

- 年4月、盛岡浦上慎司、米瀬淳二、山本真也、湯浅健、吉川慎一、沼尾昇、久保雄一、伊藤将也、助川玄、福井巖 pN+前立腺癌における内分泌療法開始時期に関する検討 第48回日本癌治療学会総会、2010年10月、京都
- 30 湯浅健、安田庸輔、助川玄、伊藤将也、久保雄一、沼尾昇、吉川慎一、浦上慎司、山本真也、米瀬淳二、福井巖 骨転移の治療 骨転移を認めた腎がん患者の治療成績 第48回日本癌治療学会総会、2010年10月、京都
- 31 助川玄、沼尾昇、山本真也、安田庸輔、伊藤将也、久保雄一、吉川慎一、湯浅健、浦上慎司、米瀬淳二、福井巖 膀胱癌に対する膀胱全摘除術後上部尿路再発の頻度と危険因子の検討 第75回日本泌尿器科学会東部総会 宇都宮 2010
- 32 安田庸輔、山本真也、助川玄、伊藤将也、久保雄一、沼尾昇、吉川慎一、湯浅健、浦上慎司、米瀬淳二、福井巖 膀胱癌に対する血管茎処理先行広範膀胱全摘後の局所再発に関する検討 第75回日本泌尿器科学会東部総会 宇都宮 2010
- 33 高橋俊二、湯浅健、畠清彦 エストロゲンおよびSERMと骨代謝作用 新たな視点から アロマトーゼ阻害剤および抗アンドロゲン剤による骨代謝障害 第27回日本骨代謝学会学術集会 2010年
- 34 山本真也、米瀬淳二、浦上慎司、吉川慎一、沼尾昇、久保雄一、伊藤将也、助川玄、安田庸輔、湯浅健、福井巖 片側神経温存前立腺全摘除術後の性機能変化 日本性機能学会総会 2010年
- 35 湯浅健、仲野兼司、高橋俊二、畠清彦、米瀬淳二、福井巖 進行期腎細胞癌に対する分子標的治療の初期経験 第8回日本臨床腫瘍学会総会、2010年3月、東京
- 36 安田庸輔、湯浅健、助川玄、伊藤将也、久保雄一、沼尾昇、吉川慎一、浦上慎司、山本真也、米瀬淳二、福井巖 臨床病期T1腎癌の手術術式選択に及ぼす腫瘍側因子と手術合併症の検討 日本泌尿器科学会東部総会 2010
- 37 米田真也、湯浅健、小峰直樹、高橋誠、沼倉一幸、鶴田大、小原崇、齋藤満、成田伸太郎、堀川洋平、土谷順彦、佐藤滋、羽瀨友則 前立腺癌患者の骨密度に関する検討 日本泌尿器科学会東部総会 2010
- 38 山本真也、米瀬淳二、浦上慎司、吉川慎一、沼尾昇、久保雄一、伊藤将也、助川玄、安田庸輔、湯浅健、福井巖 排尿障害を合併した前立腺癌に対する前立腺全摘術後の排尿状態についての検討 日本泌尿器科学会東部総会 2010
- 39 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
- 40 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
- 41 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
- 42 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
- 43 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
- 44 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
- 45 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
- 46 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
- 47 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
- 48 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
- 49 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功能回復の比較 日本性機能学会 2011
- 50 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
- 51 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
- 52 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
- 53 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
- 54 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。

研究分担者 松阪 諭（公財）がん研究会明病院消化器センター消化器内科 医員

#### 研究要旨

消化器癌特に大腸癌に対する標準化学療法の予測因子の探索を目的とし、末梢循環癌細胞 (CTC)、末梢循環血管内皮細胞 (CEC) および末梢循環血管内皮前駆細胞 (CEP) に注目し、研究を行った。CTC は化学療法薬の効果予測因子であること、血管新生抑制剤の効果予測に CEC および CEP が有用であることを明らかにした。

