

新しい検査法 HER2、ALK、EGFR、CCR4に対する 免疫組織学的検討と分子標的療法

いとうともお
伊藤智雄
Tomoo ITOH

現在、分子標的療法の急速な発達により、病理診断部門の役割はさらに大きなものとなっている。乳癌の分類は旧来の組織亜型以上に分子的亜型 (molecular subtype) の重要性が増多しており、われわれ病理医の行う診断は単なる形態分類から治療法や予後に密接に関連した極めて重要な事項へと変貌してきた。肺癌の分野でも近年大きな知見があり、これまで悪性リンパ腫の世界で知られていた ALK 遺伝子変異が肺腺癌の一群にもみられることが見出された。これは非常に画期的な知見であり、クリゾチニブをはじめとする分子標的薬が登場してきている。イレッサに関しては「EGFR 分子標的療法」が保険収載となり、また、変異 EGFR に特異的な抗体も登場しつつあり、免疫染色における検討も可能となりつつある。また、わが国で高頻度である成人 T 細胞リンパ腫 (ATLL) に関しては、CCR4 タンパクに対する分子標的療法が着目されている。このように、さまざまな分野の腫瘍で新たな標的分子が見いだされ、今後の

がん治療の大きな発展が着目されるところである。これらのタンパク発現の評価は、生検あるいは摘出された組織の免疫組織学的検討で行われることが多く、訓練された臨床検査技師により染色され、病理医によって評価される。今回は、代表的な 4 つのタンパクに関し、その基礎・意義について概説する。

I. HER2

HER2 (human EGFR-related 2) は細胞表面に存在する受容体型チロシンキナーゼであり、上皮成長因子受容体 (EGFR) のファミリーの一つである¹⁾。乳癌の一部で HER2/neu (c-erbB-2) 癌遺伝子の過剰増幅に伴い、細胞膜に過剰発現がみられることがある。乳癌治療薬であるトラスツズマブ (商品名ハーセプチン[®]) は HER2 タンパクに特異的に結合することにより抗腫瘍効果を発揮する。いくつかの作用機序が推測されており²⁾、図 1 に概説する。

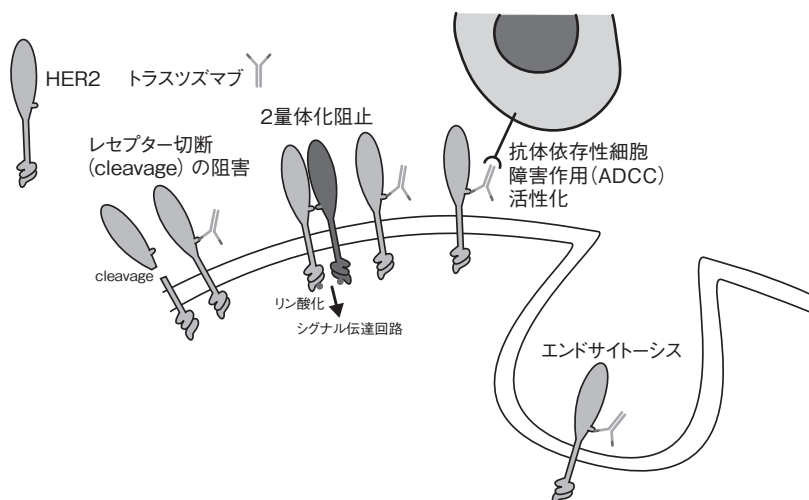


図 1 トラスツズマブ作用機序 (文献 2 より改変)

治療適応の決定には免疫組織化学法と蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization ; FISH) を用いたフローチャートにしたがって決定される (図 2)。

免疫組織化学法は通常の免疫染色と原理は不変であるが、施設間誤差などを防ぐため、厳密に標準化された染色手技や試薬、判定方法を用いて行う必要がある。複数メーカーから体外診断用医薬品が市販されている。

