

## 免疫染色と *in situ* hybridization 法で決める最近の乳癌治療

### Recent Trends of Breast Cancer Therapy Decided by the Results of Immunohistochemistry and *in situ* Hybridization

黒 住 昌 史

Masafumi Kurosumi

<sup>a</sup>埼玉県立がんセンター病理診断科

**要 旨** 近年、癌の薬物療法は癌細胞の生物学的な性状によって適応を決定するいわゆる「tailor-made therapy」の方向に進んでいる。特にホルモン依存性癌である乳癌では、ER (estrogen receptor) もしくはPgR (progesterone receptor) 陽性の患者のみが内分泌療法の対象になっている。また、ヒト上皮細胞増殖因子受容体であるHER2に対するモノクローナル抗体製剤であるtrastuzumabが、HER2のタンパク過剰発現ないしは遺伝子増幅のある乳癌に有効であることが明らかになり、広く臨床で使用されるようになった。現在、これらの治療法の適応を決めるために、ER, PgRの発現状況とHER2タンパクの過剰発現の有無を免疫組織化学的方法 (IHC法) で、HER2遺伝子増幅をISH法 (FISH, SISH, CISH) で検索することがスタンダードになった。このような乳癌領域における新しい展開は、長年の基礎的、臨床的研究の結実であり、地道な研究と実地医療が結びついた理想的な事例の1つと思われる。

キーワード：HER-2, ER, PgR, FISH, DC-SISH

#### 1. はじめに

免疫組織化学 IHC (immunohistochemistry) 的方法である蛍光抗体法は1940年代、酵素抗体法は1960年代に開発され、生物学、細胞学、組織学、病理学などの分野の基礎研究に利用され、数多くの研究成果が発表されている。その後、IHC法の技術の著しい進歩と一次抗体の質の向上によって実地臨床の場でも使えるレベルに達し、多くの臓器の病理診断に必要不可欠な検索方法になった。その中で特に乳癌領域においては、1990年代になって治療法の選択にIHC法が利用されるようになり、ER (estrogen receptor), PgR (progesterone receptor), HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) の発現状況の検索は必須な項目になり<sup>1)</sup>、世界中でルーチンに行われるようになった。本邦においてもいずれも保険収載され、正式の診療報酬を請求できるようになった。一方、特定のRNAもしくはDNAの局在を検索できる *in situ* hybridization (ISH) 法は1970年代に確立され、ISH法、FISH (fluorescence ISH) 法が基礎研究の分野で広く利用されるようになった。その後、1990年代になってFISH法も乳癌領域で臨床応用されるようになり、*HER2/neu* 遺伝子の増幅状況の検査法として行われるようになり<sup>1)</sup>、やはり保険収載されている。さらにFISH法を発展させた方法として銀粒子を用い

るSISH (silver ISH) 法や色素を用いるCISH (chromogenic ISH) 法が開発され、通常の光学顕微鏡でも遺伝子増幅検査が可能になった。筆者は25年前からIHC法やISH法の臨床応用の可能性について追究してきたが、最近になってようやく治療に直結する検査法として評価されるようになり、形態学を長く行ってきた者としては非常に感慨深いものがある。本解説では、特に乳癌領域での免疫染色およびISH法の意義と現状について概説する。

#### 2. ER, PgRの免疫組織化学的判定

##### 2.1 ホルモンレセプター検索の意義

1895年にBeatsonは再発乳癌に対して卵巣摘出術を施行し、内分泌療法が乳癌に有効であることを最初に報告した。その後、種々の内分泌療法が開発されたが、1970～80年代の多くの生化学的研究によって内分泌療法はホルモンレセプター陽性の乳癌のみ有効であることが明らかになった<sup>2)</sup>。また、乳癌の標準的な初期治療の戦略を協議するSt. Gallenコンセンサス会議では、2001年に「乳癌の内分泌療法の適応を決定するためには乳癌組織におけるERとPgRの発現状況を検索することが必要である。」というrecommendationが発表された<sup>3)</sup>。すなわち、ホルモンレセプター陽性の患者は、anti-estrogen剤、LH-RH analog剤、aromatase阻害剤などを用いた内分泌療法の対象となり、ホルモンレセプター状況に基づいた治療法の選択が行われるようになった。

