



Title	乳房外Paget病に対する新規治療実験系の確立
Author(s)	前田, 拓哉
Description	配架番号 : 2784
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15466号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15466
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90051
Type	doctoral thesis
File Information	MAEDA_Takuya.pdf



学 位 論 文

乳房外 Paget 病に対する新規治療実験系の確立

(Establishment of a new experimental
model for extramammary Paget's
disease)

2023年3月

北海道大学

前田 拓哉

学 位 論 文

乳房外 Paget 病に対する新規治療実験系の確立

(Establishment of a new experimental
model for extramammary Paget's
disease)

2 0 2 3 年 3 月

北 海 道 大 学

前 田 拓 哉

目 次

発表論文目録および学会発表目録・	1 頁
要旨・	2 頁
略語表・	5 頁
緒言・	6 頁
方法・	1 4 頁
結果・	2 2 頁
考察・	4 9 頁
結論・	5 2 頁
謝辞・	5 3 頁
利益相反・	5 4 頁
引用文献・	5 5 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Takuya Maeda, Shinya Kitamura, Hiroshi Nishihara, Teruki Yanagi
Extramammary Paget's disease patient-derived xenografts harboring ERBB2
S310F mutation show sensitivity to HER2-targeted therapies. (2020)
Oncogene. *39*: 5867–5875.

Shinya Kitamura, Teruki Yanagi, Takuya Maeda, Hideyuki Ujiie. Cyclin-
dependent kinase 4/6 inhibitors suppress tumor growth in extramammary
Paget's disease. (2022) Cancer Sci. *113*: 802–807.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Takuya Maeda, Shinya Kitamura, Hiroshi Nishihara, Teruki Yanagi
Extramammary Paget's disease patient-derived xenografts harboring ERBB2
S310F mutation show sensitivity to HER2-targeted therapies.
The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative
Dermatology, 2020. 12. Nagoya, Japan.

北村真也, 前田拓哉, 柳 輝希, 氏家英之 :
Cyclin dependent kinase (CDK) 4/6 阻害剤は乳房外 Paget 病の腫瘍増殖を抑
制する.
第 234 回日本皮膚科学会熊本地方会, 熊本, 2022.3.

要旨

【背景と目的】

乳房外 Paget 病 (Extramammary Paget's disease: EMPD) は高齢者の外陰部に好発する皮膚腫瘍で、多くの症例は腫瘍細胞が表皮内に限局していることから根治的手術により予後良好であることが知られる。しかしながらその一方でリンパ節転移や遠隔転移を起こす症例に関しては有効な治療法が確立されておらず、予後不良である。進行期における治療開発が進まない原因としては、EMPD が稀少癌であること、細胞株などの有用な前臨床実験系が存在しないことが挙げられる。近年、患者腫瘍組織移植モデル (patient-derived xenograft: PDX) が他癌種においては広く用いられるようになってきている。PDX は免疫不全マウスに患者腫瘍組織を移植し、腫瘍塊を継代する実験系であるが、従来の細胞株を用いた実験系と比較し腫瘍細胞の多様性、腫瘍細胞以外の宿主因子の特性を反映しうる実験系とされている。本研究ではこの PDX に注目し、EMPD に対する前臨床研究モデルを樹立し、治療実験を行うことで新たな治療選択肢を探ることを目的とした。

【対象と方法】

EMPD 患者のリンパ節転移再発の組織を細断し、免疫不全マウスである NOD/Scid マウスの皮下に移植を行った。定期的に腫瘍のサイズを計測し、500-1000 mm³を目安に次の世代のマウスに継代を行った。初代継代時に PDX 腫瘍と患者の原発巣組織及びリンパ節転移組織の性質を免疫染色・遺伝子パネル検査を用いて比較した。治療実験では PDX 腫瘍の大きさが 50-100 mm³になった時点で担癌マウスをランダム化し、それぞれコントロール、トラスツズマブ単剤、ラパチニブ単剤、トラスツズマブ+ラパチニブ併用、ドセタキセル、エリブリン、アベマシクリブ、パルボシクリブ群に振り分けて治療を行った。腫瘍体積はノギスで週 1 回計測し、重量は投与開始後 28 日に残存組織を摘出し体重計で測定した。また摘出した腫瘍は HE 染色の他に Ki-67, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) の免疫染色を施行し、組織学的な評価も行った。腫瘍体積・重量に関しては統計学的に解析を行い、それぞれ対応するコントロール群との比較を行った。

【結果】

移植した患者組織は 5 ヶ月後に直径 10mm の結節を形成した。免疫染色では患者組織、PDX 腫瘍はいずれも CK7 陽性、HER2 弱陽性であり、同様の染色形質を示した。また、PDX 腫瘍と患者組織は共通して *ERBB2*S310F の遺伝子変異を有しており、この変異が病原性のある変異と考えられた。また、PDX 腫瘍

を nude (nu/nu) mouse に移植し、移植した腫瘍が 3/3 (100%) で生着すること、HE 染色においても EMPD 腫瘍細胞が増殖していることを確認した。さらに、CryoStor®を用いて -80°C 凍結保存した PDX 腫瘍が NOD/Scid mouse に再度生着することも確認した。治療実験に関しては、トラスツズマブ・ラパチニブ・アベマシクリブ・パルボシクリブ・ドセタキセル・エリブリンいずれの治療群においてもコントロール群と比較して統計学的に有意な腫瘍体積の縮小効果を認めた ($P < 0.001$)。治療群の腫瘍は Ki-67, TUNEL 染色による組織学的な評価においても治療効果を示していた。

【考察】

本研究により、PDX モデル腫瘍が形態学的・遺伝子学的に患者腫瘍の特性を引継いでいることが判明した。さらに PDX 腫瘍が安定して継代可能であること、凍結保存が可能であることも確認した。また、分子標的阻害薬 (抗 HER2 療法)・殺細胞性抗がん剤とコントロール群の治療効果を比較した治療実験結果からはこれらの治療薬が EMPD の治療選択肢として有望な可能性が示唆された。既報告においては、EMPD の一部は腫瘍細胞における HER2 蛋白の過剰発現を伴うこと、そうした症例に抗 HER2 療法が有効であることが報告されている。今回の患者腫瘍の病原遺伝子変異と考えられた *ERBB2* S310F に関しては、他癌種における研究において必ずしも HER2 蛋白の過剰発現を伴わないことが知られているが、同様の変異を有する進行期 EMPD 患者の症例報告において、トラスツズマブとカペシタビンの併用療法が有効であったとする報告があり、本研究結果と一致した。また、近年の報告により、EMPD においても 12.5-26.5% の腫瘍で *ERBB2* S310F 変異があることが示されており、今後治療標的となり得る遺伝子変異であると考えられた。本研究で用いた微小管重合阻害薬のエリブリンと CDK4/6 阻害薬のアベマシクリブ・パルボシクリブに関しては実臨床においても有効性が確認されていない薬剤であるが、本研究で有効性が確認されており、今後進行期 EMPD に対する治療選択肢として有望な可能性が示唆された。また、近年、HER2 陽性乳癌の臨床研究において CDK4/6 阻害剤とトラスツズマブの併用療法の有効性が報告された。本研究では臨床検体を用いた免疫染色により EMPD における CDK4 とサイクリン D1 の発現量が高いことを確認し、CDK4/6 阻害薬による治療効果があることを示した。既報告より EMPD 症例の一部は *ERBB2* の病原性遺伝子変異や HER2 タンパク質の過剰発現を伴うことが明らかになっており、CDK4/6 標的療法は、HER2 活性化を伴う進行性 EMPD に対する単剤療法として有望であるだけでなく、抗 HER2 抗体との併用療法としても有望である可能性が示唆された。

【結論】

本研究にて得られた新知見は下記である。

- ・病理組織学的・遺伝子学的に患者の腫瘍を引き継いだ新しい EMPD-PDX モデルを作製した.

- ・治療実験では, 抗 HER2 療法 (ラパチニブ, トラスツズマブ), 抗 CDK4/6 療法 (アベマシクリブ・パルボシクリブ) および細胞障害性抗がん剤 (ドセタキセル, エリブリン) による *in vivo* での腫瘍増殖抑制が確認された.

上記より EMPD-PDX-H1 は, EMPD の効果的な治療法の開発に役立つと考えられる.

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

CDK	cyclin-dependent linase
EMPD	extramammary Paget's disease
G	generation
HE	hematoxylin and eosin
LOH	loss of heterozygosity
PDX	patient-derived xenograft
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VAF	variant allele frequency

緒言

Paget 病は、1874 年に Sir James Paget によって初めて報告された稀な付属器新生物である (Paget SJ, 1874). 乳房外 Paget 病 (extramammary Paget's disease: EMPD) は高齢者の外陰部・肛門周囲に好発する Paget 病の亜型であり (Kanitakis J, 2007), その発症率は近年増加傾向にある (図 1, Herrel LA, 2015). 稀少癌であることからその予後に関する報告は限られているが, EMPD の多くは腫瘍細胞が表皮内に限局しており, 予後は良好である (図 2, Hatta N et al. 2008). その一方で腫瘍細胞が真皮に浸潤するとリンパ節転移や遠隔転移を来す可能性があり, 転移のある症例は予後不良である (Hatta N et al. 2008; Hirakawa S et al., 2009; Ohara K et al., 2016). 大原らによる多施設共同後方視的研究においては, 遠隔転移を有する EMPD 患者の 5 年生存率はわずか 7% であったことが報告された (図 3, Ohara K et al., 2016). また, 一部の症例においてはリンパ管の腫瘍塞栓により生じると考えられる **underpants-pattern erythema** という本症例に特徴的な皮疹が見られる ((図 4, Murata Y et al. 1999).

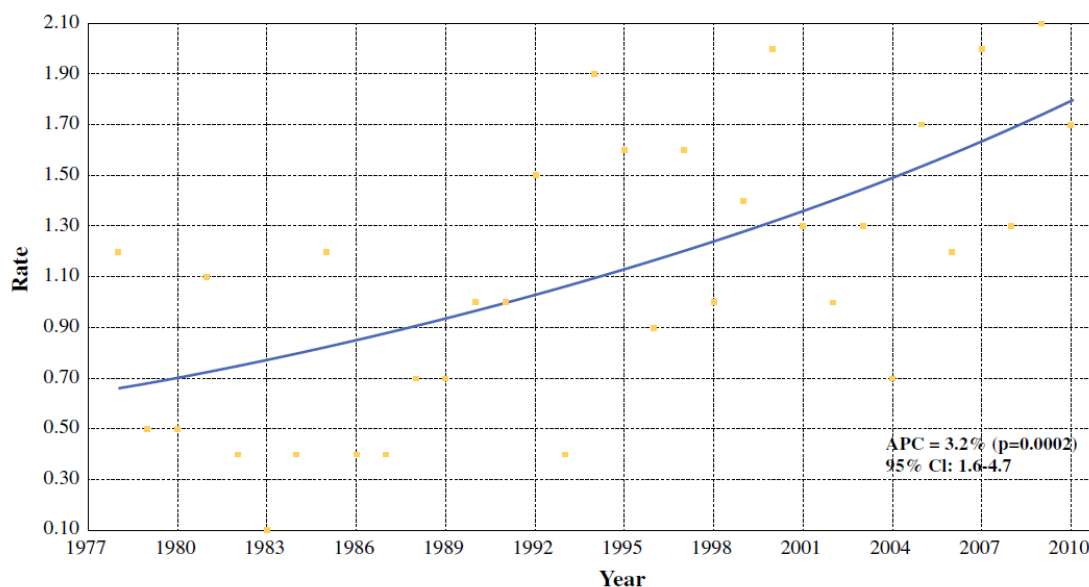


図 1 : EMPD の発症率の推移

(Rate の単位は per 1,000,000 person-years)

EMPD の発症率は近年増加傾向にあり, 1977 年と比較し 2010 年の発症数は約 3 倍になっている (Herrel LA et al, Ann Surg Oncol, 2015 より引用).

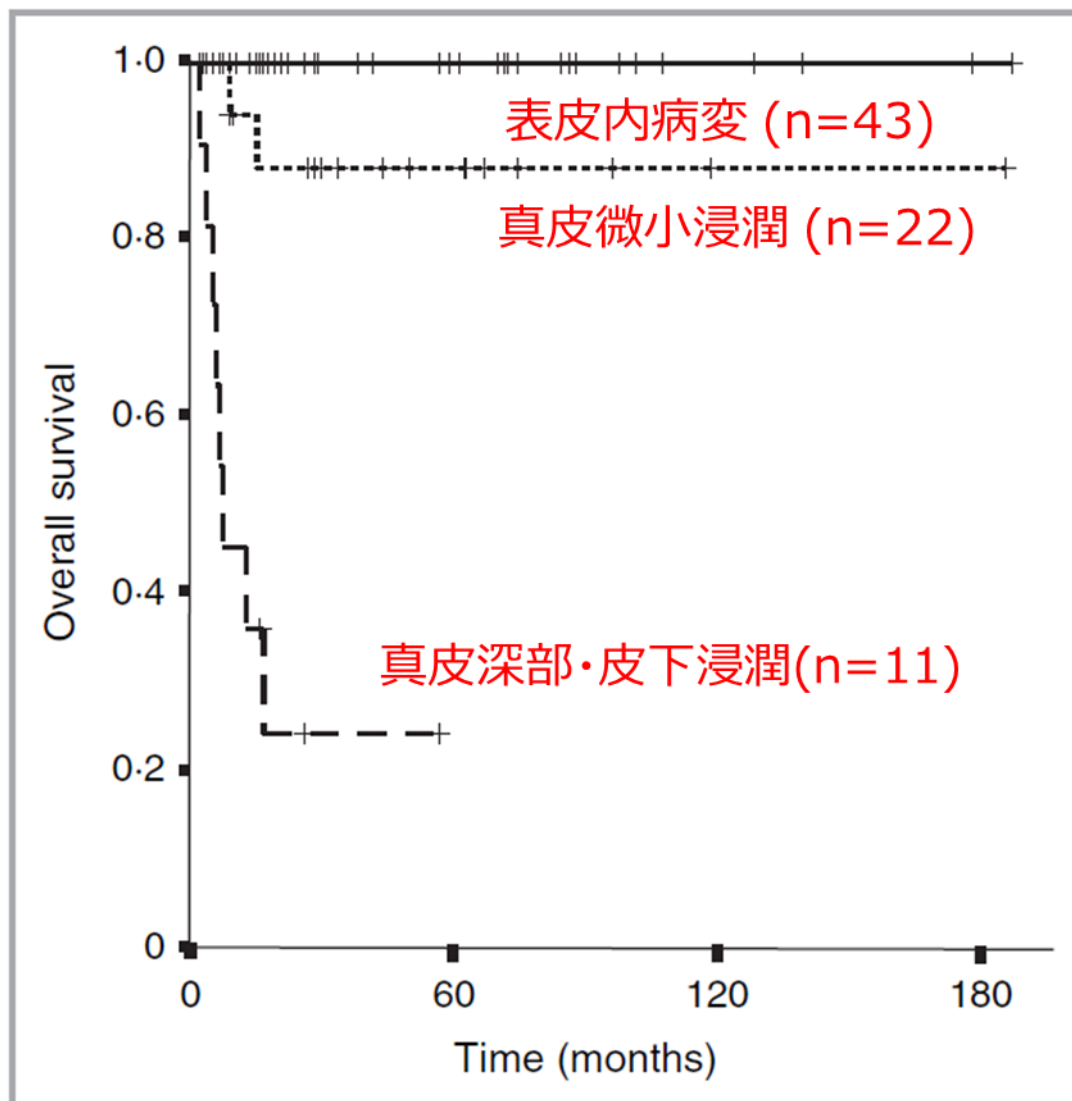


図 2 : EMPD 原発巣の腫瘍細胞の浸潤度別の全生存期間
 表皮内病変の予後は良好であることが知られる (HattaN et al. Br J Dermatol, 2008
 より一部改編し引用).

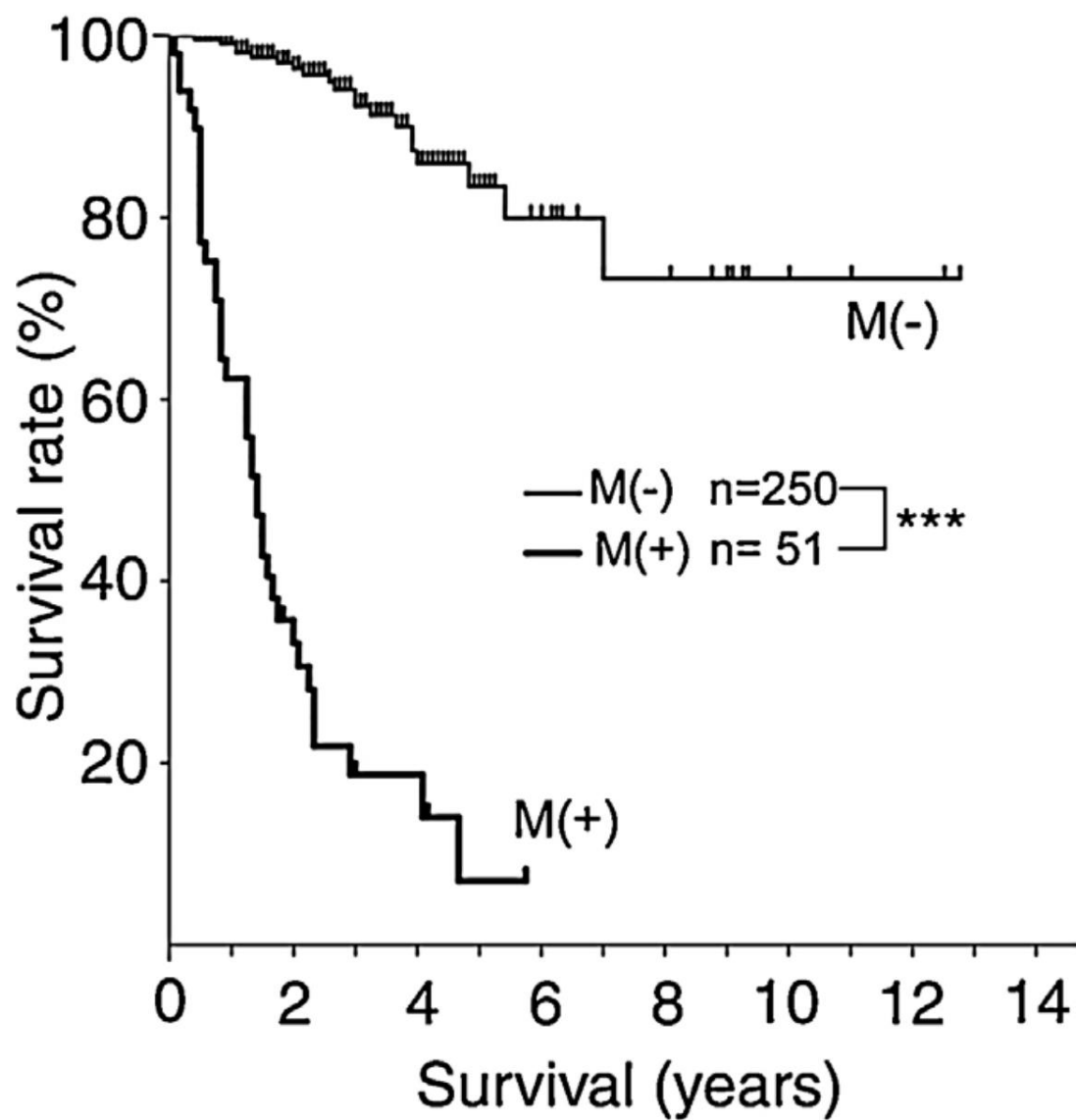


図 3 : EMPD の遠隔転移の有無による全生存期間
 遠隔転移を有する症例の 5 年生存率は 7%であった (Ohara K et al., J Dermatol Sci,
 2016 より引用).



図 4：進行期 EMPD の臨床像(underpants-pattern erythema)
鼠径部皮下の多発腫瘤・リンパ浮腫. 鼠径リンパ節転移によるリンパ管閉塞が原因と
されている Kato J et al., J Dermatol, 2018 より引用).

進行期 EMPD の治療法に関しては未だコンセンサスは存在しない状況であるが，タキサン系薬剤やプラチナ系薬剤，抗 HER2 療法に関していくつかの報告がある（表 1，Fukuda K et al., 2018 を参照）.

表 1：進行期 EMPD の治療法に関するレビュー
タキサン系薬剤・プラチナ系薬剤・抗 HER2 療法などの報告がある (Fukuda K et al., Front Oncol, 2018 より引用)。

Reference	No. of patients	Treatment	Type of response	Outcome (months)
Tokuda et al. (5)	22	Low-dose FP (5-FU, cisplatin)	CR (1/22), PR (12/22), SD (6/22), PD (3/22)	PFS: median 5.2, OS: median 12.0
Oashi et al. (6)	7	FECOM (5-FU, epirubicin, carboplatin, vincristine, mitomycin C)	PR (4/7), unevaluable (3/7)	PFS: median 6.5, OS: median 9.4
Yoshino et al. (7)	13	Docetaxel	PR (8/13), SD (3/13), PD (2/13)	PFS: median 7.1, OS: median 16.6
Mikoshihara et al. (8)	1	S-1	PR	PFS: 36
Kato et al. (9)	2	S-1	PR	PFS: 5, 11+
Matsushita et al. (10)	1	Docetaxel + S-1	PR	PFS: 15+
Ogata et al. (11)	1	Docetaxel + S-1	PR	PFS: 12+
Egashira et al. (12)	2	Docetaxel + S-1	CR (1/2), PR (1/2)	PFS: 12, 10, OS: 26, 23
Hirai and Funakoshi (13)	2	PET (cisplatin, epirubicin, paclitaxel)	PR (2/2)	PFS: 14+, 12+
Karam et al. (24)	1	Trastuzumab	PR	PFS: 12
Wakabayashi et al. (27)	1	Trastuzumab	PR	PFS: 12+
Barth et al. (28)	1	Trastuzumab	CR	PFS: 12+
Takahagi et al. (25)	1	Trastuzumab + paclitaxel	PR	PFS: 17, OS: 25
Hanawa et al. (26)	1	Trastuzumab + paclitaxel	PR	PFS: 13
Ichihara et al. (29)	1	Trastuzumab + paclitaxel	PR	PFS: 24+
Yoneyama et al. (45)	1	Bicalutamide + leuprolide acetate	PR	PFS: 6, OS: 14

CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; PFS, progression-free survival; OS, overall survival; +, ongoing response; 5-FU, 5-fluorouracil.

