

博士論文（要約）

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

酒居 幸生

目 次

| | |
|-----------------------------------|----|
| 緒 論 | 1 |
| 第一章 | 10 |
| イヌの移行上皮癌における <i>HER2</i> 遺伝子増幅の検出 | |
| 第二章 | 12 |
| イヌの移行上皮癌における <i>HER2</i> 蛋白発現解析 | |
| 第三章 | 37 |
| イヌの移行上皮癌に対する抗 <i>HER2</i> 療法の検討 | |
| 総 括 | 39 |
| 謝 辞 | 41 |
| 引用文献 | 42 |

緒 論

イヌの移行上皮癌は腎盂から尿管、膀胱、尿道の一部までの尿路を内張する移行上皮に由来した悪性腫瘍である。イヌの全悪性腫瘍のうち、移行上皮癌が占める割合は約 2%と高くない (Knapp *et al.*, 2000a; Fulkerson *et al.*, 2015)。しかし、イヌの尿路系腫瘍の中では移行上皮癌の発生率が非常に高く、特に膀胱腫瘍では約 50-75%を占めている (Lee *et al.*, 2007)。イヌ移行上皮癌は低悪性度・表在型または高悪性度・浸潤型の 2 つに大きく分類されるが、90%以上の症例が高悪性度・浸潤型であり、低悪性度・表在型は稀である (Valli *et al.* 1995)。そのため、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 (Knapp *et al.*, 2014; Fulkerson *et al.*, 2015)。

一般的に、イヌ移行上皮癌の発生には遺伝的要因や環境的要因などのいくつかの因子が関連していると考えられている。その中でも特に遺伝的素因が強く関連しており、移行上皮癌は特定犬種での発生が多い。スコティッシュ・テリアは他の犬種に比べて、移行上皮癌の発生リスクが 18-21 倍高いと報告されている (Knapp *et al.*, 2000a; Knapp *et al.*, 2014)。さらにウェスト・ハイランド・ホワイต์テリア、エスキモー、キースホンド、サモエド、シェットランド・シープドッグ、ビーグルおよびワイヤー・フォックス・テリアは、他の犬種に比べて移行上皮癌を発生する可能性が 3-7 倍高い (Knapp *et al.*, 2000a)。また性別 (雌)、避妊・去勢および肥満などがイヌ移行上皮癌の危険因子になると報告されてい

る (Glickman *et al.*, 1989; Knapp *et al.*, 2014)。

イヌ移行上皮癌では、臨床症状として血尿、頻尿、不適切な排尿などが認められる。しかし、これらの症状は尿路感染症や結石症などの非腫瘍性疾患でも認められるため、イヌ移行上皮癌を臨床症状のみで診断することはできない。一部のイヌ移行上皮癌では尿路に腫瘤を形成し、腫瘍細胞が尿中に遊離する。そのため、超音波検査による腫瘤の発見や尿沈渣の細胞診による異型細胞の検出はイヌ移行上皮癌の存在を示唆する所見であるが、同様の所見は良性腫瘍や非腫瘍性疾患でも認められることがある。以上のことから、イヌ移行上皮癌の確定診断のために外科手術や膀胱鏡による組織生検が行われる (Knapp *et al.*, 2014)。

近年、イヌ移行上皮癌の非侵襲的な診断方法として尿沈渣中の腫瘍細胞における *v-raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1 (BRAF)* 遺伝子変異の検出が行われている。*BRAF* 遺伝子変異はヒトの悪性黒色腫や大腸癌で検出される遺伝子変異であるが、イヌ移行上皮癌でも高率 (67-87%) に検出されることが判明した (Decker *et al.*, 2015; Mochizuki *et al.*, 2015a; Mochizuki *et al.*, 2015b)。また、現在のところイヌの正常膀胱および膀胱炎では *BRAF* 遺伝子変異が検出されていない (Mochizuki *et al.*, 2015a; Mochizuki *et al.*, 2015b)。そのため、超音波検査や尿沈渣の細胞診などから移行上皮癌が疑われるイヌで *BRAF* 遺伝子変異が検出された場合、移行上皮癌である可能性が極めて高い。

しかし、イヌ移行上皮癌の約 20-30%では *BRAF* 遺伝子変異を持たないため、これらの症例に対する新規診断法の開発が必要である。

現在、イヌ移行上皮癌に対する治療法として外科手術、放射線療法および内科療法の三つが選択できる。イヌ移行上皮癌に対する外科手術は膀胱部分切除術や膀胱全摘出・尿管吻合術などが行われており (Saeki *et al.*, 2015; Marvel *et al.*, 2017)、腫瘍を完全に切除できれば根治する症例も存在する。しかし、イヌ移行上皮癌は診断時に既に進行していることが多く、約 20%の症例でリンパ節や他臓器への転移が認められる (Knapp *et al.*, 2014; Fulkerson *et al.*, 2015)。また外科手術を行っても、63-76%の症例で再発が認められる (Saeki *et al.*, 2015; Marvel *et al.*, 2017)。さらに術後には尿失禁、尿管閉塞、腎盂腎炎などの合併症が認められる。これらの理由により、イヌ移行上皮癌に対して外科手術を第一選択とする機会は少ない。

外科手術を選択しない場合、放射線療法によりイヌ移行上皮癌の増殖を抑制することができる。放射線療法に関する初期の研究では、膀胱炎、尿失禁、大腸炎および結腸狭窄のような合併症が引き起こされた (Walker *et al.*, 1987; Withrow *et al.*, 1989)。そこで近年、より低線量の放射線を用いたプロトコルが検討され、重篤な合併症なく、高い奏効率 (61%) を得られるようになった (Choy *et al.*, 2016)。しかし、イヌ移行上皮癌に対する放射線療法の利用にはま

だいくつかの検討すべき課題が残されている。腫瘍に放射線を照射するために膀胱の位置を固定する必要があるが、膀胱の大きさ、形状および位置は膀胱内の尿量や腸管の圧迫により容易に変化する。また、現状では放射線療法を実施できる施設が限られている。そのため、イヌ移行上皮癌に対して放射線療法を汎用するには、さらなる検討が必要である。

上記の理由から、イヌ移行上皮癌症例の多くが内科療法によって治療される。その中で第一選択薬となるのが非ステロイド系抗炎症剤（NSAIDs）である。NSAIDs はシクロオキシゲナーゼ（COX）阻害剤とも呼ばれ、アラキドン酸カスケードの律速酵素である COX-2 を阻害し、脂質メディエーターであるプロスタグランジンの発現を抑制する。健康なイヌの膀胱組織では COX-2 が発現していないのに対して、イヌ移行上皮癌症例の腫瘍組織では COX-2 が発現し、腫瘍増殖に関与している（Khan *et al.*, 2000）。このことから、イヌ移行上皮癌症例に対して NSAIDs が投与され、その有効性が報告されている（Knapp *et al.*, 1994; Mohammed *et al.*, 2002; McMillan *et al.*, 2011; Knapp *et al.*, 2014）。また、NSAIDs を主軸として様々な抗癌剤を併用するプロトコルが検討されている。これまでの研究報告では、白金製剤のシスプラチンを用いたプロトコルで最も高い治療効果を得られたが、重篤な腎障害を引き起こすことが問題となっている（Knapp *et al.*, 2000b）。現在、イヌ移行上皮癌の内科療法として一般的に

使用されるプロトコルは NSAIDs のピロキシカムをビンブラスチン、ミトキサントロンまたはカルボプラチンと併用したプロトコルであり、これらによる奏効率および臨床的有用率はそれぞれ 8-58% および 67-92% である (Henry *et al.*, 2003; Boria *et al.*, 2005; Allstadt *et al.*, 2015; Knapp *et al.*, 2016)。しかし、イヌ移行上皮癌は臨床的挙動が悪く、いずれのプロトコルを用いても生存期間中央値が 1 年未満であり、予後は不良である (Henry *et al.*, 2003; Boria *et al.*, 2005; Knapp *et al.*, 2016)。

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 (Maeda *et al.*, 2018)。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 ファミリーに属する約 185 kDa の受容体型チロシンキナーゼであり、EGFR2、ERBB2、CD340 または NEU とも呼ばれる。HER ファミリーには HER1-4 の 4 種類の受容体があり、いずれの受容体も細胞外、膜貫通型および細胞内の 3 つのドメインを有する。HER1、HER3 および HER4 では、細胞外ドメインにリガンドが結合することにより 3 次元構造が変化して、ホモ

二量体またはヘテロ二量体の形成が可能となる (Arkhipov *et al.*, 2013)。一方、HER2 ではリガンドが結合しなくてもホモ二量体またはヘテロ二量体の形成が可能である (Arkhipov *et al.*, 2013)。HER2 が二量体を形成すると、細胞内ドメインにある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 (Hynes *et al.*, 2010; Gutierrez *et al.*, 2011)。

正常細胞では染色体上に一对の *HER2* 遺伝子が存在している。一方、ヒトの様々な腫瘍細胞では *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 (Owens *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015)。*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、細胞増殖活性や抗アポトーシス活性が異常に亢進する。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 (Ross *et al.*, 1998; Pils *et al.*, 2007; Nedjadi *et al.*, 2016; Soria *et al.*, 2017)。しかし、1990 年代の初めに HER2 に対する抗体薬であるトラスツズマブ (商品名：ハーセプチン) 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 (Piccart-Gebhart *et al.*, 2005;

