

antibody method)法による免疫染色を行うが、一次抗体の反応は 10 分間の内因性ペルオキシダーゼブロックおよび 20 分間のプロテインブロック後に、抗 HER2/neu マウスモノクローナル抗体 (CB11、希釈済み抗体、協和メディックス社)を常温、30 分間反応させた。

また同じ検体を用いて HER2 に対するポリクローナル抗体である HerceptTest(ダコ・サイトメーション)のキットを用いた免疫染色も行った。

免疫染色の評価は HerceptTest のスコアリングに準じて、陽性細胞率と陽性染色強度により 0(細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞<10%、ただし細胞質に局限する陽性染色は判定対象外)、1+(ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色がある癌細胞 \geq 10%、癌細胞は細胞膜のみが部分的に染色されている)、2+(弱-中等度の完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞 \geq 10%)、3+(強い完全な癌細胞の陽性染色がある癌細胞 \geq 10%)の 4 段階に評価した。

② FISH 法とその判定

FISH 法はパスビジョン HER2 DNA プローブキット(米国 Vysis 社)を用いた。検査法は同キットの添付文書に従うが、簡単な手順を以下に述べる。免疫染色を行ったのと同じブロックより作成したスライドを 65°Cで一晩ベーキングし、脱パラフィンを行った。0.2N 塩酸 20 分間浸漬後、80°Cの前処理溶液に 30 分間浸漬後、酵素処理として 37°Cに加温したプロテアーゼ溶液に 60 分間浸漬した。10%中性緩衝ホルマリンに常温 10 分間再固定し、風乾のうえ、スライドを 72°Cの変性溶液に 5 分間浸漬し、DNA を変性した。70%、85%、100%エタノールにそれぞれ 1 分間浸漬し、洗浄・

脱水。ハイブリダイゼーションとして DNA プローブを 45°C上で 10 μ l 添加し、カバーガラスをのせシールし、37°Cの湿潤箱で二晩インキュベーションした。72°Cのポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液で 2 分間洗浄する。対比染色として DAPI 10 μ l 添加し、カバーガラスをのせ、蛍光顕微鏡でシグナルを観察し、癌細胞 20 個中の HER2/neu(オレンジ)と CEP17(グリーン)のシグナル数を数え、HER-2/CEP17 比が 2.0 以上を HER2 遺伝子増幅あり(陽性)と判定した。

C. 研究結果

平成 16 年 10 月より平成 17 年 6 月までに国立がんセンター中央病院にて切除された乳癌症例全 184 例中 ductal carcinoma in situ, predominantly intraductal carcinoma を除く浸潤癌 155 例を対象とした。組織型の内訳は、浸潤性乳管癌 138 例、浸潤性小葉がん 6 例、その他特殊型 11 例であった。IHC にて 0, 1+, 2+, 3+と判定された症例は 83(53%)、46(30%)、9(6%)、17 例(11%)であった。FISH で陽性と判定された症例は 25 例(16%)であった。

FISH を"golden standard"としたときの、CB11 を用いた IHC(2+/3+)の感度は 80%、特異度は 95%、IHC(3+)の特異度は 99%であった。陽性的中率は IHC(2+/3+)で 77%、IHC(3+)で 94%であった。

FISH を"golden standard"としたとき、CB11 および Herceptest を用いた IHC による HER2 判定のスコア別一致率は、(0), (1+), (2+), (3+)でそれぞれ 97-99%, 21-91%, 33-44%, 93-100%であった。

FISH-negative かつ IHC-positive となった症例は 1 例あり、polysomy が原因であった。一方、

FISH-positive かつ CB11 または HercepTest で IHC-negative と判定された症例は全 7 例あり、固定不良による IHC での判定不能例、乳管内成分が目立つ症例、IHC による染色性が不均一な（強く染色される領域が全体の 10%未満と判定された）症例が含まれた。

D. 考察

IHC を用いた HER2 スクリーニングの特異度は高いが、IHC で(1+)と判定と FISH の判定との不一致を 9-19%に認めた。不一致の原因としては生物学的要因、抗体、観察者による要因、標本の固定条件などの技術的な要因のほかに、IHC, FISH での評価方法の違いが影響することが考えられた。判定の不一致例の生物学的、治療的意義は不明であり、予後の追跡が必要である。

E. 結論

HER2 陽性乳癌患者におけるトラスツズマブ療法のスクリーニング法として、FISH を” golden standard” としたときの IHC の妥当性を検討し、IHC, FISH の判定の不一致例について考察した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Tateishi U, Hasegawa T, Seki K, Terauchi T, Moriyama N, Arai Y.

Disease activity and (18)F-FDG uptake in organising pneumonia: semi-quantitative evaluation using computed tomography and positron emission tomography.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006 Mar 28; [Epub ahead of print]

2: Tateishi U, Yamaguchi U, Seki K, Terauchi T, Arai Y, Hasegawa T.

Glut-1 expression and enhanced glucose

metabolism are associated with tumour grade in bone and soft tissue sarcomas: a prospective evaluation by [(18)F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006 Feb 28; [Epub ahead of print]

3: Tateishi U, Miyake M, Maeda T, Arai Y, Seki K, Hasegawa T.

CT and MRI findings in KIT-weak or KIT-negative atypical gastrointestinal stromal tumors.

Eur Radiol. 2006 Jan 6;:1-7 [Epub ahead of print]

1: Miyake M, Tateishi U, Maeda T, Arai Y, Seki K, Hasegawa T, Sugimura K.

Sclerosing perineurioma: tumor of the hand with a short T2.

Skeletal Radiol. 2005 Oct 19;:1-4 [Epub ahead of print]

2. 学会発表

清水千佳子、関邦彦、村田有也、古田耕、木下貴之、明石定子、福富隆志、河野勤、安藤正志、勝俣範之、藤原康弘。乳癌における HER2 スクリーニング：免疫組織染色法(IHC)と Fluorescent in situ hybridization(FISH)法の比較。日本癌治療学会総会。2005. 10/, 名古屋。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

血漿内糖鎖関連酵素の酵素活性測定系の構築

分担研究者 西尾和人 国立がんセンター研究所薬効試験部 室長

研究要旨 抗体依存性細胞障害 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) は抗 HER2 モノクローナル抗体トラスツズマブの抗腫瘍効果発現機序の一つと考えられている。ADCC 活性を規定する抗体側の構造因子としてその糖鎖、特にフコースの修飾が挙げられるが、トラスツズマブが生体内で受けるフコース修飾につき検討することでトラスツズマブの抗腫瘍効果発現予測ならびに機能解明に寄与すると期待され HER2 陽性乳癌患者において測定を計画した。本年度はその準備段階として糖鎖関連酵素の血漿内酵素活性測定系の構築を行った。

