

大腸癌患者における分子標的薬 (ERBITUX™) の 適応を決定する EGFR (上皮増殖因子受容体) 蛋白の 免疫組織化学的検査法

Immunohistochemical Detection for EGFR Protein Expression Identifying
Colorectal Cancer Patients Eligible for Treatment with ERBITUX™

うめ きた よし ひさ
梅 北 善 久
Yoshihisa UMEKITA

はじめに

大腸癌はわが国において近年増加している癌の一つであり、現在、癌死亡数では女性の第1位、男性では第4位を占めている。病期が進行していなければ手術によって治療可能であり、切除不能進行・再発大腸癌においても薬物療法の進歩によりこの15年でその治療成績が4倍になった。しかしながら進行再発大腸癌の平均的な生存期間は約2年であり、新たな治療薬、特に副作用の少ない分子標的薬の開発が望まれている。上皮増殖因子受容体 (EGFR) は大腸癌を含むさまざまな癌において発現しており、浸潤や転移のしやすさと相関することが知られている。そのため、分子標的薬のターゲットとして注目を集めてきており、すでに EGFR のチロシンキナーゼ部位を阻害する分子標的薬 (ゲフィニチブ) が肺癌治療に用いられている。

一方、本来結合する成長因子 (EGF, TGF α) よりも EGFR に対する親和性が高く、成長因子のシグナル伝達を阻害することで抗腫瘍効果を示すセツキシマブ (商品名: アービタックス) が開発され、欧米では2004年より臨床応用が開始されている。日本においては2008年9月より「EGFR陽性の治療切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」の治療薬として発売が開始された。同時に EGFR の発現を確認する標準化検査キットとして EGFR pharmDx™ kit (Dako 社) が厚生労働省から体外診断用医薬品として承認され、2008年9月より発売が開始されている。

本稿ではこの検査法を中心に概説し、セツキシマ

ブの新たな症例選択の項目として有望視される KRAS 変異についても触れる。

I. EGFR とは

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) は EGFR/erbB-1、HER2/erbB-2、HER3/erbB-3、HER4/erbB-4 からなる HER ファミリーの一つで、分子量 170 kDa の膜貫通型受容体である¹⁾。EGFR はリガンド結合部位である細胞外領域、膜貫通領域、チロシンキナーゼ活性をもつ細胞内領域から構成されており、EGF (Epidermal Growth Factor) ないし TGF- α (Transforming Growth Factor- α) といった特異的リガンドが細胞外領域に結合することにより、EGFR と EGFR あるいは他の HER ファミリーとの間で二量体を形成する。そのことによって細胞内領域でのチロシンキナーゼの活性化、自己リン酸化が引き起こされ、各種シグナル伝達系を介して核内に達したシグナルにより、細胞動態を調節する遺伝子の転写が亢進し細胞分裂を誘導する²⁾。EGFR の活性化がアポトーシスの阻害、細胞増殖、血管新生、細胞分化を促し、結果として生じる細胞の腫瘍化や腫瘍の進展、悪性化などに重要な役割を果たすことが明らかになっている³⁾ (図1)。

EGFR は遺伝子増幅や転写異常による EGFR 蛋白発現の増加、EGFRvIII に代表される遺伝子の突然変異による恒常的なチロシンキナーゼの活性化、腫瘍細胞による EGF や TGF α といったリガンドの大量分泌によるオートクライン刺激など、さまざまな要因により活性化される。それらのうち、オートクライン刺激による EGFR の活性化が最も一般的であ