#### A. 研究目的

大腸癌に対する化学療法薬として、オキサリプラチンの有効性が認められ、オキサリプラチン併用化学療法（FOLFOX, XELOX）が標準治療の一つとなった。バイオマーカーとして最も汎用されてきた腫瘍マーカーである CEA は、オキサリプラチン併用化学療法においては、治療効果良好な症例においても、投与後一過性に CEA が上昇することがあり、CEA 値による効果判定は行ってはならない事が報告されている。腫瘍マーカーにおける ASCO 勧告もあり、新規化学療法薬の開発により、腫瘍マーカー以外の有用なバイオマーカーの確立が必要である。さらに大腸癌化学療法における化学療法の飛躍的な効果を認めるに至る薬剤として、分子標的治療薬が重要である。その一つは血管新生抑制剤である bevacizumab である。Bevacizumab はこれまでの薬剤と異なる点は、標的とする細胞が血管内皮細胞である。さらに大腸がんにおいては、bevacizumab は単剤での有効性は示されなかったため、抗がん剤との併用による投与となる。このため、bevacizumab

の効果予測因子の探索は非常に困難である。癌細胞または血管内皮細胞を標的とする抗体医薬の開発により、化学療法薬の有効性を予測するバイオマーカーの重要性が高まってきた。これら抗体医薬を含む化学療法の治療効果を予測するバイオマーカーの探索が必要であり、末梢循環癌細胞 (CTC)、末梢循環血管内皮細胞 (CEC) および末梢循環血管内皮前駆細胞 (CEP) に注目し、研究を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. CTC 測定法

1.1. 末梢静脈血 10ml を採血し、保存剤入り専用採血管に注入する。検体は室温で保存し採血後 72 時間以内に解析を開始する。

1.2. 上皮細胞接着分子 Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) に対する抗体に鉄を結合させたものを細胞と反応させ磁気で収集し、上皮細胞を濃縮させる (CellSearch System)。

1.3. 核の認識は蛍光核酸染色 4,2-diamidino-2phenylindole dihydrochloride (DAPI) にて発色させて行う。

1.4. 上皮細胞の標識は phycoerthrin (PE) 蛍光標識した抗 cytokeratin 8,18,19 モノクローナル抗体を反応させて行う。

1.5. 白血球の認識は allophycocyan (APC) 蛍光標識した抗 CD45 モノクローナル抗体を反応させて行う。

1.6. 癌細胞の候補である cytokeratin 陽性、CD45 陰性細胞、DAPI 陽性細胞を CellSpotter Analyzer によって蛍光合成イメージで収集する。

1.7. 破損した癌細胞および断片のイメージを除外し、形態が保全された細胞を癌細胞として同定しカウントする。

## 2. CEC の測定法

2.1. 末梢静脈血 10ml を採血し、保存剤入り専用採血管に注入する。検体は室温で保存し、採血後 72 時間以内に解析を開始する。

2.2. CD146 に対する抗体に鉄を結合させたものを細胞と反応させ磁気で収集し、上皮細胞を濃縮させる (CellSearch System)。

2.3. 核の認識は蛍光核酸染色 4,2-diamidino-2phenylindole dihydrochloride (DAPI)にて発色させて行う。

2.4. 内皮細胞の標識は phycoerthrin (PE) 蛍光標識した抗 CD105 抗体を反応させて行う。

2.5. 白血球の認識は allophycocyan (APC) 蛍光標識した抗 CD45 モノクローナル抗体を反応させて行う。

2.6. CEC である CD105 陽性、CD45 陰性細胞、DAPI 陽性細胞を CellSpotter Analyzer によって蛍光合成イメージで収集する。

2.7. 破損した細胞および断片のイメージを除外し、形態が保全された細胞を同定しカウントする。

3. 治療開始時の CTC および CEC の測定

3.1. 治療開始予定患者に採血 20ml を行う。

4. 治療 2 週間後、1 ヶ月後、2 ヶ月後、4 ヶ月後の CTC および CEC の測定

4.1. 治療 2 週間後、1 ヶ月後、2 ヶ月後、4 ヶ月後に採血 20ml を行う。

5. フローサイトメーター法による解析

5.1. CEC は、CD146 抗体陽性、CD31 抗体陽性、CD133 陰性、CD45 抗体陰性の細胞として分類し、CEP は、CD146 抗体陽性、CD31 抗体陽性、CD133 陽性、CD45 抗体陰性の細胞として分類し測定する。

5.2. 採取された血液細胞の表面マーカー (CD146, CD31, CD133, CD34, CD105, CD45, VEGFR1, VEGFR2, CXCR4, Tie-2 等) の発現をフローサイトメーター法で解析する。

