

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861155

研究課題名(和文) 乳癌臨床検体を用いたHER2標的療法効果予測法の開発

研究課題名(英文) Evaluation of HER2 containing dimerization for prediction of HER2-targeting therapy

研究代表者

重松 英朗 (Shigematsu, Hideo)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：40543707

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)：二量体発現解析方法であるPLA法を用いた基礎的な検討において、HER2-2 dimer発現が乳癌細胞株のtrastuzumab感受性の相関について検討した。HER2陽性乳癌細胞株において、trastuzumab感受性細胞株は耐性細胞株と比較し高いHER2-2 dimer発現を認めた(sensitive vs. resistant, 65 vs. 15,  $p<0.01$ )。trastuzumabを含む術前化学療法が施行されたHER2陽性乳癌において、HER2-2 dimer高発現症例では高いpCR率を認めた(high vs. low, 70% vs. 18%,  $p=0.006$ )。

研究成果の概要(英文)：The expression levels of HER2-containing dimer were evaluated in series of HER2-positive breast cancer cell lines. We also evaluated the association between expression of HER2-containing dimer and trastuzumab-sensitivity in breast cancer patients who underwent trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. HER2-containing dimer was evaluated by proximity ligation assays. There were higher expression levels of HER2-2 dimer in trastuzumab-sensitive cell lines compared to the resistant cell lines (sensitive vs. resistant, 65 vs. 15,  $p<0.01$ ). In a cohort of 23 HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy, high HER2-2 dimer expression cohort showed significantly higher rate of quasi-pathological complete response compared with low HER2-2 dimer expression cohort (high vs. low, 26/37, 70% vs. 2/11, 18%,  $p=0.006$ ).

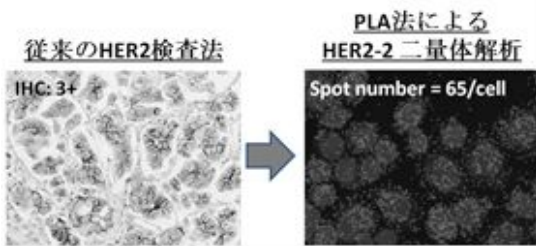
研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 HER2 二量体

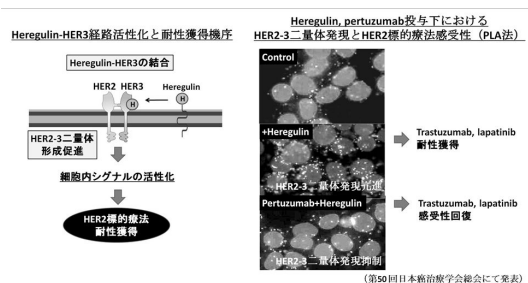
1. 研究開始当初の背景

Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 陽性乳癌は従来予後不良であったが、複数の HER2 標的治療薬が開発されており、その治療成績は向上している (Lancet Oncol 2012)。一方、これら薬剤の効果予測因子は確立しておらず、個々の症例について最適な HER2 標的療法薬を選択することが困難となっている。

HER2 陽性乳癌では HER2 を含む二量体の発現が、増殖シグナルおよび薬剤感受性に重要な役割を果たす可能性が報告されている。応募者は新規二量体解析方法である PLA (proximity ligation assay) 法を習得し、HER2-2 二量体発現が trastuzumab の効果予測因子となることを確認し報告した。これらの所見が HER2 陽性乳癌の臨床において再現されれば、HER2-2 二量体発現解析に基づく HER2 標的療法薬の選択が可能になることが期待される。



HeregulinはHER3に結合し二量体形成を促進する可溶性成長因子であり、heregulin-HER3経路の活性化がHER2標的療法の効果予測因子となる可能性が報告されている (Cancer Cell 2011)。応募者は heregulin 投与により HER2-3 二量体発現が促進され trastuzumab および lapatinib 耐性が獲得されること、pertuzumab 併用により HER2-3 二量体形成が阻害され感受性が回復することを確認し報告した。これらの所見が HER2 陽性乳癌の臨床において再現されれば、heregulin-HER3 経路活性化の解析に基づく HER2 標的療法薬の選択が可能になることが期待される。



これらの基礎的な発見を臨床応用するためには、HER2 陽性乳癌の臨床検体を対象にした研究において普遍的に再現されることが極めて重要であるが、HER2-2 二量体発現解析については、臨床検体を対象とした検査手技や基準となる値は確立されていない。ま

た、Heregulin-HER3 経路の活性化については、その経路活性化の指標となる因子が確立していないため、基礎的検討およびその測定系の臨床開発が必要と考える。

