

Kim, HM, Choi IJ, Kim CG, Kim HS, Oshima A, <b><u>Yamada Y</u></b> , Arao T, Nishio K, Michalowski A, Green EJ.	Three-gene predictor of clinical outcome for gastric cancer patients treated with chemotherapy	Pharmacogenomics Journal	12	119-127	2012
Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, Nishio K, <b><u>Yamada Y</u></b> .	FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer	Br J Cancer	106	727-732	2012
Iwasa S, Nakajima T, E, Nakamura K, Takashima A, Kato K, Hamaguchi T, <b><u>Yamada Y</u></b> , Shimada Y.	First-line fluorouracil-based chemotherapy for patients with severe peritoneal disseminated gastric cancer	Gastric Cancer	15	21-26	2012
<b><u>Yamaguchi K</u></b> , Sawaki A, Doi T, Satoh T, <b><u>Yamada Y</u></b> , Omuro Y, <b><u>Nishina T</u></b> , <b><u>Boku N</u></b> , <b><u>Chin K</u></b> , Hamamoto Y, Takiuchi H, Komatsu Y, Saji S, <b><u>Koizumi W</u></b> , Miyata Y, Sato A, Baba E, Tamura T, Abe T, Ohtsu A.	Efficacy and safety of capecitabine plus cisplatin in Japanese patients with advanced or metastatic gastric cancer: subset analyses of the AVAGAST study and the ToGA study	Gastric Cancer		[Epub ahead of print]	2012
Tanaka K, Arao T, Tamura D, Aomatsu K, Furuta K, Matsumoto K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y, Kimura H, Yanagihara K, <b><u>Yamada Y</u></b> , Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K.	SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in gastrointestinal cancer	PLoS One		[Epub ahead of print]	2012
Sobrero A, <b><u>Yamada Y</u></b> , Douillard JY, Moehler M, Van Cutsem E, Haller DG.	The need for a new fluoropyrimidine in advanced gastric cancer treatment	Eur Oncol Haematol	8	232-240	2012

Tomita H, <b>Yasui H</b> , <b>Boku N</b> , Nakasu Y, MitsuyaK, Onozawa Y, Fukutomi A, Yamazaki K, Machida N, <b>Taku K</b> , Todaka A, Taniguchi H, Tsushima T.	Leptomeningeal carcinomatosis associated with gastric cancer	Int J Clin Oncol	17	361-366	2012
Tsuji K, <b>Yasui H</b> , Onozawa Y, <b>Boku N</b> , <b>Doyama H</b> , Fukutomi A, Yamazaki K, Machida N, Todaka A, Taniguchi H, Tsushima T, Yokota T.	Modified FOLFOX-6 Therapy for Heavily Pretreated Advanced Gastric Cancer Refractory to Fluorouracil, Irinotecan, Cisplatin and Taxanes: A Retrospective Study	Jpn J Clin Oncol	42	686-690	2012
Tokunaga M, Terashima M, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, <b>Yasui H</b> , <b>Boku N</b> .	Survival Benefit of Palliative Gastrectomy in Gastric Cancer Patients with Peritoneal Metastasis	World J Surg	36	2637-2643	2012
Katayama H, Ito S, Sano T, <b>Takahari D</b> , Mizusawa J, <b>Boku N</b> , Tsuburaya A, Terashima M, Sasako M; Stomach Cancer Study Group of the Japan Clinical Oncology Group	A Phase II Study of Systemic Chemotherapy with Docetaxel, Cisplatin, and S-1 (DCS) Followed by Surgery in Gastric Cancer Patients with Extensive Lymph Node Metastasis: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG1002	Jpn J Clin Oncol	42	556-559	2012
Satoh T, Omuro Y, Sasaki Y, Hamamoto Y, <b>Boku N</b> , Tamura T Ohtsu A.	Pharmacokinetic analysis of capecitabine and cisplatin in combination with trastuzumab in Japanese patients with advanced HER2-positive gastric cancer	Cancer Chemother Pharmacol	69	949-955	2012
Tsushima T, Hironaka S, <b>Boku N</b> , Machida N, Yamazaki K, <b>Yasui H</b> , Fukutomi A, Todaka A, Taniguchi H, Onozawa Y, <b>Taku K</b> .	Comparison of safety and efficacy of S-1 monotherapy and S-1 plus cisplatin therapy in elderly patients with advanced gastric cancer	Int J Clin Oncol	18	10-16	2013
<u>樋口勝彦</u> , 小泉和三 <u>郎</u>	進行再発胃癌に対する化学 療法の現状と展望	北里医学	42	1-8	2012

Sawaki A, Ohashi Y, Omura Y, Satoh T, Hamamoto Y, <b>Boku N</b> , Miyata Y, Takiuchi H, <b>Yamaguchi K</b> , Sasaki Y, <b>Nishina T</b> , Satoh A, Baba E, Tamura T, Abe T, Hatake K, Ohtsu A	Efficacy of trastuzumab in Japanese patients with HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer: a subgroup analysis of the Trastuzumab for Gastric Cancer (ToGA) study	Gastric Cancer	15	313-322	2012
<b>Koizumi W</b> , <b>Nakayama N</b> , Tanabe S, Sasaki T, <b>Higuchi K</b> , Nishimura K, Takagi S, Azuma M, Ae T, Ishido K, Nakatani K, Naruke A, Katada C	A multicenter phase II study of combined chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 in patients with unresectable or recurrent gastric cancer (KDOG 0601)	Cancer Chemother Pharmacol	69	407-413	2012
Suganuma M, Watanabe T, <b>Yamaguchi K</b> , Takahashi A, Fujiki H	Human gastric cancer development with TNF- $\alpha$ -inducing protein secreted from Helicobacter pylori	Cancer Lett	322	133-138	2012
Tuburaya A, Morita S, <b>Kodera Y</b> , Kobayashi M, Shitara K, <b>Yamaguchi K</b> , Yoshikawa T, Yoshida K, Yoshino S, Sakamoto J	A randomized phase II trial to elucidate the efficacy of capecitabine plus cisplatin (XP) and S-1 plus cisplatin (SP) as a first line treatment for advanced gastric cancer: XP ascertainment vs. SP randomized PII trial (XParTS II)	BMC Cancer	12	307	2012
<b>Fuse N</b> , Nagahisa-Oku E, Doi T, Sasaki T, Nomura S, Kojima T, Yano T, Tahara M, Yoshino T, Ohtsu A	Effect of RECIST revision on classification of target lesions and overall response in advanced gastric cancer patients	Gastric Cancer		[Epub ahead of print]	2012
Tanizawa Y, Terashima M, Tokunaga M, Bando E, Kawamura T, Sugisawa N, Miki Y, Makuuchi R, Yamakawa Y, Kinugasa Y, Kanemoto H, Uesaka K, <b>Yasui H</b>	Conversion therapy of stage IV gastric cancer	Gan To Kagaku Ryoho	39	2469-2473	2012
小寺泰弘	胃癌肝転移に対する治療戦略	日本外科学会雑誌	113	22-25	2012
<b>Hirashima Y</b> , Shirao K	Predicting drug efficacy-fluorinated pyrimidines (fluorouracil, s-1 and capecitabine)	Gan To Kagaku Ryoho	39	1603-1607	2012

