

2012.21014B

厚生労働科学研究費補助金
がん臨床研究事業

進行・再発肝細胞癌に対する動注化学療法と分子標的薬併用による
新規治療法の確立を目指した臨床試験 (Phase III)
ならびに効果を予測するbiomarkerの探索研究

平成22～24年度 **総合研究報告書**

研究代表者 **工藤 正俊**

平成25(2013)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
がん臨床研究事業

進行・再発肝細胞癌に対する動注化学療法と分子標的薬併用による
新規治療法の確立を目指した臨床試験(Phase III)
ならびに効果を予測するbiomarkerの探索研究

平成22～24年度 総合研究報告書

研究代表者 工藤 正俊

平成25(2013)年 3月

目 次

I. 総合研究報告

進行・再発肝細胞癌に対する動注化学療法と分子標的薬併用による新規治療法の確立を目指した臨床試験 (Phase III) ならびに効果を予測するbiomarkerの探索研究

研究代表者 工藤正俊
近畿大学医学部消化器内科 教授

1

II. 分担研究報告

1. 肝細胞癌に対する動注化学療法・塞栓療法と分子標的薬併用の効果予測バイオマーカーの探索
西尾 和人
近畿大学医学部ゲノム生物学教室 分子生物学 教授
2. 本臨床試験の種々の条件を考慮に入れた最適な試験デザインの検討
赤澤 宏平
新潟大学医歯学総合病院 医療情報部 医療統計学・医療情報学 教授
3. 肝がんに対する治療法の確立に関する研究
奥坂 拓志
国立がんセンター中央病院 肝胆膵内科 科長
4. HCVキャリアにおけるHCVRNAの変動-reference change value (RCV)による解析-
熊田 卓
大垣市民病院 消化器内科 副院長
5. 進行肝細胞癌に対するソラフェニブの治療成績-チーム医療での取り組み-
池田 公史
国立がんセンター東病院 肝胆膵内科 科長
6. マイクロバルーンカテーテルを用いた超選択的肝動脈塞栓術(B-TACE)における腫瘍へのリポドール集積増強の機序に関する研究
荒井 保明
国立がん研究センター放射線診断科長
7. 進行肝細胞癌における分子標的治療薬の標準投与量継続可能症例の臨床病理学的特徴
永野 浩昭
大阪大学大学院医学系研究科 消化器外科学 准教授
8. 肝動脈塞栓化学療法不応早期診断のための1週後治療効果判定の有効性に関する検討
波多野 悦朗
京都大学医学研究科 肝胆膵・移植外科 講師
9. 初回治療例における非B非C肝癌の臨床的特徴-初回治療後の生命予後の比較検討-
佐々木 裕
熊本大学大学院生命科学研究部 消化器内科学 教授
10. 進行肝細胞癌に対するリザーバー肝動注化学療法の成績と予後因子に関する検討
相方 浩
広島大学病院 消化器・代謝内科 講師

11. 進行肝細胞癌に対する鉄代謝からみた肝動注化学療法の有用性の研究
山崎 隆弘
山口大学医学部附属病院 光学医療診療部 准教授
12. 肝細胞癌に対するソラフェニブの早期治療効果判定に関する研究
金井 文彦
千葉大学大学院医学研究院 腫瘍内科学 講師
13. バイオマーカーによる進行肝細胞癌に対するソラフェニブの効果判定
泉 並木
武蔵野赤十字病院 副院長
14. 進行肝細胞がんの治療選択 -特に門脈腫瘍浸潤例を中心として-
小尾 俊太郎
財団法人 佐々木研究所附属杏雲堂病院 消化器・肝臓内科 科長
15. 肝細胞癌におけるフォリスタチン発現変化に関する研究
山本 和秀
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓内科学 教授
16. 肝細胞癌に対するラジオ波焼灼療法の治療効果判定におけるCT fusion画像の有用性に関する研究
今井 康陽
市立池田病院 消化器内科 副院長
17. 進行肝細胞癌に対するソラフェニブ治療効果についての解析
日野 啓輔
川崎医科大学 肝胆膵内科学 教授
18. 進行・再発肝細胞癌に対する動注化学療法と分子標的薬併用による新規治療法の確立を目指した臨床試験 (Phase III)
高山 哲治
国立大学法人徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
消化器内科学 教授
19. 肝細胞癌異所性再発予防に関する研究
石川 達
済生会新潟第二病院 消化器内科 部長
20. 進行・再発肝細胞癌に対する動注化学療法と分子標的薬併用による新規治療の確立を目指した臨床試験 (Phase III) ならびに効果を予測するbiomarkerの探索
小川 力
高松赤十字病院 消化器内科
21. 進行・再発肝細胞癌に対する動注化学療法と分子標的薬併用による新規治療の確立を目指した臨床試験 (Phase III) ならびに効果を予測するbiomarkerの探索
小林 功幸
広島市立広島市民病院 内科部長
22. 進行・再発肝細胞癌に対する動注化学療法と分子標的薬併用による新規治療の確立を目指した臨床試験 (Phase III) ならびに効果を予測するbiomarkerの探索
辻 邦彦
手稲溪仁会病院 消化器病センター 副部長

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 99

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 131

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金 がん臨床研究事業
「進行・再発肝細胞癌に対する動注化学療法と分子標的薬併用による新規治療法の確立を目指した臨床試験 (Phase III) ならびに効果を予測するbiomarkerの探索研究」
平成22-24年度 総括報告書

進行・再発肝細胞癌に対する動注化学療法と分子標的薬併用による新規治療法の確立を目指した臨床試験 (Phase III) ならびに効果を予測するbiomarkerの探索研究

