

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2013～2016

課題番号：25430136

研究課題名（和文）分子標的薬の治療提案を目指した進行大腸癌に対する病理評価の試み

研究課題名（英文）Pathological evaluation for advanced colorectal cancer aiming at treatment proposal for molecular targeted drugs

研究代表者

廣瀬 善信（Hirose, Yoshinobu）

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：20293574

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000円

研究成果の概要（和文）：進行大腸癌を対象として、EGFR、HER3の免疫染色を臨床病理学的に比較検討したところ、腫瘍先進部簇出におけるHER3の発現パターンがEGFRと逆になる傾向がみられた。免疫染色の病理評価においては、腫瘍内不均一性に十分な配慮をする必要があり、単なる陽性陰性といった評価のみでは、腫瘍の持つ生物学的特徴ひいては薬剤有効性を正確に反映しない可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Comparative studies of immunostaining of EGFR and HER3 in advanced colorectal cancer showed that the expression pattern of HER3 at the invasive margin tended to be opposite to that of EGFR. Pathological assessment of immunostaining requires careful consideration of the heterogeneity within the tumor, otherwise it may not accurately reflect the biological properties of tumors and hence the therapeutic effect.

研究分野：病理学

キーワード：大腸癌 分子標的薬 病理評価 EGFR HER3 腫瘍内不均一性

1. 研究開始当初の背景

癌に対する分子標的薬の開発・臨床応用が増え続けており、化学療法百花齊放の時代になりつつある。この時代には、当然ながら分子標的薬の適正な使用が求められる。たとえば進行大腸癌においては、(術後補助あるいは全身)化学療法としてEGFRを分子標的とするチロシンキナーゼ阻害薬(以下、TKIと略)の適応範囲・可能性が広がっている。現状でのこのTKIの適応は、EGFR発現が陽性でKRAS遺伝子が野生型の症例に限って認められている。このような薬剤適応をevidence-basedでコントロールする考え方は、医療費膨張が社会問題化しつつある昨今においては、医療経済の面からも非常に重要になる。

ここで注目したいのは、EGFR陽性・KRAS遺伝子野生型の大腸癌であっても、その約半数でTKIは無効なことである。それらの因子のみでは、TKIの適応評価が不十分なことが示されていると言ってよい。TKIの治療効果を規定する新たな因子として、最近ではKRASのシグナル経路の下流に位置するBRAFが注目されている。BRAF遺伝子変異例では、TKIが無効であるとのコンセンサスが得られつつある。またごく最近、HER2の過剰発現がTKI無効例に有意に多いことが示され、HER2がTKIを無効にする候補因子であると示唆されている。これらの新知見から、TKIの効果規定因子としてBRAFやHER2を臨床応用に加えるべく研究を重ねることは、時代の要請と言ってもいい。さらに見逃せないことは、これらの分子異常は既に悪性黒色腫や乳癌などで治療ターゲットとして臨床応用されていることである。すなわち、これらに対する分子標的薬が一部の癌に奏功する可能性を示しており、この考え方の延長線上には「個別化治療提案」、つまり分子標的薬の適応を病理評価から新たに提案することができるかもしれない。

進行大腸癌の「治療提案型病理評価」を目指す場合、最終的に倫理問題をクリアしなければならないことは当然として、準備段階として以下のようないくつかの課題を克服しなければならないだろう。

(1)分子標的の抗腫瘍作用における位置・関係が分かっていること

(2)臨床応用可能な簡便性・経済性・信頼性を併せ持つ生物学的指標が確立されること

(3)分子標的薬の適用を裏付ける理論上の科学的根拠が十分に得られていること

このような課題を一つひとつ精査し、増え続ける分子標的薬の効果予測の重要性、治療提案の可能性を追求していくため、本研究は計画された。

2. 研究の目的

進行大腸癌に対する分子標的薬の治療適応を厳に判別するため、さらには分子標的薬の新たな「個別化治療提案」が出来る可能性を模索するために、以下の二点を明らかにする。

(1)TKIの効果予測マーカーとして、BRAF遺伝子変異の評価法を確立する。

(2)BRAFに加えてHER2あるいはEGFR過剰発現の因子も評価検討する。

これらにより、まずは症例における各因子の相互関係性(mutually exclusiveの有無など)を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