##### 2.2 免疫染色の評価方法とScore別頻度

ホルモンレセプターの検査方法としては、1990年代まではDCC法やEIA (enzyme immunoassay) 法などの生化学的

<sup>a</sup> 〒362-0806 埼玉県北足立郡伊奈町小室818番地  
TEL: 048-722-1111; FAX: 048-723-5197  
E-mail: mkurosumi@cancer-c.pref.saitama.jp  
2009年1月5日受付

方法が主に行われてきたが、本邦では2003年によくIHC法による検索が認められた。IHC法ではER、PgR染色のいずれも癌細胞の核が染色されるため、核の染色状況によって陰性か陽性の判断を下すことになるが、判定方法や判定基準については国際的に統一されていないのが現状である。日本乳癌学会の「適切なホルモンレセプター検索に関する研究」班では、2005年に班員のコンセンサスに基づいて日本独自の判定基準（J-Score）を提唱した。J-Scoreは染色占有率のみで判定し、染色強度を考慮しない基準である。占有率のcutoff値については、St. Gallen国際会議のコンセンサスのcutoff値が10%であったため10%をmajor cutoff lineにした。また、いくつかの臨床試験で1%もcutoff値にしていることから、1%もminor cutoff lineとして採用した。その結果、判定Scoreの内容は、J-Score 0：陰性、J-Score 1：陽性細胞占有率1%未満、J-Score 2：陽性細胞占有率1%以上10%未満、J-Score 3：陽性細胞占有率10%以上ということになった。また、判定区分としては、陰性：J-Score 0、境界域：J-Score 1, 2、陽性：J-Score 3とした（表1）<sup>4,5)</sup>。埼玉県立がんセンターの439症例でのScore別頻度は、ERでは、J-Score 3：77.9%、J-Score 2：0.9%、J-Score 1：1.8%、J-Score 0：19.4%であり、10%以上の細胞が陽性の症例が77.9%を占めていた（図1）。また、微妙に染色される判定の難しい

表1 乳癌学会判定基準（J-スコア）

1. 判定スコア	陽性細胞数
J-Score 0	陰性
J-Score 1	陽性細胞占有率 1%未満
J-Score 2	陽性細胞占有率 1%以上10%未満
J-Score 3	陽性細胞占有率 10%以上
2. 判定区分	
陰性	J-Score 0
境界域	J-Score 1, 2
陽性	J-Score 3

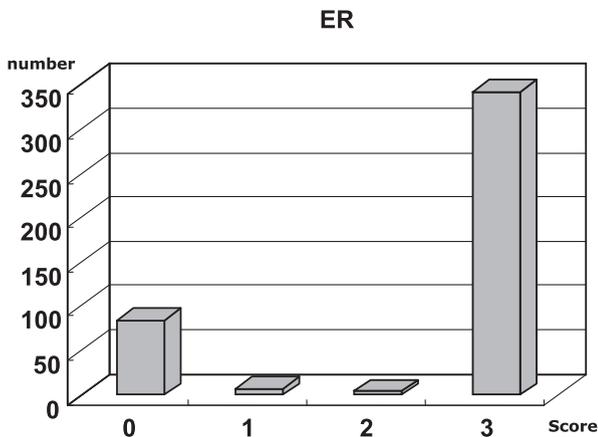


図1 ER判定におけるJ-Score別頻度  
内分泌療法の適応となるScore 3は77.9%を占めていた。

J-Score 1と2の症例はわずか2.7%に過ぎなかった。一方、PgRでは、J-Score 3:68.1%、J-Score 2:4.8%、J-Score 1:6.2%、J-Score 0:21.0%であり、10%以上の細胞が陽性の症例は68.1%であった（図2）。多くの施設では、術後の内分泌療法は主にScore 3の症例に行っており、再発時にはScore 2, 1の症例についても内分泌療法を考慮している。本邦の多くの施設では、現在はこのJ-Scoreに基づいて判定を行っている<sup>5)</sup>。