主任研究者：工藤正俊 近畿大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：本研究は、進行肝細胞癌に対する標準的治療薬であるソラフェニブと、従来わが国で行われてきた低用量シスプラチン/フルオロウラシル (Low-dose FP) の動注化学療法の併用の有効性を検証するランダム化比較第III相試験である。前者はグローバル第III相試験において、生存期間の延長が明確に証明されている。また後者においては、明確なエビデンスは存在せず、世界的には標準治療ではないが、約40%の高い奏効率が得られる治療方法である。これらの併用により、前者による生存期間延長と、後者による奏効率上昇が期待されるため、臨床的に大きな意味があり、将来、標準的治療として位置づけられる可能性がある。またLow-dose FPの動注化学療法の上乗せ効果が客観的に証明された場合に、これまで前向き比較試験として検証されてこなかった動注化学療法の有用性も客観的に評価されることになり、世界に向けてエビデンスを日本から発信することができる。本研究で得られた結果は、エビデンスレベルの高い結果として臨床現場にフィードバックされ、肝細胞癌患者の治療に貢献し、予後改善につながる事が予想される。本研究は平成22年10月より登録を開始し、平成25年2月末現在、全国31施設で152例 (80.0%) の患者が登録され、順調に試験は進行している。

A. 研究目的

肝細胞癌においては、罹患率の高さや進行した場合の効果的な治療法がない現状から、根治および再発予防、生存期間の延長などの点で有効な新薬の開発や、新たな治療法が開発が望まれている。本邦において肝動注療法は、切除不能、局所壊死療法および肝動脈化学塞栓療法が適応とならない進行肝細胞癌患者に対して選択される療法である。しかしながら、奏効率が50%を超える報告があるものの、いずれも少数例を対象とした、あるいは対照を伴わない研究

であるため、科学的根拠を持って推奨されている薬剤の組み合わせがないとされているのが実情である。また生存期間の延長については確認されていない。

一方、ソラフェニブは根治不能の進行肝細胞癌患者に対して奏効率は低いものの、唯一、臨床試験にて全生存率を延長させた薬剤である。

以上のことより、ソラフェニブと低用量シスプラチン/フルオロウラシル肝動注療法を併

用することにより、前者の生存期間延長と、後者の奏効率上昇の相乗効果が期待されるため、臨床的に大きな意味があり、将来、標準的治療として位置づけられる可能性がある。また Low-dose FPの上乗効果が証明された場合、これまで前向き比較試験として検証されてこなかった肝動注化学療法（Low-dose FP療法）の有用性も客観的に評価されることとなる。

B. 研究方法

本研究は、外科的切除、局所壊死療法および肝動脈化学塞栓療法が適応とならない進行肝細胞癌患者を対象としたソラフェニブと Low-dose FPによる肝動注化学療法の併用療法のソラフェニブ単独治療に対する優越性を確認するための前向き、無作為化、非盲検、多施設共同、並行群間、第III相、比較臨床試験である。目標症例数190例（片群95例）で、試験デザインはソラフェニブ単独群とソラフェニブとLow-dose FPによる肝動注化学療法の併用療法の2アームでの比較試験である。プライマリエンドポイントは全生存期間（Overall survival）である。

（倫理面への配慮）

（1）患者の保護について

本試験に関係するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言および「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年厚生労働省告示第415号）に従って本試験を実施している。

（2）インフォームド・コンセント

登録に先立って、担当医は医療機関の承認が得られた説明文書（付表の説明文書または医療機関で改変を加えた説明文書）を患者本人に渡し、以下の内容を口頭で詳しく説明している。

1) 病名、病期、推測される予後に関する説明

る説明

2) 本試験が臨床試験であること

3) 本試験のデザインおよび根拠

4) プロトコール治療の内容

5) プロトコール治療により期待される効果

6) 予期される有害事象、合併症、後遺症とその対処法について

7) 費用負担と補償

8) 代替治療法

9) 予想される利益と可能性のある不利益について

10) 病歴の直接閲覧について

11) 同意拒否と同意撤回

12) 人権保護

13) 質問の自由

（3）同意

試験についての説明を行い、十分に考える時間を与え、患者が試験の内容をよく理解したことを確認した上で、試験への参加について依頼する。患者本人が試験参加に同意した場合、付表の同意書または医療機関で定められた書式の本試験の同意書を用い、説明をした医師名、説明を受け同意した患者名、同意を得た日付の記載があることを確認している。

（4）個人情報保護と患者識別

個々の患者のプライバシーを保護するため、登録患者の同定や照会は、登録時に発行される症例登録番号を用いて行う。すべての研究者は個人情報保護のため最大限の努力を払っている。

（5）プロトコールの遵守

本試験に参加する研究者は、患者の安全と人権を損なわない限り、本プロトコールを遵守する。

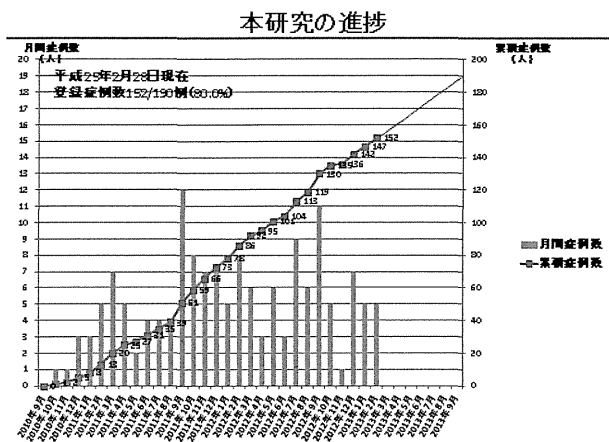
（6）利益相反

本試験は、厚生労働省科学研究費補助金に

より遂行される。いかなる企業とも営利関係はないことを確認している。

C. 研究結果

平成22年9月30日に近畿大学医学部倫理委員会の承認を得て、平成22年10月1日より登録を開始した。平成25年2月末現在全国31施設で152例(80.0%)の患者が登録され、順調に試験は進行している。現在のところ、試験の継続に問題となるような有害事象や倫理的問題は発生していない。



