

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 27 年度博士課程入学

氏名 酒居 幸生

指導教員名 米澤 智洋

論文題目

イヌの移行上皮癌における human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) を標的とした新規治療法に関する研究

イヌの移行上皮癌は尿路系腫瘍の中で発生頻度が非常に高く、特に膀胱腫瘍では約 50-75%を占めている。また、イヌ移行上皮癌は臨床的挙動が悪く、診断時に腫瘍の局所浸潤や遠隔転移が高率に認められる。そのため、イヌ移行上皮癌の治療は内科療法が主体であり、非ステロイド系抗炎症剤を主軸として様々な抗癌剤を併用するプロトコルが報告されている。しかし、いずれのプロトコルを用いても症例の生存期間中央値が 1 年未満であり、予後は不良である。

イヌ移行上皮癌の新たな治療標的を探索するために、当研究室ではこれまでに RNA シーケンス解析を実施し、腫瘍組織における遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、イヌ移行上皮癌において様々な発癌関連遺伝子のパスウェイが活性化もしくは抑制されていることが明らかになった。その中でも、癌遺伝子である *human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)* のパスウェイが最も活性化していることを見出した。

HER2 とは HER ファミリー (HER1-4) に属する約 185 kDa の受容体型チロシンキナーゼである。HER2 は他の HER2 または HER ファミリーと二量体を形成することで、細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化される。この変化により、HER2 の下流シグナルである mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) 経路や phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)/Akt 経路が活性化され、細胞増殖や細胞周期進行、アポトーシスの抑制などが引き起こされる。正常細胞では染色体上に一対の *HER2* 遺伝子が存在しているが、ヒトの様々な腫瘍細胞において *HER2* 遺伝子または *HER2* 遺伝子を含む領域が数倍から数十倍に増幅している。*HER2* 遺伝子の増幅により、腫瘍細胞では HER2 蛋白が過剰に発現し、異常な細胞増殖やアポトーシスの抑制が起こる。そのため、HER2 の遺伝子増幅および蛋白過剰

発現はヒトの様々な腫瘍において予後不良因子として知られてきた。しかし、1990 年代の初めに HER2 に対する抗体薬が開発され、HER2 蛋白過剰発現が認められるヒト乳癌患者や胃癌患者の予後が大きく改善された。そして、現在では様々な腫瘍の治療標的として HER2 が大きな注目を集めている。

ヒトと同様にイヌでも腫瘍における HER2 の異常が報告されているが、その知見は少ない。これまでの研究報告より、イヌの乳癌、胃腺癌および骨肉腫において HER2 蛋白過剰発現が認められているが、イヌの腫瘍において *HER2* 遺伝子増幅を検出した研究報告はない。そこで本論文における一連の研究では、イヌ移行上皮癌における HER2 の遺伝子増幅および蛋白過剰発現の有無を検討し、さらに HER2 を標的とした新規治療法の確立を試みた。

第一章 イヌの移行上皮癌における *HER2* 遺伝子増幅の検出

HER2 遺伝子増幅の検出には従来から fluorescent in situ hybridization (FISH) 法が使用される。しかし、FISH 法は手技が煩雑であり、簡便さや客観性に欠けている。そのため近年では、より簡易かつ客観的な *HER2* 遺伝子増幅の検出法としてデジタル PCR が代案されている。そこで本章では、イヌ *HER2* 遺伝子のコピー数異常を検出するデジタル PCR アッセイを確立し、イヌ移行上皮癌の膀胱組織および尿沈渣から抽出された DNA サンプルにおける *HER2* 遺伝子増幅の有無を検討した。その結果、移行上皮癌組織の 33% で *HER2* 遺伝子増幅が検出された。*HER2* 遺伝子増幅はポリープ様膀胱炎の 25% でも検出されたが、正常膀胱では検出されなかった。一方、尿沈渣における *HER2* 遺伝子増幅は移行上皮癌の 35% で検出されたが、ポリープ様膀胱炎、膀胱炎、膀胱結石および正常膀胱では検出されなかった。そのため、デジタル PCR を用いた尿沈渣における *HER2* 遺伝子増幅の検出はイヌ移行上皮癌の特異的な診断に有用であると考えられた。*HER2* 遺伝子増幅が移行上皮癌の尿沈渣のみで検出された理由に関しては、尿中への移行上皮細胞の剥離がポリープ様膀胱炎よりも移行上皮癌で起こりやすいからではないかと推測された。また、イヌ移行上皮癌の特徴的な遺伝子異常である *v-raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1 (BRAF)* 遺伝子変異と *HER2* 遺伝子増幅との関連を調べたところ、有意な関連は認められず、両者は独立した遺伝子異常であると考えられた。

第二章 イヌの移行上皮癌における HER2 蛋白発現解析

第一章では、イヌ移行上皮癌の 3 割以上で *HER2* 遺伝子増幅が検出されることを明らかにした。しかし、イヌ移行上皮癌における HER2 蛋白過剰発現に関する研究はこれまでにない。そこで本章では、イヌ移行上皮癌の膀胱組織における HER2 蛋白発現を免疫組織化学的手法により評価した。その結果、移行上皮癌の 61% で HER2 蛋白過剰発現が認められた。HER2 蛋白過剰発現はポリープ様膀胱炎の 38% でも認められたが、正常膀胱では認められなかった。移行上皮癌症例における HER2 蛋白発現と臨床徴候との関連を検討したところ、HER2 蛋白発現は腫瘍の組織学的グレードと関連していることが明らかになった。HER2 蛋白過剰発現は中悪性度の腫瘍細胞で最も多く認められたが、高悪性度の未分化な腫瘍細胞では認められないことが多かった。一方、HER2 蛋白発現は性別、避妊去勢、年齢、腫瘍サイズ、腫瘍のステージ、リンパ節転移、遠隔転移および再発と有意な関連が認められなかった。また、移行上皮癌症例における HER2 蛋白発現

