

表題

**切除不能進行・再発胃・食道胃接合部腺癌に対する分子標的
治療の開発促進を目的とする標的分子発現プロファイル研究**

論文の区分 **博士論文**

著者名 **永妻晶子**

所属 **国立がん研究センター**

早期・探索臨床研究センター

2015 年 2 月 13 日 申請の学位論文

紹介教員 **地域医療学系 専攻 臨床腫瘍学**

教授 藤井博文

目次

0. 略号.....	3
1. 背景.....	5
1-1. 胃癌および食道胃接合部腺癌の概要	5
1-1-1. 疫学.....	5
1-1-2A. 胃癌に対する化学療法の開発.....	6
1-1-2B. 食道胃接合部腺癌に対する治療開発.....	8
1-2. 分子標的治療	10
1-2-1. 概要.....	10
1-2-2. 分子標的薬の作用機序	10
1-3. 胃癌の標的分子	12
2. 目的.....	16
3. 材料・方法	17
3-1. 材料	17
3-1-1 標本の選択	17
3-2. 方法	17
3-2-1. TMA 作製	17
3-2-2. IHC	18
3-2-3. DISH	19
3-2-4. 判定方法.....	20
3-2-5. 解析.....	25
4. 結果.....	27
4-1. 4RTK の蛋白発現および遺伝子増幅頻度	27
4-2. 蛋白発現の特徴.....	27
4-3. 遺伝子増幅の特徴	30
4-4. 蛋白発現および遺伝子増幅における腫瘍内不均一と腺管内不均一	32
4-5. 4RTK の発現と関連する臨床病理学的特徴	37
5. 考察.....	42
6. 展望.....	46
7. 謝辞.....	47
8. 参考文献.....	48

0. 略号

5-FU	5-Fluorouracil
ADC	antibody drug conjugate
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
AEGJ	adenocarcinoma of esophagogastric junction
AID	activation-induced cytidine deaminase
BSC	best supportive care
CAPE	Capecitabine
CDDP	Cisplatin
Chr	chromosome
CPT-11	Irinotecan
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DCF	Docetaxel, Cisplatin and 5-Fluorouracil
DISH	dual color in situ hybridization
DM1	emtansine
DOX	Doxorubicin
DTX	Docetaxel
ECF	Epirubicin, Cisplatin and 5-Fluorouracil
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
EOX	Epirubicin, Oxaliplatin and Capecitabine
EPI	Epirubicin
ETOP	Etoposide
FAM	5-Fluorouracil, Doxorubicin and Mitomycin
FAMe	5-Fluorouracil, Doxorubicin and Methyl lomustine
FAMTX	5-Fluorouracil, Doxorubicin and Methotrexate
FDA	Food and Drug Administration
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
FISH	fluorescence in situ hybridization
FP	5-fluorouracil and Cisplatin
GIST	gastrointestinal stromal tumor

HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HER3	human epidermal growth factor receptor 3
HGF	hepatocyte growth factor/scatter factor
IHC	immunohistochemistry
IR	Initiation region
I-OHP	Oxaliplatin
MAR	Matrix attachment region
MHC	major histocompatibility complex
MMC	Mitomycin
NK	natural killer
NKG2D	natural-killer group 2, member D
OS	overall survival
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death 1
PFS	progression free survival
PTX	Paclitaxel
RR	response rate
RTK	receptor tyrosine kinase
SCJ	squamo-columnar junction
T-DM1	Trastuzumab emtansine
TKI	tyrosine kinase inhibitor
TMA	tissue microarray
WJOG	West Japan Oncology Group
XELOX	Capecitabine and Oxaliplatin
XP	Capecitabine and Cisplatin

1. 背景

1-1. 胃癌および食道胃接合部腺癌の概要

1-1-1. 疫学

胃癌は日本で年間約 11 万 5 千人が罹患し、約 5 万人が死亡する疾患である[1, 2]。我が国では内視鏡検査の普及により早期発見および早期治療（内視鏡治療を含む）が可能となったことが、1960 年代からの死亡率減少（それまでは死亡 1 位）につながったと考えられている。実際、胃癌全体に占める早期胃癌の割合は、欧米では 15%程度であるのに比して、我が国では 50%を超える高いものとなっている。しかしながら、死亡者数は男性 2 位、女性 3 位と、依然として克服していかなければならない重要な疾患である。胃癌の原因の一つとして *Helicobacter pylori* 感染による萎縮性胃炎や腸上皮化生の発生が胃癌発生リスクを高めることが知られており、近年除菌療法による萎縮性胃炎の改善が広く行われてきている。Stage I は手術による完全切除により 97%以上で治癒が望め、リンパ節転移の可能性が低い粘膜癌では内視鏡的切除も実施されている。Stage II/III では、第 2 群までのリンパ節郭清を実施する定型手術に加え、術後化学療法による無再発生存期間の延長が示されたことから我が国において標準治療となっている[3]。遠隔転移を有する Stage IV の 5 年生存率は 10%以下と予後不良である。現時点では、切除不能進行・再発胃癌は、化学療法により生存期間を延長できるものの化学療法のみで治癒に至らしめることは困難である。

食道胃接合部は連続した臓器である食道と胃の境界部であり、組織学的には食道扁平上皮と胃円柱上皮の境界(SCJ)とほぼ一致する。しかしながら、食道胃接合部は食道裂孔ヘルニア、バレット食道、高度の食道炎や慢性胃炎による解剖学的および組織学的変化の影響を受け容易に SCJ の位置は変化する。慢性胃炎の少ない欧米では胃粘膜皺の終末部を食道胃接合部と定義しているが、日本では食道下部に分布する縦走血管の終末を食道胃接合部と定義している[4]など、定義自体に国際的なコンセンサスが得られていない状況がある。1990 年代にドイツ人外科医 Siewert らは、食道胃接合部の上下 5cm に腫瘍の中心を有し食道へ浸潤する腺癌を AEGJ と定義し、そのうち食道胃接合部から食道側 1cm から胃側 2cm の間に癌の中心があるものを Siewert type 2- true cardia cancer と分類している[5]。一方、日本においては噴門腺粘膜領域が食道胃接合部から 2cm 以内に存在する[6]ことを根拠に、食道胃境界線(噴門輪)から上下 2cm 以内に癌腫の中心があるものを組織型の区別なく食道胃接合部癌とする「西分類」が 1970 年代に提唱され、現在も食道癌取り扱い規約・胃癌取り

扱い規約に記載されている[7]。Barrett 食道や肥満は下部食道腺癌のリスク因子として知られており、欧米では下部食道腺癌から上部胃癌増加の一因と考えられている[8]。我が国においても生活習慣の欧米化により Barrett 食道や肥満の増加、さらには下部食道腺癌リスク減少因子と考えられている *Helicobacter pylori* 感染率の減少も加われば、今後同様の傾向を呈する可能性が示唆されている[9]。欧米の食道胃境界付近に発生する癌の割合を見ると、食道:食道胃接合部が3:1程度[10]、食道胃接合部:胃が1:3程度[11]と、AEGJは決して稀ではない。我が国のAEGJの胃癌に占める割合は1割程度と比較的まれ[12-14]であるものの、AEGJを含む上部胃癌は近年増加傾向にあるという報告もあり[14, 15]、前述のように欧米と同様の経過をたどれば重要な課題となる疾患である。Siewert分類ではAEGJをtype1-3に分類し、欧米ではこれらがおおよそ1:1:1の割合で存在するのに対し、我が国ではtype1は5%以下、type2とtype3が残り1:1の割合で占めており[16]、AEGJは欧米と我が国では定義から頻度、特徴まで大きな隔たりがある疾患であることを認識しておかなければならない。

1-1-2A. 胃癌に対する化学療法の開発

進行・再発胃癌に対してBSC単独であると、生存期間中央値は3-4ヶ月程度である[17, 18]。化学療法は複数の比較試験によってBSCに比し延命効果が示されるようになり[19, 20]、臨床研究が進められてきた。1968年多癌腫を対象に5-FU単剤を用いた第II相臨床試験が行われ、そのうちの胃癌患者における奏効割合が24%と報告され[21]、1970年代中頃まで進行胃癌に対しては最も汎用されていた。1980年代以降は5-FUに様々な抗がん薬を組み合わせた多剤併用療法が世界各国で開発されてきたが、それぞれの地域で異なる開発経緯をたどってしまう。

1980年-1990年代には、DOX、EPI、CDDP、MMC、ETOPなど、単剤で胃癌に対して効果を示した既存薬剤と5-FUの併用療法の研究が盛んに実施された。米国では5-FUにDOXやMMC、Methl lomustine等を組み合わせた治療法(FAMやFAMe)が開発されたが、いずれも5-FUに対する優越性を示すことはできなかった[22, 23]。欧州ではFAM療法に対するFAMTX療法の優越性[24]、FAMTX療法に対するECF療法の優越性[25]がそれぞれ示され、EPIを含んだレジメンが標準治療と認識されていく。5-FUとCDDPを組み合わせたFPレジメンは5-FU単独療法に対する明確な延命効果を示すことができなかったものの[26, 27]、奏効率や無増悪生存期間における有意性から、米国やアジアにおいてcommunity standardとしての地位を確立していくこととなった。

2000 年に入ると、微小管重合阻害剤である PTX や DTX、トポイソメラーゼ-I 阻害剤である CPT-11 などの新規薬剤が胃癌に試された。また、5-FU のプロドラッグである経口剤の S1 や CAPE、プラチナ系薬剤として大量輸液が不要な I-OHP が開発され、治療の利便性が図られた。米国では FP 療法に対する DCF 療法の全生存期間における優越性が示された[28]。欧州では 5-FU を CAPE に、CDDP を I-OHP にそれぞれ置き換えた EOX 療法の非劣性[29]が、韓国では 5-FU を CAPE に置き換えた XP 療法の非劣性[30]がそれぞれ示された。我が国では、JCOG9912 試験において 5-FU 療法に対する S1 療法の非劣性[31]が、SPIRITS 試験において S1 療法に対する SP 療法の全生存期間における優越性[32]がそれぞれ示されたことから、SP 療法が標準治療として確立された。これを受けて米国では FP 療法と SP 療法の比較試験(FLAGS)が行われたが、SP 療法の優越性を示すことはできず非劣性の証明にとどまった[33, 34]。この時代に community standard と認識されていた FP 療法に比較して有意な生存期間の延長を示したレジメンは V325 試験における DCF 療法のみであったが、発熱性好中球減少が 29%に認められる毒性の高いレジメンであり、我が国では行われていない。

二次治療以降のエビデンスは長らく第 II 相試験レベルであったが、ドイツと韓国からそれぞれタキサン系薬剤や CPT-11 と BSC との比較試験が行われ、いずれも BSC に対する救済化学療法の実施による全生存期間の有意な延長が示された[35, 36]。これらの試験は予定登録数に達せず終了しておりサンプルサイズの問題はあるものの、二次化学療法を実施することで生存の延長が期待できるものと考えられる。日本で実施された、二次治療における CPT-11 と PTX を比較する第 III 相試験である WJOG4007 試験では、両レジメンに全生存期間の有意差はみられず(8.4 か月対 9.5 か月、 $p=0.38$)、どちらのレジメンも二次治療における実施は妥当とされた[37]。日本では二次治療以降の全生存期間が他国に比して長く、WJOG4007 試験でも参加者の 80%近くに三次治療が実施されている。

欧米と、日本や韓国とで治療法が最も異なるのが手術と周術期治療である。米国では術後に 5-FU を含む放射線化学療法の実施[11, 38]で、欧州では術前後に化学療法の実施[39, 40]で、それぞれ生存期間の有意な延長を示した。我が国では術後に S1 を 1 年間に内服する化学療法により生存期間の有意な延長が示され[3, 41]、標準治療として認識されている。その後、韓国でも術後の XELOX 療法施行により生存期間の有意な延長が示された[42, 43]。一方で、欧米では周術期治療を実施しても日本や韓国における手術単独群の 5 年生存率に及ばない。日本や韓国では D2 リンパ節郭

清を伴う胃切除術が標準術式として実施されているのに対し、D2 リンパ節郭清の割合が米国の INT-0116 試験では 10%、欧州の MAGIC 試験では 41%と低いことなどが理由として挙げられる。

このように、胃癌に対する殺細胞性抗がん剤治療に Global Standard はなく、Global Phase III study において Control Arm 治療成績に地域差が生じてしまう現状がある。さらに、胃癌は無増悪生存期間が全生存期間の Surrogate Marker とならない[44]と考えられていることから、試験治療以降の各国における様々な治療がしばしば試験結果に直接影響を及ぼしている。