Smith *et al.*, 2007; Bang *et al.*, 2010)。現在では、HER2 が様々な腫瘍の治療標的として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、*HER2* 遺伝子増幅が乳腺癌で検出されており (Beck *et al.*, 2013)、HER2 蛋白過剰発現は乳腺癌、胃腺癌および骨肉腫で認められている (Flint *et al.*, 2004; Shinoda *et al.*, 2014; Terragni *et al.*, 2014)。一方、移行上皮癌では HER2 の遺伝子増幅および蛋白過剰発現に関する報告がこれまでにない。

前述の通り、当研究室ではイヌ移行上皮癌に対する RNA シーケンス解析を実施し、HER2 シグナルが顕著に活性化していることを明らかにした (Maeda *et al.*, 2018)。この所見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存在を示唆するものである。そこで本論文では、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、さらにイヌ移行上皮癌に対する抗 HER2 療法の有効性を評価することを目的とした。第一章では、イヌ *HER2* 遺伝子のコピー数異常を検出するアッセイ系を確立し、イヌ移行上皮癌における *HER2* 遺伝子増幅を検出した。第二章では、イヌ移行上皮癌における HER2 蛋白発現を免疫組織化学的手法により評価した。第三章では、HER2 に対する分子標的薬をイヌ移行上皮癌の細胞株、担癌モデルマウスおよ

び臨床症例に投与し、抗腫瘍効果を検討した。

第一章

イヌの移行上皮癌における *HER2* 遺伝子増幅の検出

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

第二章

イヌの移行上皮癌における HER2 蛋白発現解析

【緒言】

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。医学領域では、移行上皮癌、乳癌、胃癌などの様々な腫瘍において *HER2* 遺伝子増幅が *HER2* 蛋白の過剰発現を引き起こし (Roa *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2015; Nedjadi *et al.*, 2016)、患者の予後を悪化させることが知られている (Ross *et al.*, 1998; Pils *et al.*, 2007; Soria *et al.*, 2017)。それに対してイヌの腫瘍では、*HER2* についての知見が少ない。これまでに乳腺癌、胃腺癌および骨肉腫において *HER2* 蛋白の過剰発現が認められているが (Rungsipipat *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2004; Flint *et al.*, 2004; Gama *et al.*, 2008; Imu *et al.*, 2013; Shinoda *et al.*, 2014; Terragni *et al.*, 2014)、移行上皮癌に関する研究はこれまでにない。また、イヌの腫瘍における *HER2* 蛋白発現と予後との関連は明らかになっていない。

イヌでは、これまでに乳腺癌に対する *HER2* の免疫組織化学が比較的多く実施されている (Rungsipipat *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2004; Gama *et al.*, 2008; Im *et al.*, 2013; Shinoda *et al.*, 2014)。これらの研究において、Dako のウサギポリクローナル抗体 (A0485) が汎用されている。しかし近年、Burrai らがイヌ乳腺癌組織を用いた *HER2* のウェスタンブロットを実施し、Dako の抗体はイヌ *HER2* を認識しないと報告している (Burrai *et al.*,

2015)。

そこで第二章では、イヌ HER2 に対する抗ヒト HER2 抗体の交差性を検討した。そして、イヌ移行上皮癌の腫瘍組織における HER2 蛋白発現を免疫組織化学的手法により評価し、さらに HER2 蛋白発現の強度と症例の予後との関連を検討した。

【材料と方法】

ウェスタンブロット

イヌ HER2 に対する抗ヒト HER2 抗体の交差性を確認するために、イヌ移行上皮癌細胞株 (TCCUB) の細胞溶解液を用いてウェスタンブロットを実施した。抗ヒト HER2 抗体には nanoTools (Teningen, Germany) のマウスモノクローナル抗体 (200 倍希釈; clone 19D2) および Dako (Glostrup, Denmark) のウサギポリクローナル抗体 (1,000 倍希釈; A0485) を使用した。また二次抗体として、M&S TechnoSystems Inc. (Osaka, Japan) の IRDye 680RD donkey anti-mouse antibody (10,000 倍希釈) および IRDye 800CW donkey anti-rabbit antibody (5,000 倍希釈) を使用した。

等量の蛋白質サンプル (12 μ g) を 7.5%ポリアクリルアミドゲルに泳動後 (室温で 80V, 20 分間の後に 120V, 60 分間)、ニトロセルロースメンブレンに転写した (4°C, 400A, 90 分間)。このメンブレンを 5%スキムミルクが含まれた Tris-buffered saline (TBS) でブロッキング後 (室温, 1 時間)、一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。翌日メンブレンを 0.2% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) が含まれた TBS で洗浄後、二次抗体と室温で 1 時間反応させた。TBS で洗浄後、ODYSSEY CLx (M&S TechnoSystems Inc.) を用いてメンブレン上の標的蛋白質を検出した。陽性対照にはヒト卵巣癌細胞株 (SKOV3, nanoTools)

の細胞溶解液を使用した。

供試動物

2011 年 4 月から 2016 年 12 月の間に東京大学附属動物医療センターにて膀胱全摘出・尿管吻合術を実施し、病理組織学的に移行上皮癌と確定診断されたイヌ 23 頭のホルマリン固定・パラフィン包埋膀胱組織を用いた。23 頭中 22 頭は第一章で膀胱組織を使用した移行上皮癌症例と同一症例であった。これらのイヌの性別は雄 5 頭（うち 2 頭が去勢雄）、雌 18 頭（うち 9 頭が避妊雌）であり、年齢の中央値は 124 ヲ月齡（85-136 ヲ月齡）であった。また犬種はパピヨン 5 頭、ミニチュア・ダックスフンド 4 頭、ウェルシュコーギー・ペンブローク 3 頭、残りの 11 頭はその他の犬種であった。疾患対照群として、病理組織学的にポリープ様膀胱炎と確定診断されたイヌ 8 頭の膀胱組織を用いた。全頭が第一章で膀胱組織を使用したポリープ様膀胱炎症例と同一症例であった。全ての移行上皮癌症例およびポリープ様膀胱炎症例の飼い主から膀胱組織を本研究に二次利用する旨の承諾を書面で得た。

正常対照群として、病理組織学的に膀胱に異常が認められないイヌ 8 頭の膀胱組織を用いた。全頭が第一章で膀胱組織を使用した正常対照と同一症例であった。これらのイヌの性別は全頭が未去勢雄であり、年齢の中央値は 120 ヲ月

齢（120-132 ヲ月齡）であつた。また、犬種は全頭がビーグルであつた。

組織学的グレード分類

移行上皮癌の診断に使用されたヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本を用いて、腫瘍の組織学的グレード分類を行った。過去の研究報告に基づいて（Patrick *et al.*, 2006）、各症例をグレード 1（低悪性度）、グレード 2（中悪性度）またはグレード 3（高悪性度）に分類した。

免疫組織化学

ミクロトームを用いて 4 μm の厚さの組織標本を作製した。脱パラフィン処置後、3%過酸化水素水加メタノール（室温、5 分間）により内因性ペルオキシダーゼを不活化させた。続いて、標本を pH 9.0 Target retrieval solution (Dako) に浸漬し、恒温槽内（98℃）にて 40 分間静置することで抗原を賦活化させた。室温で 60 分間静置後、8%スキムミルクを含む TBS でブロッキング処理を行った（37℃, 40 分間）。その後、Dako の抗ヒト HER2 ウサギポリクローナル抗体（100 倍希釈; A0485）を一次抗体として処置した（37℃, 40 分間）。標本を TBS で 3 回洗浄後、Envision horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti-rabbit IgG polymer (Dako) と反応させた（37℃, 60 分間）。標本を再度 TBS で 3 回洗浄し、3,3'-diaminobenzidine (DAB, Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan) を用

いて反応物を可視化した。0.03% H_2O_2 を含む TBS で反応を停止させ、マイヤーのヘマトキシリンで対比染色を行った。陽性対照として、イヌ乳腺癌の腫瘍組織を使用した。陰性対照では、一次抗体を溶媒のみに置き換えた。

予後調査

診療記録の確認または紹介医への聴取により、本研究の終点（2017年5月11日）での移行上皮癌症例の状態（生存、死亡または不明）および再発の有無を調査した。再発の診断は超音波検査および尿沈渣の細胞診に基づいて判定した。無病生存期間（DFS）は手術日から移行上皮癌が再発するまで、もしくは症例が死亡するまでの期間とした。全生存期間（OS）は手術日から症例が死亡するまでの期間とした。

統計処理

統計処理には Prism version 5 ソフトウェア（Graph Pad Software）を用いた。HER2 発現強度と各種臨床徴候（性別、避妊去勢、年齢、腫瘍サイズ、腫瘍の組織学的グレード、腫瘍のステージ、リンパ節転移、遠隔転移および再発）との比較は Fisher の正確検定により実施した。生存曲線は Kaplan-Meier 法により作成し、DFS および OS を Log-rank 検定により比較した。

【結果】

イヌ HER2 に対する抗ヒト HER2 抗体の交差性

nanoToolsおよびDakoの抗ヒトHER2抗体を用いてウエスタンブロットを実施したところ、いずれの抗体でもヒト卵巣癌細胞株（SKOV3）のレーンにおいてHER2蛋白の分子量である約185 kDaで最も強いシグナルを示すバンドが検出された（図2-1）。HER2蛋白の分子量とは異なる位置に二本のバンド（約80 kDaおよび120 kDa）が検出されたが、これらは非特異反応と考えられた。各社の抗体をイヌ移行上皮癌細胞株（TCCUB）と反応させたところ、いずれの抗体でも約185 kDaで強いシグナルを示すバンドが検出された。nanoToolsの抗体ではそれよりも低分子量の位置に二本のバンド（約60 kDおよび約110 kDa）が検出されたが、Dakoの抗体では検出されなかった（図2-1）。そこで、これ以降の実験ではDakoの抗体を使用した。