と予後との関連を検討したところ、有意な関連は認められなかった。しかし、本研究では腫瘍の組織学的グレードが予後解析の交絡因子となった可能性がある。そこで、高悪性度の移行上皮癌症例のみで HER2 蛋白発現と予後との関連を検討したところ、HER2 蛋白過剰発現が認められる症例では、認められない症例に比べて無病生存期間が短縮する傾向があり、全生存期間は有意に短縮していた。また、HER2 蛋白過剰発現が認められた移行上皮癌のうち、*HER2* 遺伝子増幅が検出されたものは 21%であった。そのため、イヌ移行上皮癌における HER2 蛋白過剰発現には *HER2* 遺伝子増幅だけでなく、その他のメカニズムも関与していることが示唆された。

第三章 イヌの移行上皮癌に対する抗 HER2 療法の検討

第二章では、イヌ移行上皮癌の 61%で HER2 蛋白過剰発現が認められることを明らかにした。このことから、HER2 がイヌ移行上皮癌の有効な治療標的になると考えられた。現在、医学領域では HER2 を標的とした治療法として抗体薬および低分子化合物が使用されている。一般的に、ヒトに使用される抗体薬をイヌに応用することは中和抗体や交差性の問題から困難である。それに対して低分子化合物では、しばしば様々な動物種との交差性が認められる。HER2 を標的とした低分子化合物の代表例としてラパチニブが知られている。ラパチニブはチロシンキナーゼ阻害薬であり、HER2 および HER1 (epidermal growth factor receptor, EGFR) の細胞内ドメインに結合することでリン酸化を阻害する。当研究室で実施した RNA シーケンス解析より、イヌ移行上皮癌では *HER2* に加えて *EGFR* も遺伝子パルスウェイが顕著に活性化していたため、ラパチニブはイヌ移行上皮癌の治療薬候補として有望である。そこで本章では、イヌ移行上皮癌の細胞株、担癌モデルマウスおよび臨床症例を用いてラパチニブの有効性を検討した。その結果、複数のイヌ移行上皮癌細胞株においてラパチニブの濃度依存的な増殖抑制作用が認められた。ラパチニブの増殖抑制作用はイヌ移行上皮癌細胞株における HER2 の蛋白発現量と相関していたが、EGFR の蛋白発現量とは相関していなかった。このことから、HER2 蛋白発現量がイヌ移行上皮癌に対するラパチニブの効果予測に重要であると考えられた。ラパチニブはイヌ移行上皮癌細胞株における HER2 および EGFR のリン酸化を抑制し、その下流シグナル分子である Erk 1/2 および Akt のリン酸化を抑制した。特に、Erk 1/2 は Akt に比べてラパチニブ処置によりリン酸化が強く抑制された。また、ラパチニブはイヌ移行上皮癌細胞株に対して細胞周期の停止を誘導したが、明らかなアポトーシスは誘導しなかった。以上のことから、イヌ移行上皮癌細胞株に対するラパチニブの抗腫瘍効果の主なメカニズムは MAPK/Erk 経路を介した細胞増殖の阻害であると考えられた。続いて、イヌ移行上皮癌をヌードマウスに皮下移植して作製した担癌モデルに対してラパチニブまたは溶媒を投与したところ、ラパチニブ投与群では溶媒投与群に比べて腫瘍体積の増大が有意に抑制され、腫瘍重量も有意に減少していた。以上より、イヌ移行上皮癌に対してラパチニブが抗腫瘍効果を発揮することが *in vitro* および *in vivo* で示された。そこで最後に、イヌ移行上皮癌の臨床症例 12 頭に対してラパチニブの臨床試験を実施したところ、11 頭で腫瘍体積が縮小し、残りの 1 頭では腫瘍体積が増大した。投薬期間中に 9 頭で消化器症状、肝酵素上昇または色素沈着が認められたが、いずれも軽度～中等度であった。このことから、イヌ移行上皮癌の臨床症例に対してラパチニブが安全かつ有効性の高い治療法となる可能性が示された。また、尿沈渣中の腫瘍細胞を用いて HER2 の免疫細胞化学を実施したところ、11 頭が HER2 陽性、1 頭が

HER2 陰性と判定された。ラパチニブ投与後の腫瘍体積は HER2 陽性症例の全頭で縮小したのに対して、HER2 陰性症例では増大しており、HER2 蛋白発現と治療反応との間に相関が認められた。そのため、尿沈渣を用いた HER2 の免疫細胞化学がラパチニブの効果予測に有用である可能性が示された。

総括

以上の研究成果より、一部のイヌ移行上皮癌では HER2 の遺伝子増幅や蛋白過剰発現を生じていることが明らかになった。HER2 蛋白過剰発現はイヌ移行上皮癌の病態を悪化させる可能性が示されたが、この点に関してはさらなる検討が必要である。また、HER2 蛋白過剰発現には遺伝子増幅以外のメカニズムも関与することが示唆され、そのメカニズムとしては転写や翻訳の異常などが考えられた。さらに、イヌ移行上皮癌に対する抗 HER2 療法の有効性が明らかとなり、今後の内科療法では分子標的療法が新たな選択肢となる可能性が示された。本論文における一連の研究は、イヌ移行上皮癌の病態を解明するための重要な知見を提供するものであり、新規診断法および新規治療法の確立に繋がると考えられる。