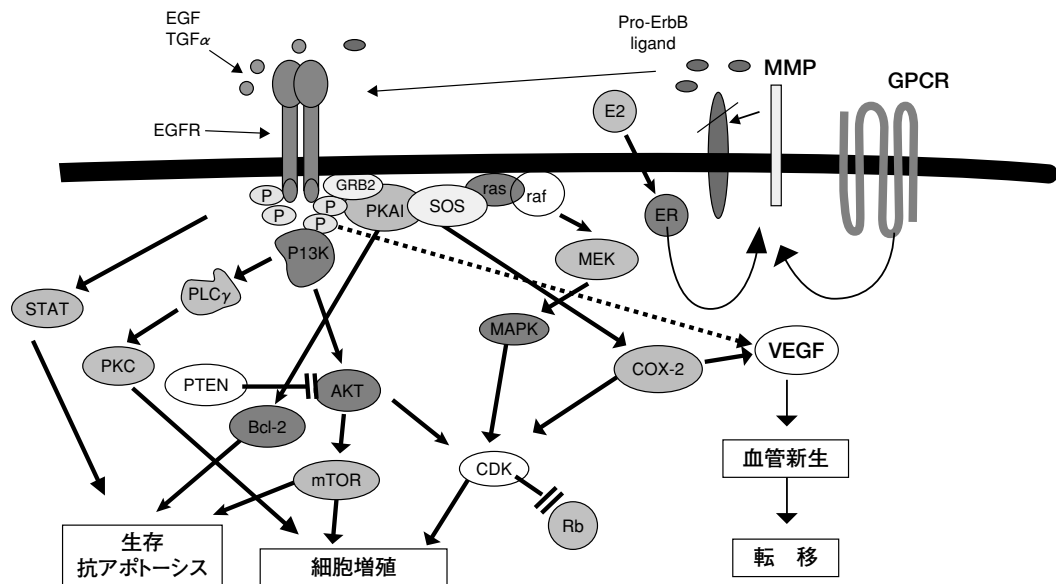


図1 EGFR シグナルネットワーク³⁾

り、さまざまな腫瘍においてEGFRとそのリガンドの両者の発現増加が認められている^{4,5)}。

Ⅱ. 大腸癌に対する抗EGFR分子標的薬

過剰に発現するEGFRはシグナル伝達系を混乱させ、細胞の腫瘍化、悪性化を惹起するだけではなく、EGFRを過剰発現する悪性腫瘍は予後不良を示し、またホルモン療法、化学療法、放射線療法において耐性を示すことなどが報告されている^{4,6)}。大腸癌におけるEGFRの発現に関する研究は古くから行われており、免疫染色における発現頻度は25～77%と報告者によって幅が見られる。一方、EGFR遺伝子の増幅を示す症例はほとんどないとされている。

一般的に大腸癌で発現するEGFRは浸潤性の高さや転移のしやすさと関連するとされており、予後不良因子の一つと考えられてきた。このような理由からEGFR蛋白を標的とした薬剤の開発は抗癌剤治療戦略上大いに期待され、現在までに、EGFRの細胞外領域に直接作用し、リガンド結合の阻害、受容体

の細胞内への取り込みを誘導する抗体治療薬、そしてEGFRの細胞内領域でのATPの結合を阻害し、細胞内でのシグナル伝達を妨害する低分子チロシンキナーゼ阻害剤などさまざまな新規分子標的薬が開発され、多くの臨床試験が実施されてきた。中でもセツキシマブの大腸癌を対象とした開発が進められる契機となったのがイリノテカン抵抗性ヒト大腸癌細胞をマウスに移植した実験で得られた結果である。イリノテカン、セツキシマブともに単独では腫瘍増殖抑制効果が得られなかったが、両剤を併用すると増殖が抑制できるといった結果が得られた。この移植マウスを使った前臨床試験のコンセプトを臨床で確認したのがセツキシマブの代表的な臨床試験(EMR62202-007)、通称BOND試験である(表1)。

Ⅲ. EGFR 検査法

EGFRはさまざまな種類の手法(遺伝子発現検索、免疫組織化学、免疫沈降法など)、検体(新鮮材料、

表1 BOND試験での治療成績

Parameter	イリノテカン+セツキシマブ (n=218)	セツキシマブ (n=111)	p value
奏効率	22.9% (95%CI 17.5-29.1)	10.8% (95%CI 5.7-18.1)	0.0074
PR+SD rate	55.5% (95%CI 48.6-62.2)	32.4% (95%CI 23.9-42.0)	0.0001
無増悪生存期間 (月)	4.1	1.5	<0.0001
全生存期間 (月)	8.6 (95%CI 7.6-9.6)	6.9 (95%CI 5.6-9.1)	0.48