イヌ移行上皮癌症例

本研究で使用された移行上皮癌症例の組織学的グレードはグレード 1 が 2/23 頭（9%）、グレード 2 が 8/23 頭（35%）およびグレード 3 が 13/23 頭（57%）であった。腫瘍のステージは T1 が 7/23 頭（30%）、T2 が 11/23 頭（48%）および T3 が 5/23 頭（22%）であった。所属リンパ節への転移が 3 頭で認められたが、

遠隔転移はいずれの症例でも認められなかった。外科手術後の内科療法として、14 頭が NSAIDs（ピロキシカム、メロキシカム、カルプロフェンまたはフィロコキシブ）の単独療法により治療され、6 頭が抗癌剤（ミトキサントロン、シスプラチン、シクロフォスファミドまたはクロラムブシル）と NSAIDs の併用療法により治療された。残りの 3 頭は術後に内科療法を受けなかった。

イヌの膀胱組織における HER2 蛋白発現

移行上皮癌組織において、様々な発現強度の HER2 蛋白が染色された（図 2-2）。HER2 蛋白発現の強度を評価するために、過去の報告でヒト移行上皮癌に利用されている基準を用いた（Gandour-Edwards *et al.*, 2002; Latif *et al.*, 2003; Latif *et al.*, 2004）。図 2-2 に示すように、細胞膜に陽性染色像が認められない場合をスコア 0 と判定した。また、10%以上の細胞で弱い陽性染色像が認められた場合をスコア 1+、中程度の陽性染色像が認められた場合をスコア 2+、強い細胞膜の陽性染色像が認められた場合をスコア 3+と判定した。そして、スコア 0 および 1+の症例を HER2 蛋白過剰発現なし（HER2 陰性）、スコア 2+および 3+の症例を HER2 蛋白過剰発現あり（HER2 陽性）と分類した。一部の細胞では細胞質に陽性染色像が認められたが、これらは評価の対象から除外した。

HER2 スコアリングの結果を表 2-1 に示した。正常対照では全頭（100%）が

HER2 陰性に分類された。これらの症例のうち、6/8 頭 (75%) がスコア 1+、2/8 頭 (25%) がスコア 0 と判定された。スコア 1+と判定された症例では、移行上皮の表層に弱い陽性染色像が認められた (図 2-3A)。疾患対照のポリープ様膀胱炎では 3/8 頭 (38%) が HER2 陽性、5/8 頭 (63%) が HER2 陰性に分類された。これらの症例のうち、3/8 頭 (38%) がスコア 2+、3/8 頭 (38%) がスコア 1+、2/8 頭 (25%) がスコア 0 と判定され、スコア 3+と判定された症例は認められなかった。スコア 1+および 2+と判定された症例では、ポリープを形成する移行上皮の全層で陽性染色像が認められた (図 2-3B)。移行上皮癌では 14/23 頭 (61%) が HER2 陽性、9/23 頭 (39%) が HER2 陰性に分類された。これらの症例のうち、4/23 頭 (17%) がスコア 3+、10/23 頭 (44%) がスコア 2+、2/23 頭 (9%) がスコア 1+、7 頭 (30%) がスコア 0 と判定された。スコア 1+から 3+と判定された症例では、腫瘤を形成する移行上皮の全層で陽性染色像が認められた (図 2-3C)。

イヌ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

表 2-2 に示すように、組織学的グレードの高い未分化な移行上皮癌は HER2 陰性症例に多く含まれていた ($P < 0.05$)。一方、移行上皮癌の HER2 陽性症例と HER2 陰性症例との間で性別、避妊去勢、年齢、腫瘤サイズ、腫瘍のステー

ジ、リンパ節転移、遠隔転移および再発に有意差が認められなかった。しかし、HER2 陽性症例では HER2 陰性症例に比べて大きな腫瘍を形成し ($P=0.2138$)、腫瘍のステージが進行している傾向が認められた ($P=0.3630$)。また、リンパ節転移は HER2 陽性症例のみで認められた ($P=0.2088$)。

イヌ移行上皮癌症例における HER2 蛋白発現と予後との関連

移行上皮癌症例のうち、10/23 頭 (HER2 陽性：6 頭、HER2 陰性：4 頭) で追跡期間中に再発が認められ、DFS は 20-1271 日 (中央値：274 日) であった。そのうち、HER2 陽性症例および HER2 陰性症例における DFS の中央値はそれぞれ 192 日 (20-955 日) および 344 日 (49-1271 日) であった。HER2 陽性症例では HER2 陰性症例に比べて DFS が短縮する傾向が認められたが、有意差は認められなかった (図 2-4A、 $P=0.2980$)。また、組織学的グレードの高い移行上皮癌症例のみ (グレード 3) で HER2 蛋白発現と予後との関連を検討したところ、HER2 陽性症例および HER2 陰性症例における DFS の中央値はそれぞれ 274 日 (20-320 日) および 337.5 日 (49-659 日) であり、HER2 陽性症例では HER2 陰性症例に比べて DFS が短縮する傾向が認められた (図 2-5A、 $P=0.0594$)。

移行上皮癌症例のうち、17/23 頭 (HER2 陽性：10 頭、HER2 陰性：7 頭) が

追跡期間中に死亡したが、詳細な死因情報は得られなかった。移行上皮癌症例における OS の中央値は 384 日 (20-1271 日) であった。そのうち、HER2 陽性症例および HER2 陰性症例における OS の中央値はそれぞれ 297 日 (20-955 日) および 470 日 (77-1271 日) であった。HER2 陽性症例では HER2 陰性症例に比べて OS が短縮する傾向が認められたが、有意差は認められなかった (図 2-4B、 $P = 0.4389$)。また、組織学的グレードの高い移行上皮癌症例のみ (グレード 3) で HER2 蛋白発現と予後との関連を検討したところ、HER2 陽性症例および HER2 陰性症例における OS の中央値はそれぞれ 274 日 (20-384 日) および 469 日 (77-970 日) であり、HER2 陽性症例では HER2 陰性症例に比べて OS が有意に短縮していた (図 2-5B、 $P < 0.05$)。

イヌの膀胱組織における HER2 の遺伝子増幅と蛋白過剰発現との関連

移行上皮癌、ポリープ様膀胱炎および正常膀胱では、HER2 の遺伝子増幅と蛋白過剰発現との間に相関が認められなかった (表 2-3)。移行上皮癌では HER2 蛋白過剰発現が 14/22 頭 (64%) で認められ、その中の 3/14 頭 (21%) で *HER2* 遺伝子増幅が検出された。ポリープ様膀胱炎では HER2 蛋白過剰発現が 3/8 頭 (38%) で認められたが、これらの症例では *HER2* 遺伝子増幅が検出されなかった。正常膀胱では HER2 の遺伝子増幅および蛋白過剰発現が全頭で認められな

かった。

表 2-1 イヌの膀胱組織における HER2 スコアリング

| | HER2 スコア | | | | 合計 |
|-------|----------|---------|----------|---------|----|
| | 0 | 1+ | 2+ | 3+ | |
| 正常対照 | 2 (25%) | 6 (75%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 8 |
| 疾患対照 | 2 (25%) | 3 (38%) | 3 (38%) | 0 (0%) | 8 |
| 移行上皮癌 | 7 (30%) | 2 (9%) | 10 (44%) | 4 (17%) | 23 |

疾患対照は全頭がポリープ様膀胱炎である。

表 2-2 イヌ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

| | | HER2 蛋白過剰発現 | | <i>P</i> |
|------------|--------|---------------------|--------------------|---------------|
| | | 陽性 (<i>n</i> = 14) | 陰性 (<i>n</i> = 9) | |
| 性別 | 雄 | 3 | 2 | 1.0000 |
| | 雌 | 11 | 7 | |
| 避妊去勢 | 有 | 6 | 5 | 0.6802 |
| | 無 | 8 | 4 | |
| 年齢 (月齢) | < 140 | 6 | 5 | 0.6802 |
| | ≥ 140 | 8 | 4 | |
| 腫瘍サイズ (mm) | < 8.5 | 5 | 6 | 0.2138 |
| | ≥ 8.5 | 9 | 3 | |
| 組織学的グレード | 1, 2 | 9 | 1 | 0.0288 |
| | 3 | 5 | 8 | |
| 腫瘍のステージ | T1 | 3 | 4 | 0.3630 |
| | T2, T3 | 11 | 5 | |
| リンパ節転移 | N0 | 5 | 6 | 0.2088 |
| | N+ | 3 | 0 | |
| 遠隔転移 | M0 | 14 | 9 | 1.0000 |
| | M+ | 0 | 0 | |
| 再発 | 有 | 6 | 4 | 1.0000 |
| | 無 | 8 | 5 | |

Fisher の正確検定。

表 2-3 イヌの膀胱組織における HER2 の遺伝子増幅と蛋白過剰発現との関連

| | | HER2 蛋白過剰発現 | | <i>P</i> |
|-------|----|-------------|----|----------|
| | | 陽性 | 陰性 | |
| 正常対照 | あり | 0 | 0 | 1.0000 |
| | なし | 0 | 8 | |
| 疾患対照 | あり | 0 | 2 | 0.4643 |
| | なし | 3 | 3 | |
| 移行上皮癌 | あり | 3 | 3 | 0.6244 |
| | なし | 11 | 5 | |