*gastrointestinal cancer chemotherapy*

# 消化器がん 化学療法 レジメンブック

編集

愛知県がんセンター中央病院薬物療法部部长  
室 圭 *Kei Muro*

46の汎用レジメンを簡潔に解説！

治療継続のネックとなる有害事象についても詳述。

第一線の先生方の声をもとにしたQ&A付き！

## 高度肥満患者の抗がん剤用量をどう決めるか？

A

薬剤により例外もあるが、高度肥満における減量基準に関して適切に評価されたものは現在なく、体表面積に投与上限は設定すべきではない。

## 1. 抗がん剤の投与量計算の実際

循環血液量，糸球体濾過率，肝の大きさ，ヒトの基礎代謝，体表からの熱の喪失などは，体表面積と相関する。抗がん剤の投与量の計算においては体表面積で換算したほうが個々の症例についてより適正な投与量が得られ，同じような血中動態最大耐量が得られることが示されている<sup>1)</sup>。そのため現在，一部の抗体製剤・分子標的治療薬を除き，抗がん剤の領域では投与量の調整は体表面積に基づいて行われている。

## 2. 肥満患者の抗がん剤用量設定の現状

体表面積に基づいて抗がん剤の投与量を設定する場合に用いる体重は実測値を用いるのが一般的であるが，体重に実測値を用いるとかなりの症例で多めに投与されることから，ECOG (The Eastern Cooperative Oncology Group) では，過量投与を避けるために実測値と標準値で計算し，いずれか少ないほうを用いる場合があることが報告されている。

一般臨床においても，標準体重を20%以上超える場合や体表面積 $2.0\text{m}^2$ 以上の場合に投与上限値を設けている施設がある。しかし，抗腫瘍効果や安全性の面での前向きな試験による十分なエビデンスがないまま用量の調整を行っているのが現状である。

## 3. 現在までのエビデンスに基づいた肥満症例における投与量の設定

2007年のJCO (Journal of Clinical Oncology) に報告されたSparreboomらの1,206例を対象とした大規模な研究による報告では，BMI > 30の症例においてはBMI < 25の症例と比べて，対象としたカルボプラチン，シスプラチン，ドセタキセル，パクリタキセル，イリノテカン等の薬剤においてクリアランスが増加しており，特にシスプラチン，パクリタキセルにおいてはクリアランスの増加が有意であった。肥満のある場合に投与量を調整することは，多くの抗がん剤においては勧められないとの結論が示されている<sup>2)</sup>。

乳がんや精巣がんの患者では減量により生存期間の短縮が認められており、治癒が望める症例においては減量によるベネフィットとリスクを十分に考慮する必要があるとされている<sup>3)</sup>。

一方、別の前向き研究では、カルボプラチンのAUC (area under the curve) について肥満患者 (BMI  $\geq$  27) で検討したところ、投与量が多すぎる可能性が示唆されている<sup>4)</sup>。

上述のJCO論文のエディトリアルには、現在までの報告に基づき、肥満患者における抗がん剤投与量の設定における規定について、以下のように述べている<sup>5)</sup>。

- ① 高度肥満における減量基準に関して適切に評価されたものは現在なく、体表面積に投与上限は設定すべきではない。
- ② 理想体重等ではなく、実際の体重を用いて求められた体表面積で計算された抗がん剤の用量を推定用量として開始用量とする。
- ③ カルボプラチンのように、実測体重の平均や理想体重を用いて計算した投与量クリアランスが一番の予測指標になる薬剤の場合は、特別に考慮する。

肥満患者を対象とした用量調整の必要性については、今後、抗腫瘍効果や安全性も指標にした前向き試験によって検証していくことが必要であると考えられる。

## 文献

- 1) 古江 尚: 抗癌剤投与量設定における体表面積の意義. 血液・腫瘍科 35 (Suppl. 2): 53-57, 1997.
- 2) Sparreboom A, et al: Evaluation of alternate size descriptors for dose calculation of anticancer drugs in the obese. J Clin Oncol 25: 4707-4713, 2007.
- 3) Gurney H: How to calculate the dose of chemotherapy. Br J Cancer 86: 1297-1302, 2002.
- 4) Herrington JD, et al: Prospective evaluation of carboplatin AUC dosing in patients with a BMI  $\geq$  27 or cachexia. Cancer Chemother Pharmacol 57: 241-247, 2006.
- 5) Gurney H, et al: Obesity in dose calculation: a mouse or an elephant? J Clin Oncol 25: 4703-4704, 2007.

(仁科智裕)

## シスプラチンを含んだレジメンにおける腎障害 軽減のための補液量・前投薬などは？

# A

原則は添付文書によるが、最近ではショートハイドレーションの安全性も報告されてきている。また、マグネシウム投与の有用性に関する報告がある。利尿薬の腎障害予防効果は、証明はされていない。

### 1. シスプラチンによる腎障害の機序

腎障害はシスプラチン(CDDP)の主たる排泄器官が腎であることが関与しており、尿細管の壊死が原因であると考えられている。

### 2. 腎毒性の予防・軽減の方法

#### ①補液によるハイドレーション

多くの臨床試験で補液量は検証されているが、統一された補液量は定まっていない。

臨床試験の結果から、高用量CDDP投与日に、合計3～5Lの大量の補液をCDDP投与前後に投与して尿量を確保することにより、腎障害が軽減されることが報告されている。そのためCDDPを含むレジメンでは、入院による治療が必要となる。

CDDP高用量(主に $60\text{mg}/\text{m}^2$ 以上)の場合の添付文書における補液は下記の通りである。

- ・CDDP投与前に適当な輸液1,000～2,000mLを4時間以上かけて点滴
- ・CDDPは生理食塩水500～1,000mLに混和して2時間以上かけて点滴投与
- ・CDDP投与後に適当な輸液1,000～2,000mLを4時間以上かけて点滴

CDDP投与前後の補液に関しては生理食塩水、0.45%生理食塩水、乳酸リンゲル液、維持液等の電解質を含んだ輸液が用いられる。CDDPを3%高張食塩溶液として投与する方法も腎障害の軽減に有効とされている。

最近になり、NK<sub>1</sub>受容体拮抗薬、第2世代5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬、ステロイドによる制吐療法が進歩しCDDP投与後の経口摂取も十分可能となったことにより、欧米において補液量2,000mL程度のショートハイドレーションの安全性が報告され、外来での投与も行われてきている<sup>1)</sup>。ショートハイドレーションを行う場合には、治療前腎機能が良好であることや、多量(1,000mL程度/日)の飲水が可能であることが必要である。

CDDP投与後2～3日目にも尿量確保のために補液を追加するため、入院による治療を行うことが多いが、経口摂取が良好な場合は外来で投与可能な場合もある。現在、TS-1®+CDDP療法でCDDP投与後2～3日目の補液を飲水に置き換えた安全性試験が実施されている。

CDDP低・中等量の場合[例：イリノテカン+CDDP (30mg/m<sup>2</sup>:biweekly)] や、ゲムシタビン+CDDP (25mg/m<sup>2</sup>:Day1, 8) の場合は、CDDP投与日のみの補液とし、用量は合計で1,500mL程度に減量して行われていることが多い。

## ② マグネシウム投与

CDDP投与時には主に腎からの排泄亢進と消化管毒性により、低マグネシウム(Mg)血症を高頻度に引き起こす。低Mg血症により、倦怠感、眠気、筋痙攣や重篤な不整脈を引き起こすことに加え、腎障害が引き起こされる可能性があることも報告されている。

高用量のCDDPを投与した患者において、Mgを追加した群としない群の腎障害の程度を比較したランダム化比較試験が2報告あり、MgをCDDP投与前に追加した群で有意に腎障害が軽いと報告されている<sup>2,3)</sup>。欧米では投与1日目にMgを投与することが標準的となっているようであるが、必ずしも投与する必要はないと考えられる。