しかしながら進行期 EMPD の治療法に関しては後方視的研究（少数例の症例集積研究あるいは単症例の症例報告）の結果を参考に施設ごとで異なる治療を行っている状況である。著者自身も本研究を開始する前に他施設において責任著者として後方視的症例集積研究を行ったものの、本疾患のような稀少疾患においてエビデンスを確立することの困難さを実感した（図 5, Kato M et al., 2019）。尚、前向きの臨床試験としては、現在進行中で慶應義塾大学皮膚科主導の HER2 陽性進行期 EMPD に対するトラスツズマブとドセタキセルの併用療法の第 II 相臨床試験（UMIN000021311）が唯一である。

従って進行期 EMPD に対する新しい治療法が切望されるが、そうした治療法の開発が十分に行えない最大の原因は、EMPD において使用可能な前臨床モデルが欠如していることである。

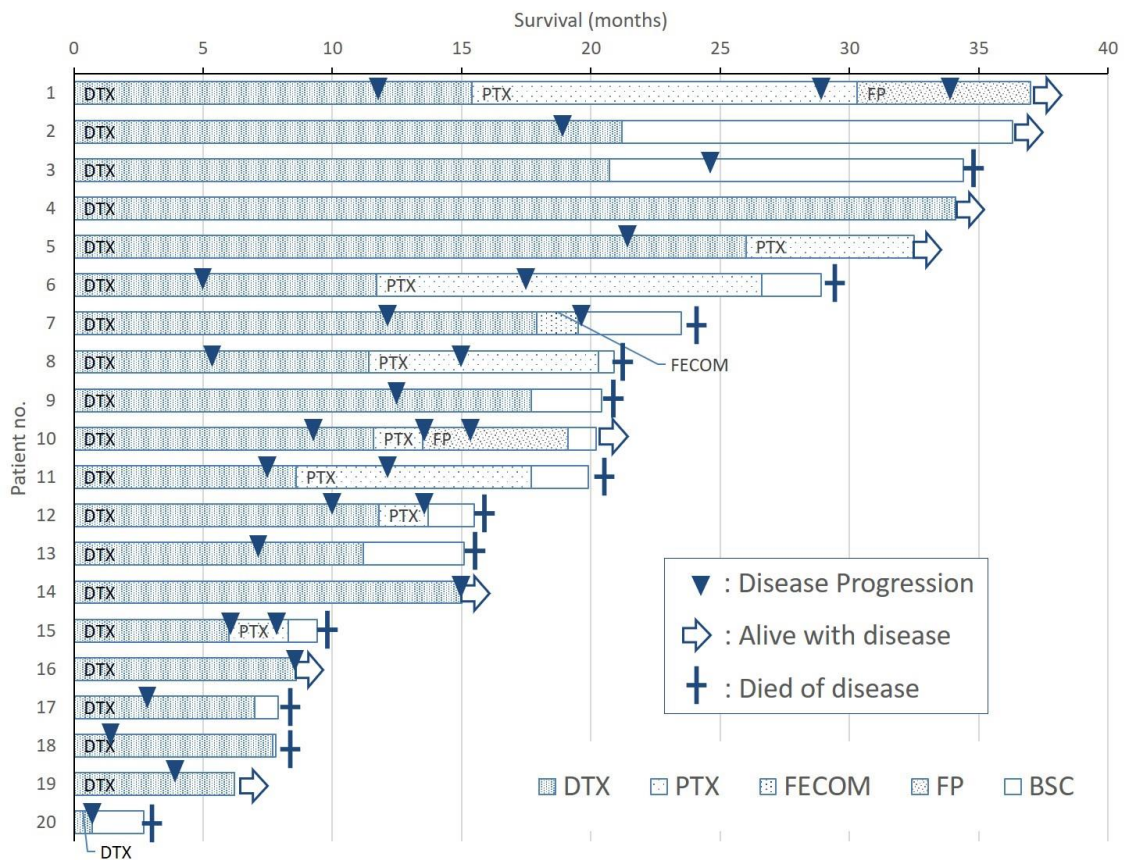


図 5：進行期 EMPD 患者に対する化学療法の奏効の検討

進行期 EMPD 患者 20 例の一次療法としてのドセタキセルの治療効果. (Kato M et al., Br J Dermatol, 2019 より改編し引用)

DTX：ドセタキセル，PTX：パクリタキセル，FECOM：5-フルオロウラシル+カルボプラチン+ビンクリスチン+マイトマイシン C，FP：5-フルオロウラシル+シスプラチン，BSC：best supportive care

単群の少数症例の報告であり，進行期の治療に関する明確なエビデンスは現時点で存在しない.

従来のがん前臨床研究モデルとしては、細胞株を用いた *in vitro* の実験や、細胞株をマウス皮下に打ち込み治療実験を行う **cell line-derived xenograft** モデルが知られている。しかしながらこれらの実験モデルは単一の腫瘍細胞を増殖させる方法であるがゆえに、腫瘍組織の分子特性や腫瘍周囲を取り巻く宿主因子、あるいは腫瘍組織内の不均一性を反映しないという弱点があり、結果として前臨床研究と早期臨床試験の結果が乖離することがしばしばあった（図 6, Frese KK et al., 2007; Daniel VC et al., 2009）。

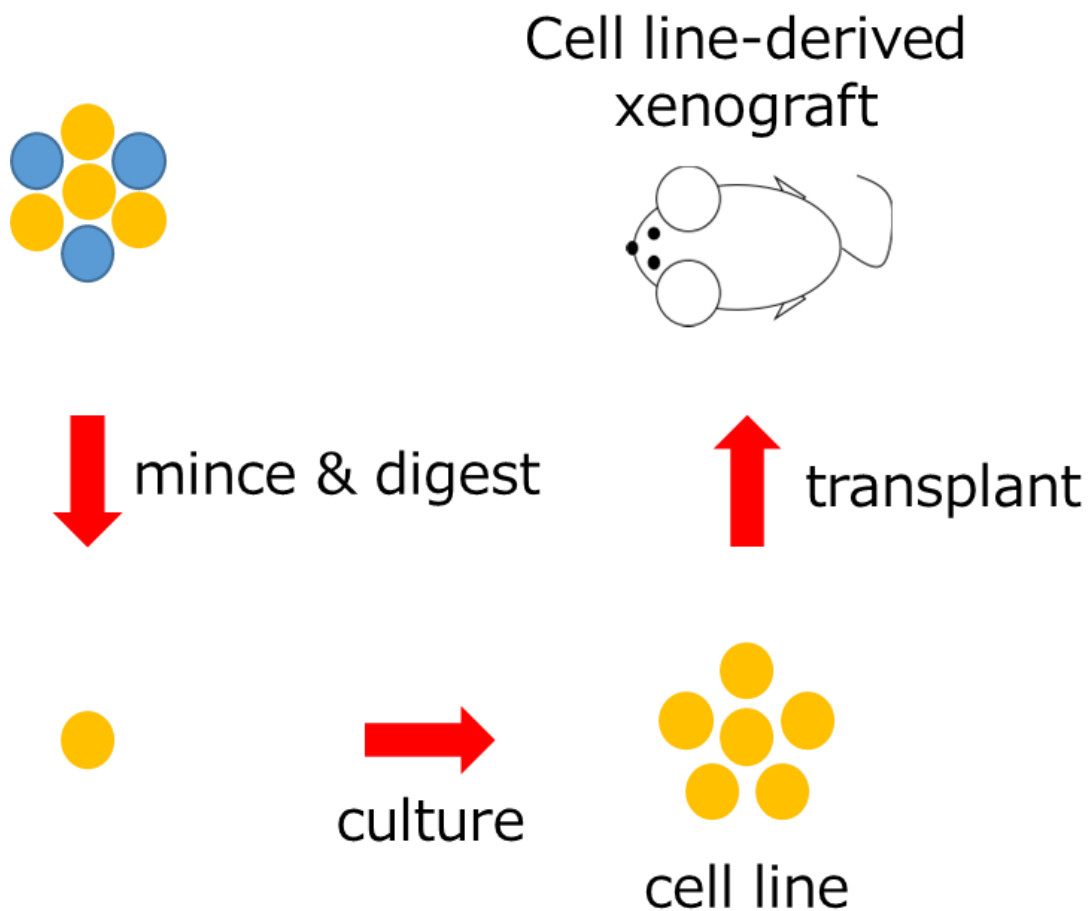


図 6：従来のがん前臨床研究モデル

細胞株を用いた研究においてはがん組織中の単一の腫瘍細胞の特性のみを反映するという弱点があった。

今回我々が着目したのは、**patient-derived xenograft (PDX)** と言われる実験モデルで（図 7）、患者の腫瘍組織をそのまま免疫不全マウスの皮下に移植し、腫瘍を増大させ継代を続ける実験系である。従来のモデルと比較し、より患者体内における腫瘍組織の性質を反映したモデルと考えられており、肺癌や乳癌の領域においては **PDX** モデルを用いて新規薬剤のスクリーニングや耐性獲得機序の解析などが行われている（Zhang XC et al., 2013; Zhang H et al., 2014）。

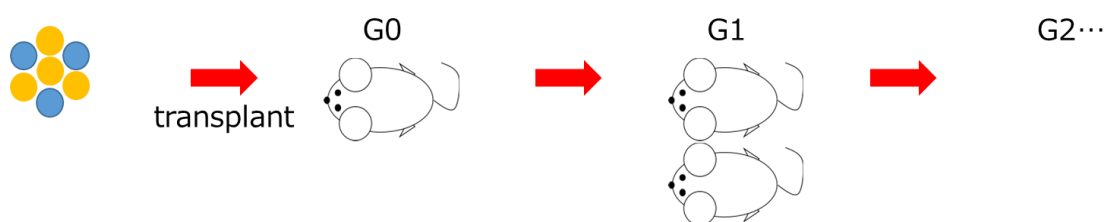


図 7：PDX モデル

細胞株を用いたモデルと比較し、腫瘍組織内の不均一性や間質内の分子特性を反映しうるモデルと考えられている。

本研究では、**EMPD** 患者由来の新規 **PDX** モデルを開発することを目的とした。そして、病理組織学的・遺伝子学的解析を行い、免疫不全マウスに異種移植された **PDX** 腫瘍が患者の元の腫瘍の特徴を維持しているかどうかを確認し、抗 **HER2** 療法（トラスツズマブ・ラパチニブ）と細胞障害性薬剤（ドセタキセル・エリブリン）を用いた治療実験を行った。

また、上記の結果を論文として投稿したのち（Maeda T et al., 2020）、追加の新規治療選択肢の探索として、治療標的となり得るタンパク質の発現を免疫染色で確認した。**EMPD** の一部が乳癌と共通した遺伝子変異を持つこと

（Zhang G et al., 2019; Kiniwa Y et al., 2019）から、乳癌の治療選択肢を参考に cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 阻害薬の追加実験を行った（Patnaik A et al., 2016; Goel S et al., 2019）。CDK4/6 は細胞増殖に重要な分子で、cyclin D1 と複合体を形成しターゲットタンパク質をリン酸化させることで細胞周期を G1 期から S 期への移行させることが知られる（Cersosimo RJ., 2019; Sherr CJ et al., 2016）。このことを踏まえて当科の **EMPD** 臨床検体を用いた免疫染色の解析も行い、追加報告を行った。

実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り，北海道大学病院倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 018-0424, 017-0392）．また，本研究は患者から書面による同意を得て施行した．臨床検体の取り扱いに関しては，北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を受け，「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則って行われた．動物実験については，国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受け（承認番号 19-0015, 19-0093），「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則して行った．

1. 使用したマウス，試薬および抗体

本研究に用いたマウス，試薬および抗体は以下の通りである．

NOD/Scid mouse (Clea, Tokyo, Japan)

Nude (nu/nu) mouse (Clea, Tokyo, Japan).

Matrigel (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)

CryoStor® CS10 (BioLife Solutions, Owego, NY, USA)

抗 CK7 抗体 (Dako, Code. M7018, Denmark)

抗 HER2 抗体 (Dako, Code. A0485, Denmark)

抗アンドロゲン受容体抗体 (ScyTek laboratories, RA0012-C, USA)

抗エストロゲン受容体抗体 (Leica Biosystems, NCL-L-6F11, UK)

抗プロゲステロン受容体抗体 (Leica Biosystems, NCL-L-PGR-312, UK)

抗 Ki-67 抗体 (Abcam, #ab8191)

抗 CDK4 抗体 (Proteintech, 11026-1-AP)

抗 CDK6 抗体 (Abcam, ab124821)

抗 Cyclin D1 抗体 (Invitrogen, SP1).

I 型コラーゲン (Iwaki, Tokyo, Japan)

RPMI (Nakalai, Kyoto, Japan)

牛胎児血清 (FBS, Sigma)

Trastuzumab (Herceptin®, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)

Lapatinib (CS-0036, Chem Scene, USA)

Tween 80 (P1754, Sigma-Aldrich, Germany)

Docetaxel (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, #sc-201436)

Eribulin (Halaven®, Eisai Co., Ltd., Tokyo, Japan)

Palbociclib (PZ0383, Sigma)

Abemaciclib (LY2835219, Adooq BioScience).

2. EMPD 患者からの腫瘍組織の採取

患者は家族歴や既往歴に特記すべきことのない 78 歳の日本人女性で、12 年前に外陰部の原発病変（図 8）を切除し経過観察中であったが、鼠径リンパ節転移を来し再診した（図 9）。摘出腫瘍は半割したのち直ちに on ice で動物実験施設に輸送し、残った組織は病理診断のためホルマリンで固定されパラフィンに包埋された。



図 8：12 年前に切除された原発巣の肉眼所見
右側優位に両側大陰唇にびらんを伴う紅色局面を認めた。



図 9：再診時の臨床所見及び画像所見

右鼠径部に硬結を触れ・CT 上も右鼠径リンパ節転移を疑う結節を認めた。

3. PDX (EMPD-PDX-H1) の樹立

摘出したリンパ節の一部を 10mm 角に細断したのち、matrigel とともに免疫不全マウスである 5 週齢の雌の NOD/Scid mouse の皮下に移植した (図 10)．本研究では、マウスは特定の病原体を含まない条件下で一定の温度 (22～25℃)、12 時間の明暗サイクルで飼育された．マウスには蒸留水と標準的な餌を自由摂取させた．腫瘍を移植したマウスを週 2 回、5 ヶ月間観察した．腫瘍は週 1 回ノギスで計測した．腫瘍の体積は以下の式で算出した．(長軸×短軸²)/2 (Yanagi et al., 2014)．腫瘍体積が 500～1000mm³に達した時点で、EMPD-PDX-H1 腫瘍を次世代の NOD/Scid mouse に移植した．2 回目の継代で、EMPD-PDX-H1 腫瘍を 3 つに分割した．1 つの切片は移植用として直径 5mm 以下に細断し、もう 1 つの切片は DNA 抽出のために -80℃で凍結した．最後の一つはホルマリンで固定した後、病理組織学的解析のためにパラフィンに包埋した．治療実験は、第 3-5 世代で行った．第 4 世代では、5 週齢の雌の nude (nu/nu) mouse にも移植を行った．第 4 世代と第 5 世代の腫瘍片を CryoStor® CS10 を入れたチューブ内で凍結し、-80℃で保存した (Ivanics T et al., 2018)．凍結保存した EMPD-

PDX-H1 腫瘍を NOD/Scid mouse に再移植し，再度増大するかを確認した．

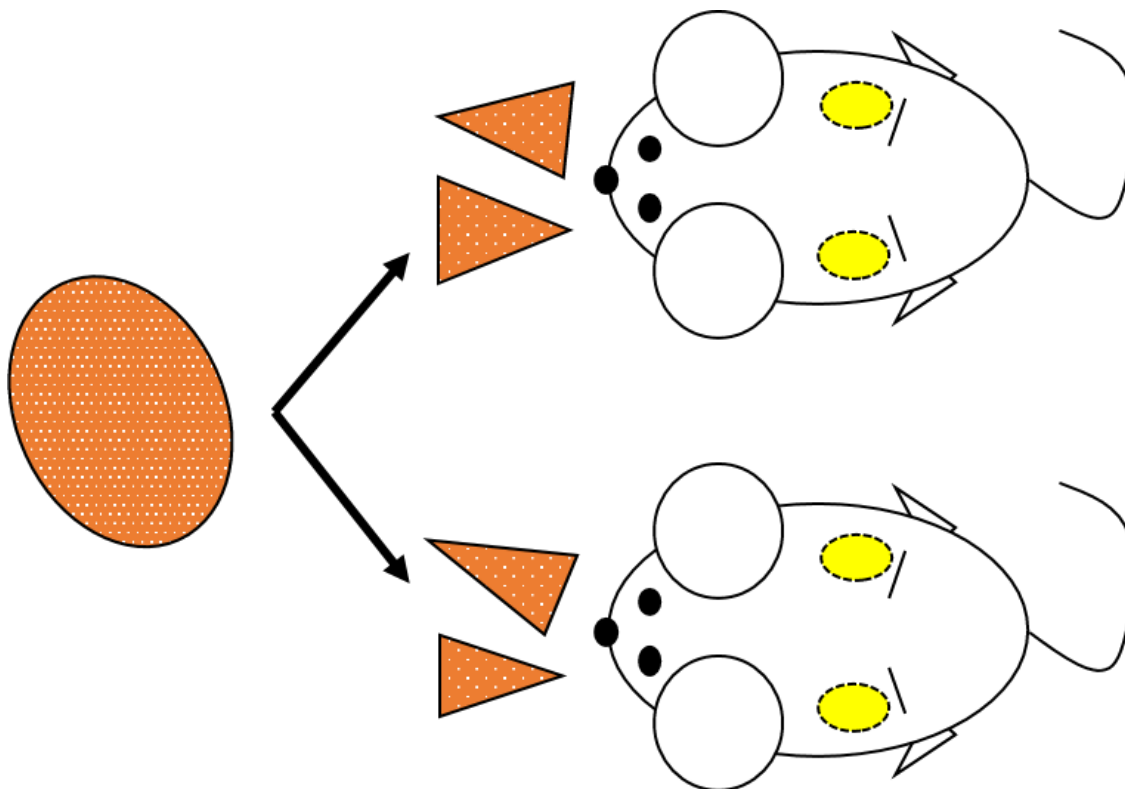


図 10：患者リンパ節組織のマウスへの継代の模式図
転移リンパ節を 10mm 角に細断しマウスの背部皮下に移植した．

4. 患者組織及び PDX 腫瘍の病理組織学的解析，新規治療選択肢の探索

患者の腫瘍及び PDX 腫瘍のホルマリン固定，パラフィン包埋組織切片を $4\mu\text{m}$ 切片にした．ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色，および CK7，HER2 の免疫染色を行い，原発巣・転移リンパ節・PDX 腫瘍の組織学的変化を比較検討した．さらに HER2，アンドロゲン受容体，エストロゲン受容体，プロゲステロン受容体，CDK4，CDK6，cyclin D1 の免疫染色を行い，治療標的となりうる蛋白質の発現を確認した．免疫染色陽性細胞を褐色に染めるために，DAB 発色剤を塗布した（Yanagi et al., 2018）．核の Ki-67 蛋白の発現については，高倍率レンズ（400 倍）を用いて無作為に選んだ 3 視野から，少なくとも 100 個のがん細胞中の陽性細胞の割合を算出した．HER2 蛋白の発現量は，乳がんの HER2 検査ガイドラインに基づき，以下のように評価した（Wolff AC et al., 2018）．

3+: “circumferential membrane staining that is complete, intense”

2+: “circumferential membrane staining that is incomplete and/or weak to

moderate and within > 10% of the invasive tumor cells or complete and circumferential membrane staining that is intense and within $\leq$ 10% of the invasive tumor cells”

1+: “incomplete membrane staining that is faint or barely perceptible and within > 10% of the invasive tumor cells”

0: “no staining observed or membrane staining that is incomplete and is faint or barely perceptible and within $\leq$ 10% of the invasive tumor cells”

5. TUNEL アッセイ

細胞死は、In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, #11684817910) を用いて TUNEL 法により、製品の説明書に従って評価した。染色性の評価は、高倍率レンズ (400 倍) を用いて無作為に選んだ 3 視野から、少なくとも 100 個のがん細胞中の陽性細胞の割合を算出した。