Fisher の正確検定。

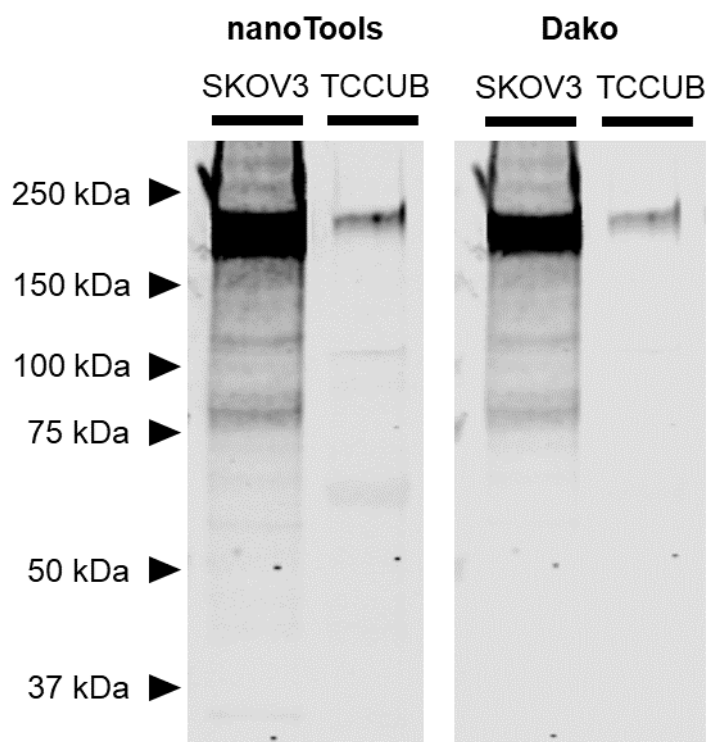


図 2-1 抗ヒト HER2 抗体を用いたウエスタンブロット

抗ヒト HER2 抗体に nanoTools のマウスモノクローナル抗体（左）および Dako のウサギポリクローナル抗体（右）を使用した。SKOV3 および TCCUB はそれぞれヒト卵巣癌細胞株およびイヌ移行上皮癌細胞株である。

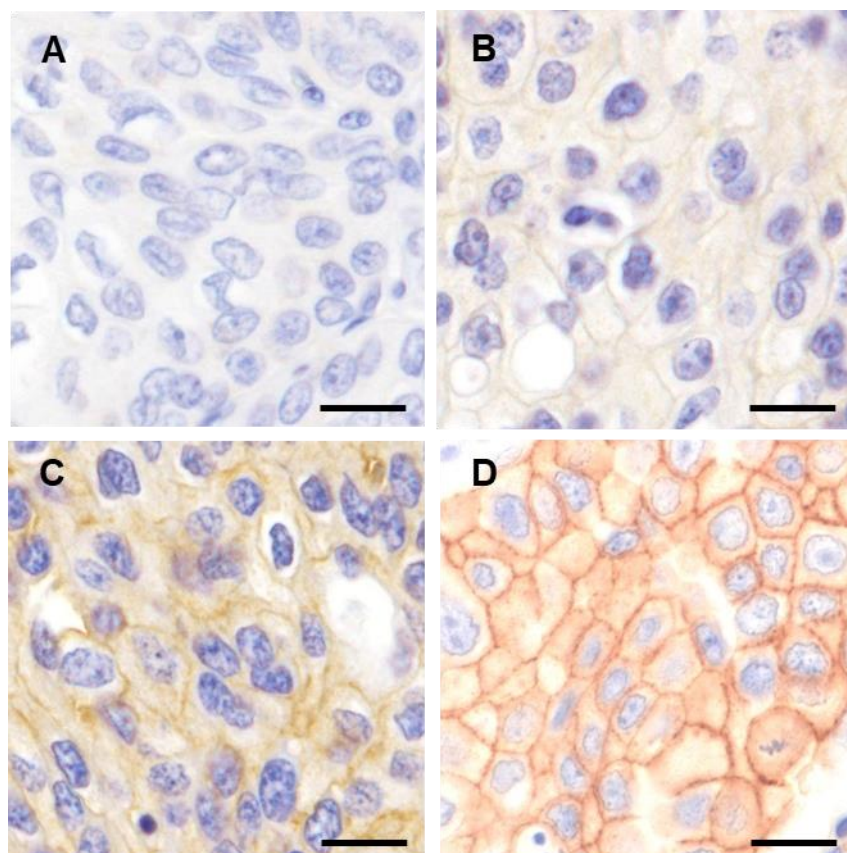


図 2-2 HER2 の免疫組織化学による染色例

A-D はイヌ移行上皮癌における染色例である。細胞膜の陽性染色像のみを評価した。細胞膜に陽性染色像が認められない場合をスコア 0 (A) と判定した。また、10%以上の細胞で弱い陽性染色像が認められた場合をスコア 1+ (B)、中程度の陽性染色像が認められた場合をスコア 2+ (C)、強い細胞膜の陽性染色像が認められた場合をスコア 3+ (D) と判定した。Bars = 25 μ m。

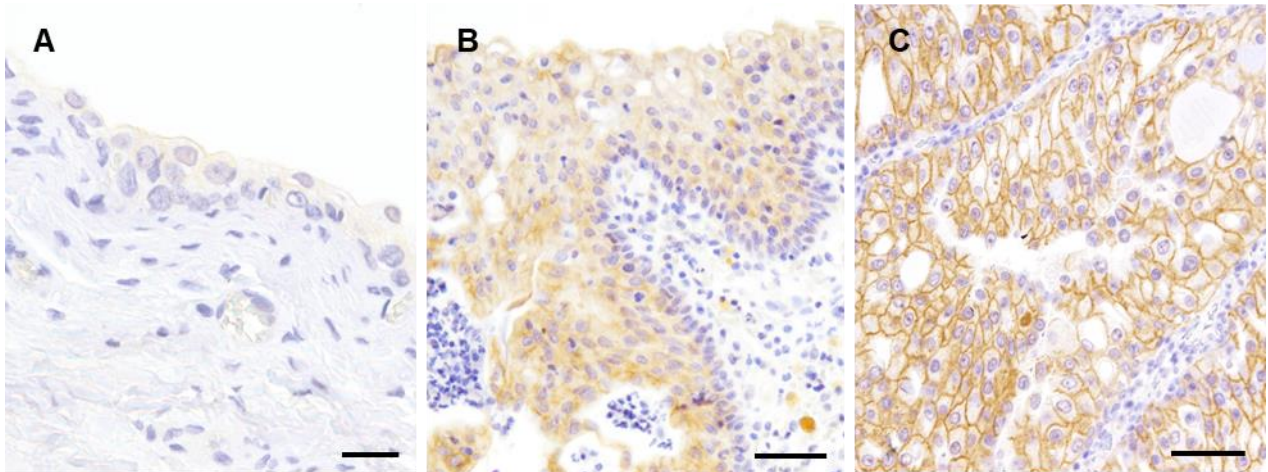


図 2-3 イヌの膀胱組織における HER2 蛋白発現様式

A. 正常膀胱 (スコア 1+): 移行上皮の表層に陽性染色像が認められた。Bar = 25 μ m。B. ポリープ様膀胱炎 (スコア 2+): ポリープを形成する移行上皮の全層で陽性染色像が認められた。Bar = 50 μ m。C. 移行上皮癌 (スコア 3+): 腫瘤を形成する移行上皮の全層で陽性染色像が認められた。Bar = 50 μ m。

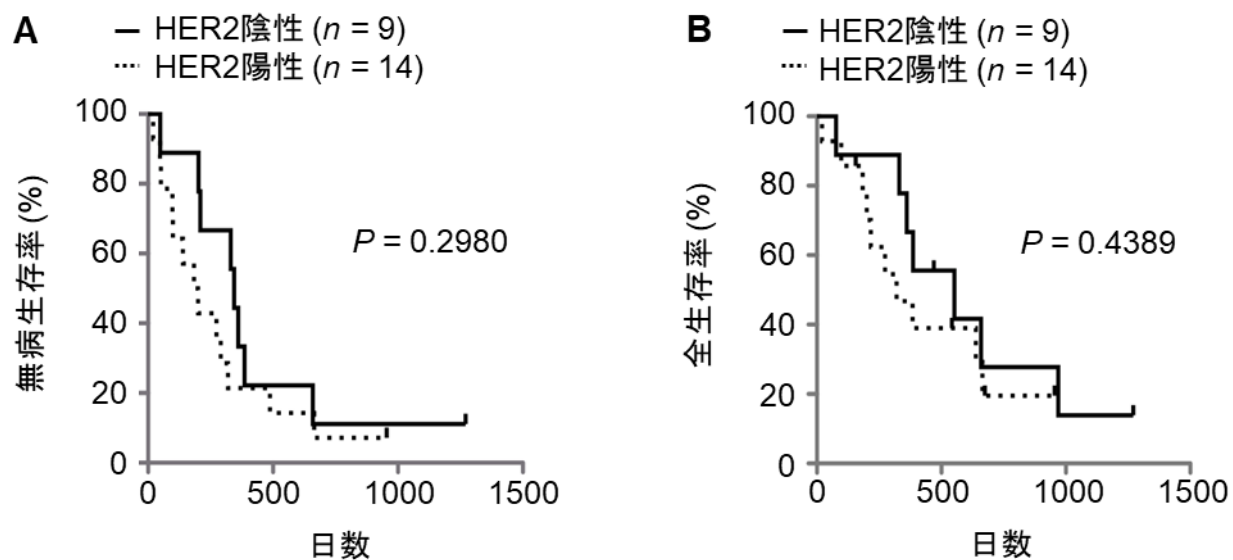


図 2-4 イヌ移行上皮癌症例における HER2 蛋白発現と予後との関連

HER2 蛋白過剰発現の有無により移行上皮癌症例を二群に分けた。Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成し、無病生存率 (A) および全生存率 (B) を Log-rank test により比較した。