A. 研究目的

本年度における研究実施目標は抗体糖鎖修飾に関与する血漿内酵素の酵素活性測定系の構築である。

B. 研究方法

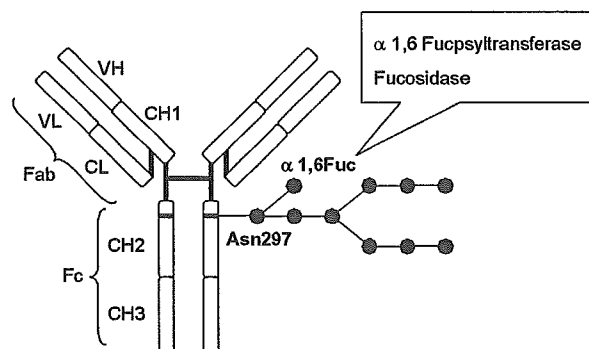
In vitro での糖鎖関連酵素の酵素活性測定系の確立のため、

(1)フコシダーゼ及び α 1,6 フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)の細胞内 mRNA 発現量を PCR により検討した。

(2)糖鎖中のフコシド結合を加水分解しフコースを遊離する酵素であるフコシダーゼ(FUCA)活性測定系を確立した。本酵素の活性は合成基質である p-nitrophenyl- α -L-fucoside (無色)を用いて、酵ジヌクレオチド(NADH)から酸化型である NAD⁺を生成し NADH のもつ 340 nm の吸光度の減少に

素反応の結果生ずる生成物、p-nitrophenol (黄色、吸光度 400 nm)を分光光度計で測定することにより測定した。活性の指標として、市販の α -L-フコシダーゼ(生化学工業)の活性を指標とした。

(3)糖残基にフコースを転移する糖転移酵素であるフコシルトランスフェラーゼ(FUT)活性測定系を確立した。本酵素の活性は、グアノシン三リン酸(GDP)-フコースを基質としフコシルトランスフェラーゼにより遊離した GDP を測定することにより測定した。遊離した GDP は、ピルビン酸キナーゼ(Pyruvate kinase)により GDP とホスホエノールピルビン酸 (PEP)からピルビン酸(Pyruvate)とグアノシン三リン酸(GTP)を生成させ、次いで乳酸脱水素酵素(LDH)の触媒反応によりピルビン酸とニコチンアミドアデニンよりフコシルトランスフェラーゼ活性を測定した。



C. 研究結果

(1)乳がん株、肺がん株、胃がん株を含む培養がん細胞株を用いて、PCRによる mRNA の検討を行った結果、すべての細胞においてフコシダーゼおよびフコシルトランスフェラーゼの発現が確認された。また各細胞間での mRNA 発現量を比較すると、肺がん株に比して乳がん株、胃がん株では比較的高い発現が認められた。

(2)(1)の結果から、胃がん株、乳がん株の細胞抽出液中のフコシダーゼ活性を測定し、その活性強度を比較した。いずれの細胞においても、フコシダーゼ活性は細胞抽出液濃度に比例した酵素活性が検出された。その酵素活性強度は、標準酵素として用いた α -L-フコシダーゼに比して弱いものであった。さらに、本測定系を用いて健常人血漿中のフコシダーゼ活性を測定した。本測定系では、酵素反応の結果生ずる生成物である p-nitrophenol の 400 nm (黄色)の吸光度を測定しているが、血漿のビルビリリン由来の黄色と重なり、バックグラウンドが増加したものの、血漿中のフコシダーゼ活性は検出可能であり、添加した血漿量に比例した酵素活性強度が検出された。以上の結果から、本測定系を用いて培養がん細胞中およびヒト血漿中のフコシダーゼ活性が検出可能であった。

(3)(1)の結果から、FUT8 の最も高い発現量を示し

た乳がん株 MCF-7 細胞の細胞抽出液を用いてフコシルトランスフェラーゼ活性を測定した。活性の指標となる NADH の減少は、MCF-7 細胞抽出液の濃度および反応時間依存的に検出された。また、健常人血漿中を用いた検討においても同様の結果が得られた。上の結果から、本測定系を用いて培養がん細胞中およびヒト血漿中のフコシルトランスフェラーゼ活性が検出可能であった。

図1 mRNA発現量

(A) Fucosidase

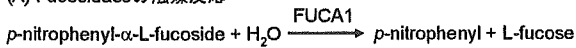


(B) α -(1,6) fucosyltransferase



図2 Fucosidase activity

(A) Fucosidaseの触媒反応



(B) Fucosidaseの酵素活性(α -L-Fucosidase精製酵素)

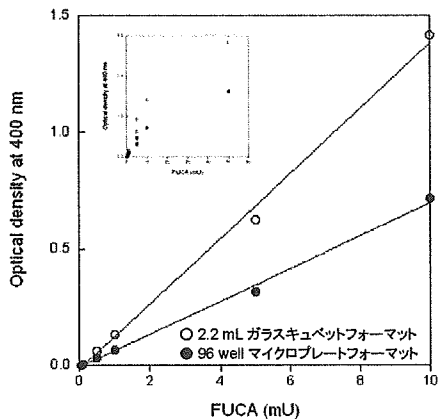
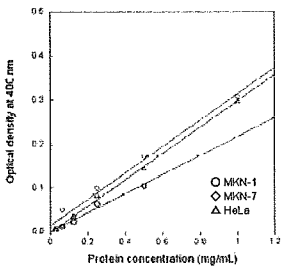


図3 Fucosidase activity

(A) 細胞抽出液中のFucosidase活性 (96 wellフォーマット)



(B) 健康人血漿中のFucosidase活性 (96 wellフォーマット)

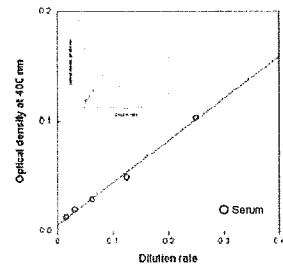
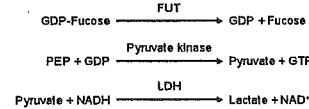
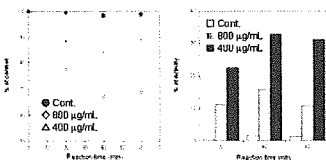