一方、判定基準の1つとして、1998年にAllredらが提唱したScore分類が最近になって注目されており、いくつかの臨床的な研究結果が報告されている。この判定基準（A-Score）では、染色された細胞の占有率によってPS（Proportion Score）を6段階に、染色強度によってIS（Intensity Score）を4段階に分類している。PSは、Score 0（全く陰性）、Score 1（1/100未満）、Score 2（1/100～1/10）、Score 3（1/10～1/3）、Score 4（1/3～2/3）、Score 5（2/3以上）であり、ISは、Score 0（negative）、Score 1（weak）、Score 2（intermediate）、Score 3（strong）である。最終的には2つのScore値を合計してScore 0, 2～8の8段階に分類している（図3）<sup>6)</sup>。このScoreと内分泌療法の効果との関係ではScore 3以上で治療効果があると報告されている<sup>7)</sup>。埼玉県立がんセンターのER陽性354例のScore別頻度は、A-Score 7-8：

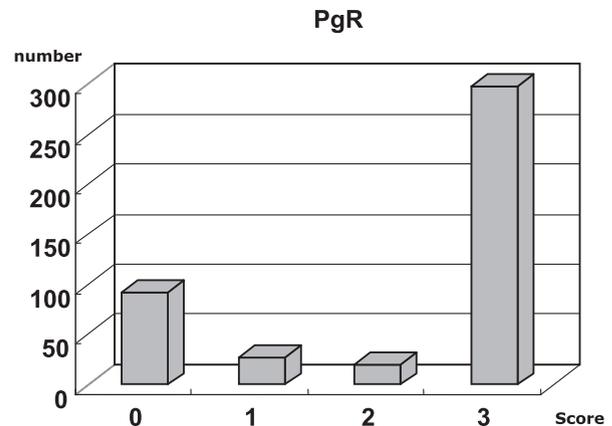


図2 PgR判定におけるJ-Score別頻度  
内分泌療法の適応となるScore 3は68.1%を占めていた。

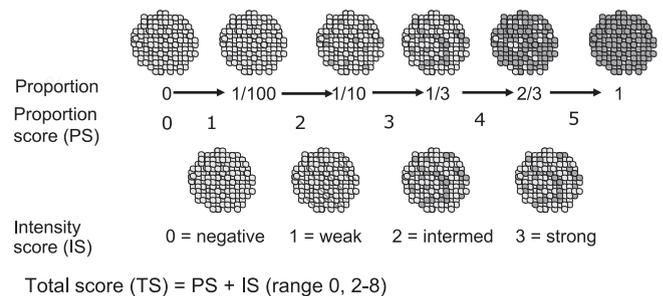


図3 Allred scoreの評価方法  
染色細胞の占有率によって6段階、染色強度によって4段階のScoreで評価し、それぞれのScoreの合計を算出し、総Scoreとして評価する。

80.8%, A-Score 6:9.3%, A-Score 5:4.8%, A-Score 4:2.8%, A-Score 3:1.1%, A-Score 2:1.1%であり(図4), A-Score 7-8から2まで順に頻度が低くなっていった<sup>5)</sup>. 2008年のSan Antonio Breast Cancer Symposiumで発表されたtamoxifenとexemestaneの効果を比較検討したTEAM trialの病理学的検討では, A-Score 7-8以上が治療に対して有効であるという結果であった. 一方, PgR陽性347例のScore別頻度は, A-Score 7-8:58.2%, A-Score 6:15.6%, A-Score 5:11.5%, A-Score 4:5.2%, A-Score 3:6.6%, Score 2:2.9%であり(図5),これもほぼScore順に頻度が低くなっていった<sup>5)</sup>. TEAM trialの症例群では, PgRはA-Score 5点以上が治療に対して有効であった. このように, A-Scoreは内分泌療法剤であるtamoxifenやaromatase inhibitorの適応を決める上でも重要視されており<sup>8)</sup>, Scoreの正しい判定が望まれている.