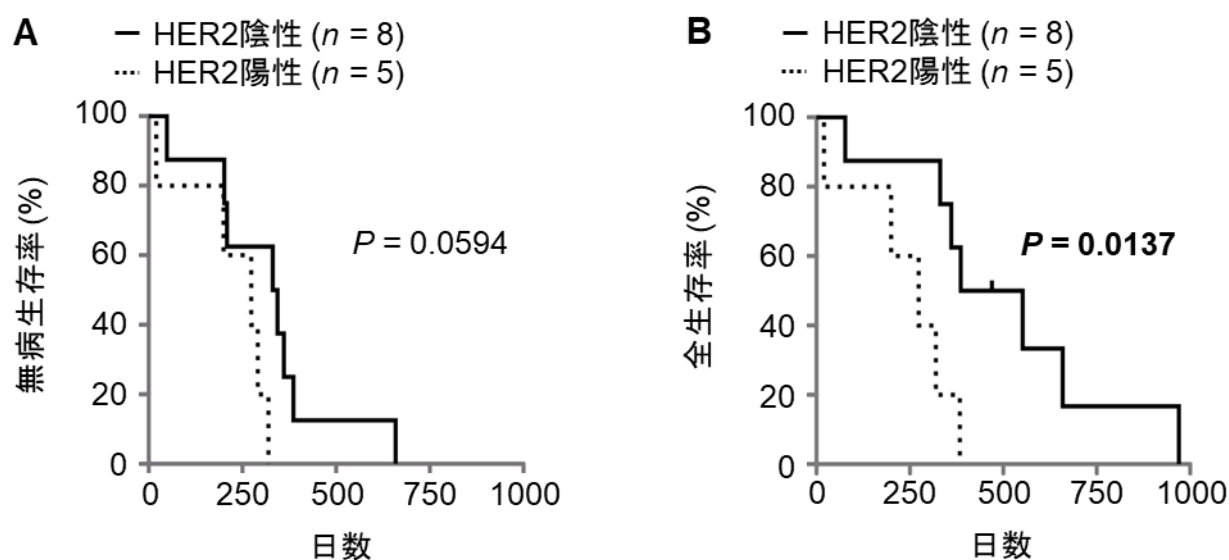


図 2-5 組織学的グレードの高いイヌ移行上皮癌症例（グレード 3）における HER2 蛋白発現と予後との関連

HER2 蛋白過剰発現の有無により移行上皮癌症例を二群に分けた。Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成し、無病生存率 (A) および全生存率 (B) を Log-rank test により比較した。

【考察】

本章の初めに、nanoToolsのマウスモノクローナル抗体とDakoのウサギポリクローナル抗体の2種類の抗ヒトHER2抗体を用いてウェスタンブロットを実施したところ、陽性対照のヒト卵巣癌細胞株（SKOV3）と同様にイヌ移行上皮癌細胞株（TCCUB）でも約185 kDaの位置に強い陽性シグナルを示すバンドが検出された。このことから、本研究で使用した二種類の抗体は少なくともイヌ移行上皮癌におけるHER2分子を正しく認識することができると考えられた。特にDakoの抗体は非特異反応が検出されず、免疫組織化学での利用に優れている可能性がある。Burraiらの報告と異なり（Burrai *et al.*, 2015）、Dakoの抗体でイヌHER2を検出できた理由として以下の二点が考えられた。まず、過去の報告ではバンドの検出法が酵素を用いる系であったのに対して、本研究では検出感度の高い蛍光を用いる系を使用した。次に、過去の報告では腫瘍組織の溶解液を蛋白サンプルとして使用したのに対して、本研究では細胞株の溶解液を使用した。そのため、本研究では正常組織の影響を受けず、比較的高濃度のHER2蛋白が含まれたサンプルを得ることができたと推測された。

移行上皮癌を含めたヒトの様々な腫瘍において HER2 蛋白過剰発現が認められ（Yan *et al.*, 2015）、患者の予後に悪影響を与えることが知られている（Ross *et al.*, 1998; Pils *et al.*, 2007; Soria *et al.*, 2017）。それに対してイヌの腫瘍では、

HER2 についての知見が少なく、HER2 蛋白発現と予後との関連は明らかになっていない。本章では、イヌ移行上皮癌の腫瘍組織において HER2 蛋白過剰発現が認められることを明らかにした。また、イヌ移行上皮癌の HER2 陽性症例と HER2 陰性症例との間では DFS や OS に有意差が認められなかった。しかし、本研究では組織学的グレードの高い未分化な移行上皮癌（グレード 3）が HER2 陰性症例に多く含まれており、このことが予後解析の交絡因子となった可能性が考えられた。そこで、症例数が最も多いグレード 3 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 陽性症例では HER2 陰性症例に比べて OS が有意に短縮していた。このことから、ヒトと同様にイヌでも HER2 蛋白過剰発現が移行上皮癌症例の予後を悪化させる可能性が示された。しかし、本研究では症例数の問題によりグレード 3 以外の移行上皮癌症例では予後解析ができていないため、HER2 蛋白過剰発現と予後との関連を明らかにするためにはさらなる検討が必要である。

HER2 蛋白過剰発現が認められるヒト移行上皮癌患者のうち、0-92%で *HER2* 遺伝子増幅が検出されており、その割合は報告によって大きく異なる（Montie 2005; Caner *et al.*, 2008; Lae *et al.*, 2010; Ching *et al.*, 2011; Sasaki *et al.*, 2014; Schneider *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015; Nedjadi *et al.*, 2016; Isharwal *et al.*, 2018)。そのため、ヒト移行上皮癌における HER2 蛋白過剰発現には *HER2*

遺伝子増幅に加えて、転写異常や転写後の翻訳異常などが関与すると考えられている。実際に、ヒト乳癌では Activator protein 2 や Yin Yang 1 などの転写因子の発現が増加し、HER2 の転写が活性化している (Allouche *et al.* 2008)。本研究では、HER2 蛋白過剰発現が認められたイヌ移行上皮癌の 21%で *HER2* 遺伝子増幅が検出された。ヒトと同様にイヌでも移行上皮癌における HER2 蛋白過剰発現に *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可能性が示された。

イヌの腫瘍における HER2 蛋白発現に関する過去の研究報告では、乳癌、胃腺癌および骨肉腫のそれぞれ 18-38%、58%および 40%において HER2 蛋白過剰発現が認められている (Rungsipipat *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2004; Flint *et al.*, 2004; Gama *et al.*, 2008; Im *et al.*, 2013; Shinoda *et al.*, 2014; Terragni *et al.*, 2014)。本研究では、正常膀胱で HER2 蛋白過剰発現が認められなかったのに対して、移行上皮癌の 61%で HER2 蛋白過剰発現が認められた。移行上皮癌では他の腫瘍に比べて HER2 蛋白過剰発現の割合が高く、HER2 の異常が病態により深く関与している可能性がある。以上のことから、HER2 がイヌ移行上皮癌の有効な治療標的になる可能性が示された。

以上を小括すると、本章では HER2 蛋白過剰発現がイヌ移行上皮癌の 6 割以

上で認められ、症例の予後を悪化させる可能性が示された。また、イヌ移行上皮癌の HER2 蛋白過剰発現には HER2 遺伝子増幅と異なるメカニズムも関与していることが示唆された。イヌの正常膀胱で HER2 蛋白過剰発現が認められないのに対して、イヌ移行上皮癌で HER2 蛋白過剰発現が認められたことから、HER2 がイヌ移行上皮癌の特異的な治療標的になると考えられた。そこで次章では、イヌ移行上皮癌に対して HER2 を標的とする治療法の有効性を検討することにした。

第三章

イヌの移行上皮癌に対する抗 HER2 療法の検討

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

総 括

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

謝 辞

本研究を行うにあたり貴重なご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学研究室の松木直章前教授、米澤智洋准教授、前田真吾助教に心より感謝申し上げます。また、貴重な研究試料を提供して頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室の中山裕之教授、内田和幸准教授、チェンバーズ・ジェームズ助教、獣医外科学研究室の西村亮平教授、中川貴之准教授、佐伯亘平特任助教、岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医分子病態学研究室の森崇教授、村上麻美講師、HER2 の免疫組織化学にご協力を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室の坪井誠也特任助教、実験装置の使用を快諾してくださいました東京大学農学生命科学研究科附属動物医療センター遺伝子診断部の後藤裕子特任准教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、実験遂行にあたりご協力頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学研究室の室員の皆様、東京大学附属動物医療センターの職員各位およびイヌ移行上皮癌症例の飼い主様に深く感謝の意を表します。

引用文献

Allouche, A., Nolens, G., Tancredi, A., Delacroix, L., Mardaga, J., Fridman, V., Winkler, R., Boniver, J., Delvenne, P., Begon, D.Y. 2008. The combined immunodetection of AP-2alpha and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors. *Breast Cancer Res.* **10**, R9.

Allstadt, S.D., Rodriguez, C.O. Jr., Boostrom, B., Rebhun, R.B., Skorupski, K.A., 2015. Randomized phase III trial of piroxicam in combination with mitoxantrone or carboplatin for first-line treatment of urogenital tract transitional cell carcinoma in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **29**, 261-267.

Antonakopoulos, N., Karamanolis, D.G., 2007. The role of NSAIDs in colon cancer prevention. *Hepatogastroenterology.* **54**, 1694-1700.

Arkhipov, A., Shan, Y., Kim, E.T., Dror, R.O., Shaw, D.E., 2013. Her2 activation mechanism reflects evolutionary preservation of asymmetric ectodomain dimers in the human EGFR family. *eLife.* **2**, e00708.

