

令和元年6月17日現在

機関番号：82402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15010

研究課題名（和文）免疫染色、次世代シーケンスを用いた胃癌のHER2抗体薬の耐性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Translational research to evaluate the resistant mechanism of anti-HER2 antibody by using immunohistochemistry and next-generation sequencing in HER2-positive gastric patients.

研究代表者

高橋 直樹 (Takahashi, Naoki)

埼玉県立がんセンター（臨床腫瘍研究所）・病院 消化器内科・医長

研究者番号：20744204

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：HER2タンパクを標的としたハーセプチンは、HER2陽性の転移性胃癌に対して使用されているが、治療抵抗の機序については明らかになっていない。また、ハーセプチン治療中の腫瘍組織を用いた研究の報告は数少ない。本研究により、治療後にHER2タンパクの発現が消失する症例が約4割ほど存在し、IGF-1Rというタンパクが高発現する症例が治療後に増加することが示された。一方で、他の分子標的治療の効果に抵抗性となるKRAS, BRAFの遺伝子変異を有する症例でも、ハーセプチン治療の効果が認められた。また、HER2遺伝子（コピー数）の増幅がある症例では、ハーセプチン治療の効果が得られやすい傾向があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、転移性胃癌に対するハーセプチン治療中における腫瘍細胞のタンパク発現ならびに遺伝子変化を評価した。これらの腫瘍細胞におけるタンパク発現や遺伝子変化は、分子標的治療薬の治療効果を予測するマーカーとなったり、新たな治療標的として新たな治療開発に繋がる重要な知見となる。HER2発現のみならず、HER2以外のタンパク発現や、癌関連遺伝子も、ハーセプチン治療中に変化が認められている。本研究で得られたたんぱく発現や遺伝子変化のプロファイルは、今後、血液を用いたcfDNAによる網羅的遺伝子解析や新たな治療開発に発展させることが可能であり、学術的ならびに社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：Trastuzumab is an active HER2 targeted drug and approved for HER2-positive GC patients. The mechanism of the resistance to trastuzumab is unclear and there were few reports to evaluate the RTKs protein expression and genetic alterations by using tumor tissues during the treatment. Our study indicated that HER2 expression disappeared during the treatment of trastuzumab in 42% of HER2-positive GC patients. In addition, the frequency of patients with high IGF-1R expression statistically increased after treatment. Somatic mutations such as KRAS and BRAF were observed in a part of patients. Although these mutations were reported as the resistance to several molecular target drugs, HER2-positive patients with these mutations achieved response to trastuzumab in our study. HER2 copy number was also evaluated by digital PCR. High copy number of HER2 at pre-treatment was associated with good response of trastuzumab and long duration of the treatment with trastuzumab.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：胃癌 HER2 ハーセプチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の新規薬剤の開発における恩恵にも関わらず、切除不能進行胃癌は依然として予後不良である。抗 HER2 抗体を含む化学療法は HER2 陽性胃癌に有効である一方で、抗体薬の耐性獲得が問題となっている。HER2 陽性乳癌においては、ハーセプチン以外にも、ラパチニブ、ペルツズマブ、T-DM1 といった抗 HER2 治療薬の有用性が認められているが、胃癌においては T-DM1 の有用性は大規模試験では証明されなかった。乳癌と異なり、胃癌は形態学的、分子学的にも不均一である特徴が影響している。