D. 考察

本研究は、進行肝細胞癌に対する標準的治療薬であるソラフェニブと、従来わが国で行われてきた。低用量シスプラチン/フルオロウラシルの動注化学療法の併用の有効性を検証するランダム化比較第III相試験である。前者はグローバル第III相試験において、生存期間の延長が明確に証明されている。また後者においては、明確なエビデンスは存在せず、世界的には標準治療ではないが、約40%の奏効率が得られる治療方法である。併用療法により、前者の生存期間延長と、後者の奏効率上昇が期待されるため、臨床的に大きな意味があり、将来、標準的治療として位置づけられる可能性がある。実

際、先に行われた第I相試験の結果、本併用療法のTTPは9.7カ月と、ソラフェニブ単独療法5.4カ月及び動注化学療法単独療法4.1カ月を相加した結果であり、奏効率は38.9%であったことから併用による治療効果が大きい期待される。また、低用量シスプラチン/フルオロウラシルの動注化学療法の上乗せ効果が客観的に証明された場合に、これまで前向き比較試験として検証されてこなかった動注化学療法の有用性も客観的に評価されることになり、世界に向けてエビデンスを日本から発信することができる。本研究で得られた結果は、エビデンスレベルの高い結果として臨床現場にフィードバックされ、肝細胞癌患者の治療に貢献し、予後改善につながる事が予想される。

E. 結論

本研究班はこの臨床試験の遂行を第一義として活動している。班員が一丸となって登録を推し進めており、進捗は順調である。本研究の成功は日本の肝細胞癌治療のすぐれた技術の世界に示すために必ず成功させる必要がある。平成25年年9月までに190例の登録を終えることができるよう、鋭意登録促進中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Minami Y, Okumura N, Yamamoto N, Tsuji N, Kono Y, Kudo M: Quantification of tumor vascularity with contrast-enhanced ultrasound for early response of transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a report of three cases. J Med Ultrason 28: 15-19, 2012.

2. Clavien PA, Lesurtel M, Bossuyt PM, Gores GJ, Langer B, Perrier A, Abecassis M, Balabaud C, Barritt GJ, Belghiti J, Bhoori S, Bossuyt P, Breitenstein S, Broelsch C, Bruix J, Burra P, Burroughs A, Busuttil R, Charlton M, Cherqui D, Colombo ML, d'Albuquerque C, D' Alessandro A, de Santibanez EJ, Dufour F, Durand F, Dutkowski P, Duvoux C, El-Serag H, Fan ST, Finn RS, Fisher R, Forner A, Freeman R, Fung J, Geier A, Germani G, Gores G, Gouw AS, Grant D, Greig P, Gurusamy K, Hanto D, Heaton N, Heim M, Hemming A, Hippen B, Hisham A, Hubscher S, Ichida T, Kahn D, Kew M, Kita Y, Kiuchi T, Klintmalm GB, Kneteman N, Kojiro M, Kudo M, Langer B, Lee JM, Lee SG, Lencioni R, Lerut J, Lesurtel M, Livraghi T, Llovet J, Lo CM, Lodge P, MacCaughan G, Madoff D, Majno P, Marcellin P, Marrero J, Mazzaferro V, Mergental H, Merle P, Miksad R, Mornex F, Mullhaupt B, Olthoff K, Paradis V, Perrier A, Pestalozzi B, Pomfret E, Poon R, Porte R, Greig P, Prasad KR, Raptis D, Roskams T, Rossi M, Samuel D, Schlitt H, Schwartz M, Sexton Dobby AM, Shaked A, Sherman M, Siegler M, Suh KS, Todo S, Toso C, Trevisani F, Trotter JJ, Veldecasas GJ, Vauthey N, Vilgrain V, Villamil F, Vonlanthen R, Wald C, Weber A, Wiesner R, Wright L, Yao F, Zheng SS, Zucman-Rossi J: Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol* 13: e11-22, 2012.
3. Minami Y, Kitai S, Kudo M: Treatment response assessment of radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: Usefulness of virtual CT sonography with magnetic navigation. *Eur J Radiol* 81: e277-280, 2012.
4. Takayasu K, Arii S, Kudo M, Ichida T, Matsui O, Izumi N, Matsuyama Y, Sakamoto M, Nakashima O, Ku Y, Kokudo N, Makuuchi M: Superselective transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. Validation of treatment algorithm proposed by Japanese guidelines. *J Hepatol* 56: 886-892, 2012.
5. Kudo M, Tateishi R, Yamashita T, Ikeda M, Furuse J, Ikeda K, Kokudo N, Izumi N, Matsui O: Current status of hepatocellular carcinoma treatment in Japan: Case study and discussion-voting system. *Clin Drug Invest* 32;suppl. 2:37-51, 2012.
6. Saito J, Kim SR, Kudo M, Imoto S, Ando K, Nakajima T, Fukuda K, Otono Y, Kim SK, Komaki T, Yano H, Nakashima O, Sugimoto K, Matsuoka T: Well-differentiated hepatocellular carcinoma detected as hypovascularity by only CT during hepatic arteriography. *Intern Med* 51:885-890, 2012.
7. Lencioni R, Kudo M, Ye SL, Bronowicki JP, Chen XP, Dagher L, Furuse J, Geschwind JF, Guevara LL, Papandreou C, Sanyal AJ,

Takayama T, Yoon SK, Nakajima K, Cihon F, Heldner S, Marrero JA: First interim analysis of the GIDEON (Global Investigation of therapeutic DEcisions in hepatocellular carcinoma and Of its treatment with sorafeNib) non-interventional study. *Int J Clin Pract* 66:675-683, 2012.

8. Okada M, Ishii K, Numata K, Hyodo T, Kumano S, Kitano M, Kudo M, Murakami T: Can the biliary enhancement of Gd-EOB-DTPA predict the degree of liver function? *Hepatob Pancreatic Dis Int* 11:307-313, 2012.

9. Hagiwara S, Kudo M, Nagai T, Inoue T, Ueshima K, Nishida N, Watanabe T, Sakurai T: Activation of JNK and high expression level of CD133 predict a poor response to Sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Brit J Cancer* 106:1997-2003, 2012.

