

性 CEC 値 が低値症例は、高値症例に比べ PFS および OS が有意に延長した。投与 4 日目の CEP 値が 0.04%未満の症例は、CEP 値が 0.04%以上の症例に比べて、PFS および OS が有意に延長した。

D. 考察

治療開始前の CXCR4+CEC 値が 20%以上、または投与 4 日目の CEP 値が 0.04%以上である FOLFOX+bevacizumab 投与症例は、bevacizumab を併用しない場合とほぼ同等の有効性しか認められず、bevacizumab の投与の有用性はないことが示唆された。

E. 結論

治療開始前の CXCR4+CEC 値および投与 4 日目の CEP 値は、bevacizumab バイオマーカーとして有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **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.
2. **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.

3. **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
4. Suenaga M, **Matsusaka S**, Ueno M, Yamamoto N, Shinozaki E, Mizunuma N, Yamaguchi T, Hatake K. Predictors of the efficacy of FOLFIRI plus bevacizumab as second-line treatment in metastatic colorectal cancer patients. *Surgery Today*. 41(8):1067-74, 2011.
5. Suenaga M, **Matsusaka S**, Watanabe T, Kuboki Y, Shinozaki E, Chin K, Mizunuma N, Ueno M, Yamaguchi T, Hatake K. How do we apply adjuvant FOLFOX to Japanese patients with curatively resected colorectal cancer? *Asia Pac J Clin Oncol*. 7(2):129-35, 2011.

6. Matsusaka S, Chin K, Ogura M, Suenaga M, Shinozaki E, Mishima Y, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci.* 101(4):1067-71, 2010. ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium, San-Francisco, 2010
7. Suenaga M, Mizunuma N, Kobayashi K, Shinozaki E, Matsusaka S, Chin K, Kuboki Y, Ichimura T, Ozaka M, Ogura M, Fujiwara Y, Matsueda K, Konishi E, Hatake K. Management of venous thromboembolism in colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Med Oncol.* 27(3):807-14, 2010. ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium, San-Francisco, 2011
- 松阪 諭 CRO と SMO Drug Delivery System 25(6): 615-616, 2010
- 松阪 諭 Bevacizumab のバイオマーカー 腫瘍内科 6(3): 261-265, 2010
- 松阪 諭 CTC によるトランスレーショナルレサーチ 細胞工学別冊がん転移臨床と研究の羅針盤 176-179, 2010
2. 学会発表  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
1. Matsusaka S, et al. Are circulating tumor cells (CTC) and EGFR status of CTC useful as a surrogate marker for determining response to cetuximab in metastatic colorectal cancer? ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium, San-Francisco, 2010
2. Matsusaka S, et al. Use of day 4 CEP and baseline CXCR4 plus CEC as predictive markers for bevacizumab in mCRC. ASCO annual meeting, Chicago, 2010
3. Matsusaka S, et al. Use of circulating tumor cells to predict response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium, San-Francisco, 2011
4. Matsusaka S, et al. Tie2-expressing myeloid cells are predictive marker for bevacizumab-containing chemotherapy in metastatic colorectal cancer. The European Multidisciplinary Cancer Congress, Stockholm, 2011
- 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

研究課題名

「検体からの細胞精製、ADCC 測定、イメージング画像記録」

研究分担者 三嶋 雄二 （公財）がん研究会癌化学療法センター臨床部 研究員

研究要旨 癌研有明病院において同意を得た患者様より提供された新鮮臨床検体より腫瘍細胞にダメージを与えることなく腫瘍細胞を精製し、バイオイメージングにより薬剤感受性試験、バイオマーカーとなる分子の発現、遺伝子変異を解析する。

#### A. 研究目的

本分担課題は、本研究課題の「バイオイメージングによる ex vivo 評価システムの開発」に向けて、主に抗体医薬の薬効評価系の基盤技術の開発とその技術を応用した評価系を用いて、実際の臨床腫瘍標本を用いた評価系のバリデーションとデータの蓄積を目的とする。

#### B. 研究方法

（検体処理）臨床検体（切除腫瘍、末梢血、骨髓穿刺生検、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、骨髓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）