図4 Fucosyltransferase activity

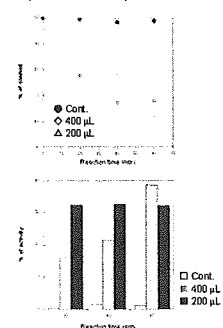
(A) Fucosyltransferaseの触媒反応および活性検出経路



(B) MCF-7細胞抽出液中のFucosyltransferase活性 (96 wellフォーマット)



(C) 健康人血漿中のFucosyltransferase活性 (96 wellフォーマット)



D. 考察

フコシダーゼおよびフコシルトランスフェラーゼ発現量の比較として、mRNAに加えて、蛋白レベルでの比較検討が必要であると考えられた。こ

れまでに、がん細胞間でのフコシダーゼ活性を定量的に比較検討した報告がないため、検出された酵素活性量の大小を判断することは困難ではあるが、検出されたフコシダーゼ活性が低いことの原因として、以下のような原因が考えられる。①フコシダーゼには複数のアイソタイプが存在し、合成基質であるp-nitrophenyl- α -L-fucosideを基質として認識できない酵素が存在する可能性がある。②フコシダーゼは酸性条件下で活性を発揮する酵素であることから、酵素反応はpH 4.5の緩衝液中で行っている。通常、多くのタンパク質はpH 4.5の酸性条件下では変性状態に傾き、タンパク質濃度が高くなるにつれてアグリゲーションを起こしやすい。そのため、本反応系では、添加する細胞抽出液もしくは血漿の濃度を低く抑える必要があり、酵素活性の検出量の低下につながっている。以上の要因を踏まえたうえで、細胞抽出液画分を粗精製による酵素活性の検出量の増加等の測定系の最適化が必要ではあるが、今回検討を行ったフコシダーゼおよびフコシルトランスフェラーゼ酵素活性測定系は、簡便でスループットが高く有用であると考えられた。

E. 結論

培養がん細胞株の細胞抽出液を用いてフコシダーゼおよびフコシルトランスフェラーゼ活性の酵素活性系を確立し、ヒト血漿中においても本測定系による検出が可能であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, and Nishio K. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients.

- Cancer Sci. (in press)
2. Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Kinoshita T, Kohno T, Katsumata N, Kang YK, Nishio K, and Fujiwara Y. Gene expression profiling of ATP binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* (in press)
 3. Shimoyama T, Hamano T, Natsume T, Koizumi F, Kiura K, Tanimoto M, and Nishio K. Reference profiling of the genomic response induced by an anti-microtubule agent TZT-1027 (Soblidotin) in vitro. *Pharmacogenomics J.* (in press)
 4. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, and Nishio K. Epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* (in press)
 5. Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Murofushi K, Sekijima M, Kaji N, Tamura T, Saijo N, and Nishio K. Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor. *FASEB J.* 20: 311-313, 2006.
 6. Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, and Saijo N. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer. *Int. Thoracic Oncol.* 1: 31-37, 2006.
 7. Arao T, Yanagihara K, Takigahira M, Takeda M, Koizumi F, Shiratori Y, and Nishio K. ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. *Int. J. Cancer* 118: 483-489, 2006.
 8. Ando K, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Hosaka T, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, and Kuroki T. Enhancement of sensitivity to tumor necrosis factor α in non-small cell lung cancer cells with acquired resistance to gefitinib. *Clin. Cancer Res.* 11: 8872-8879, 2005.
 9. Nishio K, Arao T, Shimoyama T, Fujiwara Y, Tamura T, and Saijo N. Translational studies for target-based drugs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 56: s90-s93, 2005.
 10. Kimura H, Kasahara K, Sekijima M, Tamura T, and Nishio K. Plasma MIP-1 β levels and skin toxicity in Japanese non-small cell lung cancer patients treated with the EGFR-targeted tyrosine kinase inhibitor, gefitinib. *Lung Cancer* 50: 393-399, 2005.
 11. Korfee S, Eberhardt W, Fujiwara Y, and Nishio K. The role of DNA-microarray in translational cancer research. *Curr. Pharmacogenomics* 3: 201-216, 2005.
 12. Shimura M, Saito A, Matsuyama S, Sakuma T, Terui Y, Ueno K, Yumoto H, Yamauchi K, Yamamura K, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Tamasaku K, Nishio K, Nishino Y, Endo K, Hatake K, Mori Y, Ishizaka Y, and Ishikawa T. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum(II) treatment. *Cancer Res.* 65: 4998-5002, 2005.
 13. Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, and Hirohashi S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer Sci.* 96: 323-332, 2005.
 14. Nishio M, Ohyanagi F, Horiike A, Ishikawa Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Nishio K, and Horai T. Gefitinib treatment affects androgen levels in non-small-cell lung cancer patients. *Br. J. Cancer* 92: 1877-1880, 2005.
 15. Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, Saijo N, and Nishio K. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. *Int. J. Cancer* 116: 36-44, 2005.
 16. Yamamoto N, Tamura T, Murakami H, Shimoyama T, Nokihara H, Ueda Y, Sekine I, Kunitoh H, Ohe Y, Kodama T, Shimizu M, Nishio K, Ishizuka N, and Saijo N. Randomized pharmacokinetic and pharmacodynamic study of docetaxel: dosing based on body-surface area compared with individualized dosing based on cytochrome p450 activity estimated using a urinary metabolite of exogenous cortisol. *J. Clin. Oncol.* 23: 1061-1069, 2005.
2. 学会発表
1. Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Nishio K, Hasegawa T, Ando M, Katsumata N, Kono T, and Fujiwara Y. Identification of prediction marker for drug response in gene expression analysis combined with the pharmacodynamic profile in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. The 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2005.12.8-11. San Antonio Texas.
 2. Fujiwara Y, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Nishio K, Hasegawa T, Ando M, Katsumata N, and Kono T. Identification