1-2-2B. 食道胃接合部腺癌に対する治療開発

欧米諸国では、AEGJ がこれまでも食道癌もしくは胃癌の臨床試験に組み込まれ治療開発がなされてきた。欧州で行われた4つのランダム化比較試験 1775 例のデータを用いた食道腺癌と AEGJ、胃腺癌の治療アウトカムの検討では、生存や奏効割合および毒性において原発部位による差異はないと結論づけられ、AEGJ も食道や胃腺癌と同様の治療開発戦略でよい可能性が示唆されている[45]。一方我が国においては、これまで AEGJ を胃癌の臨床試験に組み入れることはなかった。単施設のデータではあるが、国立がん研究センター中央病院において 2004 年から 2009 年までの 6 年間に緩和的化学療法を導入した AEGJ 82 例と胃腺癌 734 例において全生存期間および一次治療の奏効率を比較したところ、全生存期間では AEGJ 13.0 か月対胃腺癌 11.8 か月 ($p=0.445$)、一次治療の奏効率は AEGJ 23.3% 対胃腺癌 22.6% ($p=0.90$)と、いずれも原発部位による差がなかったことを我々は報告している[46]。

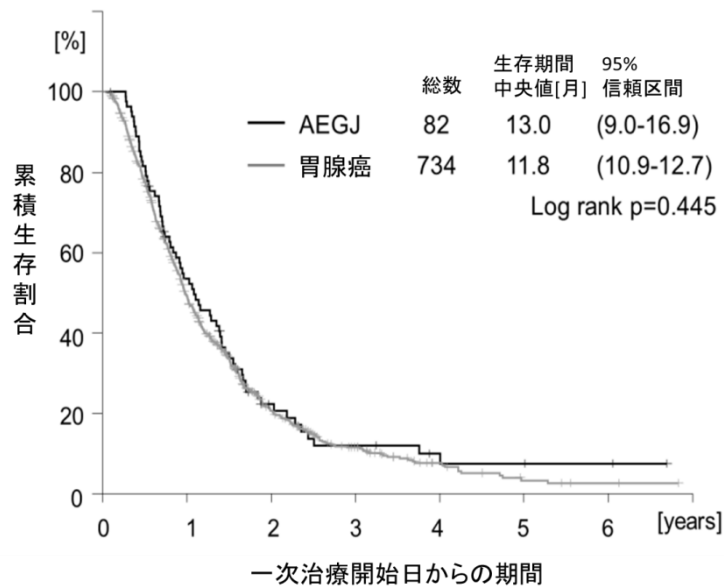


図 1) 原発部位別の生存曲線 (国立がん研究センター中央病院データ)

近年 Global Phase III Trial による全世界同時の新規薬剤開発が一般的になっており、胃腺癌と AEGJ を対象とした試験が実施されている。予後が同等であれば、我が国においても胃腺癌と AEGJ を対象とする欧米と同じ試験に組み入れて治療開発することは妥当と考えられる。

1-2. 分子標的治療

1-2-1. 概要

がんは体細胞ゲノムにおける遺伝子異常の蓄積によって発生および進展すると考えられている。遺伝子変異の多くは一塩基置換であり、またほとんどのゲノム変異はがんの発生や進展に直接関わっておらず、ごくわずかのゲノム変異が細胞に増殖や生存上優位な変化をもたらすと考えられている。近年ではエピジェネティクス異常による遺伝子の活性調節も、発がんおよび分化増殖に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。分子標的治療はこのようながんが有する異常分子を標的とした治療であり、正常細胞とがん細胞の差を認識できることからがん細胞特異的な効果が期待される。びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫に高い有効性を示した B 細胞表面抗原 CD20 のモノクローナル抗体 Rituximab の登場以降[47]、さまざまな分子標的薬が臨床応用されている。EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌に対する Gefitinib[48]、BRAF V600E 変異を有する悪性黒色腫に対する Vemurafenib [49, 50]、c-kit 陽性 GIST に対する Imatinib[51]など、分子標的薬には従来の殺細胞性抗がん剤には得られない「劇的な」効果を示す特定の対象が存在する。他方、標的以外のがん細胞には効果が発揮されないため、「効果の期待できない」特定の対象も存在している。分子標的薬の開発においては薬剤の開発のみならず、薬が対応できる「最適な」対象を見つけ出すこと、そして実際のがん組織から「最適な」対象を見つけるために「最適な」検出・診断方法(コンパニオン診断)を見つけ出すことが必須となる。

1-2-2. 分子標的薬の作用機序

古典的な抗がん薬は、がんの無限増殖に伴って亢進した DNA 合成や細胞分裂そのものを標的とし、これらを阻害してがん細胞を死に至らしめる機序を持ち、これが「殺細胞性」と呼ばれる所以である。一方、分子標的薬は細胞の増殖や生存に関わる分子機構を標的としており、1. がん細胞のシグナル伝達を阻害してその増殖を抑制・アポトーシスを誘導する、2. 免疫細胞を誘導してがん細胞を傷害する、3. 細胞内に取り込まれて殺細胞性抗がん剤を放出する、という 3 種類の作用機序に大別できる。

「がん細胞のシグナル伝達を阻害してその増殖を抑制・アポトーシスを誘導する」薬剤は、がん細胞が生存や増殖、進展など重要な生命活動に利用しているシグナルカスケード構成因子のリン酸化を阻害することで、シグナルそのものを阻害し抗腫瘍効果を発揮するものである。現存する小分子化合物のほとんどが TKI であり、加えて抗体薬のうちリガンドの中和抗体やリガンドの結合と競合的に作用するものは受容体活

性化阻害が主作用である。肺腺癌では多くの遺伝子異常が発見されているがそれぞれが相互排他的かつがん細胞が oncogenic addiction をおこしている、いわゆる driver gene mutation と考えられている[52, 53]。肺腺癌ではこのため、特定の遺伝子変化を有する対象においては TKI が単剤でも高い臨床効果を得られる[54, 55]。しかし多くのがんで同定される遺伝子異常のほとんどは passenger mutation であり、さらに標的となりうるシグナルカスケードには代替経路が存在すると考えられており[56]、単剤では十分な治療効果を得られないことが多い。分子標的薬の中には抗がん剤との併用で抗腫瘍効果が増強されるものも報告されており[57]、臨床では殺細胞性抗がん剤と併用されることが多い[58]。

免疫は様々な機序で異物と認識した細胞を処理する生体の機能である。CD8 陽性 T 細胞は樹状細胞から腫瘍関連抗原ペプチドの感作を受け、MHC class I を介してこれを認識し活性化状態となる。T 細胞は様々な刺激性/抑制性共シグナル(免疫チェックポイント分子)やサイトカインなどによりその細胞傷害活性が制御されており、がん細胞は免疫チェックポイント機構を利用し免疫細胞による細胞傷害活性から逃避している。他方、NK 細胞は抗原非特異的な細胞傷害作用を有する細胞であり、抗体製剤の Fc 領域を認識し殺細胞する機構である ADCC の主要エフェクター細胞である。NK 細胞の細胞傷害活性は主にストレスリガンドによる活性化シグナルと MHC class I による抑制性シグナルにより制御されている。がん細胞表面では MHC class I の発現低下や消失といった抑制性シグナルの減弱が起こり NK 細胞による細胞傷害が生じうるが、同時に活性化シグナルである NKG2D リガンドなどを発現することにより細胞傷害活性から逃避していると考えられている。「免疫細胞を誘導してがん細胞を傷害する」薬剤は、現在この 2 つの機序を利用したものが多くを占める。免疫チェックポイント阻害剤としては、抑制性共シグナルである CTLA-4 に対する抗体薬 Ipilimumab[59]、PD-1 に対する抗体薬 Pembrolizumab[60]が FDA で、PD-1 に対する抗体薬 Nivolumab[61]が日本及び FDA で、進行悪性黒色腫に対して既に承認されている。ADCC を主作用とする薬剤としては、固形腫瘍に対する分子標的薬剤として世界で初めて承認に至った Rituximab[47]や Trastuzumab がある。

「細胞内に取り込まれて殺細胞性抗がん剤を放出する」薬剤はADCとよばれ、Fc領域にアンカーを介して薬剤を結合させた複合体である。T-DM1はTrastuzumabにチューブリン重合阻害剤のDM1をリンカー分子で結合させたADC製剤で、HER2受容体に結合後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれリソソーム内でリンカー分子が分解されDM1が微小管に作用する。T-DM1はまた、Trastuzumabの作用であ

るHER2シグナル伝達阻害やADCC活性を併せ持っている[62]。

まとめると、シグナル伝達阻害効果が主作用である薬剤では標的分子の状態(遺伝子変異、欠失、など)やがん細胞における役割の評価が重要であり、ADCを含む抗体製剤は標的分子と結合することが薬剤反応の第一歩であることから、抗体の結合部位や特徴を反映するようなコンパニオン診断の開発が重要となる。

1-3. 胃癌の標的分子

胃癌において RTK の蛋白過剰発現や遺伝子増幅が数多く報告されており、これらは胃癌の組織型や浸潤増殖と関連するという報告が多く、分子標的治療の有力な候補と考えられてきた。HER2 蛋白過剰発現は 15-20%、遺伝子増幅は 10-15%に認められ、intestinal type との関連が報告されているが、予後因子ではない[63-68]。EGFR 蛋白過剰発現は 25-30%、遺伝子増幅は 3%程度に認められ、進行病期、脈管侵襲を認め、予後不良因子と報告されている[69-71]。MET 蛋白過剰発現は 15-35%、遺伝子増幅は-10%に認められ、予後不良因子と報告されている[72-75]。FGFR2 遺伝子増幅は-7%、進行病期や予後不良因子と報告されている[76-81]。Deng らは 193 例の胃癌組織の DNA SNP array を用いたコピー数異常解析を実施し、HER2、EGFR、MET、FGFR2、KRAS の 5 遺伝子増幅が相互排他的に 37.3%の症例で認められたと報告した[82]。我々が行った Stage III 以上の進行胃癌 121 例の NGS を用いたターゲットシーケンスによる遺伝子増幅の頻度も、HER2 が 14.9%、EGFR が 7.4%、MET が 6.6%、FGFR2 が 2.5%、KRAS が 7.4%とこれまでの報告とほぼ同等であった[83]。

一方で胃癌における遺伝子変異は少ない。がん抑制遺伝子である TP53 の変異は 50%と高く、PIK3CA の点突然変異も 12%程度と活性型変異としては最も高頻度と考えられているが、その他は概ね 10%未満と頻度は低い[84]。我々が行ったターゲットシーケンスにおける遺伝子変異の頻度も、PIK3CA が 7.4%、ROS1 が 5.0%、HER2 が 4.1%、MET が 1.7%、ALK が 1.7%といずれも少数であった[83]。さらに、胃癌は *Helicobacter pylori* 感染による慢性炎症を背景とし、DNA メチル化異常などエピゲノム変化の頻度が高いことが知られている[85]。また、遺伝子変異が生じてその下流シグナルや調節因子にエピジェネティックな変化が加わるため[86]、胃癌においては遺伝子変化を標的とした治療は難しいと推察される。

表 1) 胃癌における RTK に対する分子標的治療の開発状況

		HER2	EGFR	MET	FGFR2
抗 体 薬	Study	ToGA	EXPAND	RILOMET-2	phase1b
	薬剤	Trastuzumab	Cetuximab	Rilotumumab	BAY1179470
	対象	HER2 遺伝子 増幅/IHC 3+	全症例	MET 蛋白過剰 発現	FGFR2 蛋白過 剰発現
	ライン	1 次	1 次	1 次	最終ライン
	結果	OS の有意な延 長[58]	PFS の延長な し[87]	毒性中止[88]	進行中
	副次解 析	HER2 陽性群で benefit より強い	EGFR 蛋白発 現群は有効な 傾向[89]	-	
	Study	JACOB	REAL-3	phase2	
	薬剤	Pertuzumab + Trastuzumab	Panitumumab	LY2875358	
	対象	HER2 陽性	全症例	MET 蛋白過剰 発現	
	ライン	1 次	1 次	3 次以降	
	結果	進行中	OS の延長なし [90]	進行中	
	副次解 析		-		
	Study	GATSBY	ENRICH		
	薬剤	T-DM1	Nimotuzumab		
	対象	HER2 陽性	EGFR 蛋白過 剰発現		
	ライン	2 次以降	2 次		
	結果	進行中	進行中		
	副次解 析				

