

厚生労働省科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

「バイオイメージング画像による  
抗体医薬と低分子化合物分子標的薬剤の  
ex vivo評価システムの開発：  
末梢血CTC, CEC, CEPおよび検査または  
手術新鮮検体を用いて」に関する研究

課題番号：H21-トランスー 一般-012

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

**畠 清 彦**

(公益財団法人がん研究会有明病院化学療法科 部長)

---

平成24(2012)年5月

厚生労働省科学研究費補助金  
医療技術実用化総合研究事業

バイオイメージング画像による抗体医薬と  
低分子化合物分子標的薬剤の ex vivo 評価システムの開発：  
末梢血 CTC, CEC, CEP および検査または手術新鮮検体を用いて  
に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

目 次

I. 総括研究報告書	
バイオイメージング画像による抗体医薬と低分子化合物分子標的薬剤の ex vivo 評価システムの開発：末梢血 CTC, CEC, CEP および検査または 手術新鮮検体を用いて に関する研究 .....	畠 清彦 5
II. 研究分担報告書	
1. 骨転移症例における bisphosphonate または抗体医薬の評価に関する研究 ...	高橋 俊二 15
2. 悪性リンパ腫をはじめとする臨床データの提供に関する研究 .....	照井 康仁 17
3. 前立腺癌、腎臓癌における分子標的薬剤の評価に関する研究 .....	湯浅 健 19
4. CTC, CEC, CEP を用いた固形がんにおけるバイオマーカー研究に 関する研究 .....	松阪 諭 23
5. 検体からの細胞精製、ADCC 測定、イメージング画像記録に関する研究 ...	三嶋 雄二 27
6. 手術および病理標本を用いた分子生物学的、免疫学的標的分子の評価に 関する研究 .....	石川 雄一 31
7. 悪性リンパ腫、肺癌における ALK など分子標的の解析に関する研究 .....	竹内 賢吾 35
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	47

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

総括研究報告書

研究題名 バイオイメージング画像による抗体医薬と低分子化合物分子標的薬剤のex vivo評価システムの開発:末梢血CTC, CEC, CEPおよび検査または手術新鮮検体を用いて (H21-トランス一般-012) に関する研究

研究代表者 畠清彦 公益財団法人がん研究会有明病院化学療法科 部長

研究要旨

がんにおける新規薬剤の開発研究における、臨床試験に入る前に、開発を進行するかどうかを決定するために、臨床例における標的分子の分子疫学調査を行う系を確立した。検体の収集、保存、分離、解析のための免疫組織染色、ex vivoの系を用いた抗体の評価、を、末梢血、骨髄、または生検、手術標本から行った。本年度システムの確立によりまれな標的分子の疾患における頻度がわかり、臨床試験が開始できたものができた。この方法によって、まれながんに対する開発から臨床試験までのロードマップの例となった。

研究分担者

- ・ 高橋俊二（公財）がん研究会有明病院化学療法科・担当部長
- ・ 照井康仁（公財）がん研究会有明病院血液腫瘍科・担当部長
- ・ 湯浅健（公財）がん研究会有明病院泌尿器科・医長
- ・ 松阪諭（公財）がん研究会有明病院消化器センター消化器内科・医員
- ・ 三嶋雄二（公財）がん研究会がん化学療法センター臨床部・研究員
- ・ 石川雄一（公財）がん研究会がん研究所病理部・部長
- ・ 竹内賢吾（公財）がん研究会がん研究所病理部・主任研究員

A.研究目的

がん治療の新規薬剤導入の早期実現のための Critical point は臨床試験で

ある。製薬企業や基礎研究者が in vitro, 動物実験による preclinical data から臨床に行くためにも臨床検体を用いた ex vivo 研究は重要である。そこで、我々は、種々のまれな標的分子に対する分子疫学調査を行える、基盤を整備して、測定系を確立した。これによって標的分子の評価系、頻度を種々のがんで評価した。

B. 研究方法

まず手術検体やリンパ節生検、末梢血標本からの腫瘍細胞を入手し標的分子に関する遺伝子や蛋白を検討した。特に低分子化合物に効果や抗体医薬の評価系を確立した。また分子疫学調査として、癌関連蛋白質の発現頻度解析、生検・保存検体を用いた免疫組織染色、癌関連変異の頻度解析、生検由来 DNA を用いたシーケンス解析・FISH 解析。FISH については1個の末梢循環幹細胞からも解析した。バイオマーカー研究として、患者組織を用いたバイオマー

カー測定法確立として生検・CTC・肺洗浄液・PBMC等を用いた遺伝子変異、蛋白質発現等の解析、*ex vivo*での薬剤応答性評価を目標とした。標的分子は、ALK (anaplastic large cell lymphoma kinase), pALK, pSTAT5, pERK, pAKT, 膵臓癌において Smad4, RAF/MEK, 肺癌、大腸結腸癌、胃癌、乳癌、血液癌における FGFR, pFGFR, FGFR1,2 & 3, 膵臓癌・乳癌・肺癌・胃癌・骨髄腫における Axl-IL-15R-PAxillin, を検討した。がん研究所にアーカイブされていた2例の従来免疫染色法によるALK陰性IMTを高感度法, intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP) 法で再検討した。そのうえで、凍結保存検体を用いた5'-RACE法にて新規ALK融合遺伝子の同定を試みた。

現在2社との共同研究によって、ALKについては肺癌において第1相試験が行われて、奏効した例がでていいる。またSTAT5阻害剤については第1相試験が開始されているので、具体的な成果が出ていいると考えられる。また途中ではあるが、ADCCおよびCDCの評価系において、抗体産生株からもっとも適切な株を選択するのに使用された。AxLについてはELISAから消化器がんの予後不良群において、高値を示す事がわかった。