現在、その判定は病理医によって行われ、以下のような基準で行われている (表 1)。

結果は 0, 1+, 2+, 3+ の 4 段階に評価される。このうち、免疫染色結果のみでトラスツマブの治療を行えるものは 3+ のみである。3+ とは、浸潤癌細胞の 30% を超えるものに均一な強度で膜への染色が認められるものである (写真 1)。「乳管内成分」ではなく、「浸潤癌」の部分で評価を行う必要があることに注意が必要である。0, 1+ であった場合には適応

にはならない。2+ であったものは HER2 equivocal とされ、FISH 法で再検査が行われることとなっている。写真 1 に染色結果の一例を示す。

また、前述のごとく、現在は形態ではなく、ホルモンレセプター、HER2 の発現、増殖因子などにより乳癌を内因性サブタイプに分類することが行われるようになった (表 2)。Luminal A・B 乳癌はホルモンに感受性を有する乳癌であり、術後薬物療法の基本はホルモン療法となる。一方 basal type は最も予後の悪いタイプとなる。これらは治療や予後に直結した分類法であり、このような試みが他のフィールドへと広がってゆく可能性が考えられる。

近年は胃癌へとその応用が広がっている。大規模臨床試験 ToGA 試験にて 2010 年に HER2 陽性胃癌に対しトラスツマブの生存改善効果が明らかになったことにより、2011 年 3 月、本邦にて「HER2 過剰発現が確認された治療切除不能な進行・再発の胃癌」に対する適応拡大が承認された。胃癌の領域

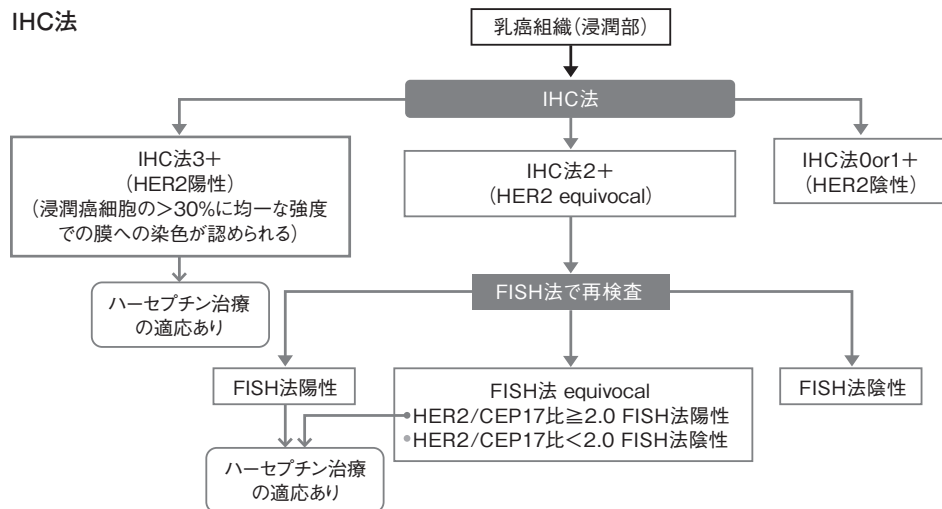


図 2 HER2 免疫染色と FISH 法を用いた適応決定フローチャート

表 1 IHC 法の判定基準 (HER2 検査ガイド第 3 版より)

判定	スコア	染色パターン
陽性	3+	強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞>30%
equivocal	2+	①弱～中程度の完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞≥10% ②強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞≥10%～≤30%
陰性	1+	ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色がある癌細胞≥10% 癌細胞は細胞膜のみが部分的に染色されている
	0	細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞<10% (細胞膜に限局する陽性染色は判定対象外)

においても HER2 陽性胃癌という新たなカテゴリーが誕生し、個別化治療が幕を開けた。胃癌は言うまでもなく、わが国に多い癌であり、大きなインパクトがある。胃癌の HER2 過剰発現の免疫組織学的