6. 遺伝子変異解析

患者組織および PDX 腫瘍は、DNA 抽出前に腫瘍細胞の含有量が十分に高く、著明な壊死が起こっていないことを病理学的に確認した。DNA Mini Kit (QIAGEN, Cat#51304, Germany) または GeneRead FFPE DNA Kit (QIAGEN, Cat#180134, Germany) を用いて、患者の血液および各組織サンプルから DNA が抽出された。DNA サンプルの量と純度は、Nanodrop ND-1000 UV/VIS Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) を用いて測定した。DNA 断片の完全性は、1% アガロースゲルを用いた電気泳動で確認した。DNA サンプルの濃度は $20\text{ng}/\mu\text{l}$ に希釈し、それらのサンプルは使用するまで -20°C で保存した。ゲノム検査は、慶応義塾大学がんセンターのゲノムユニットで行った。解析においては、COSMIC, ClinVar, CIViC のうち 2 つ以上のデータベースに記録のあるものを major な遺伝子変異、major な遺伝子変異の定義を満たさない遺伝子変異のうち、InDel であるか、COSMIC, ClinVar, CIViC のいずれかに記録のあるものを minor な遺伝子変異と定義した。Agilent 2000 TapeStation (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いて算出した DNA インテグリティナンバー (DIN) スコアに基づき DNA の品質を確認した後、Illumina MiSeq sequencing platform (Illumina, San Diego, CA) を用いて 160 のがん関連遺伝子の標的アンプリコンエクソームシーケンスが実施された。包括的がんパネルに含まれる 160 のがん関連遺伝子のリストは、表 2 に示すとおりである (human comprehensive cancer panel v2, QIAGEN)。

DNA の量は 50 ng 以上、DNA の品質は DIN スコア 3.1 以上であった。配列データは、GenomeJack (Mitsubishi Space Software, Tokyo, Japan) と呼ばれ

るオリジナルのバイオインフォマティクス・パイプラインを用いて解析された。また、原発巣の *ERBB2* 遺伝子変異を確認するため、サンガー法による遺伝子変異解析を、下記の表 3 に示すプライマーを用いて実施した。

表 2：がん関連遺伝子パネル検査に含まれる遺伝子のリスト

本研究では 160 のがん関連遺伝子を調べた。

ABL1	BUB1B	DDR2	FGFR2	IDH2	MEN1	PDGFRA	SMARCA4
AKT1	CARD11	DICER1	FGFR3	IKZF1	MET	PHF6	SMARCB1
AKT2	CBL	DNMT3A	FH	IL6ST	MLH1	PIK3CA	SMO
ALK	CBLB	ECT2L	FLCN	IL7R	MSH2	PIK3R1	SPOP
AMER1	CD79A	EGFR	FLT3	JAK1	MSH6	PMS2	SRC
APC	CD79B	EP300	FUBP1	JAK2	MTOR	PPP2R1A	STK11
AR	CDC73	EPCAM	GATA1	JAK3	MUTYH	PRDM1	SUFU
ARID1A	CDH1	ERBB2	GATA2	KDM6A	MYC	PRKAR1A	TERT
ARID2	CDK12	ERBB3	GATA3	KDR	MYD88	PTCH1	TNFAIP3
ASXL1	CDK4	ERBB4	GNA11	KIT	NF1	PTEN	TNFRSF14
ATM	CDKN2A	ERCC5	GNAQ	KLF6	NF2	PTPN11	TP53
ATRX	CHEK2	ESR1	GNAS	KMT2D	NFE2L2	RAC1	TSC1
BAP1	CIC	EZH2	GPC3	KRAS	NFKBIA	RB1	TSC2
BCL6	CREBBP	FAM46C	GRIN2A	MAP2K1	NOTCH1	RET	TSHR
BCOR	CRLF2	FANCA	H3F3A	MAP2K2	NOTCH2	ROS1	U2AF1
BRAF	CSF1R	FANCD2	HIST1H3B	MAP2K4	NPM1	SDHB	VHL
BRCA1	CTNNB1	FANCE	HNF1A	MAP3K1	NRAS	SETD2	WT1
BRCA2	CYLD	FAS	HRAS	MAP4K3	PALB2	SF3B1	XPC
BRIP1	DAXX	FBXO11	HSPH1	MDM2	PAX5	SLC7A8	ZNF2
BTK	DDB2	FBXW7	IDH1	MED12	PBRM1	SMAD4	ZRSR2

表 3：原発巣の *ERBB2* S310F 遺伝子変異を確認するために用いたプライマー
サンガー法で解析を行った。

Forward primer	5'-CGGTAATGCTGCTCATGGTG-3'
Reverse primer	5'-CTTGCTGCACTTCTCACACC-3'

7. EMPD-PDX-H1 由来の細胞株の樹立

EMPD-PDX-H1 マウス (第 3 世代) の腫瘍組織を細切し, PBS で繰り返し洗浄した. 細切した組織を, 10% 牛胎児血清を含む RPMI 培地を入れた I 型コラーゲンでコートしたディッシュ上で培養した.

8. EMPD-PDX-H1 を用いた治療実験

すべての EMPD-PDX-H1 の腫瘍体積は前述した方法で測定され統計学的に比較された. 腫瘍体積が $50 \sim 100 \text{ mm}^3$ となった担癌マウスはランダム化され, コントロール群・治療群に割り付けられた. すべての治療実験は, 1 条件につき最低 3 匹のマウスで行った. コントロール群のマウスには, 0.5% ヒドロキシプロピルメチルセルロース $100 \mu\text{l}$ を 1 日 1 回経口投与, $100 \mu\text{l}$ の PBS を週 2 回腹腔内注射, または $100 \mu\text{l}$ の PBS を週 1 回静脈内注射した. 免疫染色・遺伝子解析の結果から, 分子標的薬としては, HER2 阻害薬, CDK4/6 阻害薬による治療実験を計画した. HER2 標的治療では, 既報告 (Wainberg ZA et al., 2010) に従って, トラスツズマブ (10 mg/kg) を週 2 回腹腔内投与あるいは, ラパチニブ (100 mg/kg) を 0.5% ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよび 0.1% Tween 80 中で 1 日 1 回経口投与した (Nonagase W et al., 2016). また, トラスツズマブとラパチニブを併用投与した (Wainberg ZA et al., 2010). その他の分子標的薬として, CDK4/6 阻害薬であるアベマシクリブ・パルボシクリブの単剤での治療効果を検討した. アベマシクリブ (50 mg/kg) あるいはパルボシクリブ (120 mg/kg) を 0.5% ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよび 0.1% Tween 80 中で 1 日 1 回経口投与した (Dowless M et al., 2018; Cook Sangar ML et al., 2017). 細胞障害性薬剤については, ドセタキセル (20 mg/kg) およびエリブリン (1.5 または 0.45 mg/kg) を週 1 回静脈内投与した (Towle MJ et al., 2012; Hendrikx JJ et al., 2016). 治療効果の評価に関しては腫瘍体積の比較・Ki-67 陽性細胞率の比較を行った. 腫瘍体積はノギスで週 1 回, 腫瘍重量は投与開始後 28 日目に体重計で測定した. 腫瘍の体積と重量は盲検下で記録された.

9. 臨床検体・臨床情報のセレクション

2001~2017 年に北海道大学病院で治療を受けた EMPD 患者のうち, 免疫染色用の切り出しが可能なホルマリン固定標本がある患者の摘出臓器・年齢・性別・観察期間・病期・臨床転帰をカルテより抽出した.

1 0．臨床検体を用いた免疫染色の評価

CDK4 と cyclin D1 の染色性は、既報告 (Kitamura S et al., 2020) と陽性細胞の割合 (0, なし ; 1, 0%-25% ; 2, 25%-50% ; 3, 50%-75% ; 4, 75%-100%) と染色強度 (0, なし ; 1, 弱い ; 2, 中程度 ; 3, 強い) の合算によりスコア化した。染色性の評価は、高倍率レンズ (400 倍) を用いて無作為に選んだ 3 視野から、少なくとも 100 個のがん細胞中の陽性細胞の割合を算出した。

1 1．統計解析

治療実験の統計的有意性を評価するために、治療群と対照群との腫瘍体積の比較にはスチューデントの t 検定、免疫染色の染色性の群間比較はステイール＝ドゥワス検定、免疫染色の染色性と臨床情報の相関はスピアマンの順位相関係数を用いて比較した。統計学的検定は両側で行い、 $P < 0.05$ を有意とみなした。

実験結果

1. EMPD-PDX-H1 の樹立

本研究の概略を図 11 に示す。EMPD-PDX を樹立するために、患者のリンパ節転移を NOD/Scid mouse の皮下に移植した。移植された EMPD 腫瘍組織は、5 ヶ月かけて直径 10mm を超える弾性硬の結節に成長した（図 12）。最初の移植から 5 ヶ月半後に初代 PDX 腫瘍の継代（図 13）・HE 染色による組織学的な評価を行った（図 14）。

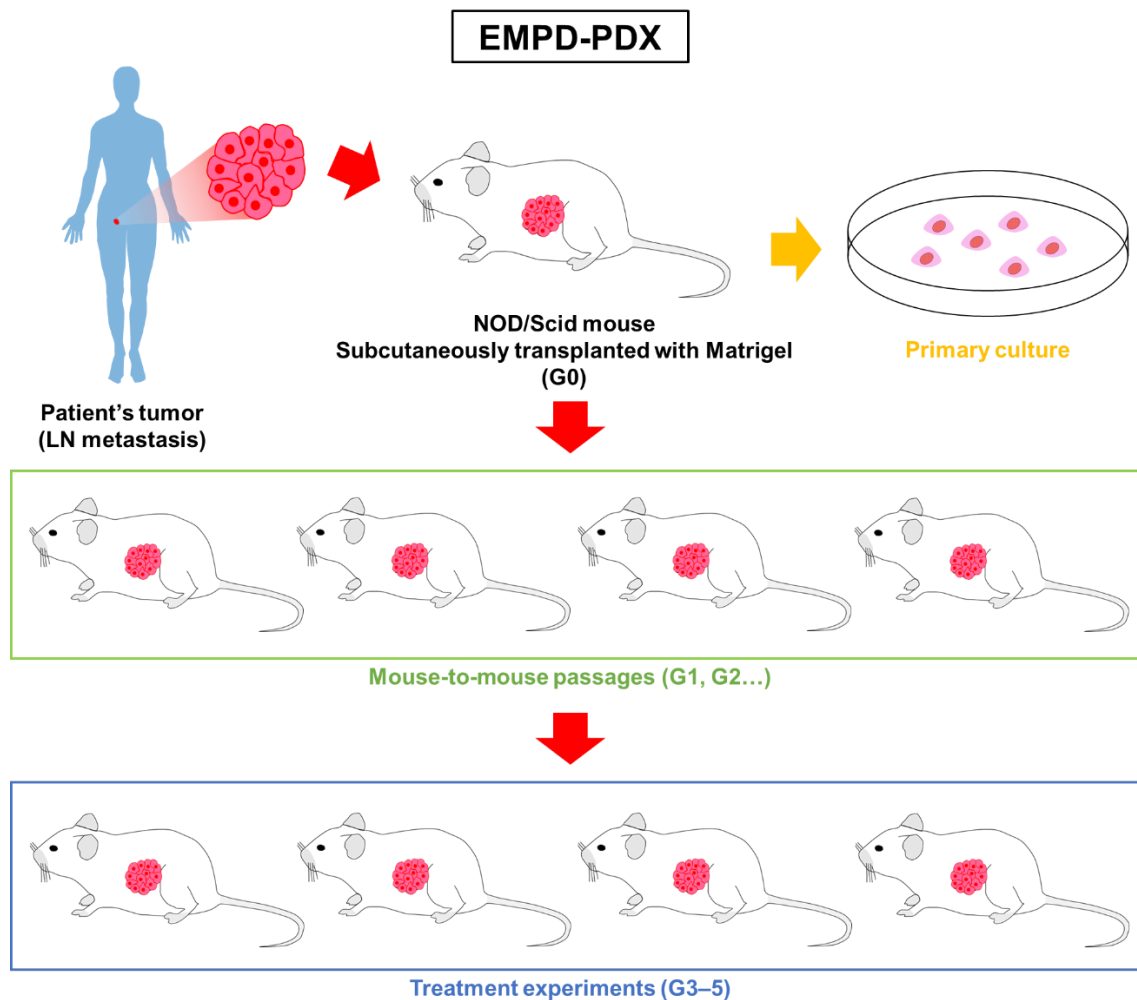


図 11：本研究の概略

患者のリンパ節転移検体を細断しマウスの皮下に移植し，増大を確認し継代した。

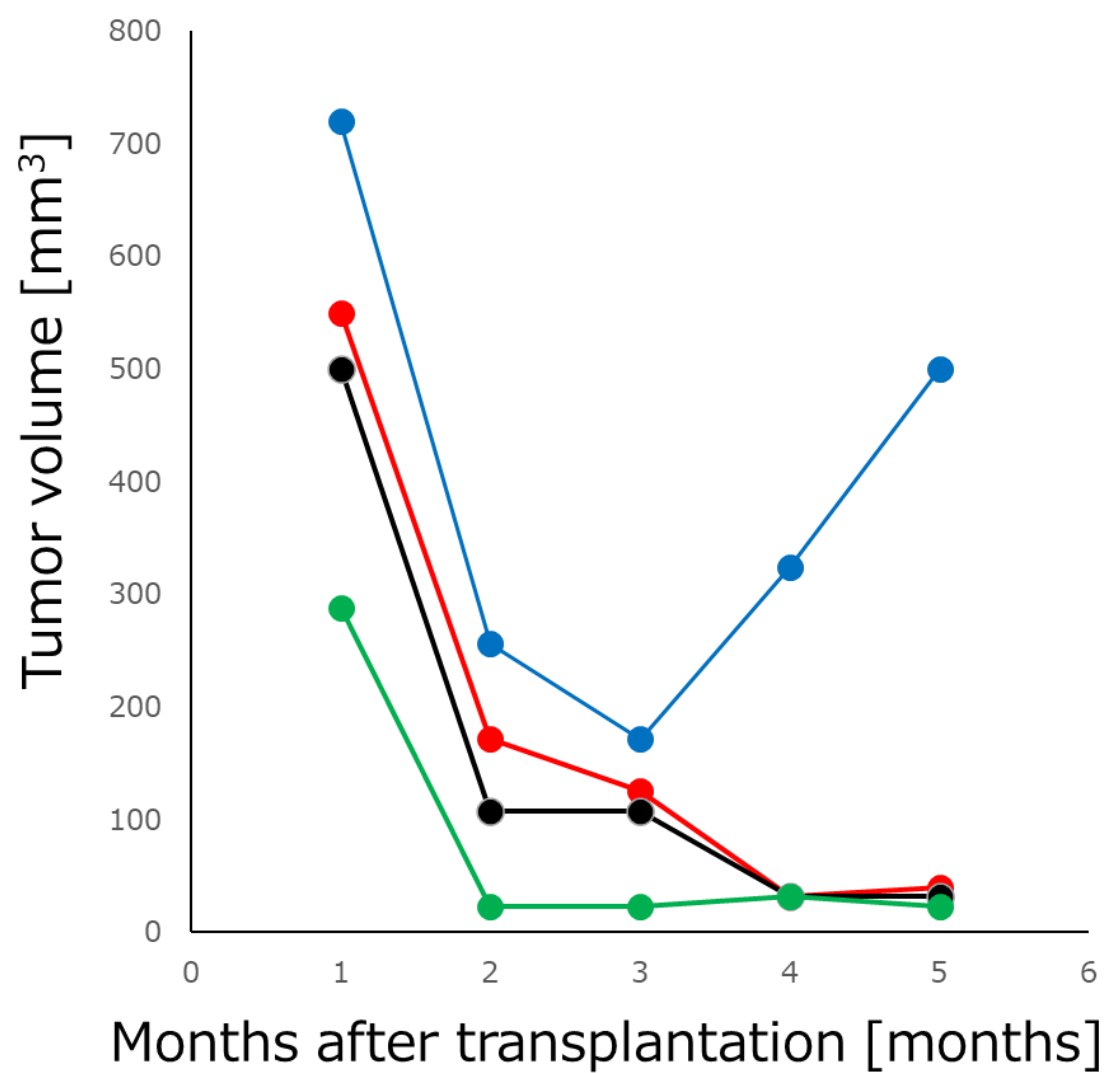


図 12：初代移植した EMPD 腫瘍(G0: generation 0)体積の成長曲線
移植した腫瘍のうちの一つは一旦縮小したものの、5 ヶ月かけ再増大した。



図 13 : PDX 腫瘍の初代継代(G0)の肉眼所見
腫瘍周囲には栄養血管が増生しており，腫瘍断面は黄白色調であった．

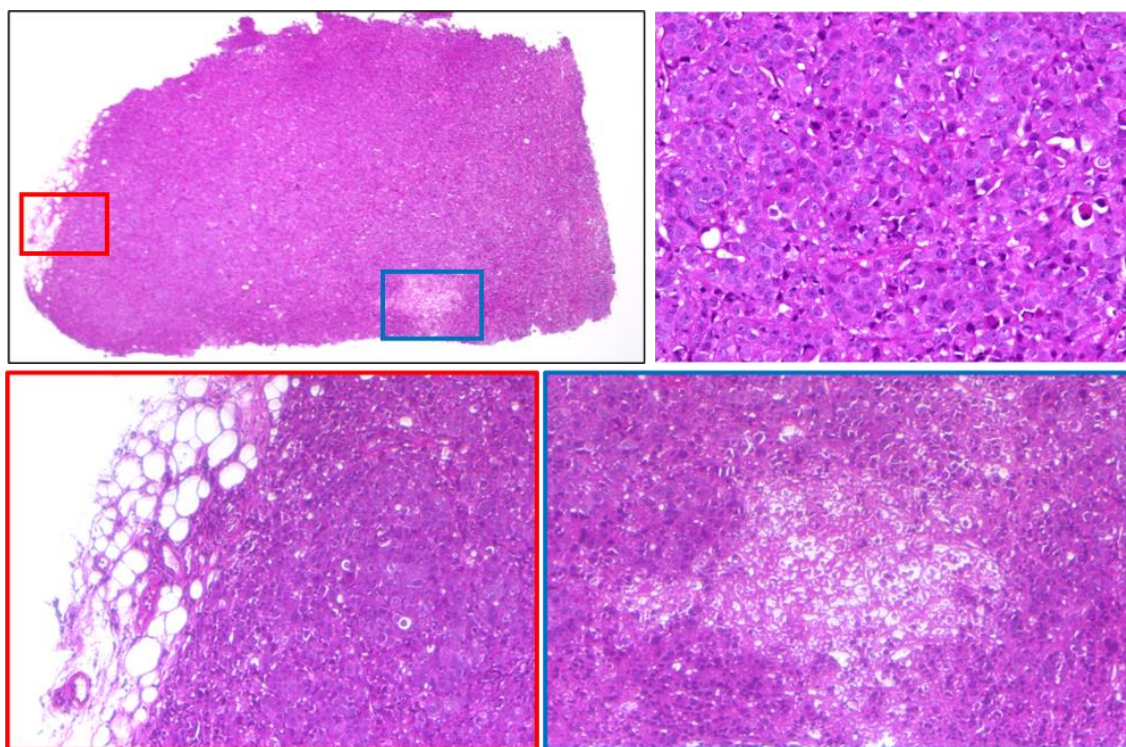


図 14 : PDX 腫瘍の HE 染色検体

腫瘍細胞は大型の核を有しシート状に増殖しており（右上），腫瘍辺縁の栄養血管や（左下赤枠），一部に壊死を伴った（右下青枠）．

次に，EMPD-PDX-H1 と患者組織に対して，CK7 および HER2 の免疫染色を行い解析した．EMPD-PDX-H1 腫瘍は，患者の組織（原発腫瘍・リンパ節転移）と同様の形態・タンパク質発現を示した（CK7 陽性，HER2 弱陽性）．（図 15）．