- pharmacogenomic markers for predicting paclitaxel-related toxicity in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. The 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2005.12.8-11. San Antonio Texas.
3. Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Fukumoto H, and Nishio K. Gene expression profile of ATP binding cassette (ABC) transporter in breast cancer patient in relation to the response to neoadjuvant chemotherapy. The 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2005.12.8-11. San Antonio Texas.
 4. Kasahara K, Kimura H, Yoshimoto A, Sone T, Shibata K, Ishiura Y, Kunitoh H, Nishio K, Tamura T, Fujimura M, and Nakao S. A phase α study of gefitinib monotherapy for chemotherapy-naïve patients with non-small cell lung cancer. American Society Clinical Oncology meeting. 2005.5.13-17. Orlando FL.
 5. Shimoyama T, Yamamoto N, Hamano T, Tamura T, and Nishio K. Gene expression analysis to identify the pharmacodynamic effects of docetaxel on the Rho signal pathway in human lung cancer patients. American Society Clinical Oncology meeting. 2005.5.13-17. Orlando FL.
 6. Ando K, Ohmori T, Hosaka T, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Ohnishi T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, Arteaga CL, and Kuroki T. Enhancement of TNF- α -sensitivity in gefitinib-acquired resistant non-small cell lung cancer cell lines. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
 7. Ohira T, Tsuboi M, Hirano T, Usuda J, Miyajima K, Suga Y, Honda H, Nakajima N, Kataba H, Ikeda N, Nishio K, Saijo N, and Kato H. Characterization of Gefitinib sensitive human lung cancer cell lines. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
 8. Hosaka T, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Ando K, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Onishi T, Horichi N, Nishio K, Fukumoto H, Saijo N, Adachi M, Nakadate T, Arteaga CL, and Kuroki T. Active mutant epidermal growth factor receptor undergoes less protein degradation due to diminished binding to c-Cbl ubiquitin ligase. Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
 9. Ishida H, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Ando K, Hosaka T, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Ohnishi T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, Arteaga CL, and Kuroki T. Long term exposure of gefitinib (IRESSA) may induce alternation of activating signaling on MAPK signaling pathway and may cause gefitinib-resistance. Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
 10. Arao T, Fukumoto H, Sakai K, Park S, Takeda M, Kimura H, Shimoyama T, Hayama N, Saijo N, and Nishio K. A small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor increases the cellular sensitivity to ZD6474. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
 11. Shimoyama T, Yamamoto N, Hamano T, Tamura T, and Nishio K. Gene expression analysis to identify the pharmacodynamic effects of docetaxel on the Rho signal pathway in human lung cancer patients. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
 12. Kimura H, Fukumoto H, Park S, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. Deletional mutant EGFR detected in circulating tumor-derived DNA from lung cancer patients treated with gefitinib. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
 13. Sone T, Kimura H, Yoshimoto A, Sekijima M, Tamura T, Nishio K, and Kasahara K. A new biomarker for skin rash in Japanese NSCLC patients treated with first line monotherapy of gefitinib. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
 14. Takeda M, Arao T, Kimura H, Shimoyama T, Hayama N, Sakai K, Park S, Fukumoto H, Fukuoka K, Kimura H, and Nishio K. Molecular determinants for transfection efficiency of siRNA lipofection. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.
 15. Nishio K. Preclinical and molecular correlative study for EGFR-specific tyrosine kinase inhibitors in Japan. The 20th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium & Meet the Expert. 2005.3.10-12. Nagoya.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)

分担研究報告書

HER2 陽性乳癌患者の臨床検体を用いた遺伝子多型、遺伝子発現ならびに蛋白質解析

分担研究者 関島 勝 (株) 三菱化学安全科学研究所鹿島研究所 先端技術研究部長

分担研究者 西尾和人 国立がんセンター研究所薬効試験部 室長

研究要旨 HER2 陽性転移性乳癌患者におけるトラスツズマブ療法の効果規定因子を同定するために、患者の末梢血単核球、血漿、乳がん組織を採取した。採取された臨床検体は(1)Affymetric 社製全遺伝子網羅型マイクロアレイを用いた末梢血単核球での遺伝子発現解析、(2)バイオビーズを用いた腫瘍部、血清中のレセプター型チロシンキナーゼとその下流シグナル伝達たんぱく質のリン酸化の網羅的解析、(3)ADCC 活性に関与する糖鎖関連酵素の血漿内酵素活性の測定に供するため、臨床検体より遺伝子および蛋白の分離、抽出および測定実施までの保管を行うとともに臨床試料の処理、管理に関する品質管理を行った。

A. 研究目的

本研究の本年度の目的は)臨床検体より遺伝子及び蛋白の分離、抽出および保管を実施し、品質管理方法に付き検討並びに最適化を図ることである。

B. 研究方法

組織検体

乳腺腫瘍針生検組織 (Core Needle Biopsy; CNB) は、採取後直ちに RNA 保存液である ISOGEN® (Nippon Gene) 内に投入し組織破碎のため 10 分間振蕩する。その後-80°C で凍結保存した。手術摘出標本は病理部において腫瘍残存部分及び正常乳腺組織部分の双方を採取し液体窒素容器内で凍結保存を行う。

b) 末梢血

トラスツズマブ治療前 14ml、トラスツズマブ投与 1、8 週間後にそれぞれ 7ml ずつ採血した。

b-1) RNA

トラスツズマブ治療前採血は 5ml を分注後 5mlPBS を加えて希釈したのち 15ml Lymphocyte Separation Medium (LSM, ICB Biochemical Inc.) 上に重層し 20 分間遠心分離し、中央の単核球層を採取し PBS で再希釈した後 10 分間遠心分離し沈殿物を ISOGEN®1.5ml に溶解し-80°C で凍結保存する。

b-2) 血漿、DNA

b-1)の過程で5ml分注した残り9mlの血液を10分間遠心分離し、血漿を1mlずつ4本に

分注し-80℃で凍結保存する。血漿の内 1ml はビーズ法による蛋白解析に用い、残り 3ml をフコシルトランスフェラーゼ酵素活性測定に用いる。遠心分離した沈殿血液 1ml を -80℃で凍結保存し DNA 抽出後 SNP 解析に用いる。

c) スケジュール管理

検体の採取、処理にあたり臨床試験事務局内に専従者を設け、スケジュール管理を行った。

C. 研究結果

研究初年度は臨床試験の承認、実施の伴い 13 例の登録が行われ全例から採血或いは針生検組織の臨床検体試料が提出され、計画された方法で処理並びに保存が行われた。大多数の登録患者が外来での検体採取を行い、登録と同日の採取も複数あったが、これまで検体処理上のトラブルは生じていない。

D. 考察

臨床検体から確実に DNA、RNA、蛋白の分離抽出、保存を行うことは精度の高い解析に不可欠なプロセスであるが、検体採取後個人情報の保護に留意しつつスムーズな搬送が必要であり、その実施には連携のとれたチームワークが必要である。国立がんセンター中央病院支援施設では過去に実施した臨床試験付随研究での経験を踏まえ本研究では臨床試験事務局内に試験治療および検体採取のスケジュール管理専従者を設け、主治医と検体処理チームとの密な連絡を行いスムーズな研究の実施に貢献している。