10. Shiina T, Maki T, Yamakawa M, Mitake T, Kudo M, Fujimoto K: Mechanical model analysis for quantitative evaluation of liver fibrosis based on ultrasound tissue elasticity imaging. *Jpn J Appl Phys* 51:07GF11-1-8, 2012.

11. Takahashi K, Kashida H, Kudo M: Hepatic nodules associated with an inferior mesentric arteriovenous malformation. *Internal Med* 51:2753-2755, 2012.

12. Kudo M: Why does every hepatocellular carcinoma clinical trial using molecular

targeted agents fail? *Liver Cancer* 1(2):59-60, 2012.

13. Kudo M: Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with emphasis on hepatic arterial infusion chemotherapy and molecular targeted therapy. *Liver Cancer* 1(2):62-70, 2012.

14. Hagiwara S, Sakurai T, Nishina S, Tanaka K, Ikeda M, Ueshima K, Minami Y, Inoue T, Yada N, Kitai S, Takita M, Nagai T, Hayaishi S, Arizumi T, Park AM, Munakata H, Nishida N, Kudo M: Characteristic pattern of reactivation of hepatitis B virus during chemotherapy for solid cancers. *Digest Dis* 30:541-546, 2012.

15. Nishida N, Arizumi T, Hayaishi S, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Ikai I, Kudo M: Gender differences in the livers of patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C infection. *Digest Dis* 30:547-553, 2012.

16. Ueda T, Tsuchiya K, Hashimoto S, Inoue T, Inao M, Tanaka A, Kaito M, Imazaki F, Nishiguchi S, Mochida S, Yokosuka O, Yatsushashi H, Izumi N, Kudo M, for RETRY study group: Retreatment with peginterferon alfa-2a plus ribavirin in patients who failed previous peginterferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy. *Digest Dis* 30:554-560, 2012.

17. Hagiwara S, Sakurai T, Takita M, Ueshima K, Minami Y, Inoue T, Yada N, Kitai S, Nagai T, Hayaishi S, Arizumi T, Nishida N, Kudo M: Risk of HCC development in cases of hepatitis C treated by long-term, low-dose PEG-IFN α 2a. *Digest Dis*, 30:561-567, 2012.
18. Kobayashi S, Kim SR, Imoto S, Ando K, Hirakawa M, Saito J, Fukuda K, Otono Y, Sakaki M, Tsuchida S, Kim SK, Hayashi Y, Nakano M, Kudo M: Histopathological diagnosis of early HCC through biopsy -efficacy of victoria blue and cytokeratin 7 staining-. *Digest Dis* 30:574-579, 2012.
19. Tsuchida S, Fukumoto T, Toyokawa A, Awazu M, Kusunoki N, Kido M, Takahashi M, Tanaka M, Kuramitsu K, Kim SR, Kudo M, Ku Y: Novel non-trocar technique for laparoscopic radiofrequency ablation. *Digest Dis* 30:588-591, 2012.
20. Minami Y, Kudo M: Hepatocellular carcinoma with obstructive jaundice: endoscopic and percutaneous biliary drainage. *Digest Dis* 30:592-597, 2012.
21. Kudo M, Ueshima K, Arizumi T: Real-life clinical practice with sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma: a single center experience. *Digest Dis* 30:609-616, 2012.
22. Katsube T, Okada M, Kumano S, Imaoka I, Kagawa Y, Hori M, Ishii K, Tanigawa N, Imai Y, Kudo M, Murakami T: Estimation of liver function using T2* mapping on gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid enhanced magnetic resonance imaging. *Eur J Radiol* 81:1460-1464, 2012.
23. Nishida N, Kudo M, Nagasaka T, Ikai I, Goel A: Characteristic patterns of altered DNA methylation predict emergence of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 56:994-1003, 2012.
24. Kudo M: Signaling pathway/molecular targets and new targeted agents under development in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 18:6005-6017, 2012.
25. Kudo M: Japan's successful model of nationwide hepatocellular carcinoma surveillance highlighting the urgent need for global surveillance. *Liver Cancer* 1(3):141-143, 2012.
26. Okusaka T, Kasugai H, Ishii H, Kudo M, Sata M, Tanaka K, Shioyama Y, Chayama K, Kumada H, Yoshikawa M, Seki T, Saito H, Hayashi N, Shiratori K, Okita K, Sakaida I, Honda M, Kusumoto Y, Tsutsumi T, Sakata K: A randomized phase II trial of intra-arterial chemotherapy using SM-11355 (Miriplatin) for hepatocellular carcinoma. *Invest New Drug* 30:2015-2025, 2012.

27. Hagiwara S, Kudo M, Chung H, Ueshima K, Inoue T, Haji S, Watanabe T, Park AM, Munakata H, Sakurai T: Activation of c-Jun N-terminal kinase in non-cancerous liver tissue predicts a high risk of recurrence after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 42:394-400, 2012.
28. Sakurai T, Kudo M, Umemura A, He G, Elsharkawy AM, Seki E, Karin M: p38 α inhibits liver fibrogenesis and consequent hepatocarcinogenesis by curtailing accumulation of reactive oxygen species. *Cancer Res* 73:215-224, 2012.
29. Kudo M: Targeted therapy for liver cancer: updated review in 2012. *Curr Cancer Drug Tar* 12:1062-1072, 2012.
30. Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y: Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of hepatocellular carcinoma 2010 update. *Hepatol Res* 42:523-542, 2012.
31. Inoue T, Kudo M, Komuta M, Hayaishi S, Ueda T, Takita M, Kitai S, Hatanaka K, Yada N, Hagiwara S, Chung H, Sakurai T, Ueshima K, Sakamoto M, Maenishi O, Hyodo T, Okada M, Kumano S, Murakami T: Assessment of Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI for HCC and Dysplastic nodule and comparison of detection sensitivity versus MDCT. *J Gastroenterol* 47:1036-1047, 2012.
32. Kudo M: Advances in Liver Fibrosis Imaging and Hepatocellular Carcinoma: Update in 2013. *Oncology* 84: 1-2, 2013.
33. Fujimoto K, Kato M, Kudo M, Yada N, Shiina T, Ueshima K, Yamada Y, Ishida T, Azuma M, Ymasaki M, Yamamoto K, Hayashi N, Takehara T: Novel image analysis method using ultrasound elastography for non-invasive evaluation of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Oncology* 84: 3-12, 2013.
34. Yada N, Morikawa H, Fujimoto K, Kato M, Kawada N, Kudo M: Assessment of liver fibrosis with real-time tissue elastography in chronic viral hepatitis. *Oncology* 84: 13-20, 2013.
35. Kudo M, Matsui O, Sakamoto M, Kitao A, Kim T, Ariizumi S, Ichikawa T, Kobayashi S, Imai Y, Izumi N, Fujinaga Y, Arii S: Role of gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging (Gd-EOB-DTPA MRI) in the management of hepatocellular carcinoma: Consensus at the Symposium of the 48th Annual Meeting of the Liver Cancer Study Group of Japan. *Oncology* 84: 21-27, 2013.