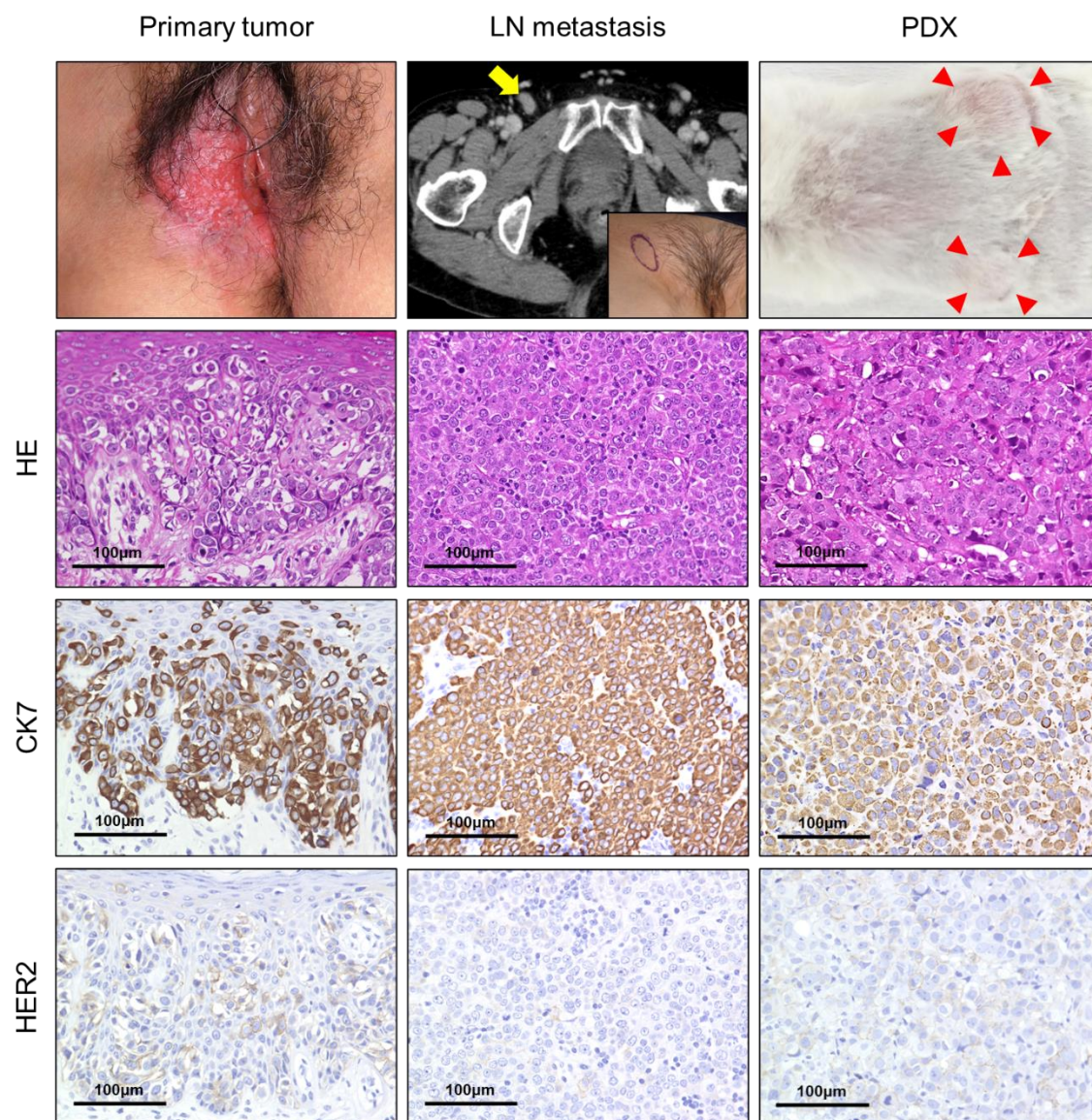


図 15：原発巣・リンパ節転移・EMPDPDX-H1 の組織学的特徴の比較
 EMPDPDX-H1 は患者組織の組織学的特徴を引き継いでいた。

腫瘍体積が 500-1000mm³に達した時点で、EMPD-PDX-H1 腫瘍を次世代の NOD/Scid mouse に移植した。継代を繰り返すにつれ、PDX 腫瘍は安定して増殖するようになった (図 16)。

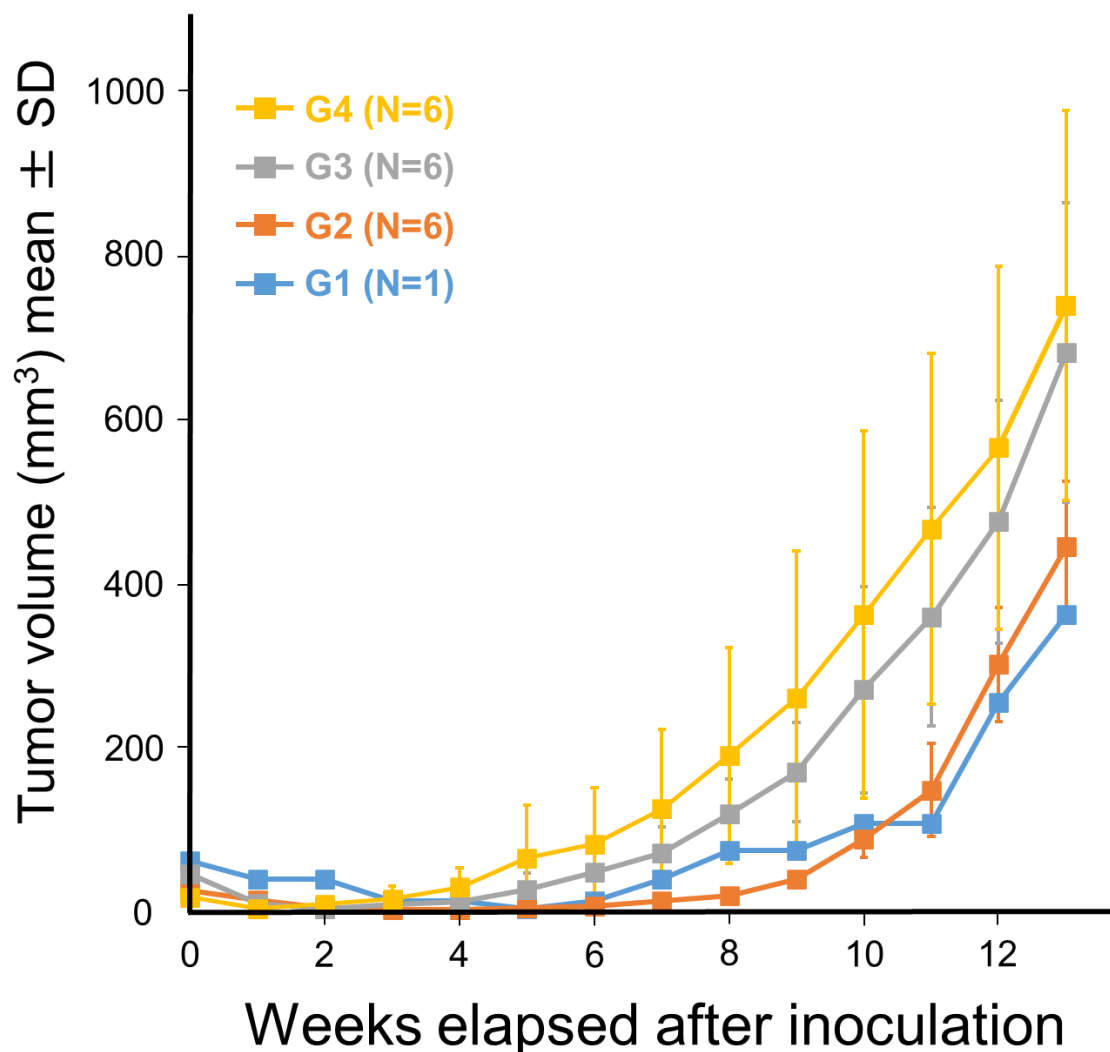


図 16 : PDX 腫瘍の腫瘍体積の成長曲線

PDX 腫瘍は世代を重ねるごとに安定し、より速やかに増大する傾向があった。

また、EMPD-PDX-H1 腫瘍を nude (nu/nu) mouse に移植した。移植した腫瘍は 3/3 (100%)で生着し、HE 染色においても EMPD 腫瘍細胞が増殖していることを確認した (図 17 A, B)。また、CryoStor®を用いて-80℃凍結保存した EMPD-PDX-H1 腫瘍が NOD/Scid mouse に再度生着することも確認した (図 18, 12 個中 10 個生着, 83.3%)。

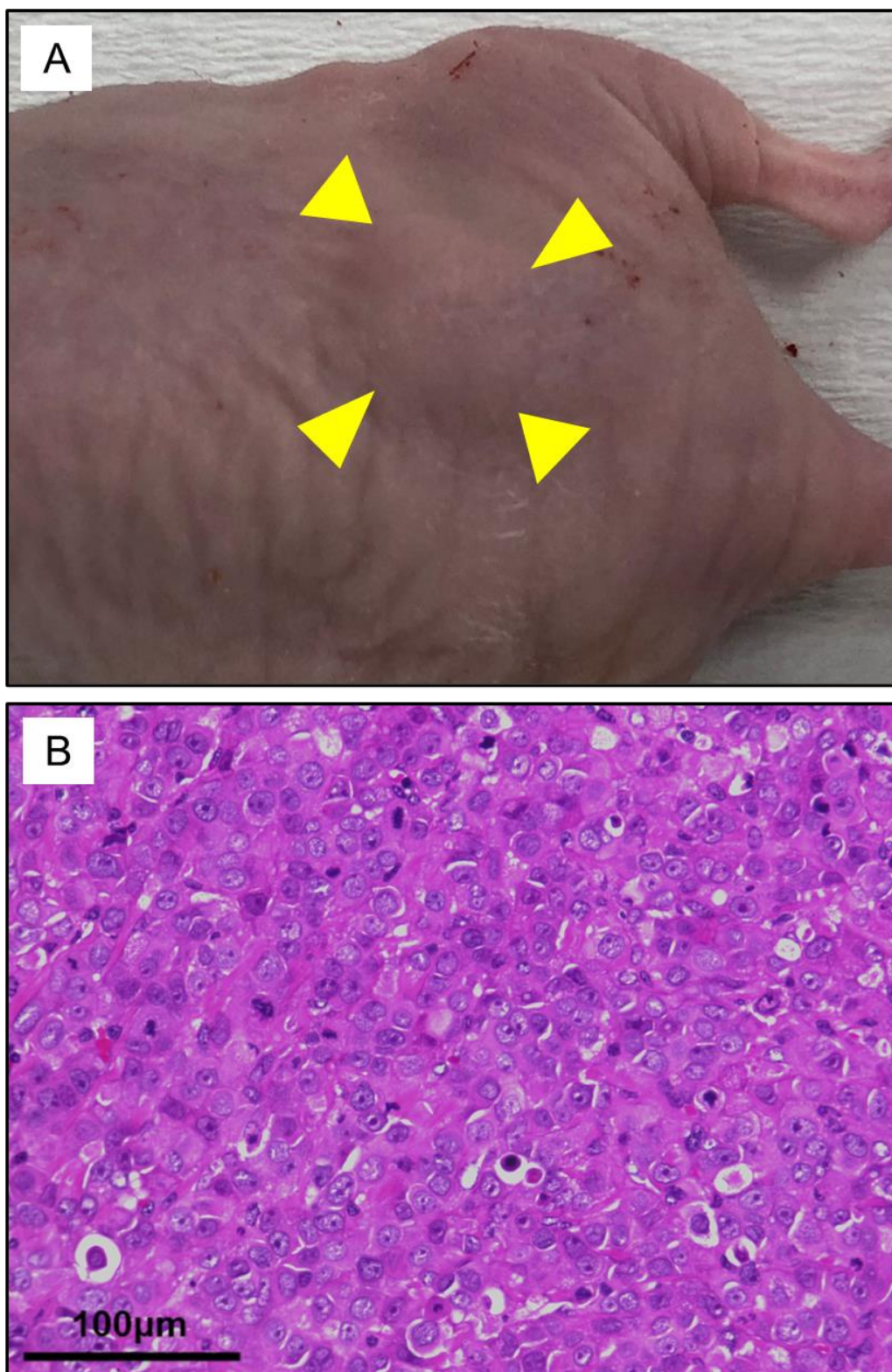


図 17 : EMPD-PDX-H1 の nude (nu/nu) mouse への移植

A : 肉眼所見. 腫瘍細胞は NOD/Scid mouse と同様に増大した.

B : HE 染色所見. 病理組織学的にも EMPD の腫瘍細胞の増殖を確認した.

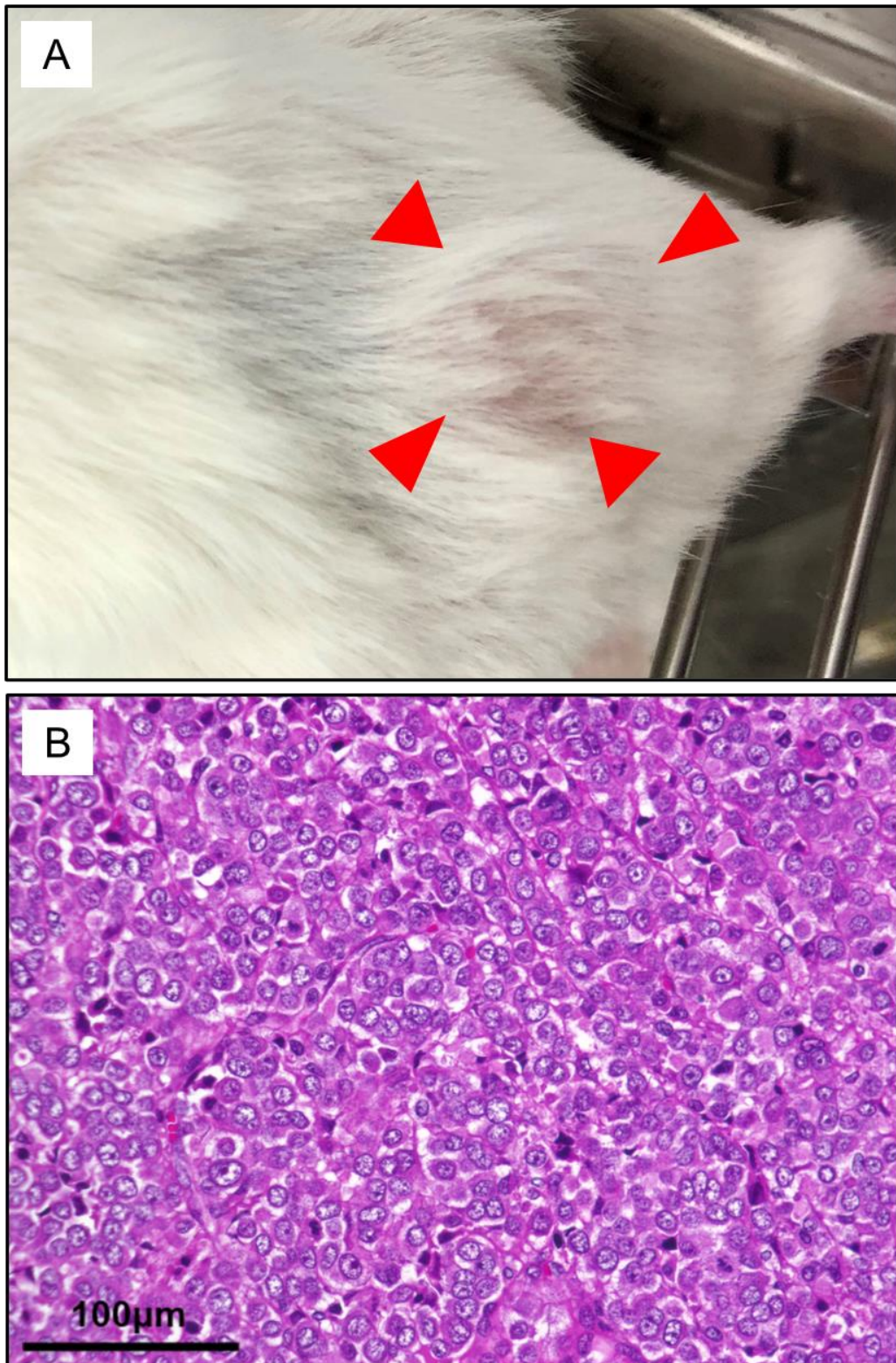


図 18：凍結保存した EMPD-PDX-H1 の再移植

A：肉眼所見．凍結保存した腫瘍は再移植後も増大した．

B：HE 染色所見．病理組織学的にも EMPD の腫瘍細胞の増殖を確認した．

さらに、EMPD-PDX-H1 の第 3 世代から細胞株の樹立も試みたが、大型・円形の腫瘍細胞がある程度まで増殖することは確認できたものの（図 19）、安定した増殖は得られず、in vitro の実験は未だ施行できていない。

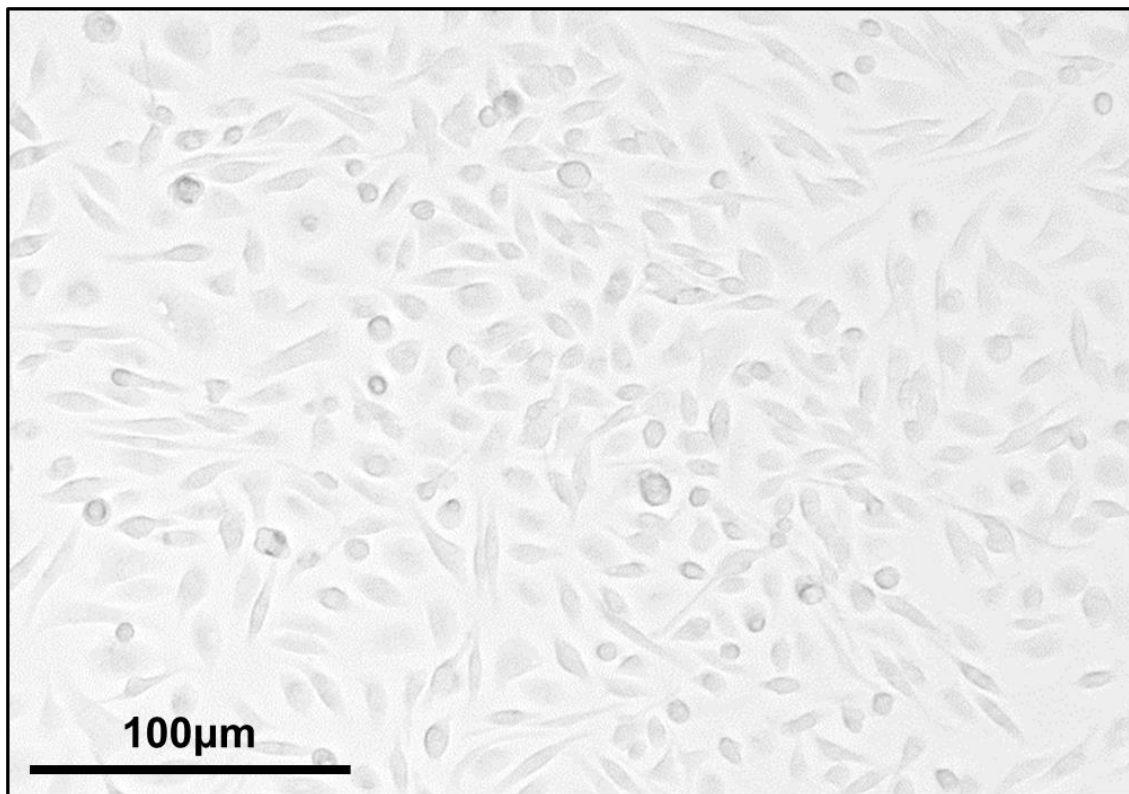


図 19 : EMPD-PDX-H1 より樹立した初代培養細胞
大型・円形のものが腫瘍細胞と思われる。

2. EMPD-PDX-H1 は患者腫瘍と同一の遺伝子変異 *ERBB2* S310F を有する

EMPD-PDX-H1 腫瘍が患者組織（原発巣・転移リンパ節）と同様の遺伝子変異を有するかどうかを確認するために、次世代シーケンサーを用いて包括的がん遺伝子パネル検査を行った。その結果 EMPD-PDX-H1 腫瘍は、患者のリンパ節転移病変と共通した病原性遺伝子変異である *ERBB2* S310F (c. 929C>T) を有していた（表 4）。

表 4：患者リンパ節転移と PDX 腫瘍の major な遺伝子変異
いずれの腫瘍検体においても *ERBB2* S310F が病原遺伝子変異と考えられた。

Sample characteristics	Major gene alterations (VAF, %)
Patient's blood	None
Patient's LN	<i>ERBB2</i> S310F (51.6%)
PDX (G1)	<i>ERBB2</i> S310F (70.7%)
PDX (G2)	<i>ERBB2</i> S310F (68.5%)

VAF: variant allele frequency

また、*ERBB2* S310F は、EMPD-PDX-H1 の継代を続けても保存された。さらに、*ERBB2* S310F を標的としたサンガーシーケンスにより、12 年前に切除した原発腫瘍においても同一の *ERBB2* S310F の遺伝子変異を有していることが判明した（図 20）。

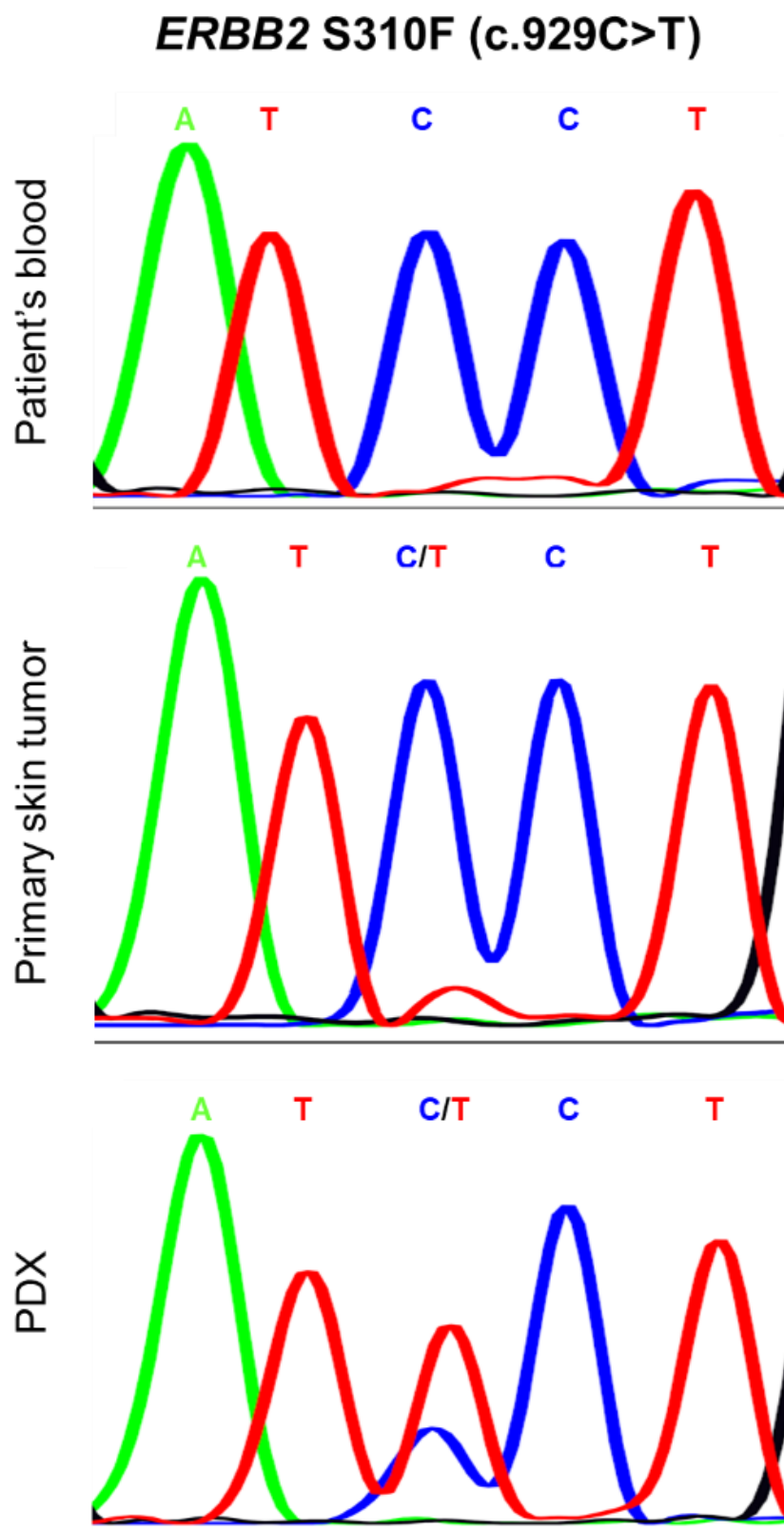


図 20：サンガー法による PDX 腫瘍と原発巣の比較
 原発巣及び PDX 腫瘍は共通して *ERBB2* S310F (c.929C>T) の遺伝子変異を有した。

その他の minor な遺伝子変異を表 5 に示す. EMPD-PDX-H1 では *ERBB2* S310F に加え, *TP53* A161T と *RB1* S780* を有していた. 患者リンパ節では, *TP53* A161T の variant allele frequency (VAF) は 50.4%, *RB1* S780* の VAF は 42.8% であったが, PDX 腫瘍においては 100% に上昇していた. これは, PDX 腫瘍では正常アレルが失われ, 正常細胞の割合が減少していることが原因と考えられる. 患者リンパ節において VAF 33.1% であった *NF1* D2545N の変異も PDX 腫瘍では保持されていたが, その VAF (G1 : 47.5%, G2 : 50.3%) は正常な対立遺伝子が維持されていることを示唆している. *NOTCH1* S1409N は PDX 腫瘍 (G1 および G2) において高い VAF で観察されており, おそらくヘテロ接合性の喪失 (LOH) に起因するものと思われる. 患者の腫瘍ではそのような変異は検出されなかったため, PDX 腫瘍の生着に重要な遺伝子である可能性がある.