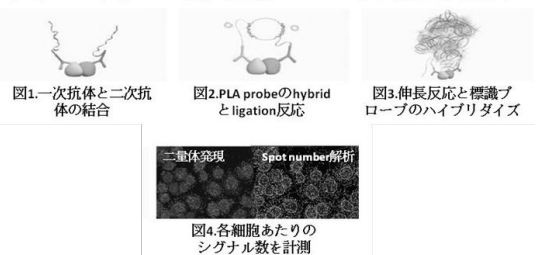
2. 研究の目的

本研究では、HER2 陽性乳癌臨床検体を対象とした、HER2-2 二量体発現および heregulin-HER3 経路活性化解析の臨床応用を可能とし、これらの因子解析をもとにした正確な効果予測に基づく HER2 陽性乳癌に対する HER2 標的療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

HER2-2 二量体発現の解析は Duolink in situ (Olink Bioscience®) を用いた PLA 法を用いて行う (図)。HER2-2 dimer 検出とし

PLA (Proximity Ligation Assay) 法を用いた HER2 二量体発現の解析方法



て PLA probe 標識の抗 HER2 抗体を用いる。手技の一般化の観点から、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) を対象とする

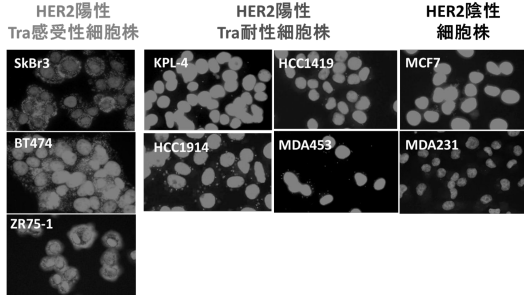
PLA 法による HER2-2 dimer 発現解析方法を用い、広島大学病院乳腺外科にて HER2 標的療法が施行された HER2 陽性乳癌症例を対象とした疫学研究を行う。HER2 陽性乳癌にて術前化学療法として trastuzumab 療法が施行された HER2 陽性乳癌症例、HER2-2 dimer 発現と HER2 標的療法の臨床的治療効果の相関を明らかとし、効果予測としての cut off 値を確立することを目的とする。研究については広島大学疫学研究倫理審査委員会において審査され、研究許可を受けた (第疫 - 4 1 8 号)。

4. 研究成果

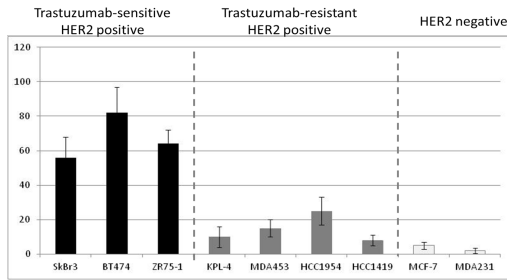
HER2 陽性乳癌細胞株における HER2-2 dimer 発現と抗 HER2 療法感受性の相関

HER2-2 homodimer の spot 数の平均値は SkBr3, BT474、trastuzumab-resistant SkBr3, MDA-MB 453、MCF-7、MDA-MB231 において 60, 84, 32, 15, 8, 2 であり、trastuzumab 感受性 HER2 陽性細胞株において高発現を認めたと、trastuzumab 耐性 HER2 陽性細胞株および HER2 陰性細胞株では HER2-2 homodimer の発現低下を認めた。In vitro の研究において HER2-2 dimer 発現が抗 HER2 標的療法の効果予測因子と成り得ることが示された。

## 乳癌細胞株におけるHER2-2 dimer発現



## 乳癌細胞株におけるHER2-2 dimer発現と trastuzumab感受性の相関



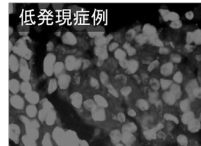
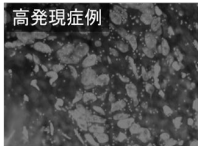
術前化学療法として trastuzumab を含む術前化学療法が施行された HER2 陽性乳癌における HER2-2 dimer 発現と治療効果の相関

HER2 陽性乳癌 5 症例、HER2 陰性乳癌 5 症例を対象とした training cohort において、HER2-2 dimer 発現は HER2 陽性乳癌および HER2 陰性乳癌において認められたが、HER2 陽性乳癌において有意に高い HER2-2 dimer 発現を認めた (HER2 陽性 vs. HER2 陰性、4.5 vs. 0.3,  $p < 0.001$ )。