## 3. 尿量確保のモニタリング・対応について

CDDP投与当日には3,000mL以上、投与後2～3日目には1,500mL以上の尿量を確保することが望ましいとされている。

尿量確保が不十分な場合は必要に応じてマンニトールやフロセミド等の利尿薬を、脱水にならないように注意しながら使用する。マンニトールやフロセミドの腎障害予防効果は証明されていないが、臨床現場では汎用されている。なお、フロセミドによる強制利尿を行う場合は腎障害、聴器障害が増強されることがあるので、輸液等による水分補給を十分行う。

## 文献

- 1) Greystoke AP, et al: How many cisplatin administration protocols does your department use? *Eur J Cancer Care (Engl)* 19: 80-90, 2010.
- 2) Bodnar L, et al: Renal protection with magnesium subcarbonate and magnesium sulphate in patients with epithelial ovarian cancer after cisplatin and paclitaxel chemotherapy: a randomised phase II study. *Eur J Cancer* 44: 2608-2614, 2008.
- 3) Willox JC, et al: Effects of magnesium supplementation in testicular cancer patients receiving cis-platin: a randomised trial. *Br J Cancer* 54: 19-23, 1986.

(仁科智裕)



## 抗EGFR抗体薬使用時の低マグネシウム血症の マネジメントは？

# A

原則として、CTCAE ver4.0日本語訳JCOG版に従い対応する。マグネシウム補給は経口でなく経静脈的投与によるが、補液による補給だけでは十分改善が得られない症例も多い。

### 1. 発生機序

抗EGFR抗体薬使用時の低マグネシウム (Mg) 血症は、抗EGFR抗体により腎尿細管からの再吸収障害が起こることによると考えられている。

### 2. 発生頻度と発現時期

海外における前向き試験の結果では抗EGFR抗体薬による治療により、98人中95人(97%)にMgの低下が出現し、高齢、治療前血清Mg低値、治療期間の長期化でリスクが高くなり、6カ月以上の投与で重症例の頻度が高くなることが報告されている<sup>1)</sup>。なお、Grade 3、4の低Mg血症の頻度は6～17%とされ、発現時期に一定の傾向はみられない。

### 3. 症 状

倦怠感、吐き気・嘔吐、眠気、脱力感、筋肉の痙攣、ふるえ、動悸、不整脈

### 4. モニタリング

低Mg血症による症状がないか注意して観察する。低Mg血症の初期段階には症状が観察されないことがあり、2週ごとに血清Mg値をチェックする。動悸などの症状がある場合は心電図検査を施行する。心疾患の合併例(心筋梗塞、心不全、不整脈)では、より注意して観察する。抗EGFR抗体薬の投与開始以前より低Mg血症を合併している症例では、低Mg血症の症状を発現する可能性が高まるため注意を要する。

### 5. 対処法

#### ①CTCAE ver4.0日本語訳JCOG版(表1)のGrade別の対応

Grade 1、2の場合: Grade 2以下の低Mg血症に対してMgを補給することが患者のQOLや死亡率を減らすというエビデンスはなく、基本的には補給や抗EGFR抗体薬の休薬は必要ないが、低Mg血症による症状が明らかな場合には補給を考える。

表 1 低マグネシウム血症の Grade (CTCAE v4.0-JCOG 版)

Grade 1	<基準値下限~1.2mg/dL
Grade 2	<1.2~0.9mg/dL
Grade 3	<0.9~0.7mg/dL
Grade 4	<0.7mg/dL; 生命を脅かす
Grade 5	死亡

Grade 3以上の場合：低Mg血症が重症化すると疲労，痙攣，傾眠などの症状だけでなく重篤な不整脈が出現するため，心電図による不整脈の有無の精査，適切なMgの補正，抗EGFR抗体薬の休薬が必要である。週に頻回の補給をしても改善が得られない場合は，抗EGFR抗体薬のstop and go approachによる投与が行われている。実際は週単位での延期を行い，血清Mg値と症状の改善を評価しながら治療の再開を考慮する。

### ②Mgの補給方法

経口のMg補給では十分な改善が得られないことが多い上に，下痢を起こすので不適当とされている。Grade 3以上の場合は，心血管イベントを減らすためにも静脈注入によりMg（硫酸Mg注射液）を補給することが望まれる。なお，低Mg血症をGrade 2以下に改善するには週2～毎日のMg補給（静脈注入で4～10g）が必要となることが報告されており<sup>2)</sup>，補液による補給だけでは十分改善が得られない症例も多くあると考えられる。

#### ●Mgの実際の処方・対処法

10%硫酸Mg注20mEq シリンジ20mL + 生理食塩水100mL 点滴静注(60分)

### 文献

- 1) Tejpar S, et al: Magnesium wasting associated with epidermal-growth-factor receptor-targeting antibodies in colorectal cancer: a prospective study. *Lancet Oncol* 8:387-394, 2007.
- 2) Fakih M: Management of anti-EGFR-targeting monoclonal antibody-induced hypomagnesemia. *Oncology (Williston Park)* 22:74-76, 2008.

(仁科智裕)

進行胃がんでパクリタキセル不応後のドセタキセル，またはドセタキセル不応後のパクリタキセル投与は意味があるのか？

**A**

現時点で有効と言えるまでのエビデンスはない。

パクリタキセル (PTX) とドセタキセル (DOC) は同じタキサン系に属しながら交差耐性が不完全であると考えられている。双方とも $\beta$ チューブリンサブユニットに結合し、チューブリン重合を促進・脱重合を阻害することで、細胞分裂サイクルを止め、がん細胞のアポトーシスを誘導する作用を持つが、PTXとDOCではチューブリン結合部の親和性や微小管関連蛋白への作用に違いがあり、このことが2剤の抗腫瘍スペクトラムの違いの一因と考えられている<sup>1~3)</sup>。

交差耐性が不完全なことから、卵巣がんや乳がんの領域ではPTX不応例へのDOC投与、あるいは逆の投与の検討がなされており、第II相試験においてもその有用性が報告されている(表1)<sup>4~8)</sup>。

しかしながら胃がんについては、症例報告レベルで有効であったとの報告は認めるが<sup>9, 10)</sup>、プロスペクティブな臨床試験はもとより、ある程度の数の症例を検討したケースシリーズの報告でさえもpublishされたものはまだない。

筆者らは、国立がん研究センター中央病院において2002年4月~2008年3月の間に、2次化学療法以降の治療として施行されたweekly-PTX療法(80mg/m<sup>2</sup>)が不応となった後、triweekly-DOC療法(60~70mg/m<sup>2</sup>)を施行された切除不能進行再発胃がん21名をレトロスペクティブに検討した<sup>11)</sup>。全21例中奏効例は1例も認めず、SD(不変)症例もわずか2例(9.5%)のみであり、PFS(無増悪生存期間)54日、MST(生存期間中央値)102日と有効性を見出せなかった。理由として、対象となった症例の約75%においてDOCが四次化学療法以降の投与であり、既に多剤に対して不応となった後で、効果を期待しがたい状態であったことが考えられた。この結果からは、胃がんにおける二次化学療法以降のPTX不応例に対するDOC使用は推奨できないという結論となった。