本研究では SNP 解析目的の DNA 保存は血

液凍結を行っていたが、常温保存可能な Whatman 社の FTA®カードの利用が可能となったため、同カードを用いた保存方法への変更を検討している。

E. 結論

本研究の臨床検体の処理並びに管理は、計画された方法のもと、スケジュール管理の徹底もあり順調に進行している。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, and Nishio K. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci.* (in press)

Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Kinoshita T, Kohno T, Katsumata N, Kang YK, Nishio K, and Fujiwara Y. Gene expression profiling of ATP binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* (in press)

Shimoyama T, Hamano T, Natsume T, Koizumi F, Kiura K, Tanimoto M, and Nishio K. Reference profiling of the genomic response induced by an anti-microtubule agent TZT-1027 (Soblidotin) in vitro. *Pharmacogenomics J.* (in press)

Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, and Nishio K. Epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* (in press)

Sakuma N, Komatsubara Y, Takeda H, Hirose H, Sekijima M, Nojima T, and Miyakoshi J. DNA strand breaks are not induced in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields allocated to mobile radio base stations. *Bioelectromagnetics.* 27: 51-57, 2006.

Sakai K, Arai T, Shimoyama T, Murofushi K,

- Sekijima M, Kaji N, Tamura T, Saijo N, and Nishio K. Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor. *FASEB J.* 20: 311-313, 2006.
- Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, and Saijo N. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer. *Int. Thoracic Oncol.* 1: 31-37, 2006.
- Arao T, Yanagihara K, Takigahira M, Takeda M, Koizumi F, Shiratori Y, and Nishio K. ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. *Int. J. Cancer* 118: 483-489, 2006.
- Ando K, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Hosaka T, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, and Kuroki T. Enhancement of sensitivity to tumor necrosis factor α in non-small cell lung cancer cells with acquired resistance to gefitinib. *Clin. Cancer Res.* 11: 8872-8879, 2005.
- Nishio K, Arao T, Shimoyama T, Fujiwara Y, Tamura T, and Saijo N. Translational studies for target-based drugs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 56: s90-s93, 2005.
- Kimura H, Kasahara K, Sekijima M, Tamura T, and Nishio K. Plasma MIP-1 β levels and skin toxicity in Japanese non-small cell lung cancer patients treated with the EGFR-targeted tyrosine kinase inhibitor, gefitinib. *Lung Cancer* 50: 393-399, 2005.
- Korfee S, Eberhardt W, Fujiwara Y, and Nishio K. The role of DNA-microarray in translational cancer research. *Curr. Pharmacogenomics* 3: 201-216, 2005.
- Shimura M, Saito A, Matsuyama S, Sakuma T, Terui Y, Ueno K, Yumoto H, Yamauchi K, Yamamura K, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Tamasaku K, Nishio K, Nishino Y, Endo K, Hatake K, Mori Y, Ishizaka Y, and Ishikawa T. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum(II) treatment. *Cancer Res.* 65: 4998-5002, 2005.
- Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, and Hirohashi S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. *Cancer Sci.* 96: 323-332, 2005.
- Nishio M, Ohyanagi F, Horiike A, Ishikawa Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Nishio K, and Horai T. Gefitinib treatment affects androgen levels in non-small-cell lung cancer patients. *Br. J. Cancer* 92: 1877-1880, 2005.
- Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, Saijo N, and Nishio K. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. *Int. J. Cancer* 116: 36-44, 2005.
- Yamamoto N, Tamura T, Murakami H, Shimoyama T, Nokihara H, Ueda Y, Sekine I, Kunitoh H, Ohe Y, Kodama T, Shimizu M, Nishio K, Ishizuka N, and Saijo N. Randomized pharmacokinetic and pharmacodynamic study of docetaxel: dosing based on body-surface area compared with individualized dosing based on cytochrome p450 activity estimated using a urinary metabolite of exogenous cortisol. *J. Clin. Oncol.* 23: 1061-1069, 2005.
2. 学会発表
- Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Nishio K, Hasegawa T, Ando M, Katsumata N, Kono T, and Fujiwara Y. Identification of prediction marker for drug response in gene expression analysis combined with the pharmacodynamic profile in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. The 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2005.12.8-11. San Antonio Texas.
- Fujiwara Y, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Nishio K, Hasegawa T, Ando M, Katsumata N, and Kono T. Identification pharmacogenomic markers for predicting paclitaxel-related toxicity in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. The 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2005.12.8-11. San Antonio Texas.
- Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Fukumoto H, and Nishio K. Gene expression profile of ATP binding cassette (ABC) transporter in breast cancer patient in relation to the response to neoadjuvant chemotherapy. The 28th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2005.12.8-11. San Antonio Texas.
- Kasahara K, Kimura H, Yoshimoto A, Sone

T, Shibata K, Ishiura Y, Kunitoh H, Nishio K, Tamura T, Fujimura M, and Nakao S. A phase α study of gefitinib monotherapy for chemotherapy-naïve patients with non-small cell lung cancer. American Society Clinical Oncology meeting. 2005.5.13-17. Orlando FL.

Shimoyama T, Yamamoto N, Hamano T, Tamura T, and Nishio K. Gene expression analysis to identify the pharmacodynamic effects of docetaxel on the Rho signal pathway in human lung cancer patients. American Society Clinical Oncology meeting. 2005.5.13-17. Orlando FL.

Ando K, Ohmori T, Hosaka T, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Ohnishi T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, Arteaga CL, and Kuroki T. Enhancement of TNF- α -sensitivity in gefitinib-acquired resistant non-small cell lung cancer cell lines. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.

Ohira T, Tsuboi M, Hirano T, Usuda J, Miyajima K, Suga Y, Honda H, Nakajima N, Kataba H, Ikeda N, Nishio K, Saijo N, and Kato H. Characterization of Gefitinib sensitive human lung cancer cell lines. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.

Hosaka T, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Ando K, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Onishi T, Horichi N, Nishio K, Fukumoto H, Saijo N, Adachi M, Nakadate T, Arteaga CL, and Kuroki T. Active mutant epidermal growth factor receptor undergoes less protein degradation due to diminished binding to c-Cbl ubiquitin ligase. Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.

Ishida H, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Ando K, Hosaka T, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Ohnishi T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, Arteaga CL, and Kuroki T. Long term exposure of gefitinib (IRESSA) may induce alternation of activating signaling on MAPK signaling pathway and may cause gefitinib-resistance. Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.

Arao T, Fukumoto H, Sakai K, Park S, Takeda M, Kimura H, Shimoyama T, Hayama N, Saijo N, and Nishio K. A small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor increases the cellular sensitivity to ZD6474. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.