1998年から2003年にがん研病院で外科的に切除された浸潤性原発性肺腺癌212例を用いた。Stat経路の活性化状況は、Cell Signaling社のリン酸化Stat3単クローン抗体(pStat3 Ab, D3A7)を用いた。

癌の症例では、年齢、性別、喫煙指数、癌遺伝子変化(EGFR変異, KRAS変異, ALK融合遺伝子)、PI3K-AKT経路のシグナルタンパクのリン酸化(pAkt, pmTOR, pS6K, pGSK3B, pFox01/03a)、RAS-ERK経路タンパクのリン酸化(pERK)、細胞系列マーカーとしてTTF-1および予後を調べ、それぞれの相関を解析した。

(検体処理) 臨床検体(切除腫瘍、末梢血、骨髄穿刺生検、内視鏡リンパ節生検、胸水、腹水など)を採取後逐次迅速に処理性、腫瘍生細胞を取得し*ex vivo*解析試料を調製する。

(1) 抗体医薬の適応のある腫瘍(B細胞性リンパ腫、乳癌、転移性大腸癌)については、ADCC感受性の評価を実施する。評価結果について、同検体のCDC感受性および治療効果との相関を解析し、生体内でのADCCの治療効果への影響を解析する。

(2) 大腸癌、胃癌、骨髄腫由来の検体について、腫瘍細胞に発現するがん幹細胞マーカー、新規標的分子候補タンパク質の発現をフローサイトメーター、蛍光イメージングを用いて評価する。評価を行った細胞試料はその一部をspheroid培養に供し、臨床試料の長期維持と評価(spheroid bank)の構築を目指す。

(3) 消化器系腫瘍由来(胃癌)末梢血標本は、非上皮系細胞の高度な除去を行った後、蛍光イメージングを用いてCTCの同定を行い、CTCにおける遺伝子異常をFISHを組み合わせて解析をする手法を開発する。また本計画により確立した手法を用いて、

胃癌 CTC における Her-2、FGFR-2 の遺伝子異常を解析する。

(倫理面への配慮)

検体は、IC の取られたものを使用し、研究計画が癌研究会の IRB で承認された後に実施した。個人情報漏洩しないよう、実験室では連結可能匿名化を実施した。

### C. 研究結果

1. 病理検体バンクからの症例の概要は以下の通りである。性別は F:M= 106:106、年齢は 70 才以上:70 才未満= 59:153、腫瘍径は 30mm 以下:30mm 超= 122:90、喫煙歴は SI400 以上:未満= 87:125、病理病期 I 期:II 期以上= 129:83、高分化:中低分化= 93:119、組織学的に乳頭状:腺房状充実= 180:32、胸膜浸潤あり:なし= 72:139、リンパ管侵襲あり:なし= 63:141、血管侵襲あり:なし= 109:98 であった。

pStat3 の発現は、陽性:陰性= 149:63 (70%) であった。性別、年齢では有意差はなく、腫瘍径が小さい、喫煙指数が少ない、病理病期が I 期、分化度が高い、乳頭状の組織像、胸膜浸潤なし、リンパ管侵襲なし、血管侵襲なし、TTF-1 陽性の群で、それぞれ有意に pStat3 の発現が高度であった。

癌遺伝子変化との関係では、pStat3 の発現は、EGFR 変異あり症例で野生型に比べ有意に高く、ALK 転座ありの群ではなしの群とくらべて有意に低かった。KRAS 変異肺癌では、有意差がなかった。すなわち、pStat3 の発現は遺伝子変異と有意に相関

していた。

### D. 考察

これまで Stat 経路は、主として免疫系の細胞などで使われていると考えられてきた。本研究により、肺腺癌でも 70% の腫瘍で使われていることが判明した。腫瘍の種類では、非喫煙者、早期、TTF-1 細胞系列の癌で主として亢進していた。

分子疫学調査として、癌関連蛋白質の発現頻度解析:生検・保存検体を用いた免疫組織染色。癌関連変異の頻度解析:生検由来 DNA を用いたシーケンス解析・FISH 解析。バイオマーカー研究として、患者組織を用いたバイオマーカー測定法確立:生検・CTC・肺洗浄液・PBMC 等を用いた遺伝子変異、蛋白質発現等の解析、ex vivo での薬剤応答性評価を行ったデータは、今後具体的な薬剤が得られてからも利用できる。特区で実施される臨床研究の検体を用いてこの研究を実施することによって特区プロジェクト全体での開発を加速化することが出来る。

(1) 抗体医薬 ADCC 活性の評価。B 細胞性リンパ腫に対する抗体医薬、rituximab (抗 CD20 抗体) について、臨床由来検体に対する ADCC、CDC の評価を 2006 年より継続して実施している。本研究課題では、ADCC の解析手法として、独自に開発した再現性の高い解析手法を採用しているが、本手法を用いて ADCC と CDC の生体内での作用に関し、それぞれの作用がお互いの作用に与える影響について詳細に解析を行った。その結果、生体内のように ADCC と CDC

が同時に誘導され得る条件においては、rituximab が低濃度、あるいは補体因子が十分ではない場合は、ADCC が誘導されるが、それ以外の条件では CDC が誘導されるかわりにADCCは抑制されることが判明した。(関連論文1報)

(2) 臨床腫瘍細胞を用に対するバイオマーカー探索。平成23年度は大腸癌13症例(手術検体5例、胸水or腹水8例)胃癌20症例(胸水or腹水21例)骨髄腫8症例(骨髄生検8例)乳癌4症例(胸水4例)についてバイオマーカー探索のためタンパク質発現解析を実施した。

・大腸癌では、EGFR+例が13/13例(13例中13例)、CD133+細胞が20%を超える腫瘍が4/13例、Axlの発現がある症例が、7/14例、FGFR2の発現がある細胞が6/13例であった。

・胃癌においてはCD133+細胞が20%を超える腫瘍が8/20例、EGFR陽性例が16/20例、AXL陽性例が11/20例、FGFR2陽性例が4/20例、Her2陽性例が5/20例であった。

