

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31日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790357

研究課題名（和文） 乳癌におけるHER2遺伝子発現の多様性とポリソミー17の関連性の解析

研究課題名（英文） The relationship between the heterogeneity of HER2 gene over-expression and polysomy 17

研究代表者

熊木 伸枝（KUMAKI NOBUE）

東海大学・医学部・講師

研究者番号：90366021

研究成果の概要（和文）：本研究は乳癌の予後因子でありトラスツズマブ治療に関連するHER2(human epidermal growth factor receptor type 2)遺伝子発現の癌における多様性とpolysomy17の関連性についてDISH (Dual color in situ hybridization)法を用いて検討した研究である。1つの癌でも浸潤部と乳管内病変によってHER2遺伝子の状態やCEP17 (centromere 17)コピー数が異なる症例を認める多様性がみられ、これらが癌の間質浸潤に関与している可能性が示唆された。しかし上記のような症例は少なく継続した検討が必要と思われる。また癌によってはpolysomy17がHER2判定結果に影響を及ぼすと推測され、HER2判定方法について今後は治療効果との関連性をふまえて検討するべきであると考え。

研究成果の概要（英文）：HER2 gene over-expression greatly affects breast cancer prognosis and the trastuzumab treatment. The aim of this study was to clarify the relationship between the heterogeneity of HER2 gene over-expression and polysomy 17 using DISH (Dual color in situ hybridization) method. In some cases, HER2 gene expression status and centromere 17 copy number differed between invasive part and intraductal part of breast cancer. This result suggests the possibility that the difference involves in stromal invasion of cancer cells. It is thought that polysomy 17 occasionally influences HER2 status assessment, therefore the selecting the method by which HER2 status is evaluated needs to be done in light of any relationships among these factors and therapeutic effects of trastuzumab.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：泌尿生殖器・内分泌、乳癌、HER2遺伝子、ポリソミー17

1. 研究開始当初の背景

乳癌の薬物治療のひとつに抗HER2(human

epidermal growth factor receptor type 2)モノクローナル抗体であるトラスツズマブ

に代表される抗体療法がある。この治療は病理組織学的検査にて HER2 蛋白過剰発現または HER2 遺伝子増幅がみられる症例 (HER2 陽性乳癌) に適応とされる。HER2 遺伝子増幅の検査法として FISH (fluorescent in situ hybridization) 法がある。FISH 法では、蛍光標識した DNA プローベを用いて腫瘍細胞において HER2 遺伝子が存在する第 17 番染色体のセントロメア (CEP17) のシグナルと HER2 遺伝子のシグナルを数え、各々のシグナルの総数比率 (HER2/CEP17) から HER2 遺伝子増幅の有無を判定する。通常 1 つの細胞に CEP17 は 2 つ存在するが、癌細胞では 3 つ以上 (polysomy) または 1 つ (monosomy) という場合がある。従って、FISH 法では CEP17 を基準にして HER2 遺伝子増幅が判定されるため polysomy17 は HER2/CEP17 の値に大きく関与し FISH 法における判定保留の原因のひとつとされている。

HER2 遺伝子増幅と polysomy17 の関連についての研究では、組織学的悪性度が高い症例群や HER2 遺伝子増幅がある群ではそうでない群に比べて有意に polysomy17 の頻度が高かった (熊木, 等. 第 17 回日本乳癌学会総会, 2009)。このことから、HER2 遺伝子増幅の機序は明らかではないが、背景に polysomy17 が存在することが遺伝子増幅の一因である可能性が考えられ、polysomy17 は HER2 遺伝子と関連性があると考えられている。

また、HER2 陽性乳癌であってもトラスツブマブの治療効果が低い症例については、個々の癌細胞レベルでの HER2 遺伝子増幅の違いが影響しているのではないかと推測されている。日常の病理組織診断においても、免疫組織化学染色上でひとつの乳癌の中でも癌細胞によって HER2 蛋白について発現に差があり、蛋白レベルでは形質が異なる多様性があることが実際に観察される。HER2 遺伝子レベルでの多様性がどのような機序で発生するかは明らかではないが、HER2 遺伝子のみの増加、polysomy17 のうえに HER2 遺伝子の増加が起こる等の仮設が考えられ、polysomy17 は乳癌細胞における HER2 遺伝子発現の多様性に結びつく原因のひとつであると推測するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、DISH (Dual color in situ hybridization) 法を用いて乳癌における HER2 遺伝子と polysomy17 との関連性を解明することを目的とした。

本研究で用いる DISH 法は DNA プローベが光学顕微鏡下にて可視化された色素による標識であるため、偏光フィルターを用いない通常の観察が可能な方法である。よって細胞形態や組織構築などの所見をふまつつ HER2 遺伝子と CEP17 を確認できる点をひとつ

の特色とする。

3. 研究の方法

(1) 対象および症例の選定

対象は当施設の付属病院で手術又は生検により摘出された原発性乳癌とする。摘出された腫瘍組織から標本を作製して診断するまでは、付属病院内で日常業務として行っており、その蓄積された標本の中から選定する。