表 5 : 患者リンパ節転移と PDX 腫瘍の minor な遺伝子変異
Minor な変異に関しては PDX 腫瘍において患者リンパ節転移検体で観察されない新たな遺伝子変異が多数存在し, これらが PDX 腫瘍の生着に寄与した可能性がある.

Sample characteristics	Minor gene alterations (VAF, %)	
Patient's blood	None	
Patient's LN	<i>TP53</i> A161T (50.4%) <i>RB1</i> S780* (42.8%) <i>NF1</i> D2545N (33.1%)	
PDX (G1)	<i>TP53</i> A161T (100%) <i>ALK</i> Q180H (17.2%) <i>ALK</i> R179L (16.0%) <i>PTCH1</i> G1363S (19.7%) <i>PTCH1</i> A1353T (17.4%) <i>TSC1</i> A529S (70.2%) <i>TSC1</i> P513S (69.6%) <i>NOTCH1</i> S1409N (90.2%) <i>FGFR2</i> L92F (36.2%) <i>FGFR2</i> L63M (41.0%) <i>FGFR2</i> V60L (41.3%) <i>FGFR2</i> A52V (41.9%) <i>EGFR2</i> V49A (42.8%)	<i>KMT2D</i> G5087E (47.1%) <i>KMT2D</i> S2149T (45.7%) <i>RB1</i> S780* (100.0%) <i>NF1</i> D2545N (47.5%) <i>CDK12</i> S1288R (36.0%) <i>BCOR</i> R710S (18.1%) <i>KDM6A</i> I598V (23.4%) <i>KDM6A</i> M754V (17.5%) <i>KDM6A</i> T794P (17.5%)
PDX (G2)	<i>TP53</i> A161T (100%) <i>ALK</i> Q180H (12.2%) <i>ALK</i> R179L (12.3%) <i>PTCH1</i> G1363S (19.7%) <i>PTCH1</i> A1353T (17.5%) <i>TSC1</i> A529S (59.8%) <i>NOTCH1</i> S1409N (72.5%) <i>FGFR2</i> L92F (24.9%) <i>FGFR2</i> L63M (25.8%) <i>FGFR2</i> V60L (26.3%) <i>FGFR2</i> A52V (26.8%)	<i>KMT2D</i> G5087E (44.6%) <i>KMT2D</i> S2149T (37.5%) <i>RB1</i> S780* (99.5%) <i>NF1</i> D2545N (50.3%) <i>CDK12</i> S1288R (19.8%) <i>KDM6A</i> T794P (26.8%)

3. EMPD-PDX-H1 を用いた治療実験

EMPD の前臨床研究は、EMPD の細胞株・あるいは PDX 組織を樹立することそのものが困難であるためか、本論文まで報告されていない。そこで、EMPD-PDX-H1 が臨床現場で報告されている分子標的療法や化学療法に反応するかどうかを確認するための治療実験を行った。分子標的療法に関しては、PDX が病源性遺伝子変異の *ERBB2* S310F を保有していたことから、HER2 標的治療薬（トラスツズマブ単剤・ラパチニブ単剤・両者の併用）で腫瘍を治療した。その結果、全ての分子標的療法が腫瘍に対し奏効することがわかった（図 21-23）。

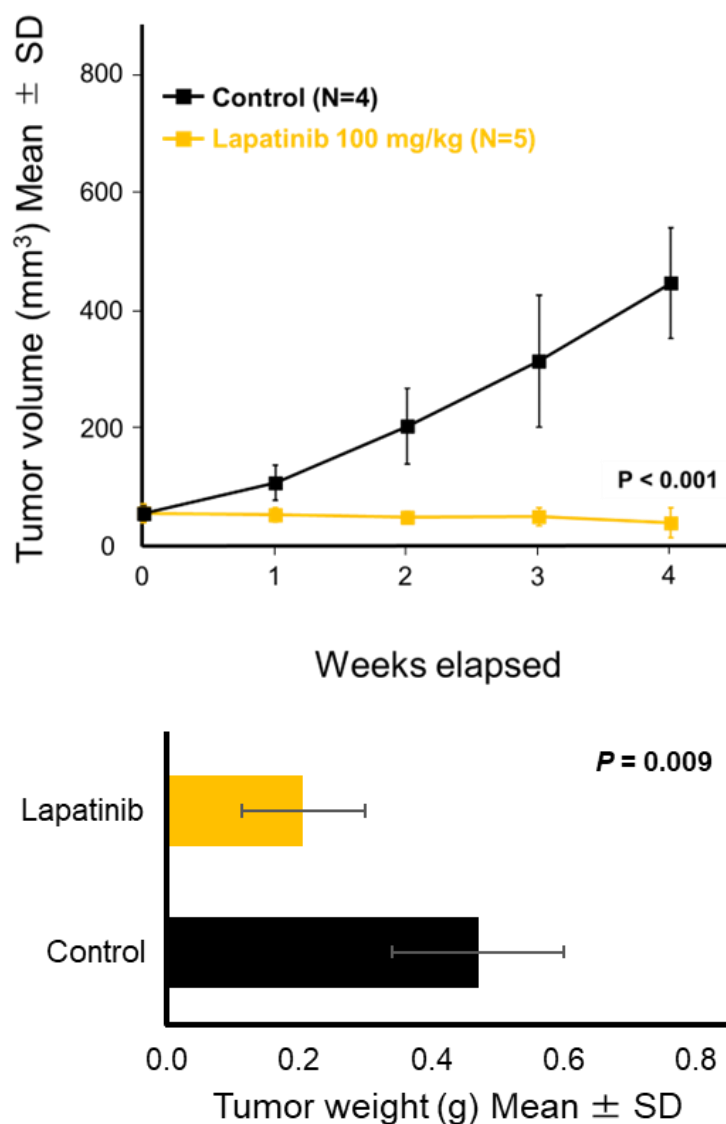


図 21：ラパチニブによる治療実験

ラパチニブ群（N=5）はコントロール群（N=4）と比較し統計学的に有意な腫瘍縮小効果を示した（腫瘍体積： $P < 0.001$ ，腫瘍重量： $P = 0.009$ ）。

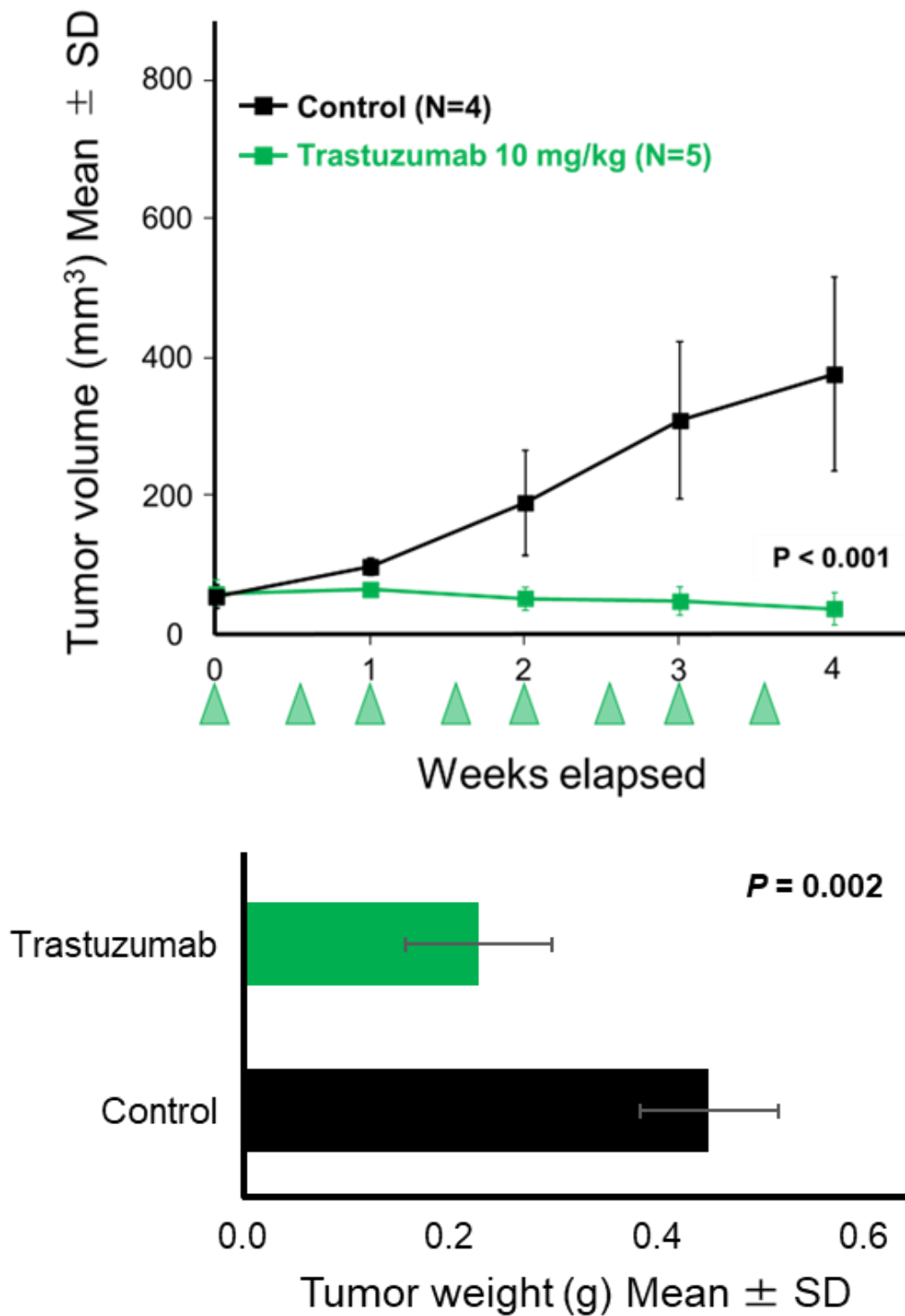


図 22：トラスツズマブによる治療実験

トラスツズマブ群 (N=5) はコントロール群 (N=4) と比較し統計学的に有意な腫瘍縮小効果を示した (腫瘍体積 : $P < 0.001$, 腫瘍重量 : $P = 0.002$).

緑矢頭はトラスツズマブ投与日を示す.

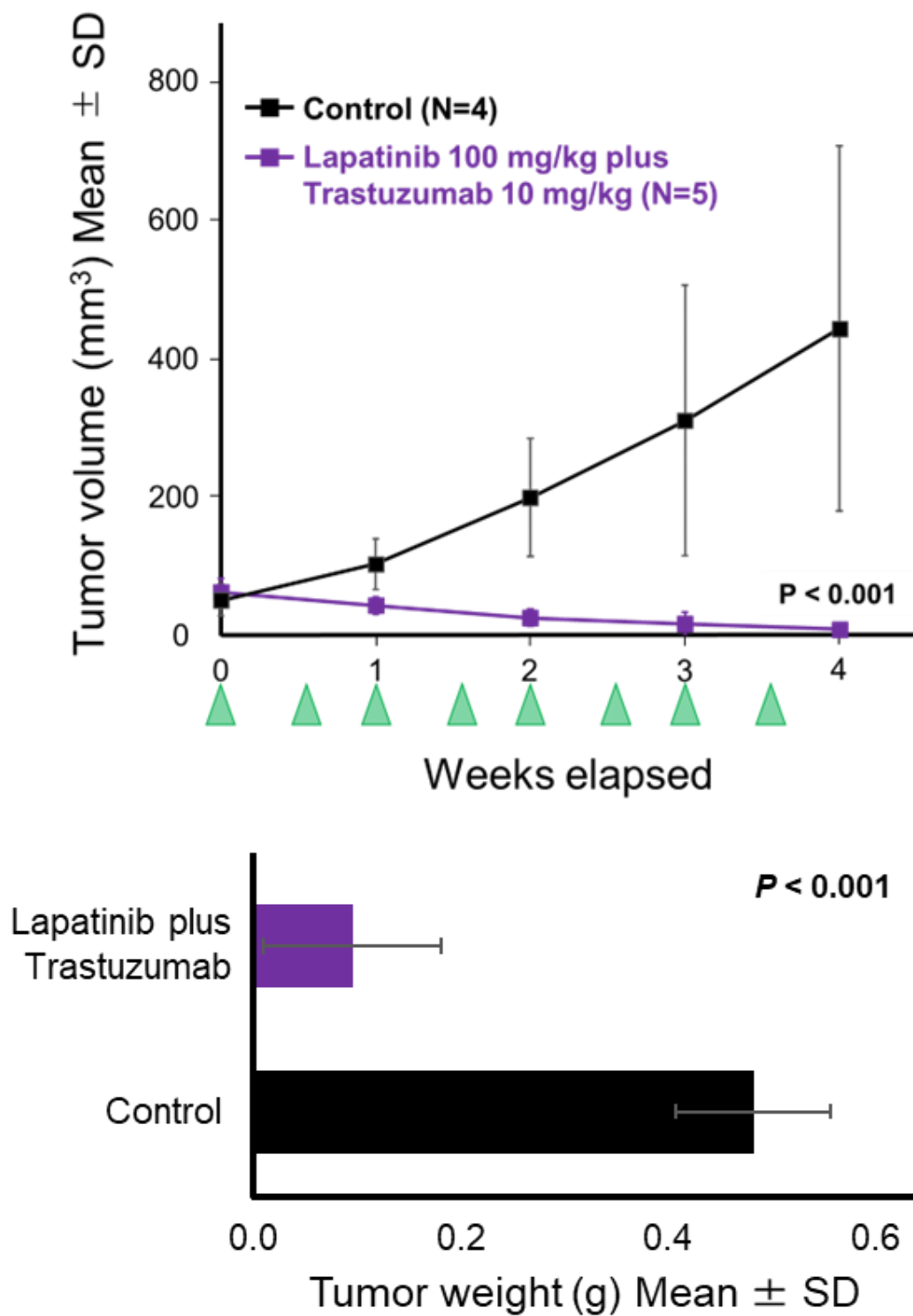


図 23：ラパチニブ・トラスツズマブ併用療法による治療実験
ラパチニブ・トラスツズマブ併用群 (N=5) はコントロール群 (N=4) と比較し統計学的に有意な腫瘍縮小効果を示した (腫瘍体積 : $P < 0.001$, 腫瘍重量 : $P < 0.001$).
緑矢頭はトラスツズマブ投与日を示す.

次に細胞障害性抗がん剤に関しても治療実験を施行したが、EMPD-PDX-H1は、実臨床において転移性 EMPD に有効であることが報告されているドセタキセル (Yoshino K et al, 2016; Kato M et al., 2019) に良好な反応を示した (図 24)。また、実臨床において EMPD に使用された報告のない薬剤としては、乳がんの二次治療として有効であることが示されているエリブリン (Twelves C et al., 2014) を用いた。エリブリン単剤療法 (1.5 mg/kg/週) により、EMPD-PDX-H1 は完全に消失し、1 週間再発はなかった (図 25)。さらにエリブリンを減量して投与を行い、同様の結果を得た (図 26)。

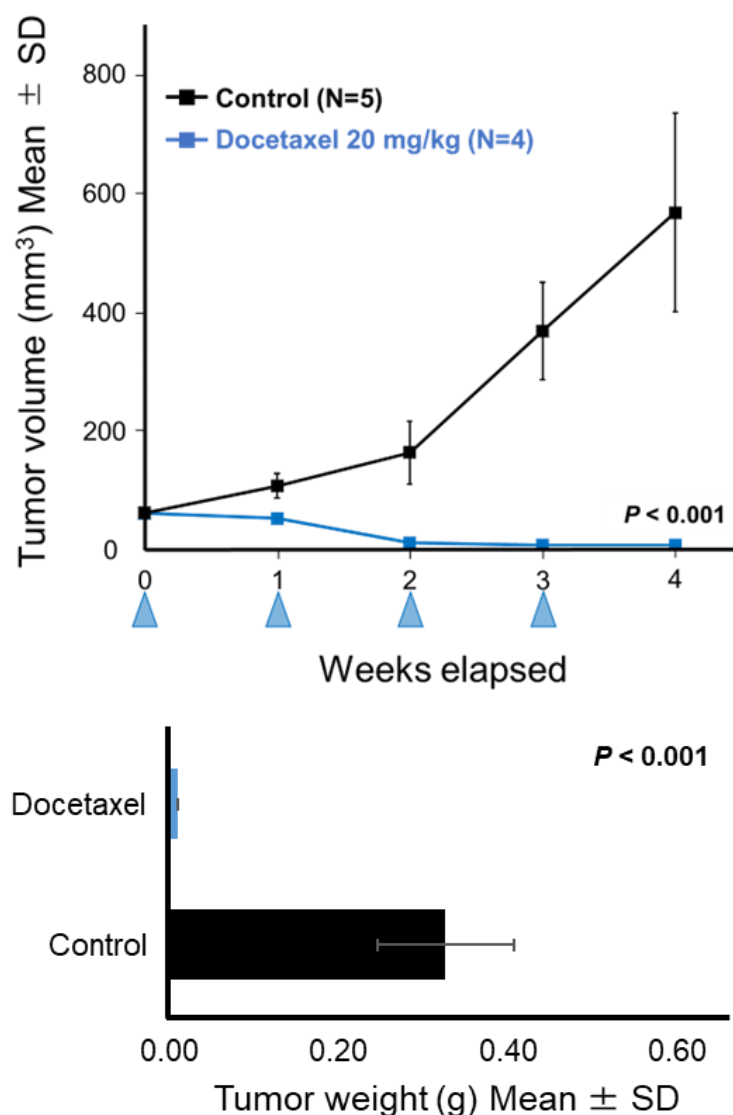


図 24：ドセタキセルによる治療実験

ドセタキセル群 (N=4) はコントロール群 (N=5) と比較し統計学的に有意な腫瘍縮小効果を示した (腫瘍体積 : $P < 0.001$, 腫瘍重量 : $P < 0.001$)。

青矢頭はドセタキセル投与日を示す。

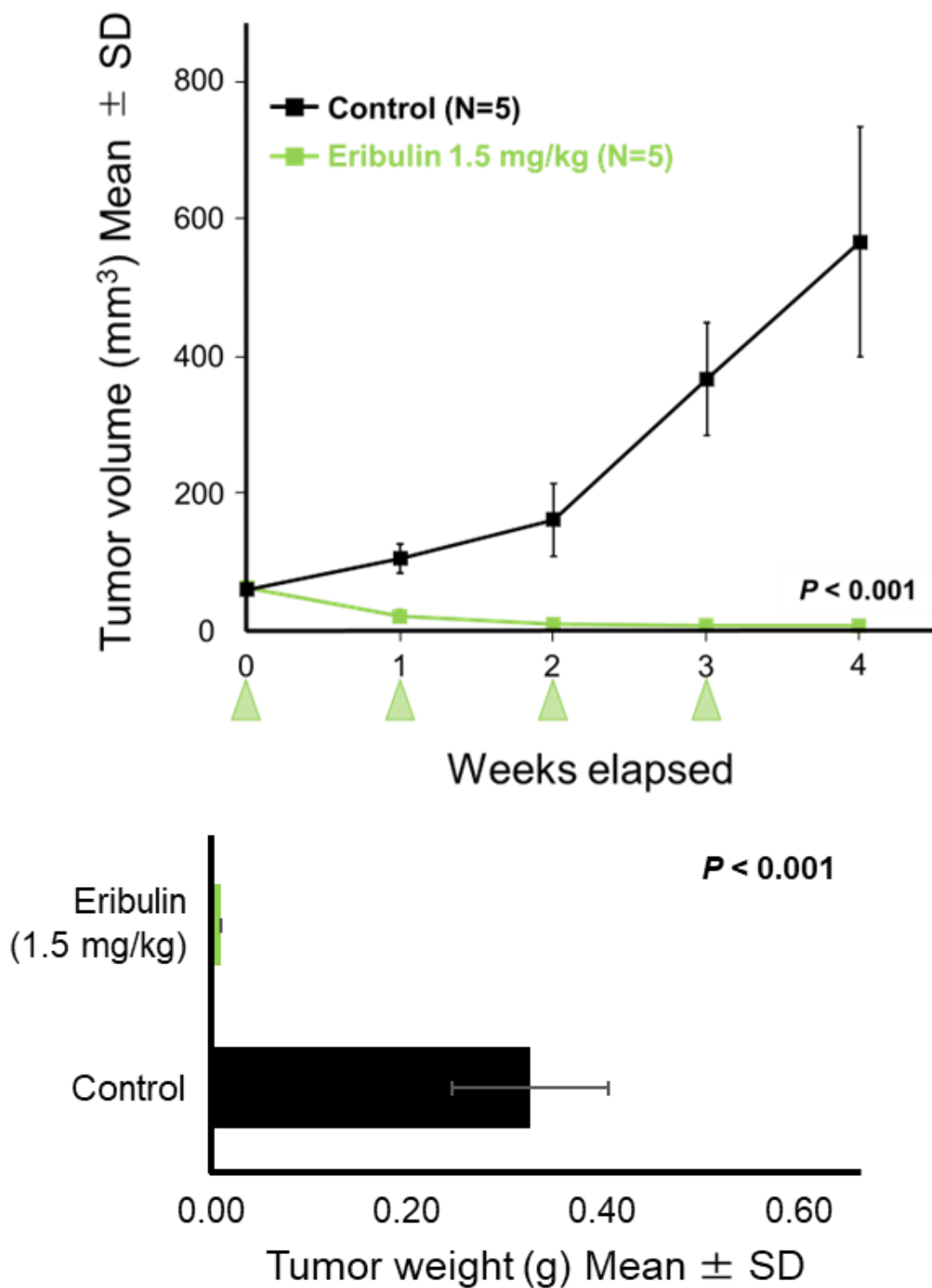


図 25 : エリ布林 (1.5 mg/kg/週) による治療実験
 エリ布林群 (N=5) はコントロール群 (N=5) と比較し統計学的に有意な腫瘍縮小
 効果を示した (腫瘍体積 : $P < 0.001$, 腫瘍重量 : $P < 0.001$).
 薄緑矢頭はエリ布林投与日を示す.