(2) HER2 陽性乳癌では、HER2 細胞外ドメイン (ECD) の脱落、p95 HER2 の発現、PI3K/AKT 経路や MARK 経路の活性化、PTEN 発現低下、Fc R a 遺伝子多型、MET 経路や IGF-1R 経路の活性化などがハーセプチンの治療抵抗性に関与していると報告がされているが、HER2 陽性胃癌で同様の結果になるとは限らない。HER2 陽性進行胃癌におけるハーセプチン治療の大規模なバイオマーカー研究はなく、治療抵抗性に関わる機序に関してはいまだに不明な点が多い。抗 HER2 薬剤の耐性獲得に関連する分子機構を解明し、新たな診療体系を構築することは非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、HER2 陽性切除不能胃癌のハーセプチン治療の前向き臨床試験の治療前後、増悪時の臨床検体を用い、抗 HER2 療法の治療効果、治療抵抗性にメカニズムを解明するためを行う。申請者がこれまで行ってきた消化器癌における抗体治療の予後ならびに抵抗性に関わる遺伝子解析や血清タンパク解析を進展させ、治療開始前の抗 HER2 療法の治療効果予測・予後ならびに治療抵抗性に関わる分子を同定する。具体的には、免疫生化学染色 (IHC)、次世代シーケンス (NGS) を用いて、経時的に腫瘍組織内の主要な受容体チロシンキナーゼ (RTK) の発現ならびに網羅的な遺伝子変化を解析する。これまでの研究成果と本研究の解析結果を統合的に評価し、今後の新たな前向き臨床研究につなげることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) HER2 陽性切除不能進行胃癌に対するハーセプチン治療のバイオマーカー探索前向き臨床試験では、約 20 症例の登録が得られており、研究事務局で臨床情報をすべて管理している。すべての参加施設は各施設の倫理委員会の承認を得ている。ハーセプチンを含む化学療法の治療開始前、治療中、病勢増悪時に原発巣から生検が行われており、腫瘍組織は FFPE ブロックとして保管されている。各施設で保管された FFPE ブロックは、免疫染色ならびに遺伝子解析に使用する未染色スライドとして匿名連結化のもとで、国立がん研究センター中央病院の研究事務局で一旦保管された状態であることから、解析予定である金沢大学ならびに埼玉県立がんセンターに郵送され、本申請者の研究室にて厳重に保管される。研究事務局は、患者背景、治療内容、治療効果、生存期間などの臨床データを各施設から定期的に収集し、臨床情報のアップデートを行う。本研究の解析結果が得るまで治療データの追跡を行い、臨床データをまとめる。

(2) 胃癌のハーセプチン治療における治療前、治療中、病勢増悪時の FFPE ブロックから 3 μm 厚の未染色スライドを作成し、現在治療標的薬が存在する代表的な RTK である EGFR、HER2、HER3、MET、IGF-1R、FGFR などの免疫染色を行う。RTK 発現スコアは、腫瘍組織の 10% 以上を占める最も強い発現強度と定義し、0 (発現なし) ~ 3+ (強発現) で評価を行う。治療前の発現変化と治療後に新たに現れる発現変化を別々に評価し、耐性機序を検討する。金沢大学ならびに埼玉県立がんセンターにおいて FFPE 検体から DNA を抽出し、抽出した DNA の質ならびに濃度を評価する。上記施設にある次世代シーケンサー (MiSeq) を用いて、網羅的な遺伝子変化を解析する。治療前の遺伝子変化と治療後に新たに現れる遺伝子変化を、別々に評価する予定である。測定ならびにデータ解析にあたって、研究協力施設である札幌医科大学フロンティア医学研究所の指導を受ける。遺伝子変異、発現変化をとりまとめる。

(3) RTKs のタンパク発現 (IHC) と NGS による遺伝子情報を統合し、患者ごとの分子プロファイルを作成する。最終的に臨床情報をアップデートし、ハーセプチン治療における奏効ならびに生存期間のデータを解析し、ハーセプチン治療における奏効群と非奏効群、予後良好群と予後不良群における分子プロファイルの違いを検証する。治療開始前の分子プロファイルからは治療効果予測や予後マーカーの検証を行い、治療後、病勢増悪時のプロファイルからは、初期耐性、獲得耐性に関連する分子の同定を行う。