36. Inoue T, Kudo M, Hatanaka K, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Minami Y, Sakurai T, Ueshima k, Nishida N: Usefulness of contrast-enhanced ultrasonography to evaluate the post treatment responses of Radiofrequency ablation for Hepatocellular carcinoma; Comparison with dynamic CT. *Oncology 84*: 51-57, 2013.
37. Minami Y, Kudo M: Therapeutic response assessment of transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: US, CT and MRI. *Oncology 84*: 58-63, 2013.
38. Minata M, Harada K, Kudo M, Ikai I, Nishida N: The prognostic value of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma for predicting metastasis after curative resection. *Oncology 84*: 75-81, 2013.
39. Nishida N, Arizumi T, Takita M, Nagai T, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Ida H, Kudo M: Quantification of tumor DNA in serum and vascular invasion of human hepatocellular carcinoma. *Oncology 84*: 82-87, 2013.
40. Minata M, Kudo M, Harada K, Ikai I, Nishida N: Expression of E-cadherin and vascular endothelial growth factor in non-cancerous liver is associated with recurrence of HCC after curative resection. *Oncology 84*: 88-92, 2013.
41. Nishida N, Kudo M: Recent advancements in comprehensive genetic analyses for human hepatocellular carcinoma. *Oncology 84*: 93-97, 2013.
42. Claudon M, Dietrich CF, Choi BI, Cosgrove DO, Kudo M, Nolsoe CP, Piscaglia F, Wilson SR, Barr RG, Chammas MC, Chaubal NG, Chen MH, Clevert DA, Correas JM, Ding H, Forsberg F, Fowlkes JB, Gibson RN, Goldberg BB, Lassau N, Leen EL, Mattrey RF, Moriyasu F, Solbiati L, Weskott HP, Xu HX: Guidelines and good clinical practice recommendations for contrast enhanced ultrasound (CEUS) in the liver-update 2012: a WFUMB-EFSUMB initiative in cooperation with representatives of AFSUMB, AIUM, ASUM, FLAUS and ICUS. *Ultrasound Med Biol 39*:187-210, 2013.
43. Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, Ichida T, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima O, Matsui O, Matsuyama Y, for the Liver Cancer Study Group of Japan. : Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: a cohort study based on a Japanese nationwide survey. *J Hepatol 58*:724-729, 2013.
44. Claudon M, Dietrich CF, Choi BI, Cosgrove DO, Kudo M, Nolsoe CP, Piscaglia F, Wilson SR, Barr RG, Chammas MC, Chaubal NG, Chen MH, Clevert DA, Correas JM, Ding H,

Forsberg F, Fowlkes JB, Gibson RN, Goldberg BB, Lassau N, Leen EL, Mattrey RF, Moriyasu F, Solbiati L, Weskott HP, Xu HX: Guidelines and good clinical practice recommendations for contrast enhanced ultrasound (CEUS) in the liver—update 2012. *Ultraschall Med*, 2013 (in press, Epub ahead of print).

45. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Ykosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Moriwaki H, Adachi K, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H: Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN α 2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multicenter cooperative study. *J Gastroenterol*, 2013 (in press, Epub ahead of print).

46. Nagata Y, Kudo M, Nagai T, Watanabe T, Kawasaki M, Asakuma Y, Hagiwara S, Nishida N, Matsui S, Kashida H, Sakurai T: Heat shock protein 27 expression is inversely correlated with atrophic gastritis and intraepithelial neoplasia. *Digest Dis Sci*, 2013 (in press, Epub ahead of print).

47. Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, Hagiwara S, Sakurai T, Haji S, Kanazawa K, Hidaka H, Iso Y, Kubota K, Shimada M, Utsunomiya T, Hirooka M, Hiasa Y, Toyoki Y, Hakamada K, Yasui K, Kumada T, Hidenori Toyoda, Sato S, Hisai H, Kuzuya T, Tsuchiya K, Izumi N, Arii

S, Nishio K, Kudo M: FGF3/FGF4 Amplification and Multiple lung Metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2013 (in press, Epub ahead of print).

48. Park JW, Amarapurkar D, Chao Y, Chen PJ, Geschwind JF, Goh KL, Han KH, Kudo M, Lee HC, Lee RC, Lesmana LA, Lim HY, Paik SW, Poon RT, Tan CK, Tanwandee T, Teng G, Ceng AL: Consensus recommendations and review by an International Expert Panel on Interventions in Hepatocellular Carcinoma (EPOIHCC). *Liver Int*, 2013 (in press, Epub ahead of print).

49. Kim SR, Taniguchi M, Sasase N, Kim KI, Ninomiya T, Imoto S, Ando K, Mita K, Fuki S, Fukuda K, Kudo M, Sakamoto H, Inui K, Hayashi Y: Multicentric occurrence of HCC detected 3–4 years after AFP-L3 positivity. *Intern Med*, 2013 (in press).