Bang, Y.J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H.C., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T., Aprile, G., Kulikov, E.,

- Hill, J., Lehle, M., Rüschoff, J., Kang, Y.K., 2010. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. **376**, 687-697.
- Beck, J., Hennecke, S., Bornemann-Kolatzki, K., Urnovitz, H.B., Neumann, S., Ströbel, P., Kaup, F.J., Brenig, B., Schütz, E., 2013. Genome aberrations in canine mammary carcinomas and their detection in cell-free plasma DNA. *PLoS One*. **8**, e75485.
- Belgrader, P., Tanner, S.C., Regan, J.F., Koehler, R., Hindson, B.J., Brown, A.S., 2013. Droplet digital PCR measurement of HER2 copy number alteration in formalin-fixed paraffin-embedded breast carcinoma tissue. *Clin. Chem*. **59**, 991-994.
- Blackwell, K.L., Pegram, M.D., Tan-Chiu, E., Schwartzberg, L.S., Arbushites, M.C., Maltzman, J.D., Forster, J.K., Rubin, S.D., Stein, S.H., Burstein, H.J., 2009. Single-agent lapatinib for HER2-overexpressing advanced or metastatic breast cancer that progressed on first- or second-line trastuzumab-containing regimens. *Ann. Oncol*. **20**, 1026-1031.

- Bonkobara, M., 2015. Dysregulation of tyrosine kinases and use of imatinib in small animal practice. *Vet. J.* **205**, 180-188.
- Boria, P.A., Glickman, N.W., Schmidt, B.R., Widmer, W.R., Mutsaers, A.J., Adams, L.G., Snyder, P.W., DiBernardi, L., de Gortari, A.E., Bonney, P.L., Knapp, D.W., 2005. Carboplatin and piroxicam therapy in 31 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Vet. Comp. Oncol.* **3**, 73-80.
- Burrai, G.P., Tanca, A., De Miglio, M.R., Abbondio, M., Pisanu, S., Polinas, M., Pirino, S., Mohammed, S.I., Uzzau, S., Addis, M.F., Antuofermo, E., 2015. Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer? *Tumor Biol.* **36**, 9083-9091.
- Burstein, H.J., Storniolo, A.M., Franco, S., Forster, J., Stein, S., Rubin, S., Salazar, V.M., Blackwell, K.L., 2008. A phase II study of lapatinib monotherapy in chemotherapy-refractory HER2-positive and HER2-negative advanced or metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* **9**, 1068-1074.

- Caner, V., Turk, N.S., Duzcan, F., Tufan, N.L., Kelten, E.C., Zencir, S., Dodurga, Y., Bagci, H., Duzcan, S.E., 2008. No strong association between HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in high-grade invasive urothelial carcinomas. *Pathol. Oncol. Res.* **14**, 261-266.
- Cerbone, L., Sternberg, C.N., Sengeløv, L., Agerbaek, M., Van Herpen, C., Marreaud, S., Collette, S., Zhang, J., 2016. Daugaard G. Results from a Phase I Study of Lapatinib with Gemcitabine and Cisplatin in Advanced or Metastatic Bladder Cancer: EORTC Trial 30061. *Oncology.* **90**, 21-28.
- Ching, C.B., Amin, M.B., Tubbs, R.R., Elson, P., Platt, E., Dreicer, R., Fergany, A., Hansel, D.E., 2011. HER2 gene amplification occurs frequently in the micropapillary variant of urothelial carcinoma: analysis by dual-color in situ hybridization. *Mod. Pathol.* **24**, 1111-1119.
- Chow, N.H., Chan, S.H., Tzai, T.S., Ho, C.L., Liu, H.S., 2001. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1957-1962.

Choy, K., Fidel, J., 2016. TOLERABILITY AND TUMOR RESPONSE OF A NOVEL LOW-DOSE PALLIATIVE RADIATION THERAPY PROTOCOL IN DOGS WITH TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE BLADDER AND URETHRA. *Vet. Radiol. Ultrasound*. **57**, 341-351.

Ciardiello, F., Caputo, R., Bianco, R., Damiano, V., Pomatico, G., De Placido, S., Bianco, A.R., Tortora, G., 2000. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2053-2063.

Decker, B., Parker, H.G., Dhawan, D., Kwon, E.M., Karlins, E., Davis, B.W., Ramos-Vara, J.A., Bonney, P.L., McNiel, E.A., Knapp, D.W., Ostrander, E.A., 2015. Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer--Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Mol. Cancer Res.* **13**, 993-1002.

- Dutra, A.P., Granja, N.V., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2004. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**, 1673-1681.
- Flint, A.F., U'Ren, L., Legare, M.E., Withrow, S.J., Dernell, W., Hanneman, W.H., 2004. Overexpression of the erbB-2 proto-oncogene in canine osteosarcoma cell lines and tumors. *Vet. Pathol.* **41**, 291-296.
- Fulkerson, C.M., Knapp, D.W., 2015. Management of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs: a review. *Vet. J.* **205**, 217-225.
- Gama, A., Alves, A., Schmitt, F., 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch.* **453**, 123-132.
- Gandour-Edwards, R., Lara, P.N. Jr, Folkins, A.K., LaSalle, J.M., Beckett, L., Li, Y., Meyers, F.J., DeVere-White, R., 2002. Does HER2/neu expression provide prognostic information in patients with advanced urothelial carcinoma? *Cancer.* **95**, 1009-1015.
- Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Kofler, M., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W., Ward, C.W., 2003. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals

an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors.

Mol. Cell. **11**, 495-505.

Glickman, L.T., Schofer, F.S., McKee, L.J., Reif, J.S., Goldschmidt, M.H., 1989.

Epidemiologic study of insecticide exposures, obesity, and risk of bladder cancer in household dogs. *J. Toxicol. Environ. Health.* **28**, 407-414.

Goble, N.M., Clarke, T., Hammonds, J.C., 1989. Histological changes in the

urinary bladder secondary to urethral catheterisation. *Br. J. Urol.* **63**, 354-357.

Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., Hynes, N.E., 1997. ErbB-2, the

preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **16**, 1647-1655.

Gutierrez, C., Schiff, R., 2011. HER2: biology, detection, and clinical

implications. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135**, 55-62.

Hanazono, K., Fukumoto, S., Kawamura, Y., Endo, Y., Kadosawa, T., Iwano,

H., Uchide, T., 2015. Epidermal growth factor receptor expression in canine transitional cell carcinoma. *J. Vet. Med. Sci.* **77**, 1-6.

- Henry, C.J., Tyler, J.W., McEntee, M.C., Stokol, T., Rogers, K.S., Chun, R., Garrett, L.D., McCaw, D.L., Higginbotham, M.L., Flessland, K.A., Stokes, P.K., 2003. Evaluation of a bladder tumor antigen test as a screening test for transitional cell carcinoma of the lower urinary tract in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **64**, 1017-1020.
- Heredia, N.J., Belgrader, P., Wang, S., Koehler, R., Regan, J., Cosman, A.M., Saxonov, S., Hindson, B., Tanner, S.C., Brown, A.S., Karlin-Neumann, G., 2013. Droplet Digital™ PCR quantitation of HER2 expression in FFPE breast cancer samples. *Methods.* **59**, S20-23.
- Hynes, N.E., Watson, C.J., 2010. Mammary Gland Growth Factors: Roles in Normal Development and in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a003186.
- Im, K.S., Kim, I.H., Kim, N.H., 2013. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. *Vet. J.* **195**, 366-372.
- Impellizeri, J.A., Howell, K., McKeever, K.P., Crow, S.E., 2006. The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an ex vivo evaluation. *Vet. J.* **171**, 556-558.

Isharwal, S., Huang, H., Nanjangud, G., Audenet, F., Chen, Y.B., Gopalan, A., Fine, S.W., Tickoo, S.K., Lee, B.H., Iyer, G., Chadalavada, K., Rosenberg, J.E., Bajorin, D.F., Herr, H.W., Donat, S.M., Dalbagni, G., Bochner, B.H., Solit, D.B., Reuter, V.E., Al-Ahmadie, H.A., 2018. Intratumoral heterogeneity of ERBB2 amplification and HER2 expression in micropapillary urothelial carcinoma. *Hum. Pathol.* **77**, 63-69.

Ito, C., Nishizuka, S.S., Ishida, K., Uesugi, N., Sugai, T., Tamura, G., Koeda, K., Sasaki, A., 2017. Analysis of PIK3CA mutations and PI3K pathway proteins in advanced gastric cancer. *J. Surg. Res.* **212**, 195-204.

Jimenez, R.E., Hussain, M., Bianco, F.J. Jr, Vaishampayan, U., Tabazcka, P., Sakr, W.A., Pontes, J.E., Wood, D.P. Jr, Grignon, D.J., 2001. Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin. Cancer Res.* **7**, 2440-2447.

Kaufman, D., Raghavan, D., Carducci, M., Levine, E.G., Murphy, B., Aisner, J., Kuzel, T., Nicol, S., Oh, W., Stadler, W., 2000. Phase II trial of

gemcitabine plus cisplatin in patients with metastatic urothelial cancer.

J. Clin. Oncol. **18**, 1921-1927.

Khan, K.N., Knapp, D.W., Denicola, D.B., Harris, R.K., 2000. Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **61**, 478-481.

Kim, J.W., Kim, H.P., Im, S.A., Kang, S., Hur, H.S., Yoon, Y.K., Oh, D.Y., Kim, J.H., Lee, D.S., Kim, T.Y., Bang, Y.J., 2008, The growth inhibitory effect of lapatinib, a dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase, in gastric cancer cell lines. *Cancer Lett.* **272**, 296-306.