(2) 標本作製

手術にて摘出された乳腺組織は 10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、パラフィン包埋ブロックを作製する。固定時間は 48 時間以内とする。乳腺部分切除症例では乳腺部分はほぼ全割する。乳房切除例に関しては、腫瘍中心部から辺縁部を含むように標本を作製する。パラフィン標本を薄切し、HE

(3) 免疫組織化学的手法を用いたホルモンレセプター (ER, PgR)、HER2 の発現検討

① ER, PgR および HER2 の免疫組織化学染色 (IHC; immunohistochemistry)

選出したパラフィンブロックから 4 micro millimeter の標本を薄切し、ER (estrogen receptor)、PgR (progesterone receptor)、HER2 の免疫組織化学染色を行う。ER と PgR については自動染色装置 Bechmark (Roche Diagnostics) を用い (ER: clone 6F11, PgR: clone 16)、HER2 については HercepTest (DAKO) を用いる。

② 免疫組織化学染色の判定

ER および PgR は Allred score、HER2 は ASCO/CAP ガイドライン (Wolff AC, et. al. Arch Pathol Lab Med. 131; 18-34, 2007) を基準に判定する。ER, PgR, HER2 の染色は通常の診断に用いている方法で、すでに確立されているものである。

(4) DISH 法による染色

選出した切片においてペンタナインフォーム Dual ISH HER2 キット (Roche Diagnostics) を用いて自動染色装置 Bechmark (Roche Diagnostics) を使用し DISH 法にて染色を行う。DISH 法とは、HER2 DNA と CEP17 各々に蛍光標識プローベを hybridization した上に、そのプローベに対しての抗体を反応させその抗体を色素で可視化する方法である。抗原抗体反応を用いるため HER2 と CEP17 という異なるプローベ各々に特異的に反応し 2 つを別々に可視化できる。

(5) HER2 遺伝子増幅判定と polysomy17 の観察

① HER2 遺伝子の増幅の判定

研究目的の項でも述べたとおり、癌細胞において HER2 遺伝子が存在する第 17 番染色体のセントロメア (CEP17) のシグナルと HER2 DNA のシグナルを数え、各々のシグナル総数

の比率(HER2/CEP17)によって増幅を判定する。(4)に示したキットのプロトコルに従って20個の癌細胞についてカウントする。この比率が2.0以上であるものをHER2遺伝子増幅あり、2.0未満のものを増幅なしと判定する。ただし2.2-1.8である場合は不明確(equivocal)としてさらに20個の腫瘍細胞を計測して合計40個の腫瘍細胞によって判定する。

② polysomy17 の定義

Polysomy17 は(4)で染色したものについて、CEP17の数を判定する。1つの癌細胞についてCEP17を3つ以上もつ細胞がDISH法でカウントした癌細胞のうち30%以上を占める症例をpolysomy17とする。また1つの癌細胞についてCEP17が1つ以下である細胞が60%以上を占める症例をmonosomy17とする。そしてpolysomyにもmonosomyにも当てはまらない症例をdisomyとする(Perez EA, et al., Mayo Clin Proc77: 148-154, 2002)。

(6) 組織形態と DISH 法の結果の検討

HER2 遺伝子の増幅と polysomy17 の有無について検討を行う。また組織学的な所見と免疫組織化学染色結果も加えて考察する。

4. 研究成果

(1) 研究結果

① 対象は原発性乳癌 54 例。全症例が女性で、平均年齢 54.6 歳(79-27 歳)、腫瘍の平均の浸潤径は 25.5 mm。リンパ節転移ありの症例は 18/53 例(1 例は不明)。組織型の内訳、組織学的悪性度、免疫組織化学染色における HER2 発現、HER2 遺伝子増幅、polysomy17 の結果は表 1 に示した。

表1. 原発性乳癌における病理組織学的特徴・HER2判定結果およびCEP17コピー数

組織型	浸潤性乳管癌 乳頭腺管癌: 28 硬癌: 18 充実腺管癌: 8 粘液癌: 2
組織学的悪性度	Grade I: 14 II: 22 III: 18
HER2発現(IHC)	3+: 17 2+: 13 1+/ 0: 24
HER2遺伝子増幅(DISH)	(+): 22 (-): 32
CEP17コピー数	polysomy: 17 (31%) disomy: 32 (60%) monosomy: 5 (9%)

② 癌浸潤部での polysomy の出現は、HER2 増幅(+)群では 8/22(36%)、HER2 遺伝子増幅(-)群では 9/32(28%)にみられたが両群間で出現に有意な差はみられなかった。しかし免

疫組織化学染色での HER2 発現様式と polysomy については、HER2: 2+では polysomy が多く認められる一方で HER2: 0/ 1+群および HER2: 3+群では少なかった(p<0.05)(図 1)。また DISH 法において、初回の判定が equivocal の症例が 3 例あったがいずれも polysomy であった。