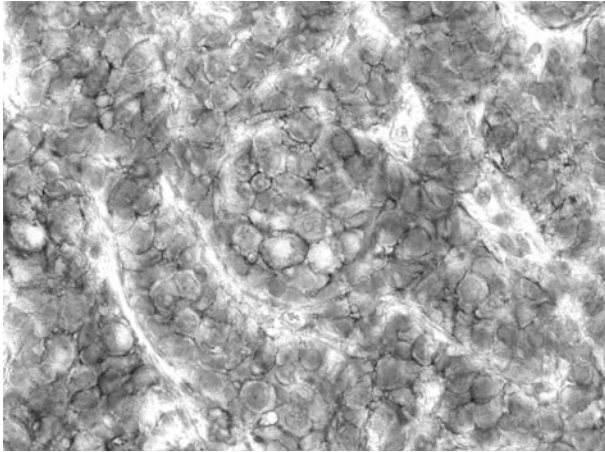


写真 1 乳癌HER2免疫染色2+例

(写真 1 は巻末のカラーページに掲載しています)

表 2 乳癌の molecular subtype

内因性サブタイプ	定義
Luminal A	ER and/or PgR + HER2 - Ki-67 low (< 14%)
Luminal B (HER2-)	ER and/or PgR + HER2 - Ki-67 high
Luminal B (HER2+)	ER and/or PgR + Any Ki-67 HER2 overexpressed or amplified
ErbB2 overexpression	HER2 overexpressed or amplified ER and PgR -
"Basal-type"	ER and PgR - HER2 negative

評価は乳癌とやや異なる判断が求められる。3+, 2+, 1+, 0 の 4 段階に判定することは乳癌と同様であるが、胃癌では管腔側の細胞膜には通常 HER2 の発現を認めない。したがって、側面、基底膜での染色強度を判定することとなる、強度の基準は乳癌と同じに行えばよい。ただし、胃癌の場合には乳癌に比較して染色態度の不均一性が目立つことが多い。腫瘍全体を観察することが求められ、5 個以上の陽性細胞塊があれば陽性としてすることとなっている。いくつかの種類の外診診断用医薬品が市販されているが、やや染色性が異なることにも注意が必要である。胃癌における判定基準を表 3 に示す。

II. ALK

ALK は未分化大細胞型リンパ腫 anaplastic large cell lymphoma (ALCL) の一部において nucleophosmin (NPM) との融合遺伝子が形成されていることが 1994 年に見いだされ³⁾、また、同リンパ腫において ALK 陽性群は陰性群に比較して明らかに予後が良好であることが示された⁴⁾。リンパ腫では核と胞体に陽性となり、ALCL の診断にあたってはすでに欠かせない抗体となっている。

一方、近年、医学の世界で大きな驚きとともに見出されたのが、肺癌における EML4-ALK 融合遺伝子陽性群の発見である⁵⁾。この融合遺伝子の産物が直接癌化に関連していると考えられ、クリゾチニブをはじめとする ALK 阻害剤が有効であることも大規模臨床試験で証明され⁶⁾、近年の肺癌治療における大きなトピックスとしてとらえられている。ALCL、

表 3 胃癌におけるスコアリング判定基準 (胃癌 HER2 検査病理部会作成 HER2 ATLAS 胃癌編より)

Score	切除標本の染色パターン	生検標本の染色パターン	HER2 過剰発現
0	細胞膜に陽性染色なし あるいは細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞が一切片上に10%未満	陽性染色なし あるいは細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞なし	陰性
1+	弱/ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色性がある腫瘍細胞が一切片上に10%以上 腫瘍細胞は細胞膜のみが部分的に染色されている	腫瘍細胞の染色割合に関係なく 弱/ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞クラスター (5個以上の集塊)	陰性
2+	弱-中程度の完全な側方または側方・基底膜側の細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞が一切片上に10%以上	腫瘍細胞の染色割合に関係なく 弱-中程度の完全な側方または側方・基底膜側の細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞クラスター (5個以上の集塊)	境界域 (Equivocal)
3+	強い完全な側方または側方・基底膜側の細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞が一切片上に10%以上 全周性に認められない場合もある	腫瘍細胞の染色割合に関係なく 強い完全な側方または側方・基底膜側の細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞クラスター (5個以上の集塊)	陽性