TKI	study	LOGiC	phase2	phase2	phase2
	薬剤	Lapatinib	Gefitinib	Tivantinib	Dovitinib (マルチキナーゼ阻害)
	対象	HER2 遺伝子増幅	全症例	全症例	FGFR2 遺伝子増幅
	ライン	1 次	2 次以降	2 次以降	2 次以降
	結果	OS の延長なし [91]	奏効率 18.3% [92]	奏効率 0% [93]	進行中
	副次解析	-	無効中止	バイオマーカー同定されず	
	study	TyTAN		phase2	SHINE
	薬剤	Lapatinib		AMG337	AZD4547
	対象	HER2 遺伝子増幅/IHC 3+		MET 遺伝子増幅	FGFR2 遺伝子増幅
	ライン	2 次以降		3 次以降	2 次以降
	結果	OS の延長なし [94]		進行中	進行中
	副次解析	HER2 IHC3+で有意に OS・PFS 延長			

現時点で胃癌において clinical benefit を証明できた RTK を標的とする分子標的治療薬は、HER2 蛋白過剰発現を対象とした抗体薬 Trastuzumab のみである。EGFR に対する抗体薬はいずれも主要評価項目を達成できなかったが、副次解析により EGFR 蛋白過剰発現群では良好な結果が得られていることを鑑みると、胃癌における分子標的薬開発の対象は蛋白過剰発現群への抗体薬にあるのではないかと推察される。一方で胃癌には RTK を含め遺伝子変異が少なく driver gene を持たないと考えられており、事実これまで RTK を標的とした TKI やリガンドを標的とした薬剤は主要評価項目を達成できていない。すなわち胃癌においては、肺腺癌や乳癌とは異なりシグナル伝達阻害薬作用が主作用の薬剤による効果は弱く、蛋白発現細胞に広く効果が

期待できる ADCC 作用を有する抗体薬や ADC の有効性が高いのではないかと推察される。

2. 目的

我が国における胃癌は、罹患数・死亡数から対策の優先度の高い 5 大がんの一つであり、先進国の中でも発症率が高くわが国には世界の胃癌治療を先導する責務がある。胃癌の薬物療法には Global Standard がなく日・米・欧の三極で異なるレジメンが独自に開発され実施されてきた状況があるが、治療成績は既に頭打ちになっている。胃癌も他の癌に追随し分子標的薬剤の開発にシフトしてきたが、希少集団であるが故、また海外との Drug lag を解消するため、Global Phase III study への参入が必須となってきた。背景で述べたように、胃癌および AEGJ は我が国と欧米で生物学的に異なると考えられており、我が国における治療集団の特徴、標的分子との関連性について把握しておく必要がある。さらに、胃癌における標的分子は不均一かつ多彩であることが知られており、分子標的薬剤の開発を進めていくうえで多数症例による検討が重要と考えられる。

そこでまず、胃癌では主に 4 種類の RTK に対する治療薬の開発が進んでいるため、4 種類の RTK を標的分子とした場合どのくらいの胃・食道胃接合部腺癌患者が治療対象となりうるのか調査することを、本研究では第一の目的とした。また、これら 4 種類の RTK 発現の特徴や分子間の相互関係について大規模コホートで詳細に検討した報告がないため、これを第二の目的とした。この 2 つを明らかにするために本研究を行った[95]。

3. 材料・方法

3-1. 材料

3-1-1 標本の選択

2003 年 1 月から 2007 年 7 月までに国立がん研究センター東病院で胃もしくは食道胃接合部悪性腫瘍に対して摘出術を施行され、術前治療の実施されていない原発性胃もしくは食道胃接合部腺癌を対象とした。摘出術は 1032 例に施行され、950 例(食道胃接合部腺癌 33 例、胃腺癌 917 例)が適格で解析の対象とした。82 例の不適格となった理由は、摘出標本中に癌を含まず(4 例)、腺癌以外の組織型 (7 例)、原発が胃もしくは食道胃接合部以外(15 例)、転移性腫瘍 (3 例)、再発腫瘍 (2 例)、術前治療を実施 (51 例)、であった。

カルテより抽出した臨床情報は、性別、手術日、手術時年齢、術後治療の有無とその内容、再発日、再発部位、再発確認モダリティ、最終転帰確認日、転帰、死亡原因、である。また、病理レポートより抽出した病理組織学的情報は、占拠部位、肉眼型分類、組織型分類、壁深達度、脈管侵襲(リンパ管侵襲、静脈侵襲)、郭清リンパ節数、転移リンパ節数・番号、その他転移部位、手術の遺残で、必要に応じて HE 標本を再確認した。

なお、本研究は国立がん研究センター研究倫理審査委員会による倫理審査を受け、承認されたのちに実施した(研究許可番号:2012-010)。

3-2. 方法

3-2-1. TMA 作製

原発性胃もしくは食道胃接合部腺癌手術組織の HE 標本を検鏡し、主要部位以外の腺癌組織が十分に含まれているホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックを 1 つずつ抽出し、それぞれ該当する HE 標本上に腺癌組織が含まれる領域をマーキングし、直径 2mm の TMA コア 2 か所を抜き取る部位を決定した。2 か所のコアは、可能な限り組織型や深達度の異なる部分を選択した。TMA コア抜きはティッシュ・アレイヤー装置(KIN-2、東屋医科器械)を用いて行った。相対位置決定のためコントロールコアを 2 か所に配置し、同様に直径 2mm にコア抜きした正常肝臓組織を用いた。48 コアが配置される TMA ブロックを作製し、1 つの TMA ブロックには 23 個の組織から抜き取られたそれぞれのコアと正常肝臓組織を図のように配置した。

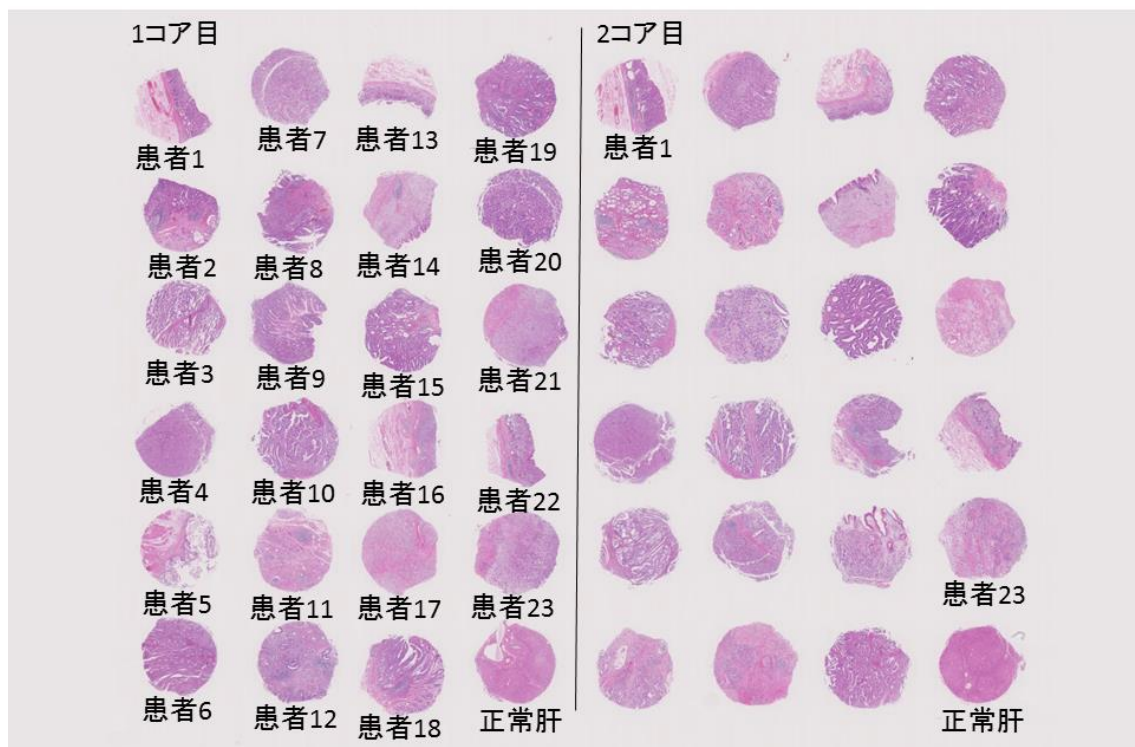


図 2) TMA map

2 か所の位置決めコア(正常肝)との位置関係によりコアの座標を特定している。決定した座標をコア番号として、臨床情報と対応させている。

すべての TMA ブロックは 4 μ m 厚に薄切し、剥離防止コーティングを施されたスライドガラス(PLUTINUM コートスライドガラス、松波硝子工業株式会社)に張り付けた。

3-2-2. IHC

IHC は HER2、EGFR、MET、FGFR2 について実施した。

HER2、EGFR、MET の IHC は Ventana 社の全自動染色システムである Ventana Benchmark ULTRA を用い、すべての試薬および工程は推奨プロトコルを用いて行われた。すなわち、一次抗体は Ventana PATHWAY anti-HER2/neu (4B5) rabbit monoclonal antibody (Ventana)、CONFIRM anti-EGFR (3C6) mouse monoclonal antibody (Ventana)、CONFIRM anti-Total c-MET(SP44) rabbit monoclonal antibody (Ventana)をそれぞれ用い、HER2 および MET における抗原性賦活化は CC1 バッファー(EDTA、Ventana)を用いた加熱処理、EGFR における抗原性賦活化は Protease 1(Ventana)を用いた蛋白分解酵素処理で実施し、HER2 および EGFR の検出キットは I-VIEW DAB ユニバーサルキットを、MET の検出キットは ultraView

DAB ユニバーサルキットを用いた。

FGFR2 は手動染色で実施した。以下に染色プロトコールを記載する。

- 1) 脱パラフィン処理を行う
 - 2) 内因性ペルオキシダーゼ反応阻止のため、0.3%過酸化水素加メタノール溶液に 20 分浸し、3 分間水洗する
 - 3) 抗原性賦活化処理として、10M の pH6.0 クエン酸緩衝液を用い圧力鍋(Pascal Pressure Cooker, Dako)による加熱処理を行った後、十分な冷却を行う
 - 4) PBS 洗浄を 3 回実施する
 - 5) 非特異反応阻止のため、2%の正常ブタ血清を加えた PBS に 30 分浸し、その後に PBS で置換する
 - 6) 一次抗体反応として、rabbit polyclonal anti-FGFR2 antibody (C-17, SC-122, Santa Cruz Biotechnology)を 1:200 の濃度で作成し添加、4℃で一晩反応させる
 - 7) PBS 洗浄を 5 回実施する
 - 8) 標識二次抗体反応として、goat anti-rabbit IgG (DAKO EnVision Peroxidase Rabbit, K4002)を添加し、室温で 30 分反応させる
 - 9) PBS 洗浄を 3 回実施する
 - 10) 3 分の DAB 発色を実施した後、3 分間水洗する
 - 11) 後染色として、Meyer ヘマトキシリン溶液による核染色を実施し、5 分間水洗する
- HER2、EGFR、MET、FGFR2 においてすべての免疫染色処理が終了した後、エタノールによる脱水、キシレンによる透徹および封入を行った。

FGFR2 については、Positive control として正常乳管組織を使用した[96]。なお、FGFR2 が膜上に発現する RTK 蛋白であるにも関わらず、本研究で用いた抗体は核および細胞質への染色が主体であった。

3-2-3. DISH

DISH は HER2、EGFR、MET について実施した。

DISH 法は腫瘍組織中の標的遺伝子および標的遺伝子のセントロメアが局在する染色体を黒色および赤色のシグナルとして検出する方法で、明視野での観察が可能であり腫瘍組織の形態学的特徴との同時観察を実現した方法である。

以下に反応原理を示す[97]。

- 1) 標本上の標的遺伝子およびセントロメアにそれぞれジニトロフェノールおよびジゴキシゲニンを標識したプローブを同時にハイブリダイゼーションさせる

- 2) 抗ジニトロフェノール抗体とペルオキシダーゼ標識抗体を反応させ、ジニトロフェノールで標識されたプローブ-抗ジニトロフェノール抗体-ペルオキシダーゼ標識抗体の複合化合物を形成させる
- 3) 2)の複合化合物に酢酸銀およびハイドロキノンと過酸化水素と共に添加し、標本上の標的遺伝子を黒色に染色させる
- 4) 抗ジゴキシゲニン抗体およびアルカリフォスファターゼ標識抗体を反応させ、ジゴキシゲニンで標識されたプローブ-抗ジゴキシゲニン抗体-アルカリフォスファターゼ標識抗体の複合物を形成させる
- 5) 4)の複合化合物にナフトール試薬、ファーストレッド試薬を塩化マグネシウムと共に添加し、標本上の標的遺伝子セントロメア領域が赤色に染色される

