

【総説】

固形癌における受容体チロシンキナーゼ蛋白の  
過剰発現および遺伝子増幅

Protein overexpression and gene amplification of tyrosine kinase receptors in carcinomas

金沢大学大学院医学系研究科分子細胞病理学  
(病理学第一)

鈴木 潮 人

はじめに

受容体チロシンキナーゼ蛋白は、腫瘍細胞の増殖、腫瘍血管新生など、腫瘍形成の複数の過程において重要な役割を果たしている。現在までに56種類の受容体チロシンキナーゼが知られており、21のファミリーに分類されている。なかでも、epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), platelet derived growth factor receptor (PDGFR) familyは腫瘍発生における重要な因子として注目されている。これまでに、EGFR, VEGFR, PDGFRが、いくつかの臓器の癌で過剰発現されていることが報告されており、これらを標的とした治療の効果が期待できる。治療効果を高めるためには、異なる受容体チロシンキナーゼ経路の阻害薬との併用、さらにシグナル伝達の下流因子を標的とした治療との併用が有効と考えられる。我々は、これらの治療法を確立するための基礎データを得るべく、人体からの切除材料を対象としてこれらのキナーゼをコードする遺伝子の増幅を手始めとして受容体チロシンキナーゼ蛋白及びその下流のシグナル伝達因子の発現、活性化について調べてきた。本稿では、各種の固形癌における受容体チロシンキナーゼ蛋白の発現および遺伝子増幅について、治療法についても言及しながら概説する。

1. EGFRファミリー

EGFRファミリーに属するHER1 (human epidermal growth factor receptor1, erbB1またはEGFR)およびHER2 (同じくerbB2またはEGFR2)は細胞膜に存在し、1. 細胞外ドメイン、2. 膜貫通ドメイン、3. 細胞内ドメインから成る。細胞外ドメインにリガンドが結合すると、EGFRおよびHER2は2量体を形成し、細胞内ドメインの内因性チロシンキナーゼ活性が上昇し、レセプター同士が相互のチロシン残基をリン酸化する。次に、細胞質に存在する複数の下流因子が順次活性化されていき、遺伝子発現の場である核に増殖シグナルが伝達される(図1)。こうして、EGFRおよびHER2は、主に腫瘍の増殖シグナルの伝達に関与している。

2. HER2と乳癌

乳癌における分子標的治療の代表的薬剤はヒト化抗HER2抗体である。2001年にはヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブ(ハーセプチン)が転移性乳癌の治療薬として認可されている。ハーセプチンは、HER2に特異的に結合した後(図2)、直接的腫瘍細胞増殖抑制作用や、NK細胞のFc受容体を介する抗体依存性細胞障害作用によって抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。最近、転移再発性乳癌についてのみならず、原発性乳

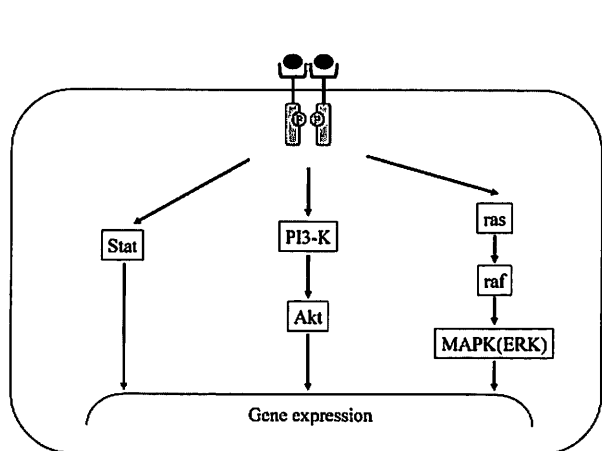


図1. 受容体チロシンキナーゼ蛋白下流の細胞内シグナル伝達経路。  
受容体の細胞外ドメインにリガンドが結合することにより、EGFRおよびHER2は2量体を形成し、レセプター同士が相互のチロシン残基をリン酸化する。さらに、下流因子にシグナルを伝達し、遺伝子発現の場である核に増殖シグナルが伝達される。