50. Yang J, Kim SR, Kudo M, Hino O: Recent advance in the management of chronic hepatitis B. *Hepat Res Treat*, 2013 (in press).

51. Cheng AL, Kang YK, Lin DY, Park JW, Kudo M, Qin S, Chung HC, Song X, Xu J, Poggi G, Omata M, Lowenthal SP, Lanzalone S, Yang L, Lechuga MJ, Raymond E, for the SUN1170 HCC Study Group: Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*,

2013 (in press).

52. Aoki T, Kokudo N, Matsuyama Y, Izumi N, Ichida T, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima O, Matsui O, Makuuchi M, for the Liver Cancer Study Group of Japan: Prognostic impact of spontaneous tumor rupture in patients with hepatocellular carcinoma: an analysis of 1,160 cases from a nation-wide survey in Japan. Ann Surg, 2013 (in press).

53. Minami Y, Kudo M: Radiofrequency ablation of liver metastases from colorectal cancer: a literature review. Gut Liver, 2013 (in press).

54. Hyodo T, Murakami T, Imai Y, Okada M, Hori M, Kagawa Y, Kogita S, Kumano S, Kudo M, Mochizuki T: Hypovascular nodules in chronic liver disease: risk factors for developing hypervascular hepatocellular carcinoma. Radiology, 2013 (in press) .

55. Hasegawa k, Makuuchi M, Kokudo N, Izumi N, Ichida T, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima M, Matsui O, Matsuyama Y, for the

Liver Cancer Study Group of Japan: Impact of histologically confirmed lymph node metastases on the patient survival after surgical resection for hepatocellular carcinoma: report of a Japanese nationwide survey. Ann Surg, 2013 (in press).

56. Nishiguchi S, Enomoto H, Aizawa N, Nishikawa H, Osaki Y, Tsuda Y, Higuchi K, Okazaki K, Seki T, Kim SR, Hongo Y, Jyomura H, Nishida N, Kudo M: Relevance of the Core 70 and IL-28B polymorphism and response-guided therapy of peginterferon alfa-2a± ribavirin for chronic hepatitis C of Genotype 1b: A multicenter randomized trial, ReGIT-J study. J Gastroenterol, 2013(in press).

2. 学会発表

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

本試験は、全肝細胞癌患者の利益に資することを目的とし、研究者の特別な利益を追求するものではないため、特許関連の申請は行わないことを確認している。

2. 実用新案登録 なし

3. その他

平成24年11月

USE論文賞 (応用物理学会論文賞) 受賞

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

肝細胞癌に対する動注化学療法・塞栓療法と分子標的薬併用の効果予測バイオマーカーの探索

分担研究者 西尾 和人 近畿大学医学部ゲノム生物学教室 教授

研究要旨

*FGF3*および*FGF4*を含む染色体11q13の遺伝子増幅は、ソラフェニブ治療の効果予測バイオマーカーであることを特定した。腫瘍組織において11q13領域の遺伝子増幅は肝細胞癌以外のがん種で新たな治療標的であることが見いだされた。血中血管新生関連因子の解析では、ソラフェニブ治療後に有意に変動する増殖因子を同定した。これらは治療効果のモニタリングに有用なマーカーである可能性が示唆された。

A. 研究目的

ソラフェニブを含む肝細胞がん治療に対して、層別化可能なバイオマーカーを特定することにより、がん治療成績の向上を図る。具体的には、下記の3項目である。ソラフェニブの治療効果と関連する(1) がん細胞ゲノムコピー数異常、(2) 血清中タンパク、(3) がん細胞遺伝子変異を特定する。

B. 研究方法

(1) がん細胞ゲノムコピー数異常の測定

採取された腫瘍組織生検検体からDNAを抽出し、Comparative Genomic Hybridization (CGH)法を用いてがん細胞ゲノムコピー数異常を検出した。ソラフェニブの標的遺伝子および血管新生関連遺伝子を中心にコピー数異常を解析し、ソラフェニブ治療効果との関連を検討し、効果予測因子を特定した。パラフィン包埋サンプルへの遺伝子増幅の検出は、TaqMan Copy Number Assaysを用いた。

(2) 血中血管新生因子・増殖因子の測定

患者血清中の血管新生関連因子（サイトカイン・ケモカイン）および増殖因子の定量測定をmultiplex ELISAあるいはELISAを用いて行なう。測定は治療前、Day29、PD後の血清を対象に、Luminex systemを用いて行った。

(3) がん細胞遺伝子変異の測定

ソラフェニブの標的分子である各種VEGFR2類似受容体群(VEGFRs, FGFRs, PDGFRs, KITなど)およびBRAFの遺伝子変異を検討する。そのほかにダイレクトシーケンスを組み合わせて遺伝子変異を検出し、ソラフェニブ治療効果との関連を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究では同意説明文書・同意書に基づき、事前に本研究の意義、目的、方法、予測される結果や不利益について検体提供者に説明し、文書により自由意思による検体提供者の同意を得ている。検

体は連結可能匿名化し、測定を行った。

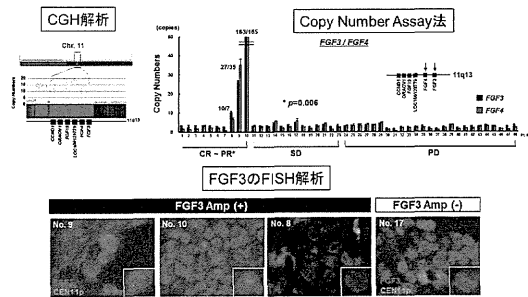
C. 研究結果

(1) ソラフェニブ著効例組織の遺伝子解析
解析サンプルとしてソラフェニブ著効例の凍結手術標本組織を用いた。測定・解析方法は、Affymetrix社製CGH arrayによりゲノムワイドなコピー数変化を解析し、著効例でみられるコピー数異常領域を同定した。さらにもその領域に存在するソラフェニブに対する感受性と関連する遺伝子を絞り込んだ。本著効例では薬剤に関連する遺伝子を含むゲノム領域のコピー数が、20倍以上増加していた。

