

## 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 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590310

研究課題名（和文）分子標的療法の導入を視野に入れた胃癌における HER2 異常の包括的検討

研究課題名（英文）A comprehensive study of HER2 aberration of gastric cancers in viewing as the target of molecular therapy

研究代表者

大井 章史（001 AKISHI）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50160411

研究成果の概要（和文）：免疫組織化学と fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を使って 475 例の胃癌を検索した結果、51 例に *HER2* 遺伝子増幅を持った癌細胞を認め、21 例(42%) でその増幅は不均一であった。Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 及び FISH では、*HER2* と *MYC* の同一腫瘍細胞内での増幅が 8 例に、同じく *MYC* と *FGFR2* または *EGFR* の同時増幅がそれぞれ 1 例にみられた。一方、*HER2* と *EGFR*、*HER2/FGFR2*、*HER2/MET/FGFR2* の同一腫瘍内で異なる細胞上での増幅がそれぞれ 7 例、1 例、1 例にみられた。この結果は、胃癌に対する、個別化分子標的療法を行う上で重要であると結論された。

研究成果の概要（英文）：By combined analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization (FISH) on 475 formalin-fixed paraffin-embedded tissue, 51 gastric adenocarcinoma with *HER2*-amplified cancer cells. The heterogeneity of *HER2* amplification, if defined as the existence of less than 50% of cancer cells positive for *ERBB2* amplification, the 21 tumors (42%) would be heterogeneous. The combined analysis of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and FISH revealed that, co-amplification in individual cells of *HER2* and *MYC* were found in 8 tumors and *MYC/FGFR2*, and *MYC/EGFR* in a case respectively. On the other hand, co-amplification of *HER2/EGFR* in 7, *HER2/FGFR2* in one tumor and *HER2/MET/FGFR2* in a tumor, however the respective genes were mutually exclusively amplified. In conclusion, the semi-comprehensive information of amplification status of *HER2* and other genes obtained by the combined study of MLPA and FISH may be useful to plan individualized molecular target therapy against gastric cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子細胞病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：胃癌、HER2、分子標的療法、遺伝子増幅、FISH

## 1. 研究開始当初の背景

固形癌に対する分子標的療法で最初に成功をおさめたのは、抗 HER2 ヒト化モノクローナル抗体、trastuzumab (Herceptin) による乳癌治療である。基礎研究が直接臨床医学に貢献できた(“Bench to Bedside”) 典型例と言える。2009年の第45回米国臨床腫瘍学会年次学術集会(The American Society of Clinical Oncology, ASCO)ではtrastuzumabをHER2陽性胃癌に用いたphase III臨床試験の結果(ToGA試験)が発表され、その延命効果が証明され、胃癌に対するtrastuzumabを用いたadjuvant治療が日本国内で保険適用される可能性が高まってきた。我々は1993年以来、胃癌におけるHER2遺伝子の増幅と蛋白の過剰発現について免疫染色とfluorescence *in situ* hybridization (FISH)を用いた詳細な検索をおこなってきた。その結果はHER2遺伝子の高度増幅は高度の蛋白過剰発現と95%一致し、これは乳癌に見られるHER2遺伝子の変化と同様であることを報告しており、trastuzumabの胃癌患者への適応の可能性を提唱してきた。胃癌に対するHER2治療は再発転移胃癌に対するadjuvant治療として用いられる可能性が高いが、今、これに先立ち、数年後に転移再発をきたし、治療対象となる可能性のある切除胃癌について、我が国におけるHER2陽性胃癌の分子生物学的性格、臨床病理学的特徴、さらに陽性症例をscreeningする手段のalgorismを総括的に検討することは焦眉の急である。

## 2. 研究の目的

胃癌に対する抗HER2ヒト化モノクローナル抗体、trastuzumabを用いたadjuvant治療が日本国内で保険適用される可能性が高まってきた。本研究の目的はこの分子標的療法の導入を視野に置いて、胃癌における(1)HER2蛋白の発現とHER2遺伝子増幅の関係、(2)その頻度、(3)HER2陽性胃癌の臨床病理学的特徴、(4)HER2陽性胃癌細胞のクローナリティさらに(5)HER2遺伝子と同時増幅が見られる遺伝子と排他的増幅遺伝子の関係について総括的に検討することである。