Cunninhom et al. NEJM 2004

凍結切片、ホルマリン固定標本、血清など）を用いた検出が試みられてきたが、検出法の標準化および陽性の定義、再現性などに問題があり、EGFR 検出結果と臨床的有用性との関連に関する検出を困難にしている。現在、日常の病理診断に用いられる組織標本（特にホルマリン固定標本）による免疫組織化学的 EGFR 蛋白の検出が最も広く用いられている。日常の病理診断に用いられているため材料が豊富なことと組織・細胞中の局在を評価できる点（例えば癌組織において発現しているのか、あるいは正常組織においてなのか）で優れている。しかしながら、免疫組織化学的手法の違いが検出結果に影響を及ぼす可能性があり、抗体・検出試薬を含めた使用試薬の種類、その反応条件や検出結果の評価・判定法などの標準化が必要である。また、検体となる組織標本の固定法、固定時間、作製法などによっても検出結果に影響がでてくることがあり、やはり標準化が求められている。

アメリカ病理学会によると免疫染色法に対して以下のような標準化法が推奨されている。

- (1) ホルマリン固定材料を用いる
- (2) 標本固定までの時間及び固定時間を短く行う
(6～24 時間)
- (3) 既に確認された染色プロトコルを用いて行う
- (4) 自動化された方法を用いる
- (5) 必ず陽性コントロールと陰性コントロールを用いる
- (6) 評価には画像解析を用いる方がよい、などである。

これらをほぼ満たすものとして、EGFR pharmDx™ kit (Dako 社) がある。このキットはホルマリン固定パラフィン包埋標本において優れた反応性を示す抗ヒト EGFR マウスモノクローナル抗体クローン 2-18C9、およびコントロールスライドとして 2 種類の細胞株から作製した細胞ブロック標本、その他 EGFR の免疫組織染色に必要なすべての試薬を含み（図 2）、また、染色条件を画一化することによって優れた染色性と高い再現性を実現している（図 3）。

抗ヒト EGFR マウスモノクローナル抗体クローン 2-18C9 は EGFR 蛋白と特異的に反応し、HER2/*neu* 及び他の HER ファミリー蛋白とは交差反応しない。このクローンが認識するエピトープは EGFR 細胞外領域のリガンド結合部位近傍であり、乳癌、肺癌、悪性膠細胞腫などで発現している EGFR 変異型

1. 蛋白分解酵素試薬（プロテイナーゼ K）
2. ブロッキング試薬（過酸化水素）
3. 一次抗体（抗ヒト EGFR (2-18C9)・マウスモノクローナル抗体）
4. 一次抗体陰性コントロール（IgG1 マウスモノクローナル抗体）
5. ポリマー試薬
（パーオキシダーゼ標識デキストラン結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体）
6. 基質緩衝液（イミダゾール緩衝液、過酸化水素）
7. 発色基質（3, 3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド：DAB）
8. 濃縮洗浄液（トリス塩酸緩衝液）
コントロールスライド
（ホルマリン固定パラフィン包埋された細胞株 2 種類を貼付したスライド）
CAMA-1 (EGFR 蛋白発現量レベル：0)
HT-29 (EGFR 蛋白発現量レベル：2+)

