

|||||
原 著
|||||

CD-DST 法を用いた乳癌 intrinsic subtypes における 抗癌剤感受性試験の検討

獨協医科大学越谷病院 乳腺センター

林原 紀明 小川 利久 辻 英一 石綱 一央

要 旨 乳癌の個別化治療が進む中で、依然としてエストロゲンレセプター (ER) や HER2 遺伝子の発現状況と化学療法の薬剤感受性との関係には不明な点が多い。今回我々は Collagen gel Droplet embedded culture Drug Sensitivity Test (CD-DST 法) を用いた抗癌剤感受性試験を行い、乳癌の subtype と薬剤感受性の関係について検討を行った。対象は乳癌患者 60 例 59 検体で、5-FU は 34 検体、epirubicin は 35 検体、paclitaxel は 29 検体で抗癌剤感受性の評価が可能であった。5-FU, epirubicin, paclitaxel いずれの薬剤においても HER2 発現状況と抗癌剤感受性との間に有意な相関は認められなかった。ER の発現を認めるホルモン陽性乳癌では epirubicin に対する薬剤感受性が有意に低下し、5-FU, paclitaxel に対しても感受性が低い傾向が認められた。術前化学療法施行例では抗癌剤感受性試験の評価可能率が低下する事が判明した。CD-DST 法は今後の乳癌化学療法を選択する上で、有用となりうる可能性が示唆された。

Key Words : 抗癌剤感受性, CD-DST 法, 乳癌サブタイプ, ホルモンレセプター, HER2 過剰発現

緒 言

従来より乳癌の予後予測因子として、腫瘍径、リンパ節転移個数などがあげられてきたが、近年、分子生物学の発展とともに、エストロゲンレセプター (ER) や HER2 遺伝子の発現、Ki-67 などの分子マーカーを用いた乳癌の分類 (subtype) と予後、治療効果予測がなされている¹⁾。また遺伝子解析技術の普及にともない遺伝子発現解析を用いた予後因子の同定がなされており、化学療法の適応の見極めに関する有用性が示唆されている²⁾。

しかし、このような乳癌の個別化治療が進む中で、乳癌の subtype に応じて薬物治療の方向性が定められてきたが、依然としてエストロゲンレセプターや HER2 の発現状況と化学療法の薬剤感受性、また化学療法による薬剤感受性の変化、耐性の獲得については不明な点が多い。Collagen gel Droplet embedded culture Drug Sensitivity Test (CD-DST 法) は Type I 型コラーゲンを用いた

微量三次元培養法を用いる事で、ヒトがん細胞の初代培養に適していると考えられ、また生体濃度に近い接触条件下で抗癌剤感受性を測定できるため、実臨床に即した検査法である³⁾。今回、我々はこの CD-DST 法を用いて、抗癌剤薬剤感受性試験を行い、乳癌の化学療法の効果を予測し、乳癌の subtype と薬剤感受性、また化学療法による感受性の変化について、検討を行い報告する。

方 法

対象：東京大学医学部附属病院・乳腺内分泌外科における 2008 年 1 月から 2012 年 9 月までの検体採取可能であった乳癌患者 60 例 59 検体を対象とした。本研究は東京大学医学部倫理委員会において承認済みであり、検査に際しては文書による患者の同意も取得されている。年齢は 34 から 83 (平均 60.4) 歳で、乳腺組織が 53 検体でリンパ節組織が 6 検体 (腋窩リンパ節 6 検体) であった。乳腺組織検体は全例浸潤癌で、乳頭腺管癌 17 例、充実腺管癌 9 例、硬癌 18 例、apocrine 癌 4 例、粘液癌 1 例、浸潤性小葉癌 4 例であった。また分子マーカーではエストロゲンレセプター陽性が 33 例、陰性が 26 例であり、HER2 遺伝子の発現では、HER2 陽性が 17 例、陰性が 42 例であった。また乳癌の分類である intrinsic subtype では、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプタ

平成 27 年 7 月 30 日受付, 平成 27 年 9 月 2 日受理
別刷請求先: 林原紀明

〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷 2-1-50
獨協医科大学越谷病院 乳腺センター

一の発現を認める luminal type が 28 例, ホルモンレセプターと HER2 蛋白が共に発現している luminal-HER2 type が 8 例, ホルモンレセプター陰性で HER2 蛋白の発現が認められる HER2-enrich が 9 例, ホルモンレセプター, HER2 蛋白いずれも発現が認められない triple negative が 14 例であった. 術前に化学療法を施行した症例は 11 例であった.