HER2、EGFR、MET の DISH は Ventana 社の全自動染色システムである Ventana Benchmark ULTRA を用い、すべての試薬および工程は推奨プロトコルを用いて行われた。すなわち、プローブは INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cockrail assay (Ventana)、INFORM EGFR DNA Probe (Ventana)、INFORM MET DNA Probe (Ventana)、INFORM CHROMOSOME 7 Probe (Ventana)をそれぞれ用い、検出キットは ultraView SISH DNP kit (Ventana)および RED ultraView ISH DIG detection kit (Ventana)を用いた。すべての染色処理が終了した後、標本を十分に水洗および乾燥し、封入した。

3-2-4. 判定方法

IHC の判定は、染色強度と染色割合を組み合わせて行った。染色強度は HER2 評価基準に基づいて 0-3 の 4 段階で評価し 0; 染色されないもの、1; かすかに染色されるもの、2; 弱くもしくは中等度に染色されるもの、3; 強く染色されるもの、とした。それぞれの染色強度ごとに 2 コアに含まれる全腫瘍細胞に対する割合を評価した。

HER2、EGFR、MET は腫瘍細胞の細胞膜における染色性を評価し、胃癌 HER2 評価基準としても用いられている Hofmann 基準[64]に準じてスコアを決定した。

表 2) HER2、EGFR、MET IHC スコア

スコア	染色パターン
3+	強い完全な基底側または側方側細胞膜の陽性染色がある癌細胞がコア中に 10%以上。全周性に認められない場合もある
2+	弱～中程度の完全な基底側または側方側の細胞膜の陽性染色がある癌細胞がコア中に 10%以上
1+	かすかな細胞膜の染色がある癌細胞がコア中に 10%以上
0	細胞膜に陽性染色なし、もしくは細胞膜の陽性染色がある癌細胞がコア中に 10%未満

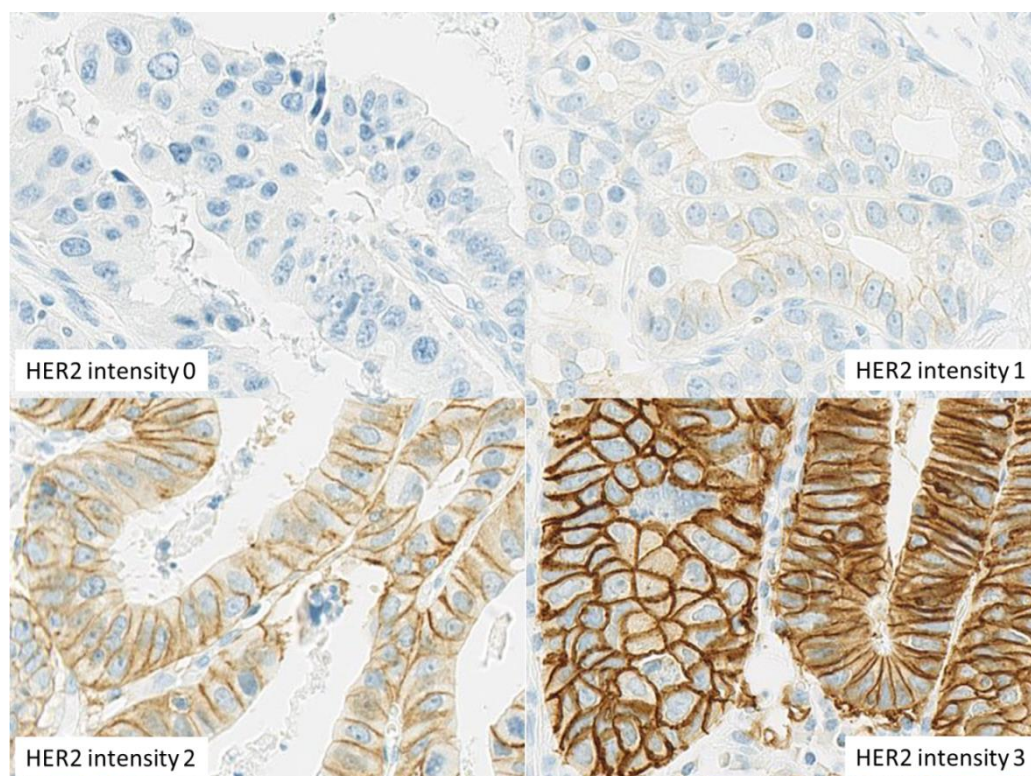


図 3) HER2 染色強度

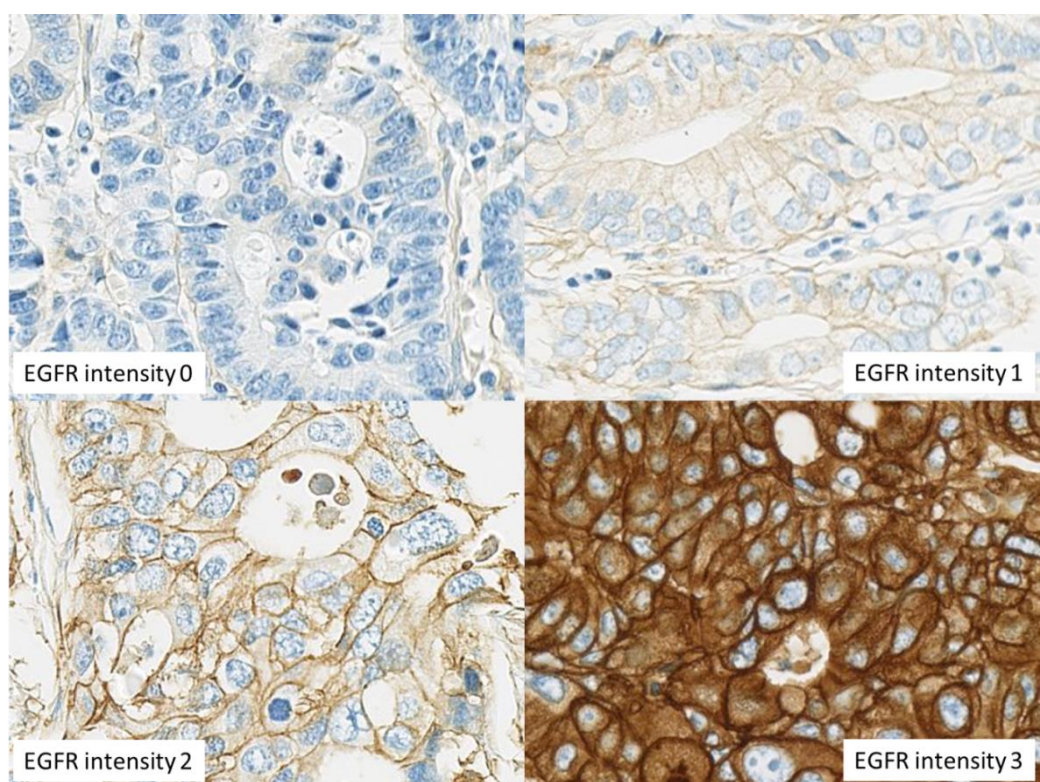


图 4) EGFR 染色強度

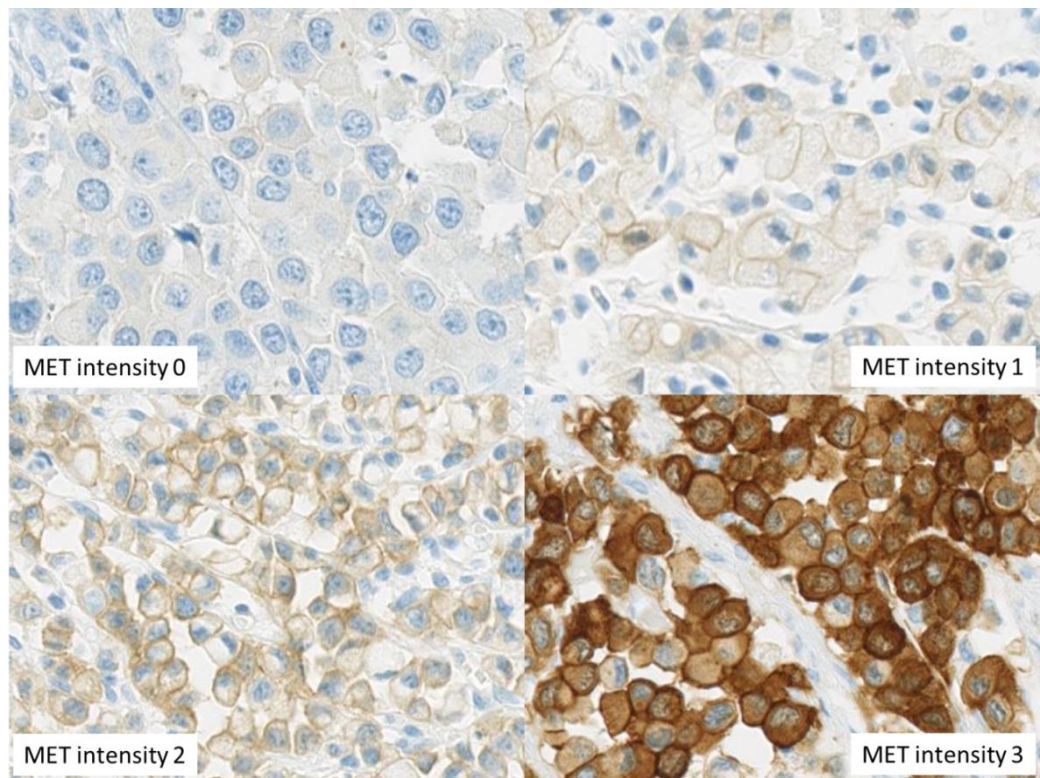


图 5) c-MET 染色強度

FGFR2 は腫瘍細胞の細胞質および核における染色性を評価し、以下に記す評価基準を用いてスコアを決定した。

表 3) FGFR2 IHC スコア

スコア	染色パターン
3+	強い細胞質もしくは核の陽性染色がある癌細胞がコア中に 50%以上
2+	弱～中程度の細胞質もしくは核の陽性染色がある癌細胞がコア中に 50%以上
1+	かすかな細胞質もしくは核の染色がある癌細胞がコア中に 50%以上
0	細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞質もしくは核の陽性染色がある癌細胞がコア中に 50%未満

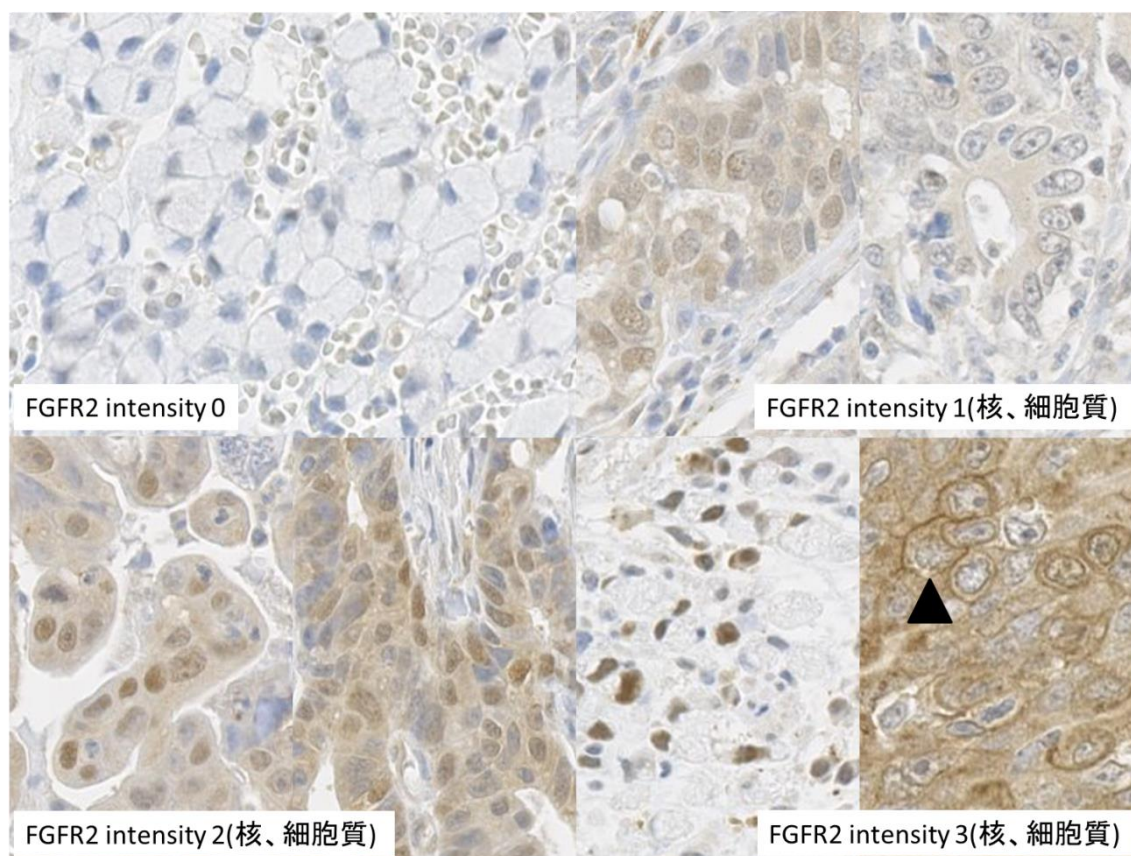


図 6) FGFR2 染色強度

矢頭) ごく一部の症例では膜に染色された。

DISH の判定は IHC で最も強い染色強度を示した hot spot の領域に相当する 20 個の腫瘍細胞の核について、セントロメアシグナル(黒色)と対象遺伝子シグナル(赤色)をそれぞれ数え記録した。HER2/Chr17 比が 2 以上、もしくは HER2 シグナルがクラスターを形成しているときに HER2 遺伝子増幅ありとした。EGFR と MET 遺伝子は Colorado Cancer Center criteria[98]を用いて評価を行い、EGFR もしくは MET/Chr7 比が 2 以上、検索した細胞の 10%以上で EGFR もしくは MET シグナルが 15 コピー以上、EGFR もしくは MET シグナルがクラスターを形成しているときに EGFR/MET 遺伝子増幅ありとした。