肺癌のみならず、炎症性線維芽細胞腫、ALK 陽性大細胞 B 細胞性リンパ腫、ALK 陽性組織球症、腎癌などで ALK 融合遺伝子の存在が発見されており、腫瘍により ALK のさまざまなパートナー遺伝子が見出されている。

ALK 融合遺伝子の検出は RT-PCR 法、FISH 法などとともに免疫組織学的手法が重要である。しかし、肺癌の場合、通常の免疫染色手技では陽性を得ることはできず、高感度な方法が求められる。代表的なものとして竹内らの開発した iAEP (intercalated antibody-enhanced polymer) 法が挙げられる⁷⁾。現在はニチレイからキット化され、入手が可能である。その他 VENTANA 社などからもキットが発売されている。正しく染色と解釈を行えば、免疫染色結果と変異の有無は強く相関するが、疑わしい例では FISH 法などによる確認を行うことが望ましい。写真 2 に免疫染色結果を示す。

Ⅲ. EGFR

EGFR 遺伝子変異の存在は肺非小細胞癌治療薬であるゲフィチニブ (商品名イレッサ) の有効性と大きな関連があることがわかっている。同薬剤は EGFR 細胞内ドメインのチロシンキナーゼ領域に存在する ATP 結合部位に結合し、競合的に自己リン酸化を阻害する。EGFR の機能獲得性変異によるシグナルの活性化が発生している癌ではこの薬剤の有効性がある。実際に、カルボプラチン/パクリタキセル併用群とゲフィチニブ群を比較した解析では、EGFR 遺

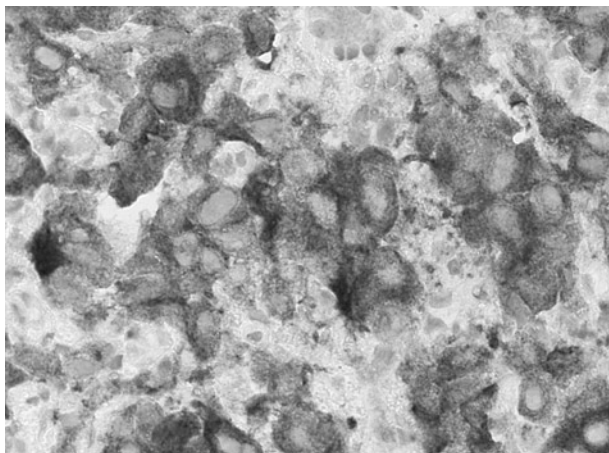


写真 2 肺癌における ALK 免疫染色

(写真 2 は巻末のカラーページに掲載しています)

伝子変異陽性群でのみ、ゲフィチニブが大きく予後改善効果があり、陰性群では逆となることが確かめられ、大きな話題となった。検出方法としては遺伝子変異解析の他、近年は変異 EGFR に特異的な抗体が登場してきており (del 19 および L858R)、その有効性が着目されつつある。

一方、大腸癌では EGFR に対するヒト・マウスキメラ化モノクローナル抗体薬としてセツキシマブが用いられ、EGFR 陽性の治療切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌に適応が認められている。これまで、「EGFR 陽性」の判断に免疫染色が用いられてきたが、実は陰性例との間の奏効率に有意な差は認められていない。一方で RAS 遺伝子 (KRAS/NRAS 遺伝子) に変異がある症例では無効であることが分かっている。本年 4 月から PCR-rSSO 法による大腸癌の組織中の同遺伝子変異の検出が 2,500 点として保険収載となった。このことは本剤の適切な利用を行う上で朗報であろう。