Shimoyama T, Yamamoto N, Hamano T, Tamura T, and Nishio K. Gene expression analysis to identify the pharmacodynamic effects of docetaxel on the Rho signal pathway in human lung cancer patients. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.

Kimura H, Fukumoto H, Park S, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. Deletional mutant EGFR detected in circulating tumor-derived DNA from lung cancer patients treated with gefitinib. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.

Sone T, Kimura H, Yoshimoto A, Sekijima M, Tamura T, Nishio K, and Kasahara K. A new biomarker for skin rash in Japanese NSCLC patients treated with first line monotherapy of gefitinib. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.

Takeda M, Arao T, Kimura H, Shimoyama T, Hayama N, Sakai K, Park S, Fukumoto H, Fukuoka K, Kimura H, and Nishio K. Molecular determinants for transfection efficiency of siRNA lipofection. American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. 2005.4.15-22. Anaheim California.

Nishio K. Preclinical and molecular correlative study for EGFR-specific tyrosine kinase inhibitors in Japan. The 20th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium & Meet the Expert. 2005.3.10-12. Nagoya.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

乳癌患者におけるトラスツヅマブ療法の効果規定因子に関する研究

分担研究者 青儀健二郎 独立行政法人国立病院機構四国がんセンター 乳腺科医師

研究要旨 乳癌患者におけるトラスツヅマブ療法の効果を規定する因子として、患者末梢血単核球における薬剤の生体内での活性の評価 (FcγR の遺伝子多型、やフコシダーゼやフコシルトランスフェラーゼ活性)、その標的分子である HER2 タンパクの評価 (HER2 の 2 量体 status、HER2 遺伝子多型)、そして網羅的アプローチによるバイオマーカーの探索 (遺伝子発現、タンパク) を検討し、その臨床効果の予測、評価を行う。

A. 研究目的

トラスツヅマブは HER2 陽性乳癌患者の予後の改善に寄与するもの、その効果はまだ十分とはいえない。本研究はトラスツヅマブ投与をうける患者において、薬剤の生体内での活性の評価 (FcγR の遺伝子多型、やフコシダーゼやフコシルトランスフェラーゼ活性)、その標的分子である HER2 タンパクの評価 (HER2 の 2 量体 status、HER2 遺伝子多型)、そして網羅的アプローチによるバイオマーカーの探索 (遺伝子発現、タンパク) を検討し、トラスツヅマブの臨床効果の予測、評価の指標となりうるかを評価する。

B. 研究方法

本研究では以下の項目とトラスツヅマブの臨床効果の関連について検討する。

a. 抗腫瘍効果発現の機序と考えられている抗体依存性細胞障害能 (ADCC) に関わる宿主側因子である、患者免疫細胞の抗体受容体部分 (FcγR) の遺伝子多型解析

b. ADCC を規定すると考えられる抗体側の因子である糖鎖修飾について、その修飾酵素である患者フコシルトランスフェラーゼの活性測定

c. トラスツヅマブの標的分子である腫瘍細胞における HER2 タンパクの 2 量体とその構成レセプタータンパクの解析

d. HER2 遺伝子多型とトラスツヅマブの臨床効果、有害反応との相関解析

e. 患者腫瘍組織を用いた、トラスツヅマブの臨床効果の予測・作用メカニズムのためのバイオマーカーの探索 (遺伝子発現解析)

f. 患者末梢血単核球を用いた、トラスツヅマブの臨床効果の予測・評価のためのバイオマーカーの探索 (遺伝子発現解析)

g. 患者末梢血を用いた、トラスツヅマブの臨床効果の予測・評価のためのバイオマーカーの探索 (タンパク解析)

対象は、

①トラスツヅマブ単独療法を受ける再発・進行乳癌患者 (単独群)、

②術前化学療法併用療法（5FU/エピルビシン/シクロフォスファミド投与後、パクリタキセル/トラスツマブ投与など）および術前化学療法単独（5FU/エピルビシン/シクロフォスファミド投与後、パクリタキセル投与）を受ける乳癌患者（併用群）、とする。

予定研究期間：2005年8月1日より2008年3月31日

予定症例数は、①40例、②術前化学療法併用療法（5FU/エピルビシン/シクロフォスファミド投与後、パクリタキセル+トラスツマブ投与）：目標各40例とする。

国立がんセンター中央病院との共同研究となる。

（倫理面への配慮）

本研究における遺伝子発現解析は、RNAを調べるため、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象ではない。しかしその趣旨を踏まえた上での対応を行い、検体の提供者およびその家族への不利益を最小限に留めるよう配慮する。一方、末梢血単核球におけるFcγR、HER2の遺伝子型の測定は正常組織から抽出したゲノム解析に当たる為、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に遵守されなければならない。今回の研究において得られる情報は治療効果などの関連性は必ずしも明らかでなく、また開示することで提供者又は第三者の生命、身体等の権利利益を害する恐れがあるために遺伝情報は開示しない。つまり、FcγRおよびHER2の遺伝子多型の有無、またこれによる治療効果との関連性の有無に関わらず、情報提供は行わない。検体提供者個人の識別につながる

情報は、個人情報管理者により管理され、第三者に渡ることはない。

C. 研究結果

現在、当院の倫理審査委員会にて当該研究を審議中であり、承認されれば研究を開始する予定である。

D. 考察

トラスツマブの効果を正確に予測・評価するファクターを提示することができれば、臨床的にはHER2陽性乳癌患者においてより効果的あるいはquality of life (QOL) の高い治療方針を提示できると考えられる。

E. 結論

本研究により、乳癌患者に対しトラスツマブにより効果的あるいはQOLの高い治療の提供を目指す。

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

HER2 陽性転移性乳癌患者におけるトラスツズマブ療法の効果規定因子に関する研究

分担研究者 井上 浩明 (株)東洋紡ジーンアナリシス 敦賀ラボラトリー 部長

研究要旨 HER2 遺伝子に関する変異・一塩基多型(SNP)の測定系を確立すると共にヒト由来培養がん細胞に対する SNP のタイピングを実施した。

A. 研究目的

本年度の目的は、HER2 遺伝子の変異及び SNP の測定系の構築及び、in vitro でのサンプルを用いた測定系の確認である。

B. 研究方法

(1)HER2 遺伝子の SNP 測定系の構築

HER2 遺伝子の SNP 測定系を構築する為に、既存データベースから HER2 遺伝子の全 SNP を抽出し、これらの SNP の特異的プライマー及び SNP 検出用のプローブを設計・構築した。更に作成したプライマー及びプローブのセットを用いて、複数のヒト由来培養がん細胞株の DNA における SNP を検出した。

