

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 5 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860979

研究課題名(和文)皮膚がんにおけるテーラーメイド分子標的医療の開発

研究課題名(英文)Development of molecular targeted therapy for patients with skin cancer

研究代表者

田中 亮多(Tanaka, Ryota)

国立研究開発法人国立がん研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：90649667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ節転移を有した乳房外パジェット病の転移巣におけるHER2の陽性率を解析した結果、26例中10例(38%)でHER2蛋白が過剰発現していた。更にこれら10例のHER2遺伝子増幅をDISH法も用いて検索し、HER2対応する原発腫瘍とのHER2陽性および陰性の一致率を解析した結果、一致率は92%と良好であった。以上により、転移巣への切除や生検が不可能な場合にも、原発巣のHER2ステータスを確認すれば、分子標的治療が有効かどうか判断できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The study assessed the concordance of HER2 protein and gene status between primary and metastatic sites of extramammary Paget disease and evaluate whether they are suitable as target. Twenty-six metastatic sites of primary EMPD underwent evaluation. HER2 protein overexpression and gene amplification were detected in 38% and 19%, respectively. In 24 out of 26 cases (92%), there were no changes in HER2 status between the primary tumors and the corresponding lymph node metastasis (kappa coefficient 0.75). HER2 status was of good overall concordance between primary tumors and corresponding metastatic sites, suggesting there should be adaptation for HER2 targeted therapy in patients with HER2 positive EMPD.

研究分野：内科系臨床医学

キーワード：乳房外パジェット病 分子標的治療 HER2 皮膚悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

進行期の皮膚がんに対する薬物療法の治療成績は悪く、特に進行期の non-melanoma skin cancer には標準治療が存在しない。高齢化に伴い皮膚がんの患者数はこれまでにない程に増加している。テーラーメイド分子標的治療を開発することは、特に進行期の皮膚がん患者の治療に大きく貢献する。皮膚がんでは、主に乳房外 Paget 病での HER2 蛋白過剰発現報告例が多かった。当施設では、既知の最大症例報告数 47 例を大きく上回る 104 例の乳房外 Paget 病について、HER2 の免疫染色と遺伝子増幅検査に自動化装置とキットを用い、手技によるエラーを最小化した。また、効果判定は ASCO/CAP ガイドラインに基づき行うことで、判定基準を統一した。その結果、約 17% で HER2 蛋白過剰発現を認め、なかでも HER2 3+ 症例は全例で HER2 遺伝子増幅を有しており、乳がんや胃がんと同様に HER2 分子標的治療が効果的である可能性が示唆された。また、HER2 陽性の傾向は深くまで浸潤した症例やリンパ節転移を有する症例に有意に多くみられ、HER2 分子標的治療がより進化した症例にこそ効果的に適応できる可能性がある (Tanaka R et al. 2013)。

また、これまでの後方視的な解析報告によりリンパ節転移を特に複数個有する乳房外 Paget 病は予後不良であることが、知られている。

2. 研究の目的

Non-melanoma skin cancer に対するテーラーメイド分子標的医療の開発を目的とした。中でも HER2 を標的とした治療法の開発に着目した。

3. 研究の方法

本研究では HER2 発現を中心として、皮膚がんの摘出標本を用い皮膚がんにおける HER2 蛋白過剰発現と遺伝子増幅についての後方的探索を行う。

研究には当該施設で過去に手術ないし生検により摘出されたホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いる。免疫組織化学染色で HER2 蛋白過剰発現を評価し、*in situ* hybridization により *HER2* 遺伝子増幅を評価する。原発巣に加え転移巣でも同様に評価を行うことで、HER2 発現の一致率についても考察する。そして、本研究の結果をもとに HER2 陽性皮膚がんへの分子標的治療を目的とした医師主導臨床試験を計画する。

1) 当施設で保管する皮膚がん患者のパラフィンブロックを用い免疫組織化学染色を行う。

- ① 従来の組織形態学的分類に基づき Tissue micro Array (TMA) を作成する
- ② パラフィンブロックより 4 μ m 切片の未染標本を作成する

- ③ 免疫組織化学染色には自動化装置と HercepTest (K5205; Dako) を用いる
- ④ 評価は最新の ASCO/CAP ガイドラインに基づき行う。判定の困難な標本は個別に染色する。(パラフィンブロックより 4 μ m 切片の未染標本を作成する)。