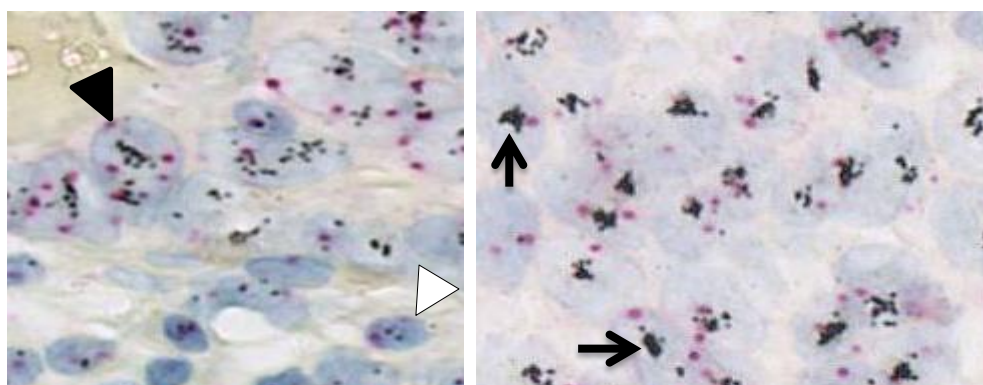


図 7) 遺伝子増幅の判定(写真は HER2)。

白矢頭) 浸潤リンパ球は HER2 遺伝子増幅陰性(HER2/Chr17=2/2、比 1.0)。

黒矢頭) 遺伝子増幅陽性 (HER2/Chr17=16/5、比 3.25)。

黒矢印) HER2 シグナルがクラスターを形成している。

なお、標本における IHC および DISH 法の評価はコアに割り当てられた識別番号を用いて行われ、臨床病理学的データと独立した状態で実施された。

RTK 発現陽性/陰性の判定は次の通り行った。HER2 は IHC スコア 3+もしくは、IHC スコア 2+かつ DISH で増幅ありを HER2 陽性と定義した。EGFR、MET、FGFR2 に関しては、IHC スコア 3+もしくは 2+を陽性と定義した。

また、複数の RTK が同一コアにスコア 2+以上で発現している症例について、それぞれの RTK の染色状況を詳細に観察し、次のように定義した。

染色領域の状況について 2 パターンに分類できることがわかった。

1) concurrently co-existing pattern: 同一領域に複数の RTK が同時に染色されている例

2) exclusively existing pattern: 複数の RTK が相互排他的な領域にそれぞれ染色されている例

また、染色強度の関係について 2 パターンに分類できることがわかった。

i) strongest intensive pattern: 複数の RTK のうち、1 つの RTK の染色強度のみが強く(染色強度 3)その他の RTK の染色強度が中等度(染色強度 2)の例

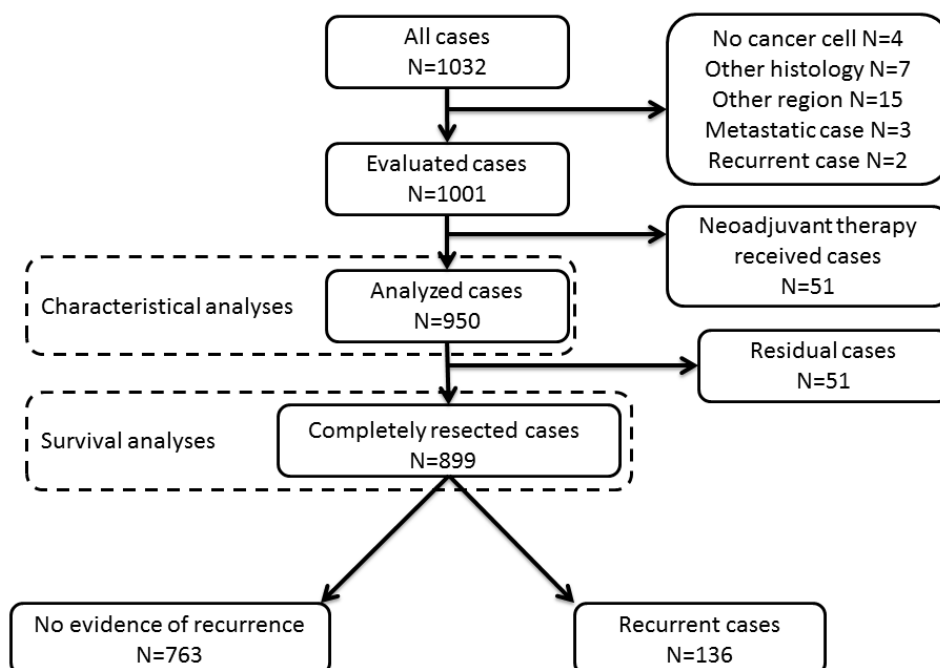
ii) equal intensive pattern: 複数の RTK のうち、2 つ以上の RTK の染色強度が同等の例

さらに、染色強度とその面積の優位性から 1 症例ごとに「predominant RTK」を定義した。Strongest intensive pattern を示す例については、最も染色強度が強い RTK を predominant RTK とした。Equal intensive pattern を示す例については、コア内で最も強い染色強度の RTK の染色面積を比較しより広い領域に染色されていた RTK を predominant RTK とした。

3-2-5. 解析

統計学的解析は SPSS v19.0 統計ソフト(SPSS Inc., Chicago, IL)を用いて行った。

図 8) 研究のシェーマ



分子の発現割合と臨床病理学的因子との相関については術前化学療法施行症例

を除いた 950 例、再発および予後との相関については手術時の癌遺残症例を除いた 899 例を用いて解析を行った。

それぞれの分子の発現割合と臨床病理学的因子との相関は、 χ^2 乗検定もしくは Fisher の正確度検定を用いた。全生存期間は手術日からすべての理由による死亡までの日数とし、死亡が確認されない症例は最終追跡日をもって打ち切りとした。生存曲線は Kaplan-Meier 曲線で描かれ、log-rank 検定により群間の比較が行われた。単変量解析および多変量解析には Cox 比例ハザード回帰モデルを用いた。すべての解析は両側比較検定で行われ、P 値<0.05 で有意差ありとした。

4. 結果

4-1. 4RTK の蛋白発現および遺伝子増幅頻度

全例において免疫染色は評価可能であった。DISH はプローブシグナルの検出不良などが原因で、HER2 の 1.0%、EGFR の 12.4%、MET の 7.1%で判定不可能であった。

表 4) 4RTK の IHC スコア

		IHC スコア			
		0	1+	2+	3+
R T K	HER2	483(51%)	297(31%)	77(8%)	93(10%)
	EGFR	350(37%)	377(40%)	154(16%)	69(7%)
	MET	291(31%)	422(44%)	176(19%)	61(6%)
	FGFR2	84(9%)	571(60%)	268(28%)	27(3%)

HER2 IHC スコア 2+のうち、19 例に遺伝子増幅が認められた。4RTK の陽性割合はそれぞれ、HER2 12%、EGFR 23%、MET 25%、FGFR2 31%であった。EGFR および MET 遺伝子増幅の割合はそれぞれ 2.4%、1.3%であった。

4RTK の陽性割合について、AEGJ と胃腺癌での比較を行った。HER2 陽性は AEGJ で 9.1%、胃腺癌で 11.9%(p 値 0.441)、EGFR 陽性は AEGJ で 36.4%、胃腺癌で 23.0%(p 値 0.075)、MET 陽性は AEGJ で 24.2%、胃腺癌で 25.0%(p 値 0.924) と、AEGJ と胃腺癌の間に有意な差を認めなかった。しかしながら、FGFR2 陽性は AEGJ で 48.5%、胃腺癌で 30.4%(p 値 0.028)と、AEGJ で有意に FGFR2 陽性症例が多く認められた。

4-2. 蛋白発現の特徴

4RTK のいずれも「陰性」と判定された症例は全体の 36.9%であり、残り 63.1%は何らかの標的分子蛋白発現を呈していた。また、このうち 22.7%は同一症例内に複数の標的蛋白分子を発現していた。

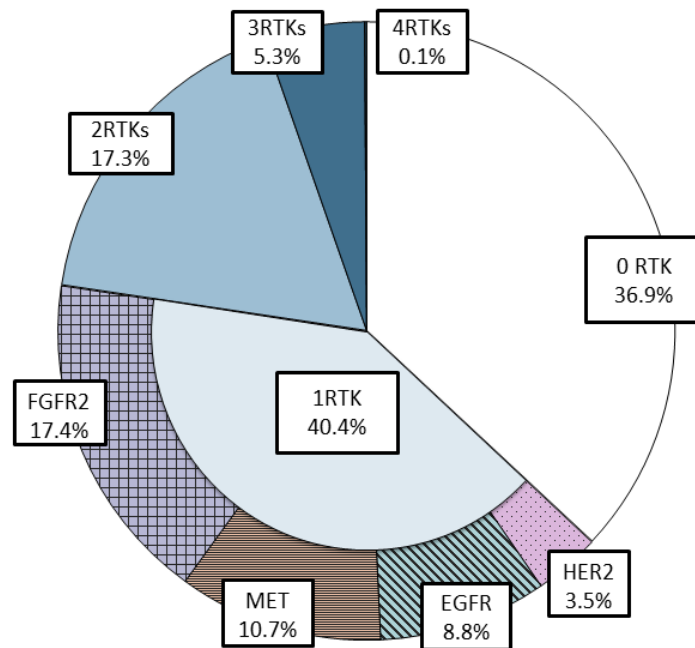


図 9) 4RTK の蛋白過剰発現状況

複数の分子が発現している症例について詳細に検討した。複数の分子の発現パターンは、46.5%が strongest intensive pattern、53.5%が equal intensive pattern であった。

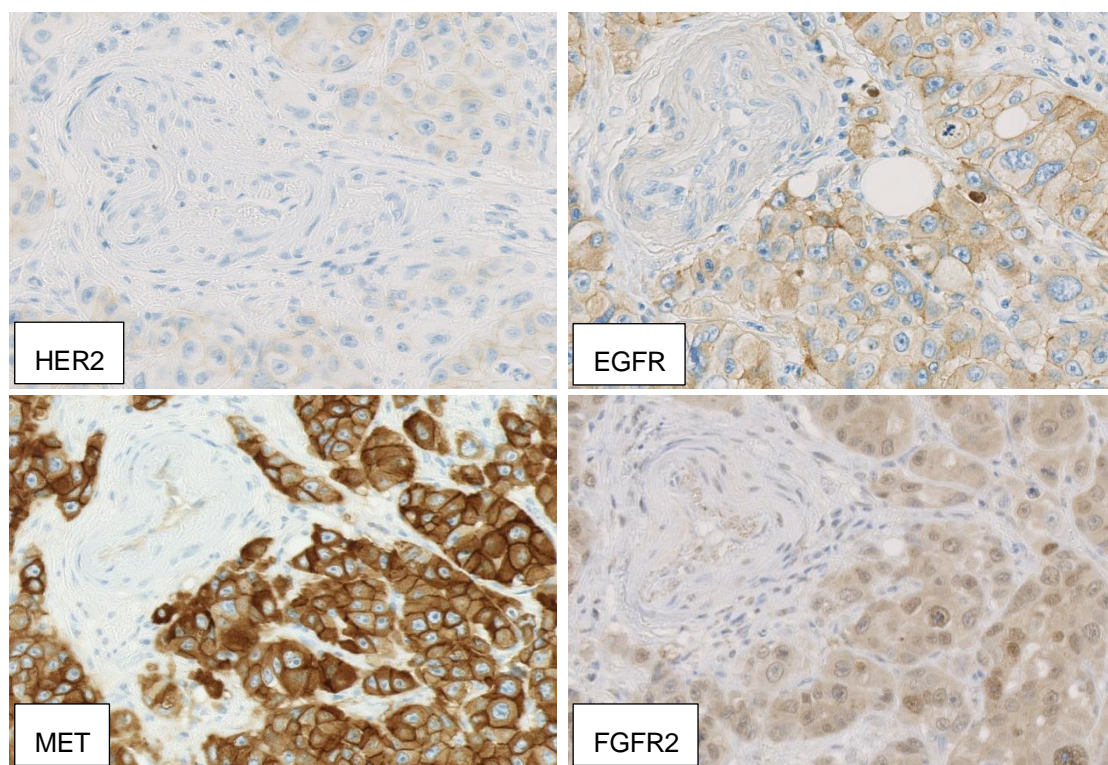


図 10) strongest intensive pattern の例

同一の領域における染色性の評価において MET が最も強い染色強度 3 で発現しており、EGFR および FGFR2 が染色強度 2 でともに陽性、HER2 は染色強度 1 で陰性の判定となる。