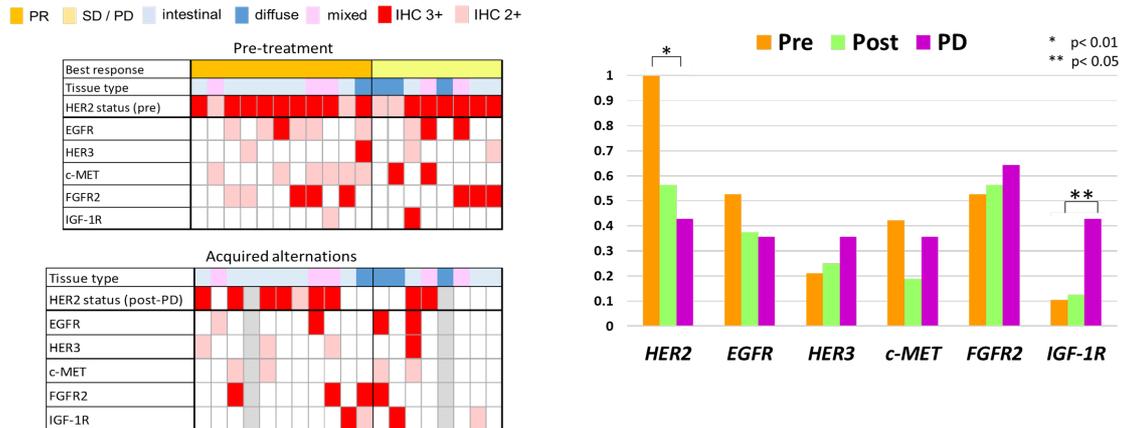
4. 研究成果

切除不能・進行再発胃癌に対するハーセプチンの耐性機序を評価するため、ハーセプチン治療を行う HER2 陽性患者でハーセプチン治療を行う患者を前向きのバイオマーカー試験として登録し、治療開始前、治療初期、治療中止時に腫瘍組織を採取した。最終的に、20 症例の患者が登録され、臨床背景ならびに治療効果を評価した。採取した腫瘍組織から DNA を抽出し、IHC による RTKs のタンパク発現、NGS による網羅的な遺伝子変異・増幅の変化 (Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2)、digital PCR による HER2 増幅の変化を評価した。

(1) 腫瘍組織におけるタンパク発現 (IHC) の変化

本研究では、HER2 以外にも、EGFR、HER3、c-MET、FGFR2、IGF-1R のタンパク発現を免疫染色で評価した (図 1)。治療開始前の腫瘍組織で、HER2 の免疫染色を再度行ったところ、1 症例が HER2 陰性であることが分かり、19 症例を対象に評価を行った。全例が HER2 陽性であり、75% で IHC 3+、25% で IHC 2+/FISH 陽性であった。RTKs の中でも、FGFR2 のタンパク発現の頻度が高い傾向が認められた。少数例の検討ではあるが、治療前の RTKs のタンパク発現とハーセプチン治療効果の関連性は低かった。治療開始後ならびに治療中止時の発現に関しては、HER2 発現は治療中止時には 42% の患者で消失していた。EGFR、HER3、c-MET などは、治療後も高発現 (IHC2+) の症例が 3 割程度あった。FGFR2 高発現の症例が、治療中止時は最も頻度が高く認められた。IGF-1R の発現に関しては、治療前は高発現の症例は少ないが、治療中止時には有意に高発現の症例が増えていた。