本領域11a13領域には*FGF3*、*FGF4*が含まれ、同遺伝子の増幅は、FISH法で確認された。一方、パラフィン包埋スライドは、DNAが切断されていることが多く、ゲノム解析が困難とされている。そのため、パラフィン包埋スライドで当該遺伝子増幅のスクリーニングが可能な検出技術を開発中とした。

全国からソラフェニブ著効例を集積し、*FGF3/FGF4*遺伝子増幅の検討を行った。非奏効例38例には認められなかったが、著効例では10例中3例に遺伝子増幅が認められた ($p=0.006$ 、特願2011-104275、図1)。FISHでも*FGF3/FGF4*領域の遺伝子増幅が確認された。臨床的バイオマーカーとしては、高度肺転移例 ($p=0.006$) および低分化型組織型 ($p=0.13$) がソラフェニブ著効症例で多く認められた。

【図1】 ソラフェニブ治療の効果予測バイオマーカー



Sorafenib治療において、*FGF3/FGF4*の遺伝子増幅は、効果予測バイオマーカーであることを特定した。

Arao T. et al. Hepatology. In revise

基礎研究では*FGF4*過剰発現細胞株のマウス移植系実験においてソラフェニブ感受性を誘導する結果が得られている。

また、各種がん組織における同領域のコピー数異常を検討し、特徴的な結果として194例の食道癌手術標本においては高頻度に11q13領域のコピー数異常が認められることを発見した。約40%の食道癌において、5コピー以上の*FGF3/FGF4*遺伝子のコピー数増加が認められた。

(2) サンプル集積

平成22年度に全国の参加施設を対象に共通プロトコルを作成し、各施設における倫理委員会に提出した。全施設が倫理委員会の承認が終了し、臨床試験の登録が順調に開始された。バイオマーカー研究サンプルの集積は順調に行われ、血漿については、50例を対象に161サンプルの解析が終了している。症例集積が完了した時点で、すべてのサンプルの測定を実施し臨床効果等との相関解析を行う予定である。

(3) 血中血管新生因子・増殖因子の測定

12種類の血中血管新生因子、6種類の増殖因子の血中濃度測定を行った。そのうち6種類の増殖因子は、ソラフェニブ治療前後の比較において有意に変動することを示した。TGFβ1, 2, 3ではday 28において有意に減少していた。74サンプル中の増殖因子関連因子 (Amphiregulin, EGF, epiregulin, HB-EGF, PIGF, TGFα) の測定を実施したがDay 29において治療前と比べて減少する因子が認められると同時に、PD時に再上昇する例もあり、耐性に関わるマーカーとなる可能性があると考えられる。未測定サンプルを含め、検証的測定を実施中である。

D. 考察

ソラフェニブ著効例組織の遺伝子解析によって、有力な定性的なゲノムの異常を特定した (PCT出願)。本研究で特定した肝細胞がんソラフェニブ

治療への効果予測バイオマーカーとなる*FGF3/FGF4*遺伝子増幅は、治療層別化を通じて肝細胞がんの治療成績の向上に貢献できると考えられる。

また、11q13領域 (*FGF3/FGF4*遺伝子領域) のゲノムコピー数の増加は、肝細胞がんのみならず食道癌等、他がん種においての治療法の開発に重要な標的分子であると考えられる。血中の血管関連因子、増殖因子は、効果予測、治療効果モニターに有用なマーカーであることが示唆される。

バイオマーカーの検証研究の位置づけからも、本臨床試験の完遂が望まれる。

E. 結論

Sorafenibの感受性規定因子として、*FGF3/FGF4*遺伝子増幅・肺転移例・低分化型組織型を特定した。血中血管新生因子分子、血中増殖因子の一部はソラフェニブ治療により有意に変動し、採血によるバイオマーカーとして有望な結果と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

1. Kawakami H, Okamoto I, Arao T, Okamoto W, Matsuoka K, Taniguchi H, Kuwata K, Yamaguchi H, Nishio K, Nakagawa K, Yamada Y. MET amplification as a potential therapeutic target in gastric cancer. *Oncotarget*, 2012; E-pub ahead of print.
2. Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, Inoue A, Ichinose Y, Kobayashi K, Takeda K, Kiura K, Nishio K, Seki Y, Ebisawa R, Shahidi M, Yamamoto N. LUZ-Lung 4: A phase II trial of afatinib in patients with advanced, non-small cell lung cancer who progressed on prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J Clin Oncol*. 2013; in press.
3. Hayashi H, Okamoto I, Kimura H, Sakai K, Nishimura Y, Nishio K, Nakagawa K. Clinical outcomes of thoracic radiotherapy for locally advanced NSCLC with EGFR mutations or EML4-ALK rearrangement. *Anticancer Res*. 2013;32(10): 4533-7.

