001$) and the proportion of gene-amplified and protein-positive tumor cells ($P < 0.001$) and negative relationships to the CV of protein category ($P < 0.001$) and the proportion of gene-amplified but protein-negative tumor cells ($P = 0.002$). The diagnostic models, created by combining clinicopathological factors and the ITH indicators, showed excellent diagnostic ability for therapeutic effect of trastuzumab-based treatments.

研究分野：乳腺病理学

キーワード：腫瘍内不均質性 HER2 乳癌 Gene-protein assay

1. 研究開始当初の背景

ある物質の腫瘍内における不均質性 (intratumoral heterogeneity: ITH) は、遺伝子型の多様性に起因するものと (genetic ITH) 遺伝子型は同一だが表現型が多様なもの (non-genetic ITH) とに分けられる。後者の発生機序としては、エピジェネティックなメカニズムやその物質の発現に関与する因子の不均質性などが想定される。乳癌における HER2-ITH は、抗 HER2 療法の効果や患者の予後と関連があると考えられているが、さまざまな要因による ITH が存在し、評価が難しいため、その臨床的な意義は明らかになっていない。

現在、日常臨床で行われている HER2 検査は、遺伝子増幅をみる *in situ* hybridization (ISH) とタンパク発現をみる免疫組織化学法 (immunohistochemistry: IHC) である。HER2 遺伝子増幅細胞と非増幅細胞が混在し genetic ITH がみられる腫瘍は ISH で検出可能である。一方、IHC でタンパク発現が不均質であった場合は、genetic ITH と non-genetic ITH 両方の可能性がある。これまで、遺伝子とタンパクを同時にみることができなかったため、それらを区別することはできなかった。

Gene-protein assay (GPA) は、IHC と dual *in situ* hybridization (DISH) を同一切片上で同時に行う新技術である。GPA で HER2 検査を行うと、HER2 遺伝子とタンパク、両方の発現状況を同時に、明視野で観察でき、genetic と non-genetic 両方の ITH を評価可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、乳癌における HER2-ITH の臨床的な意義を明らかにすることである。臨床的意義は、抗 HER2 療法の効果予測と予後予測、二つの側面から検討する。HER2-ITH は、ISH、IHC、GPA を用いて評価する。

3. 研究の方法

トラスツズマブを含む術前薬物療法を行った Stage I-III の HER2 陽性乳癌症例 102 例を対象に、治療前針生検標本における HER2-ITH をさまざまな指標で評価し、その結果と術前薬物療法の効果との関連を調べた。HER2-ITH は、定性的な方法と定量的な方法で検索した。定性的な方法では、ISH と IHC の標本を用いて、2018 年に改訂された HER2 検査の ASCO/CAP ガイドラインに従って、目視により、genetic ITH あり/なしの 2 群に分けた。定量的な方法では、最初に、GPA 標本から 600 倍の病理組織写真を各症例 5 枚ずつ撮影した。次に、そこにみられる全ての浸潤癌細胞について、HER2 遺伝子コピー数とタンパク発現状況をカウントした。最後にそのカウントデータを用いて、HER2-ITH の指標となりうる複数の統計値を算出した。術前薬物療法の治療効果は、pathological complete response (pCR) / non-pCR の 2 群に分けて評価した。pCR は薬物療法後の手術標本に浸潤癌が遺残していないものと定義し、乳管内癌巣やリンパ節転移の有無は考慮しなかった。

治療効果と有意に関連していた HER2-ITH の指標と臨床病理学的因子 (ホルモン受容体の発現状況、核グレード、Ki67 陽性率、臨床病期) とを組み合わせて、トラスツズマブを含む薬物療法の効果を予測する診断モデルを作成した。これらのモデルの診断能を検証し、さらに、予後との関連を検討した。

GPA で検出可能な、遺伝子増幅がみられるがタンパク低発現の癌細胞の割合は、non-genetic ITH の程度を反映していると考えられる。これらの細胞で、何が起きているのかを解明する第一歩として、そのような細胞が多く含まれる症例を対象に、HER2 messenger RNA (mRNA) の ISH を行い、GPA スライドと比較観察した。

4. 研究成果

目視で genetic ITH ありと判定された 7 例は全て non-pCR 症例で、genetic ITH なしと判定された 95 例のうち 50 例が pCR、45 例が non-pCR であった (Table 1)。genetic ITH の有無は有意に pCR と関連していた ($P = 0.013$ 、Fisher の直接確率検定)。