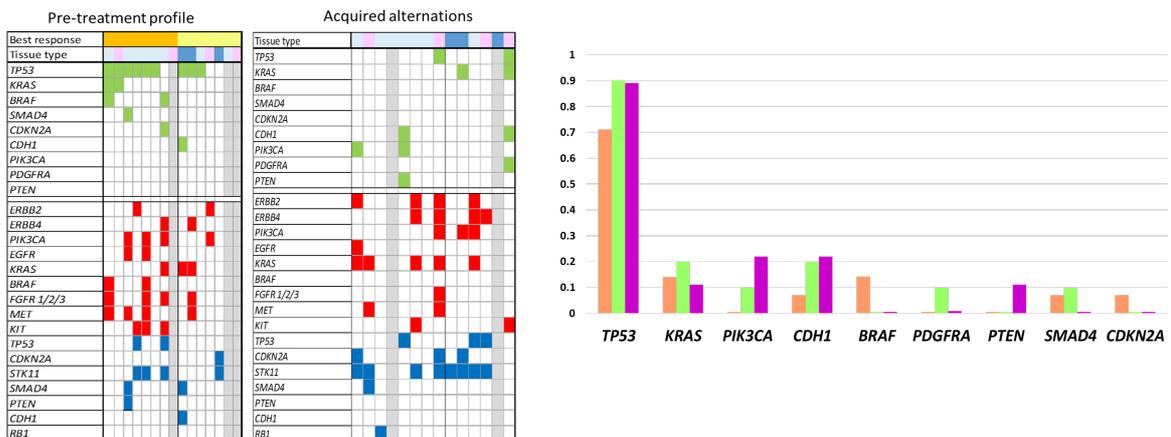
図 1. 腫瘍細胞のタンパク発現 (IHC) の変化



(2) 遺伝子変異の変化

治療開始前から治療中止までの遺伝子変異の変化を図 2 に示す。治療前の遺伝子変化として、TP53 変異の頻度が最も高かった。また、少数例ではあるが KRAS、BRAF、SMAD4、CDKN2A の変異が認められた。これらの遺伝子変異は、ハーセプチン治療に奏効した症例に認められることから、ハーセプチンの初期耐性とは関連が少くないと考えられた。治療中の変化としては、TP53 変異がどのタイミングにおいても最も頻度が高く、その他の遺伝子変異の頻度は低かったが、PIK3CA、PTEN、PDGFRA に関しては、薬剤耐性の機序に関わっている可能性が考えられる。

図 2. 腫瘍組織における遺伝子変化

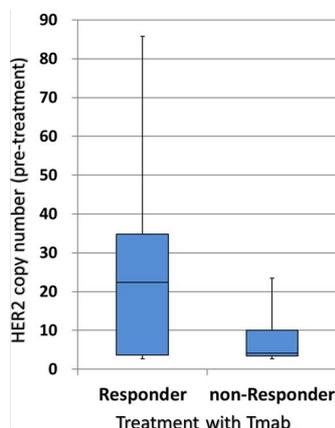


(3) HER2 遺伝子のコピー数の変化

ハーセプチン治療を受けた 15 症例の抽出 DNA を用いて、治療前から治療中止までの HER2 遺伝子のコピー数ならびに治療効果との関連性を評価した (図 3)。腫瘍組織における免疫染色 (IHC) と HER2 遺伝子コピー数の関連性について評価をしたところ、HER2 IHC3+ の症例ではコピー数が高い傾向が認められたが、IHC 2+/DISH+ ではコピー数は低値であった。また、HER2 IHC2+/DISH+ の症例では、ハーセプチン治療後に HER2 IHC 発現が消失する症例が多い傾向が認められた。HER2 コピー数が高い症例は、ハーセプチン治療に奏効する割合が多く、治療成功期間が長い傾向が認められた。

図3. HER2コピー数の変化と治療効果

Case No.	HER2 IHC			HER2 copy number		
	Pre	Post	PD	Pre	Post	PD
1	3+	3+	3+	NE	53.7	14.1
2	2+	1+	0	2.65	2.85	2.12
3	3+	3+		11.8	13.1	
4	3+	2+	0	3.37	2.89	3.86
5	2+	0	0	2.65	2.32	2.85
6	3+	2+		3.45	2.88	
7	2+	0	0	3.6	2.28	2.24
8	3+	3+	3+	23.4	32.4	23.4
9	3+	3+	3+	85.8	38.8	56.1
10	3+	3+	3+	NE	27.1	22.7
11	3+			34.2		
12	3+		3+	35.3		39.6
13	3+	3+		22.4	6.37	
14	3+			4.63		
15	3+	3+	3+	—	—	—
16	2+	1+	0	—	—	—
17	3+	1+	0	—	—	—
18	3+	0	0	—	—	—
19	3+	0	0	—	—	—



(4) 今後の展望

本研究の解析結果から、HER2 のタンパク発現が治療経過中に変化すること、治療開始前の HER2 コピー数が治療効果を予測するのに有用である可能性が示された。また、他の RTK 発現や遺伝子変異のプロファイルが明らかになり、今後は低侵襲である cfDNA を用いた網羅的な遺伝子解析や HER2 コピー数による治療モニタリングなどを用い、HER2 陽性胃癌における個別化治療の発展に繋がられるよう研究を継続していく予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