## 3. 研究の方法

当院外科で手術された胃癌について、ホルマリン固定・パラフィン包埋組織を使って、HER2蛋白の過剰発現を免疫染色でスクリーニングし、陽性および偽陽性例についてHER2遺伝子増幅をfluorescence *in situ* hybridization(FISH)で検索した。免疫染色とFISHは連続切片を用いて行い、個々の細

胞レベルで蛋白の発現と遺伝子増幅が比較できる精度を求めた。

また、Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)を用いた増幅遺伝子の包括的解析を行い、えられた結果をもとにFISHを行い、同時増幅、排他的(mutually exclusive)増幅の有無を検索した。

### (1) 免疫染色によるHER2蛋白過剰発現の検討

対象：ホルマリン固定・パラフィン包埋された胃癌475例について、それぞれ代表的切片2枚を選び、免疫染色を用いてHER2およびEGFRの発現を検索し、2+および3+の腫瘍についてホルマリン固定・パラフィン包埋連続切片を用いたFISH法を用いて、HER2、EGFR、遺伝子の増幅をしらべた。Heterogeneityの認められた症例でリンパ節転移が認められた18例については、転移巣すべてに免疫染色とFISHを追加した。

### (2) Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)を用いた増幅遺伝子の包括的解析

SALSA MLPA probemix P175-A2 Tumour Gain (HER2の他、MDM4, MYCN, ALK, PDGFRA, KIT, KDR, DHFR, EGFR, MET, SMO, BRAF, FGFR1, MYC, ABL1, RET, CCND1, CCND2, CDK4, MDM2, AURKB 遺伝子のコピー数の増減を1度に解析できるkit) および SALSA MLPA probemix P231-A2 FGF10-FGFR2 (FGFR2遺伝子増幅キットである)を用いて検索をおこない、増幅あるいはコピー数の増加のあった症例についてFISHで其の確認を行った。

## 4. 研究成果

(1) HER2遺伝子の増幅は474例中51例(10.8%)にみられた。増幅は未分化型腺癌に比べて優位に分化型腺癌に頻度が高かったが、他の臨床病理学的要因との相関は見つからなかった(表1)。

(2) 51例のHER2遺伝子増幅胃癌のうち、陽性細胞の頻度が50%以下のものをheterogenous amplification(不均一増幅)と定義すると、21例(41%)がこれに相当した。

(3) 51例のMLPAの結果と、これに基づいて行ったFISHの結果、HER2、MYC、EGFR、FGFR2、MET、CCND1、MET、TOP2A、AURKAの「増幅」/「コピー数増加」がそれぞれ、31例/13例、5例/11例、4例/6例、2例/0例、1例/1例、3例/0例、1例/1例、4例/4例、0例/6例にみられた。続いて行ったFISHでは、HER2とMYCの同一腫瘍細胞内での増幅が8例に、同じくFGFR2とMYC、EGFRとMYCの増幅がそれぞれ1例にみられ

た。一方、*HER2*と*EGFR*、*HER2*と*FGFR2*、*HER2*と*MET*および*FGFR2*の同一腫瘍内で異なる細胞上での増幅がそれぞれ7例、1例、1例にみられた。

*HER2*と*MYC*の同時増幅のある症例では、従来からHerceptinに対する感受性が高いとされている。また、*HER2*と他の受容体型チロシンキナーゼをコードする*EGFR*、*MET*、*FGFR2*が相互排他的に同一腫瘍内で増幅しているという事実は、これらの腫瘍に対する治療にHerceptinに加えて、他の分子標的薬を投与する必要があることをしめした。

今回の結果はMLPAとFISHによる*HER2*および関連した遺伝子の増幅に関する情報は、胃癌に対する、個別化分子標的療法を行う上で重要な情報を提供してくれると結論された。

今後、*HER2*遺伝子の不均一増幅のみられる症例における、Herceptin療法の適応基準を決定するための臨床的研究、および、*HER2*と*EGFR*、*MET*、*FGFR2*の同時増幅のある症例のカクテル治療薬の効果について明らかにしたい。