蛋白発現分布では、69.7%の症例が concurrently co-existing pattern に、30.3%の症例が exclusively existing pattern にそれぞれ分類された。

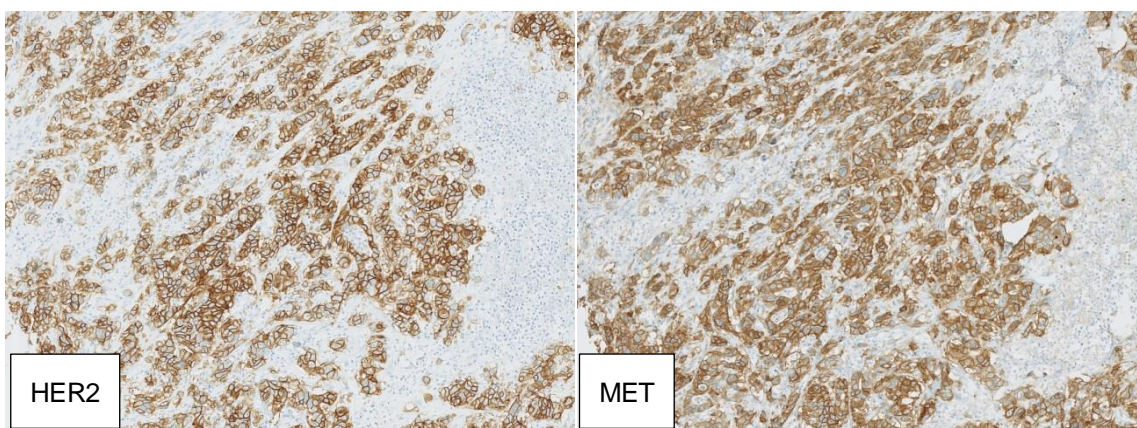


図 11) concurrently co-existing pattern の例

HER2、MET とともに同一領域に染色強度 3 を認めている。

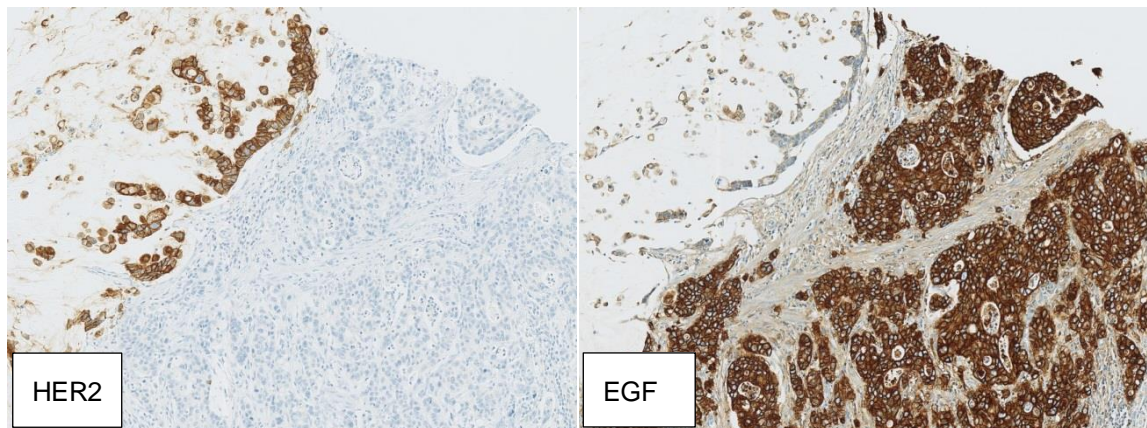


図 12) exclusively existing pattern の例

HER2 は粘液癌領域に、EGFR は中分化管状腺癌領域に、相互排他的にそれぞれ染色強度 3 で発現している。

方法に記したように「predominant RTK」を定義した場合、HER2 predominance 症例へ 10.1%、EGFR predominance 症例へ 13.9%、MET predominance 症例へ 16.1%、FGFR2 predominance 症例へ 22.9%とそれぞれ分類された。

4-3. 遺伝子増幅の特徴

遺伝子増幅はそのほとんどが IHC における染色強度 3 の領域でみられた。5 症例 (0.5%) で 2 種類以上の分子の遺伝子増幅が同一症例内に同時に確認され、2 症例は同一がん細胞内の分布(いわゆる concurrently co-existing pattern)、3 症例は相互排他的な分布(いわゆる exclusively existing pattern)であった。

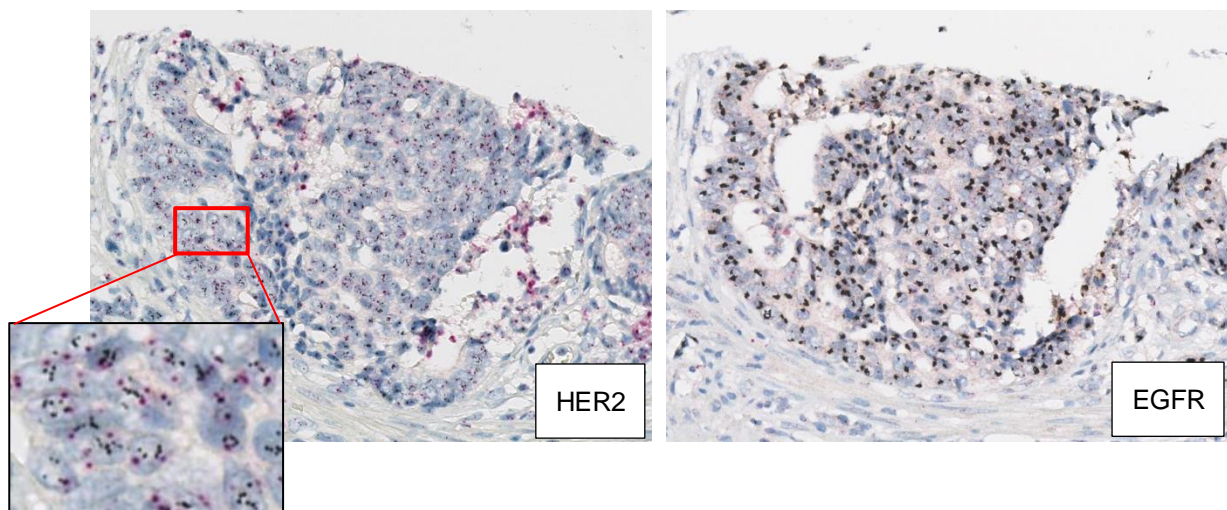


図 13) 同一がん細胞に複数の RTK 遺伝子増幅が生じている例
HER2 DISHではHER2/Chr17比が2以上(左下は拡大図)、EGFR DISHではEGFR
シグナルがクラスターを形成している。

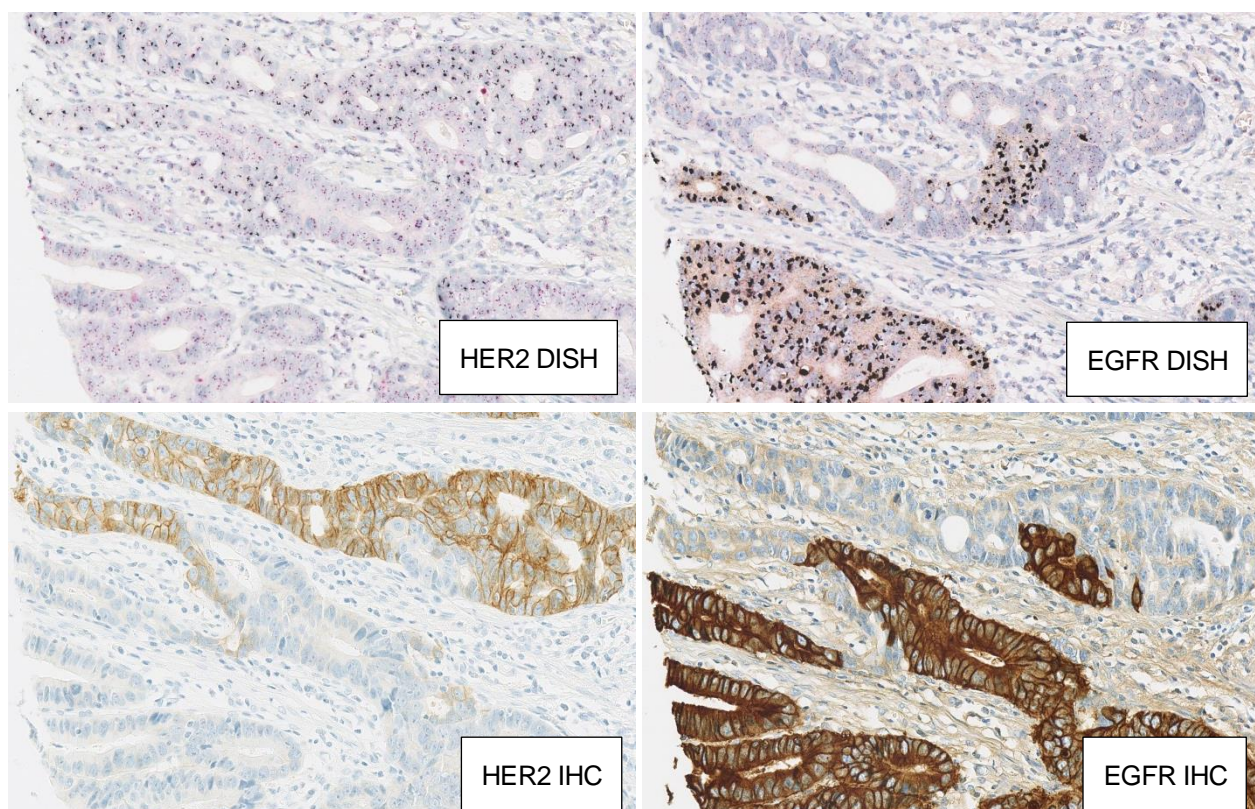


図 14) 同一症例の相互排他的な領域で複数の RTK 遺伝子増幅が生じている例
HER2 蛋白過剰発現および遺伝子増幅は標本の上半分、EGFR 蛋白過剰発現およ
び遺伝子増幅は標本の下半分で見られる。

4-4. 蛋白発現および遺伝子増幅における腫瘍内不均一と腺管内不均一

胃癌において以前より報告されている蛋白発現の腫瘍内不均一 (Intratumoral heterogeneity)について検討を行った。

表 5) IHC 染色強度 3 の領域がコア全体に占める割合

染色強度 3 の割合	HER2	EGFR	MET	FGFR2
<10%	11.6%	27.4%	60.0%	81.1%
≥10%, <30%	26.9%	36.8%	27.1%	
≥30%, <80%	27.9%	29.5%	9.7%	17.6%
≥80%	34.6%	6.3%	3.2%	1.4%

4 分子の免疫染色において染色強度 3 の領域ががん細胞内に占める割合を症例ごとに求めたところ、均一(80%以上)な染色性は HER2 の 34.6%が最多で他の 3 分子はいずれも 10%未満、MET や FGFR2 は 5%未満とわずかであった。EGFR では 60%以上、MET および FGFR2 では 80%以上の症例で限局した(30%未満)染色性を示しており、4 種類の RTK 蛋白発現において強い腫瘍内不均一が存在することが本研究において示された。