(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

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。さらに FOLFOX の効果療法群における CEA の一過性偽上昇の症例に対しても、CTC は治療開始 2 週間目 (2 コース開始前) に 3 以下になることを明らかにした。(Matsusaka S, et al:

Cancer Sci 2010) CTC は bevacizumab 併用化学療法の効果予測因子として有効であることが報告された。しかし FOLFOX においても、FOLFOX+bevacizumab においても、CTC が 3 以上の症例は治療効果を認めない事は明らかであるが、bevacizumab 自体の治療効果の予測は不可能であった。そこで末梢血中血管内皮細胞(Circulating endothelial cell: CEC)および血管内皮前駆細胞(Circulating endothelial progenitor: CEP)に注目した。Bevacizumab 併用療法において、治療開始前の CEC 値が低値症例は、高値症例に比べ PFS および OS が有意に延長する事を報告した。また、高値症例は FOLFOX 症例群の PFS とほぼ同じであり、Bevacizumab を併用する benefit を認めない事が示唆された。さらに bevacizumab 治療開始前の CXCR4 陽性 CEC 値が、さらに bevacizumab 治療開始前の CXCR4 陽性 CEC 値が、bevacizumab の治療効果予測因子であることを報告した。PD 症例は non-PD 症例に比べ有意に治療開始前の CXCR4 陽性 CEC が高値であること、治療開始前の CXCR4 陽性 CEC 値が低値症例は、高値症例に比べ PFS および OS が有意に延長する事を報告した。投与 4 日目の CEP 値が低値症例は、CEP 値が高値症例に比べて、PFS および OS が有意に延長することを報告した。

#### D. 考察

化学療法薬の効果予測判定が CTC 数の経時的変化により予測できることが多くの臨床研究から明らかになってきた。経時的・非侵襲的に CTC を検出することで、進行過程および治療経過中の癌細胞の表現型を評価できることから、CTC は、分子標的治療薬を含む新規薬剤の効果予測に有効なバイオマーカーになると考えられる。さらに今後の展開として、新規薬剤のバイオ

マーカーとして、微量がん細胞だけでなく、癌組織を形成する支持細胞に焦点を合わせる必要性も考察される。

#### E. 結論

CTC は化学療法薬の効果予測因子であること、血管新生抑制剤の効果予測に CEC および CEP が有用であることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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, 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.

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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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 F, Hatake K. Management of venous thromboembolism in colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Med Oncol*. 27(3):807-14, 2010.
- Suenaga M, Mizunuma N, Chin K, Matsusaka S, Shinozaki E, Oya M, Ueno M, Yamaguchi T, Muto T, Konishi F, Hatake K. Chemotherapy for small-bowel Adenocarcinoma at a single institution. *Surg Today*. 39(1):27-31, 2009.
- Suenaga M, Mizunuma N, Shouji D, Shinozaki E, Matsusaka S, Chin K, Oya M, Yamaguchi T, Muto T, Hatake K. Modified irinotecan plus bolus 5-fluorouracil/L-leucovorin for metastatic colorectal cancer at a single institution in Japan. *J Gastroenterol*. 43(11):842-8, 2009.
- 松阪 諭 抗体医薬に対するバイオマーカー 医学のあゆみ 228: 1105-1108, 2009
- 松阪 諭 CEC とベバシズマブ感受性予測 腫瘍内科 3: 229-232, 2009
- 松阪 諭 抗 VEGF モノクローナル抗体 Bevacizumab とバイオマーカー 大腸癌 FRONTIER 2: 39-43, 2009
- 松阪 諭 大腸癌化学療法のバイオマーカー 癌と化学療法 36(1): 11-14, 2009
- 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.  
Circulating Tumor Cells and Circulating Endothelial Cells are useful as surrogate markers for FOLFOX4 airtn or aithout bevacizumab in mCRC. ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium, San-Francisco, 2009
2. Matsusaka S, et al.  
Circulating tumor cells (CTCs) as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in advanced gastric cancer (AGC)

ASCO annual meeting, Orlando, FL, 2009

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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）がん研究会がん化学療法センター臨床部 研究員