2) HER2 蛋白過剰発現例と一部の発現していない症例に *in situ* hybridization を行う。判定方法は以下の通りを行う。

判定方法を適切に指導された少なくとも 2 人が判定を行う。免疫組織化学染色の結果は伏せて行う。

1 標本あたり、40 個 (20 個/人) のがん細胞につき HER2 遺伝子と CEN17 をそれぞれ数える。合計し HER2/CEN17 の比が 2.2 より大きい場合を遺伝子増幅あり、1.8 より小さい場合を遺伝子増幅なしと判定する。比が 1.8 以上または 2.2 以下場合には、再度 40 個のがん細胞につき同様に集計し、最終的なカットオフ値は 2.0 とする。即ち、2.0 以上は遺伝子増幅あり、2.0 より小さい場合には遺伝子増幅なし、と判定する (ASCO/CAP ガイドライン)。

fluorescence *in situ* hybridization (FISH) と dual-color *in situ* hybridization (DISH) それぞれの利点や改善点を明らかにすることが可能となる。

HER2 遺伝子発現の有無についての評価時には、免疫組織化学染色の結果は伏せて行う。

3) 更に加えて HER2 と関連が深い HER ファミリー (EGFR、HER3、HER4) についても複合的に後方的探索研究を行う。

4. 研究成果

(1) Tissue micro Array と免疫組織化学染色をも用いた網羅的な HER Family 蛋白過剰発現の解析。

従来の組織形態学的分類に基づき TMA を作成し、non-melanoma skin cancer の HER2 蛋白の過剰発現につき免疫組織化学染色を用いて網羅的に探索した。(図 1)

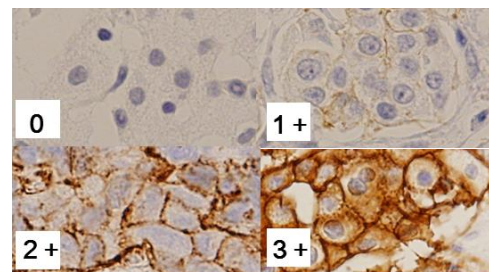


図 1 自動化装置と HercepTest (K5205; Dako) を用いた HER2 蛋白過剰発現の評価

ASCO/CAP ガイドラインに基づき 0 から 3+ までの 4 段階でスコア化した。

また、HER Family (EGFR、HER3、HER4) についても同様に免疫組織化学染色を用いて網羅的に探索した。その結果、HER2 との関連

や標的となる特徴は見出せなかった。

(2) リンパ節転移巣での HER2 発現についての解析

乳房外 Paget 病の HER2 発現に着目して *in situ hybridization* により、HER2 遺伝子増幅につき更なる探索を行った(図 2)。

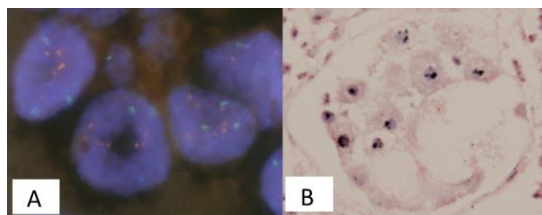


図 2 *in situ hybridization* による HER2 遺伝子増幅像
A FISH、HER2 遺伝子はオレンジ、CEN17 は緑で標識
B DISH HER2 遺伝子は黒、CEN17 は赤で標識

原発標本に加え転移標本で、原発巣と転移巣での HER2 発現率の関係を明らかにすることで、特に進行した乳房外 Paget 病での HER2 発現の状態を知ることができると判断し、対象は治療標的となり得る予後不良とされるリンパ節転移を有する症例 (n=26) とした。

遺伝子増幅を認めた症例を陽性としたときの原発層とリンパ節転移での HER2 ステータスの一致率は 92% (24/26 例) (κ coefficient 0.75) と良好であった。

しかしながら、原発層での HER2 陽性 5 例中 1 例がリンパ節転移で HER2 陰性、陰性例 21 例中 1 例が陽性リンパ節転移で HER2 陽性と Heterogeneity を示す症例が少数ながら見られた。(表 1)