Kinugasa, H., Nouse, K., Tanaka, T., Miyahara, K., Morimoto, Y., Dohi, C., Matsubara, T., Okada, H., Yamamoto, K., 2015. Droplet digital PCR measurement of HER2 in patients with gastric cancer. *Br. J. Cancer.* **112**, 1652-1655.

Knapp, D.W., Richardson, R.C., Chan, T.C., Bottoms, G.D., Widmer, W.R., DeNicola, D.B., Teclaw, R., Bonney, P.L., Kuczek, T., 1994. Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J. Vet. Intern. Med.* **8**, 273-278.

- Knapp, D.W., Glickman, N.W., Denicola, D.B., Bonney, P.L., Lin, T.L., Glickman, L.T., 2000a. Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder A relevant model of human invasive bladder cancer. *Urol. Oncol.* **5**, 47-59.
- Knapp, D.W., Glickman, N.W., Widmer, W.R., DeNicola, D.B., Adams, L.G., Kuczek, T., Bonney, P.L., DeGortari, A.E., Han, C., Glickman, L.T., 2000b. Cisplatin versus cisplatin combined with piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **46**, 221-226.
- Knapp, D.W., Ramos-Vara, J.A., Moore, G.E., Dhawan, D., Bonney, P.L., Young, K.E., 2014. Urinary bladder cancer in dogs, a naturally occurring model for cancer biology and drug development. *ILAR J.* **55**, 100-118.
- Knapp, D.W., Ruple-Czerniak, A., Ramos-Vara, J.A., Naughton, J.F., Fulkerson, C.M., Honkisz, S.I., 2016. A Nonselective Cyclooxygenase Inhibitor Enhances the Activity of Vinblastine in a Naturally-Occurring Canine Model of Invasive Urothelial Carcinoma. *Bladder Cancer.* **2**, 241-250.

Konecny, G.E., Pegram, M.D., Venkatesan, N., Finn, R., Yang, G., Rahmeh, M., Untch, M., Rusnak, D.W., Spehar, G., Mullin, R.J., Keith, B.R., Gilmer, T.M., Berger, M., Podratz, K.C., Slamon, D.J., 2006. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 1630-1639.

Krasilnikov, M.A., 2000. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc)*. **65**, 59-67.

Krüger, S., Weitsch, G., Büttner, H., Matthiensen, A., Böhmer, T., Marquardt, T., Sayk, F., Feller, A.C., Böhle, A., 2002a. Overexpression of c-erbB-2 oncoprotein in muscle-invasive bladder carcinoma: relationship with gene amplification, clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Int. J. Oncol.* **21**, 981-987.

Krüger, S., Weitsch, G., Büttner, H., Matthiensen, A., Böhmer, T., Marquardt, T., Sayk, F., Feller, A.C., Böhle, A., 2002b. HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic implications. *Int. J. Cancer.* **102**, 514-518.

- Lae, M., Couturier, J., Oudard, S., Radvanyi, F., Beuzeboc, P., Vieillefond, A., 2010. Assessing HER2 gene amplification as a potential target for therapy in invasive urothelial bladder cancer with a standardized methodology: results in 1005 patients. *Ann. Oncol.* **21**, 815-819.
- Latif, Z., Watters, A.D., Dunn, I., Grigor, K.M., Underwood, M.A., Bartlett, J.M.S., 2003. HER2/neu overexpression in the development of muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Cancer.* **89**, 1305-1309.
- Latif, Z., Watters, A.D., Dunn, I., Grigor, K., Underwood, M.A., Bartlett, J.M.S. 2004. HER2/neu gene amplification and protein overexpression in G3 pT2 transitional cell carcinoma of the bladder: a role for anti-HER2 therapy? *Eur. J. Cancer.* **40**, 56-63.
- Lee, A.H., Key, H.P., Bell, J.A., Hodi, Z., Ellis, I.O., 2012. Concordance of HER2 status assessed on needle core biopsy and surgical specimens of invasive carcinoma of the breast. *Histopathology.* **60**, 880-884.
- Lee, J.Y., Tanabe, S., Shimohira, H., Kobayashi, Y., Oomachi, T., Azuma, S., Ogihara, K., Inokuma, H., 2007. Expression of cyclooxygenase-2, P-

- glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma. *Res. Vet. Sci.* **83**, 210-216.
- Li, J., Lv, B., Li, X., He, Z., Zhou, K., 2013. Apoptosis-related molecular differences for response to tyrosin kinase inhibitors in drug-sensitive and drug-resistant human bladder cancer cells. *J. Cancer Res. Ther.* **9**, 668-671.
- Ma, Z., Parris, A.B., Xiao, Z., Howard, E.W., Kosanke, S.D., Feng, X., Yang, X., 2017. Short-term early exposure to lapatinib confers lifelong protection from mammary tumor development in MMTV-erbB-2 transgenic mice. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 6.
- Maeda, S., Tomiyasu, H., Tsuboi, M., Inoue, A., Ishihara, G., Uchikai, T., Chambers, J.K., Uchida, K., Yonezawa, T., Matsuki, N., 2018. Comprehensive gene expression analysis of canine invasive urothelial bladder carcinoma by RNA-Seq. *BMC Cancer.* **18**, 472.
- Martin de las Mulas, J., Ordas, J., Millan, Y., Fernandez-Soria, V., Ramon y Cajal, S., 2003. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res. Treat.* **80**, 363-367.

- Martinez, I., Mattoon, J.S., Eaton, K.A., Chew, D.J., DiBartola, S.P., 2003. Polypoid cystitis in 17 dogs (1978-2001). *J. Vet. Intern. Med.* **17**, 499-509.
- Marvel, S.J., Séguin, B., Dailey, D.D., Thamm, D.H., 2017. Clinical outcome of partial cystectomy for transitional cell carcinoma of the canine bladder. *Vet. Comp. Oncol.* **15**, 1417-1427.
- McHugh, L.A., Sayan, A.E., Mejlvang, J., Griffiths, T.R., Sun, Y., Manson, M.M., Tulchinsky, E., Mellon, J.K., Kriaievska, M., 2009. Lapatinib, a dual inhibitor of ErbB-1/-2 receptors, enhances effects of combination chemotherapy in bladder cancer cells. *Int. J. Oncol.* **34**, 1155-1163.
- McMillan, S.K., Boria, P., Moore, G.E., Widmer, W.R., Bonney, P.L., Knapp, D.W., 2011. Antitumor effects of deracoxib treatment in 26 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **239**, 1084-1089.
- Mellon, J.K., Lunec, J., Wright, C., Horne, C.H., Kelly, P., Neal, D.E., 1996. C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J. Urol.* **155**, 321-326.

- Mochizuki, H., Kennedy, K., Shapiro, S.G., Breen, M., 2015a. BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLoS One*. **10**, e0129534.
- Mochizuki, H., Shapiro, S.G., Breen, M., 2015b. Detection of BRAF Mutation in Urine DNA as a Molecular Diagnostic for Canine Urothelial and Prostatic Carcinoma. *PLoS One*. **10**, e0144170.
- Mohammed, S.I., Bennett, P.F., Craig, B.A., Glickman, N.W., Mutsaers, A.J., Snyder, P.W., Widmer, W.R., DeGortari, A.E., Bonney, P.L., Knapp, D.W., 2002. Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Res.* **62**, 356-358.
- Montie JE. 2005. Her-2/neu protein overexpression and gene amplification in human transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.* **173**, 1921-1922.
- Nedjadi, T., Al-Maghrabi, J., Assidi, M., Dallol, A., Al-Kattabi, H., Chaudhary, A., Al-Sayyad, A., Al-Ammari, A., Abuzenadah, A., Buhmeida, A., Al-Qahtani, M., 2016. Prognostic value of HER2 status in bladder transitional cell carcinoma revealed by both IHC and BDISH techniques. *BMC Cancer*. **16**, 653.

- Otsuji, K., Sasaki, T., Tanaka, A., Kunita, A., Ikemura, M., Matsusaka, K., Tada, K., Fukayama, M., Seto, Y., 2017. Use of droplet digital PCR for quantitative and automatic analysis of the HER2 status in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **162**, 11-18.
- Owens, M.A., Horten, B.C., Da Silva, M.M., 2004. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin. Breast Cancer* **5**, 63-69.
- Park, Y.R., Seo, S.Y., Kim, S.L., Zhu, S.M., Chun, S., Oh, J.M., Lee, M.R., Kim, S.H., Kim, I.H., Lee, S.O., Lee, S.T., Kim, S.W., 2018. MiRNA-206 suppresses PGE2-induced colorectal cancer cell proliferation, migration, and invasion by targetting TM4SF1. *Biosci. Rep.* **38**, pii: BSR20180664.
- Patrick, D.J., Fitzgerald, S.D., Sesterhenn, I.A., Davis, C.J., Kiupel, M., 2006. Classification of canine urinary bladder urothelial tumours based on the World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification. *J. Comp. Pathol.* **135**, 190-199.

Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C.H., Steger, G., Huang, C.S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Láng, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T.M., Rüschoff, J., Suto, T., Greaorex, V., Ward, C., Straehle, C., McFadden, E., Dolci, M.S., Gelber, R.D., 2005. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1659-1672.

Pils, D., Pinter, A., Reibenwein, J., Alfanz, A., Horak, P., Schmid, B.C., Hefler, L., Horvat, R., Reinthaller, A., Zeillinger, R., Krainer, M., 2007. In ovarian cancer the prognostic influence of HER2/neu is not dependent on the CXCR4/SDF-1 signalling pathway. *Br. J. Cancer.* **96**, 485-491.

Pirrelli, M., Caruso, M.L., Di Maggio, M., Armentano, R., Valentini, A.M., 2013. Are biopsy specimens predictive of HER2 status in gastric cancer patients? *Dig. Dis. Sci.* **58**, 397-404.