方法: 手術による摘出検体の腫瘍部分を無菌的に 1 cm³ 大摘出し, 直後に培養液中に冷保存をし, 摘出後 30 時間以内に冷凍保存を行った. その後, 腫瘍を細切し, 細胞分解酵素を用いて 37°C で 2 時間処理をした. 次にコラーゲン・ゲル・フラスコで予備培養を行い, 血球・壊死細胞・非細胞成分を除去し生細胞のみを回収した. そして 30 μL のコラーゲングル中に細胞を包埋し三次元培養を行い, 培養後に 5-FU を 1.0 μg/ml, epirubicin を 0.1 μg/ml, paclitaxel を 1.0 μg/ml で 24 時間培養細胞と接触させた後, 線維芽細胞の増殖を抑制させ無血清増殖培養を 7 日間行い, ニュートラルレッド染色にて生細胞のみ画像解析定量を行った. 癌細胞コロニーの体積を薬剤非接触群 (C) と薬剤接触群 (T) との相対増殖率の比 T/C (%) 値を求め, 50% 以下を高感受性, 50 から 60% を中等度感受性, 60% 以上を低感受性とした.

結 果

59 検体中 37 検体 (62.7%) がいずれかの抗癌剤感受性で評価可能であった (表 1). 5-FU は 37 検体中 34 検体 (91.9%), epirubicin は 37 検体中 35 検体 (94.6%), paclitaxel は 37 検体中 29 検体 (78.3%) で評価可能であった. 評価不能検体が 22 検体 (37.2%) に認められた. 評価可能であった検体の感受性試験の結果は, 5-FU は 34 検体中 6 検体が高感受性であり, 7 検体が中等度感受性, 21 検体が低感受性であった. epirubicin は 35 検体中 14 検体が高感受性であり, 2 検体が中等度感受性, 19 検体が低感受性であった. paclitaxel は 29 検体中 11 検体が高感受性であり, 4 検体が中等度感受性, 14 検体が低感受性であった.

<HER2 過剰発現と抗癌剤感受性>

HER2 過剰発現の有無と薬剤感受性との関連については, 5-FU に対する評価が可能であった 34 検体のうち, HER2 過剰発現は 10 検体あり, 2 検体で 5-FU 高感受性であり, 2 検体が中等度感受性, 6 検体が低感受性であった. HER2 低発現は 24 検体で, そのうち高感受性は 3 検体であり, 中等度感受性が 6 検体, 低感受性が 15 検体であった. また epirubicin に対する評価が可能であった 35 検体のうち HER2 過剰発現は 10 検体あり, 4 検体で

表 1 CD-DST 法にて評価可能であった乳癌患者 37 症例の背景

	評価可能数 (n=37)
年齢	
50 ≤	28
<50	9
検体材料	
乳腺	33
リンパ節	4
病理組織型	
乳頭腺管癌	14
充実腺管癌	1
硬癌	13
小葉癌	3
アポクリン癌	2
その他	4
転移リンパ節数 (n)	
n=0	14
1 ≤ n < 4	10
4 ≤ n	13
ホルモンレセプター	
陽性	17
陰性	20
HER2 過剰発現	
過剰発現あり	11
過剰発現なし	26
Subtype	
luminal	16
luminal/HER2	4
HER2-enrich	7
triple negative	10
病期分類	
I	6
II A	13
II B	10
III A	5
III B	2
III C	1
IV	0

epirubicin 高感受性, 0 検体が中等度感受性, 6 検体が低感受性であった. また HER2 低発現は 25 検体で, そのうち高感受性は 11 検体で, 中等度感受性が 1 検体, 低感受性が 13 検体であった. 同様に paclitaxel に対する評

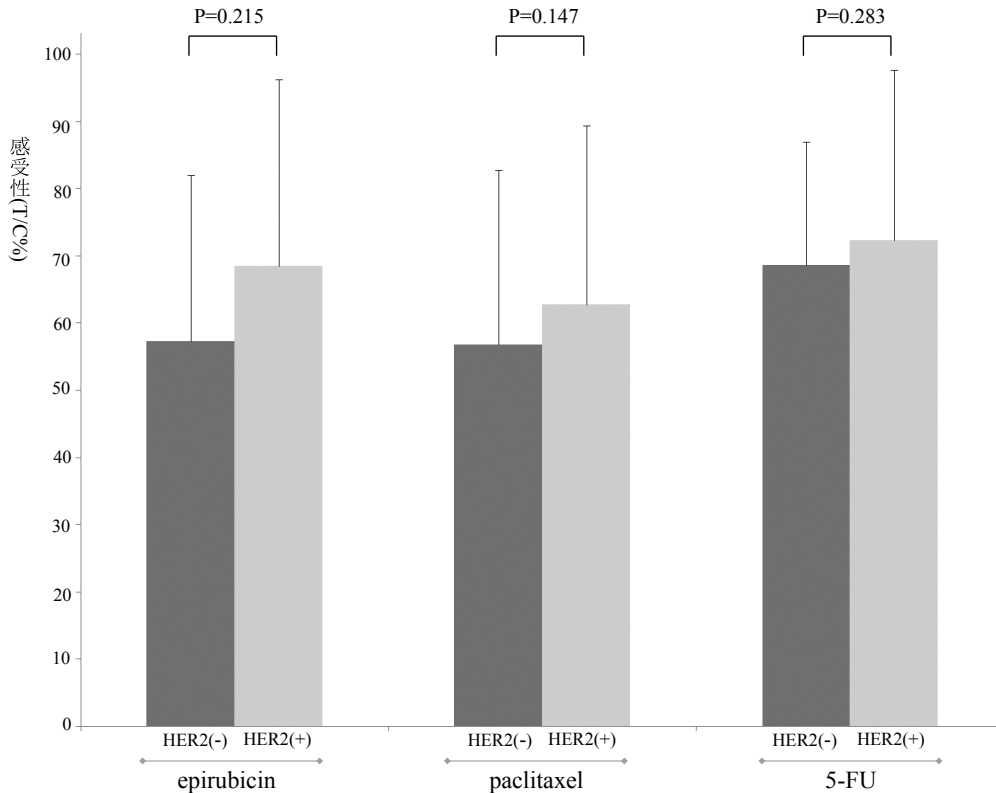


図1 HER2 過剰発現群における抗瘍剤感受性

HER2 過剰発現群における5-FU, epirubicin, paclitaxel に対する抗瘍剤感受性を示す。いずれの薬剤においてもHER2 過剰発現の有無と抗瘍剤感受性との間には有意な相関は認められなかった。

価が可能であった29検体のうちHER2 過剰発現は10検体あり、そのうち4検体でpaclitaxel 高感受性、1検体が中等度感受性、5検体が低感受性であった。さらにHER2 低発現症例は19検体であり、そのうち高感受性は8検体、中等度感受性が2検体、低感受性が9検体であった。5-FU, epirubicin, paclitaxel いずれの薬剤においてもHER2 過剰発現の有無と抗瘍剤感受性との間には有意な相関は認められなかった(図1)。

<エストロゲンレセプター発現状況と抗瘍剤感受性>

エストロゲンレセプターの発現の有無と薬剤感受性との関連については、5-FU に対する評価が可能であった34検体のうち、エストロゲンレセプター陽性症例は17検体あり、そのうち2検体で5-FU 高感受性、3検体が中等度感受性、12検体が低感受性であった。またエストロゲンレセプター陰性症例は17検体で、そのうち高感受性は3検体、中等度感受性が5検体、低感受性が9検体であった。またepirubicin に対する評価が可能であった35検体のうちエストロゲンレセプター陽性症例は18検体あり、そのうち7検体でepirubicin 高感受性、0検

体が中等度感受性、11検体が低感受性であった。一方、エストロゲンレセプター陰性症例は17検体で、そのうち高感受性は8検体で、中等度感受性が1検体、低感受性が8検体であった。同様にpaclitaxel に対する評価が可能であった29検体のうちエストロゲンレセプター陽性症例は13検体あり、そのうち6検体でpaclitaxel 高感受性、1検体が中等度感受性、6検体が低感受性であった。また、エストロゲンレセプター陰性症例は16検体で、そのうち高感受性は6検体、中等度感受性が2検体、低感受性が8検体であった。今回の我々の検討では、エストロゲンレセプターの発現状況とepirubicin との感受性には有意な相関が認められ($p=0.04^*$)、エストロゲンレセプターの発現を認めるホルモン陽性乳癌はepirubicin に対する薬剤感受性が相対的に低下することが判明した。また5-FU, paclitaxel に関しても有意な相関とまではいかなかったが、epirubicin 同様エストロゲンレセプター陽性乳癌は薬剤感受性が低い傾向が認められた(図2)。

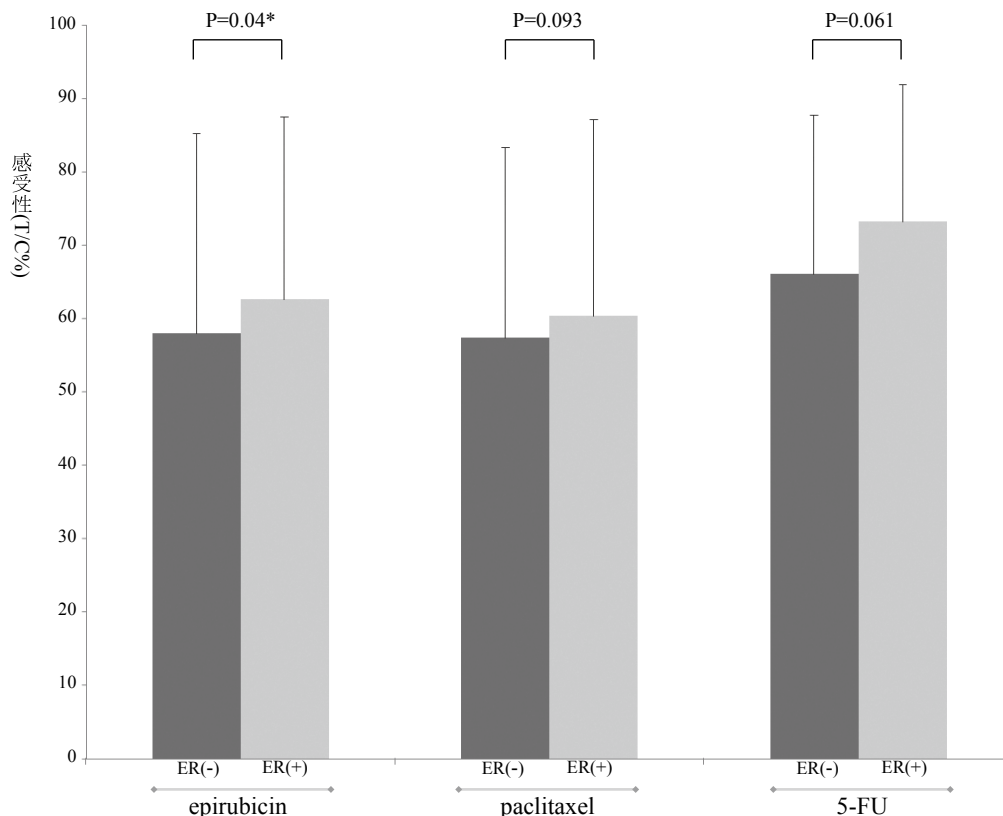


図2 エストロゲンレセプター発現群における抗癌剤感受性

エストロゲンレセプター発現群における5-FU, epirubicin, paclitaxelに対する抗癌剤感受性を示す。エストロゲンレセプター発現群では対照群（エストロゲンレセプター非発現群）と比較してepirubicinに対する感受性は有意に低下しており（ $P=0.04^*$ ）、5-FU, paclitaxelへの感受性においても低下傾向を示した。

＜術前化学療法と感受性評価率との相関＞

今回の我々の検討において抗癌剤感受性の評価が可能であった37検体のうち、術前化学療法を施行した症例は4例（10.8%）であった。一方、感受性試験において腫瘍細胞の培養にて生細胞が増殖せず、評価不能判定となった症例22検体のうち術前化学療法を施行した症例は7検体（31.8%）であり、感受性試験評価不能判定群に術前化学療法施行例が多く存在した。術前化学療法施行の有無と抗癌剤感受性評価可能率との間には有意な相関が認められ（ $p=0.049^*$ ）、術前化学療法を施行すると、抗癌剤感受性試験の評価可能率が低下することが判明した（図3）。

考 察

従来より乳癌の予後予測因子として、腫瘍径や、リンパ節転移個数があげられており、腫瘍径が2cm以上の症例や、リンパ節転移陽性症例が術後化学療法の適応とされてきた。しかし、近年の遺伝子発現解析により、腫瘍径、リンパ節転移個数ではなく、ホルモンレセプターの

発現状況、HER2蛋白の過剰発現の有無、Ki-67腫瘍増殖因子の発現といった腫瘍の生物学的特性にもとづき化学療法の適応が決定され、今日ではホルモンレセプターを発現し、増殖能が低いとされる乳癌以外の症例は、化学療法の適応とされている。

化学療法の抗腫瘍効果を判定する方法として、ヌードマウスを用いた*in vivo*法と腫瘍検体を用いた*in vitro*法がある。また*in vitro*法にも腫瘍組織を用いたHDRA法（Histoculture Drug-Response Assay）⁴⁾と腫瘍細胞を用いる方法があるが、今回我々が採用したCD-DST法は腫瘍細胞を用いる方法である。CD-DST法の特徴として、少ない細胞数で検査可能である事、無血清培養および画像比色定量を用いることにより線維芽細胞の影響を除去できる事、また生体内の薬剤濃度をより正確に反映している事があげられ、実臨床に応用しやすい検査法である⁵⁾。CD-DST法を用いた乳癌に対する抗癌剤感受性試験において、その検体における感受性評価可能率は64から84.3%^{6,7)}との報告があり、今回の我々の検討においても、その感受性評価可能率は62.7%と諸家の報告と同程

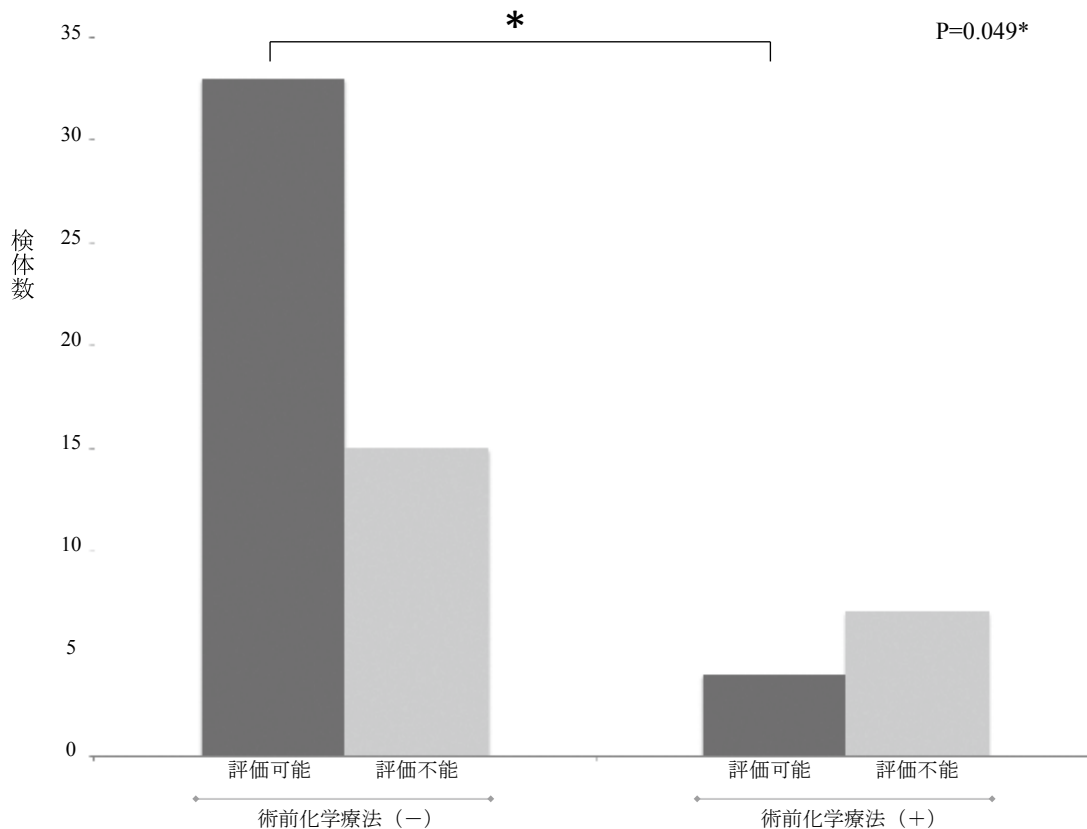


図3 術前化学療法と感受性評価

術前化学療法未施行群では術前化学療法施行群と比較して、有意に感受性評価可能症例を多く認めた ($P=0.049^*$)。

度の評価可能率であった。評価不能と判定された原因としては腫瘍中心部から検体を採取したことにより、central necrosisにより viability の低下していた腫瘍細胞を多く採取してしまった可能性が考えられた。

近年の遺伝子解析の発展に伴い、乳癌もその遺伝子発現型により4つの subtype に分類される事がわかっている⁸⁾。この subtype は本来は MammaPrint, OncoType DX といった多遺伝子解析試験により決定づけられるものであるが⁹⁾、実臨床ではエストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、HER2, Ki-67 の過剰発現を病理検体において免疫染色を行い、これらの発現状況から luminal (ホルモンレセプター陽性/HER2陰性), luminal-HER2 (ホルモンレセプター陽性/HER2陽性), HER2-enrich (ホルモンレセプター陰性/HER2陽性), triple-negative (ホルモンレセプター陰性/HER2陰性) の4つの subtype を決定している。これらの subtype はそれぞれ、予後や治療効果が異なる事が知られており、例えばホルモン陽性乳癌では、化学療法は奏功しづらく¹⁰⁾、luminal型の乳癌では化学療法による過剰治療をさけるため、術後化学療法の適応として、核 grade 3, 4個

以上のリンパ節転移、低ホルモン感受性、Ki-67が高値といった、腫瘍の増殖傾向が高い症例にのみ使用することが推奨されている^{11,12)}。今回の我々の検討でも、エストロゲンレセプター陽性の検体は陰性の検体と比較して epirubicin に対して有意に感受性が低く、また5-FU, paclitaxel に対しても、統計学的有意差はでなかったものの、エストロゲンレセプター陽性症例の薬剤感受性は低い傾向を示した。またこれらの検討により、やはり luminal型の乳癌の治療には化学療法は奏功しにくい、腫瘍増殖能が高い症例に対して化学療法を施行する際には、epirubicin よりも5-FUやpaclitaxelを用いたレジメンのほうがより高い奏功率となる可能性が示唆された。一方HER2陽性乳癌は化学療法が奏功しやすい事が知られており¹³⁾、特にアンシラサイクリン系薬剤の標的酵素とされる topoisomerase II alpha (topo II alpha) は、ヒト染色体17q領域に位置し、HER2遺伝子の近傍に位置する事から topo II の異常に伴って HER2 の異常が生じる事が知られている。よって HER2 のアンシラサイクリン系薬剤に対する感受性は、主に topo II により規定されていると考えられている^{14,15)}。今回の我々の検討では

HER2 過剰発現と薬剤感受性との間に相関は認められなかったが、HER2 陰性検体数が 25 例であるのに対し、HER2 陽性検体数が 10 例と HER2 陽性検体数が少なく、さらなる症例の蓄積が必要であると思われた。また術前化学療法を施行する事により、腫瘍の viability が低下し、腫瘍増殖因子である Ki-67 の発現が低下する事が知られているが¹⁶⁾、術前薬物療法の治療においても、腫瘍増殖が抑制され Ki-67 の発現量が低下し、予後の改善が見込まれると言われており^{17,18)}、術前化学療法により腫瘍の増殖能、viability の低下が引き起こされると考えられている。今回の我々の検討においても、術前化学療法施行症例では有意に感受性評価可能率が低下しており、原因として術前化学療法による腫瘍の viability の低下により、腫瘍細胞の培養が困難であった可能性が考えられた。

近年、乳癌領域においても、個々の患者に対して最大限の効果が得られるよう、予後予測因子、治療効果予測因子に基づき治療法を選択するテーラーメイド治療が行われている。しかし、治療効果予測因子として遺伝子プロファイルが有用ではあるが、あくまで化学療法を施行すべきかどうかの判定にすぎず、実際の使用にあたって、多くの抗癌剤の中からどの薬剤を選択すべきであるのかは現在のテーラーメイド治療においても不明な点が多い。そこで術前の生検検体をもちいて CD-DST 法による薬剤感受性試験を行い、感受性の認められる抗癌剤を選択することでより確実なテーラーメイド治療を行うことができると考えられる。しかし、術前の生検検体で CD-DST 法を施行するには、生検で得られる検体量が少量である為、薬剤感受性試験を施行することが困難であると思われる。確実なテーラーメイド治療を行うためには、今後は 10G 針によるバコラ生検など、検体量をより多く得る工夫が必要であると思われた。

結 論

乳癌の subtype 別に、抗癌剤と腫瘍縮小効果の相関を CD-DST 法による抗癌剤感受性試験において検討した。HER2 過剰発現と薬剤感受性との相関は認められなかったが、ホルモンレセプター陽性の乳癌では、epirubicin に対して有意に低感受性が認められており、CD-DST 法は今後の乳癌化学療法を選択する上で、有用となりうる可能性が示唆された。

文 献

1) Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al : Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer : highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast

Cancer. *Ann Oncol* **22** : 1736-1747, 2011.

- 2) Paik S, Shak S, Tang G, et al : A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* **347** : 1999-2009, 2004.
- 3) Kobayashi H, Higashiyama M, Minamigawa K, et al : Examination of in vitro Chemosensitivity test using collagen gel droplet culture method with colorimetric endpoint quantification. *Jpn J Cancer Res* **92** : 203-210, 2001.
- 4) Kubota T, Sasano N, Abe O, et al : Potential of the histoculture drug-response assay to contribute to cancer patient survival. *Clin Cancer Res* **1** : 1537-1543, 1995.
- 5) 北川透, 伊藤壽記, 吉川正人, 他 : 消化器癌術後補助化学療法の個別化に向けて : 抗癌剤感受性試験 (CD-DST 法) の可能性. *癌の臨床* **51** : 19-25, 2005.
- 6) Takamura Y, Kobayashi H, Taguchi T, et al : Prediction of chemotherapeutic response by collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test in human breast cancers. *Int J Cancer* **98** : 450-455, 2002.
- 7) 山本祐司, 渡辺祐司, 石田直樹, 他 : 当科における CD-DST 法を用いた乳癌に対する抗癌剤感受性試験の検討. *癌と化学療法* **35** : 793-796, 2008.
- 8) Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al : Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 8418-8423, 2003.
- 9) Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, et al : Comparison of PAM50 risk of recurrence score with onco-type DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol* **31** : 2783-2790, 2013.
- 10) Regan MM, Pagani O, Walley B, et al : Premenopausal endocrine-responsive early breast cancer : who receives chemotherapy? *Ann Oncol* **19** : 1231-1241, 2008.
- 11) Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, et al : Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer : toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res* **10** : R65, 2008.
- 12) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group : Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer : meta-analysis of long-term outcome among 100,000 women in 123 ran-

- domised trials. *Lancet* **379** : 432-444, 2012.
- 13) Muss HB, Thor AD, Berry DA, et al : c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* **330** : 1260-1266, 1994.
 - 14) Paik S, Bryant J, Park C, et al : erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **90** : 1361-1370, 1998.
 - 15) Park K, Kim J, Lim S, et al : Topoisomerase II α (topo II) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. *Eur J Cancer* **39** : 631-634, 2003.
 - 16) Avci N, Deligonul A, Tolunay S, et al : Neoadjuvant chemotherapy-induced changes in immunohistochemical expression of estrogen receptor, progesterone receptor, HER2, and Ki-67 in patients with breast cancer. *J BUON* **20** : 45-49, 2015.
 - 17) Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al : Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **99** : 167-170, 2007.
 - 18) Dowsett M : Neoadjuvant endocrine therapy : patient selection, treatment duration and surrogate endpoints. *Breast* **24**(Suppl 1) : PG8.02, 2015.

**Breast Cancer Subtypes and anti-cancer Drug Sensitivity
Based on a Collagen Gel Droplet Embedded Culture Drug Sensitivity Test**

Noriaki Hayashibara, Toshihisa Ogawa, Eiichi Tsuji, Kazuo Ishizuna

Breast Center, Dokkyo Medical University Koshigaya Hospital

Breast cancer is classified into four subtypes according to estrogen receptor (ER) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression. The biological subtypes have a spectrum of clinical, pathologic, and molecular features. Here, we investigated the correlation between the breast cancer subtype and chemosensitivity using the collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST). The response to 5-fluorouracil (5-FU) was examined in 34 specimens ; the response to epirubicin, in 35 ; and the response to paclitaxel, in 29. HER2 overexpression was not significantly correlated to the chemotherapeutic

response to 5-FU, epirubicin, or paclitaxel. ER-positive breast cancer was significantly less sensitive to epirubicin and tended to be refractory to 5-FU and paclitaxel. The evaluation rate of the anti-drug sensitivity test was significantly lower in the group that received neoadjuvant chemotherapy. CD-DST could be useful in choosing anti-cancer drug agents for breast cancer patients.

Key Words : CD-DST, intrinsic subtypes, HER2 overexpression, estrogen receptor, chemosensitivity.