Ⅳ. CCR4

CCR4 (C-C chemokine receptor type 4) は正常組織中では IL-4 および IL-5 などのサイトカインを産生する CD4 陽性ヘルパー 2 型 T 細胞に発現することが知られ、腫瘍においては T 細胞系悪性リンパ腫に高い頻度で発現するケモカイン受容体であり、特に成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATLL) では 90% 近い症例での高発現が知られている。近年協和発酵キリンから CCR4 を標的とするヒト化モノクローナル抗体であるポテリジオ®が「再発・難治性の CCR4 陽性の成人 T 細胞白血病リンパ腫」に対する薬剤として発売され、本邦で CCR4 陽性の再発・再燃成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) を対象に臨床試験が実施され、その有用性が確認された。その機序は HER2 の項でも説明した ADCC 活性によるものと考えられている。とくに、本薬剤は高 ADCC 活性抗体作製技術「POTELLIGENT®」を用い、抗体が保有する糖鎖のうちフコースを低減させることによって ADCC 活性を飛躍的に向上させ、治療効率を高めていることが特徴である。PTCL 非定型型では 3 割程度の陽性率であるが、ATLL では 9 割以上が発現しているとされる。この薬剤の使用には例によって免疫染色による発現の評価が求められる。現在、コン

パニオン診断薬「ポテリジオ®テスト IHC」が協和メデックス株式会社より発売されている。完全にキット化されており、コントロールスライドを含めて発売されている。現在は手染色に限られるが、自動免疫染色装置への応用なども将来的に期待されよう。判断基準は表4に示す通りである。他に、フローサイトメトリー用の「ポテリジオ®テスト FCM」も併売されており、各施設の状態に応じて使い分ければよい。写真3に染色例を示す。

表4 ポテリジオ®テスト IHC 判定基準

判定	基準
陰性	染色される腫瘍細胞が認められないか又は腫瘍細胞のうち陽性細胞(膜及び細胞質に関係なく染色される細胞)が10%未満
陽性	腫瘍細胞のうち陽性細胞(膜及び細胞質に関係なく染色される細胞)が10%以上

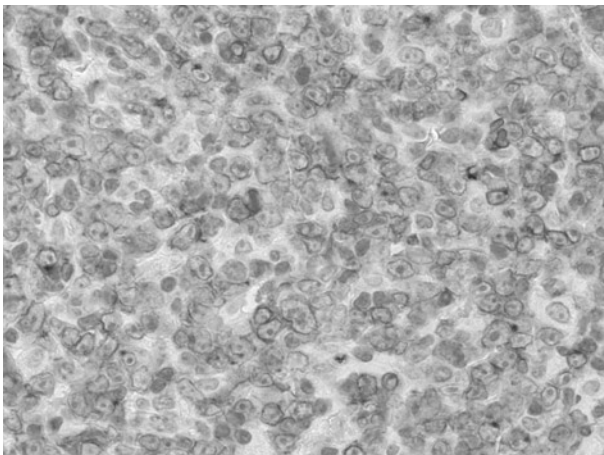


写真3 成人T細胞白血病/リンパ腫におけるCCR4免疫染色。異型細胞に一致して陽性である。

(写真3は巻末のカラーページに掲載しています)

以上、4種類の近年登場してきた治療に密接にかかわる新たな免疫染色検査法を紹介した。いずれも、患者にとっては極めて重要な意味のある検査となる。精度管理は極めて重要である。いずれもプロトコールは厳密に決定されており、正確な手技により安定した結果を得るように各施設において体制整備をお願いしたい。近年は、さまざまな治療関連免疫染色が増加し、病理学の重要性は増してきている。

文 献

- 1) Coussens L., Yang-Feng T. L., Liao Y. C., et al.: Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 1985 ; **230** : 1132-1139.
- 2) Hudis C. A.: Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007 ; **357** : 39-51.
- 3) Morris S. W., Kirstein M. N., Valentine M. B., et al.: Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994 ; **263** : 1281-1284.
- 4) Gascoyne R. D., Aoun P., Wu D., et al.: Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 1999 ; **93** : 3913-3921.
- 5) Soda M., Choi Y. L., Enomoto M., et al.: Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007 ; **448** : 561-566.
- 6) Shaw A. T., Kim D. W., Nakagawa K., et al.: Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013 ; **368** : 2385-2394.
- 7) Takeuchi K., Choi Y. L., Togashi Y., et al.: KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 ; **15** : 3143-3149.