C. 研究結果

(1)データベースからの SNP 抽出

HER2 遺伝子中に存在する既知 SNP は 96 箇所であった。その内訳は、イントロン中に 80 箇所、エクソン中に 16 箇所、更にエクソン中アミノ酸置換が生じる SNP が 7

箇所であった。

(2)SNP 測定系の構築

データベースから抽出した 96 箇所の SNP に関し、各 SNP を含む増幅産物長が 100~200 bp となる特異的プライマーセットを設計した。さらに、各増幅産物と特異的にハイブリダイズさせた後、融解曲線から SNP 型判定を行う標識プローブの設計を行った。

(3)作製プライマー・プローブの有用性の確認

96SNP 中アミノ酸置換を生じる 7SNP に関して、ヒト由来の培養がん細胞株 11 種(国立がんセンター中央病院より供与)より抽出した DNA を用いて測定を行った。7SNP 中 5SNP はすべての細胞株でホモであった。マイナーホモもしくはヘテロの検出された SNP が 2 箇所同定された。

D. 考察

SNP は遺伝子発現に影響を及ぼし、その結果、遺伝子産物の質的・量的異常が発生

する。HER2 のたんぱく質レベルでの質的変化は HER2 遺伝子のエクソン中のアミノ酸置換を伴う変異或いは SNP の型に影響を受けると考えられる。今回、構築された SNP 測定系により、培養がん細胞株での SNP が検出されたことから、本測定系はアミノ酸置換を伴う 7SNP の型判定を効率よく実施することが可能であると考えられる。

E. 結論

(1)HER2 関連 SNP96 を抽出し、型判別を行うためのプライマー及びプローブを設計・構築した。

(2)アミノ酸変異を伴う 7SNP について、国立がんセンター中央病院より供与された細胞株を用いて測定系の有用性を確認した。

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, and Nishio K.	EGFR mutation status in tumor-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical souse for predicting of gefitinib response.	Clin. Cancer Res.		in press	
Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, and Nishio K.	High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients.	Cancer Sci.		in press	
Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Kinoshita T, Kohno T, Katsumata N, Kang YK, Nishio K, and Fujiwara Y.	Gene expression profiling of ATP binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients.	Breast Cancer Res. Treat.		in press	
Shimoyama T, Hamano T, Natsume T, Koizumi F, Kiura K, Tanimoto M, and Nishio K.	Reference profiling of the genomic response induced by an anti-microtubule agent TZT-1027 (Soblidotin) in vitro.	Pharmacogenomics J.		in press	
Kimura H, Kasahara K, Shibata K, Sone T, Yoshimoto A, Kita T, Ichikawa Y, Waseda Y, Watanabe K, Shiarasaki H, Ishiura Y, Mizuguchi M, Nakatsumi Y, Kashii T, Kobayashi M, Kunitoh H, Tamura T, Nishio K, Fujimura M, and Nakao S.	EGFR mutation of tumor and serum in the gefitinib treated patients with chemotherapy-naïve non-small cell lung cancer.	Int. Thoracic Oncol.	1	260-270	2006

Matsumoto K, Katsumata N, Yamanaka Y, Yonemori K, Kohno T, Shimizu C, Andoh M, Fujiwara Y.	The safety and efficacy of the weekly dosing of irinotecan for platinum- and taxanes-resistant epithelial ovarian cancer.	Gynecol Oncol.	100	412-416	2006
Shimizu C, Fujiwara Y.	Pharmacogenomics in chemotherapy and drug development for breast cancer	Nippon Rinsho.	64	424-431	2006
Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Murofushi K, Sekijima M, Kaji N, Tamura T, Saijo N, and Nishio K.	Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor.	FASEB J.	20	311-313	2006
Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, and Saijo N.	A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer.	Int. Thoracic Oncol.	1	31-37	2006
Arao T, Yanagihara K, Takigahira M, Takeda M, Koizumi F, Shiratori Y, and Nishio K.	ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model.	Int. J. Cancer	118	483-489	2006
Miyake M, Tateishi U, Maeda T, Arai Y, Seki K, Hasegawa T, Sugimura K.	Sclerosing perineurioma: tumor of the hand with a short T2.	Skeletal Radiol.	Epub ahead of print	1-9	2006
Tateishi U, Yamaguchi U, Seki K, Terauchi T, Arai Y, Hasegawa T.	Glut-1 expression and enhanced glucose metabolism are associated with tumour grade in bone and soft tissue sarcomas: a prospective evaluation by [(18)F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography.	Eur J Nucl Med Mol Imaging	Epub ahead of print		2006
Tateishi U, Hasegawa T, Seki K, Terauchi T, Moriyama N, Arai Y.	Disease activity and (18)F-FDG uptake in organising pneumonia: semi-quantitative evaluation using computed tomography and positron emission tomography	Eur J Nucl Med Mol Imaging	Epub ahead of print		2006

Kanazawa T, Akashi-Tanaka S, Iwamoto E, Takasugi M, Shien T, Kinoshita T, Miyakawa K, Shimizu C, Ando M, Katsumata N, Fujiwara Y, Fukutomi T.	Diagnosis of complete response to neoadjuvant chemotherapy using diagnostic imaging in primary breast cancer patients.	Breast J.	11	311-316	2005
Yonemori K, Katsumata N, Uno H, Matsumoto K, Kouno T, Tokunaga S, Yamanaka Y, Shimizu C, Ando M, Takeuchi M, Fujiwara Y.	Efficacy of weekly paclitaxel in patients with docetaxel-resistant metastatic breast cancer.	Breast Cancer Res Treat.	89	237-241	2005
Sakuma N, Komatsubara Y, Takeda H, Hirose H, Sekijima M, Nojima T, and Miyakoshi J.	DNA strand breaks are not induced in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields allocated to mobile radio base stations.	Bioelectromagnetics.	27	51-57	2005
Ando K, Ohmori T, Inoue F, Kadofuku T, Hosaka T, Ishida H, Shirai T, Okuda K, Hirose T, Horichi N, Nishio K, Saijo N, Adachi M, and Kuroki T.	Enhancement of sensitivity to tumor necrosis factor α in non-small cell lung cancer cells with acquired resistance to gefitinib.	Clin. Cancer Res.	11	8872-8879	2005
Nishio K, Arai T, Shimoyama T, Fujiwara Y, Tamura T, and Saijo N.	Translational studies for target-based drugs.	Cancer Chemother Pharmacol.	56	s90-s93	2005
Kimura H, Kasahara K, Sekijima M, Tamura T, and Nishio K.	Plasma MIP-1 β levels and skin toxicity in Japanese non-small cell lung cancer patients treated with the EGFR-targeted tyrosine kinase inhibitor, gefitinib.	Lung Cancer	50	393-399	2005