表 1 乳がん・卵巣がんでの 2nd-Taxan 報告

	n	1st-Taxan	2nd-Taxan	奏効率 (RR)
乳がん				
Valero (1998) <sup>4)</sup> phase II	44	PTX	DOC 100mg/m <sup>2</sup> q3w	18.1%
Sawaki (2004) <sup>5)</sup> retrospective	44	DTX	PTX 80mg/m <sup>2</sup> qw	31.8%
Yonemori (2005) <sup>6)</sup> retrospective	82	DTX	PTX 80mg/m <sup>2</sup> qw	19.5%
卵巣がん				
Vershroege (2000) <sup>7)</sup> phase II	32	PTXを含む化学療法	DOC 75 or 100mg/m <sup>2</sup> q3w	23%
Markman (2003) <sup>8)</sup> phase II	30	PTX+プラチナ系製剤	DTOC 75mg/m <sup>2</sup> q3w	10%

以上のように、胃がんにおいてはPTX不応後のDOC、またはDOC不応後のPTXはいずれも現時点で有効と言えるまでのエビデンスはない。

しかし、我々の検討の中で、前治療のPTXのPFSが120日以上症例では、DOCのPFSは89日と、120日未満の症例のPFS(38日)と比較して有意に長かった(log rank:  $p = 0.045$ )。もちろん交絡因子は考えられるが、このような一部の症例には有効である可能性がある。また、胃がんに対する化学療法の選択肢がいまだ多いとは言えない現状で、数少ない武器を有効に使うためには、やはりこの“2nd-Taxan”の有効性についてプロスペクティブな臨床試験で検討されるべきである。

### 文献

- 1) Gligorov J, et al: Preclinical pharmacology of taxanes: implication of the differences. *Oncologist* 9: 3-8, 2004.
- 2) Hanauske AR, et al: Effects of taxotere and taxol on *in vitro* colony formation of freshly explanted human tumor cells. *Anticancer Drugs* 3: 121-124, 1992.
- 3) Untch M, et al: Comparison of paclitaxel and docetaxel in gynecologic and breast cancer cell lines with ATP-cell viability assay. *Anticancer Drugs* 5: 24-30, 1994.
- 4) Valero V, et al: A phase II study of docetaxel in patients with paclitaxel-resistant metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 16: 3362-3368, 1998.
- 5) Sawaki M, et al: Paclitaxel administered weekly in patients with docetaxel-resistant metastatic breast cancers: a single-center study. *Tumori* 90: 36-39, 2004.
- 6) Yonemori K, et al: Efficacy of weekly paclitaxel in patients with docetaxel-resistant metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 89: 237-241, 2005.
- 7) Vershroegen CF, et al: Docetaxel for patients with paclitaxel-resistant Mullerian carcinoma. *J Clin Oncol* 18: 2733-2739, 2000.

- 8) Markman M, et al: Phase II trial of single agent docetaxel in platinum and paclitaxel-refractory ovarian cancer, fallopian tube cancer, and primary carcinoma of the peritoneum. *Gynecol Oncol* 91: 573-536, 2003.
- 9) 對馬隆浩, 他: Docetaxel不応後にPaclitaxelが奏効した癌性腹膜炎を伴う進行・再発胃癌の2例. *癌と化学療法* 34: 1647-1650, 2007.
- 10) Kimura Y, et al: Paclitaxel-resistant recurrent gastric cancer responsive to docetaxel: A case report. *癌と化学療法* 38: 643-645, 2011.
- 11) 堀田洋介, 他: 切除不能進行胃癌におけるpaclitaxel不応例に対するdocetaxelの治療成績. 日本臨床腫瘍学会学術集会, #01-030, 2009.

(堀田洋介, 加藤 健)

## D HER2 に対する抗体薬

### I HER2 の役割

HER (ErbB) ファミリーは、HER1 (上皮成長因子受容体: EGFR), HER2, HER3, HER4 からなる膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼである。リガンドが受容体の細胞外領域に結合すると、受容体はホモまたはヘテロダイマーを形成し細胞内情報伝達が開始される。HER2 は、過剰発現するとリガンド非依存的に恒常的に活性化し、正常細胞を形質転換することが報告されている。HER2 は HER1 ~ HER4 のいずれともダイマーを形成しうるが、HER2/HER3 の増殖促進活性、形質変換活性が最も高いことが示されている。HER2 関連シグナルは MAPK 経路を介して細胞増殖に関与し、PI3K/AKT 経路を介してアポトーシス回避に作用する。

実際、HER2 の過剰発現はがん細胞の増殖の亢進、転移能の上昇などががん細胞の悪性化と関連することが示唆されている。HER2 は乳がん患者の 20 ~ 30%、胃がん患者の 10 ~ 20% 程度で過剰発現しており、乳がんでは予後不良因子となっている。

### 2 trastuzumab

trastuzumab は、HER2 (ERBB2) タンパク質に対するヒト化モノクローナル抗体である。

trastuzumab は、マウス由来のモノクローナル抗体の抗原結合部位をヒト免疫グロブリンの定常部に移植したヒト化抗体で、マウス由来の部分は全体の 5% であり、95% はヒトモノクローナル抗体で構成されている。

#### a. 作用機序

trastuzumab は、HER2 に特異的に結合すると、HER2 タンパク質の細胞外ドメインを結合し、増殖因子のシグナルが細胞内へ伝達されるのを阻害する。また、NK 細胞、単球を作用細胞とした抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) により抗腫瘍効果を発揮する。

#### b. 治療対象

HER2 過剰発現が確認された乳がん患者および胃が

ん患者が適応となる。

HER2 過剰発現は DNA レベルの遺伝子増幅に伴って起きている。免疫組織化学 (IHC) 法または蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を行うのが一般的であるが、乳がんと胃がんでは IHC 法の判定方法が異なる。

乳がんでは、3+ (腫瘍細胞の膜に限局した強度の染色性を示す HER2 陽性細胞 > 30%) を強陽性とし、10 ~ 30% を 2+ (equivocal) とする。胃がんは乳がんとは異なり、IHC では全周性ではなく基底膜および側方側の細胞膜のみに陽性反応が認められる場合があり、強い染色性を示す HER2 陽性細胞 > 10% (生検標本の場合は 5 個以上含むがん細胞クラスターがあること) を 3+ と判定し、弱-中等度の染色性の場合には 2+ (equivocal) とする。2+ の場合は FISH 法で再検査を行う。

FISH 法では、20 個の腫瘍細胞での HER2 および CEP17 それぞれの蛍光シグナル数を蛍光顕微鏡で計数する。HER2/CEP17 比 > 2.2 を陽性、1.8 ~ 2.2 を equivocal と定義する。equivocal と判定された場合は、細胞数を増やしてカウントし同様に判定を行う。再度 equivocal と判定された場合は、従来どおり 2.0 以上を陽性とする。

最近、HER2 遺伝子増幅を測定する方法として DISH 法 (dual color *in situ* hybridization) も保険適用となった。腫瘍組織中の HER2 遺伝子および HER2 遺伝子が局在する第 17 番染色体のセントロメアを、黒色 (HER2 遺伝子) と赤色 (第 17 番染色体のセントロメア) のシグナルとして検出する方法で、腫瘍組織の形態学的特徴とシグナルが光学顕微鏡下で同時観察可能である。

#### c. 用法・用量、薬物動態

初回 4 mg/kg を 90 分かけて静脈内投与し、その後週 1 回 2 mg/kg を投与する方法 (A 法) と、初回 8 mg/kg 投与後、3 週に 1 回 6 mg/kg を投与する方法 (B 法) がある。初回投与の忍容性が良好であれば、2 回目以降の投与時間は 30 分間まで短縮できる。