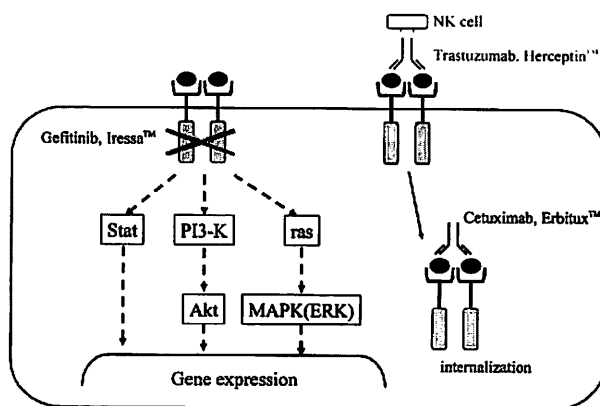


図2. 分子標的治療薬の作用機序。  
ヒト化モノクローナル抗体セツキシマブ(アービタックス)はリガンドと競合的にEGFRに結合してEGFRの活性化・二量体化を阻害し、細胞表面にあるEGFRを細胞内へ内在化させる。トラスツズマブ(ハーセプチン)は、HER2に特異的に結合した後、抗体依存性細胞障害作用によって抗腫瘍効果を発揮する。ゲフィチニブ(イレッサ)はEGFRのチロシンキナーゼに結合してEGFRの自己リン酸化を阻害し、下流へのシグナル伝達を遮断する。

癌の術後補助療法における治療効果も報告され、治療適応が拡大されている。これまでに、*HER2*遺伝子増幅、蛋白過剰発現の予後因子、治療効果予測因子としての有用性は確立されている。ハーセプチンの適応には免疫染色による検索が用いられており、免疫染色 (IHC) の結果は4段階 (0, 1+, 2+, 3+) で判定される。0, 1+は陰性、3+は過剰発現陽性と判定されるが、2+は再現性が低く、*fluorescence in situ hybridization* (FISH) 法により*HER2*遺伝子増幅の有無を確認することが推奨されている。FISH法では、100kb前後の標的遺伝子配列に対する200base前後のDNAプローブを用いる。通常は、その遺伝子の存在する染色体のセントロメアを同時に検出し、遺伝子増幅と染色体の増加とを区別する。例えば、17番染色体のセントロメアの数と*HER2*遺伝子の数を調べ、セントロメアの数に対して*HER2*遺伝子の数が増加した場合に遺伝子増幅と判定する。また、数コピーから数十コピーに及ぶ高度の遺伝子増幅が生じることが知られており、1つはdouble minute (DM) chromosomeと呼ばれる、セントロメアを持たない小染色体が出現する形態をとる。もう1つは染色体の一部に増幅した遺伝子が繰り返し並ぶもので、染色体分染法で均一に染まることよりhomogeneously staining region (HSR)と呼ばれる。

乳癌患者235例を対象としてFISH法を用いて行った我々の研究では、IHC 3+の症例では、ほぼ100%に遺伝子増幅がみられ、0, 1+ではほぼ全例において遺伝子増幅がみられなかった。蛋白過剰発現(2+, 3+)の約90%は遺伝子増幅によるものであり、逆に、遺伝子増幅のある細胞ではほぼ100%の細胞で蛋白過剰発現がみられた。また、乳癌における*HER2*遺伝子増幅は比較的均一な変化であるが、一部の症例においては、腫瘍内における蛋白発現および遺伝子増幅の分布は不均一であり、“genetic heterogeneity”が認められた。このような、heterogeneityを示したある乳癌症例について以下に示す。この症例では、一部の癌細胞において*HER2*蛋白過剰発現がみられ、これらの癌細胞において、FISHによりHSR型の遺伝子増幅が確認された(図3)。非定型的乳房切除術後2年で肝転移巣と癌性胸膜炎が出現し、ハーセプチンとドセタキセルの併用療法が行われた結果、肝転移巣と胸水貯留が消失した。しかし、その後、癌性胸膜炎が再発し、肺炎により死亡した。経過中、肝に再発は認めなかった。