図 2 キット構成

- Step 1. 脱パラフィン、親水化**
- Step 2. 前処理（蛋白分解酵素処理）**
- 1) 親水化後の標本を洗浄液*1に浸漬する 2分間、1回
 - 2) 標本上の余分な水分をキムワイプなどで吸い取って蛋白分解酵素試薬を標本上に滴下する 常温5分間
 - 3) 精製水で洗浄後、洗浄液に浸漬する 5分間、1回
- Step 3. 内因性パーオキシダーゼのブロッキング**
- 1) 標本上の余分な水分をキムワイプなどで吸い取って内因性パーオキシダーゼブロッキング試薬を標本上に滴下する 常温5分間
 - 2) 洗浄液で洗浄後、洗浄液に浸漬する 5分間、1回
- Step 4. 一次抗体（抗 EGFR, clone 2-18C9）の反応**
- 1) 標本上の余分な水分をキムワイプなどで吸い取って一次抗体を標本上に滴下する 常温30分間
 - 2) 洗浄液で洗浄後、洗浄液に浸漬する 5分間、1回
- Step 5. 検出ポリマー試薬の反応**
- 1) 標本上の余分な水分をキムワイプなどで吸い取ってポリマー試薬を標本上に滴下する 常温30分間
 - 2) 洗浄液で洗浄後、洗浄液に浸漬する 5分間、2回
- Step 6. 基質溶液の反応**
- 1) 調整済 DAB 基質溶液*2を標本上に滴下する 常温10分間
 - 2) 精製水で洗浄 5分間、2回
- Step 7. 対比染色**
- 1) ヘマトキシリンに標本を浸漬する 常温適宜
 - 2) 流水水洗、色出し 適宜
- Step 8. 脱水・透徹・封入**
- 1) アルコール、キシレンにより脱水・透徹 適宜
 - 2) 永久標本用封入剤を用いて封入する
- *1 キット中の濃縮洗浄液を精製水にて10倍希釈して使用
*2 基質緩衝液1mLに対してDAB溶液1滴（25～30μL）の割合で加え混和して使用

図 3 用手法染色手順

表2 主な臨床試験における EGFR の発現頻度

臨床試験ID	EGFR発現	EGFR発現率	95% Confidence Intervals
EMR 62202-007	474/577	82.10%	78.1 - 86.1%
IMCL CP02-0141	105/140	75%	66.9 - 83.1%
IMCL CP02-9923	292/401	72.80%	68.0 - 77.6%

(EGFR vIII) にも保持されている。また、このエピトープはホルマリン固定によって形成されるホルマリン架橋に対して耐性であることからホルマリン固定パラフィン包埋標本において高感度な検出が可能となっている⁷⁾。

このキットはセツキシマブの臨床試験で使用されたものであり、FDA (米国医薬品安全局) の承認を得た標準 EGFR 検査法として全世界で幅広く使用されている。また、今日までに実施された多くの臨床試験において、試験対象症例の選択に使用されている^{8,9)} (表2)。

IV. EGFR 染色の結果判定と解釈

大腸癌組織における EGFR 染色の結果は腫瘍細胞の細胞膜に陽性シグナルが認められた場合、陽性と判定する。「シグナルのパターンが連続性かどうか」や「シグナル強度がどうか」は問われない。その根拠となっているのはセツキシマブの代表的な臨床試験 (EMR62202-007/通称 BOND 試験) における EGFR の発現強度・陽性率とセツキシマブの奏効率の解析結果である。免疫染色の結果、セツキシマブとイリノテカンを併用投与した群を、EGFR を発現している細胞の割合が 10% 以下、10～20%、20～35%、35% 以上の 4 群に分けて奏効率を比較した結果、いずれも 20～24% で一定していた。EGFR の染色強度を “Faint”, “Weak or moderate”, “Strong” の 3 群に分けた場合ではそれぞれ 20.8%、24.7%、22.7% と、こちらも差がなかったというものである。

ところで、EGFR 蛋白は腫瘍細胞のみならず、粘膜上皮や扁平上皮などの上皮組織および線維芽細胞、平滑筋細胞、神経周皮細胞など間質を構成するさまざまな細胞においても見られる。固定などの影響により検査上、不適切な組織標本を用いて染色を行った場合、これらの細胞における染色性が低下ないし消失することから、染色の内部コントロールとして利用でき、検査対象として適正な組織標本かどうかの指標として有用である。また、判定対象であ

る大腸癌細胞としばしば混在するため、注意が必要である。大腸癌細胞であるかどうかを確定できない細胞は、判定対象から除外するのが望ましい。

以下、判定の手順の概略を示す。

1. 陽性および陰性細胞株を搭載したコントロールスライドガラスの染色性を観察し、構成試薬の性能やテクニカル・エラーの有無を含め検査精度を確認する。
2. 光学顕微鏡の 4 倍対物レンズを使用して、検体組織内の腫瘍細胞における陽性反応の有無を観察し、陽性反応が認められない場合、判定結果は陰性とする。
3. 陽性反応が認められた場合、対物レンズを 10 倍もしくは 20 倍に切り替え、陽性反応が細胞質か細胞膜に認められるのかを確認する。細胞膜に認められる場合、その染色パターンが全周性および不連続のいずれであっても、また細胞質への反応性の有無を問わず判定結果は陽性とする。一方、陽性反応が細胞質のみに存在する場合、判定結果は陰性となる。