A 法における定常状態での半減期は 28.5 日、B 法における定常状態での半減期は 16.5 日である。trastuzumab の薬物動態に併用薬剤の影響はなく、人種差も認められないが、胃がん患者の血清中 trastuzumab のトラフ濃度の平均値は転移性乳がん患者と比較して低値を示す傾向が認められている。動物デー

タでは trastuzumab は胎盤を通過し、乳汁へも移行するが、脳・脊髄への移行は認められなかった。

## d. 副作用

### 1) infusion reaction

trastuzumab の点滴中～点滴開始後 24 時間以内に多く出現する。初回投与時に約 40% の症例に発熱、悪寒、悪心・嘔吐などの症状が認められている。軽症～中等症の場合は、投与の中断や投与速度の減量で対処できることが多いが、必要に応じて解熱鎮痛薬や抗ヒスタミン薬の使用を考慮する。通常再投与が可能である。アナフィラキシー様症状や肺障害などの重篤な副作用（気管支痙攣、重度の血圧低下、急性呼吸促進症候群など）による死亡例も報告されており、有症状の肺基礎疾患や肺転移のある患者では重篤化しやすいとされているため、十分観察しながら慎重に投与することが必要である。

### 2) 心毒性

trastuzumab の重篤な副作用の 1 つであり、左心機能低下のほか、高血圧、不整脈なども起こしうる。HER2 は心筋細胞の生存経路にも発現しており、薬物療法に trastuzumab を併用すると、心不全の発症率が高くなる。心毒性のメカニズムは完全に解明されていないが、アントラサイクリンなどによる酸化ストレスが加わると、細胞膜上の HER1、HER2、HER4 にリガンドが結合し心筋細胞の生存経路が活性化されるが、trastuzumab が HER2 受容体に結合することにより生存経路が遮断されると考えられている。

転移性乳がんに対する第Ⅲ相試験などのデータによると、trastuzumab 単独投与による心障害発現率は 3%、AC/EC (doxorubicin または epirubicin + cyclophosphamide) との併用では 27%、paclitaxel との併用では 10% の心不全リスクが推定されているが、Cochrane Review では、trastuzumab による心不全、左室駆出率 (left ventricular ejection rate: LVEF) 低下の相対リスクはそれぞれ 5.11 と 1.83 と報告されている。

アントラサイクリンの蓄積投与量 (doxorubicin 換算で 350 mg/m<sup>2</sup> 以上) 以外に、胸部放射線治療歴、心不全症状、LVEF 低下、不整脈、心臓弁膜症、冠動脈疾患、高血圧が危険因子とされている。trastuzumab による心毒性は通常可逆性であるが、約 20% は不可逆性といわれている。trastuzumab 投与開始前には必ず LVEF を含む心機能 [心エコー検査または MUGA スキャン (multiple gated acquisition scan)] を確認し、薬物療法と trastuzumab の併用療法を行う際には、心機能を定期的にモニタリングする必要がある。

## e. HER2 陽性転移性乳がんに対する trastuzumab

### 1) trastuzumab 単独療法

一次治療における trastuzumab 単独療法の有用性は、単アームの第Ⅱ相試験において奏効率 15～35% と報告されている。trastuzumab → docetaxel (順次投与) vs trastuzumab + docetaxel (併用) を比較した HERTAX 試験では、無増悪生存期間 (PFS) に有意差はなかったが、全生存期間 (OS) は併用群において 10.8 ヶ月の改善を認めた ( $p=0.11$ )。また、trastuzumab 単剤 → trastuzumab + docetaxel (順次投与) vs trastuzumab + docetaxel (併用) を比較した JO 17360 試験では、OS が併用療法において有意に延長した (HR 2.72,  $p=0.04$ )。このため、単剤療法は併用療法よりも推奨グレードが低い。

### 2) trastuzumab + 薬物療法併用

一次治療としての trastuzumab + 薬物療法 (AC/EC,あるいは paclitaxel) 併用は、薬物療法単独と比較して奏効率 (50% vs 32%)、無進行期間 (TTP) 中央値 (7.4 ヶ月 vs 4.6 ヶ月, HR 0.51,  $p < 0.001$ )、生存期間中央値 (25.1 ヶ月 vs 20.3 ヶ月, HR 0.80,  $p=0.046$ ) と優れていた (H0648g 試験)。docetaxel との併用においては別の試験でも OS の延長を認めている (M77001 試験)。vinorelbine との併用についても、trastuzumab + タキサンと同等の効果が報告されている (TRAVIOTA 試験, HERNATA 試験)。

### 3) trastuzumab + 他の分子標的治療薬との併用

trastuzumab 投与中に病勢進行 (PD) となった HER2 陽性転移性乳がんに対して、lapatinib 単独療法と lapatinib + trastuzumab 併用療法の第Ⅲ相試験が行われた (EGF104900 試験)。併用療法により PFS が延長し (12.0 ヶ月 vs 8.1 ヶ月, HR 0.73,  $p=0.008$ )、OS の改善も認められた。trastuzumab + docetaxel + perutzumab 併用療法については後述する。

### 4) trastuzumab beyond progression

trastuzumab 投与中もしくは投与後に PD となった後の trastuzumab 継続の有効性については 2 つの第Ⅲ相試験が報告されている。

GBG 26/BIG 03-35 試験は、trastuzumab 既治療例に対する capecitabine 単独と capecitabine + trastuzumab 併用療法を比較した第Ⅲ相試験である。併用療法群において奏効率 (48.1% vs 27.0%,  $p=0.012$ )、TTP (8.2 ヶ月 vs 5.6 ヶ月, HR 0.69,  $p=0.0338$ ) とともに良好であったが、OS の延長は認めなかった。また、先に述べた EGF104900 試験では、trastuzumab 不応後に lapatinib との併用で trastuzumab 継続投与の効

果が検証された。

以上より, trastuzumab が無効となった症例に対する trastuzumab の継続投与は治療選択肢としてあげられるが, 特に trastuzumab 終了後1年以内の増悪に対しては trastuzumab + lapatinib が有効と考えられている。

#### f. 補助薬物療法としての trastuzumab

早期乳がん術後の trastuzumab に関して試験が5つ報告され (NSABPB-31, NCCTG N9831, HERA, BCIRG 006, FinHer), 4つで positive な結果を認めているが, FinHer 試験では短期 (9回) の trastuzumab 投与で有用性を示せなかった。HER2 陽性, リンパ節転移陽性あるいは再発高リスクのリンパ節転移陰性乳がんでは, アントラサイクリンやタキサンによる治療後, trastuzumab を1年間投与することが推奨されている。

術前治療としては, 薬物療法に trastuzumab を併用する群としない群の第Ⅲ相試験において, trastuzumab 併用群で有意に病理学的完全奏効率 (pCR) が高かった (66.7% vs 25%,  $p=0.02$ )。最近, trastuzumab, pertuzumab, docetaxel の種々の組み合わせによるランダム化第Ⅱ相試験 (NeoSphere) の結果が報告された。主要評価項目である pCR 率は3剤併用群で最も高かった (45.8%)。術前薬物療法も症例に応じて選択される。