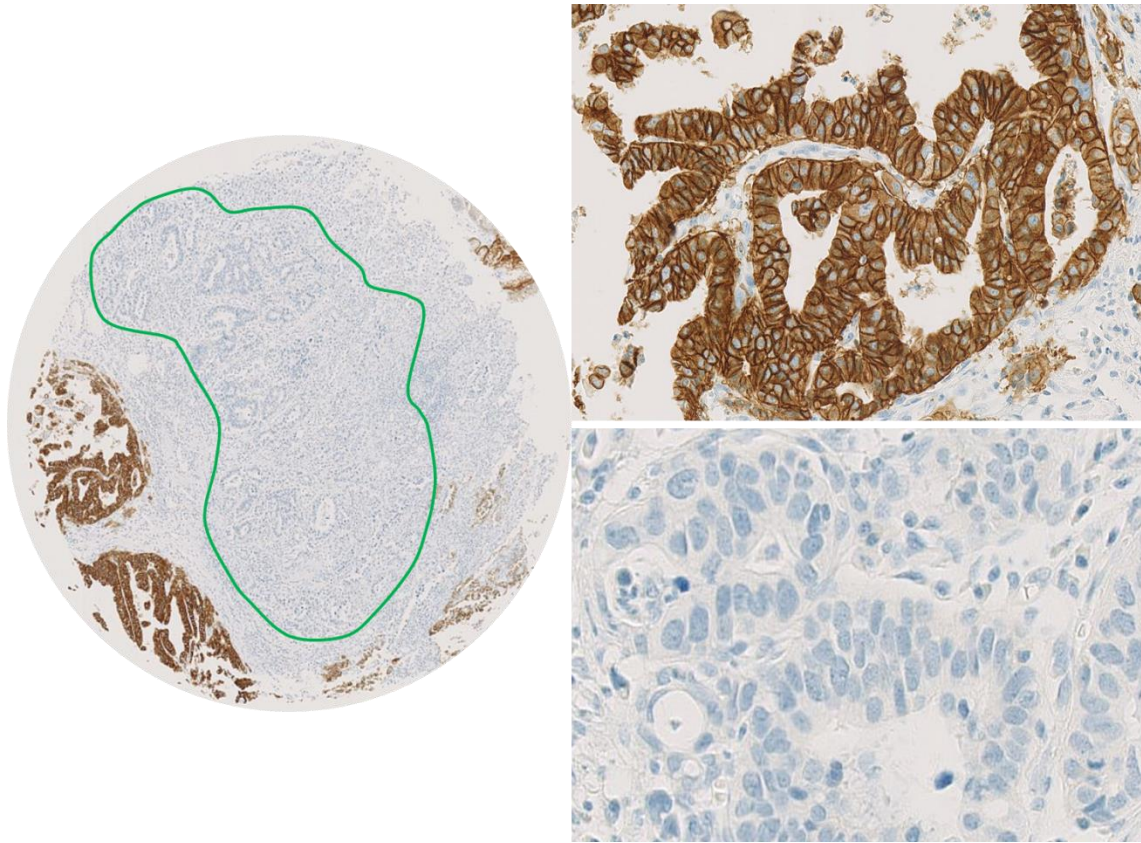


図 15) 腫瘍内 HER2 蛋白発現不均一

左図) 緑線で囲まれた領域は染色強度 0 の腫瘍領域で、コア内に存在する腫瘍の約 60%を占める。

右図) 染色強度 3 のがん細胞(上)と染色強度 0 のがん細胞(下)。

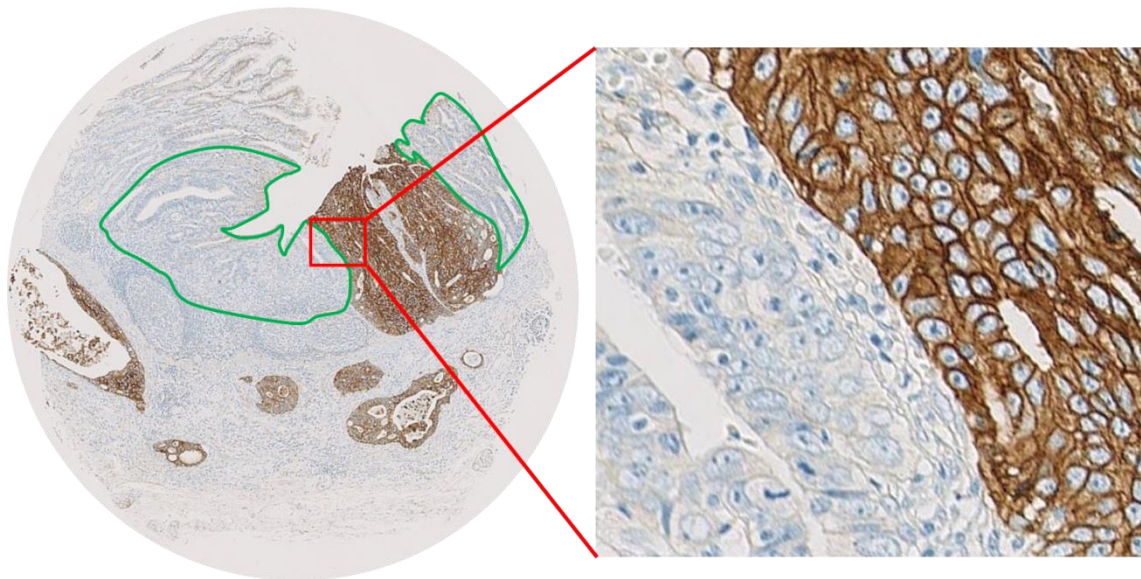


図 16) 腫瘍内 EGFR 蛋白発現不均一

左) 緑線で囲まれた領域は染色強度 0 の腫瘍領域。

右) 赤四角枠の拡大図。左下領域のがん細胞には EGFR 蛋白発現がみられない。

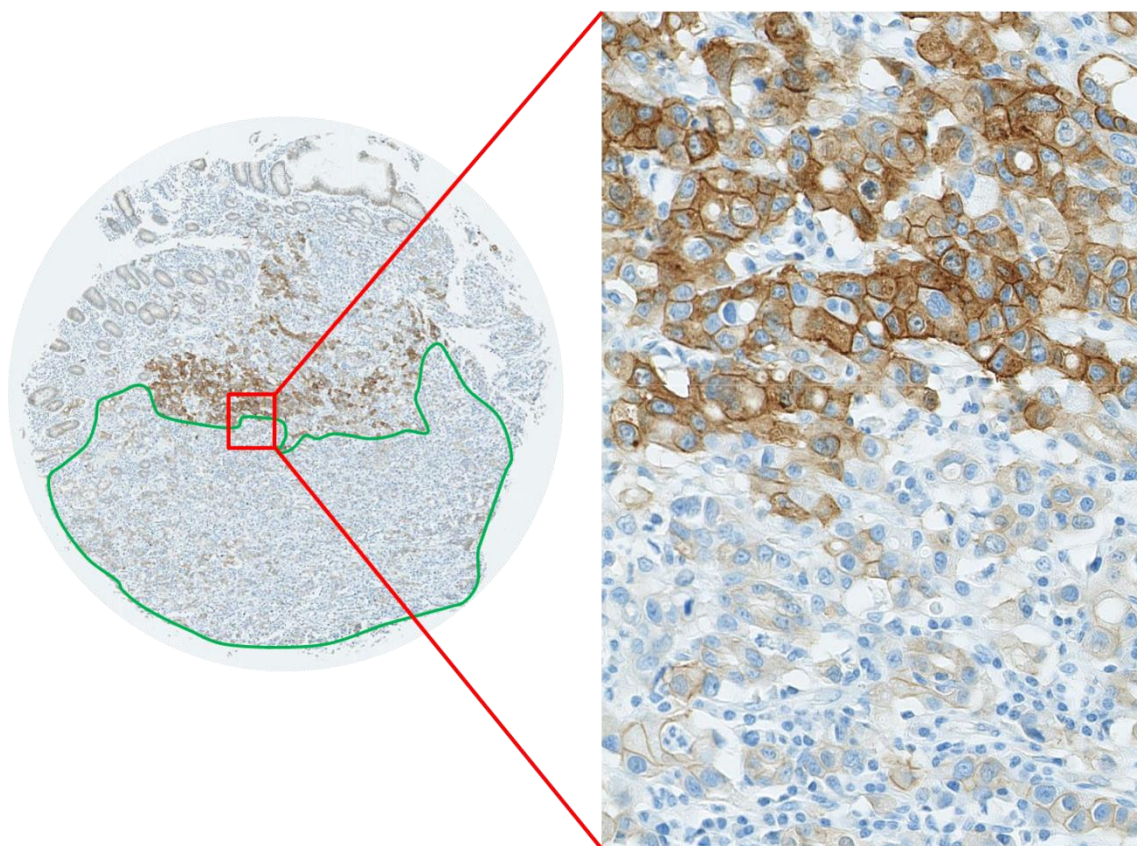


図 17) 腫瘍内 MET 蛋白発現不均一

左) 緑線で囲まれた領域は染色強度 0-1 の腫瘍領域で、コア内に存在する腫瘍の約 70%を占める。

右) 赤四角枠の拡大図。下半分のがん細胞は染色強度 1 である。

さらに、EGFR(4 症例、0.4%)や c-MET(3 症例、0.3%)では、脈管内に浸潤するがん細胞のみに蛋白過剰発現がみられる症例が存在した。

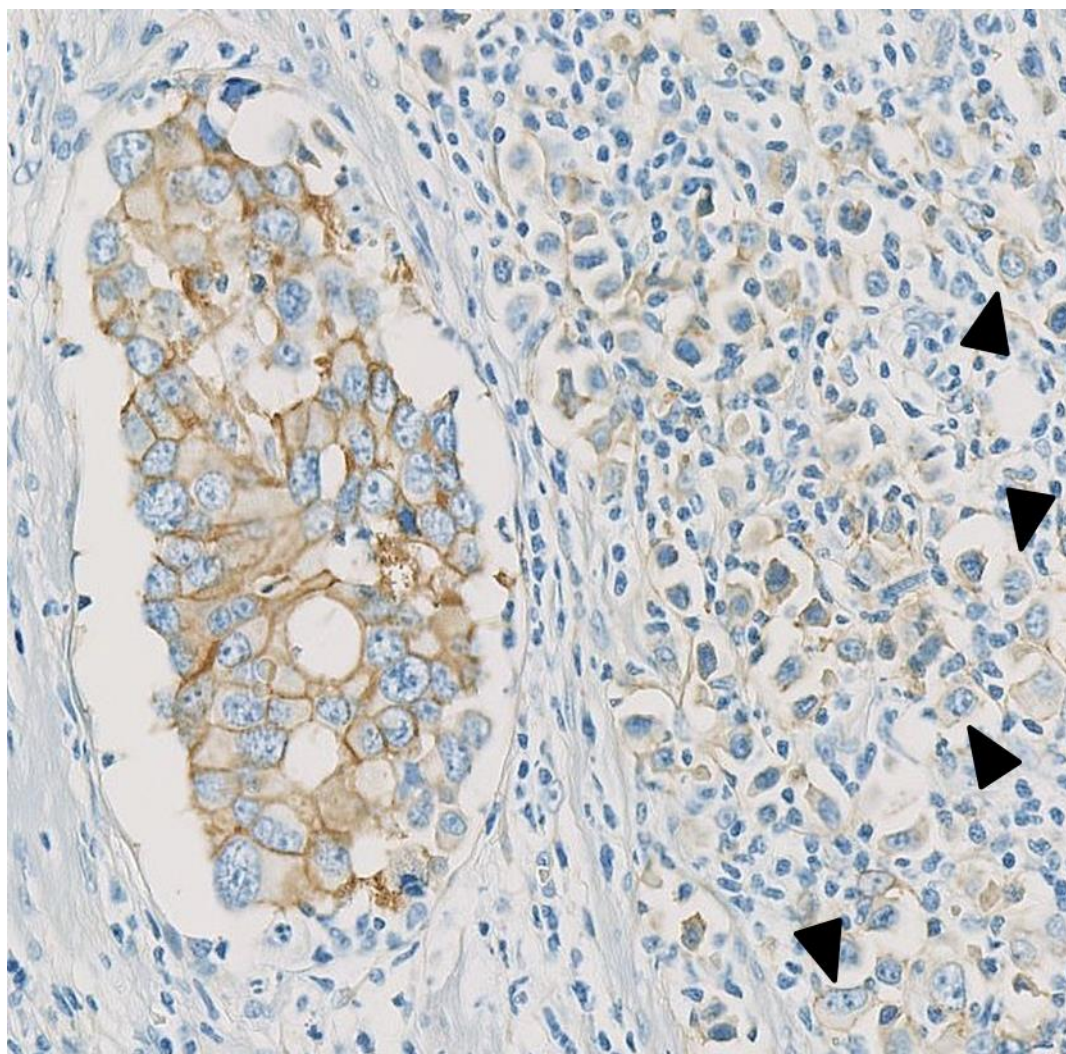


図 19) 脈管内浸潤成分の EGFR 蛋白発現

左側の脈管内浸潤がん細胞は染色強度 2、右側の間質浸潤がん細胞(矢頭)は染色強度 1。

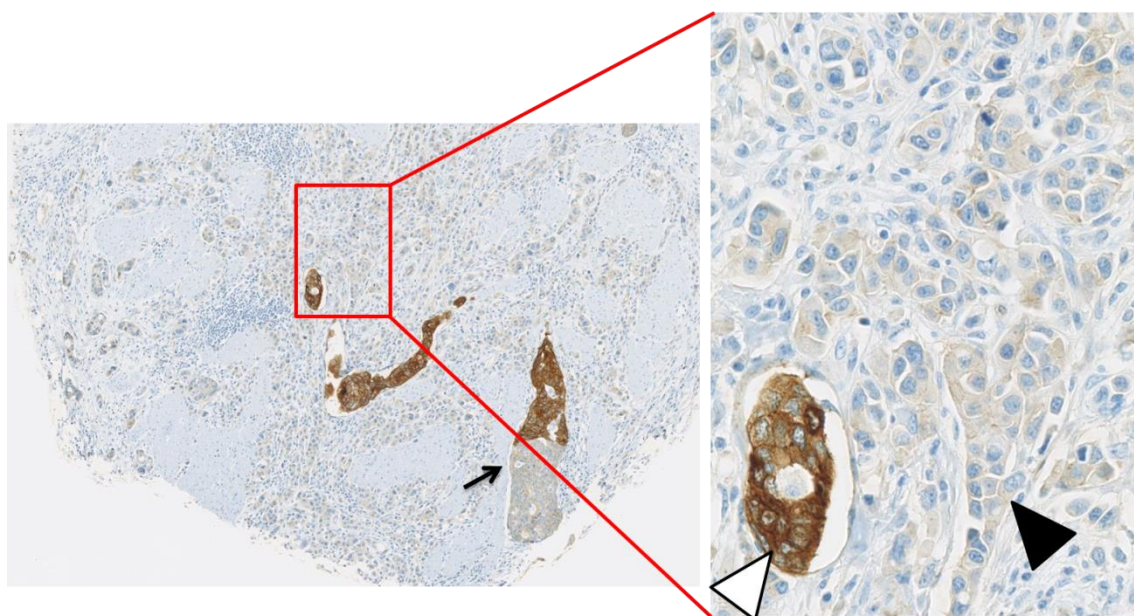


図 20) 脈管内浸潤成分の MET 蛋白発現

左) 弱拡大図。3つの大きな脈管内に染色強度3のがん細胞が浸潤している。黒矢印の脈管内浸潤がん集塊はさらに集塊内で蛋白発現不均一分布を示している。

右) 赤四角枠の拡大図。周囲に浸潤しているがん細胞は染色強度0である。また、白矢頭の脈管内浸潤がん集塊は染色強度3であるが、黒矢頭の脈管内浸潤がん集塊は染色強度0と、脈管内浸潤成分においても不均一な蛋白発現分布である。

遺伝子増幅についても、蛋白発現の腫瘍内不均一との関連を検討した。

表 6) 遺伝子増幅と染色強度3の蛋白過剰発現の腫瘍内不均一との関係

	染色割合カテゴリごとの 遺伝子増幅症例の占める割合		
染色強度3の割合	HER2	EGFR	MET
<10%	54.5%	11.5%	5.4%
≥10%, <30%	67.9%	14.3%	2.4%
≥30%, <80%	100%	35.7%	26.7%
≥80%	100%	83.3%	40.0%

HER2 では染色強度3の領域が30%以上の腫瘍では全例で遺伝子増幅を伴っていた。EGFR、MET についても強染色領域が広い腫瘍では遺伝子増幅の割合が明らか

に多くみられ、増幅と判定できない症例においても標的遺伝子とセントロメアが同時に増加している polysomy パターンを示していた。これらより、強染色領域が広い、すなわち蛋白発現が均一な腫瘍ほど標的遺伝子が増加し遺伝子増幅を伴っている割合が増えていることが示された。

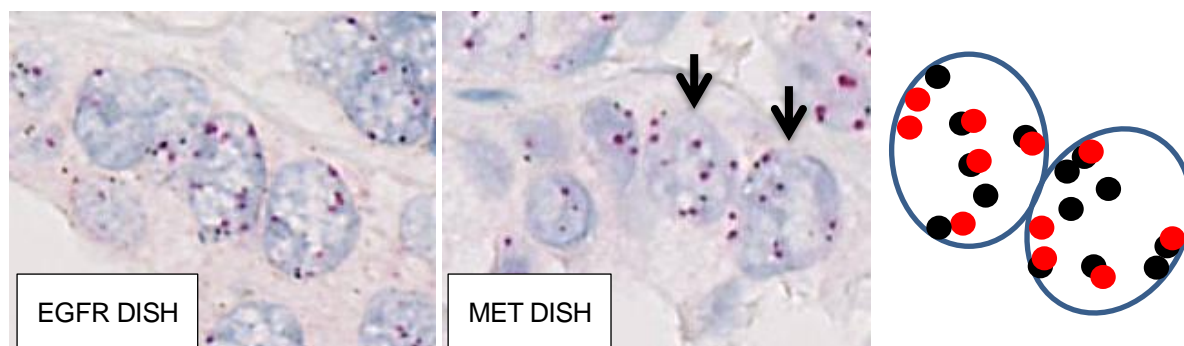


図 21) 7 番染色体 polysomy 症例

右シェーマは矢印の細胞(MET)におけるシグナル分布図。EGFR および MET は 7 番染色体上に存在し、DISH 法において共に 7 番染色体セントロメア(赤シグナル)がコピー過剰状態(polysomy)にあることが確認できる。

* 今後雑誌掲載等の形での刊行を予定している部分であり、削除の上非公開とした。

4-5. 4RTK の発現と関連する臨床病理学的特徴

それぞれの分子発現と病理組織学的特徴について解析を行った結果を表 7 に示す。年齢および性別で有意差があった分子は HER2 であり、これまでの報告と一致して年齢の高い症例、および男性で HER2 陽性が有意に多かった。腫瘍の占拠部位で差がみられた分子は EGFR および HER2 であり、EGFR 陽性は胃の下部から発生する癌に多く、HER2 陽性は胃の上部から発生する癌に多い傾向であった。胃癌取り扱い規約における組織型分類では、HER2 および MET 陽性が分化型癌に、EGFR 陽性は低分化型癌に多くみられた。EGFR および FGFR2 ではリンパ管・血管侵襲が共に陽性群で有意に多く、HER2 陽性群では血管侵襲が有意に多かった。MET 陽陰性は脈管侵襲の有無と関連しなかった。EGFR および FGFR2 は病期の進行とともに陽性割合が有意に増加したが、HER2 および MET は病期と有意な相関は認められなかった。再発形式について解析を行った結果を表 8 に示す。HER2 陽性群は肝転移や胸郭内臓器転移が陰性群に比して有意に多く、FGFR2 陽性群は腹膜播種が有意に多く腹部リンパ節転移が有意に少なかった。

表 7) 4RTK 蛋白過剰発現と臨床病理学的特徴との関係

		HER2			EGFR			c-MET			FGFR2		
		陰性	陽性	p 値	陰性	陽性	p 値	陰性	陽性	p 値	陰性	陽性	p 値
人数		838	112		727	223		713	237		655	295	
年齢中央値 (範囲)		63 (18-92)	66 (34-84)	0.003	63 (27-88)	65 (18-92)	0.153	64 (26-92)	64 (18-88)	0.777	64 (26-92)	64 (18-86)	0.782
性別(%)	男性	544(65)	90(80)	0.001	481(66)	153(69)	0.497	479(67)	155(65)	0.614	434(66)	200(68)	0.642
	女性	294(35)	22(20)		246(34)	70(31)		234(33)	82(35)		221(34)	95(32)	
局在(%)	接合部	30(4)	3(3)	0.057	21(3)	12(5)	0.041	25(4)	8(3)	0.524	17(3)	16(5)	0.117