・骨髄腫におけるFGFR3陽性例は、3例中8例(1例解析不能)であった。

解析に供した検体試料の一部は、さらに3次元培養を実施し、長期間維持培養を継続している。十分なspheroidが形成された検体は、フィブリンクロットを作成後、パラフィンに包埋した(24例)。

2010年度の血液がん新規患者数380例中、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫182例と最も多く、次いでろ胞性リンパ腫5

2例、MALTリンパ腫44例であった。一方、T細胞性リンパ腫は10%程度であった。

(3) 胃癌患者CTCでの遺伝子異常の解析手法の構築と評価 昨年度に引き続き、CTCによる低侵襲な遺伝子異常解析を実施した。評価手法は昨年度報告を行った、免疫磁気分離と免疫染色(IHC)とFISH法を同時に実施しCTCを識別しつつ、Her-2(+CEP17)およびFGFR2(+CEP10)の2-color FISHをそれぞれ実施し、共焦点レーザー走査型顕微鏡の疑似多重チャンネル機能を用いることで5チャンネル蛍光イメージを3次元的に評価する方法を採用した。本プロトコールにより本年度は111例の胃癌症例についてHer-2、FGFR-2の遺伝子解析を実施し、CTCの遺伝子増幅の有無を解析した。

臨床検体を用いた分子標的の評価として、頻度や薬剤に対する効果、proof of conceptを示す研究などを行いやすい環境が整備できている。

(2) 島と松阪は、主に、手術検体やリンパ節生検、末梢血標本からの腫瘍細胞を入手して、標的分子に関する遺伝子や蛋白の検討、低分子化合物に効果や抗体医薬の評価系を確立して、外部からも受託できるようにする。三嶋は得られた検体から、癌幹細胞にも注目し、CD20抗体による染色での精製や新鮮時からの短期培養と、末梢血では、末梢循環腫瘍細胞、末梢内皮細胞、末梢内皮前駆細胞、を分離して、薬剤暴露前後に標的分子解析、活性化蛋白などの変化など

を検討する。標的分子は、現在いくつかの企業で標的とされている、ALK (anaplastic large cell lymphoma kinase), pALK, pSTAT5, pERK, pAKT, 膵臓癌において Smad4, RAF/MEK, 種々の癌、肺癌、大腸結腸癌、胃癌、乳癌、血液癌における FGFR, CTC により、直接 1 個の細胞から FISH での解析および K-RAS 変異の解析が可能となるようシステムを作成した。いくつかの標的分子における頻度などの分子疫学的データが得られた。

石川、竹内は、肺癌や胃癌について、それぞれ標的分子の解析を行った。ALK については、非小細胞肺癌の 3% に認められた。点変異はなく、ファイザー化合物による点変異の耐性機序については現在開発中の薬剤が有効である事がわかった。神経芽細胞腫でも発現過剰している可能性が認められた。Smad4 の膵臓癌、大腸癌における変異を検出したが、RON についての検査系はまだできていない。

三嶋は FGFR1-4 については、骨髓腫での FISH の検出系を確立した。胃癌の CTC、腹水中の細胞などから cancer spheroid を培養した。

AXL については血中可溶性 AXL について測定系を決めて、血液、尿検体でのスクリーニングができるかどうかを検討している。ADCC の系を作成した。

また CTC を用いた FISH の系を確立した。特許申請中である。

照井は悪性リンパ腫における臨床データと臨床検体を収集し、組織バンクとデータを

融合させた。

血液、胸水、リンパ節細胞浮遊液などの臨床検体からリンパ腫細胞によるリツキシマブの感受性試験では CD20 の発現増強と感受性が正の相関を示した。また CD20 遺伝子変異で、CD20 タンパクの発現低下に関する遺伝子変異がみとめられた。

CD20 の点変異についても新たなモノクローナル抗体を作成し、特許申請予定である。検査会社とも共同して、製品化する方向である。

(3) AxL については、血清、胸水、腹水からの検体を ELISA で測定できることがわかり、胃癌、大腸癌例で測定し、予後不良群で高値である FGFR については測定系が確立できたので、骨髓腫などで具体的に測定し、ex vivo での腫瘍細胞に阻害効果があるかどうかを検証し、開発の価値があるかどうかを検定する。

(4) STAT35 阻害剤についてははいよいよ第 1 相試験が開始された。

また、将来的な運用を企図した spheroid bank の維持、拡充をめざし、spheroid microarray の作成を企図し、spheroid のパラフィンブロックを作成したが、現在のところ予定検体数に到達せず、microarray 化は実施していない。

## E. 結論

多くのまれな標的分子の分子疫学的研究を行い、評価のための方法論も種々評価した。評価方法が間違っていると正しく頻度を評



価できないだけでなく、薬剤の評価にまでたどり着かない。評価ができるシステムが開発されると、本成果は ALK 阻害剤の本格的実用化に向け、ALK 陽性腫瘍の革新的な同定法・同定理論を提示した報告ということになる。本研究課題で取得した個々の解析データは、検体を提供していただいた症例の臨床情報と照会することで多くの臨床上有用な知見を提供するものである。現在まで取得したデータをもって、他分担研究者の所有する臨床情報との解析に供される。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Maita S, Yuasa T, Tsuchiya N, Mitobe M, Narita S, Horikawa Y, Hatake K, Fukui I, Kimura S, Maekawa T, Habuchi T. Antitumor effect of sunitinib against skeletal metastatic renal cell carcinoma through inhibition of osteoclast function. *Int J Cancer* 2012;130:677-84.
2. Yuasa T, Tsuchiya N, Horikawa Y, Narita S, Inoue T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Takahashi S, Hatake K, Fukui I, Habuchi T. Clinical Efficacy and Prognostic Factors for Overall Survival in Japanese Patients with Metastatic Renal Cell Cancer Treated with Sunitinib. *BJU int.* (in press).
3. Yuasa T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Takahashi S, Hatake K, Fukui I. Treatment Outcome and Prognostic Factors of the Patients with Renal Cell Cancer Bone Metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28: 405-11.
4. Yuasa T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Nakano K, Kodaira M, Takahashi S, Hatake K, Inamura K, Ishikawa Y, Fukui I. Tumor Size is a Potential Predictor of the Response to Tyrosine Kinase Inhibitors in Renal Cell Cancer. *Urology* 2011; 77: 831-5.
5. Matsusaka S, Mishima Y, Suenaga M, Terui Y, Kuniyoshi R, Mizunuma N, Hatake K. Circulating endothelial progenitors and CXCR4-positive circulating endothelial cells are predictive markers for bevacizumab. *Cancer*. 117: 4026-32, 2011.
6. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Kuniyoshi R, Takagi K, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci.* 102(6):1188-92, 2011.
7. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Takagi K, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating endothelial

- cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 68(3):763-8, 2011
8. Yuji Mishima<sup>1</sup>, Yasuhito Terui<sup>1</sup>, Yuko Mishima, Ryoko Kuniyoshi<sup>1</sup>, Satoshi Matsusaka Mariko Mikuniya<sup>1</sup>, Kiyotsugu Kojima and Kiyohiko Hatake High reproducible ADCC analysis revealed a competitive relation between ADCC and CDC and differences between FcγR111a polymorphism. *Int. Immunol.* (2012) doi: 10.1093/intimm/dxs048 First published online: March 21, 2012 (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

1. 特許出願

1 ) 「METHOD OF ANALYZING GENETICALLY ABNORMAL CELLS」

( 米国 13/290231) (欧州 11008830.9)

2. 実用新案登録

記載可能なものなし。

3. その他

なし

## II. 研究分担報告書

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合）  
分担研究報告書

研究分担課題名 骨転移症例における bisphosphonate または抗体医薬の評価

研究分担者 高橋俊二 公益財団法人がん研究会有明病院化学療法科 担当部長

研究要旨 ビスフォスフォネートまたはその他の骨特異的薬剤の効果を評価するためのバイオマーカーを探索するため、早期乳癌患者における術前ビスフォスフォネート投与を行い、CTC, CEC 等のバイオマーカーとしての可能性が示された。

#### A. 研究目的

ビスフォスフォネート、デノスマブなどの骨特異的薬剤の開発が進み、骨転移のみならず原発腫瘍／骨外転移に対する効果も示唆されているが、そのメカニズム、効果のバイオマーカーについては明らかになっていない。乳癌骨転移患者あるいは早期乳癌患者におけるビスフォスフォネートまたはその他の骨特異的薬剤の効果を評価するためのバイオマーカーを探索する。

#### B. 研究方法

1) 早期乳癌で術前化学療法予定の患者に対して化学療法にゾレドロン酸 4mg/3-4w 6ヶ月投与を併用し、病理学的効果を検討すると共に CTC, CEC, DTC(disseminated tumor cells, 骨髄微小転移)等の変化を測定し、治療効果のマーカーになるかを検討する。

2) ビスフォスフォネート以外の新たな骨特異的薬剤の治療効果とそのバイオマーカーを検討する。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言及び GCP の精神に則り実施し、臨床試験に関する倫理指針を遵守する。また患者個人情報に関する倫理指針を遵守する。

#### C. 研究結果

1) H22-23 年度において 30 例の早期乳癌患者に対してゾレドロン酸併用の術前化学療法を行い、病理学的効果が明らかになった 9 例中 2 例で Grade 3, 1 例で Grade 2a が得られた。CTC は治療開始前 12 例中 3

例で陽性であったが 3 例とも治療後消失した。CEC は治療前 108±92 から治療後 496±404 で有意な変動はなかったが、grade 0 または 1a の効果が低い患者では増加する傾向があった。

2) 破骨細胞抑制剤でもある SRC 阻害剤ダサチニブの骨代謝マーカーに対する影響を固形癌患者の第 1 相試験において検討し、骨吸収マーカーである尿 NTx、血清 TRACP-5 が 46.3%、22.2%低下していた。

#### D. 考察

臨床試験の中間解析であり少数例での検討であるが、化学療法とゾレドロン酸の併用による術前化学療法で高い病理学的効果が得られる可能性がある。また CEC の変動が治療効果のバイオマーカーになる可能性があるが多数例の検討が必要である。

#### E. 結論

ビスフォスフォネートの骨以外への効果を CEC のようなバイオマーカーにより予測できる可能性がある。今後症例を蓄積し、またその他の骨特異的薬剤についても検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Dana Rathkopf, Glenn Liu, Michael A Carducci, Mario A Eisenberger, Aseem Anand, Michael J Morris, Susan F Slovin, Yasutsuna Sasaki,