手術的に切除された進行大腸癌(pT3-4)109例を対象として、その切除標本材料をベースとした病理学的検索を行った。

(1)BRAF遺伝子変異の同定法確立：大腸癌組織における免疫染色は、新規抗体である抗BRAF抗体(Clone VE1, Spring Biosciences)および市販のキット(ABC kit, Vectastain)を用いて行った。同時に、染色を行った同一パラフィンブロックからの連続切片(10μm厚)を脱パラ後、Proteinase Kを用いてDNAを抽出した。抽出DNAをもとにPCR増幅を行ない、シーケンス解析にてBRAF遺伝子変異の有無を検討した。

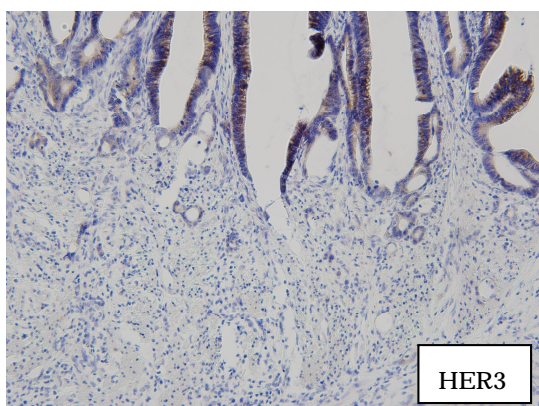
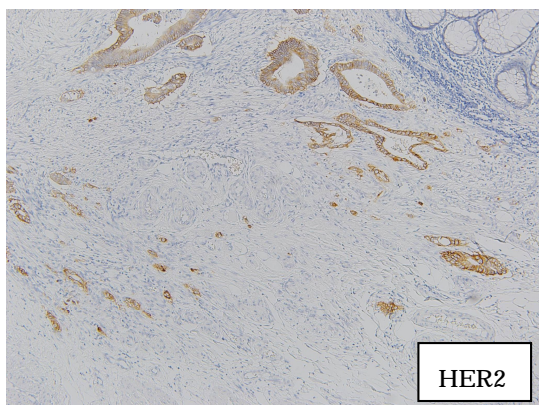
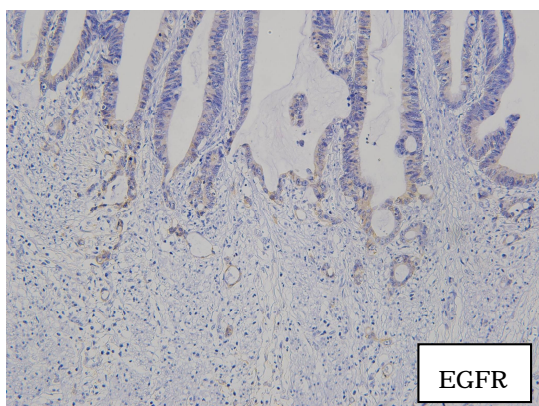
(2)HER family遺伝子の発現の検討：EGFR、HER2の免疫染色は、市販のキット(EGFR PharmDx & HercepTest II, Dako)に従って施行した。HER3の免疫染色については、抗HER3抗体(clone DAK-H3-IC, Dako)および市販のキット(ABC kit, Vectastain)を用いて行った。染色結果は、原則としてHercepTestに準じて評価したが、EGFRおよびHER3では以下のように若干修整して用いた(膜および細胞質の染色所見は区別せず、全く染まらないあるいは10%以下の弱陽性のみ、0;弱陽性が10%以上、1+;中等度陽性が10%以上、2+;強陽性が10%以上、3+)、いずれも2+以上を陽性とした。

4. 研究成果

BRAFの免疫染色の条件設定のため、まずは陽性コントロールとして甲状腺乳頭癌症例を検討した。その結果、乳頭癌において陽性が確認され、染色条件としては概ね確立できた。次に、BRAF遺伝子変異を検索するため、パラフィン切片からの抽出DNAをPCR増幅し、直接シーケンス法にて検討した結果、5%(5/109例)にBRAFの変異を確認した。それらの遺伝子変異症例5例について、抗BRAF(V600E)抗体を用いた免疫染色による検討