- (1) Sonohara F, Gao F, Iwata N, Kanda M, Koike M, Takahashi N, Yamada Y, Kodera Y, Wang X, Goel A, Ann Surg, Vol.269, number 5, 2019, pp. 879-886. doi: 10.1097/SLA.0000000000002622.
- (2) Roy R, Kandimalla R, Sonohara F, Koike M, Kodera Y, Takahashi N, Yamada Y, Goel A, A comprehensive methylation signature identifies lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma, Int J Cancer, Vol.144, number 5, 2019, pp.1160-1169. doi: 10.1002/ijc.31755.
- (3) Matsuyama T, Ishikawa T, Takahashi N, Yamada Y, Yasuno M, Kawano T, Uetake H, Goel A, Transcriptomic expression profiling identifies ITGBL1, an epithelial to mesenchymal transition (EMT)-associated gene, is a promising recurrence prediction biomarker in colorectal cancer, Mol Cancer, Vol.18, number 1, 2019, pp.19. doi: 10.1186/s12943-019-0945-y.
- (4) Kandimalla R, Gao F, Matsuyama T, Ishikawa T, Uetake H, Takahashi N, Yamada Y, Becerra C, Kopetz S, Wang X, Goel A, Genome-wide Discovery and Identification of a Novel miRNA Signature for Recurrence Prediction in Stage II and III Colorectal Cancer, Clin Cancer Res, Vol.24, number 16, 2018, pp. 3867-3877. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3236.
- (5) Shigeyasu K, Okugawa Y, Toden S, Miyoshi J, Toiyama Y, Nagasaka T, Takahashi N, Kusunoki M, Takayama T, Yamada Y, Fujiwara T, Chen L, Goel A, AZIN1 RNA editing confers cancer stemness and enhances oncogenic potential in colorectal cancer, JCI Insight, Vol.3, number 12, 2018, pii 99976. doi: 10.1172/jci.insight.99976
- (6) Akiyoshi K, Hamaguchi T, Yoshimura K, Takahashi N, Honma Y, Iwasa S, Takashima A, Kato K, Yamada Y, Onodera H, Takeshita S, Yasui H, Sakai G, Akatsuka S, Ogawa K, Horita Y, Nagai Y, Shimada Y, A Prospective, Multicenter Phase II Study of the Efficacy and Feasibility of 15-minute Panitumumab Infusion Plus Irinotecan for Oxaliplatin- and Irinotecan-refractory, KRAS Wild-type Metastatic Colorectal Cancer (Short Infusion of Panitumumab Trial), Clin Colorectal Cancer, Vol.17, number 1, 2018, pp.e83-e89. doi: 10.1016/j.clcc.2017.10.004.
- (7) Saka H, Kitagawa C, Kogure Y, Takahashi Y, Fujikawa K, Sagawa T, Iwasa S, Takahashi N, Fukao T, Tchinou C, Landers D, Yamada Y, Safety, tolerability and pharmacokinetics of the fibroblast growth factor receptor inhibitor AZD4547 in Japanese patients with advanced solid tumours: a Phase I study, Invest New Drugs, Vol.35, number 4, 2017, pp.451-462. doi: 10.1007/s10637-016-0416-x.

[学会発表](計 2 件)

- (1) Takahashi N, Iwasa S, Sawada T, Sasaki Y, Taniguchi H, Oda I, Honda T, Kojima Y, Hara H, Honma Y, Takashima A, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y. Change in the molecular profile of tumor tissues during treatment with trastuzumab, as analyzed by next-generation sequencing and immunohistochemistry: A multicenter prospective biomarker study on HER2-positive gastric cancer, ESMO, 2018.
- (2) Takahashi N, Iwasa S, Matsushima T, Miyazawa S, Shimizu S, Kumekawa Y, Yoshii T, Asayama M, Hara H, Comparison of HER2 expression by immunohistochemistry and HER2 copy number by digital PCR in tumor tissue during treatment with trastuzumab in the prospective cohort of metastatic HER2-positive gastric cancer patients, ASCO-GI, 2019.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：澤田 武

ローマ字氏名：Takeshi Sawada

研究協力者氏名：佐々木 泰史

ローマ字氏名：Yasushi Sasaki

研究協力者氏名：岩佐 悟

ローマ字氏名：Satoru Iwasa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。