Korfee S, Eberhardt W, Fujiwara Y, and Nishio K.	The role of DNA-microarray in translational cancer research.	Curr. Pharmacogenomics	3	201-216	2005
Shimura M, Saito A, Matsuyama S, Sakuma T, Terui Y, Ueno K, Yumoto H, Yamauchi K, Yamamura K, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Tamasaku K, Nishio K, Nishino Y, Endo K, Hatake K, Mori Y, Ishizaka Y, and Ishikawa T.	Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum(II) treatment.	Cancer Res.	65	4998-5002	2005
Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, and Hirohashi S.	Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhus stomach cancer.	Cancer Sci.	96	323-332	2005
Nishio M, Ohyanagi F, Horiike A, Ishikawa Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Nishio K, and Horai T.	Gefitinib treatment affects androgen levels in non-small-cell lung cancer patients.	Br. J. Cancer	92	1877-1880	2005
Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, Saijo N, and Nishio K.	Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib.	Int. J. Cancer	116	36-44	2005
Tateishi U, Miyake M, Maeda T, Arai Y, Seki K, Hasegawa T.	CT and MRI findings in KIT-weak or KIT-negative atypical gastrointestinal stromal tumors.	Eur Radiol.		1-4	2005

EGFR Mutation of Tumor and Serum in Gefitinib-Treated Patients with Chemotherapy-Naive Non-small Cell Lung Cancer

Hideharu Kimura, MD, Kazuo Kasahara, MD, Kazuhiko Shibata, MD, Takashi Sone, MD, Akihiro Yoshimoto, MD, Toshiyuki Kita, MD, Yukari Ichikawa, MD, Yuko Waseda, MD, Kazuyoshi Watanabe, MD, Hiroki Shiarasaki, MD, Yoshihisa Ishiura, MD, Masayuki Mizuguchi, MD, Yasuto Nakatsumi, MD, Tatsuhiko Kashii, MD, Masashi Kobayashi, MD, Hideo Kunitoh, MD, Tomohide Tamura, MD, Kazuto Nishio, MD, Masaki Fujimura, MD, and Shinji Nakao, MD

Background: The authors evaluate the efficacy and safety of gefitinib monotherapy in chemotherapy-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). A secondary endpoint is to evaluate the relationship between clinical manifestations and epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutation status.

Methods: Japanese chemotherapy-naive NSCLC patients were enrolled. They had measurable lesions, Eastern Cooperative Oncology Group performance status of 0 to 2, and adequate organ and bone marrow function. Patients received 250 mg of oral gefitinib daily. *EGFR* mutations in exon 18, 19, and 21 of DNA extracted from tumor and serum were analyzed by genomic polymerase chain reaction and direct sequence.

Results: All 30 patients were eligible for the assessment of efficacy and safety. An objective response and stable disease were observed in 10 patients (33.3%) and nine patients (30.0%), respectively. The median time to progression was 3.3 months and the median overall survival was 10.6 months. The 1-year survival rate was 43.3%. Grade 3 toxicities were observed in seven patients. *EGFR* mutation was observed in four of 13 (30.8%) tumors, and two of them achieved partial response. In serum samples, three of 10 patients with *EGFR* mutations in the serum before treatment had a response to gefitinib. *EGFR* mutation was observed in 10 of 27 and significantly more frequently observed in the posttreatment samples from patients with a partial response or stable disease than in those from patients with progressive disease ($p = 0.006$).

Conclusions: Gefitinib monotherapy in chemotherapy-naive NSCLC patients was active, with acceptable toxicities. These results warrant further evaluation of gefitinib monotherapy as a first-line therapy. The *EGFR* mutation in serum DNA may be a biomarker for monitoring the response to gefitinib during treatment.

Key Words: Non-small-cell lung cancer, Gefitinib, Epidermal growth factor receptor, Mutation, Serum DNA.

(*J Thorac Oncol.* 2006;1: 260-267)

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is the leading cause of cancer death in Japan and throughout the world.¹ Unfortunately, the majority of patients with NSCLC present with locally advanced or metastatic disease at the time of diagnosis. Although chemotherapy has produced modest survival benefits in advanced NSCLC patients, the outcome of chemotherapy for NSCLC remains unsatisfactory.

Protein tyrosine kinases play important roles in the pathogenesis of malignant tumors.² Among them, epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase has been implicated in the initiation and progression of NSCLC.³⁻⁵ The overexpression of EGFR is frequent in NSCLC.⁶ Monoclonal antibodies and low-molecular-weight compounds that inhibit the EGFR signaling pathway have been developed and shown to have antitumor effects. Gefitinib (Iressa, AstraZenca, London, England) is an orally active EGFR type tyrosine kinase inhibitor. In four phase I studies, tumor shrinkage or stabilization after gefitinib monotherapy was observed in some patients with NSCLC. In two phase II trials, Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung cancer (IDEAL) 1 and 2, gefitinib monotherapy was shown to have a substantial effect in NSCLC patients treated previously with chemotherapy.^{7,8} In these trials, patients of Asian origin and who had never been smokers had a statistically significant improvement in overall survival. In spite of encouraging results in the IDEAL trials, two large-scale, phase III, randomized trials, Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Treatment, failed to show any survival benefit for the use of gefitinib.^{9,10} Patients in a large-scale phase III trial comparing gefitinib

From Respiratory Medicine, Kanazawa University Hospital, Ishikawa; Internal Medicine, Kouseiren Takaoka Hospital, Takaoka; Internal Medicine, Shimminato Municipal Hospital, Shimminato, Japan. Internal Medicine, Fukuiken Saiseikai Hospital; Respiratory Medicine, Toyama City Hospital, Toyama; Respiratory Medicine, Ishikawa Prefectural Hospital, Kanazawa; Respiratory Medicine, Kanazawa Municipal Hospital; Kanazawa; and National Cancer Center Hospital, and National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan.

Address for correspondence: Kazuo Kasahara, MD, Takara-machi 13-1, Kanazawa, Ishikawa, Japan; email: kasa1237@med3.in.kanazawa-u.ac.jp.

Copyright © 2006 by the International Association for the Study of Lung Cancer

ISSN: 1556-0864/06/0103-0260