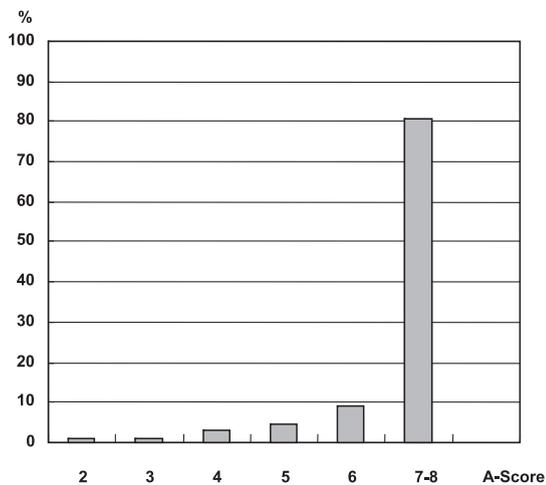


図4 ER陽性例におけるA-Score別頻度  
ホルモン剤の効果が高いといわれているScore 7-8は80.8%を占めていた.

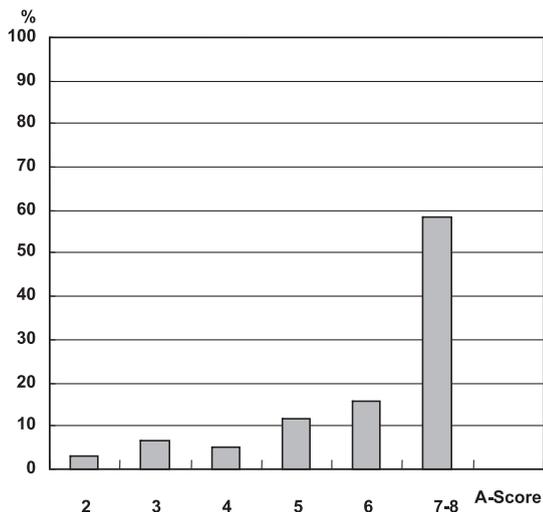


図5 PgR陽性例におけるA-Score別頻度  
ホルモン剤の効果が高いといわれているScore 5以上は85.3%を占めていた.

### 3. HER2の免疫組織化学的判定

#### 3.1 HER2過剰発現検索の意義

HER (human epidermal growth factor type) 2/neuは, ヒト上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)遺伝子に類似した構造を示す癌遺伝子として発見された. HER2は細胞の増殖や悪性化に関与するとされており, 予後因子としても重要視されている. 一方, 抗癌作用を有するtrastuzumabは遺伝子を組み換えたHER2モノクローナル抗体であり, 乳癌の治療薬として1998年に米国で承認されている. trastuzumabはHER2が過剰発現している癌にのみ効果が認められ, 一般的にはHER2タンパクの過剰発現はIHC法で, HER2遺伝子の過剰発現はFISH法で検索されている<sup>1)</sup>. 2001年6月にIHC法が保険収載されている.

#### 3.2 免疫染色の評価方法とScore別頻度

IHC法では, 癌細胞の細胞膜にHER2タンパクが局在するため, 陽性細胞では細胞膜が縁どりされるように染色されてくる. 染色性は面積と強度で判定され, 10%以上の癌細胞が染色された場合のみ強度について評価する「10%ルール」がキットの基準として用いられている. また, 染色強度に従って4段階に分けて判定している. Score 0は10%未満の癌細胞の膜が陽性を示すか全く染まらないもの, Score 1は膜が不完全に染まるもの, Score 2とScore 3は膜がきれいに縁どりされて染まるもので, 弱から中等度に染まるものをScore 2, 強く染まるものをScore 3と判定する(図6). 浸潤巢のみで判定し, 乳管内進展巣では判定しない. また, 細胞質が染色されても判定の対象とはしない<sup>1)</sup>. 埼玉県立がんセンターにおける1,482症例の判定結果は, Score 0:33.7%, Score 1:38.0%, Score 2:15.7%, Score 3:12.9%であり, Score 2以上が28%を占めていた(表2). trastuzumab治療の適応基準については現在も議論されているが, Score 3の患者は治療対象とし, Score 2はFISH法で遺伝子増幅が確