#### g. 胃がんに対する trastuzumab

HER2 陽性の切除不能進行再発胃がん・食道胃接合部がんを対象とした国際共同第Ⅲ相試験 (ToGA 試験) において, HER2 陽性は免疫染色 (IHC) で3+ または FISH 陽性 (FISH+) と定義された。capecitabine または 5-FU + cisplatin (XP/FP 療法) と trastuzumab + XP/FP 併用療法が比較され, 主要評価項目である OS は, XP/FP 療法群の 11.1 ヶ月に対し, trastuzumab 併用群では 13.8 ヶ月 (HR 0.74,  $p=0.0046$ ) と有意に延長した。trastuzumab による毒性の上乗せは認められず, 心毒性も問題となっていない。この試験結果より, わが国でも 2011 年 3 月, trastuzumab が胃がんに適応拡大された。乳がんのように病勢進行後の trastuzumab 継続投与の意義は現時点で明らかではなく, 補助薬物療法における有効性も今後の課題である。

#### h. 耐性機序

腫瘍細胞表面に存在する HER2 タンパク質がタンパク質分解酵素によって切離され, 細胞外ドメイン

(extracellular domain: ECD) が放出されると, trastuzumab は結合不能となり, trastuzumab に対して耐性化する。ECD が消失した HER2 は p95 として検出可能であり, p95 HER2 と呼ばれる。p95 陰性乳がん患者では trastuzumab の奏効率が 51% (19/37) であるのに対し, p95 陽性乳がん患者では 11% (1/9) しか効果がなかったとの報告がある。このような症例には lapatinib が有効と考えられる。その他, MUC4 による HER2 のマスキングや, 代替シグナルの存在 (IGF-1R, Met など), 下流シグナル分子の変化 (PTEN 欠失など) による耐性化も報告されている。

### 3 pertuzumab

pertuzumab (国内未承認) は, HER2 受容体と他の HER 受容体 (EGFR/HER1, HER3 および HER4) との 2 量化を特異的に阻害するヒト化モノクローナル抗体である。pertuzumab は trastuzumab とは結合する HER2 受容体 ECD が異なり, trastuzumab はドメイン 4 に, pertuzumab はドメイン 2 に結合する。*in vitro* において pertuzumab は HER3 を阻害することで細胞増殖が抑制されることも報告されている。pertuzumab は HER2/HER3 ヘテロ 2 量体によるシグナル伝達を阻害できるが, trastuzumab ではそのような反応は確認されていない。

CLEOPATRA 試験は, trastuzumab + docetaxel 併用療法に対する pertuzumab の上乗せ効果を検証した第Ⅲ相試験である ( $n=808$ )。pertuzumab 併用群において, 主要評価項目である PFS 中央値が 6.1 ヶ月延長し (PFS 中央値 18.5 ヶ月 vs 12.4 ヶ月), PD または死亡リスクが 38% 減少した (HR 0.62,  $p<0.0001$ )。pertuzumab 併用群において心毒性発生率の上昇は認められなかった。OS も pertuzumab 併用群で延長する傾向が認められたが, 報告時点で統計的に有意差がなく, 最終解析は 2013 年に行われる予定である。

前述のように, 術後補助薬物療法として docetaxel + trastuzumab + pertuzumab の有効性が報告され, 今後標準治療となる可能性がある。

pertuzumab は 2012 年 6 月に米国食品医薬品局 (FDA) で承認され, わが国においても承認申請中である。



## 4 T-DM1

T-DM1 (国内未承認) は, trastuzumab の Fc 部分にリンカー分子を介して抗がん薬 emtansine (DM1) を結合させた薬剤結合抗体 (antibody-drug conjugate: ADC) である. trastuzumab が HER2 の ECD に結合すると受容体の内在化が起こり, T-DM1 が腫瘍細胞内に取り込まれる. DM-1 は微小管阻害作用があり, ライソゾームにより T-DM1 が分解され DM1 が細胞質に入ると, チュブリンに結合し G2/M arrest から細胞死に至る.

第Ⅱ相臨床試験 (TDM4374g 試験) では, アントラサイクリン, タキサンおよび capecitabine に加えて, 転移がんに対して過去に2種類以上の HER2 を標的とした治療 (trastuzumab および lapatinib) 後に病態が悪化した HER2 陽性転移性乳がん患者 110 人を対象に T-DM1 単剤治療を評価した. 主要評価項目である奏効率は 34.5% であった.

HER2 陽性転移性乳がん患者に対する一次治療として, T-DM1 単剤と trastuzumab + docetaxel 併用療法を比較したランダム化第Ⅱ相臨床試験 (TDM4450g) の結果, PFS は, T-DM1 単剤群では 14.2 ヶ月, trastuzumab + docetaxel 併用群では 9.2 ヶ月であった (HR 0.59,  $p=0.035$ ). 副作用による治療中止は, T-DM1 単剤群で 7.2%, trastuzumab + docetaxel 併用群では 28.8% と忍容性も優れていた.

trastuzumab + タキサン既治療例を対象に, T-DM1 単剤と capecitabine + lapatinib 併用療法を比較した EMILIA 試験の結果が 2012 年 ASCO において報告された. PFS (9.6 ヶ月 vs 6.4 ヶ月, HR 0.65,  $p < 0.0001$ ) で有意な改善が報告され, OS も中間解析であるが有意な延長を認めた (最終解析は 2014 年予定).

現在, 一次治療例を対象として, T-DM1 + プラセボまたは pertuzumab 併用療法と trastuzumab + タキサン併用療法を比較する MARIANNE 試験が進行

中である. 今後, 補助薬物療法においても研究が進むと思われる.

### ■参考文献

- 1) Slamon DJ et al : Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *J Clin Oncol* 344 : 783, 2001
- 2) Blackwell KL et al : Randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 28 : 1124, 2010
- 3) von Minckwitz G et al : Trastuzumab beyond progression in human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced breast cancer: a German breast group 26/breast international group 03-05 study. *J Clin Oncol* 27 : 1999, 2009
- 4) von Minckwitz G et al : Trastuzumab beyond progression : overall survival analysis of the GBG 26/BIG 3-05 phase III study in HER2-positive breast cancer. *Eur J Cancer* 47 : 2273, 2011
- 5) Buzdar AU et al : Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy : results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 23 : 3676, 2005
- 6) Gianni L et al : Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere) : a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 13 : 25, 2012
- 7) Bang YJ et al : Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA) : a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376 : 687, 2010
- 8) Baselga J et al : Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 366 : 109, 2012

## Gene Amplification of Ribosomal Protein S6 Kinase-1 and -2 in Gastric Cancer

SHUHEI YOSHIDA<sup>1,2</sup>, KAZUKO MATSUMOTO<sup>1</sup>, TOKUZO ARAO<sup>1</sup>, HIROKAZU TANIGUCHI<sup>3</sup>,  
ISAO GOTO<sup>2</sup>, TOSHIAKI HANAFUSA<sup>2</sup>, KAZUTO NISHIO<sup>1</sup> and YASUhide YAMADA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Genome Biology, Kinki University Faculty of Medicine, Osaka, Japan;

<sup>2</sup>First Department of Internal Medicine, Osaka Medical College, Osaka, Japan;

<sup>3</sup>Pathology Division and <sup>4</sup>Gastrointestinal Medical Oncology, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

**Abstract.** *Background: The gene amplification of ribosomal protein S6 kinase 1 and 2 (S6K1 and S6K2) and its clinical relevance in gastric cancer remain unclear. Materials and Methods: A comparative genomic hybridization analysis and DNA copy number assay were performed for nine cancer cell lines. The gene amplification of S6K1 and S6K2 were determined using a DNA copy number assay of 213 gastric cancer tissues. Results: S6K1 and S6K2 amplifications were observed in one and three cancer cell lines, respectively. No amplification of S6K1 was detected in the gastric cancer tissues, while S6K2 amplification was observed in 4.7% of the gastric carcinoma tissues. Patients with stage IV gastric cancer whose tumors exhibited amplification had a significantly shorter overall survival. Conclusion: S6K2 amplification was frequently observed in gastric cancer and was related to a poor prognosis. Our findings may provide novel insight into the dysregulation of mammalian target of rapamycin signaling by S6K2 amplification in gastric cancer.*

Many investigations on treatment of gastric cancer have been performed over the past decades; however, the prognosis for patients with advanced gastric cancer remains poor (1, 2). Thus, detailed information on genomic alterations in clinical samples is needed in order for new treatment modalities of molecular-targeted drugs to be developed.