- 1) ヒト検体を対象とする研究の施行にあたっては、ヘルシンキ宣言に則るとともに、施設内倫理委員会に申請し、その承認を得る。
- 2) ヒト検体を採取する際には、被験者個人のプライバシーの保護、検体提供の任意性、提供を受けた検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度などについて、被験者ないしはその保護者に十分に説明した上で、書面による同意を得る。
- 3) 被験者由来のヒト検体は番号と記号で標識し、被験者の個人情報と検体情報を分離して取り扱う
- 4) 研究の結果は専門雑誌や学術講演会などで公表を予定しているが、その場合、学術的に必要な項目に限定し、被験者の特定につながる情報を公開しない。

#### C. 研究結果

(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)。

(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。

#### D. 考察

本年度は、昨年度に引き続き臨床検体の採取、匿名化、精製、解析、培養、保存に関する一連の処理工程をルーチン化し、解析データを取得した。本年度の解析症例数は血液腫瘍、消化器腫瘍、乳癌などの症例で総計 100 症例を超える検体の処理と解析を実施した。

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

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

High reproducible ADCC analysis revealed a competitive relation between ADCC and CDC and differences between FcγR11la polymorphism.

Mishima Y, et al. International Immunology (in press)

##### 2. 学会発表

○日本癌学会総会 ポスター

70<sup>th</sup> Annual meeting of the JCA-PROCEEDINGS- p497, (2011)

○102<sup>nd</sup> AACR Annual meeting

Proceedings Apr. 2-6; p383, (2011)

○EORTC-NCI-AACR Symposium

Proceedings Nov. 12-16; p203, (2011)

(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. 特許出願

1) 「METHOD OF ANALYZING GENETICALLY ABNORMAL CELLS」( 米国 13/290231)

(欧州 11008830.9)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

研究要旨 肺癌をはじめとする多くの癌で、チロシンキナーゼ受容体（RTK）やその下流因子の阻害薬が注目されている。そうした阻害薬の作用機序を解明し、新たな阻害薬を開発するには、RTK 下流のシグナル伝達の解明が必要である。RTK 下流シグナル伝達経路は、PI3K-AKT 経路、RAS-ERK 経路、Stat 経路の 3 つがあるが、これまでは前 2 者が主たる研究の対象となってきた。また、研究材料としては主として細胞株が使われてきた。本研究では、材料としては手術的に摘出された肺癌を用い、RTK 下流のシグナル伝達経路として Stat 経路に注目した。材料は、浸潤性肺腺癌 212 例、Stat シグナル発現はリン酸化抗体を用いて免疫染色により検討し、臨床病理学的事項、癌遺伝子変異、TTF-1 等と相関を検討した。その結果、リン酸化 Stat の発現は、早期の癌、喫煙指数が少ない、分化度が高い、乳頭状の組織像、TTF-1 陽性の群と、それぞれ有意に相関していた。癌遺伝子の変異では、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。pStat3 の発現は遺伝子変異と有意に相関していた。RTK 下流因子の評価には、リン酸化抗体の免疫染色が有用である。

#### A. 研究目的

肺癌の治療における gefitinib の劇的な成功以来、多くの臓器の癌で、チロシンキナーゼ受容体（RTK）ないしその下流因子の阻害薬が注目されている。実際にいくつかの治療薬も登場してきている。そうした阻害薬の作用機序を解明し、新たな薬剤を開発するには、癌において RTK 下流のシグナルがどのように活性化されているかを知る必要がある。RTK 下流のシグナル経路としては、PI3K-AKT 経路、RAS-ERK 経路および Stat 経路がある。しかしこれまでは、前 2 者の経路が注目され、Stat 経路の研究はあまり進んでいなかった。また、研究材料としても細胞株を用いた研究が殆どであった。

本研究では、材料として手術的に摘出された肺癌を用いて Stat 経路の活性化状況を調べた。

#### B. 研究方法

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、癌遺伝子変異（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, pFoxO1/03a）、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。

（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

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。

上記の因子を用いて、相関を多変量解析で調べたところ、乳頭状の組織像、非ないし軽度喫煙だけが独立して pStat3 発現と相関していた。その他の因子、たとえば腫瘍径、EGFR 変異、病期、分化度、脈管侵襲などは残らなかった。

#### 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高進していた。

#### E. 結論

Stat 経路発現の検討には、リン酸化抗体が有用であった。進行癌では、Stat 経路の活性化は相対的に少ないと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ishikawa N, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishii A, Goto M, Ishikawa Y, Asaka R, Matsuura M, Hatamochi A, Kuroiwa M, Takubo K. Accelerated in vivo epidermal telomere loss in Werner syndrome. *Aging (Albany NY)*. 2011;3:417-29.