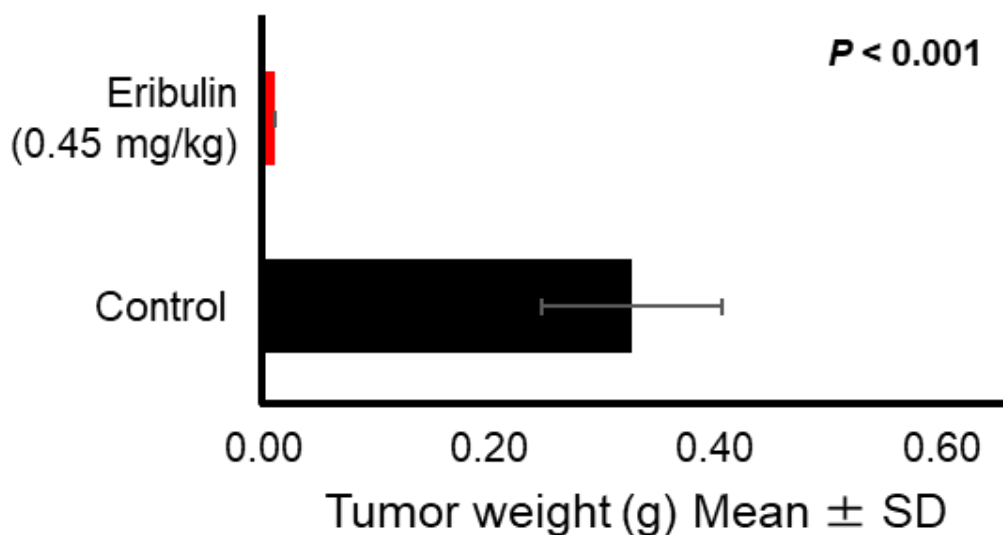
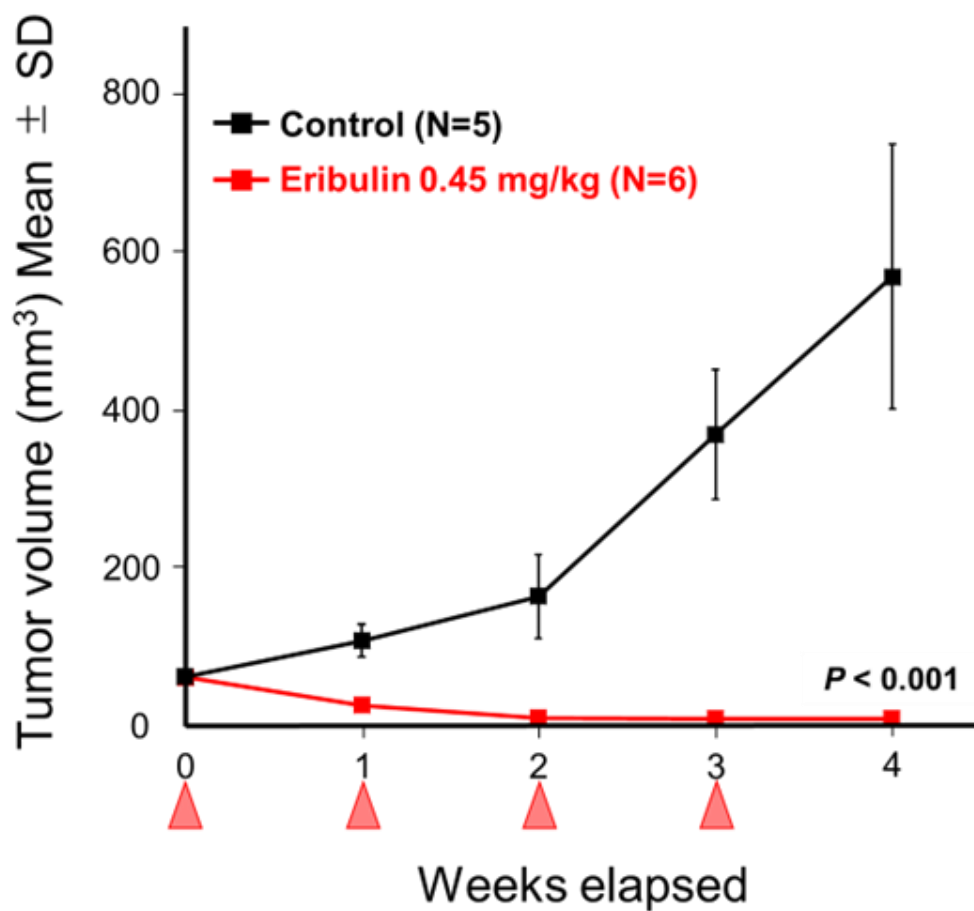


図 26 : エリ布林 (0.45 mg/kg/週) による治療実験
 エリ布林群 (N=6) はコントロール群 (N=5) と比較し統計学的に有意な腫瘍縮小
 効果を示した (腫瘍体積 : $P < 0.001$, 腫瘍重量 : $P < 0.001$).
 赤矢頭はエリ布林投与日を示す.

治療実験の結果は、Ki-67 染色と TUNEL 染色でも確認された。Ki-67 染色では、治療群の EMPD-PDX-H1 腫瘍の全てが、コントロール群の腫瘍が示すよりも統計学的に有意に低い陽性細胞率を示した（図 27）。TUNEL 染色では、全ての治療群の EMPD-PDX-H1 腫瘍が、コントロール群の腫瘍が示したよりも統計学的に有意に高い陽性腫瘍細胞率を示した（図 28）。

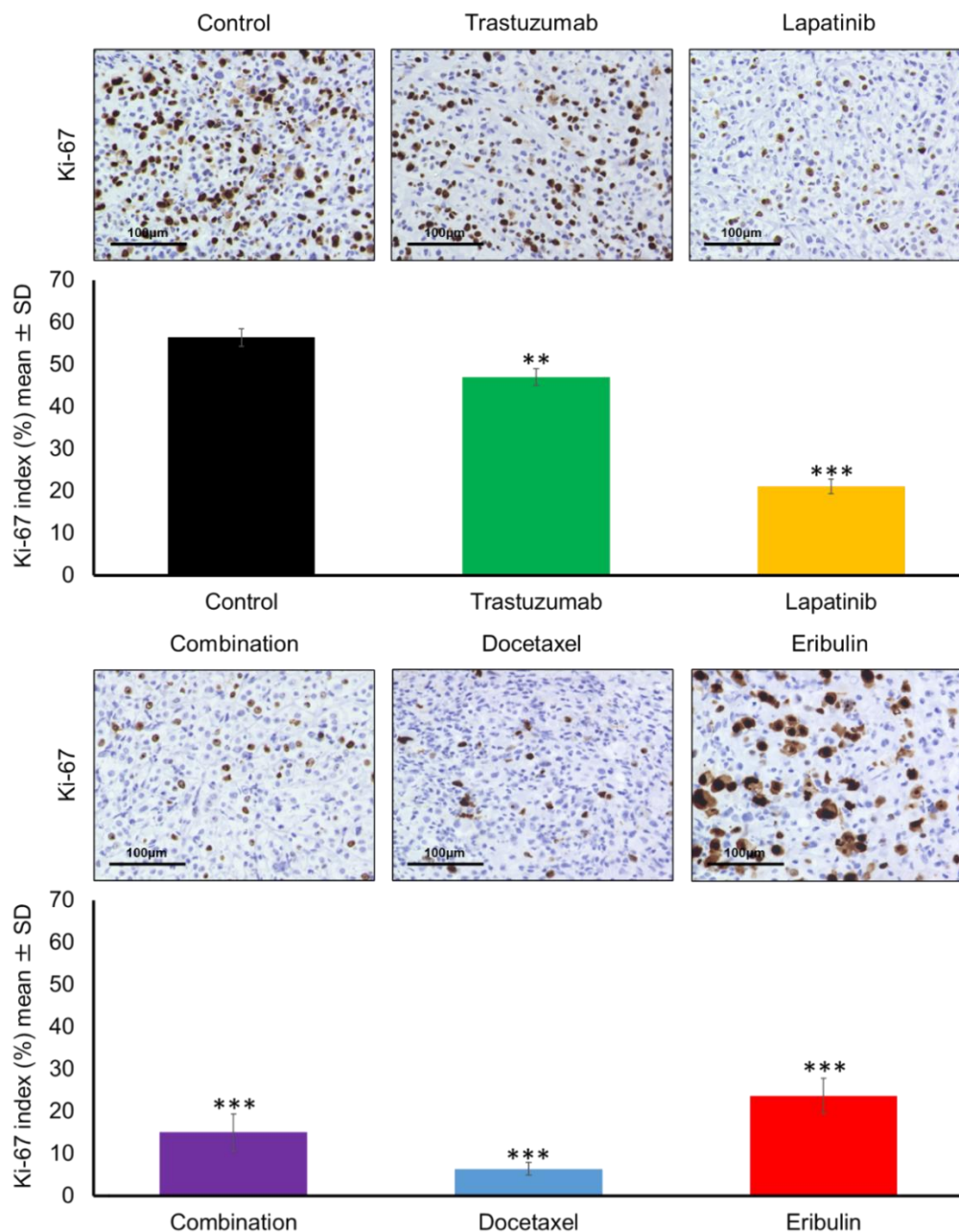


図 27 : Ki-67 染色による治療効果の評価

いずれの治療群においても Ki-67 陽性細胞陽性率はコントロール群よりも低かった。

投与開始後 4 週時点で腫瘍を摘出し病理学的検討を行った

（図中 Combination 群はラパチニブ・トラスツズマブ併用群を指す）。

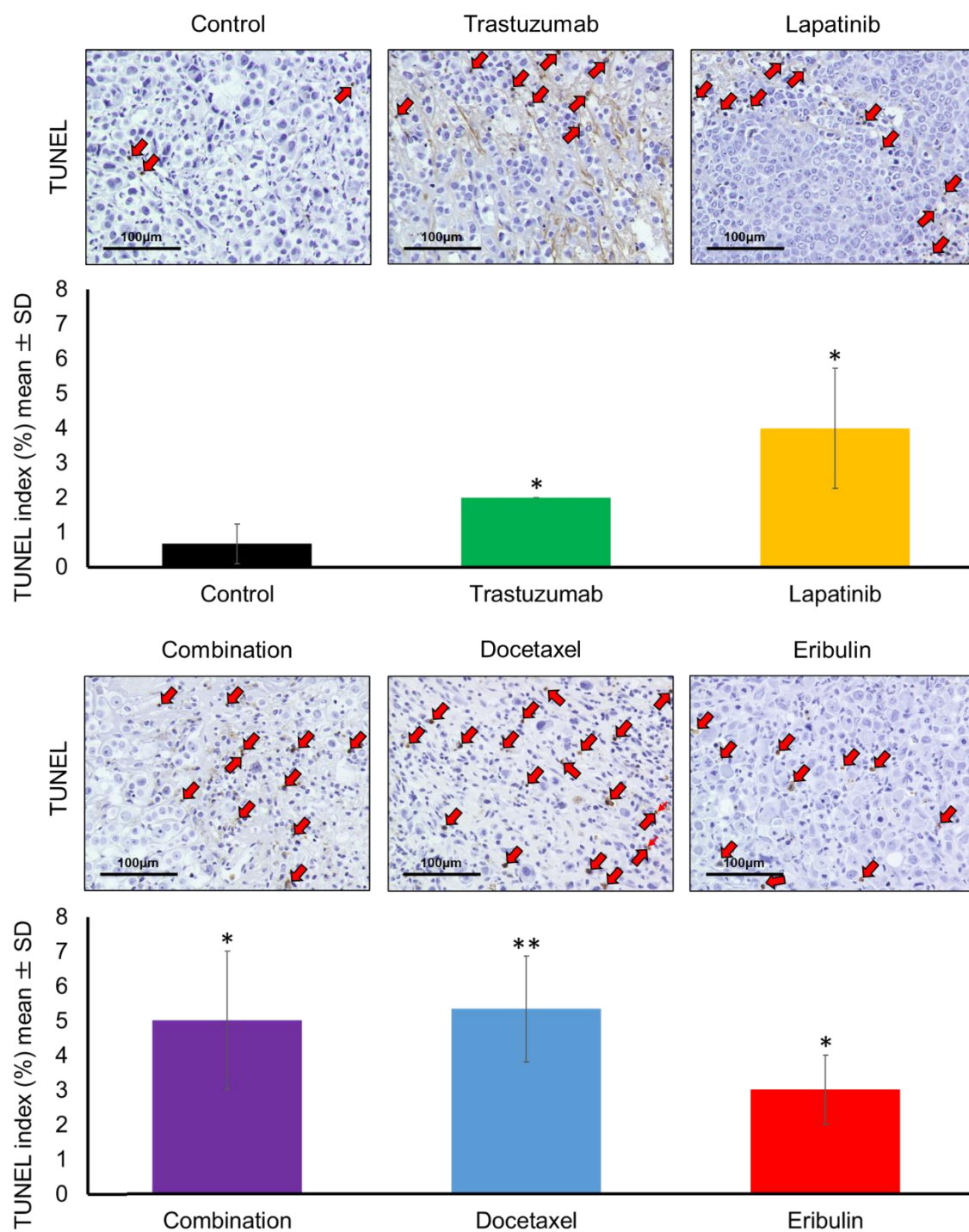


図 28 : TUNEL 染色による治療効果の評価
 いずれの治療群においても TUNEL 陽性細胞陽性率はコントロール群よりも高かった
 (図中 Combination 群はラパチニブ・トラスツズマブ併用群を指す)。

4. EMPD-PDX-H1 を用いた新たな治療実験の探索

治療実験の探索を目的とした免疫染色では、アンドロゲン受容体陽性、エストロゲン受容体陰性、プロゲステロン受容体陰性、CDK4 陽性・CDK6 陰性であった (図 29, 30).

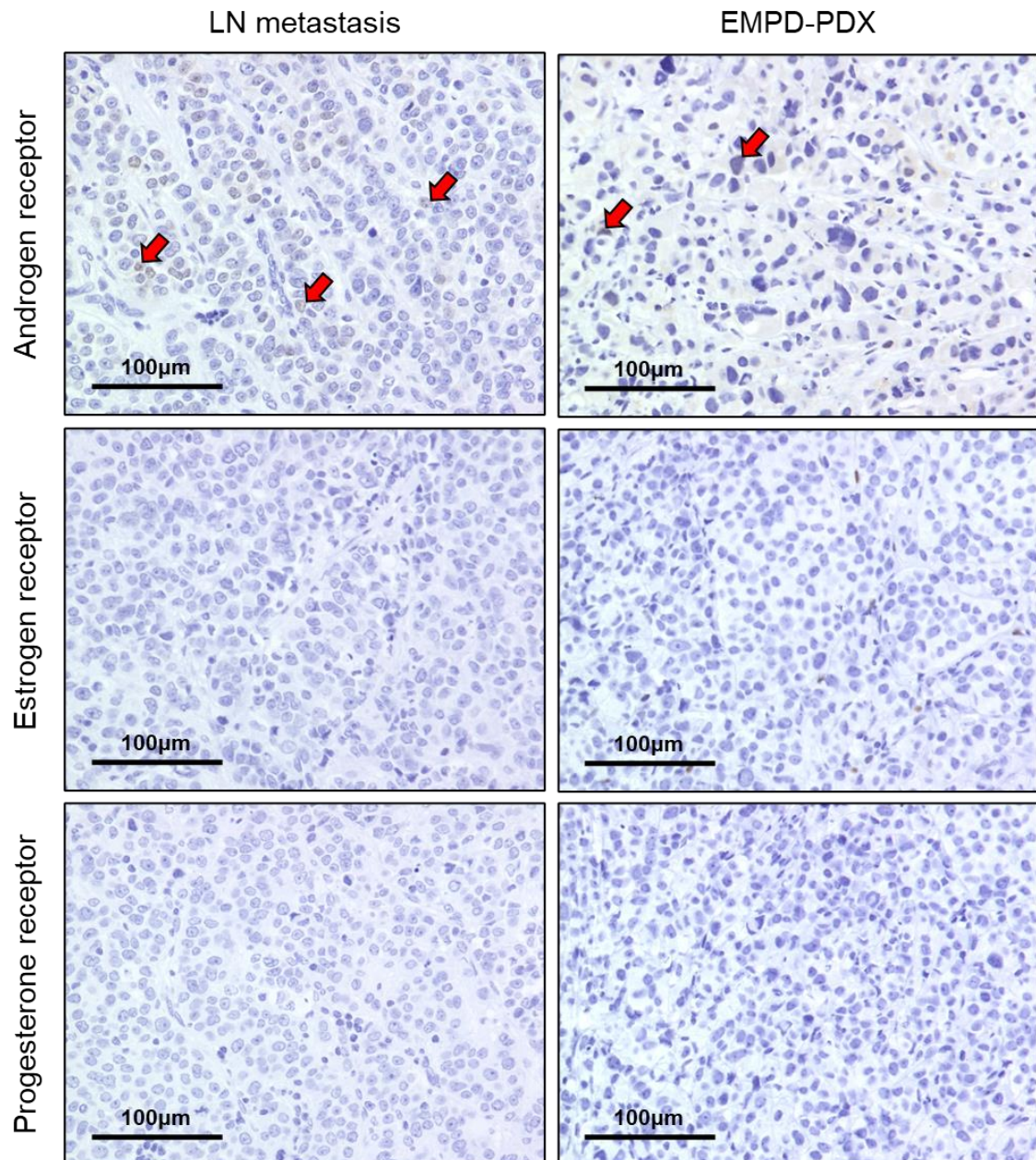


図 29：性ホルモン受容体の免疫染色所見
EMPD-PDX-H1・患者リンパ節転移はいずれもアンドロゲン受容体陽性、
エストロゲン・プロゲステロン受容体陰性であった。

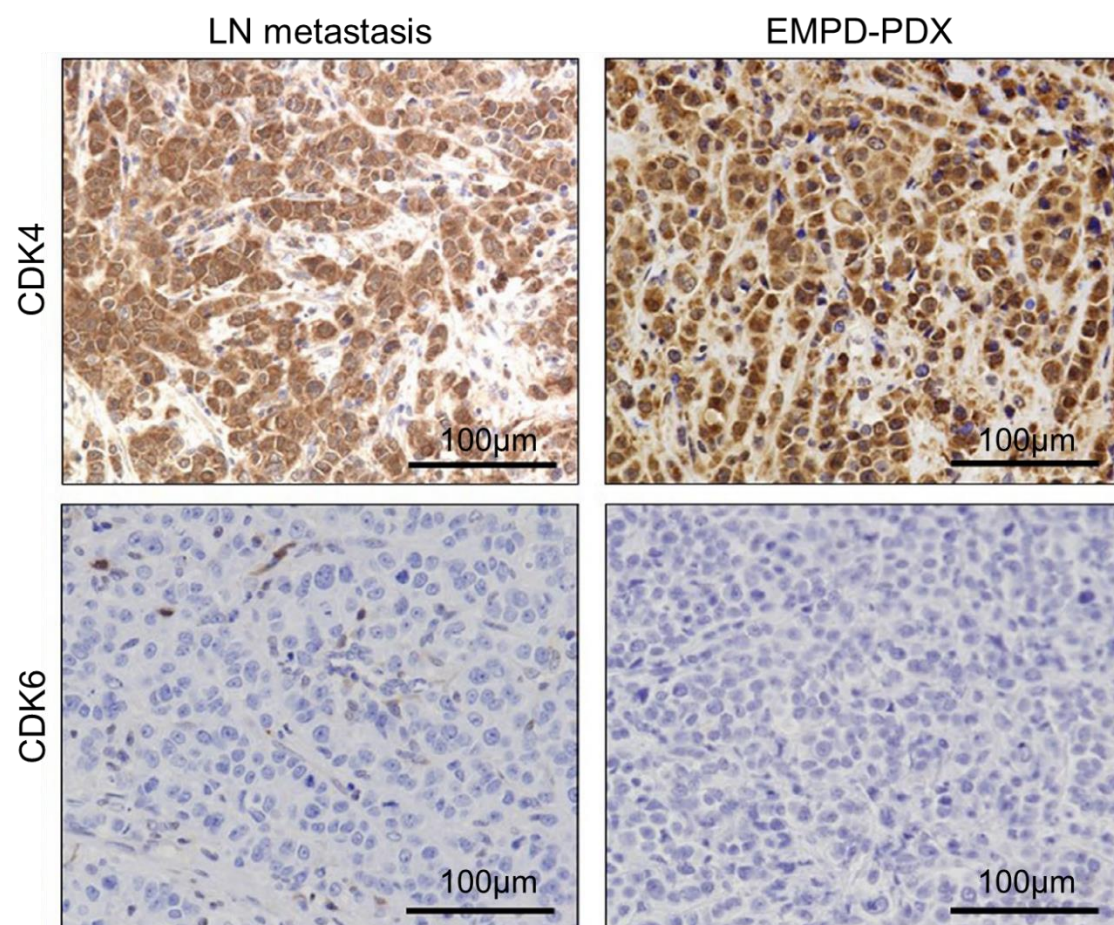


図 30 : CDK4・CDK6 の免疫染色所見
 EMPD-PDX-H1・患者リンパ節転移はいずれも CDK4 陽性, CDK6 陰性であった.