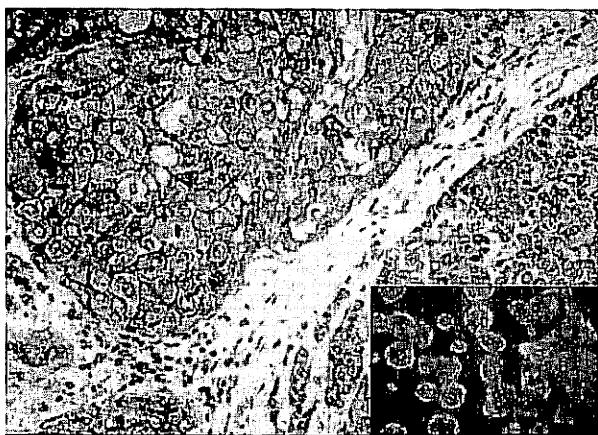


図3. 免疫染色およびFISH法。一部の癌細胞において*HER2*蛋白過剰発現がみられ(左)、これらの癌細胞においてHSR型の遺伝子増幅がみられる(挿入図、右下)。

胸水を対象としたFISHでは、*HER2*遺伝子増幅陽性の癌細胞は見られなかった。従って、ハーセプチンによって、感受性のある*HER2*遺伝子増幅陽性の癌細胞が消失し、陰性の癌細胞の置換増殖を招いたと考えられた<sup>2)</sup>。このように、同一腫瘍内における蛋白発現及び遺伝子増幅のheterogeneityは臨床的にも重要な意義を持っている。従って、免疫染色に加えてFISH法により遺伝子増幅を検索することは、腫瘍内における遺伝子増幅を示す癌細胞の一群を発見するのに有用であり、薬剤反応性を予測することが出来る。抗体製剤であるハーセプチンに加え、チロシキナーゼ阻害薬の開発も行われており、その一つであるラパチニブはEGFR、*HER2* dual inhibitorである点が特徴的である。この薬剤の乳癌に対する治療効果が期待されるが、その適応についても、蛋白発現、遺伝子増幅の有無、さらにそれらのheterogeneityについても慎重に検討されることによって、より効果的な治療が可能になると考えられる。

### 3. EGFRを標的とした治療

これまでに、EGFRチロシキナーゼに対する小分子化合物ゲフィチニブ(商品名イレッサ)やEGFR蛋白の細胞外ドメインを標的としたヒト化モノクローナル抗体セツキシマブ(商品名アービタックス)による治療法が開発されている(図2)。

ゲフィチニブは、EGFRのATP結合部位にATPと競合的に結合して自己リン酸化を阻害することによりシグナル伝達を遮断して、細胞の増殖や分化を抑制する薬として開発された。2004年に世界に先駆けて日本で肺癌に対する治療薬として認可されたが、肺線維症という副作用が重大な問題となった。さらに、2007年には他の小分子化合物であるエルロチニブ(タルセバ)が認可された。経験的に腺癌、女性、東洋人、非喫煙者の肺癌症例にゲフィチニブの奏効例の多いことが注目されていたが、これら4つの要因とEGFR遺伝子のチロシキナーゼ領域のATP結合部位における遺伝子変異(ほとんどが、exon21のコードン858における点突然変異L858R、exon19のインフレーム遺伝子欠損に集中している)との正の相関が明らかになり、薬理効果のメカニズムが解明された。一般的には、これらの遺伝子変異と遺伝子増幅との間に相関は無いとされている。

一方、肺癌におけるセツキシマブの有効性は早期の治験の結果から否定されている。我々の181例の非小細胞性肺癌の検索では34%の症例でEGFR蛋白の過剰発現があり、このうち74%にEGFR遺伝子の増幅を認めている<sup>3)</sup>。この結果は乳癌における*HER2*の異常に匹敵する高頻度であり、さらに、FISHで確認した遺伝子増幅像や免疫染色による細胞膜上での過剰発現の像でも両者に違いを認めなかった(図4)。従って、EGFR遺伝子の増幅すなわちEGFR蛋白の過剰発現のある肺癌におけるセツキシマブの有効性が否定されていることは我々にとっては予想外の結果である。乳癌における*HER2*の場合と異なり、肺癌では個々の腫瘍内におけるEGFRの異常発現のある腫瘍細胞の比率にばらつきが多いこと(intratatumoral heterogeneity, mean  $\pm$  SD, 54 $\pm$ 24%)が関係するのかもしれない。最近、Hirschらは肺癌におけるEGFR遺伝子コピー数の増加(遺伝子増幅およびポリソミー7を含む)はセツキシマブ併用化学療法による治療効果と相関すると報告しており<sup>4)</sup>、肺癌におけるセツキシマブの有効性について再考される可能性もある。