研究要旨 がん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

本分担研究は、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

本分担研究の実施にあたり、研究の遂行の方法は、新鮮臨床検体から解析対象である腫瘍細胞を精製する行程〔検体処理〕と、精製生腫瘍細胞の特性のバイオイメージングを用いた評価〔特性解析〕、並びに精製腫瘍細胞より作成した3次元培養塊（spheroid）を用いた microarray の作成〔spheroid microarray 作成〕に大別される。以下に概要を示す。

〔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し腫瘍生細胞を精製する。精製細胞試料は直ちに〔特性解析〕および、〔spheroid microarray 作成〕3次元培養に供した。

〔特性解析〕

- 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した。評価により抗体療法に対する耐性例を選出し、作用機序解明にむけた解析に供した。
- 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した。

- 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した。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した。

（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。本研究に

において、再現性と利便性の高い ADCC 評価方法を確立した (関連論文 1 報)。B 細胞性リンパ腫に対する rituximab (抗 CD20 抗体) については、患者由来検体の ADCC および CDC 評価により、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)、臨床由来検体に対する ADCC、CDC の評価を実施している。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)。さらに rituximab 抵抗性機序の解明のため、CD20 分子の N 末端領域を認識するモノクローナル抗体を作成し、rituximab 抵抗性遺伝子変異を容易にスクリーニングできる系を開発した。本スクリーニング系は、上述の ADCC/CDC 評価により同定した耐性症例における臨床試料を用いてバリデーション研究を実施した。(関連特許 1 件、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。

本課題においてバイオマーカー探索を目的に表面抗原発現解析を行った。症例は、大腸癌 31 症例 (手術検体 12 例、胸水 or 腹水 19 例) 胃癌 36 症例 (胸水 or 腹水 36 例) 骨髄腫 12 症例 (骨髄生検 12 例) 乳癌 4 症例 (胸水 4 例) であった。

・大腸癌では、EGFR 陽性症例が 27/28 例 (27 例中 28 例)、CD133+細胞が 20% を超える腫瘍が 9/27 例、Axl の発現がある症例が、14/29 例、FGFR2 の発現がある細胞が 7/27 例であった。

・胃癌においては CD133+細胞が 20% を超

える腫瘍が 13/36 例、EGFR 陽性例が 29/36 例。AXL 陽性例が 17/36 例、FGFR2 陽性例が 9/36 例、Her2 陽性例が 7/36 例であった。

・骨髄腫における FGFR3 陽性例は、5 例中 12 例 (1 例解析不能) 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 遺伝子異常解析の有用な評価手法として FISH (fluorescent in situ hybridization) 法が用いられるが、腫瘍の存在率の極端に少ない末梢血中の CTC などを同手法で評価することは困難である。そこで、末梢血中の CTC を相対的に濃縮し免疫学的方法 (IHC) を施すことで CTC を識別し、さらに IHC で標識された細胞をそのまま FISH を施すことで、CTC の遺伝解析を可能にするプロトコルを作成した。ほんプロトコルでは、サイトケラチン陽性、CD45 陰性の有核細胞を CTC と定義し、これらの細胞を抗汎サイトケラチン抗体、抗 CD45 抗体、および DAPI による IHC を実施し、さらに Her-2 (+CDP17) 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 (関連特許 1 件)。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。本プロトコルにより本年度は 139 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判定した。

[spheroid microarray 作成]

精製生腫瘍検体試料 222 検体について、3 次元培養を試みた。臨床検体からの初代 3 次元培養は増殖速度が極めて緩やかであり、このうち、38 症例が本報告書作成時点まで培養を維持することが可能であった。さら

に、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)。

#### D. 考察

本研究課題では臨床検体の採取、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、実際に臨床検体より解析可能な状態の生腫瘍細胞を調製するステップ、細胞試料を癌種や検体に応じて①抗体医薬に対する ADCC 評価、②バイオマーカー探索のための表面抗原解析、③ CTC による低侵襲バイオプシーを実施するステップ、3次元初代培養から spheroid を作成し、spheroid microarray を作成するステップを実施した。臨床検体の精製ステップ、および①～③の各評価手法は本研究期間初年度に、ほぼ確立しバリデーションを実施し、第2-3年度において、データの収集と解析を実施した。ADCC 評価(解析①)では、主に非ホジキンリンパ腫において治療耐性機序の解析ならびに耐性症例の予測技術を提案するに至り、関連特許を申請した。表面抗原解析によるバイオマーカー探索(解析②)では、観察期間が十分ではなく、臨床情報との相関解析にいたっていないが、集積したデータを各癌種担当分担研究者と共有し、しかるべき時点で解析を実施する。CTC (解析③)では、イメージング技術を駆使し、CTC の遺伝子解析結果をデジタルデータとして保存する技術を確立し特許申請を行った。本手法により 100 例を超える症例データ取得し、疫学的にも重要な解析結果を得た。また第3年度には本技術を利用した臨床試験を開始した。

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 (英文誌、筆頭著者のみ)

An imaging-based rapid evaluation method for complement-dependent cytotoxicity discriminated clinical response to rituximab-containing chemotherapy.

Mishima Y, et al. Clinical Cancer research: 15, Issue: 15, Pages: 3624-32 (2009)

The identification of irreversible rituximab-resistant lymphoma caused by CD20 gene mutations.

Mishima Y, et al. Blood Cancer Journal Volume: 1, Issue: 4, Pages: e15-8 (2011)

High reproducible ADCC analysis revealed a competitive relation between ADCC and CDC and differences between FcγR11a polymorphism.

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

##### 2. 学会発表

2009

○日本分子標的治療研究会 口演  
第13回日本がん分子標的学会プログラム p27, (2009)

○日本癌学会総会 ポスター  
68<sup>th</sup> Annual meeting of the JCA-PROCEEDINGS- p459, (2009)

○AACR-NCI-EORTC Symposium 2010

○日本癌学会総会 ポスター  
69<sup>th</sup> Annual meeting of the JCA-PROCEEDINGS- p162, (2010)

○日本血液学会 口演  
臨床血液 51(9); p301, (2010)

○EORTC-NCI-AACR Symposium

EJC 8(7); p195, (2010)

○American Society of Hematology  
Blood 116(21); p4145, (2010)

2011

○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)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

1) 「遺伝子異常細胞の解析方法」（特願 2010-251107）

2) 「CD20 タンパク質の N 末端細胞質領域を認識するモノクローナル抗体およびハイブリドーマ」（特願 2010-271699）

3) 「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

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 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

研究分担者 石川雄一（公財）がん研究会がん研究所病理部 部長

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。本研究の 3 カ年では、手術的に摘出された肺腺癌組織を用いて、RTK 下流のシグナル伝達因子の活性化状況をリン酸化抗体を用いて検索した。どの検体でもリン酸化抗体はよく染色され、臨床検体でもその有用性が確かめられた。癌に固有のテーマとしては、(i)肺細気管支肺胞上皮癌（BAC）における喫煙の関与の程度、(ii) 肺腺癌における Stat 経路の活性化状況の調査、を遂行した。(i) では、119 例の AIS を用いて、喫煙歴などの臨床病理学的事項および癌遺伝子変化、さらに RTK 下流のシグナル伝達因子の活性化状況を検索した。その結果、喫煙者に発生した AIS と非喫煙者の AIS と殆ど同じ性質であった。(ii) では、212 例の浸潤性腺癌を用いて、pStat3 の発現と臨床病理学的事項、癌遺伝子変化、TTF-1 等と相関を検討したところ、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。

#### 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。

本研究ではまず、細気管支肺胞上皮癌（bronchioloalveolar carcinoma, i.e. adenocarcinoma in situ, AIS）における喫煙の関与の程度を、RTK 下流のシグナル伝達因子の活性化状況などを指標にして

調べた。AIS は一般には女性、非喫煙者に多いが、喫煙者や男性に発生することもあり、その実態は完全には理解されていない。喫煙者に発生した AIS は、喫煙とは無関係に、たまたま生じたものであって、その性質は非喫煙者の AIS と同じなのだろうか。本研究では、119 例の BAC を収集して、喫煙歴を含む臨床的病理学的背景を調査し、EGFR 変異を検索し、receptor tyrosine kinase (RTK) 下流のシグナル伝達因子の活性化を、リン酸化抗体による免疫染色を用いて検討した。