V. 注意を要するアーティファクト

1. 過固定による染色性の低下

通常 24～48 時間程度のホルマリン固定標本においては弱～強度の陽性反応が認められるが、採取後 1 週間固定した標本の上皮では EGFR が陰性化する例がしばしば認められる。

2. 不適切な標本作製による組織の収縮

組織の収縮の原因として、固定から標本作製までの間に生じた上皮成分と間質成分の収縮差が知られている。

3. 組織周辺部に認められるアーティファクト

組織片周囲に認められる非特異反応の原因としては「採取時の組織の座減や乾燥」、「組織固定時の不

適切な取り扱い」、「染色時の標本乾燥」などがあり、こうした非特異反応が見られる部位では特異性を欠く核への陽性反応がしばしば認められる。

4. 不適切な酵素処理による組織の過消化

不適切な酵素処理 (処理時間や反応温度が不適当) や不十分な組織の固定が組織の過消化の原因として考えられる。こうした場合、組織内蛋白が必要以上に除去される結果、透けたような組織標本となり、また多くの場合、免疫組織化学染色の染色強度にも影響がでる。

VI. 今後の展望

KRAS 遺伝子は EGFR を軸とした細胞内シグナル伝達に関与している癌遺伝子であり、通常 EGFR より下流領域に増殖シグナルを伝達する。大腸癌では約40%に KRAS 変異が認められている。KRAS 遺伝子の変異がない患者の場合、EGFR を標的とした治療を用いることで、細胞増殖の EGFR シグナル伝達経路が遮断されやすくなる。一方、KRAS 遺伝子の変異がある場合には EGFR 軸内で無軌道な増殖シグナル伝達カスケードの継続力を保持することが多い。これは EGFR 阻害剤が標的に結合した場合も同様である。なぜなら、現在承認されている EGFR 阻害剤の標的は KRAS 遺伝子の発現や活性よりも上流に位置するためである。セツキシマブやパニツムマブなどの EGFR 阻害剤による治療は KRAS 遺伝子が正常である患者においてのみ有効で、KRAS 遺伝子に変異がある患者では事実上、同薬剤は奏功しないというデータが2008年の米国臨床腫瘍学会 (ASCO2008) で複数報告された¹⁰⁾。

これらの報告を受けて、ASCO2008 総会では EGFR 阻害剤適格患者は全員、治療開始前に KRAS 遺伝子検査を行うべきであるということが推奨された。欧州では既に KRAS 遺伝子の変異がない患者に

のみパニツムマブ治療が承認されている。米国や日本でもセツキシマブの適応がほどなく変更される可能性が高い。

文 献

- 1) Prigent SA, Lemoine NR.: The type 1 (EGF-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res* **4** (1): 1-24, 1992.
- 2) Salomon DS, Bradt R, Ciardiello F, *et al.*: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* **19**: 183-232, 1995.
- 3) Bianco R, Gelardi T, Damiano V, *et al.*: Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 1416-1431, 2007.
- 4) Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, *et al.*: Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor α predicts worse prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer* **89**: 484-487, 2000.
- 5) Scher HI, Sarkis A, Reuter V, *et al.*: Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor α in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res* **1**: 545-550, 1995.
- 6) Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME.: Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, estrogen receptor-positive breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* **963**: 824-828, 1998.
- 7) Pii K, Andersen FG, Jensen S, *et al.*: Characterization of a new monoclonal antibody, clone 2-18C9, for the measurement of Epidermal Growth Factor Receptor expression in solid tumors. *Am Assoc Cancer Res 95th annual meeting, Abst#5029* (2004)
- 8) Cunningham D, Humblet Y, Siena S, *et al.*: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **351**: 337-345, 2004.
- 9) Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJSr. *et al.*: Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* **22**: 1201-1208, 2004.
- 10) Messersmith WA and Ahnen DJ.: Targeting EGFR in colorectal cancer. *N Engl J Med* **359**: 1834-1836, 2008.