Table 1 Clinicopathological data of ERBB2-positive cases.				
		No. of patients (B2-positive t		p
Number of patients		474	51	
Sex	Male	337 (72)	40 (78)	0.22
	Female	137 (28)	11 (22)	
Histology (WHO classification)	tubular adenocarcinoma	302 (63)	40 (78)	0.0078
	papillary adenocarcinoma	12 (3)	4 (8)	
	mucinous adenocarcinoma	4 (1)	0 (0)	
	poorly cohesive carcinoma	101 (21)	2 (4)	
	mixed carcinoma	42 (9)	4 (8)	
	carcinoma with lymphoid stroma	9 (2)	1 (2)	
unclassified	4 (1)	0 (0)		
Location	Upper	97 (20)	13 (25)	0.43
	Middle	183 (39)	22 (44)	
	Lower	170 (36)	15 (30)	
	unknown	24 (5)	1 (1)	
T stage	T1	310 (66)	28 (55)	0.20
	T2	101 (21)	17 (33)	
	T3	42 (9)	4 (8)	
	T4	21 (4)	2 (4)	
N stage	Absent	351 (74)	34 (67)	0.17
	Present	123 (26)	17 (33)	
Depth	M	209 (44)	15 (30)	0.088
	SM	101 (21)	13 (25)	
	MP	42 (9)	5 (10)	
	SS	69 (15)	16 (31)	
	SE	42 (9)	1 (2)	
	SI	11 (2)	1 (2)	

## 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 Dobashi Y, Kimura M, Matsubara H, Endo S, Inazawa J, Ooi A  
Molecular alterations in AKT and its protein activation in human lung carcinomas. *Human Pathology* 査読あり  
43(12):2229-40,2012  
DOI:10.1016/j.humpath.2012.03015

- ② Suzuki S, Dobashi Y, Minato H, Tajiri R, Yoshizaki T, Ooi A  
EGFR and HER2-Akt-mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas. *Virchows Archiv* 査読あり 461(3): 271-82, 2012  
DOI:10.1007/s00428-012-1282-3

- ③ Ooi A, Inokuchi M, Harada S, Inazawa J, Tajiri R, Sawada-Kitamura S, Ikeda H, Kawashima H, Dobashi . Gene amplification of *ESR1* in breast cancers - Fact or fiction? A fluorescence *in situ* hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification study. *J Pathol* 査読あり 227:8-16, 2012  
DOI:10.1002/path.3974

[学会発表] (計6件)

- ① 大井章史、土橋洋、野島孝之、池田博子、北村星子、尾山武  
Utility of FISH to detect MDM2 amplification in liposarcomas and their morphologic mimics. 第102回日本病理学会総会 2013年6月6日-8日、さっぽろ芸文館 (札幌)
- ② 大井章史。ワークショップ9 細胞診におけるFISHの応用。乳癌捺印細胞を使った fluorescence *in situ* hybridization で見る癌遺伝子増幅 第54回日本臨床細胞学会 2013年6月2日、グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
- ③ Ooi A, Inokuchi M, Dobashi Y, Tajiri R. Comparative study of MLPA and FISH to determine gene amplifications in breast cancers (J-3121). 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sep 21 (19-21), 2012, Sapporo Educational and culture hall (Sapporo)
- ④ Ooi A, Tajiri R. Workshop WS 1 Molecular targeted cancer therapy and histochemistry. Gene amplification of *ESR1* in breast cancers Fact or fiction? A fluorescence *in situ* hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification study. 14h International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. 2012 Aug 26 Kyoto International Conference center (Kyoto)
- ⑤ 大井章史、井口雅史、古河浩之、川島博子。乳癌における ESR1 遺伝子の増幅は真実か否か。第20回日本乳癌学会学術総会 2012年6月28日 熊本市国際交流会館 (熊本)

- ⑥ 大井章史、田尻亮輔、鈴木潮人、北村星子、池田博子、土橋洋。Multiplex ligation-dependent probe amplification 法を用いた乳癌の遺伝子増幅の検討。第101回日本病理学会総会、平成24年4月27日 京王プラザホテル(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大井 章史 (OOI AKISHI)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：50160411

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし