

## 総説 (教授就任記念講演)

### 個別治療化のための分子病理診断の展望

上原久典

徳島大学病院病理部

(平成30年3月2日受付) (平成30年3月9日受理)

#### はじめに

近年、がんの増殖に関連した特定の遺伝子や蛋白質の働きを阻害する薬剤が開発されてきており、これらを用いた治療は分子標的治療と呼ばれている<sup>1)</sup>。分子標的治療では、がん細胞が標的となる遺伝子や蛋白質をどの程度発現しているかが、適応の決定に重要な要因となるが、その評価は多くの場合病理組織検体を用いて行われている。例えば、乳癌の場合、HER2 (human epidermal growth factor receptor type 2) タンパクが癌細胞の増殖に関与していることが知られているが、HER2タンパクを標的とする薬剤を用いた治療を選択するためには、免疫組織染色法などにより乳癌細胞がHER2タンパクを一定のレベル以上に発現していることを確認する必要がある。肺癌の場合、EGFR (epidermal growth factor) や ALK (anaplastic lymphoma kinase) を始めとする多くの治療標的分子が明らかにされ、それぞれを標的とする薬が開発されており、治療薬の選択のために乳癌と同様に病理検体が用いられている。現在、多くの悪性腫瘍に対して分子標的治療薬が次々と開発されており、治療薬選択のための分子病理診断のニーズは増え続けている。

われわれは診療面では上に述べたような分子標的治療のための病理診断に取り組んでいるが、研究面では癌細胞と正常細胞の相互作用という観点から前立腺癌や乳癌を中心に新たな治療標的となる分子の探索・解析を行っている。例えば前立腺癌と骨組織の相互作用を調べた研究では、動物モデルにおいては PDGF (platelet-derived growth factor) と PDGF-R (receptor) が、前立腺癌細胞と骨芽細胞の共培養モデルでは接着分子である N-cadherin や cadherin-11 が、癌の増殖や進展に重要な役割を果たしており、治療標的となる可能性があることを明らかにしてきた。

本稿では病理診断、研究の両面から個別治療化のための分子病理診断の展望について概説する。

#### 分子病理診断の概要

病理診断とは、検査のために病変部から採取された組織片や細胞、および手術で摘出された臓器・組織について、ガラス標本を作製し、顕微鏡で観察して診断を行うことである。以前は病変部の肉眼所見と通常用いられる HE (hematoxylin & eosin) 染色、および PAS (periodic acid-Schiff) 染色など多くの特殊染色によって診断が行われてきた。これらは病理診断の基礎となるものであり、その重要性に変わりはないが、現在では、それに加えて病変部の細胞におけるさまざまな分子の発現、遺伝子変異、転座等の情報を加えた分子病理診断が求められるようになってきている。

分子病理診断の発達によって、以前は形態の違いによって行われていた腫瘍の分類が、次第に分子発現の違いによる腫瘍細胞の起源や予後の差を加味して行われる方向に変わってきている。例えば乳癌の診断では、通常形態分類に加えて、癌細胞における ER (estrogen receptor), PgR (progesterone receptor), HER2 の発現の有無などによる分子サブタイプが用いられるようになってきている<sup>2)</sup>。さらに、分子病理診断が求められている最も大きな理由として、分子標的治療の発達があげられる。分子標的治療を行う際には治療の効果や副作用を投薬前に予測するためにはがん細胞が標的となる遺伝子や蛋白質をどの程度発現しているかを検査する。こういった治療個別化のための検査はコンパニオン診断と呼ばれ、病理組織標本、特にホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いることが多い。

## コンパニオン診断

コンパニオン診断を行う際によく用いられる手技として免疫組織化学法と *in situ* ハイブリダイゼーション法がある。免疫組織化学法は免疫染色とも呼ばれ、特定の分子に対する抗体を用いて組織内におけるその分子の発現を検出する。一次抗体を組織と反応させたのち、一次抗体に対するビオチン標識された二次抗体を反応させ、avidin-biotin complex や高分子ポリマーによって感度を上げ、DAB (3,3'-Diaminobenzidine) で褐色に発色させるという手順で行われることが多い<sup>3)</sup>。*in situ* ハイブリダイゼーション法では、標識されたプローブが用いられ、組織内でのDNAあるいはmRNAの発現を検出することができる。蛍光標識プローブを用いたFISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法は、特定の遺伝子増幅や染色体転座の検索を行う際に用いられる<sup>4)</sup>。

表1にコンパニオン診断の対象となる主な腫瘍と分子を示しているが、新しい分子標的の発見とそれに対する薬の開発に伴って検査対象となる腫瘍、分子が今後も増えていくと考えられる。その場合、最も問題となるのが、検体の量の問題である。現時点でも検査対象となる分子が多い肺癌の場合の当院での一般的な検査の流れを図1に示す。HE染色標本で腺癌と診断できる場合はすぐに

ALKの免疫染色(図2)を行う。腺癌か扁平上皮癌かの鑑別が難しく、腺癌のマーカであるTTF-1と扁平上皮癌のマーカであるp40の免疫染色(図2)を行う必要がある場合も、当院では治療開始までの時間短縮と再度の薄切による検体のロスを減らすために同時にALKの染色を行っている。ALK陽性の場合には分子標的治療の適応となる。陰性の場合にはEGFRの遺伝子変異の検索を行い、変異がない場合はPD-L1の発現を免疫染色で調べ、陽性細胞が50%未満の場合は細胞障害性抗がん剤を用いる。

HER2発現の検査も当院の乳癌症例で行われている。ガイドラインではHER2の免疫染色での発現レベルをスコア0, 1+, 2+, 3+ (図3)の4つに分け、スコア0と1+を陰性、3+を陽性、2+を境界域としている。スコア2+の場合にはFISH法による検査を追加して判定する。陽性の場合には分子標的薬であるトラストズマブの適応となる。

コンパニオン診断は今後も増加していくと考えられるが、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた免疫染色を行っていく場合、いくつか問題点がある。検体量の問題はすでに述べたが、これについては複数の生検材料を1個ずつ別のブロックに包埋することである程度対応できると考えられる。段階的に検査を進めていくため、

表1 コンパニオン診断の対象となる主な腫瘍と分子

	検査対象	検査方法
肺癌	EGFR	PCR-Invader 等
	ALK	IHC, FISH
	PD-L1	IHC
	ROS1	RT-PCR
大腸癌	RAS	Direct sequence 等
	EGFR	IHC
乳癌	HER2	IHC, FISH
胃癌	HER2	IHC, FISH
頭頸部癌	PD-L1	IHC
悪性リンパ腫	CCR4	IHC
	CD20	IHC
	CD30	IHC
GIST	KIT	IHC
悪性黒色腫	BRAF	Rael-time PCR

EGFR, epidermal growth factor receptor ; ALK, anaplastic lymphoma kinase ; PD-L1, programmed death-ligand 1 ; ROS1, c-ros oncogene 1 ; HER2, human epidermal growth factor receptor type ; CCR4, C-C chemokine receptor type 4 ; PCR, polymerase chain reaction ; IHC, immunohistochemistry ; FISH, fluorescence *in situ* hybridization ; RT, reverse transcription

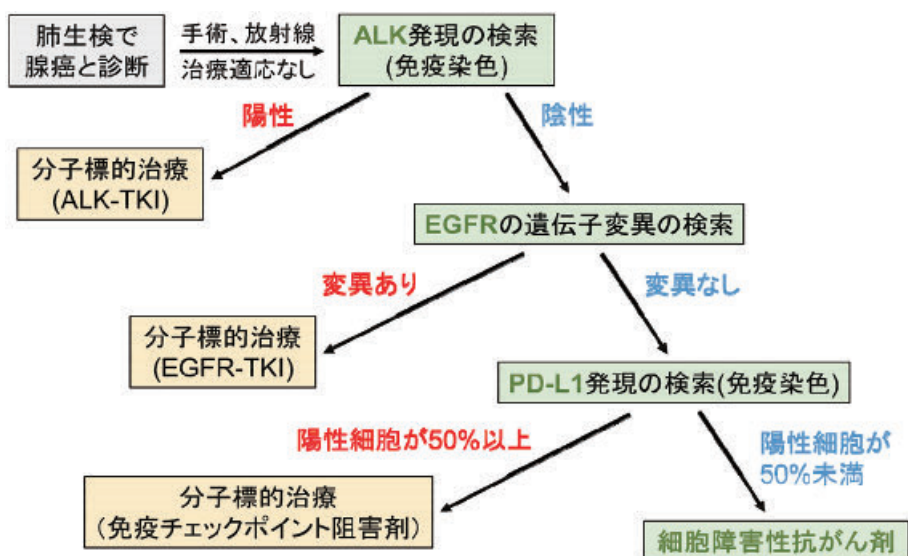


図1 当院における肺癌の分子標的治療適応の検査の流れ  
EGFR, epidermal growth factor receptor; ALK, anaplastic lymphoma kinase; PD-L1, programmed death-ligand 1; TKI: tyrosine kinase inhibitor

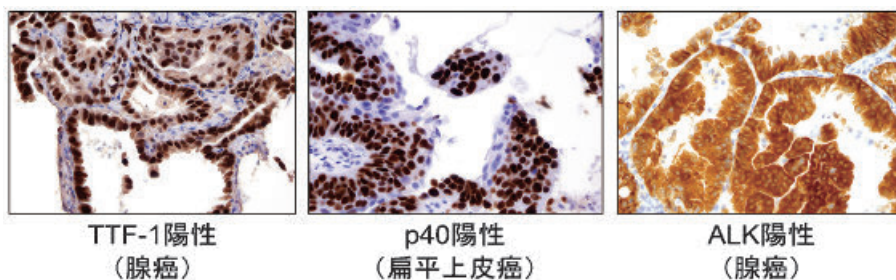


図2 非小細胞肺癌の免疫染色  
非小細胞肺癌の診断において、腺癌と扁平上皮癌の鑑別が難しい場合、TTF-1 (thyroid transcription factor-1)を腺癌のマーカー、p40を扁平上皮癌のマーカーとして免疫染色を行う。その際に当院では、治療開始までの時間短縮と再度の薄切による検体のロスを減らすために同時に ALK の免疫染色も行っている。

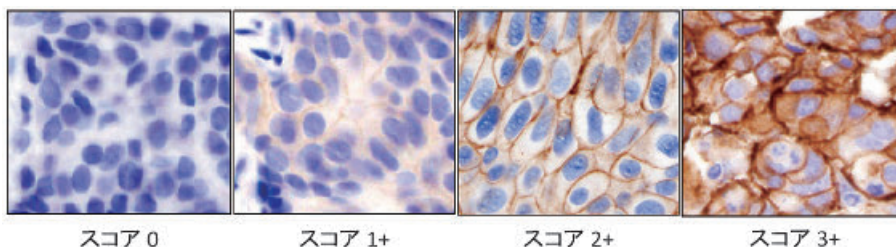


図3 免疫染色による乳癌のHER2発現の評価スコア

結果が出るのに時間がかかってしまうことも問題だが、診断を急ぐあまり病理部門に過剰な負担がかかってしまう可能性もあり、今後対策を考えていく必要がある。また、常に陽性コントロールを付けて免疫染色の質を安定させること、定期的な外部機関による評価、病理医間での評価基準の標準化も重要である。

### 新規治療標的分子の探索・解析

われわれは上に述べたような診療のための取り組みに加え、癌細胞と正常細胞の相互作用という観点から前立腺癌や乳癌を中心に新たな治療標的となる分子の探索、解析を行っている。がんが周囲組織に浸潤するその先進部では、がん細胞と正常細胞の間で、それぞれが分泌するさまざまな物質や細胞接着などによって相互作用が起き、特殊な微小環境が形成されている。この微小環境形成のメカニズムを明らかにし、その中で治療標的となるような分子を見出すことで、がんの浸潤、転移の制御に貢献できると考えている。以下に前立腺癌の骨進展、および周囲脂肪組織への浸潤の制御を目指してわれわれが行った研究をいくつか紹介する。

前立腺癌は、比較的早期から骨転移を示すことが知られている<sup>5)</sup>。われわれは前立腺癌の骨転移機構を明らかにするために動物モデルを用いて検討を行った<sup>6)</sup>。ヌードマウスの脛骨に骨転移巣から樹立されたヒト前立腺癌細胞(PC-3)を移植すると、5~8週間で骨破壊を伴って腫瘍が形成される(図4)。このモデルにおいてPDGF-Rのリン酸化阻害剤が腫瘍抑制に有効かどうかを調べるために、まず、それぞれPDGF, PDGF-R, リン酸化PDGF-Rに対する抗体を用いて免疫染色を行った。PDGF, PDGF-R, リン酸化PDGF-Rはいずれも骨近傍の腫瘍細胞にのみ発現していた。この結果から前立腺癌細胞と骨組織の間に何らかの相互作用が起きていることが示唆された。PDGF-Rのリン酸化が骨周囲の前立腺癌細胞にしか認められなかったため、それ以外の部分の腫瘍細胞に対して抗がん剤を併用するようにして実験をデザインした。PDGF-Rのリン酸化阻害剤としてイマチニブ<sup>7)</sup>、抗がん剤としてタキソールを用いた。前立腺癌細胞をマウスの脛骨に移植後5週間イマチニブとタキソールを投与すると、コントロール群では著しい骨破壊が認められたのに対し、治療群では優位に腫瘍形成頻度が低下し、骨破壊の程度も軽減された。また、PDGFは血管新生因子としても知られており<sup>8)</sup>、治療群では血管新生も抑制された。

これらの結果からPDGF-Rを介したシグナル伝達が前立腺癌細胞の骨での増殖や血管新生に重要であり、治療標的になる可能性が示された<sup>9-12)</sup>。

上に示した動物モデルで病変部において、骨破壊が起きている部分では破骨細胞が誘導されているが、まだ骨破壊が起きていない部分では骨表面は骨芽細胞で覆われており、前立腺癌細胞と接触しているように見える(図5)。そこで、前立腺癌細胞と骨芽細胞の接触がどのよ

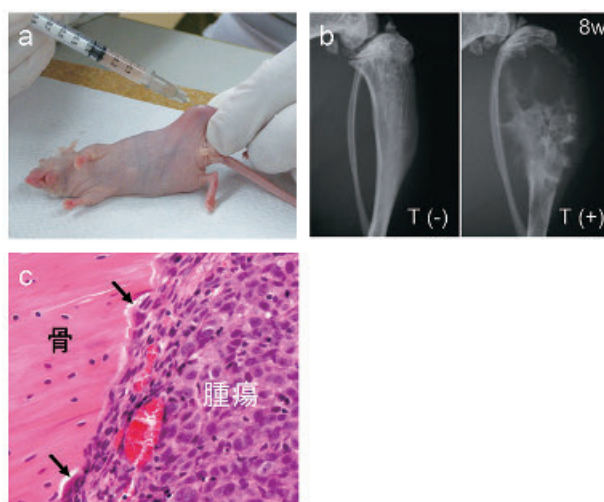


図4 前立腺癌の骨進展モデル  
a) ヌードマウス脛骨へのヒト前立腺癌細胞(PC-3)の移植。  
b) 前立腺癌細胞移植後8週間のX線写真。腫瘍が形成されているT(+)のマウスでは、著しい骨破壊が認められる。T(-)はコントロール。  
c) 癌細胞が破骨細胞(矢印)を誘導しながら骨を破壊している。

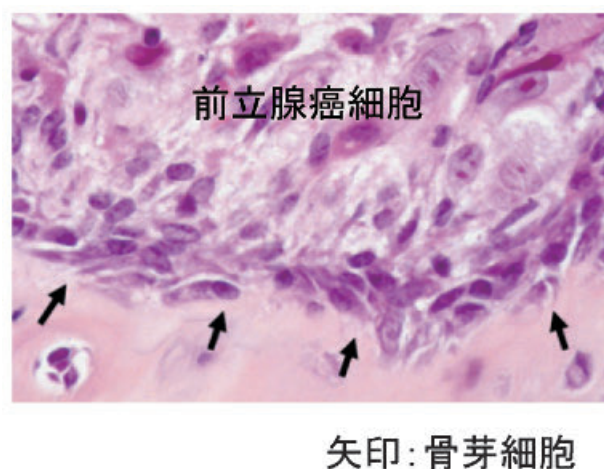


図5 前立腺癌細胞と骨芽細胞の接触

うな相互作用を起こすかを調べるために2種類の共培養モデルを構築した。1つは cell culture insert を用いた二層培養モデルで、上層にヒト骨芽細胞を、下層にヒト前立腺癌細胞を培養することにより、骨芽細胞と前立腺癌細胞の間には可溶性因子を介した相互作用が起こる。もう1つは骨芽細胞と前立腺癌細胞を混合して両者が接触した状態にする接触培養モデルである。このモデルでは可溶性因子と物理的接触による相互作用が起こる(図6)。この2つのモデルで培養した前立腺癌細胞の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイで調べ、比較することにより、物理的接触に特異的な遺伝子発現の変化が検出できる。前立腺癌の骨進展モデルで用いた PC-3 細胞では、*IL1 $\beta$*  (interleukin 1, beta), *COX2* (cyclooxygenase 2), *IL6* (interleukin 6), *C3* (complement component 3) の4つの遺伝子で物理的接触によって特異的に発現上昇が認められた。これらの遺伝子はいずれも破骨細胞誘導に関与していることが知られている<sup>13-16)</sup>。さらにこれらの遺伝子発現上昇は、骨転移との関連が示唆されている接着分子である N-cadherin や cadherin-11<sup>17,18)</sup> の中和抗体で癌細胞をあらかじめ処理しておくことにより阻害された。これらの結果から溶骨性増殖を示すような前立腺癌細胞では、骨芽細胞との接触により破骨細胞形成が促進され、N-cadherin や cadherin-11 を介した細胞接着が治療標的になる可能性が示唆された<sup>19)</sup>。

前立腺は周囲を脂肪組織で囲まれており、前立腺癌が進行すると脂肪組織に浸潤する<sup>20)</sup>。そこで、脂肪細胞と前立腺癌細胞の相互作用についても調べた。われわれは FABP4 (fatty acid binding protein 4) という分子に注目して検討を行った。FABP4は脂肪酸のキャリアタン

パクで、脂肪細胞から血中に放出され、アディポカインの一つと考えられている<sup>21,22)</sup>。FABP4は、*in vitro* で前立腺癌細胞の浸潤を促進したが、FABP4と脂肪酸の結合を特異的に阻害する FABP4 inhibitor の添加によって浸潤が抑制された。さらに、FABP4 inhibitor の経口投与によってマウス皮下での前立腺癌細胞の増殖が抑制された。前立腺癌細胞は FABP4 とともに脂肪酸を取り込み、その脂肪酸を浸潤に利用している可能性が考えられ、FABP4 を介した前立腺癌細胞への脂肪酸供給の抑制が前立腺癌の進展の制御につながる可能性がある<sup>23)</sup>。

われわれはその他にも乳癌、膀胱癌などで正常組織との相互作用に関する研究を進めている。さまざまなモデルを用いて治療標的の候補分子を見出し、その機能を解析し、最終的に診断・治療にフィードバックされるように研究を進展させていきたいと考えている。

#### おわりに

治療が画一的なものから個別化に向かう中で、病理診断も古典的な形態診断から、形態情報にさまざまな分子の発現、遺伝子変異、転座等の情報を加えた分子病理診断へと変化してきた。すでに大量のゲノム情報に基づいた診断・治療も始まりつつあり、今後、病理医の果たす役割はさらに大きくなると考えられる。

#### 文 献

- 1) Baudino, T.A.: Targeted cancer therapy: The next generation of cancer treatment. *Curr. Drug Discov.*

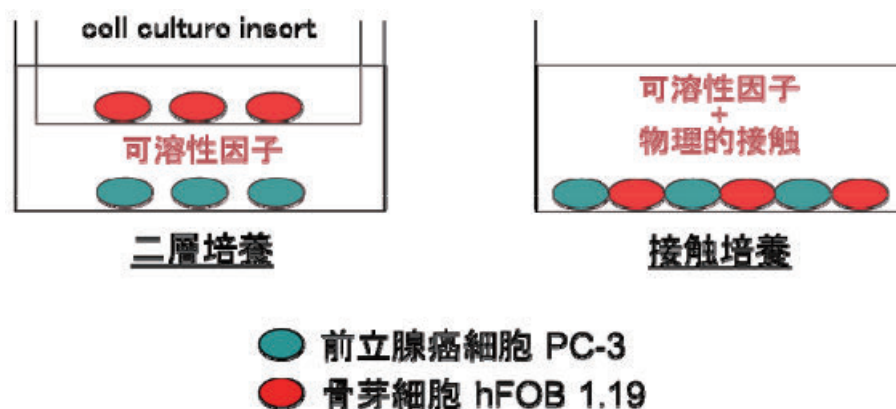


図6 前立腺癌細胞と骨芽細胞の共培養モデル

- Technol., 12 : 3-20, 2015
- 2) S rli , T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., *et al.* : Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 11 : 10869-10874, 2001
  - 3) True, L.D., Liu, A.Y. : A challenge for the diagnostic immunohistopathologist. Adding the CD phenotypes to our diagnostic toolbox. Am. J. Clin. Pathol., 120 : 13-15, 2003
  - 4) Hansel, D.E., Ashfaq, R., Rahman, A., Wanzer, D., *et al.* : A subset of pancreatic adenocarcinomas demonstrates coamplification of topoisomerase IIalpha and HER2/neu : use of immunolabeling and multicolor FISH for potential patient screening and treatment. Am. J. Clin. Pathol., 123 : 28-35, 2005
  - 5) Charhon, S.A., Chapuy, M.C., Delvin, E.E., Valentin-Opran, A., *et al.* : Histomorphometric analysis of sclerotic bone metastases from prostatic carcinoma special reference to osteomalacia. Cancer., 51 : 918-924, 1983
  - 6) Kim, S.J., Uehara, H., Karashima, T., Shepherd, D.L., *et al.* : Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgen-independent human prostate cancer growing in the bone of nude mice. Clin. Cancer Res., 9 : 1200-1210, 2003
  - 7) Grimminger, F., Schermuly, R.T., Ghofrani, H.A. : Targeting non-malignant disorders with tyrosine kinase inhibitors. Nat. Rev. Drug Discov., 9 : 956-970, 2010
  - 8) Uehara, H. : Angiogenesis of prostate cancer and antiangiogenic therapy. J. Med. Invest., 50 : 146-153, 2003
  - 9) Kim, S.J., Uehara, H., Karashima, T., Shepherd, D.L., *et al.* : Effects of blocking platelet-derived growth factor-receptor signaling in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases. J. Natl. Cancer Inst., 19 : 458-470, 2003
  - 10) Kim, S.J., Uehara, H., Yazici, S., Langley, R.R., *et al.* : Simultaneous blockade of platelet-derived growth factor-receptor and epidermal growth factor-receptor signaling and systemic administration of paclitaxel as therapy for human prostate cancer metastasis in bone of nude mice. Cancer Res., 64 : 4201-4208, 2004
  - 11) Kim, S.J., Uehara, H., Yazici, S., He, J., *et al.* : Modulation of bone microenvironment with zoledronate enhances the therapeutic effects of STI571 and paclitaxel against experimental bone metastasis of human prostate cancer. Cancer Res., 65 : 3707-3715, 2005
  - 12) Kim, S.J., Uehara, H., Yazici, S., Busby, J.E., *et al.* : Targeting platelet-derived growth factor receptor on endothelial cells of multidrug-resistant prostate cancer. J. Natl. Cancer Inst., 98 : 783-793, 2006
  - 13) Akatsu, T., Takahashi, N., Debari, K., Morita, I., *et al.* : Prostaglandins promote osteoclastlike cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. J. Bone Miner. Res., 4 : 29-35, 1989
  - 14) Liu, X.H., Kirschenbaum, A., Yao, S., Levine, A.C. : Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- B (RANK) ligand/RANK system. Endocrinology, 146 : 1991-1998, 2005
  - 15) Trebec-Reynolds, D.P., Voronov, I., Heersche, J.N., Manolson, M.F. : IL-1alpha and IL-1beta have different effects on formation and activity of large osteoclasts. J. Cell Biochem., 109 : 975-982, 2010
  - 16) Sato, T., Abe, E., Jin, C.H., Hong, M.H., *et al.* : The biological roles of the third component of complement in osteoclast formation. Endocrinology, 133 : 397-404, 1993
  - 17) Chu, K., Cheng, C.J., Ye, X., Lee, Y.C., *et al.* : Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. Mol. Cancer Res., 6 : 1259-1267, 2008
  - 18) Kii, I., Amizuka, N., Shimomura, J., Saga, Y., *et al.* : Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage. J. Bone Miner. Res., 19 : 1840-1849, 2004
  - 19) Shiirevnyamba, A., Takahashi, T., Shan, H., Ogawa, H., *et al.* : Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts. Br. J. Cancer., 104 : 505-13, 2011
  - 20) Sung, M.T., Eble, J.N., Cheng, L. : Invasion of fat

- justifies assignment of stage pT3a in prostatic adenocarcinoma. *Pathology*, **38** : 309-311, 2006
- 21) Hotamisligil, G.S., Johnson, R.S., Distel, R.J., Ellis, R., *et al.* : Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*, **274** : 1377-1379, 1996
- 22) Boord, J.B., Fazio S, Linton, M.F. : Cytoplasmic fatty acid-binding proteins : emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **13** : 141-147, 2002
- 23) Uehara, H., Takahashi, T., Oha, M., Ogawa, H., *et al.* : Exogenous fatty acid binding protein 4 promotes human prostate cancer cell progression. *Int. J. Cancer*, **135** : 2558-68, 2014

## *Molecular pathological diagnosis for personalized medicine*

*Hisanori Uehara*

*Division of Pathology, Tokushima University Hospital, Tokushima, Japan*

### SUMMARY

In recent years, classical morphology-based pathological diagnosis has moved into molecular diagnosis which is a mixture of morphology and informations such as specific protein expression, genetic mutation, and chromosomal translocation. The progress of molecular pathological diagnosis (MPD) is accompanied by the development of personalized medicine. For example, in molecular targeted therapy, a choice of drugs depends on whether the cancer cells express the targeted molecule or not. The examination of targeted molecules is mainly done by immunohistochemistry using pathological specimens. Therefore the demands of MPD will increase with the discovery of new targeted molecules and drugs. The first part of this review refers the practices and the challenges for the future about MPD.

In addition to daily practice on MPD in the hospital, we have advanced cancer research in the aspect of an interaction between cancer cells and normal cells to discover new molecular targets. In the latter half of this review, we introduce some of our study results such as the targeted molecules in the animal model of prostate cancer development to the bone and those in the co-culture models between prostate cancer cells and osteoblasts.

MPD is now moving to next stage, pathological diagnosis based on a great deal of genomic information. In association with it, the roles of pathologists must be of increasing significance.

Key words : molecular pathological diagnosis, molecularly targeted therapy, personalized medicine, immunohistochemistry