2004年から米国において、また2008年7月から我が国において、セツキシマブが大腸癌の治療薬として承認されている。その適応条件として「EGFR発現陽性の治癒切除不能な進行・再

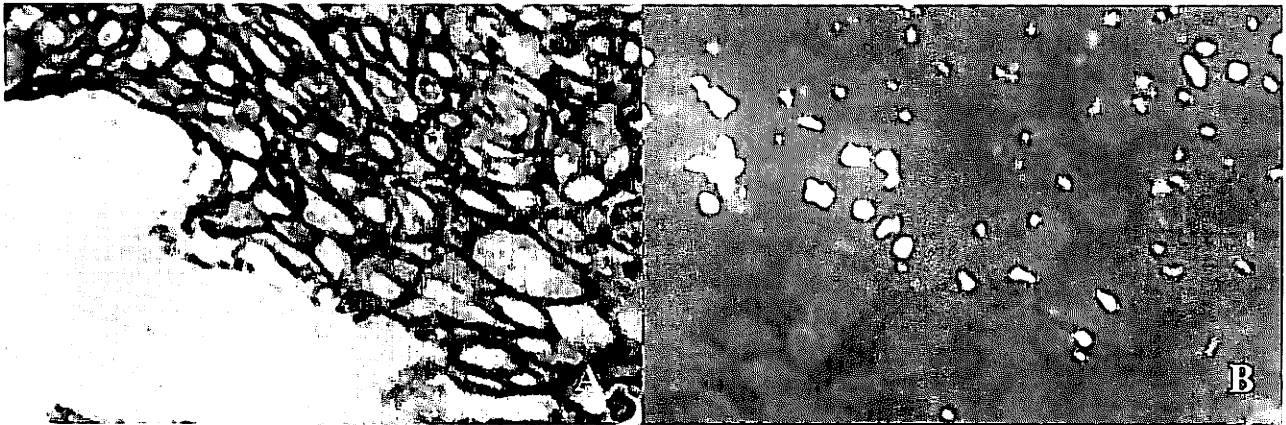


図4. EGFR蛋白・遺伝子の免疫染色・FISH法による検索。

- A. 扁平上皮癌症例のEGFR染色。単一細胞内にheterogeneousな強陽性像がみられる。  
B. FISH法。免疫染色陽性部(A)に一致してHSR型のEGFR遺伝子増幅がみられる。

発大腸癌症例」とされているがEGFR発現を簡便かつ正確に検出する方法は定まっていない。最も頻繁に用いられるのが免疫染色であるが、この方法で調べた研究によれば大腸癌のEGFR過剰発現の頻度は数%から90%以上と報告されており、報告者による差が大きい。ELISAでみたEGFRの発現は癌と非癌部で有意差がないという報告もあり、同じ研究者のreal-time PCRを用いた検討ではむしろ非癌部で有意に発現が高いという報告もある<sup>9)</sup>。244例の大腸癌症例を用いた我々の研究では、EGFR蛋白の明らかな過剰発現がみられたのは全症例の8%のみであり、その58%がEGFR遺伝子の高度増幅によるものであった<sup>10)</sup>。さらに、これらの63%の症例ではEGFR過剰発現のある癌細胞が腫瘍全体に占める割合は5%以下であった。これらの結果はモノクローナル抗体の治療効果を期待出来る症例の割合は必ずしも高くはない可能性を示している。しかしながら、分子標的療法はtailored therapyであり、例え有効な症例が少数であっても、的確に選択し適用されれば治療効果が期待出来る。無効の症例が含まれることによる希釈効果によって有効な治療薬が正しく評価されない可能性があり、治療適応基準の設定は大変重要である。今後の数年間の臨床的、病理組織学的、細胞遺伝学的なデータの蓄積により、正確な治療適応の判定方法が決定されるべきである。

我々は肺癌、大腸癌以外の固形癌についても、免疫染色とFISH法を用いてEGFRの異常を検索してきた(図5)<sup>11)</sup>。その頻度は様々であるが、多くの臓器の癌でEGFRの遺伝子増幅と、それに伴う細胞膜上での蛋白過剰発現を確認している。今後、臓器横断的に、個々の癌の持つ分子細胞学的特性にあわせた分子標的療法の導入が検討されるべきだと考えている。