		リンパ節転移		Total
		陽性	陰性	
原発巣	陽性	4	1	5
	陰性	1	20	21
Total		5	21	26

表 1 乳房外 Paget 病での原発層とリンパ節転移での HER2 ステータスの対比

本研究は HER2 の検査および評価を標準化して行った。更にこれまでに検討されていなかった乳房外 Paget 病転移症例 26 例を用いて初めて HER2 蛋白の過剰発現と遺伝子増幅検査を原発巣と転移巣で評価した研究となった(論文投稿中)。*in situ hybridization* 法として、DISH 法は FISH 法と同様に評価できる可能性が示唆されたが、本研究の対象症例が 26 例であり、免疫組織化学染色 (IHC 法) の結果が 2+ であった場合に DISH 法を標準的に用いるためには更なる症例集積が必要である。

本研究の成果により、乳房外 Paget 病でも乳がんと同様に図 3 のような治療アルゴリズムを適用できることが示唆された。

抗HER2抗体治療アルゴリズム

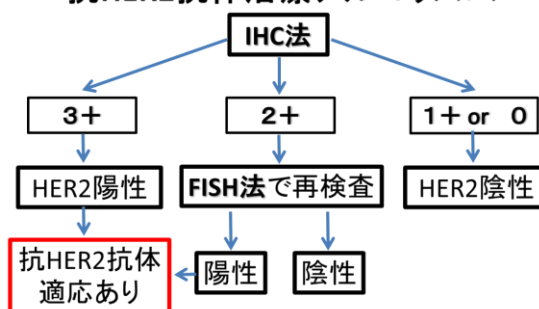


図 3 抗 HER2 抗体治療アルゴリズム

今後は他施設での共同研究を行い、特に進行期乳房外 Paget 病での HER2 発現の解析を本研究と同様の手法を用いて行い、抗 HER2 抗体治療アルゴリズムの検証を行う。医師主導臨床試験を行う場合には、本研究の結果が重要な基礎データとなり、アルゴリズムが患者選択基準に採用されることが期待できる。

また、分子標的治療を開発するにあたり、前臨床試験が不可欠と考え、細胞株の樹立を目指したが、HER2 陽性乳房外 Paget 病の細胞株は樹立できず、今後の課題となった。

〔引用文献〕

(1) Tanaka R, Sasajima Y, Tsuda H, Namikawa K, Tsutsumida A, Otsuka F, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 protein overexpression and gene amplification in extramammary Paget disease. The British journal of dermatology. 2013;168(6):1259-66.

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 1 件)

1. Concordance of the HER2 protein and gene status between primary and corresponding lymph node metastatic sites of extramammary Paget disease Ryota Tanaka, Yuko Sasajima, Hitoshi Tsuda, Kenjiro Namikawa, Akira Takahashi, Arata Tsutsumida, Yasuhiro Fujisawa, Manabu Fujimoto, Naoya Yamazaki
Clin Exp Metastasis
Published online: 11 June 2016
DOI 10.1007/s10585-016-9804-z

[学会発表] (計1件)

1. 田中, 亮多、笹島, ゆう子、津田, 均、並川, 健二郎、堤田, 新、山崎, 直也、乳房外 Paget 病における HER2 発現と分子標的治療の可能性、第 112 回日本皮膚科学会 総会、2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 亮多 (TANAKA Ryota)
国立がん研究センター中央病院
皮膚腫瘍科 任意研修医
研究者番号：90649667

(2) 研究協力者

小俣 渡 (OMATA Wataru)
国立がん研究センター中央病院
皮膚腫瘍科 がん専門修練医

(3) 研究協力者

大芦 孝平 (OASHI Kohei)
国立がん研究センター中央病院
皮膚腫瘍科 任意研修医
研究者番号：00640343

(4) 研究協力者

蔦 幸治 (TSUTA Koji)
関西医科大学 病態検査学講座 教授
研究者番号：00392332

(5) 研究協力者

津田 均 (TSUDA Hitoshi)
防衛医科大学校 病理病態学 教授
研究者番号：70217321

(6) 研究協力者

山崎 直也 (YAMAZAKI Naoya)
国立がん研究センター中央病院
皮膚腫瘍科 科長
研究者番号：00582586