- Shunji Takahashi, Seiichiro Ozono, Nga Kit Eliza Fung, Shinta Cheng, Jinping Gan, Marco Gottardis, Mary T. Obermeier, Jyotsna Reddy, Steven Zhang, Blisse J. Vakkalagadda, George Wilding, and Howard I. Scher. Phase I Dose-Escalation Studies of BMS-641988 in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2011 Feb 15;17(4):880-7.
2. Yoshinori Ito, Koichi Nagasaki, Yoshio Miki, Takuji Iwase, Futoshi Akiyama, Masaaki Matsuura, Rie Horii, Masujiro Makita, Nahomi Tokudome, Masaru Ushijima, Masataka Yoshimoto, Shunji Takahashi, Tetsuo Noda and Kiyohiko Hatake. Prospective randomized phase II study determines the clinical usefulness of genetic biomarkers for sensitivity to primary chemotherapy with paclitaxel in breast cancer. *Cancer Science* 2011 Jan; 102(1):130-6
  3. Yuasa T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Saito K, Takahashi S, Hatake K, Fukui I. Treatment outcome and prognostic factors in renal cell cancer patients with bone metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2011 Apr;28(4):405-11.
  4. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, Diel IJ, Takahashi S, Shore N, Henry DH, Barrios CH, Facon T, Senecal F, Fizazi K, Zhou L, Daniels A, Carrière P, Dansey R. *Ann Oncol*. 2011 Oct 10.
  5. Tokudome N, Ito Y, Takahashi S, Kobayashi K, Taira S, Tsutsumi C, Oto M, Oba M, Inoue K, Kuwayama A, Masumura K, Nakayama Y, Watanabe C, Hatake K. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of heavily treated metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer*. 2011 Jul;18(3):195-202.
  6. Biomarkers to predict response to sunitinib therapy and prognosis in metastatic renal cell cancer. Yuasa T, Takahashi S, Hatake K, Yonese J, Fukui I. *Cancer Sci*. 2011 Nov;102(11):1949-57.
  7. Takahashi S, Iwase T, Kohno N, Ishikawa T, Taguchi T, Takahashi M, Horiguchi J, Nakamura S, Hozumi Y, Fukunaga M, Noguchi S. Efficacy of zoledronic acid in postmenopausal Japanese women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole: 12-month results. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Feb 4.
- )
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

研究分担課題名 悪性リンパ腫をはじめとする臨床データの提供

研究分担者 照井康仁 公益財団法人がん研究会 有明病院 血液腫瘍科 担当部長

研究要旨 悪性リンパ腫をはじめとする臨床データバンクを構築し、臨床検体を用いた様々な解析と照らし合わせながら、疾患の病態、予後に関する結果に導いた。

#### A. 研究目的

悪性リンパ腫は年々増加しており、WHO 分類による組織型の多様性が指摘されてきているが、様々な多剤併用療法の開発や新規分指標的薬剤の進歩により、リンパ腫患者の予後は改善されてきた。特に B 細胞表面上にある CD20 抗原に対するマウスヒトキメラ型モノクローナル抗体である rituximab は抗悪性腫瘍薬との併用にて有効な成績が報告されている。しかし日本におけるリンパ腫疾患の病態や予後に迫る報告は数少ない。

本研究の目的は、臨床データバンクを構築し、リンパ節や血液、胸水などの臨床検体のデータを効率的に融合し、日本におけるリンパ腫疾患の病態や予後などの関連性を見いだすことである。

#### B. 研究方法

2011 年度の血液がん新規患者数 380 例を対象に臨床データバンクを構築し、リンパ節や血液、胸水などの臨床検体データと融合させた。

##### 研究方法

##### I. 臨床データバンクの構築

新規患者の年齢、性別、臨床症状、血算と生化学検査などの検査値、病理診断（細胞表面マーカー、遺伝子再構成、染色体異常

を含む）を PC 内に匿名で入力、保存した。

##### II. 臨床検体データバンクの構築

血液、胸水、リンパ節細胞浮遊液などの臨床検体からリンパ腫細胞を分離し、リツキシマブの感受性試験、CD20 遺伝子変異解析などが施行された。

##### （倫理面への配慮）

本研究は、Cancer Board の審議を経て調査計画書がまとまった後、Tumor Board に提出する。その後 Scientific Review Board (SRB) にて化学療法専門医による審査が通過された後、Institutional Review Board (IRB) にて弁護士など一般人を含む機関にて本研究の倫理性を審議され承認された上で、研究が開始することになる。

#### C. 研究結果

##### I. 臨床データバンク

2010 年度の血液がん新規患者数 380 例中、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 182 例と最も多く、次いでろ胞性リンパ腫 52 例、MALT リンパ腫 44 例であった。一方、T 細胞性リンパ腫は 10% 程度であった。

##### II. 臨床検体データバンク

血液、胸水、リンパ節細胞浮遊液などの臨床検体からリンパ腫細胞によるリツキシマブの感受性試験では CD20 の発現増強と感受性が正の相関を示した。また CD20 遺伝子変異で、CD20 タンパクの発現低下に関する遺伝子変異がみとめられた。

#### D. 考察

臨床データベースを構築し、リンパ節や血液、胸水などの臨床検体のデータを効率的に融合を試みた。日本におけるリンパ腫疾患の病態や予後などの関連性を見いだすことにおいて有用であった。

#### E. 結論

今後、臨床データベースと臨床検体のデータベースを広げることで、様々な解析が可能となる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Suzuki K, Terui Y, Nakano K, Nara E, Nasu K, Ueda K, Nishimura N, Mishima Y, Sakajiri S, Yokoyama M, Takahashi S, Hatake K. High thymidine kinase activity is a strong predictive factor for poor prognosis in PTCLs treated by CHOP. *Leuk Lymphoma*. 2011 Oct 31. [Epub ahead of print]

2) 照井康仁 副作用対策におけるチーム医療の意義 分子標的治療薬の副作用のマネジメント 弦間昭彦編集 南江堂 15-22、2011

3) 照井康仁 2. ホジキンリンパ腫治療の最近の進歩 *Annual Review 血液* 2011 中外医学社 129-136、2011

4) 照井康仁 血液腫瘍治療薬 新薬展望 2011 医薬ジャーナル 197-202、2011

5) 照井康仁 リツキシマブはB細胞受容体シグナルを抑制する 血液内科

62(2) 226-230、2011

6) 照井康仁 CHAPTER6 悪性リンパ腫 -悪性リンパ腫 化学療法選択の原則- 外来癌化学療法クリニカルパス実例集 メディカルレビュー社 180-184、2011

7) 照井康仁 CHAPTER7 白血病 -白血病 化学療法選択の原則- 外来癌化学療法クリニカルパス実例集 メディカルレビュー社 204-205、2011

8) 照井康仁 CHAPTER8 多発性骨髄腫 -多発性骨髄腫 化学療法選択の原則- 外来癌化学療法クリニカルパス実例集 メディカルレビュー社 221-222、2011