更に、浸潤性の肺腺癌における Stat 経路の活性化状況の調べるために、手術的に摘出された肺癌を用いてリン酸化 Stat3 抗体（pStat3）による免疫組織化学的検索を実施した。

#### B. 研究方法

(i) AIS と喫煙：1995 年から 2010 年に癌研病院で外科的に切除された原発性肺

癌 2,087 例のうち、腺癌は 1,549 例であり、そのうち 119 例 (7.8%) に AIS が見られた。比較対照群として、浸潤型腺癌 (n=1,430、Comp G1)、腺癌以外の非小細胞癌 (カルチノイドと気管支腺型の癌は除く) (n=438; Comp G2) を作成した。これまでの知見では、AIS 群、Comp G1、Comp G2 の順で、喫煙との相関が高まると推定される。これらの群において、性別比、喫煙率 (%) と喫煙量 (smoking index)、粘液型か否か、多重性および他の腫瘍の合併を調べ、さらに検体が使用できるものは EGFR 変異を検索した。さらに可能な範囲で、RTK 下流のシグナル伝達因子の発現状態を、パラフィン標本を用いた免疫染色により検索し、喫煙者 BAC と非喫煙者 BAC とでは差があるのかどうかを検討した。RTK 下流のシグナル伝達系は、大きく RAS-ERK 経路、PI3K-AKT 経路および STAT 経路に分けられるが、本研究では、phospho-ERK 抗体 (Thr202/ Tyr204, Rabbit, 20G11) および phospho-AKT 抗体 (Ser473, Rabbit, 736E11) (いずれも Cell Signaling 社) を用いて、ERK および AKT のリン酸化タンパクを検索した

(ii) 浸潤性肺腺癌における Stat 経路の活性化状況: 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) を用いた免疫染色で判定した。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, pFoxO1/3a)、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、pStat3 発現との相関を解析した。

(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

(i) AIS の 119 症例: 性別は F:M= 85:34 であった。男性比率は、BAC: Comp G1: Comp G2= 29: 50: 87(%)であった。全体の喫煙者率は、同じく 26: 48: 92 (%)であり、男性のみでは 68: 79: 95(%)、女性のみでは 9: 18: 71 (%)であった。各群の平均年齢は、61±10, 64±10, 67±9.0 であり、男女差はなかった。BAC 全体の平均径は 16±10 mm であった。組織学的に、9 例 (8%)が粘液型、21 例(18%)が多発性 BAC、13 例 (11%) が進行癌との合併例 (12 例は腺癌と、1 例は扁平上皮癌と合併)、21 例 (18%) は AAH を合併していた。EGFR 変異率は、男性例で 47% (14/30)、女性例で 67% (18/27) であった。EGFR 検索例全体 (n=57) では、変異陽性率は喫煙者で 57% (12/21)、非喫煙者で 56% (20/36) で、差はなかった。

RTK 下流のシグナル伝達因子の発現状態を検討するために、喫煙者例から 4 例 (平均年齢 57.8 才、F:M= 1:3, SI= 885 (600-1420)) 非喫煙者から 6 例 (平均年齢 65.8 才、F:M= 5:1) をランダムに選んだ。その結果、AKT 発現陽性は、喫煙者例で 0%、非喫煙者例で 16% (1/6) であり、MAPK 発現は、各々 50% (2/4)、50% (3/6) であった。更に下流の因子では、mTOR と p70S6K 発現はいずれも、各々 75% (3/4)、83% (5/6)、FKHR 発現はともに 0%、GSK3β は各々 25% (1/4)、33% (2/6) であった。また、肺癌では cell lineage (細胞起源ないし分化傾向) が原因との相関で重要であるが、AIS は全例で TTF-1(+)であり、いわゆる非喫煙者型の癌、換言すれば、TRU type (terminal respiratory unit type) の癌であった。

(ii) Stat 経路の活性化: 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

り:なし= 109:98 であった。

pStat3 の発現は、陽性:陰性= 149:63 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関連していた。