追加実験ではCDK4/6阻害薬のアベマシクリブ・パルボシクリブを投与した。
(経口投与, 1日1回, 連日) いずれの薬剤も3週時点でコントロール群と比較して統計学的に有意な腫瘍増殖抑制効果が得られた(図31, それぞれ $P < 0.001$)。

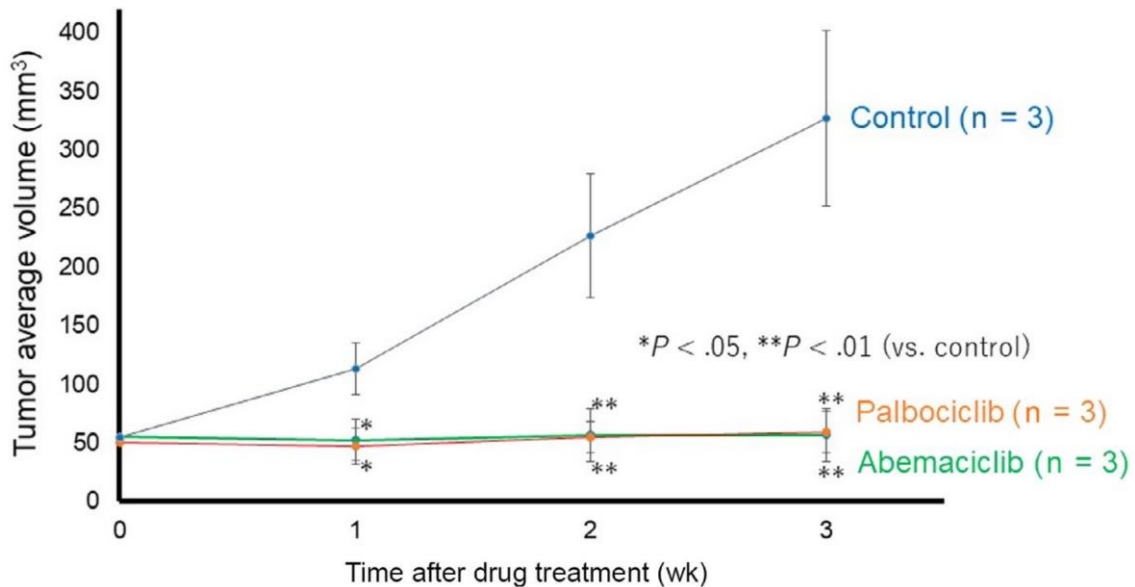


図 31 : CDK4/6 による治療実験

アベマシクリブ群 (N=3) 及びパルボシクリブ群 (N=3) はコントロール群 (N=3) と比較し統計学的に有意な腫瘍増殖抑制効果を示した (それぞれ $P < 0.001$)。

3週治療後に腫瘍を摘出し, 組織学的に Ki-67 陽性細胞率を比較したところ, アベマシクリブ投与群はコントロール群と比較し統計学的に有意に Ki-67 陽性細胞率が低かった ($P < 0.005$)。

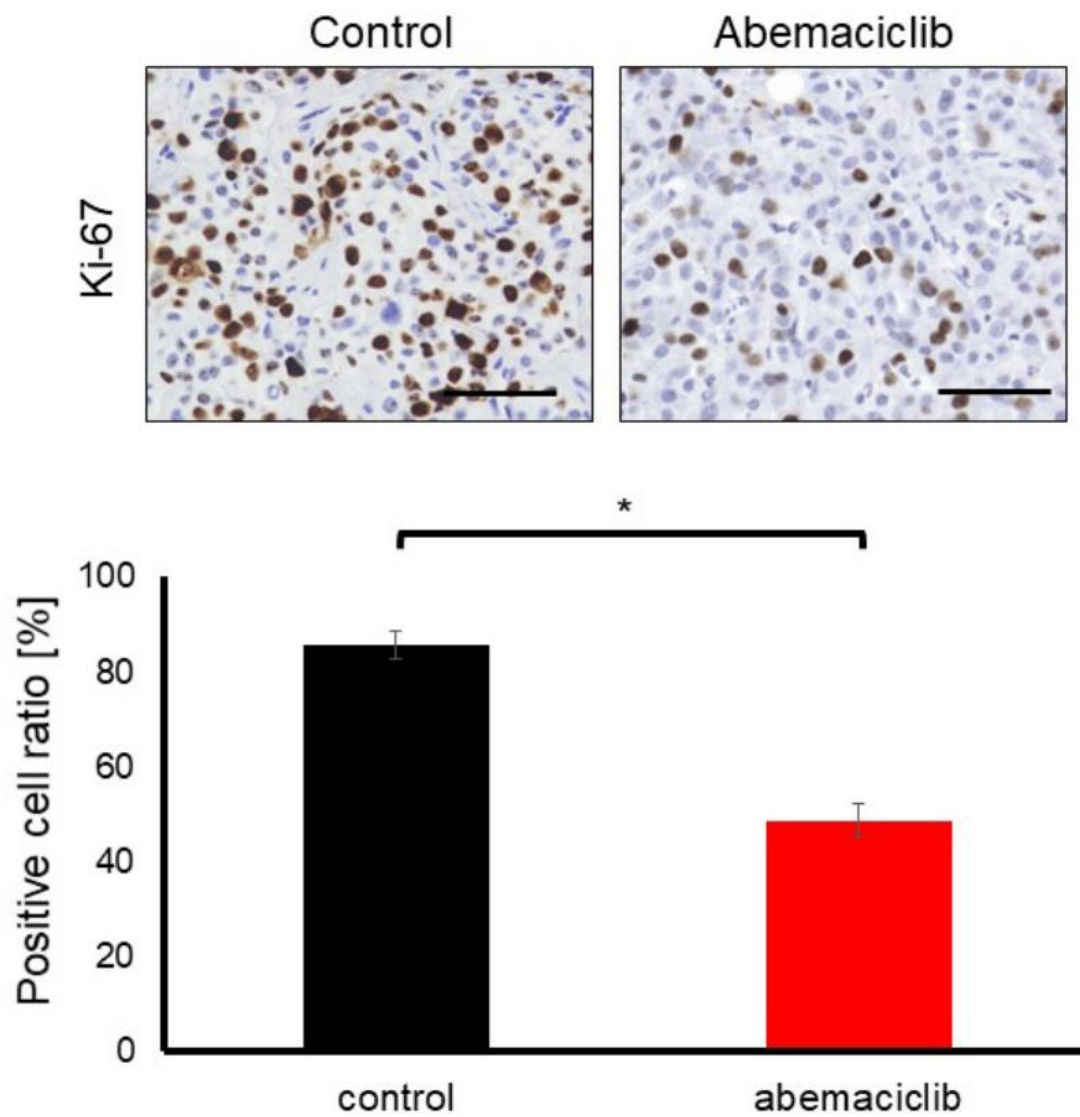


図 32 : CDK4/6 による治療実験

アベマシクリブ群はコントロール群と比較し、統計学的に有意に Ki-67 陽性細胞率が低かった ($P < 0.05$).

5. EMPD は CDK4, cyclin D1 の染色性の発現が高い

次に北海道大学病院皮膚科にて治療を行った EMPD 患者検体を用いて免疫染色を行った。臨床検体が得られた患者の臨床背景を表 6 にまとめた。患者数は 61 名で年齢は 53~94 歳（平均 75 歳），男女比は 36:25 であった。

表 6：当科で腫瘍組織が得られた患者の臨床背景のまとめ
61 名の患者より 61 の皮膚サンプル・11 のリンパ節転移のサンプルを得た。

		Number	Proportion
Case	primary lesion	61	84.70%
	metastatic LN	11	15.30%
Age	range (mean, median)	53 – 94 (74.96, 75)	
Sex	male	36	59.00%
	female	25	41.00%
Observation period [month]	range (mean, median)	1 – 96 (36.03, 36)	
Clinical stage	Ia	27	44.26%
	Ib	23	37.70%
	II	2	3.28%
	III	3	4.92%
	IV	6	9.84%
Outcome	alive	52	85.25%
	dead	9	14.75%

免疫染色では、EMPDP 原発巣及びリンパ節転移における腫瘍細胞の CDK4 発現レベルは、正常表皮や付属器上皮と比較して高かった（図 33, * $P < .01$ ）

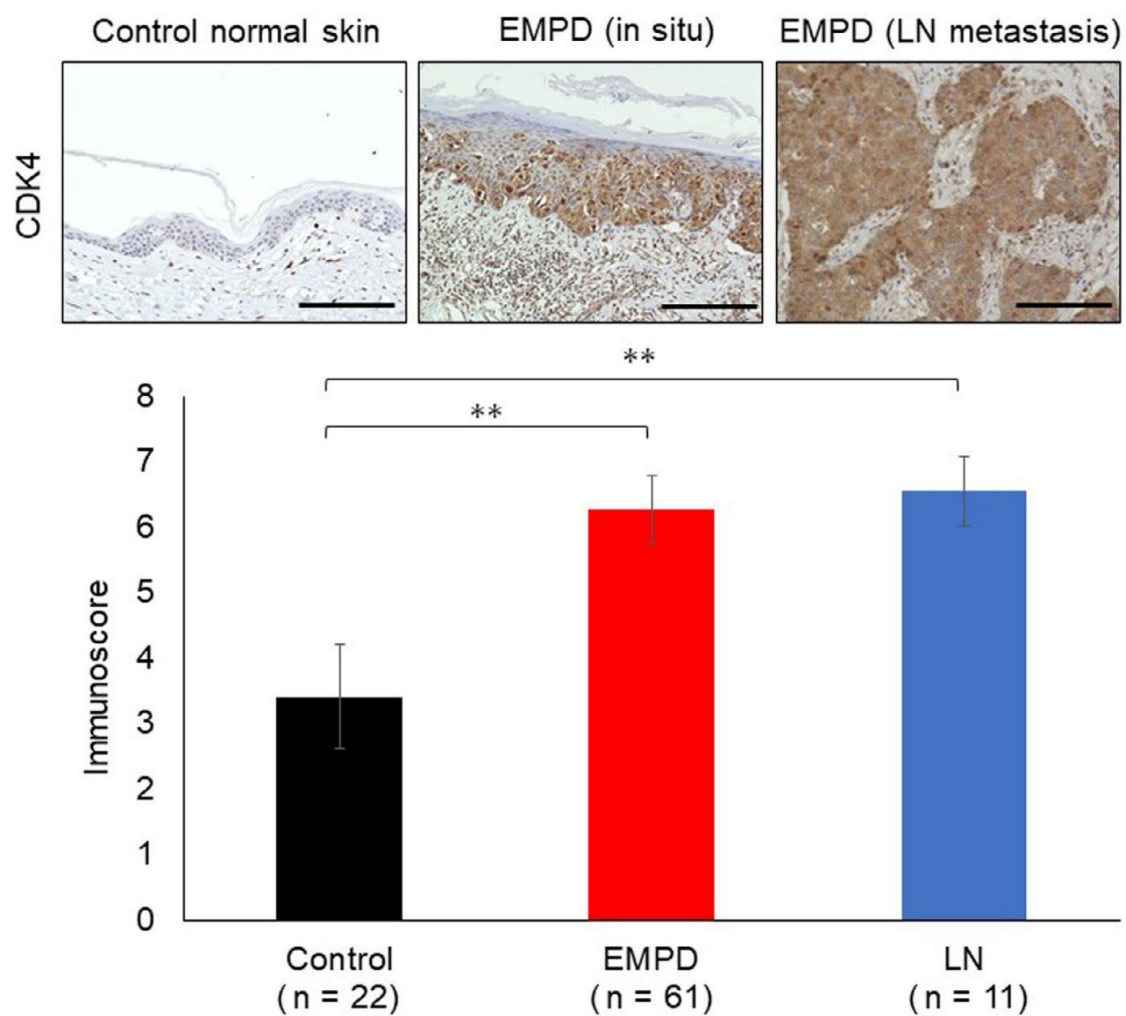


図 33 : CDK4 の染色性の比較

原発巣・リンパ節転移の EMPDP 腫瘍細胞はコントロールと比較し CDK4 高発現であった（それぞれ $P < 0.01$ ）。

次に、CDK4/6 と複合体を形成しターゲットタンパク質をリン酸化させるとされている cyclin D1 (Cersosimo RJ., 2019; Sherr CJ et al., 2016) の EMPD 腫瘍細胞における発現量を評価した。EMPD 原発巣の腫瘍細胞は、正常表皮よりも高い cyclin D1 発現レベルを示したものの、リンパ節転移腫瘍細胞と正常表皮の染色性の差に統計学的有意差は認めなかった (図 34)。

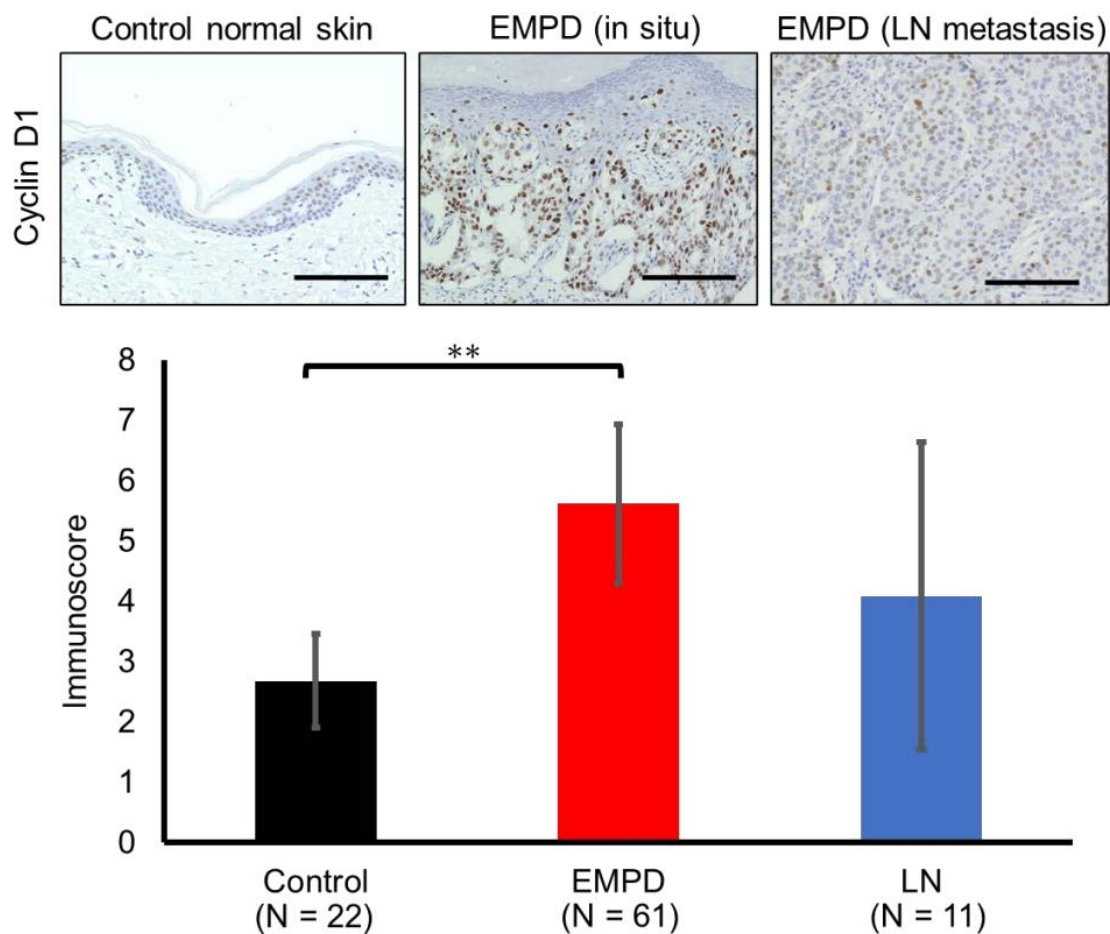


図 34 : Cyclin D1 の染色性の比較

原発巣腫瘍細胞はコントロールと比較し cyclin D1 高発現であった ($P < 0.01$)。

最後に EMPD において CDK4 及び cyclin D1 が高発現であることの臨床的意義を検討するために、免疫染色結果と臨床情報との相関を評価した。しかしながら EMPD における CDK4/ cyclin D1 発現量と臨床病期との間に相関は認められなかった。

考察

本研究では、病理組織学的・遺伝子学的に患者腫瘍の性質を引き継いだ EMPD-PDX モデルを樹立した。また、HER2 及び CDK4/6 標的治療薬と細胞障害性抗がん剤の有効性を示した。

EMPD の一部の症例では、免疫染色や in situ hybridization で HER2 蛋白の過剰発現が報告されている (Richter CE et al, 2010; Tanaka R et al., 2013; Tanaka R et al., 2016)。また、EMPD の体細胞変異解析では、いくつかの *ERBB2* 変異が検出されている (Zhang G et al, 2019; Kiniwa Y et al., 2019)。さらに、HER2 蛋白の過剰発現と *ERBB2* 遺伝子の増幅は、疾患の進行と正の相関があることが報告されている (Tanaka R et al., 2013)。実際に、転移性 EMPD に対してラパチニブやトラスツズマブなどの HER2 標的治療の有効性がいくつかの症例報告で示されている (Karam A et al., 2008; Takahagi S et al., 2009; Vornicova O et al., 2014)。これらの事実より、HER2 陽性/変異型 EMPD では、HER2 シグナル経路が発がんに関与していると考えられている。本研究では、EMPD-PDX-H1 が HER2 蛋白の明らかな過剰発現を伴わない病原性変異である *ERBB2* S310F を有していることが確認された。*ERBB2* S310F は、*ERBB2*/HER2 の細胞外ドメインに存在する遺伝子変異であり (図 35, Bose R et al., 2013)、そのドメインは、乳癌・肺癌・膀胱癌、大腸癌など様々な癌で最も多く変異を有すると報告されている (Tate JG et al., 2019)。また EMPD においても 12.5-26.5% の腫瘍で *ERBB2* S310F 変異があると報告されている (Kusaba Y et al., 2022)。