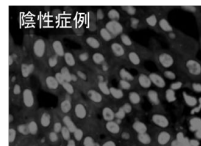
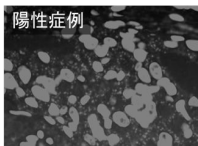
術前化学療法として trastuzumab を含む術前化学療法が施行された HER2 陽性乳癌 38 症例を対象にした研究において、HER2-2 dimer 高発現症例は HER2-2 dimer 低発現症例と比較して有意に高い確率で病理学完全寛解 (pCR) が得られることが認められた (pCR 率: 高発現 vs. 低発現, 70%(19/27) vs. 18%(2/11))。一方、HER2-2 dimer 発現についてより高い発現グループでは pCR 率が低い傾向が認められた。

## PLA法によるHER2を含む二量体発現 (FFPE検体)

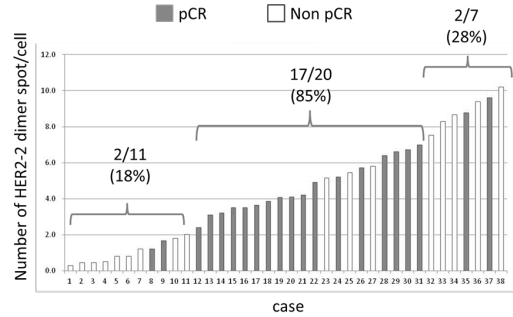
### HER2-2 dimer



### HER2-3 dimer



## HER2-2 dimer発現レベルとpCRの相関



HER2-3 dimer 発現および HER2 発現と HER2-2 dimer 発現の相関

更なる検討として HER2-3 dimer および PLA 法による HER2 発現の定量化を行った。HER2-3 dimer 発現は 5 例 (14%) の症例に認め、これらの症例では 3 例に pCR を認め、いずれの症例も HER2-2 dimer の高発現を認めた。HER2 発現を PLA 法により定量化したところ、HER2 発現の定量的解析が可能であり、HER2 発現が HER2-2 dimer と強い相関を示すことが確認された (Pearson の相関係数 0.857,  $p < 0.001$ )。

## 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 4 件)

1. Utility of  $(18)\text{F}$  FDG-PET/CT for predicting prognosis of luminal-type breast cancer. Aogi K, Kadoya T, Sugawara Y, Kiyoto S, Shigematsu H, Masumoto N, Okada M. Breast Cancer Res Treat. 2015 Feb;150(1):209-17. (査読・有)
2. Clinical Significance of Extracapsular Invasion at Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Patients with Sentinel Lymph Node Involvement. Shigematsu H, Taguchi K, Kouji H, Ohno S. Ann Surg Oncol. 2015 Jul;22(7):2365-71. (査読・有)
3. The efficacy and safety of preoperative chemotherapy with tri-weekly Abraxane and cyclophosphamide followed by 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide therapy for resectable breast cancer—A multicenter clinical trial, Shigematsu H, Kadoya T, Okada M, et al, Clin Breast Cancer. 2015 Apr;15(2):110-6. (査読・有)
4. Role of FDG-PET/CT in prediction of underestimation of invasive breast cancer in cases of ductal carcinoma in situ diagnosed at needle biopsy, Shigematsu H, Kadoya T, Okada M, et al, Clinical Breast Cancer. 2014 Oct;14(5):358-64 (査読・有)

〔学会発表〕(計 3件)

1. Shigematsu H, Takayuki K, Masahiro O, Akiko E, Norio M, Tsuyoshi K, Miyo O, Kouji A, Morihito O, Expression levels of HER2-2 dimer in proximity ligation assays is associated with trastuzumab sensitivity in HER2-positive breast cancer. ESMO, アムステルダム 2013年9月30日
2. 発表者名：重松英朗,角舎学行,網岡愛,梶谷桂子,恵美純子,松浦一生,舩本法生,春田るみ,片岡健,岡田守人:乳癌術前化学療法による腋窩リンパ節転移陰性化予測における FDG-PET/CT 検査の有用性の検討. 第22回日本乳癌学会総会,大阪,2014年7月11日
3. 発表者名：重松英朗,網岡愛,梶谷桂子,恵美純子,松浦一生,舩本法生,角舎学行,春田るみ,片岡健,岡田守人:術前針生検にてDCISと診断された症例における浸潤がん up-stage 予測としてのFDG-PET/CT SUV max の有用性. 第114回日本外科学会総会,京都,2014年4月3日

6. 研究組織

- (1)研究代表者 重松 英朗  
(Shigematsu Hideo)  
広島大学・大学病院・病院助教  
研究者番号：40543707