Table 1 HER2 遺伝子型の不均質性と術前薬物療法の治療効果

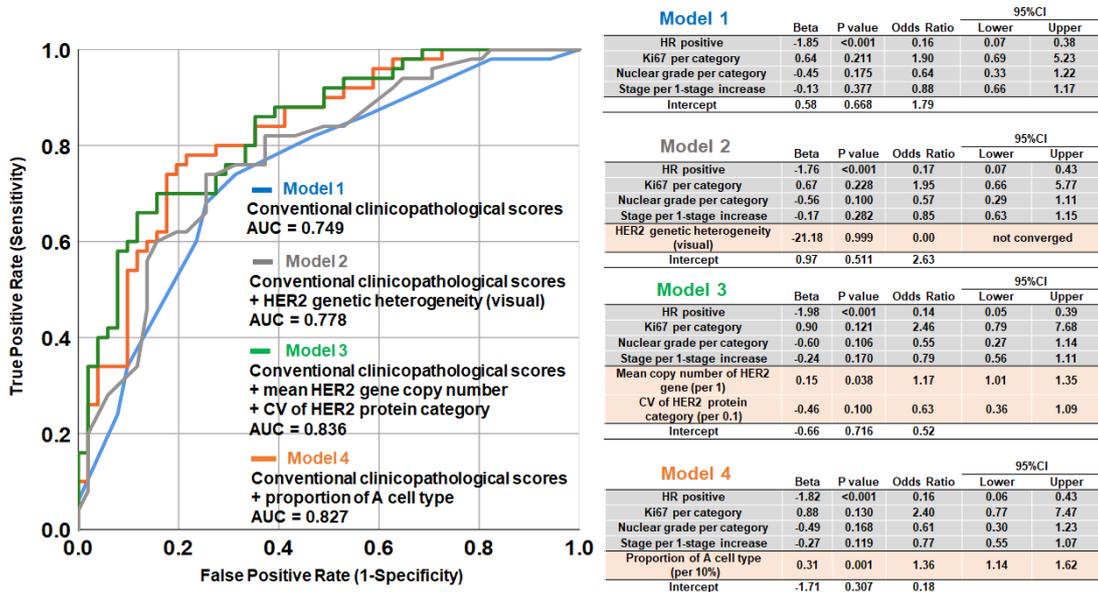
		術前薬物療法の治療効果		
		non-pCR	pCR	合計
HER2 の遺伝子型の不均質性	なし	45	50	95
	あり	7	0	7
	合計	52	50	102

HER2; human epidermal growth factor receptor 2, pCR; pathological complete response

pCR の達成は、HER2 遺伝子シグナル数の平均値 (genetic ITH の指標、 $P < 0.001$)、HER2 タンパクスコアの平均値 ($P < 0.001$)、HER2 遺伝子増幅かつタンパク過剰発現を示す癌細胞の割合 ($P < 0.001$) と有意な正の相関を、HER2 タンパクスコアの coefficient of variation (CV) 値 ($P < 0.001$) や HER2 遺伝子増幅がみられるがタンパク低発現の癌細胞の割合 (non-genetic ITH の指標、 $P = 0.002$) と有意な負の相関を示した (Mann-Whitney の U 検定)。

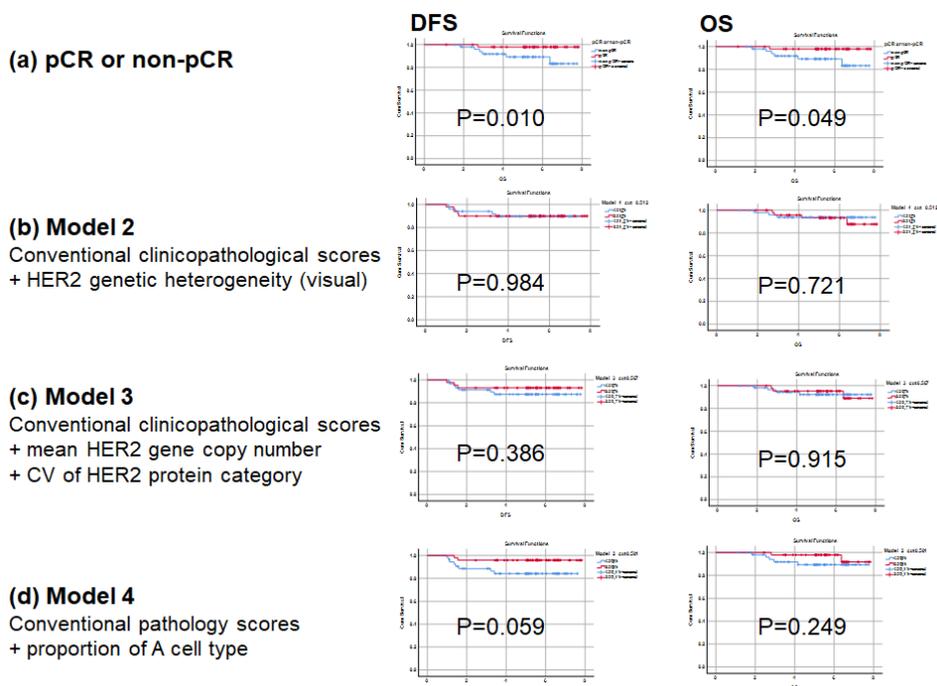
臨床病理学的因子と HER2-ITH の指標を組み合わせるトラスツズマブを含む薬物療法の効果予測モデルを作成し、その診断能を検証した。臨床病理学的因子のみで作成した診断モデルを Model 1、臨床病理学的因子に組み合わせる HER2-ITH の指標を目視で判定した genetic ITH の有無としたものを Model 2、HER2 遺伝子シグナル数の平均値とタンパクスコアの CV 値としたものを Model 3、HER2 遺伝子増幅かつタンパク過剰発現を示す癌細胞の割合としたものを Model 4 とした。Model 2 (AUC = 0.778) は、Model 1 (AUC = 0.749) と同等の中等度の診断能を示したのに対し、Model 3 (AUC = 0.836) と Model 4 (AUC = 0.827) は、より高い診断能を示した (Figure 1)。