9) 照井康仁 2. 治療関連合併症・悪性腫瘍 IV. 予後と病診連携 *日本内科学会雑誌* 第100巻 第7号 1909-1916、2011

10) 照井康仁 外来化学療法の運営 第73回日本血液学会学術集会 教育講演 S-4 基本シリーズ 臨床血液 第52巻 第10号 56-61、2011

##### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

研究要旨 転移性腎細胞がんに対する分子標的治療薬スニチニブの効果予測因子について、臨床的側面からおよび *in vitro*, *in vivo* での実験から検討した。腎がん骨転移は他臓器の転移と比較して予後不良とは言えないこと、Hb, LDH, Ca, PS, 診断から治療開始までの期間などのいわゆる MSKCC 危険因子は分子標的治療時代においても有効である。などの事象を確認し論文報告をした。

#### A. 研究目的

転移性腎細胞癌に対する治療アルゴリズムの設立のために、① 分子標的治療薬の効果と副作用に関する因子、② 治療効果に関するバイオマーカーの同定、③ 臨床にて評価が困難な骨転移に関する効果を *in vivo* にて評価することを目的とする。

#### B. 研究方法

臨床症例からの後方視的観察および腎細胞がん細胞株を用いて *in vitro* および *in vivo* にて解析した。臨床材料を用いる実験では「泌尿器科腫瘍組織での遺伝子異常と発現解析」として IRB に申告し承認を得た。

#### C. 研究結果、D. 考察、E. 結論

- 1) 腎がん組織の病理学的検索および分子生物学的検証にて腎がんにも ALK 融合遺伝子ががん化に関与することがわかった。
- 2) 骨転移を有する腎がん症例について後方視的に解析を行った。PS 不良、Hb 低下、血清 LDH 上昇、高 Ca 血症および 1 年以内の腎細胞癌診断から初期全身治療までの期間や、腎摘除歴無しと脳転移が予後不良因子として抽出された
- 3) 治療因子はすべて予後良好群となり、特にゾレドロン酸使用例は生存期間が長かった。
- 4) 分子標的治療が行われた転移性腎細胞癌症例についての後方視的解析では、

PS 不良、Hb 低下、血清 LDH 上昇、高 Ca 血症および 1 年以内の腎細胞癌診断から初期全身治療までの期間などの MSKCC 因子が予後不良因子として抽出された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1, 論文発表

【原著】

【英文】

- 1 Maita S, Yuasa T, Tsuchiya N, Mitobe M, Narita S, Horikawa Y, Hatake K, Fukui I, Kimura S, Maekawa T, Habuchi T. Antitumor effect of sunitinib against skeletal metastatic renal cell carcinoma through inhibition of osteoclast function. *Int J Cancer* 2012;130:677-84.
- 2 Yuasa T, Tsuchiya N, Horikawa Y, Narita S, Inoue T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Takahashi S, Hatake K, Fukui I, Habuchi T. Clinical Efficacy and Prognostic Factors for Overall Survival in Japanese Patients with Metastatic Renal Cell Cancer Treated with Sunitinib. *BJU int.* (in press).
- 3 Yuasa T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Takahashi S, Hatake K, Fukui I. Treatment Outcome and Prognostic Factors of the Patients with Renal Cell Cancer Bone Metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28: 405-11.



- 4 Yuasa T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Nakano K, Kodaira M, Takahashi S, Hatake K, Inamura K, Ishikawa Y, Fukui I. Tumor Size is a Potential Predictor of the Response to Tyrosine Kinase Inhibitors in Renal Cell Cancer. *Urology* 2011; 77: 831-5.
- 5 Sugawara S, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y, Takeuchi K. Identification of ALK fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by intercalated antibody-enhanced polymer method. *Cancer* (in press).
- 6 Urakami S, Yonese J, Yamamoto S, Yuasa T, Kitsukawa S, Numao N, Kubo Y, Ito M, Sukegawa G, Yasuda Y, Ishikawa Y, Fukui I. Outcome of Antegrade Radical Prostatectomy with Intended Wide Resection in Prostate Cancer Patients with a Preoperative Serum PSA Level >100 ng/ml. *Urol Int.* 2011;87:175-81.
- 7 Ito M, Saito K, Yasuda Y, Sukegawa G, Kubo Y, Numao N, Kitsukawa S, Urakami S, Yuasa T, Yamamoto S, Yonese J, Fukui I. Prognostic Impact of C-reactive Protein for Determining Overall Survival of Patients With Castration-resistant Prostate Cancer Treated With Docetaxel. *Urology.* 2011;78:1131-5.
- 8 Narita S, Tsuchiya N, Yuasa T, Maita S, Obara T, Numakura K, Tsuruta H, Saito M, Inoue T, Horikawa Y, Satoh S, Habuchi T. Outcome, clinical prognostic factors and genetic predictors of adverse reactions of intermittent combination chemotherapy with docetaxel, estramustine phosphate and carboplatin for castration-resistant prostate cancer. *Int J Clin Oncol* 2011 (in press).
- 9 Saito M, Tsuchiya N, Maita S, Numakura K, Obara T, Tsuruta H, Kumazawa T, Inoue T, Narita S, Horikawa Y, Yuasa T, Satoh S, Habuchi T. What Is the Most Preferred Wound Site for Laparoscopic Donor Nephrectomy?: A Questionnaire Assessment. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2011; 21: 511-5.
- 【和文】
- 10 湯浅健、羽瀧友則 膀胱癌・病因 新しい診断と治療のABC 腎癌・膀胱癌. 編集:木原和徳 最新医学社, 東京, 2011 pp.143-152.
- 11 湯浅健、羽瀧友則 腎がん・尿路がん・膀胱がん がん化学療法の進歩. 編集:江口研二 医薬ジャーナル社, 大阪, 2011 pp.116-124.
- 12 湯浅健 (編) 最新化学療法レジメン 泌尿器がん メジカルビュー社 2011年
- 【総説】
- 【英文】
- 29 Yuasa T, Takahashi S, Hatake K, Yonese J, Fukui I. Biomarkers to Predict Response to Sunitinib Therapy and Prognosis in Metastatic Renal Cell Cancer. *Cancer Science*;2011, 102:1949-57.
- 30 Yuasa T, Fujii Y, Takahashi S, Fukui I, Yonese J. Molecular targeted therapies for patients with metastatic renal cell cancer. *Translational Med* (in press).
- 【和文】
- 31 湯浅健【腎細胞癌の分子標的治療】 mTOR 阻害剤:everolimus 医学のあゆみ 2011 236, 107-10.
- 32 湯浅健【クイックマスター 泌尿器科の病気・治療・ケア】 抗がん化学療法 泌尿器ケア 2011 16, 376-377.
- 33 高橋俊二, 湯浅健, 福井巖 前立腺がんの骨転移に対する治療 update 前立腺癌骨転移の薬物治療 腫瘍内科の立場から 泌尿器外科 24 巻 8 号 Page1275-1277(2011)
- 34 湯浅健, 羽瀧友則【がん化学療法の進歩】 各論 臓器別がん治療 腎がん・尿路がん・膀胱がん 化学療法の領域 27 巻増刊 Page1180-1188(2011)
- 35 湯浅健, 高橋俊二 【進行性腎癌に対する分子標的治療薬・薬剤選択ガイド】 分