The serine/threonine kinase mammalian target of rapamycin (mTOR) is a downstream effector of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/ v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT) pathway and regulates

transcription, mRNA translation, cellular growth, proliferation, and survival of cells in response to various stimuli such as growth factors, nutrients, energy, and stress signals (3). mTOR forms two complexes, which are known as mTORC1 and mTORC2, and these multiple-protein complexes are activated by phosphorylated AKT (4). Activated mTORC1 further activates downstream ribosomal protein S6 kinases by phosphorylation (5). Ribosomal protein S6 kinase-1 (S6K1, also known as *p70-S6K/RPS6KB1*) and ribosomal protein S6 kinase-2 (S6K2, also known as *p70S6Kbeta/ RPS6KB2*) are key target molecules of mTORC1 and belong to the AGC [protein kinase, cAMP-dependent (PKA), protein kinase, cGMP-dependent (PKG) and protein kinase C (PKC)] kinase family (6). S6 kinases possess consensus domains, including a TOR signaling motif in the N-terminal domain, a kinase domain and a C-terminal domain (7). S6K1 phosphorylates numerous downstream molecules and regulates many cellular process including mRNA processing, translation initiation, translational elongation, protein folding, cell growth, motility, and survival (6). Therefore, mTORC1-S6K1 signaling is considered to be important for cellular physiology, and its deregulation often leads to disease.

In oncology, both cancerous and non-cancerous cells that contribute to the formation of tumor tissue, such as leukocytes, endothelial cells, and fibroblasts, depend on the mTORC1-S6K1 signaling pathway, and frequent dysregulation of this signaling has been associated with the development of cancer (8). Thus, many mTOR inhibitors are now under clinical development, and some mTOR inhibitors have shown clinical benefits as molecular-targeted drugs (9). However, very limited information on S6K1 and S6K2 amplification and its clinical relevance to gastric cancer is available.

In this study, we retrospectively studied the DNA copy numbers of S6K1 and S6K2 using formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples from patients with gastric cancer who had undergone surgery, and evaluated the clinical significance of these amplifications.

*Correspondence to:* Tokuzo Arao, Department of Genome Biology, Kinki University Faculty of Medicine, 377-2 Ohno-higashi, Osaka-Sayama, Osaka 589-8511, Japan. Tel: +81 723660221 Ext. 3150, Fax: +81 723676369, e-mail: arao@med.kindai.ac.jp

*Key Words:* Ribosomal protein S6 kinase, RPS6KB2, gastric cancer, gene amplification, S6K2 mTOR signaling.

## Materials and Methods

**Cell cultures.** Gastric cancer cell lines (44As3, 58As1, HSC43 and OKAJIMA) were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) except for IM95, which was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). The esophageal cancer cell lines KYSE170 and KYSE180 were maintained in a 1:1 mixture of Ham's F12 medium and RPMI-1640 with 2% heat-inactivated FBS. KYSE70 was maintained in DMEM with 2% FBS. KYSE150 was maintained in Ham's F12 with 2% FBS. The cell lines were maintained in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified atmosphere at 37°C. The IM95 and KYSE series were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (Ibaraki, Osaka, Japan), while the others were provided by the National Cancer Center Research Institute (Tsukiji, Tokyo, Japan).

**Patients and samples.** A total of two-hundred thirteen patients with histologically-confirmed gastric cancer who had undergone surgery at the National Cancer Center Hospital were included in this study, as previously described (10). All the patients in this series had an Eastern Cooperative Oncology Group performance status of 0 to 2. The present study was approved by the Institutional Review Board of the National Cancer Center Hospital.

Genomic DNA samples were extracted from surgical specimens preserved as FFPE tissues using a QIAamp DNA Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany), as previously described (10). Macro dissection of the FFPE samples was performed to select for a cancer region, which was marked by a pathologist. The DNA concentration was determined using the NanoDrop2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

**DNA copy number assay for S6K1 and S6K2.** The copy numbers for S6K1 and S6K2 were determined using commercially available and pre-designed TaqMan Copy Number Assays, as previously described (10). The primer IDs used were as follows: S6K1, Hs03958357\_cn; S6K2, Hs05250093\_cn. The telomerase reverse transcriptase (*TERT*) locus was used for the internal reference copy number. Human Genomic DNA (TaKaRa, Otsu, Japan) and DNA from non-cancerous FFPE tissue were used as normal controls. Real-time genomic PCR was performed in a total volume of 20 µl in each well, containing 10 µl of TaqMan genotyping master mix, 20 ng of genomic DNA, and each primer. The PCR conditions were 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min; the resulting products were detected using the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data were analyzed using the SDS 2.2 software and CopyCaller software (Applied Biosystems).

**Real-time reverse-transcription PCR.** cDNA was prepared from the total RNA of each cultured cell line using a GeneAmp® RNA-PCR kit (Applied Biosystems). Real-time RT-PCR amplification was performed as described previously (11). The primers used for the real-time RT-PCR were as follows: *S6K1*, forward 5'-CAC ATA ACC TGT GGT CTG TTG CTG-3' and reverse 5'-AGA TGC AAA GCG AAC TTG GGA TA-3'; *S6K2*, forward 5'-CTT CCA GAC TGG TGG CAA ACT CTA-3' and reverse 5'-CAG CGT GAT CTC AGC CAG GTA-3'; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPD*), forward 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3' and reverse 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GT-3'. *GAPD* was used to normalize the expression levels in the subsequent quantitative analyses.

**Immunoblotting.** A western blot analysis was performed as described previously (11). The following antibodies were used: anti-S6K1 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-RPS6KB2 (Sigma), anti-β-actin and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Cell Signaling Technology).

**Array-based comparative genomic hybridization (CGH).** The array-based CGH analysis was performed as previously described (12). The Genome-wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) was used for each of the esophageal cancer cell lines. The GeneChip Human Mapping 250K Nsp Array (Affymetrix) was used for the gastric cancer cell lines. A total of 250 ng of genomic DNA was digested with *NspI* (250K) or both *NspI* and *SlyI* in independent parallel reactions (SNP6.0), with the restriction enzymes ligated to the adaptor, and then amplified using PCR with a universal primer and TITANIUM Taq DNA Polymerase (Clontech, Palo Alt, CA, USA). The PCR products were quantified, fragmented, end-labeled, and hybridized onto a GeneChip Human Mapping 250K Nsp Array or a Genome-wide Human SNP6.0 Array. After washing and staining in Fluidics Station 450 (Affymetrix), the arrays were scanned to generate CEL files using the GeneChip Scanner 3000 and the GeneChip Operating Software Ver.1.4. In the array-CGH analysis, sample-specific copy number changes were analyzed using Partek Genomic Suite 6.4 software (Partek, St. Louis, MO, USA).