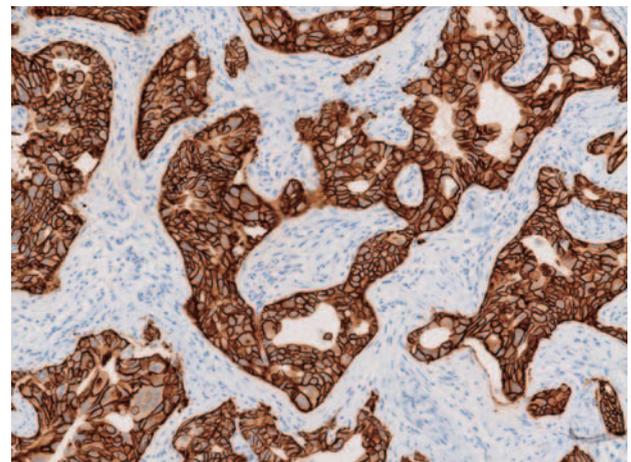


図6 IHC法のHER2染色像  
10%以上の癌細胞の膜が完全に強く染色される場合にScore 3と判定する.

表2 IHC法 HER2 スコア別乳癌患者数

Score	0	1+	2+	3+	total
number	499	563	232	188	1,482
%	34	38	16	13	100

(埼玉県立がんセンター, 2001-2007年)

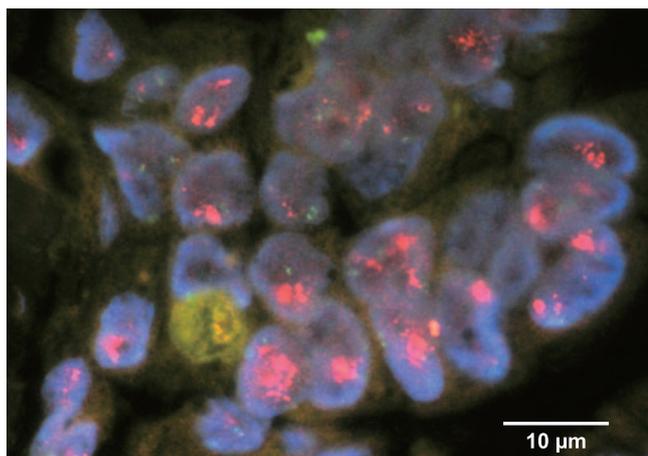


図7 FISH法の蛍光写真像

HER2がオレンジ、CEP17がグリーンの蛍光を発している。HER2/CEP17のシグナル比が2.0以上の場合を陽性と判定する。

認された場合のみ治療対象とするという考え方が一般的である。2006年から術後療法においても trastuzumab が使われるようになり、より厳密な基準によって HER2 status を評価する必要があるといわれており、2007年1月に ASCO/CAP は新しい HER2 検査ガイドラインを発表した。すなわち、IHC法では強い染色を示す癌細胞が30%以上の場合に Score 3 と判定する「30%ルール」に改訂され、今後10%ルールに替わる可能性がでてきている。