子標的治療の副作用マネージメントの  
要点は? 臨床泌尿器科 66 巻 1 号  
Page77-82(2012)

【症例報告】

【英文】

- 36 Numakura K, Tsuchiya N, Yuasa T, Saito M, Obara T, Tsuruta H, Narita S, Horikawa Y, Satoh S, Habuchi T. A case study of metastatic Xp11.2 translocation renal cell carcinoma effectively treated with sunitinib. *Int J Clin Oncol* 2011;16:577-80.

学会報告

【海外】

- 1 Yuasa T, Maita S, Tsuchiya N, Hatake K, Fukui I, Kimura S, Maekawa T, Habuchi T. Antitumor effect of sunitinib against skeletal metastatic renal cell carcinoma through inhibition of osteoclast function. The 8th Asia Pacific Oncology Summit Tokyo, 2011.
- 2 Numakura K, Tsuchiya N, Yuasa T, Inoue T, Narita S, Horikawa Y, Hatakeyama S, Ohyama C, Inoue T, Mimata H, Saito H, Arai Y, Kanno T, Kamba T, Ogawa O, Habuchi T. Clinical Characteristics of Xp11.2 Translocation Renal Cell Carcinoma in Adult Japanese Patients. The 105<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association of Urology. Washington DC, 2011.
- 3 Yasuda Y, Saito K, Sukegawa G, Ito M, Kubo Y, Yano A, Kitsukawa S, Yuasa T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Takahashi S, Fukui I. Prognostic Impact of Pretreatment C-Reactive Protein for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma treated with Tyrosine Kinase Inhibitors. The 105<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association of Urology. Washington DC, 2011.

【国内】

- 4 山本真也、米瀬淳二、浦上慎司、吉川慎一、矢野晶大、久保雄一、伊藤将也、助川玄、安田庸輔、湯浅健、河野敦、石川雄一、福井巖 Stage C (cT3N0M0) 前立腺癌の中期治療成績-前立腺全摘術 vs 放射線療法- 第 99 回日本泌尿器科学会総会 名古屋 2011
- 5 湯浅健、土谷順彦、浦上慎司、堀川洋平、成田伸太郎、井上高光、仲野兼司、高橋俊二、畠清彦、山本真也、米瀬淳二、福井巖 転移性腎細胞癌における分子標的治療-腫瘍縮小および予後予測因子の検討-第 99 回日本泌尿器科学会総会 名古屋 2011
- 6 久保雄一、山本真也、安田庸輔、助川玄、伊藤将也、矢野晶大、吉川慎一、湯浅健、浦上慎司、米瀬淳二、福井巖 ハイリスク前立腺癌に対する血管処理先行順行性広範前立腺全摘術の術者別治療成績 第 99 回日本泌尿器科学会総会 名古屋 2011
- 7 安田庸輔、齋藤一隆、助川玄、伊藤将也、久保雄一、矢野晶大、吉川慎一、湯浅健、浦上慎司、山本真也、米瀬淳二、高橋俊二、福井巖 C 反応性蛋白質は分子標的薬により治療された転移を有する腎細胞がんの予後予測因子である。第 99 回日本泌尿器科学会総会 名古屋 2011
- 8 伊藤将也、増田均、安田庸輔、助川玄、久保雄一、矢野晶大、吉川慎一、浦上慎司、湯浅健、山本真也、米瀬淳二、福井巖 前立腺針生検における癌検出予測因子としての Overactive Bladder Symptom Score の有用性 第 99 回日本泌尿器科学会総会 名古屋 2011
- 9 浦上慎司、米瀬淳二、山本真也、湯浅健、吉川慎一、矢野晶大、久