#### 4. 膜蛋白および下流因子について

細胞膜のレセプターであるEGFRおよびHER2と核を結ぶ多数のシグナル伝達経路が知られている。なかでも、EGFRの下流経路としてStat (signal transducer and activator of transcription), Akt, ERK (extracellular signal regulated kinase)系が重要と考えられている(図1)。非小細胞肺癌の組織を用いて、EGFRとその下流因子を対象としてwestern blotで検索したところ、ERKはEGFRの状態に関わらず活性化されていた。しかし、遺伝子増幅によりEGFR蛋白が過剰発現している肺癌症例では

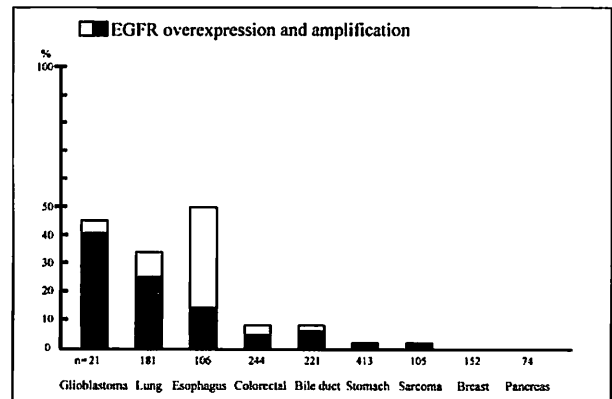


図5. 各臓器原発の癌におけるEGFR蛋白過剰発現および遺伝子増幅の頻度。

下流因子Stat3が活性化され、EGFRのチロシンキナーゼに遺伝子突然変異を有する症例では、下流因子Aktが高率に活性化されていた。EGFRの過剰発現及び活性化を示す症例においても、異なる下流経路によりシグナルが伝達されていることが示唆された<sup>12)</sup>。

一方、軟部腫瘍におけるEGFRの下流因子では、Aktが、Stat, ERKに比して高い頻度で活性化されていたが、EGFRの活性化の有無との相関はみられなかった<sup>13)</sup>。EGFR遺伝子増幅による過剰発現がみられる症例ではStat3経路が高い頻度で活性化されていた。しかし、遺伝子変異を有する症例では、必ずしもEGFRは活性化されておらず、しかも、特定の下流経路の活性化はみられなかった。このように、生体内の腫瘍では、EGFR蛋白過剰発現がみられても下流における分子の状態と必ずしも相関していない可能性がある。従って、各症例における膜蛋白の発現・活性化とともに下流の因子の活性化状態について検索し、治療効果の期待出来る複数の標的に対する治療を同時に行うことにより、治療効果を高めることが可能と考えられる。

#### 5. PDGFについて

血管系の構築には、管構造を形成する内皮細胞と、血管の構造的安定化に重要な役割を果たす壁細胞(平滑筋細胞)が必須

である。これらの血管系の主な2つの細胞を制御する因子として、VEGF, PDGFが挙げられる。内皮細胞はPDGFを、壁細胞はVEGFを分泌し、パラクリン機構により互いに作用する。近年、腫瘍血管が腫瘍増殖において重要な役割を果たすことから、抗腫瘍療法の標的として認識されるようになってきた。VEGFを標的とした抗腫瘍血管療法としてヒト化抗VEGFモノクローナル抗体ベバシズマブ(商品名アバスタ)が臨床応用されており、他剤との併用により大腸癌の生存率向上に有効であることが示されている。一方、マウスを用いた実験では、PDGFRチロシンキナーゼを標的とした阻害剤Imatinib Mesilate (商品名グリベック)が胃癌に対する抗がん剤の効果を増強させることが報告されており<sup>13)</sup>、臨床応用も期待されるが、そのためには外科材料標本を用いた研究によるデータの蓄積が必須である。我々は、癌治療対象のモデルとしてノックインマウスを用いて、PDGFRの機能及び*in vivo*における癌細胞周囲の微小環境について明らかにするべく研究を行い、PDGFR- $\beta$ 活性の高い間質を背景とすると、PDGF刺激の少ない環境でも、腫瘍血管面積が増加しており、腫瘍の初期増殖が亢進していることを報告した<sup>14)</sup>。これらの結果も踏まえて実験を進展させ、抗腫瘍血管療法の確立に役立てるために、人体の胃癌切除材料を対象として研究を継続中である。