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

AIS 発生症例では、女性の方が男性より 2.6 倍多く、また年齢的にも AIS 症例は、浸潤性腺癌や腺癌を除く非小細胞肺癌全体よりも、有意に若かった。この結果は、これまでの報告とほぼ一致している。AIS 症例の喫煙率 (26%) は、浸潤型腺癌や腺癌以外の非小細胞肺癌全体よりも有意に少なく、特に女性では喫煙率はわずか 9% であり、AIS は喫煙との相関が低いことが改めて示された。一方、EGFR 変異率は、男性より女性の方が 20% 高かったが、喫煙者と非喫煙者との比較では、差がなかった。このことは、喫煙者に非喫煙者型の癌が発生した場合、EGFR 変異が存在することがあることを示しており、男性、喫煙者といった疫学的事項のみで EGFR 変異の存在を推定すべきでない。

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% の腫瘍で活性化し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

リン酸化抗体による免疫組織化学的検索は、AIS の性質の解明、および Stat 経路の活性化状況の調査などに有用であった。喫煙者に発生した AIS は非喫煙者の AIS と殆ど同じ性質であった。進行した肺腺癌では、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

Migita T, Narita T, Asaka R, Miyagi E, Nagano H, Nomura K, Matsuura M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Seimiya H, Ishikawa Y. Role of insulin-like growth factor binding proteins 2 in lung cancer: IGF independent anti-apoptotic effect via caspase-3. Am J Pathol, 2010, 176: 1756-66.

Hiramatsu M, Ninomiya H, Inamura K, Nomura K, Takeuchi K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Yamori T, Matsuura M, Morikawa T, Ishikawa Y. Activation status of receptor tyrosine kinase downstream pathways in primary lung adenocarcinoma with reference of KRAS and EGFR mutations. Lung Cancer 2010, 70: 94-102.

Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y, Matsubara O. Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? Arch Pathol Lab Med. 2010 Jan;134(1): 66-72.

Satoh Y, Ishikawa Y. Primary pulmonary meningioma: Ten-year

follow-up findings for a multiple case, implying a benign biological nature. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010 Mar; 139(3): e39-40.

Hoshi R, Furuta N, Horai T, Ishikawa Y, Miyata S, Satoh Y. Discriminant model for cytologic distinction of large cell neuroendocrine carcinoma from small cell carcinoma of the lung. *J Thorac Oncol.* 2010 (4); 5: 472-8

Inamura K, Ishikawa Y. Lung cancer progression and metastasis from the prognostic point of view. *Clin Exp Metastasis.* 2010, 27:389-97

Sakao Y, Okumura S, Mun M, Uehara H, Ishikawa Y, Nakagawa K. Prognostic heterogeneity in multilevel N2 non-small cell lung cancer patients: importance of lymphadenopathy and occult intrapulmonary metastases. *Ann Thorac Surg.* 2010, 89(4):1060-3.

Okada A, Shimmyo T, Hashimoto T, Kobayashi Y, Miyagi Y, Ishikawa Y, Nakagawa K, Hayashi J, Tsuchiya E. Predictive advantage of a cell type classification for pulmonary adenocarcinoma coupled with data for p53, K-ras and EGFR alterations. *Cancer Sci.* 2010 Jul;101(7):1745-53. Epub 2010 Apr 7.

Mochizuki T, Okumura S, Ishii G, Ishikawa Y, Hayashi R, Kawabata K, Yoshida J. Surgical resection for oral tongue cancer pulmonary metastases. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010

Ohba T, Motoi N, Kimura Y, Okumura S, Kawabata K, Yoshizawa Y, Inase N, Ishikawa Y. Cytokeratin expression profiling is useful for distinguishing

between primary squamous cell carcinoma of the lung and pulmonary metastases from tongue cancer. *Pathol Int.* 2010, 60(8): 575-80.

Dan S, Okamura M, Seki M, Yamazaki K, Sugita H, Okui M, Mukai Y, Nishimura H, Asaka R, Nomura K, Ishikawa Y, Yamori T. Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations. *Cancer Res.* 2010; 70(12): 4982-94. Epub 2010 Jun 8.

Uehara H, Sakao Y, Mun M, Nakagawa K, Nishio M, Ishikawa Y, Okumura S. Prognostic value and significance of subcarinal and superior mediastinal lymph node metastasis in lower lobe tumours. *Eur J Cardiothorac Surg.* 38 (2010) 498-502

Takeuchi S, Takahashi A, Motoi N, Yoshimoto S, Tajima T, Yamakoshi K, Hirao A, Yanagi S, Fukami K, Ishikawa Y, Sone S, Hara E, Ohtani N. Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res.* 2010 Nov 15;70(22): 9381-90. Epub 2010 Nov 9.