Tsuji K, Ishikawa Y, Imamura T. Technique for differentiating alveolar soft part sarcoma from other tumors in paraffin-embedded tissue: comparison of immunohistochemistry for TFE3 and CD147 and of reverse transcription polymerase chain reaction for ASPSCR1-TFE3 fusion transcript. *Hum Pathol*. 2011 Aug 9. [Epub ahead of print]

Sakao Y, Okumura S, Mun M-y, Uehara H, Ishikawa Y, Nakagawa K. The impact of superior mediastinal lymph node metastases on prognosis in non-small cell lung cancer located in the right middle lobe. *J Thorac Oncol* 2011 Mar;6(3):494-9.

Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK-fusion identification. *Clin Cancer Res*. 2011;17:3341-8.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K,



Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011; 6:244-85.

Kudo K, Ohyanagi F, Horiike A, Miyauchi E, Yanagitani N, Hoshi R, Satoh Y, Motoi N, Hamanaka W, Ishikawa Y, Mun M, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Horai T, Nishio M. Clinicopathological findings of non-small-cell lung cancer with high serum progastrin-releasing peptide concentrations. *Lung Cancer* 74: 401-4, 2011

Numao N, Kawakami S, Sakura M, Yoshida S, Koga F, Saito K, Masuda H, Fujii Y, Yamamoto S, Yonese J, Ishikawa Y, Fukui I, Kihara K. Characteristics and clinical significance of prostate cancers missed by initial transrectal 12-core biopsy. *BJU Int.* 2011 Sep 21. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10427.x. [Epub ahead of print]

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(2):175-81. Epub 2011 Aug 18.

佐藤征二郎, 石川雄一, 土屋了介. 健康特集「肺癌」. 家族の元気をつくる Health Salon, 2011年1月号 (No. 255), pp. 5-7

宮内栄作, 工藤慶太, 星利良, 古田則行, 平井康夫, 元井紀子, 石川雄一, 宝来威. 肺野に孤立性陰影を認めた悪性胸膜中皮腫の1例. *日本臨床細胞学会雑誌*, 50(2); 115-9, 2011.

稲村健太郎, 元井紀子, 石川雄一. *トラ*

ンスクリプトームによる病態解析. 第3部 病理組織検体を用いたオーム研究: 疾患関連分子同定への挑戦. *病理と臨床* 29: 臨時増刊号 522-528, 2011

石川雄一. 細気管支肺胞上皮癌とは、どのような癌ですか? 3. 肺癌の病理と分類、弦間昭彦 (編著)、*肺癌診療 Q & A*, pp.24-25, 2011、中外医学社、東京。

石川雄一. ALK 融合遺伝子肺癌にはどのような臨床病理学的特徴がありますか? 3. 肺癌の病理と分類、弦間昭彦 (編著)、*肺癌診療 Q & A*, pp.24-25, 2011、中外医学社、東京。

石川雄一、野口雅之. 現在の組織分類には、どのような問題点がありますか? 3. 肺癌の病理と分類、弦間昭彦 (編著)、*肺癌診療 Q & A*, pp.24-25, 2011、中外医学社、東京。

小野宏、石川雄一. 3. 肺疾患の概要と鑑別診断. 小細胞癌. 青笹克之、松原修 (編) 「*癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌*」, pp. 140-148, 2011、中山書店、東京

佐藤征二郎、石川雄一. 7. 実際の症例. 症例2, EGFR 変異肺腺癌. 青笹克之、松原修 (編) 「*癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌*」, pp. 316-320, 2011、中山書店、東京

齋藤雄一、石川雄一. 7. 実際の症例. 症例4, 肺線維症に伴う肺癌. 青笹克之、松原修 (編) 「*癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌*」, pp. 326-331, 2011、中山書店、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
記載可能なものなし。
2. 実用新案登録  
記載可能なものなし。
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  
研究課題名 悪性リンパ腫、肺癌における ALK など分子標的の解析