### 3.3 HER2 遺伝子増幅の判定

FISH法では、蛍光を発する HER2 遺伝子の数と対照となる CEP17 の数との比で遺伝子増幅の有無を判定する方法がとられている(図7)。CEP17は17番染色体のセントロメア部分のことであり、ほとんどの正常細胞では HER2 と同数が認められる。HER-2/CEP17 の比が2.0以上の場合(Path Vysion 法)に HER2 遺伝子の増幅があると判断されている。2003年4月(転移性乳癌のみ)、2008年4月(すべての浸潤性乳癌)に FISH 法が保険収載された。埼玉県立がんセンターの Score 2 の症例について FISH 法で再検査したところ、そのうち66%が陽性と判定されたことから、HER2 の推定陽性率は23.6%となる。日本の浸潤性乳癌患者を40,000人とするとその約25%、10,000人ほどが trastuzumab の適応となりうると推定された。2007年1月に ASCO/CAP が発表した HER2 のガイドラインでは、FISH 法の判定において、「陽性」「陰性」の他に HER2/CEP17 のシグナル比が0.8~2.2の部分を「Equivocal (境界域)」とし、HER2/CEP17 のシグナル比>2.2を「陽性」と判定する基準に改訂された。今後の臨床試験の結果により、ASCO/CAP の判定基準が世界的な標準になる可能性がある。HER2 検査のさらなる展望として、将来的に導入が期待される新たな HER2 遺伝子増幅の検査法を紹介する。FISH 法では、HER 遺伝子増幅を蛍光シグナルとして描出させるため評価には蛍光顕微鏡が必要であることと標本の永久保存ができないという難点がある。それに対し、新しい方法である SISH 法は銀粒子、CISH 法は色素産生物質によって染色体シグナルを可視化するので、通常の光学顕微鏡下で判定でき、標本の永久保存が可能である。Single-color の SISH 法と CISH 法では2枚の連続切片を作製し、CEN17 と HER2 遺伝子の増幅を別々に検索しなければならないが(図8)、2008年の ASCO で我々のグループが発表した DC-SISH (dual color-SISH) 法は FISH 法と同様に1

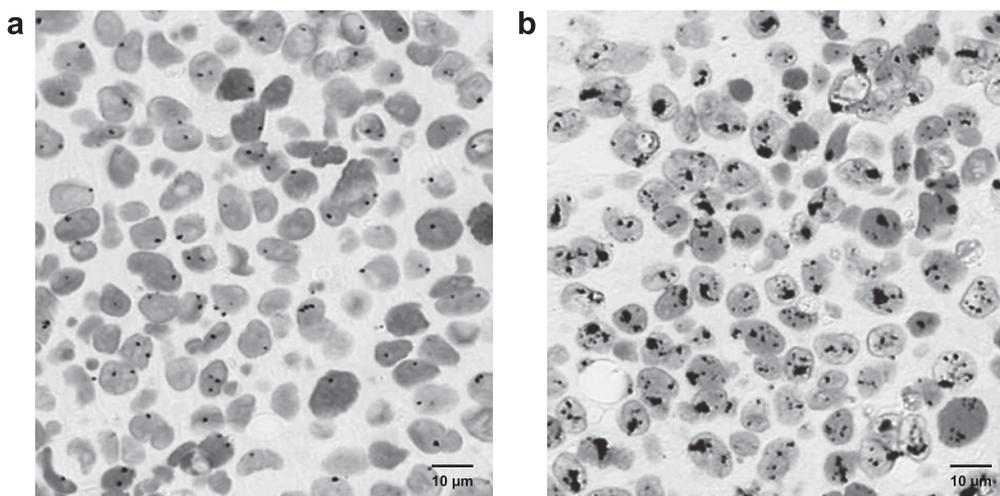


図8 SISH法の顕微鏡像

a. CEN17が黒色の dot として描出されている。b. HER2 遺伝子が黒色の dot もしくは cluster で描出されている。HER2/CEN17 比が2.0以上の場合を陽性と判定する。