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* (in press).

鈴木奈緒子, 星利良, 佐藤之俊, 古田則行, 宮内栄作, 石川雄一, 平井康夫, 宝来威. ラブドイド細胞が目立った肺大細胞神



- 経内分泌癌の1例. 日本臨床細胞学会雑誌, 49:15-19, 2010.
- 大場岳彦, 石川雄一. 肺神経内分泌腫瘍の分類と組織診断. 病理と臨床, 28(2) : 151-155, 2010.
- 二宮浩範, 石川雄一. 微小乳頭状腺癌・腸型腺癌. 病理と臨床, 28(3) : 259-262, 2010.
- 荻田 真, 石川雄一. 神経内分泌形態, 第3章肺-腫瘍-, 『病理形態学キーワード』, 臨時増刊号, 病理と臨床 vol. 28, 2010
- 石川雄一. ALK 肺癌の臨床病理学的特徴 - 形態からわかるその疫学的背景. 呼吸器内科 18 (4): 362-367, 2010
- 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
- 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

研究分担課題名 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、リンパ腫や肺炎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。研究分担者の元にコンサルテーション目的で送付され診断された ALK-positive large B-cell lymphoma（ALK+LBCL）における抗 ALK 免疫染色のパターンが、これまで ALK+LBCL で知られていたパターンと異なることから、未知の融合パートナーを持つと予想し inverse RT-PCR 法にて解析したところ *SQSTM1-ALK* を得た。また、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。これらの新規 ALK 融合遺伝子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、新規 ALK 融合の造腫瘍能を確認した。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、新規の ALK 融合、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。

#### B. 研究方法

研究分担者の元にコンサルテーション目的で送付されてきた 67 才男性のリンパ腫疑い検体に関して、その精査を行った。検体は、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）病理未染標本の形で担当医より研究分担者に送られた。HE 染色と免疫染色法により病理組織学的検討を行い診断した。免疫染色法と FISH 法にて *ALK* 融合遺伝子の存在を確認した。IMT に関しては、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て新規 ALK 融合遺伝子の同定を試みた。

#### C. 研究結果

ALK+LBCL と診断したコンサルと症例について

は、その抗 ALK 免疫染色のパターンが、これまで ALK+LBCL で知られていた *CLTC-ALK*、*NPM-ALK* の染色パターンと異なることから、これらとは違う融合パートナーを持つと予想した。ALK 融合蛋白の細胞内局在は融合パートナーに依存するからである。Inverse RT-PCR 法により *SQSTM1* exon 5 が *ALK* exon 20 に結合した新規融合遺伝子が証明された。

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。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。

*SQSTM1-ALK*、*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、これらの造腫瘍能を確認した。

#### D. E. 考察&結論

ALK+LBCL は稀なリンパ腫ではあるが予後が悪い。B 細胞性腫瘍にもかかわらず CD20 を発現しないため、rituximab が使用できず、その有効な治療法が渴望されている。今回の *SQSTM1-ALK* は ALK+LBCL のなかでも稀な ALK 融合であると思われる。しかしながらこの発見は、ALK+LBCL の病態生理の理解に寄与し、正しい

診断に至るための鍵となり、将来的な ALK 阻害剤治療への道筋をより確かなものにするものと考えられた。

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.* on line
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* 103:390-392, 2012
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 on line*
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* 75:66-72, 2012
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* 7:e31323, 2012
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.* 102:1602-1604, 2011
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.* 17:3341-3348, 2011
8. 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 Tachibana T, Tomita N, Furuya M, Yamanaka S, Takeuchi K, Nakamura N, Fujita H, Ishigatsubo Y. Aberrant CD20 expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Internal Medicine.* 2011
9. Watanabe N, Noh JY, Narimatsu H, Takeuchi K, Yamaguchi T, Kameyama K, Kobayashi K, Kami M, Kubo A, Kunii Y, Shimizu T, Mukasa K, Otsuka F, Miyara A, Minagawa A, Ito K, Ito K. Clinicopathological features of 171 cases of