Figure 1 薬物療法の効果予測モデル



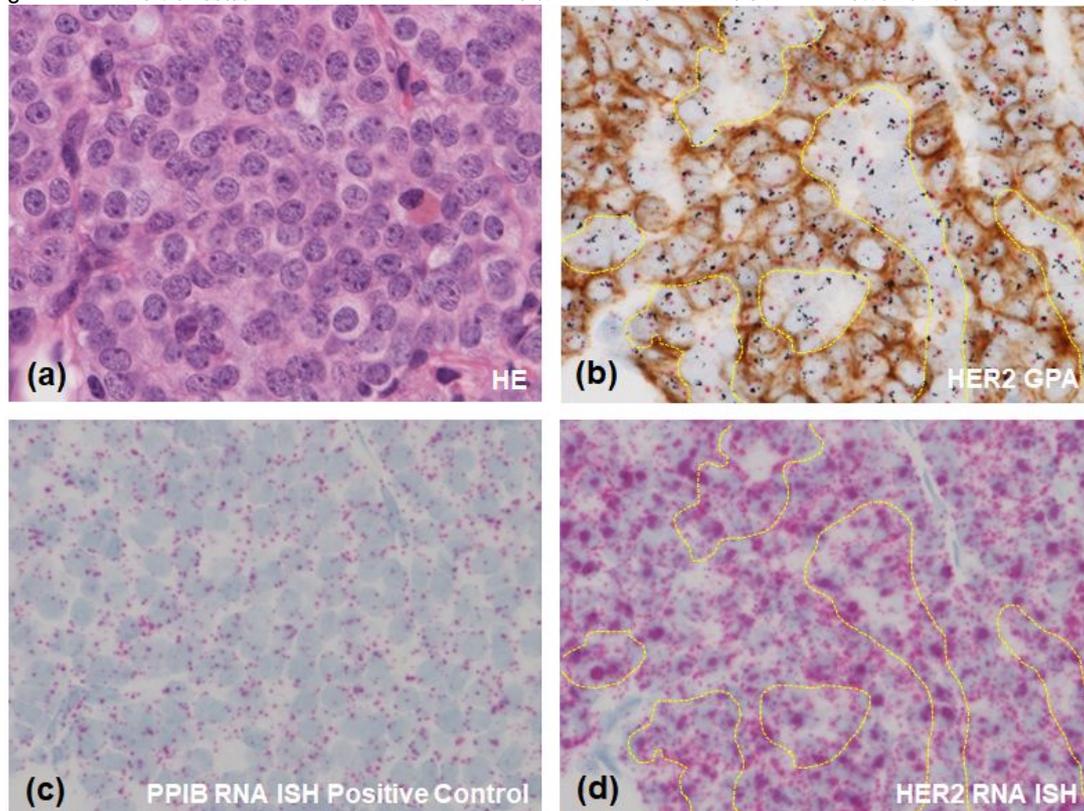
いずれの診断モデルも予後との有意な関連はみいだせなかった。その原因として、経過観察期間が短いため、再発数と死亡数が少ないことが考えられた。

Figure 2 効果予測モデルと予後との関連



最後に、遺伝子増幅がみられるがタンパク低発現の癌細胞を多く含む症例を対象に、HER2 mRNA の ISH を行ったところ、HER2 遺伝子増幅がみられるがタンパク低発現の癌細胞でも高レベルの HER2 mRNA が検出された (Figure 3)。

Figure 3 遺伝子増幅がみられるがタンパク低発現の癌細胞を含む HER2 陽性乳癌の病理組織像



以上より、HER2-ITH は抗 HER2 療法の効果予測に有用で、HER2 陽性乳癌症例の治療方針決定に際し、評価すべき因子である。診断モデルの結果から、HER2-ITH は遺伝子とタンパク両方の発現状況を組み合わせて評価したほうが、より正確に治療効果を予測できる可能性がある。GPA への HER2 検査の適応拡大が期待される。HER2 遺伝子増幅がみられるがタンパク低発現の癌細胞において、ヒストン修飾や DNA のメチル化により HER2 遺伝子の転写が抑制されている可能性は低いと考えられた。遺伝子増幅細胞でタンパク発現が低下する機序については、研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Rie Horii, Matsuura Masaaki, Hiroaki Nitta, et al.
2. 発表標題 Clinical significance of HER2 intratumoral heterogeneity, determined by simultaneous gene and protein analysis, in HER2-positive breast cancer.
3. 学会等名 11th European Breast Cancer Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	秋山 太 (Akiyama Futoshi) (50222550)	公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・臨床病理担当部長 (72602)	