- 保雄一、伊藤将也、助川玄、安田庸輔、福井巖 去勢抵抗性前立腺癌に対する結合型エストロゲン製剤のパイロット試験 第99回日本泌尿器科学会総会 名古屋 2011
- 10 安田庸輔、藤井靖久、湯浅健、助川玄、伊藤将也、久保雄一、吉川慎一、浦上慎司、山本真也、米瀬淳二、福井巖 小径腎腫瘍の病理所見と解剖学的因子の関連について 第49回日本癌治療学会 2011年
- 11 山本真也、川上理、米瀬淳二、浦上慎司、吉川慎一、矢野晶大、久保雄一、伊藤将也、助川玄、安田庸輔、湯浅健、河野敦、石川雄一、福井巖 前立腺全摘標本における Non Specimen Confinement の術前予測因子の検討 第49回日本癌治療学会 2011年
- 12 浦上慎司、米瀬淳二、山本真也、湯浅健、吉川慎一、矢野晶大、久保雄一、伊藤将也、助川玄、安田庸輔、福井巖 がん研有明病院における pN1 前立腺癌の検討 第49回日本癌治療学会 2011年
- 13 米田真也、湯浅健、沼倉一幸、鶴田大、小原崇、井上高光、成田伸太郎、堀川洋平、土谷順彦、佐藤滋、福井巖、米瀬淳二、畠清彦、高橋俊二、羽瀧友則 転移性腎細胞癌の治療前腫瘍径とスニチニブの効果予測 第49回日本癌治療学会 2011年
- 14 山本真也、米瀬淳二、浦上慎司、吉川慎一、矢野晶大、久保雄一、伊藤将也、助川玄、安田庸輔、湯浅健、福井巖 術者間における片側神経温存前立腺全摘除術後の性機能回復の比較 日本性機能学会 2011
- 15 赤座英之、篠原信雄、湯浅健、富田善彦、藤元博行、庭川要、麦谷荘一、大園誠一郎、三木恒治、植村天受、野々村祝夫、高橋正幸、長谷川淑博、縣直樹、狩野宗英、植田英治、柴田篤、河合統介、内藤誠二 スーテントの転移性腎細胞癌患者における海外第三相試験および国内第二相試験結果のサブ解析 肺単独転移に対するスーテントの抗腫瘍効果 腎癌研究会 2011
- 16 高橋俊二、仲野兼司、湯浅健、畠清彦、樋口秀太郎、戸谷渡、杉崎崇人、濱敏弘 腎細胞癌に対する分子標的治療の有害事象対策 チーム医療 腎癌研究会 2011
- 17 浦上慎司、米瀬淳二、山本真也、湯浅健、吉川慎一、矢野晶大、久保雄一、伊藤将也、助川玄、安田庸輔、福井巖 去勢抵抗性前立腺癌に対する結合型エストロゲン製剤(プレマリン) パイロット試験 日本泌尿器科学会東部総会 2011
- 18 伊藤将也、増田均、安田庸輔、助川玄、久保雄一、矢野晶大、吉川慎一、浦上慎司、湯浅健、山本真也、米瀬淳二、福井巖 前立腺針生検における癌検出予測因子としての overactive bladder symptom score(OABSS)の有用性 日本泌尿器科学会東部総会 2011
- 19 安田庸輔、齋藤一隆、助川玄、伊藤将也、久保雄一、矢野晶大、吉川慎一、湯浅健、浦上慎司、山本真也、米瀬淳二、高橋俊二、福井巖 C反応性蛋白(CRP)は分子標的薬により治療された転移を有する腎細胞癌の予後予測因子である 日本泌尿器科学会東部総会 2011
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)  
なし。

研究要旨 Bevacizumab は、標的細胞が血管内皮細胞であることと化学療法薬との併用投与のため、効果予測因子の探索は非常に困難である。末梢循環血管内皮細胞 (Circulating endothelial cell: CEC) の phenotype および末梢循環血管内皮前駆細胞 (Circulating endothelial progenitor: CEP) が bevacizumab の効果予測因子であるか検討した。

#### A. 研究目的

転移・再発大腸癌患者の予後は、新しい化学療法薬の進歩により改善されてきている。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対するモノクローナル抗体である bevacizumab は、FOLFOX [Leucovorin (LV) / 5-fluorouracil (5-FU) / oxaliplatin] との併用にて有効な成績が報告されている。FOLFOX または FOLFOX+bevacizumab において、末梢循環大腸癌細胞 (Circulating tumor cell: CTC) が3個以上の症例は治療効果を認めない事を報告した (Matsusaka S, et al: Cancer Sci 2010) が、bevacizumab の治療効果の予測は不可能であった。Bevacizumab はこれまでの薬剤と作用機序が異なり、標的細胞が血管内皮細胞であることと化学療法薬との併用投与のため、bevacizumab の効果予測因子の探索は非常に困難である。1st line における化学療法薬+bevacizumab が耐性になった場合、2nd line として新たな化学療法薬に bevacizumab を併用すべきか予測不能で、臨床面で早急に解決すべき問題である。Bevacizumab 併用療法において、治療開始前の末梢循環血管内皮細胞 (Circulating endothelial cell: CEC) が低値症例は、高値症例に比べ無増悪生存期間 (progression-free survival: PFS) および全生存期間 (overall survival: OS) が有意

に延長する (Matsusaka S, et al: Cancer Chemother Pharmacol 2011) この研究研究結果をさらに発展させ、CEC phenotype および末梢循環血管内皮前駆細胞 (Circulating endothelial progenitor: CEP) が bevacizumab の効果予測因子であるか検討した。

#### B. 研究方法

FOLFOX+bevacizumab 投与症例における CEC および CEP を、フローサイトメトリーを用いて経時的 (治療開始前、投与4日目、2コース開始前) に測定した。さらに血管内皮細胞については、VEGFR1、VEGFR2、Tie-2 および CXCR4 の発現を解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、Cancer Board の審議を経て研究計画書がまとまった後、Tumor Board に提出した。その後 Scientific (SRB) にて化学療法専門医による審査が通過された後、Institutional Review Board (IRB) である弁護士など一般人を含む機関にて本研究の倫理性が審議されたのち承認されている。

#### C. 研究結果

治療無効 (PD) 症例は非無効 (non-PD) 症例に比べ有意に治療開始前の CXCR4 陽性 CEC 値が高値を示した。治療開始前の CXCR4 陽