癌浸潤部で HER2 遺伝子増幅(+)の 22 症例のうち、polysomy である症例は HER2 遺伝子増幅が low-grade amplification ($2.0 \leq \text{HER2/CEP17} < 4.0$) と high-grade amplification ($4.0 \leq \text{HER2/CEP17}$) の症例が混在していたが、disomy, monosomy 症例は high-grade amplification のみであった(図 2)。

③ 22 症例のうち 3 例は乳管内病変部で HER2 遺伝子増幅(-)でありこの 3 症例はすべて polysomy であった。また浸潤部と乳管内病変部での CEP17 コピー数が異なる症例は 6 症例みられた。

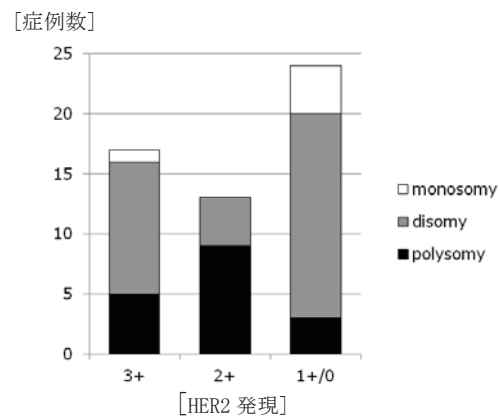


図 1. HER2 発現の程度と polysomy17 の頻度

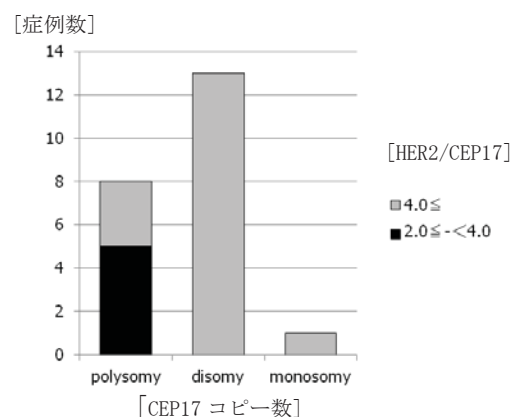


図 2. polysomy17 と HER2 遺伝子増幅の程度

(2) 考察

① polysomy17 は免疫組織化学染色にて 2+ や DISH 法にて equivocal といった HER2 判定

保留となる症例に多くみられた。また HER2 遺伝子増幅(+)群の中でも、polysomy17 の症例には low-grade amplification の症例が含まれていた。これらの結果より、現在一般的に使用されている HER2 遺伝子増幅の判定基準に CEP17 の値が含まれているため、HER2 遺伝子が増幅はしているがその程度によっては判定の際に polysomy17 の影響を受けやすいと推測される。

② 今回の検討では HER2 遺伝子増幅の有無と polysomy 17 の出現に相関性は認められなかった。しかし1つの腫瘍の癌浸潤部と乳管内病変部とで HER2 増幅や CEP17 のコピー数が異なる症例が観察された。この結果より、HER2 遺伝子増幅または CEP17 の増減が乳管外へ浸潤する時点で起こった、あるいは、当初より1つの腫瘍の中に2種類以上の腫瘍細胞群が存在しその中の1種類の腫瘍細胞が浸潤した、という仮説が考えられる。HER2 遺伝子発現の多様性と polysomy 17 との直接的な関連性は明らかになっていないが、浸潤部と乳管内病変部での HER2、CEP17 の発現様式の相違があることは、これらが癌の間質浸潤に関与している可能性が示唆される。

(3)今後の展望

本研究結果から症例によっては CEP17 のコピー数が HER2 判定にある程度の影響を及ぼすと推測された。近年 HER2 判定については、HER2 遺伝子の増幅数のみを判定に用いるべきとの報告もなされている。判定方法を検討する際には、HER2 判定結果が治療選択に結びつく点を考慮にいれ、今後は治療効果との関連性をふまえて検討するべきであると考え

る。
また腫瘍の部位によって HER2 遺伝子の状態や CEP17 コピー数が異なる症例がみられ、腫瘍の多様性がみられた。しかし、上記のような症例が少なく、詳細な検討が行えなかった。そこで、多様性という観点からは癌の原発巣と転移巣において HER2 発現などの異なる症例も含まれると考え、転移性の症例も加えることで症例を増やして検討を継続していくべきと思われる。また原発巣と転移巣の比較では、浸潤・転移との関与についてもあわせて考察が行えると考える。

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)

[学会発表] (計2件)

①熊木伸枝、宮澤麻里子、岡松千都子、徳田裕、中村直哉、乳癌における DISH 法を用いた HER2 遺伝子増幅と polysomy 17 の関連性の病理組織学検討、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 27 日、京王プラザホテル(東京都)

②熊木伸枝、増田しのぶ、唐小燕、齋藤雄紀、鈴木育宏、徳田裕、Dual ISH 法を用いた HER2 遺伝子増幅と polysomy17 の関連についての検討、第 19 回日本乳癌学会学術総会、2011 年 9 月 3 日、仙台国際センター(仙台市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

熊木 伸枝 (KUMAKI NOBUE)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：90366021