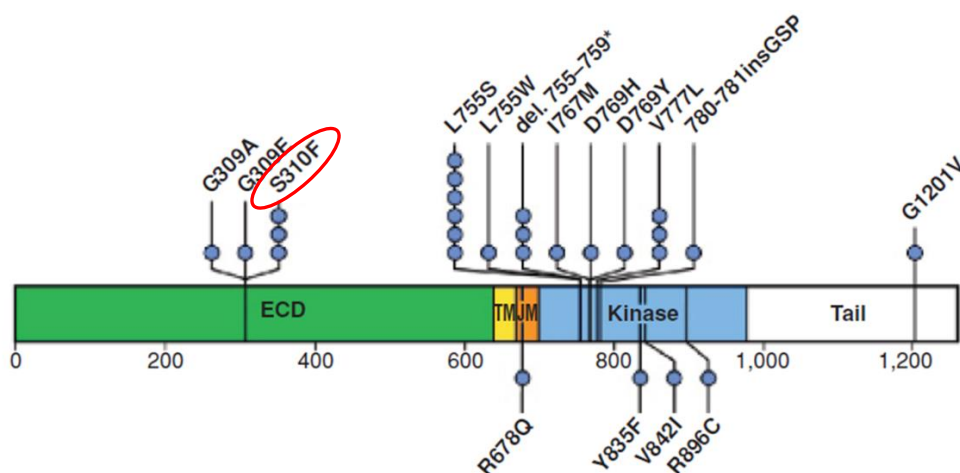


図 35 : *ERBB2* S310F の局在

ERBB2 S310F は *ERBB2* の細胞外ドメインに存在する (Bose R et al, Cancer Discov, 2013 より引用・改変)。

Greulich らは、*ERBB2* S310F 変異が、C 末端のリン酸化の上昇、あるいは分子間ジスルフィド結合形成による共有結合の二量体化を特徴とする、二つの異なるメカニズムを介して *ERBB2*/HER2 の活性化につながることを報告している (Greulich H et al., 2012). *ERBB2* S310F は、*ERBB2* 非増幅乳癌でも報告されており、必ずしも *ERBB2* 増幅を伴うとは限らない (Ma CX et al., 2017). また、*ERBB2* S310F 変異を有する肺がん、大腸がんなどでは HER2 標的治療が有効である (Greulich H et al., 2012; Kavuri SM et al., 2015; Hyman DM et al., 2018). EMPD に関しては、Vornicova らが *ERBB2* S310F 変異を有する EMPD の症例を初めて報告し、トラスツズマブとカペシタビン併用療法が複数の転移病巣に対して著効を示した (Vornicova O et al., 2014). この症例報告は、*ERBB2* S310F を保有する EMPD-PDX-H1 が HER2 標的治療薬に感受性があることを示した我々の実験結果と一致するものである。

本研究では細胞障害性化学療法による抗腫瘍効果も実証されている。近年の研究で EMPD と乳房パジェット病 (乳癌の 1 亜型と考えられている) が共通の遺伝子変異を持つことが示唆されていることから (Zhang G et al., 2019; Takeichi T et al., 2020), 乳癌に有効である微小管重合阻害剤であるエリブリンの投与を試みた (図 36, Twelves C et al., 2014; Towle MJ et al., 2012). エリブリン投与により、EMPD-PDX-H1 腫瘍の全てに高い効果が認められた。

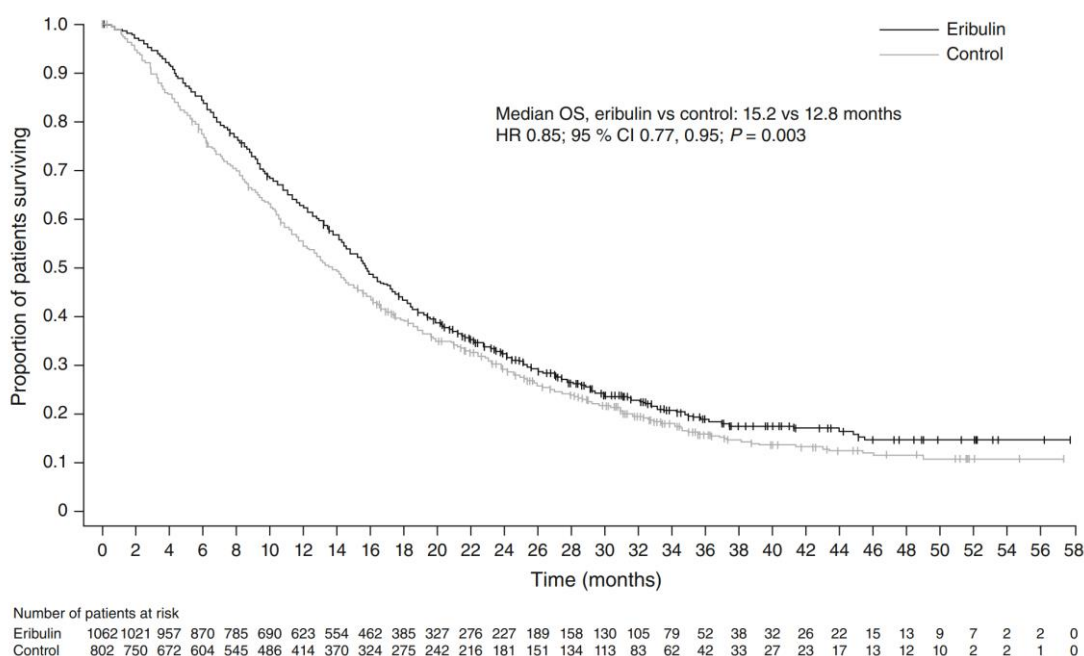


図 36 : 乳癌におけるエリブリンの治療効果

二次以降の化学療法の治療効果。エリブリン群は対照群と比較し良好な全生存期間が得られた (Twelves C et al. Breast Cancer Res Treat, 2014 より引用)。

したがって、EMPDPDX-H1 に対してエリブリンが有効であるという臨床報告はないものの、本研究結果からはエリブリンが EMPD の治療選択肢となる可能性が示唆された。

また、近年、HER2 陽性乳癌の臨床研究において CDK4/6 阻害剤とトラスツズマブの併用療法の有効性が報告された (Patnaik A et al., 2016; Goel S et al., 2019)。本研究では臨床検体を用いた免疫染色により EMPD における CDK4 とサイクリン D1 の発現量が高いことを確認し、CDK4/6 阻害薬による治療効果があることを示した。既報告より EMPD 症例の一部は *ERBB2* の病原性遺伝子変異や HER2 タンパク質の過剰発現を伴うことが明らかになっており、CDK4/6 標的療法は、HER2 活性化を伴う進行性 EMPD に対する単剤療法として有望であるだけでなく、抗 HER2 抗体との併用療法としても有望である可能性が示唆された。

結論

本研究にて得られた新知見は下記である。

- ・病理組織学的・遺伝子学的に患者の腫瘍を引き継いだ新しい EMPD-PDX モデルを作製した。
- ・治療実験では、抗 HER2 療法（ラパチニブ，トラスツズマブ），抗 CDK4/6 療法（アベマシクリブ・パルボシクリブ）および細胞障害性抗がん剤（ドセタキセル，エリブリン）による *in vivo* での腫瘍増殖抑制が確認された。

上記より EMPD-PDX-H1 は，EMPD の効果的な治療法の開発に役立つと考えられる。

本研究の限界は，進行期 EMPD の症例数が少なく，1 人の患者からしか EMPD-PDX を樹立できなかったことである。今後は，他の患者からも同様の方法で PDX モデルを樹立できるかどうかを確認し，他の PDX モデルでの治療実験を行い，その結果をもとに臨床試験を行うことで実臨床での治療選択肢を増やすことが期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えてくださり，多くのご指導とご助言を賜りました，北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室 清水宏名誉教授・氏家英之教授に深甚なる謝意を表します．また，直接ご指導いただきました北海道大学病院皮膚科 柳輝希講師に心より深謝いたします．そして，本研究にご協力くださいましたすべての患者様に深く御礼申し上げます．また，最後になりましたが，北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室の教室員，技術員，秘書各位に心より御礼申し上げます．

利益相反

本研究に関して，開示すべき利益相反状態はない．

引用文献

- Bose, R., Kavuri, S. M., Searleman, A. C., Shen, W., Shen, D., Koboldt, D. C., Monsey, J., Goel, N., Aronson, A. B., Li, S., et al. (2013). Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer. Discov.* *3*, 224–237.
- Cersosimo, R. J. (2019). Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors for the management of advanced or metastatic breast cancer in women. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* *76*, 1183–1202.
- Cook Sangar, M. L., Genovesi, L. A., Nakamoto, M. W., Davis, M. J., Knobluagh, S. E., Ji, P., Millar, A., Wainwright, B. J., and Olson, J. M. (2017). Inhibition of CDK4/6 by palbociclib significantly extends survival in medulloblastoma patient-derived xenograft mouse models. *Clin. Cancer. Res.* *23*, 5802–5813.
- Daniel, V. C., Marchionni, L., Hierman, J. S., Rhodes, J. T., Devereux, W. L., Rudin, C. M., Yung, R., Parmigiani, G., Dorsch, M., Peacock, C. D., et al. (2009). A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer. Res.* *69*, 3364–3373.
- Dowless, M., Lowery, C. D., Shackelford, T., Renschler, M., Stephens, J., Flack, R., Blosser, W., Gupta, S., Stewart, J., Webster, Y., et al. (2018). Abemaciclib is active in preclinical models of ewing sarcoma via multipronged regulation of cell cycle, DNA methylation, and interferon pathway signaling. *Clin. Cancer. Res.* *24*, 6028–6039.
- Frese, K. K., and Tuveson, D. A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nat. Rev. Cancer.* *7*, 645–658.
- Fukuda, K., and Funakoshi, T. (2018). Corrigendum: Metastatic Extramammary Paget's Disease: Pathogenesis and Novel Therapeutic Approach. *Front. Oncol.* *8*, 47.

Goel, S., Pernas, S., Tan-Wasielewski, Z., Barry, W. T., Bardia, A., Rees, R., Andrews, C., Tahara, R. K., Trippa, L., Mayer, E. L., et al. (2019). Ribociclib plus trastuzumab in advanced HER2-positive breast cancer: results of a phase 1b/2 trial. *Clin. Breast. Cancer.* *19*, 399–404.

Greulich, H., Kaplan, B., Mertins, P., Chen, T. H., Tanaka, K. E., Yun, C. H., Zhang, X., Lee, S. H., Cho, J., Ambrogio, L., et al. (2012). Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *109*, 14476–14481.

Hatta, N., Yamada, M., Hirano, T., Fujimoto, A., and Morita, R. (2008). Extramammary Paget's disease: treatment, prognostic factors and outcome in 76 patients. *Br. J. Dermatol.* *158*, 313–318.

Hirakawa, S., Detmar, M., Kerjaschki, D., Nagamatsu, S., Matsuo, K., Tanemura, A., Kamata, N., Higashikawa, K., Okazaki, H., Kameda, K., et al. (2009). Nodal lymphangiogenesis and metastasis: role of tumor-induced lymphatic vessel activation in extramammary Paget's disease. *Am. J. Pathol.* *175*, 2235–2248.

Hendrikx, J. J., Lagas, J. S., Song, J. Y., Rosing, H., Schellens, J. H., Beijnen, J. H., Rottenberg, S., and Schinkel, A. H. (2016). Ritonavir inhibits intratumoral docetaxel metabolism and enhances docetaxel antitumor activity in an immunocompetent mouse breast cancer model. *Int. J. Cancer.* *138*, 758–769.

Herrel, L. A., Weiss, A. D., Goodman, M., Johnson, T. V., Osunkoya, A. O., Delman, K. A., and Master, V. A. (2015). Extramammary Paget's disease in males: survival outcomes in 495 patients. *Ann. Surg. Oncol.* *22*, 1625–1630.

Hyman, D. M., Piha-Paul, S. A., Won, H., Rodon, J., Saura, C., Shapiro, G. I., Juric, D., Quinn, D. I., Moreno, V., Doger, B., et al. (2018). HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature.* *554*, 189–194.

Ivanics, T., Bergquist, J. R., Liu, G., Kim, M. P., Kang, Y., Katz, M. H., Perez, M. V. R., Thomas, R. M., Fleming, J. B., and Truty, M. J. (2018). Patient-derived xenograft cryopreservation and reanimation outcomes are dependent on cryoprotectant type. *Lab. Invest.* 98, 947–956.

Kanitakis, J. (2007). Mammary and extramammary Paget's disease. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 21, 581–590.

Karam, A., Berek, J. S., Stenson, A., Rao, J., and Dorigo, O. (2008). HER-2/neu targeting for recurrent vulvar Paget's disease: a case report and literature review. *Gynecol. Oncol.* 111, 568–571.

Kato, J., Hida, T., Yamashita, T., Kamiya, S., Horimoto, K., Sato, S., Takahashi, H., Sawada, M., Yamada, M., and Uhara, H. (2018). Successful TS-1 monotherapy as the second-line treatment for advanced extramammary Paget's disease: A report of two cases. *Journal. Dermatol.* 45, 80–82.

Kato, M., Yoshino, K., Maeda, T., Nagai, K., Oaku, S., Hiura, A., and Fujisawa, Y. (2019). Single-agent taxane is useful in palliative chemotherapy for advanced extramammary Paget's disease; A Case Series. *Br. J. Dermatol.* 181, 831–832.

Kavuri, S. M., Jain, N., Galimi, F., Cottino, F., Leto, S. M., Migliardi, G., Searleman, A. C., Shen, W., Monsey, J., Trusolino, L., et al. (2015). HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment. *Cancer. Discov.* 5, 832–841.

Kiniwa, Y., Yasuda, J., Saito, S., Saito, R., Motoike, I. N., Danjoh, I., Kinoshita, K., Fuse, N., Yamamoto, M., and Okuyama, R. (2019). Identification of genetic alterations in extramammary Paget disease using whole exome analysis. *J. Dermatol. Sci.* 94, 229–235.

Kitamura, S., Yanagi, T., Maeda, T., and Shimizu, H. (2020). Drp1 expression levels correlate with clinical stage in extramammary Paget's disease. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 34, e510–e513.

Kitamura, S., Yanagi, T., Maeda, T., Ujiie, H. (2022) Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors suppress tumor growth in extramammary Paget's disease. *Cancer Sci.* *113*: 802–807.

Kusaba, Y., Kajihara, I., Myangat, T. M., Tanaka, K., Kanemaru, H., Sawamura, S., Makino, K., Aoi, J., Masuguchi, S., and Fukushima, S. (2022). Clinical significance of ERBB2 S310F mutation in extramammary Paget's disease. *J. Dermatol.* *49*, e305-e306.

Ma, C. X., Bose, R., Gao, F., Freedman, R. A., Telli, M. L., Kimmick, G., Winer, E., Naughton, M., Goetz, M. P., Russell, C., et al. (2017). Neratinib efficacy and circulating tumor DNA detection of HER2 mutations in HER2 nonamplified metastatic breast cancer. *Clin. Cancer. Res.* *23*, 5687–5695.

Maeda, T., Kitamura, S., Nishihara, H., Yanagi, T. (2020) Extramammary Paget's disease patient-derived xenografts harboring ERBB2 S310F mutation show sensitivity to HER2-targeted therapies. *Oncogene.* *39*: 5867–5875.

Nonagase, Y., Yonesaka, K., Kawakami, H., Watanabe, S., Haratani, K., Takahama, T., Takegawa, N., Ueda, H., Tanizaki, J., Hayashi, H., et al. (2016). Heregulin-expressing HER2-positive breast and gastric cancer exhibited heterogeneous susceptibility to the anti-HER2 agents lapatinib, trastuzumab and T-DM1. *Oncotarget.* *7*, 84860–84871.

Ohara, K., Fujisawa, Y., Yoshino, K., Kiyohara, Y., Kadono, T., Murata, Y., Uhara, H., Hatta, N., Uchi, H., Matsushita, S., et al. (2016). A proposal for a TNM staging system for extramammary Paget disease: retrospective analysis of 301 patients with invasive primary tumors. *J. Dermatol. Sci.* *83*, 234–239.

Paget, S.J. (1874). On disease of the mammary areola preceding cancer of the mammary gland. *St. Bartholomew's. Hosp. Rep.* *10*, 87–89.

Patnaik, A., Rosen, L. S., Tolaney, S. M., Tolcher, A. W., Goldman, J. W., Gandhi, L., Papadopoulos, K. P., Beeram, M., Rasco, D. W., Hilton, J. F., et al. (2016). Efficacy and safety of abemaciclib, an inhibitor of CDK4 and CDK6, for patients with breast cancer, non-small cell lung cancer, and other solid

tumors. *Cancer. Discov.* *6*, 740–753.

Richter, C. E., Hui, P., Buza, N., Silasi, D. A., Azodi, M., Santin, A. D., Schwartz, P. E., and Rutherford, T. J. (2010). HER-2/NEU overexpression in vulvar Paget disease: the Yale experience. *J. Clin. Pathol.* *63*, 544–547.

Sherr, C. J., Beach, D., and Shapiro, G. I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer. Discovery.* *6*, 353–367.

Takahagi, S., Noda, H., Kamegashira, A., Madokoro, N., Hori, I., Shindo, H., Mihara, S., and Hide, M. (2009). Metastatic extramammary Paget's disease treated with paclitaxel and trastuzumab combination chemotherapy. *J. Dermatol.* *36*, 457–461.

Takeichi, T., Okuno, Y., Matsumoto, T., Tsunoda, N., Suzuki, K., Tanahashi, K., Kono, M., Kikumori, T., Muro, Y., and Akiyama, M. (2020). Frequent FOXA1-Activating Mutations in Extramammary Paget's Disease. *Cancers. (Basel).* *12*, 820.

Tanaka, R., Sasajima, Y., Tsuda, H., Namikawa, K., Tsutsumida, A., Otsuka, F., and Yamazaki, N. (2013). Human epidermal growth factor receptor 2 proteinoverexpression and gene amplification in extramammary Paget disease. *Br. J. Dermatol.* *168*, 1259–1266.

Tanaka, R., Sasajima, Y., Tsuda, H., Namikawa, K., Takahashi, A., Tsutsumida, A., Fujisawa, Y., Fujimoto, M., and Yamazaki, N. (2016). Concordance of the HER2 protein and gene status between primary and corresponding lymph node metastatic sites of extramammary Paget disease. *Clin. Exp. Metastasis.* *33*, 687–697.

Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C. G., Creatore, C., Dawson, E., et al. (2019). COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic. Acids. Res.* *47*, D941–D947.

Towle, M. J., Nomoto, K., Asano, M., Kishi, Y., Yu, M. J., Littlefield, B. A.

(2012). Broad spectrum preclinical antitumor activity of eribulin (Halaven (R)): optimal effectiveness under intermittent dosing conditions. *Anticancer. Res.* *32*, 1611–1619.

Twelves, C., Cortes, J., Vahdat, L., Olivo, M., He, Y., Kaufman, P. A., and Awada, A. (2014). Efficacy of eribulin in women with metastatic breast cancer: a pooled analysis of two phase 3 studies. *Breast. Cancer. Res. Treat.* *148*, 553–561.

Vornicova, O., Hershkovitz, D., Yablonski-Peretz, T., Ben-Itzhak, O., Keidar, Z., and Bar-Sela, G. (2014). Treatment of metastatic extramammary Paget's disease associated with adnexal adenocarcinoma, with anti-HER2 drugs based on genomic alteration ERBB2 S310F. *Oncologist.* *19*, 1006–1007.

Wainberg, Z. A., Anghel, A., Desai, A. J., Ayala, R., Luo, T., Safran, B., Fejzo, M. S., Hecht, J. R., Slamon, D. J., and Finn, R. S. (2010). Lapatinib, a dual EGFR and HER2 kinase inhibitor, selectively inhibits HER2-amplified human gastric cancer cells and is synergistic with trastuzumab in vitro and in vivo. *Clin. Cancer. Res.* *16*, 1509–1519.

Wolff, A. C., Hammond, M., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mangu, P. B., Bartlett, J., Bilous, M., Ellis, I. O., Fitzgibbons, P., Hanna, W., et al. (2018). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J. Clin. Oncol.* *36*, 2105–2122.

Yanagi T, Krajewska M, Matsuzawa S, and Reed JC. (2014). PCTAIRE1 phosphorylates p27 and regulates mitosis in cancer cells. *Cancer. Res.* *74*, 5795–5807.

Yanagi, T., Watanabe, M., Hata, H., Kitamura, S., Imafuku, K., Yanagi, H., Homma, A., Wang, L., Takahashi, H., Shimizu, H., et al. (2018). Loss of TRIM29 Alters Keratin Distribution to Promote Cell Invasion in Squamous Cell Carcinoma. *Cancer. Res.* *78*, 6795–6806.

Yoshino, K., Fujisawa, Y., Kiyohara, Y., Kadono, T., Murata, Y., Uhara, H.,

Hatta, N., Uchi, H., Matsushita, S., Takenouchi, T., et al. (2016). Usefulness of docetaxel as first-line chemotherapy for metastatic extramammary Paget's disease. *J. Dermatol.* *43*, 633–637.

Zhang, G., Zhou, S., Zhong, W., Hong, L., Wang, Y., Lu, S., Pan, J., Huang, Y., Su, M., Crawford, R., et al. (2019). Whole-Exome Sequencing Reveals Frequent Mutations in Chromatin Remodeling Genes in Mammary and Extramammary Paget's Diseases. *J. Invest. Dermatol.* *139*, 789–795.

Zhang, H., Cohen, A. L., Krishnakumar, S., Wapnir, I. L., Veeriah, S., Deng, G., Coram, M. A., Piskun, C. M., Longacre, T. A., Herrler, M., et al. (2014). Patient-derived xenografts of triple-negative breast cancer reproduce molecular features of patient tumors and respond to mTOR inhibition. *Breast. Cancer. Res.* *16*, R36.

Zhang, X. C., Zhang, J., Li, M., Huang, X. S., Yang, X. N., Zhong, W. Z., Xie, L., Zhang, L., Zhou, M., Gavine, P., et al. (2013). Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenograft models with genetic aberrations within EGFR, KRAS and FGFR1: useful tools for preclinical studies of targeted therapies. *J. Transl. Med.* *11*, 168.