4. Hayashi H, Kurata T, Fujisaka Y, Kawakami H, Tanaka K, Okabe T, Takeda M, Satoh T, Yoshida K, Tsunoda T, Arao T, Nishio K, Nakagawa K. Phase I trial of OTS11101, an anti-angiogenic vaccine targeting vascular endothelial growth factor receptor 1 in solid tumor. *Cancer Sci.* 2012; 104(1): 98-104.
5. Okamoto I, Arao T, Miyazaki M, Satoh T, Okamoto K, Tsunoda T, Nishio K, Nakagawa K. Clinical phase I study of elpamotide, a peptide vaccine for VEGFR 2, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Sci.* 2012; E-pub ahead of print.
6. Fujita Y, Suda K, Kimura H, Matsumoto K, Arao T, Nagai T, Saijo N, Yatabe Y, Mitsudomi T, Nishio K. Highly sensitive detection of egfr t790m mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating egfr mutation. *J Thorac Oncol.* 2012; E-pub ahead of print.
7. Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, Hagiwara S, Sakurai T, Haji S, Kanazawa A, Hidaka H, Iso Y, Kubota K, Shimada M, Utsunomiya T, Hirooka M, Hiasa Y, Toyoki Y, Hakamada K, Yasui K, Kumada T, Toyoda H, Sato S, Hisai H, Kuzuya T, Tsuchiya K, Izumi N, Arie S, Nishio K, Kudo M. FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2012; E-pub ahead of print.
8. Minakata K, Takahashi F, Nara T, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, Nurwidya F, Yae S, Koizumi F, Moriyama H, Seyama K, Nishio K, Takahashi K. Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small cell lung cancer with both mutant wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Sci.* 2012; 2012; 103(11): 1946-4.
9. Ureshino H, Murakami Y, Watari K, Izumi H, Kawahara A, Kage M, Arao T, Nishio K, Yanagihara K, Kinoshita H. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) promotes metastasis of human scirrhous gastric cancer cell through epithelial mesenchymal transition. *Plos One* 2012; 7(7):1312.
10. Tanizaki J, Okamoto I, Okabe T, Sakai K, Tanaka K, Hayashi H, Kaneda H, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, Hatashita, E, Nishio K, Nakagawa K. Activation of HER family signaling as a mechanism of acquired resistance to ALK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(22): 6219-26.
11. Goto K, Satouchi M, Ishii G, Nishio K, Hagiwara K, Mitsudomi T, Whiteley J, Donald E, McCormack R, Todo T. An evaluation study of EGFR mutation tests utilized for non-small-cell lung cancer in the diagnostic setting. *Ann Oncol.* 2012; 23(11): 2914-9.
12. Takeda M, Okamoto I, Sakai K, Kawakami H, Nishio K, Nakagawa K. Clinical outcome for EML4-ALK-positive patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with first-line platinum-based chemotherapy. *Ann Oncol.* 2012; 23(11): 2931-6.
13. Okamoto W, Okamoto I, Arao T, Kuwata K, Hatashita E, Yamaguchi H, Sakai K, Yanagihara K, Nishio K, Nakagawa K. Antitumor action of the MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) in gastric cancer positive for MET amplification. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(7):1557-64.
14. Sakai K, Okamoto I, Takezawa K, Hirashima T, Kaneda H, Takeda M, Matsumoto K, Kimura H, Fujita Y, Nakagawa K, Arao T, Nishio K. A novel mass spectrometry-based assay for diagnosis of EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012;7(5):913-8.

15. Oiso N, Tatsumi Y, Arao T, Rai S, Kimura M, Nakamura S, Itoh T, Nishio K, Matsumura I, Kawada A. Loss of genomic DNA copy numbers in the p18, p16, p27 and RB loci in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Eur J Dermatol.* 2012;22(3):393-4.
16. Matsuoka H, Arao T, Makimura, C, Takeda M, Kiyota H, Tsurutani J, Fujita Y, Matsumoto K, Kimura H, Otsuka M, Koyama A, Imamura CK, Tanigawara Y, Yamanaka T, Tanaka K, Nishio K, Nakagawa K. Expression changes in arrestin $\beta 1$ and genetic variation in catechol-O-methyltransferase are biomarkers for the response to morphine treatment in cancer patients. *Oncol Rep.* 2012;27(5):1393-9.
17. Kaneda H, Okamoto I, Sakai K, Tanizaki J, Takeda M, Nishio K, Nakagawa K. Marked response to both S-1 and pemetrexed in a patient with echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase-positive lung adenocarcinoma. *Acta Oncol.* 2012; 51(7): 942-4.
18. Aomatsu K, Arao T, Abe K, Kodama A, Sugioka K, Matsumoto K, Kudo K, Kimura H, Fujita Y, Hayashi H, Nagai T, Shimomura Y, Nishio K. Slug is upregulated during wound healing and regulates cellular phenotypes in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(2):751-6.
19. Tanaka K, Arao T, Tamura D, Aomatsu K, Furuta K, Matsumoto K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y, Kimura H, Yanagihara K, Yamada Y, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in gastrointestinal cancer. *Plos One* 2012;7(1):e27922.
20. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, Nishio K, Yamada Y. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br J Cancer* 2012;106(4): 727-32.
21. Tanizaki J, Okamoto I, Takezawa K, Sakai K, Azuma K, Kuwata K, Yamaguchi H, Hatashita E, Nishio K, Janne PA, Nakagawa K. Combined effect of ALK and MEK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer* 2012; 106(4): 763-7.
22. Makimura C, Arao T, Matsumoto K, Takeda M, Kiyota H, Tsurutani J, Fujita Y, Matsumoto K, Kimura H, Otsuka M, Koyama A, Imamura CK, Yamanaka T, Nishio K, Nakagawa K. Prospective study evaluating the plasma concentrations of twenty-six cytokines and response to morphine treatment in cancer patients. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4561-8.
23. Sakamoto H, Kimura H, Sekijima M, Matsumoto K, Arao T, Chikugo T, Yamada Y, Kitano M, Ito A, Takeyama Y, Kudo M, Nishio K. Plasma concentrations of angiogenesis-related molecules in patients with pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2012;42(2):105-12.
24. Arao T, Matsumoto K, Megawa M, Nishio K. What can and cannot be done using a microarray analysis? Treatment stratification and clinical applications in oncology. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(12):1789-93.
25. Murakami H, Tamura T, Takahashi T, Nokihara H, Naito T, Nakamura Y, Nishio K, Seki Y, Sarashina A, Shahidi M, Yamamoto N. Phase I study of continuous afatinib (BIBW2992) in patients with advanced non-small cell lung cancer after prior chemotherapy/erlotinib/gefitinib (LUX-Lung 4). *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012;69(4):891-9.
26. Takeda M, Okamoto I, Sakai K, Tanaka K, Terashima M, Nishio K, Nakagawa K. Successful long-term treatment with