研究分担者 竹内賢吾（公財）がん研究会 がん研究所 病理部

研究要旨

近年、様々な腫瘍で様々な ALK 融合遺伝子が発見されている。研究分担者は、ALK 融合遺伝子陽性腫瘍に対して独自に開発した診断法・解析法や、開発の過程で得たノウハウを用い、肺炎症性筋線維芽細胞腫（IMT）における新たな ALK 融合遺伝子の同定を行った。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) 法で再検討したところ陽性となった。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ところ、新規パートナー-protein-tyrosine phosphatase, receptor-type, F polypeptide-interacting protein-binding protein 1 (PPFIBP1) を 1 例に同定した。PPFIBP1-ALK 融合遺伝子の存在は RT-PCR, genomic PCR, および FISH により確認された。PPFIBP1-ALK を導入したマウス線維芽細胞 3T3 を用いて、フォーカスフォーメーションアッセイ、マウス皮下移植アッセイにより、PPFIBP1-ALK の造腫瘍能を確認した。もう一例も PPFIBP1-ALK を有していることが FISH により確認された。現在の IMT における ALK 陽性率は、iAEP 法などの高感度法で再検討する必要がある。新規 ALK 融合は IMT 以外にも見つかってきている。ALK 阻害剤の本格的実用化を迎えるに当たり、“ALK 陰性”腫瘍の再検討が必要であろうと考えられる。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。

A. 研究目的

病理診断医である分担研究者らは、ALK 陽性腫瘍の簡便な診断法として multiplex RT-PCR 法 (Clin Cancer Res. 2008;14:6618-6624.)、高感度免疫染色法 intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP) 法 (Clin Cancer Res. 2009;15:3143-3149.)、FISH 法を開発してきた。

本分担研究の目的は、これら独自に開発した診断法・解析法や、開発の過程で得たノウハウを用い、リンパ腫や肺癌における分子標的の探索および解析を行うことである。

ALK 阻害剤 crizotinib は ALK 融合陽性肺癌や ALK 融合陽性炎症性筋線維芽細胞腫

(inflammatory myofibroblastic tumor, IMT) 患者に対し実用化されている。しかしながら、その発現強度の低さから、従来の抗 ALK 免疫染色による ALK 融合の検出には問題がある。我々は、従来法により“ALK 陰性”とされた IMT 症例を、高感度法で再検討した（教科書的には IMT のおよそ 50%が ALK 陽性とされている）。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

2 例の“ALK 陰性”IMT はともに iAEP 法により ALK 陽性であることが判明した。5'-RACE 法により新規パートナー-protein-tyrosine phosphatase, receptor-type, F polypeptide-interacting protein-binding protein 1 (PPFIBP1) を 1 例に同定した。PPFIBP1-ALK 融合遺伝子の存在は RT-PCR, genomic PCR, および FISH により確認された。PPFIBP1-ALK を導入したマウス線維芽細胞 3T3 を用いて、フォーカスフォーメーションアッセイ、マウス皮下移植アッセイにより、PPFIBP1-ALK の造腫瘍能を確認した。驚いたことに、もう一例も PPFIBP1-ALK を有していることが FISH により確認された。

D. E. 考察&結論

iAEP 法などの高感度免疫染色法は免疫染色法の潜在的価値を引き上げることになるであろう。現在の IMT における ALK 陽性率は、iAEP 法などの高感度法で再検討する必要がある。ALK 阻害剤の恩恵にあずかる患者を正確に同定しなくてはならないからである。新規 ALK 融合は IMT 以外にも見つかってきている。ALK 阻害剤の本格的実用化を迎えるに当たり、“ALK 陰性”腫瘍の再検討が必要であろうと考えられる。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。

F. 健康危険情報  
該当せず。

G. 研究発表

1. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012.
2. Yamamoto M, Takeuchi K, Shimoji M, Maniwa T, Isaka M, Nakagawa K, Ohde Y, Kondo H, Nakajima T. Small non-mucinous bronchioloalveolar carcinoma with anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity: A novel ALK fusion gene? *Cancer Sci*. 2012;103:390-392.
3. Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y, Takeuchi K. Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method. *Cancer*. 2012.
4. Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, Nakagawara A. ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity. *Lung Cancer*. 2012;75:66-72.
5. Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H, Takeuchi K. KLC1-ALK: A novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS One*. 2012;7:e31323.
6. Kijima T, Takeuchi K, Tetsumoto S, Shimada K, Takahashi R, Hirata H, Nagatomo

I, Hoshino S, Takeda Y, Kida H, Goya S, Tachibana I, Kawase I. Favorable response to crizotinib in three patients with echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-type oncogene-positive non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2011;102:1602-1604.

7. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification. *Clin Cancer Res*. 2011;17:3341-3348.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当せず。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
照井康仁	副作用対策におけるチーム医療の意義	弦間昭彦 編集	分子標的治療薬の副作用のマネジメント	南江堂	東京	2011	15-22
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—	監修 嶋清彦	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	東京	2011	180-184
照井康仁	CHAPTER7 白血病 —白血病 化学療法選択の原則—	監修 嶋清彦	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	東京	2011	204-205
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—	監修 嶋清彦	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	東京	2011	221-222
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.
湯浅健、羽瀧友則	腎がん・尿路がん・膀胱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.
湯浅健	最新化学療法レジメン 泌尿器がん			メジカルビュー社		2011	
三嶋雄二	あなたのがんに効く薬が分かる時代に	高橋伸児/ 奥村美穂	がんを薬で治す	朝日新聞出版	東京	2011	3-5
石川雄一	細気管支肺胞上皮癌とは、どのような癌ですか？ 3. 肺癌の病理と分類	弦間昭彦(編著)	肺癌診療Q & A	中外医学社	東京	2011	24-25
石川雄一	ALK 融合遺伝子肺癌にはどのような臨床病理学的特	弦間昭彦(編著)	肺癌診療Q & A	中外医学社	東京	2011	24-25

	徴がありますか？ 3. 肺癌の病理と分類						
石川雄一、野口雅之	現在の組織分類には、どのような問題点がありますか？ 3. 肺癌の病理と分類	弦間昭彦(編著)	肺癌診療 Q & A	中外医学社	東京	2011	24-25
小野宏、石川雄一	3. 肺疾患の概要と鑑別診断。小細胞癌	青笹克之、松原修(編)	癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌	中山書店	東京	2011	140-148
佐藤征二郎、石川雄一	7. 実際の症例。症例 2, EGFR 変異肺腺癌	青笹克之、松原修(編)	癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌	中山書店	東京	2011	316-320
齋藤雄一、石川雄一	7. 実際の症例。症例 4, 肺線維症に伴う肺癌	青笹克之、松原修(編)	癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌	中山書店	東京	2011	326-331

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
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	77:	831-5.	2011
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
Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Kuniyoshi R, Takagi K, Terui Y,	Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to	Cancer Sci. ;	102(6)	1188-92	2011

Mizunuma N, <u>Hatake K.</u>	chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer.				
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
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	130	677-84.	2012
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).	
Yuji Mishima I, Yasuhito Terui I, Yuko Mishima, Ryoko Kuniyoshi I, Satoshi Matsusaka Mariko Mikuniya I, Kiyotsugu Kojima and Kiyohiko Hatake.	High reproducible ADCC analysis revealed a competitive relation between ADCC and CDC and differences between FcγRIIIa polymorphism.	Int. Immunol.	(in press)	doi: 10.1093/intimm/dxs048 First published online: March 21,	2012
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	17(4)	880-7.	2011
Yoshinori Ito, Koichi Nagasaki, Yoshio Miki, Takuji Iwase, Futoshi Akiyama, Masaaki Matsuura, Rie Horii,	Prospective randomized phase II study determines the clinical usefulness of genetic biomarkers for sensitivity to primary chemotherapy with	Cancer Science	102(1)	130-6	2011

Masujiro Makita, Nahomi Tokudome, Masaru Ushijima, Masataka Yoshimoto, Shunji Takahashi, Tetsuo Noda and Kiyohiko Hatake.	paclitaxel in breast cancer.				
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	28(4)	405-11.	2011
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.	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.	Ann Oncol.	23(5)	1341-7.	2012
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.	18(3)	195-202.	2011
Yuasa T, Takahashi S, Hatake K, Yonese J, Fukui	Biomarkers to predict response to sunitinib therapy and prognosis in metastatic renal cell cancer.	Cancer Sci.	102(11)	1949-57.	2011
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.		in press	2012
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.	53(5)	849-54.	2012
Sugawara S, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y,	Identification of ALK fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by intercalated antibody-enhanced polymer	Cancer		in press	