おわりに

各臓器の固形癌における受容体チロシンキナーゼ蛋白と治療法について概説し、我々の研究について紹介した。近年、新しい分子標的剤の出現により、病理組織標本を用いた薬剤感受性の評価が重要になってきた。特に、生検および外科切除組織を検索することは、治療前の癌細胞に関する情報を得ることが出来るため、重要である。

現在、我々の教室では、人体の胃癌切除材料を対象として新生血管に関する研究を行っているが、これまでの成果を踏まえて、大腸癌におけるセツキシマブの適応条件を簡便かつ正確に決定する方法を確立するための研究も継続中である。

## 謝 辞

本稿で紹介した研究は、大井章史教授の全般的な指導の下、金沢大学大学院医学系研究科分子細胞病理学、山梨大学医学部第一病理の大学院生、教室員、自治医科大学附属さいたま医療センターの共同研究者の協力により行われたものです。ここに申し上げます。

- 1) Kunitomo K, Takehana T, Inoue S, Fujii H, Suzuki S, Matsumoto Y, Ooi A. Detection of c-erbB-2 (HER-2/neu) amplification in breast carcinoma by fluorescence in situ hybridization on tissue sections and imprinted cells. *Pathol Int* 52: 451-457, 2002
- 2) Kunitomo K, Inoue S, Ichihara F, Kono K, Fujii H, Matsumoto Y, Ooi A. A case of metastatic breast cancer with outgrowth of HER2-negative cells after eradication of HER2-positive cells by humanized anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumab) combined with docetaxel. *Hum Pathol* 35: 379-381, 2004
- 3) Suzuki S, Dobashi Y, Sakurai H, Nishikawa K, Hanawa M, Ooi A. Protein overexpression and gene amplification of

epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Cancer* 103: 1265-1273, 2005

- 4) Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, Chansky K, Crowley J, Kelly K, Franklin WA, Bunn PA, Jr., Varella-Garcia M, Gandara DR. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol* 26: 3351-3357, 2008
- 5) Spindler KL, Lindebjerg J, Nielsen JN, Olsen DA, Bisgard C, Brandslund I, Jakobsen A. Epidermal growth factor receptor analyses in colorectal cancer: a comparison of methods. *Int J Oncol* 29: 1159-1165, 2006
- 6) Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, Fujii H, Takeda Y, Dobashi Y. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* 17: 895-904, 2004
- 7) Hanawa M, Suzuki S, Dobashi Y, Yamane T, Kono K, Enomoto N, Ooi A. EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Int J Cancer* 118: 1173-1180, 2006
- 8) Nakazawa K, Dobashi Y, Suzuki S, Fujii H, Takeda Y, Ooi A. Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers. *J Pathol* 206: 356-365, 2005
- 9) Takehana T, Kunitomo K, Suzuki S, Kono K, Fujii H, Matsumoto Y, Ooi A. Expression of epidermal growth factor receptor in gastric carcinomas. *Clin Gastroenterol Hepatol* 1: 438-445, 2003
- 10) Dobashi Y, Takei N, Suzuki S, Yoneyama H, Hanawa M, Ooi A. Aberration of epidermal growth factor receptor expression in bone and soft-tissue tumors: protein overexpression, gene amplification and activation of downstream molecules. *Mod Pathol* 17: 1497-1505, 2004
- 11) Suzuki S, Igarashi S, Hanawa M, Matsubara H, Ooi A, Dobashi Y. Diversity of epidermal growth factor receptor-mediated activation of downstream molecules in human lung carcinomas. *Mod Pathol* 19: 986-998, 2006
- 12) Dobashi Y, Suzuki S, Sugawara H, Ooi A. Involvement of epidermal growth factor receptor and downstream molecules in bone and soft tissue tumors. *Hum Pathol* 38: 914-925, 2007
- 13) Kim R, Emi M, Arihiro K, Tanabe K, Uchida Y, Toge T. Chemosensitization by STI571 targeting the platelet-derived growth factor/platelet-derived growth factor receptor-signaling pathway in the tumor progression and angiogenesis of gastric carcinoma. *Cancer* 103: 1800-1809, 2005
- 14) Suzuki S, Heldin CH, Heuchel RL. Platelet-derived growth factor receptor-beta, carrying the activating mutation D849N, accelerates the establishment of B16 melanoma. *BMC Cancer* 7: 224, 2007