Powles, T., Huddart, R.A., Elliott, T., Sarker, S.J., Ackerman, C., Jones, R., Hussain, S., Crabb, S., Jagdev, S., Chester, J., Hilman, S., Beresford, M., Macdonald, G., Santhanam, S., Frew, J.A., Stockdale, A., Hughes,

- S., Berney, D., Chowdhury, S., 2017. Phase III, double-blind, randomized trial that compared maintenance Lapatinib versus placebo after first-line chemotherapy in patients with human epidermal growth factor receptor 1/2-positive metastatic bladder cancer. *J. Clin. Oncol.* **35**, 48-55.
- Ravery, V., Grignon, D., Angulo, J., Pontes, E., Montie, J., Crissman, J., Chopin, D., 1997. Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol. Res.* **25**, 9-17.
- Roa, I., Slater, J., Carvajal, D., Schalper, K., de Toro, G., Ares, R., Game, A., León, J., de Aretxabala, X., 2013. HER2 gene amplification and overexpression in advanced gastric cancer. *Rev. Med. Chil.* **141**, 1411-1419.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A., 1998. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells.* **16**, 413-428.
- Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., 1999. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor

- suppressor protein in canine mammary tumors. *J. Vet. Med. Sci.* **61**, 27-32.
- Rusnak, D.W., Lackey, K., Affleck, K., Wood, E.R., Alligood, K.J., Rhodes, N., Keith, B.R., Murray, D.M., Knight, W.B., Mullin, R.J., Gilmer, T.M., 2001. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 85-94.
- Saeki, K., Fujita, A., Fujita, N., Nakagawa, T., Nishimura, R., 2015. Total cystectomy and subsequent urinary diversion to the prepuce or vagina in dogs with transitional cell carcinoma of the trigone area: a report of 10 cases (2005-2011). *Can. Vet. J.* **56**, 73-80.
- Samaratunga, H., Martignoni, G., Egevad, L., Delahunt, B., 2013. Premalignant lesions of the urinary bladder. *Pathology*. **45**, 243-250.
- Sasaki, Y., Sasaki, T., Kawai, T., Morikawa, T., Matsusaka, K., Kunita, A., Kume, H., Aoki, I., Homma, Y., Fukayama, M., 2014. HER2 protein overexpression and gene amplification in upper urinary tract

urothelial carcinoma-an analysis of 171 patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 699-708.

Sato, K., Moriyama. M., Mori, S., Saito, M., Watanuki, T., Terada, K., Okuhara, E., Akiyama, T., Toyoshima, K., Yamamoto, T., Kato, T., 1992. An immunohistologic evaluation of c-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer*. **70**, 2493-2498.

Sauter, G., Lee, J., Bartlett, J.M., Slamon, D.J., Press, M.F., 2009. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J. Clin.Oncol.* **27**, 1323-1333.

Schneider, S.A., Sukov, W.R., Frank, I., Boorjian, S.A., Costello, B.A., Tarrell, R.F., Thapa, P., Houston Thompson, R., Tollefson, M.K., Jeffrey Karnes, R., Cheville, J.C., 2014. Outcome of patients with micropapillary urothelial carcinoma following radical cystectomy: ERBB2 (HER2) amplification identifies patients with poor outcome. *Mod. Pathol.* **27**, 758-764.

Shapiro, S.G., Raghunath, S., Williams, C., Motsinger-Reif, A.A., Cullen, J.M., Liu, T., Albertson, D., Ruvolo, M., Bergstrom-Lucas, A., Jin, J., 2015.

Canine urothelial carcinoma: genomically aberrant and comparatively relevant. *Chromosome Res.* **23**, 311-331.

Shinoda, H., Legare, M.E., Mason, G.L., Berkbighler, J.L., Afzali, M.F., Flint, A.F., Hanneman, W.H., 2014. Significance of ER α , HER2, and CAV1 expression and molecular subtype classification to canine mammary gland tumor. *J. Vet. Diagn. Invest.* **26**, 390-403.

Smith, I., Procter, M., Gelber, R.D., Guillaume, S., Feyereislova, A., Dowsett, M., Goldhirsch, A., Untch, M., Mariani, G., Baselga, J., Kaufmann, M., Cameron, D., Bell, R., Bergh, J., Coleman, R., Wardley, A., Harbeck, N., Lopez, R.I., Mallmann, P., Gelmon, K., Wilcken, N., Wist, E., Sánchez Rovira, P., Piccart-Gebhart, M.J., 2007. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomized controlled trial. *Lancet.* **369**, 29-36

Soria, F., Moschini, M., Haitel, A., Wirth, G.J., Karam, J.A., Wood, C.G., Rouprêt, M., Margulis, V., Karakiewicz, P.I., Briganti, A., Raman, J.D., Kammerer-Jacquet, S.F., Mathieu, R., Bensalah, K., Lotan, Y., Özsoy, M., Remzi, M., Gust, K.M., Shariat, S.F., 2017. HER2 overexpression

is associated with worse outcomes in patients with upper tract urothelial carcinoma (UTUC). *World J. Urol.* **35**, 251-259.

Suh, K.J., Sung, J.H., Kim, J.W., Han, S.H., Lee, H.S., Min, A., Kang, M.H., Kim, J.E., Kim, J.W., Kim, S.H., Lee, J.O., Kim, Y.J., Lee, K.W., Kim, J.H., Bang, S.M., Im, S.A., Lee, J.S., 2017. EGFR or HER2 inhibition modulates the tumor microenvironment by suppression of PD-L1 and cytokines release. *Oncotarget.* **8**, 63901-63910.

Sun, X., Li, Q., 2018. Prostaglandin EP2 receptor: Novel therapeutic target for human cancers (Review). *Int. J. Mol. Med.* **42**, 1203-1214.

Terragni, R., Casadei Gardini, A., Sabbatini, S., Bettini, G., Amadori, D., Talamonti, C., Vignoli, M., Capelli, L., Saunders, J.H., Ricci, M., Ulivi, P., 2014. EGFR, HER-2 and KRAS in canine gastric epithelial tumors: a potential human model? *PLoS One.* **15**, 9:e85388.

Tetu, B., Fradet, Y., Allard, P., Veilleux, C., Roberge, N., Bernard, P., 1996. Prevalence and clinical significance of the HER-2/neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J. Urol.* **155**, 1784-1788.

- Valli, V.E., Norris, A., Jacobs, R.M., Laing, E., Withrow, S., Macy, D., Tomlinson, J., McCaw, D., Ogilvie, G.K., Pidgeon, G., Henderson, R.A., 1995. Pathology of canine bladder and urethral cancer and correlation with tumour progression and survival. *J. Comp. Pathol.* **113**, 113-130.
- Veterinary cooperative oncology group - common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1 (2016). *Vet. Comp. Oncol.* **14**, 417-446.
- Walker, M., Breider, M., 1987. Intraoperative radiotherapy of canine bladder cancer. *Vet. Radiol. Ultrasound.* **28**, 200-204.
- Walters, L., Martin, O., Price, J., Sula, M.M., 2018. Expression of receptor tyrosine kinase targets PDGFR- β , VEGFR2 and KIT in canine transitional cell carcinoma. *Vet. Comp. Oncol.* **16**, E117-E122.
- Wang, T., Hsieh, E.T., Henry, P., Hanna, W., Streutker, C.J., Grin, A., 2014. Matched biopsy and resection specimens of gastric and gastroesophageal adenocarcinoma show high concordance in HER2 status. *Hum. Pathol.* **45**, 970-975.

Wang, Y., Tsang, J.Y.S., Cui, Y., Cui, J., Lin, Y., Zhao, S., Law, P.T.W., Cheung, S.Y., Ng, E.K.O., Tse, G.M.K., Ke, Z., 2017. Robust and accurate digital measurement for HER2 amplification in HER2 equivocal breast cancer diagnosis. *Sci. Rep.* **7**, 6752.

Wester, K., Sjostrom, A., de la Torre, M., Carlsson, J., Malmstrom, P.U., 2002. HER-2-a possible target for therapy of metastatic urinary bladder carcinoma. *Acta. Oncol.* **41**, 282-288.

Withrow, S.J., Gillette, E.L., Hoopes, P.J., McChesney, S.L., 1989. Intraoperative irradiation of 16 spontaneously occurring canine neoplasms. *Vet. Surg.* **18**, 7-11.

Wood, E.R., Truesdale, A.T., McDonald, O.B., Yuan, D., Hassell, A., Dickerson, S.H., Ellis, B., Pennisi, C., Horne, E., Lackey, K., Alligood, K.J., Rusnak, D.W., Gilmer, T.M., Shewchuk, L., 2004. A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res.* **64**, 6652-6659.

Wulfing, C., Machiels, J.P., Richel, D.J., Grimm, M.O., Treiber, U., De Groot, M.R., Beuzeboc, P., Parikh, R., Pétavy, F., El-Hariry, I.A., 2009. A

single-arm, multicenter, open-label phase 2 study of lapatinib as the second-line treatment of patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *Cancer*. **115**, 2881-2890.

Yan, M., Schwaederle, M., Arguello, D., Millis, S.Z., Gatalica, Z., Kurzrock, R., 2015. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer Metastasis Rev*. **34**, 157-164.

Zhu, Y., Lu, D., Lira, M.E., Xu, Q., Du, Y., Xiong, J., Mao, M., Chung, H.C., Zheng, G., 2016. Droplet digital polymerase chain reaction detection of HER2 amplification in formalin fixed paraffin embedded breast and gastric carcinoma samples. *Exp. Mol. Pathol.* **100**, 287-293.