**Statistical analysis.** The statistical analyses of the clinicopathological features were performed using the Student's *t*-test and the  $\chi^2$  test using PAWS Statistics 18 (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan). The overall survival (OS) curves were estimated using the Kaplan-Meier method.

## Results

**Gene amplification of S6K1 and S6K2 in cancer cell lines.** An array-CGH analysis was performed to detect the gene amplifications of *S6K1* and *S6K2* in five gastric cancer and four esophageal cancer cell lines. Among the nine cell lines that were examined, the chromosomal region of 17q23 around *S6K1* was amplified in the 44As3 cell line (Figure 1A). The chromosomal region of 11q13 around *S6K2* was amplified in the Okajima, KYSE170, and KYSE180 cell lines (Figure 1B).

To evaluate the high-throughput method for detecting the gene amplification of *S6K1* and *S6K2*, real-time PCR-based DNA copy number assays were performed using DNA from the cancer cell lines (Figure 1C and 1D). The DNA copy number assay demonstrated that copy numbers greater than four copies were observed for *S6K1* in 44As3 cells ( $4.7 \pm 0.3$  copies) and for *S6K2* in Okajima, KYSE170, and KYSE180 cells ( $4.4 \pm 0.3$ ,  $4.0 \pm 0.5$ , and  $4.6 \pm 1.0$  copies, respectively). Collectively, similar results were observed for the gene amplifications of *S6K1* and *S6K2* between the array-CGH and DNA copy number assay. These results indicated that *S6K1* and *S6K2* were amplified in gastric and esophageal cancer cell lines.

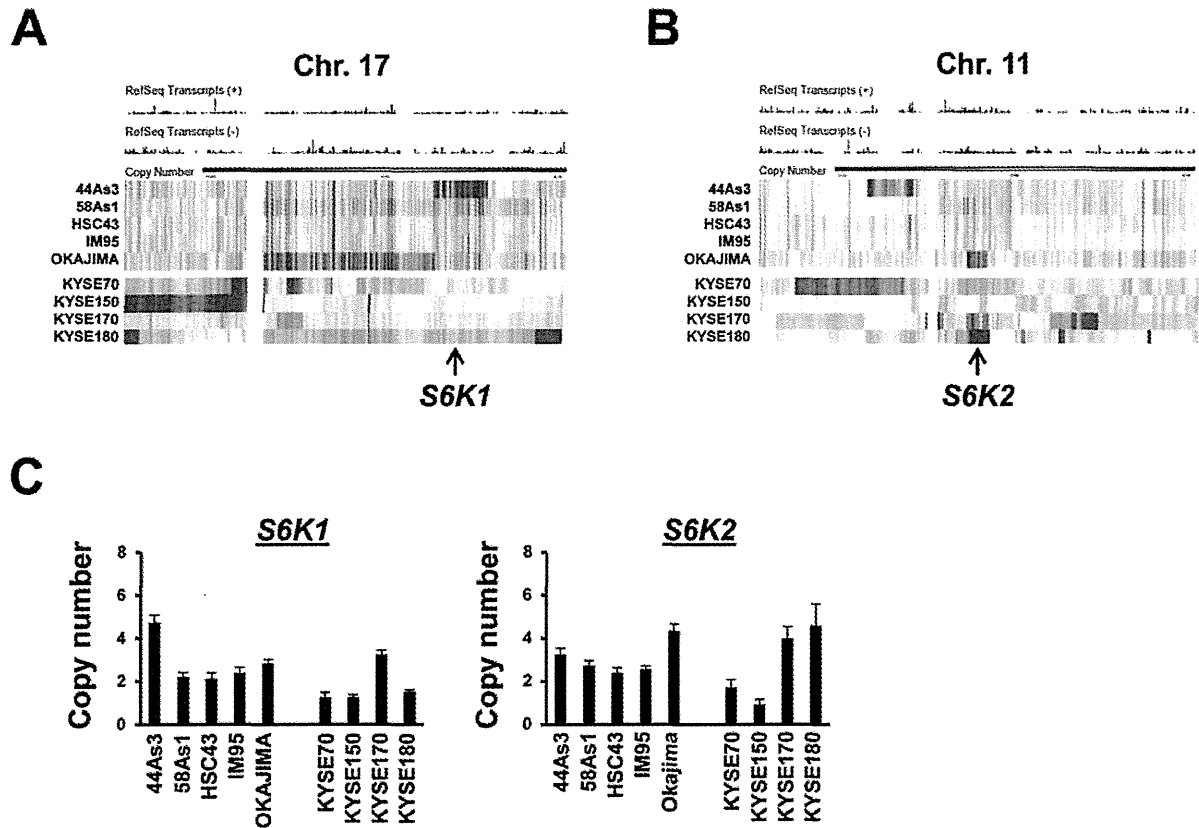


Figure 1. Gene amplification of ribosomal protein S6 kinase-1 and -2 (*S6K1* and *S6K2*) in gastric cancer and esophageal cancer cell lines. The DNA copy numbers of *S6K1* on chromosomal 17 (A) and of *S6K2* on chromosomal 11 (B) were evaluated using an array-comparative genomic hybridization analysis. The arrows indicate the genomic loci of the *S6K1* and *S6K2* genes. (C) Evaluation of DNA copy numbers in cancer cell lines. A DNA copy number assay was performed to determine the copy numbers of the *S6K1* and *S6K2* genes.

*mRNA and protein expression levels of S6K1 and S6K2 in cancer cell lines.* To investigate the correlation between gene amplification and mRNA and protein expression, we examined the mRNA expression levels of *S6K1* and *S6K2* using real-time RT-PCR for gastric and esophageal cancer cell lines. Real-time RT-PCR demonstrated that the *S6K1* mRNA was up-regulated in Okajima cells and that *S6K2* mRNA was up-regulated in Okajima and KYSE180 cells (Figure 2A). A western blot analysis revealed that *S6K1* protein expression was observed in all the cell lines, with differences in expression being relatively small, while a high *S6K2* protein expression level was observed in Okajima and KYSE180 cells (Figure 2B). In *S6K2*-amplified cell lines, although the mRNA and protein expression levels of *S6K2* were not increased in KYSE170 cells, those of Okajima and KYSE180 cells were clearly increased. When compared with the results for the DNA copy numbers, *S6K2* amplification seemed to mediate the mRNA and protein up-regulation, but the effects of *S6K1* were unclear.

*Gene amplification of S6K1 and S6K2 in clinical gastric cancer samples.* *S6K1* and *S6K2* amplification was evaluated using a DNA copy number assay of 213 FFPE samples of primary gastric cancer. The *S6K1* copy number ranged from 0.4 to 3.8 copies, and no obvious *S6K1* amplification was observed in gastric cancer samples (copies  $\geq 4$ , Figure 3A). The *S6K2* copy number ranged from 0.5 to 9.5 copies. Overall, 4.7% (10/213) of gastric carcinomas harbored the *S6K2* amplification at a level of more than four copies (copies  $\geq 4$ , Figure 3B). The copy numbers of *S6K2* amplification were 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.8, 4.9, 5.5, 7.1, 7.3 and 9.5. The mean copy number in the non-amplified *S6K1* and *S6K2* cases was  $1.6 \pm 0.5$  and  $2.5 \pm 0.6$ , respectively. The results indicate that *S6K2* was actually amplified in the clinical gastric cancer samples.

*Clinicopathological features of S6K2-amplified gastric cancer.* The patient characteristics according to *S6K2* amplification are shown in Table I. The median age was 63 years, and 69% (147/213) of this cohort were male. The