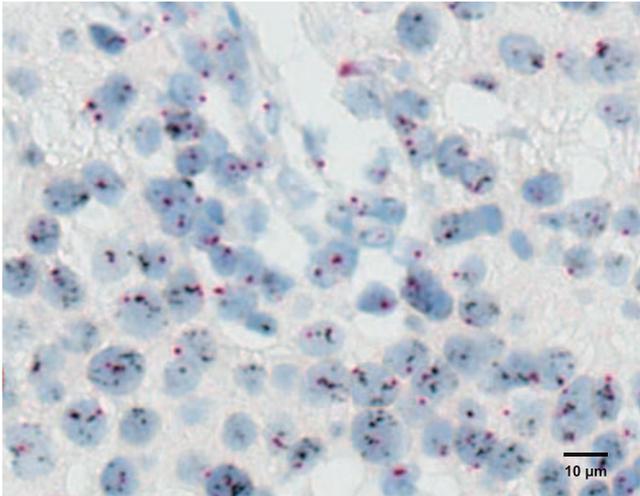


図9 DC-SISH法の顕微鏡像

CEN17が赤色のdotとして、HER2遺伝子が黒色のdotで描出されている。CER2/CEN17比が2.0以上の場合を陽性と判定する。

枚の切片でHER2遺伝子（黒い粒子）とCEN17（赤い粒子）を同時に光学顕微鏡下で評価できる方法であり、新しい方法として有望視されている（図9）<sup>9)</sup>。さらに、IHC法とSISH法の組み合わせにより、HER2遺伝子増幅とHER2タンパクの過剰発現を同時に判定できる方法も確立されつつある。このようにHER2検査の精度向上を目指し、新たな検査法の開発も進められている。

#### 4. まとめ

IHC法とISH法は基礎的研究の中で開発された形態学的な技術であり、各方面の基礎研究の分野で発達してきた。その後、実際の病理診断の分野にも取り入れられ、大きく進歩

してきた。さらに日常の臨床で使われるようになり、多くの企業が改良や研究開発に力を注いだため、技術と精度は著しく進歩した。一方、乳癌医療においてはいくつかの重要な生物学的因子が明らかになり、*tailor-made therapy*として治療法の選択にも関わってくるようになった。このような物質の存在診断は、当初は生化学的方法で行われていたが、現在では組織、細胞像を確認する*in situ*での判断が重要視され、形態学的な検査法であるIHC法およびISH法が主流になってきた。このように長年の基礎的な研究の積み重ねが実地医療の場において極めて有用な実を結ぶことがあることが実証された例である。

#### 文 献

- 1) 黒住昌史：乳癌疾患の臨床，金原出版，東京，pp.91-95（2006）
- 2) Kurosumi, M.: *Breast Cancer*, 10, 97-104（2002）
- 3) Goldhirsch, A., Glick, J.H., Gelber, R.D., Coates, A.S. and Senn, H.J.: *J. Clin. Oncol.*, 19, 3817-3827（2001）
- 4) Umemura, S., Kurosumi, M., Moriya, T., Oyama, T., Arihiro, K., Yamashita, H., Umekita, Y., Komoike, Y., Shimizu, C., Fukushima, H., Kajiwara, H. and Akiyama, F.: *Breast Cancer*, 13, 232-235（2006）
- 5) Kurosumi, M.: *Breast Cancer*, 14, 189-193（2007）
- 6) Allred, D.C., Harvey, J.M., Berardo, M. and Clark, G.M.: *Mod. Pathol.*, 11, 155-168（1998）
- 7) Harvey, J.M., Clark, G.M., Osborne, C.K. and Allred, D.C.: *J. Clin. Oncol.*, 17, 1474-1481（1999）
- 8) Ellis, M.J., Coop, A., Singh, B., Mauriac, L., Llombert-Cussac, A., Janicke, F., Miller, W.R., Evans, D.B., Dugan, M., Brady, C., Quebe-Fehling, E. and Borgs, M.: *J. Clin. Oncol.*, 19, 3808-3816（2001）
- 9) Nitta, H., Hauss-Wegrzyniak, B., Lehrkamp, M., Murillo, A.E., Gaire, F., Farrell, M., Walk, E., Penault-Llorca, F., Kurosumi, M., Dietel, M., Wang, L., Loftus, M., Pettay, J., Tubbs, R.R. and Grogan, T.M.: *Diagn Pathol*, in press