を行った結果、その5例いずれも弱陽性の染色結果（強陽性例なし）にとどまった。既報をみると、遺伝子変異陽性例における本抗体（clone VE1）を用いた染色性は、特異度・感度ともに非常に高いとするものが多い一方で、本結果のごとく特異度・感度ともにやや低いものも少数散見される。Ventana社製の染色機器を利用する施設では、染色結果が良好な傾向があるため、本抗体を用いた病理評価においては、利用機器を含む染色条件の影響が少なくない問題点が挙げられた。

次にEGFRの免疫染色を検討したところ、109例中14例の腫瘍において陽性（14%）であった。腫瘍内における染色性を比較検討したところ、腫瘍中央に比べて腫瘍先端部で染色強度が増加する傾向にあり、いくつかの既報による結果と合致した。特に、腫瘍先端部の簇出における染色性増大が目立った。同様にHER2について検討したところ、109例中4例で陽性（4%）であった。HER2の腫瘍内に



おける染色性については、腫瘍中央と腫瘍先端部での染色性の強度差は目立たなかった。最後にHER3についても同様に検討したところ、109例中44例において陽性（40%）と評価した。HER3の腫瘍内における染色性であるが、腫瘍中央に比べて腫瘍辺縁での染色性が低下する傾向があった。また、HER3陽性率と腫瘍分化度に有意差があり、HER3陽性腫瘍には高分化が多い傾向がみられた。

以上から、免疫染色の病理評価による治療提案の将来的応用に際しては、腫瘍内不均一性（intratumoral heterogeneity）に十分な考慮をする必要があることが示唆された。病理評価に際しては、単なる陽性陰性といった評価のみでは、腫瘍の持つ生物学的特徴ひいては薬剤有効性を正確に反映しない可能性があり、引き続き精査すべき重要な検討課題と考えられる。

また、腫瘍先端部簇出におけるHER3の発現パターンがEGFRと逆になる傾向は、in vivoでそれらが二量体を形成すると報告されていることから、機能的メカニズムを考えるうえで興味深い結果と考えられた。

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 3 件)

(1) 栗栖義賢, 辻求, 廣瀬善信. 分子標的治療と病理. 大阪医科大学雑誌. 74:94-99, 2015. 査読なし.

(2) T Nishida, Y Egashira, H Akutagawa, M Fujii, K Uchiyama, Y Shibayama, Y Hirose. Predictors of lymph node metastasis in T1 colorectal carcinoma: an immunophenotypic analysis of 265 patients. Dis Colon Rectum 57:905-15, 2014.

Doi:10.1097/DCR.000000000000168. 査読有り.

(3) 野中健一, 浅井竜一, 安福至, 富田弘之, 松橋延壽, 廣瀬善信, 高橋孝夫, 山口和也, 長田真二, 吉田和弘. 広範な漿膜下リンパ管侵襲を呈し追加切除を要した小型0-IIc型上行結腸癌の1例. 日本消化器外科学会雑誌. 46 : 777-83, 2013. Doi: org/10.5833/jjgs.2012.0271, 査読有り.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 安田恵美, 水野裕太, 服部公亮, 里見英俊, 芥川寛, 竹下篤, 栗栖義賢, 桑原宏子, 江頭由太郎, 廣瀬善信: Paget病様進展を伴う色素性肛門腺由来腺癌の1例. 第104回日本病理学会総会, 2015年4月30日-5月2日: 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市).

(2)里見英俊,服部公亮,芥川寛,平田公一,竹下篤,栗栖義賢,安田恵美,桑原宏子,山田隆司,江頭由太郎,廣瀬善信:大腸 medullary carcinoma の1例.第60回日本病理学会秋期特別総会,2014年11月20日-21日:国立劇場おきなわ(沖縄県・浦添市).

(3)明石静香,芥川寛,江頭由太郎,桑原宏子,栗栖義賢,棚田諭,石崎幸恵,竹下篤,安田恵美,武田玲郁,浦上真由美,吉川純子,出口千尋,辻求,廣瀬善信:腹膜偽粘液腫をきたしたS上結腸粘液癌の一例.第53回日本臨床細胞学会秋期大会,2014年11月8日-9日:海峡メッセ下関(山口県・下関市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣瀬 善信 (HIROSE, Yoshinobu)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号:20293574