Takeuchi K.	method.				
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.	87	175-81.	2011
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.	78	1131-5.	2011
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		in press	2011
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	21	511-5.	2011
Yuasa T, Fujii Y, Takahashi S, Fukui I, Yonese J.	Molecular targeted therapies for patients with metastatic renal cell cancer.	Translational Med		in press	
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	16	577-80.	2011
Y Mishima, Y Terui, K Takeuchi, Y Matsumoto-Mishima, S Matsusaka, R Utsubo-Kuniyoshi, and K Hatakel	The identification of irreversible rituximab-resistant lymphoma caused by CD20 gene mutations	Blood Cancer J	1(4)	15-18	2011
Ishikawa N, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishii A, Goto M, Ishikawa Y, Asaka R, Matsuura M, Hatamochi A,	Accelerated in vivo epidermal telomere loss in Werner syndrome	Aging (Albany NY).	3(4)	417-29	2011

Kuroiwa M, Takubo K.					
Sakao Y, Okumura S, Mun M-y, Uehara H, Ishikawa Y, Nakagawa K.	The impact of superior mediastinal lymph node metastases on prognosis in non-small cell lung cancer located in the right middle lobe.	J Thorac Oncol	6(3)	494-9	2011
Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D.	International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma.	J Thorac Oncol.	6(2)	244-85	2011
Kudo K, Ohyanagi F, Horiike A, Miyauchi E, Yanagitani N, Hoshi R, Satoh Y, Motoi N, Hamanaka W, Ishikawa Y, Mun M, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Horai T, Nishio M.	Clinicopathological findings of non-small-cell lung cancer with high serum progastrin-releasing peptide concentrations.	Lung Cancer	74	401-4	2011
Numao N, Kawakami S, Sakura M, Yoshida S, Koga F, Saito K, Masuda H, Fujii Y, Yamamoto S, Yonese J, Ishikawa Y, Fukui I, Kihara K.	Characteristics and clinical significance of prostate cancers missed by initial transrectal 12-core biopsy.	BJU Int.			
Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y.	RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer.	Nat Med.			on line
Yamamoto M, Takeuchi K, Shimoji M, Maniwa T, Isaka M, Nakagawa K, Ohde Y, Kondo H, Nakajima T.	Small non-mucinous bronchioloalveolar carcinoma with anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity: A novel ALK fusion gene?	Cancer Sci	103	390-392	2012

Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y, Takeuchi K.	Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method.	Cancer			on line
Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, Nakagawara A.	ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity.	Lung Cancer	75	66-72	2012
Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H, Takeuchi K.	KLC1-ALK: A novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only.	PLoS One	7	e31323	2012
Kijima T, Takeuchi K, Tetsumoto S, Shimada K, Takahashi R, Hirata H, Nagatomo I, Hoshino S, Takeda Y, Kida H, Goya S, Tachibana I, Kawase I.	Favorable response to crizotinib in three patients with echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-type oncogene-positive non-small cell lung cancer.	Cancer Sci	102	1602-1604	2011
Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y.	Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification.	Clin Cancer Res.	17	3341-3348	2011
佐藤征二郎, 石川雄一, 土屋了介.	健康特集「肺癌」	家族の元気をつくる Health Salon	255	5-7	2011
宮内栄作, 工藤慶太, 星利良, 古田則行, 平井康夫, 元井紀子, 石川雄一, 宝来威.	肺野に孤立性陰影を認めた悪性胸膜中皮腫の1例	日本臨床細胞学会雑誌	50(2)	115-9	2011
稲村健太郎, 元井紀子, 石川雄一	トランスクリプトームによる病態解析. 第3部 病理組織検体を用いたオーム研究: 疾患関連分子同定への挑戦	病理と臨床	29: 臨時増刊号	522-528	2011
三嶋雄二	がん幹細胞のマーカーと Cancer Spheroid Complex	最新医学	66(3)	477-485	2011
三嶋雄二	22nd EORTC-NCI-AACR Symposium on "Molecular Targets and Cancer Therapeutics"	がん分子標的治療	9(2)	147-149	2011

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	236	107-10.	2011
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	16	376-377.	2011
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(8)	1275-1277	2011
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	1180-1188	2011
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(1)	77-82	2012