	上部	157(19)	30(27)		147(20)	40(18)		148(21)	39(16)		124(19)	63(21)	
	中部	397(47)	39(35)		348(48)	88(39)		327(46)	109(46)		311(47)	125(42)	
	下部	236(28)	39(35)		198(27)	77(35)		198(28)	77(32)		188(29)	87(29)	
	残胃	18(2)	1(1)		13(2)	6(3)		15(2)	4(2)		15(2)	4(1)	
肉眼型 (%)	0 型	453(54)	56(50)	0.004	436(60)	73(33)	<0.001	362(51)	147(62)	0.006	383(58)	126(43)	<0.001
	1 型	17(2)	8(7)		18(2)	7(3)		22(3)	3(1)		14(2)	11(4)	
	2 型	94(11)	21(19)		74(10)	41(18)		88(12)	27(11)		65(10)	50(17)	
	3 型	217(26)	22(20)		154(21)	85(38)		184(26)	55(23)		161(25)	78(26)	
	4 型	45(5)	4(4)		36(5)	13(6)		45(6)	4(2)		21(3)	28(9)	
	5 型	12(1)	1(1)		9(1)	4(2)		12(2)	1(0)		11(2)	2(1)	
組織型 (%)	pap	9(1)	13(12)	<0.001	15(2)	7(3)	0.001	15(2)	7(3)	<0.001	17(3)	5(2)	0.160
	tub1	120(14)	26(32)		130(18)	26(12)		94(13)	62(26)		115(18)	41(14)	

組織型 (%) 続き	tub2	254(30)	46(41)		216(30)	84(38)		212(30)	88(37)		208(32)	92(31)	
	por1	67(8)	7(6)		47(6)	27(12)		58(8)	16(7)		50(8)	24(8)	
	por2	237(28)	9(8)		188(26)	58(26)		200(28)	46(19)		154(24)	92(31)	
	sig	132(16)	1(1)		114(16)	19(9)		116(16)	17(7)		99(15)	34(12)	
	muc	19(2)	0(0)		17(2)	2(1)		18(3)	1(0)		12(2)	7(2)	
リンパ管 侵襲(%)	なし	490(58)	57(51)	0.127	455(63)	92(41)	<0.001	403(57)	144(61)	0.253	398(61)	149(51)	0.003
	あり	348(42)	55(49)		272(37)	131(59)		310(43)	93(39)		257(39)	146(49)	
静脈侵襲 (%)	なし	468(56)	47(42)	0.006	443(61)	72(32)	<0.001	373(53)	140(59)	0.083	381(58)	134(45)	<0.001
	あり	370(44)	65(58)		284(39)	151(68)		338(47)	97(41)		274(42)	161(55)	
壁深達度 (%)	T1	437(52)	57(51)	0.060	431(59)	63(28)	<0.001	352(49)	142(60)	0.029	376(57)	118(40)	<0.001
	T2	107(13)	10(9)		92(13)	25(11)		93(13)	24(10)		72(11)	45(15)	
	T3	171(20)	34(30)		122(17)	83(37)		158(22)	47(20)		129(20)	76(26)	
	T4	123(15)	11(10)		82(11)	52(23)		110(15)	24(10)		78(12)	56(19)	
領域リン パ節転移 (%)	なし	540(64)	54(48)	0.001	489(67)	105(47)	<0.001	439(62)	155(65)	0.302	438(67)	156(53)	<0.001
	あり	298(36)	57(51)		238(33)	117(52)		273(38)	82(35)		216(33)	139(47)	
	未郭清	0(0)	1(1)		0(0)	1(0)		1(0)	0(0)		1(0)	0(0)	
進行度 (%)	I	477(57)	52(46)	0.217	457(63)	72(32)	<0.001	380(53)	149(63)	0.067	400(61)	129(44)	<0.001
	II	171(20)	28(25)		131(18)	68(30)		158(22)	41(17)		122(19)	77(26)	
	III	133(16)	22(20)		98(13)	57(26)		130(17)	35(15)		93(14)	62(21)	
	IV	57(7)	10(9)		41(6)	26(12)		55(8)	12(5)		40(6)	27(9)	

表 8) 4RTK 発現と再発臓器(部位)との関連

		HER2			EGFR			c-MET			FGFR2		
		陰性	陽性	p 値	陰性	陽性	p 値	陰性	陽性	p 値	陰性	陽性	p 値
再発人数		114	22		81	55		113	23		81	55	
肝臓(%)	なし	82(72)	11(50)	0.043	56(69)	37(67)	0.819	81(72)	12(52)	0.067	52(64)	41(75)	0.203
	あり	32(28)	11(50)		25(31)	18(33)		32(28)	11(48)		29(36)	14(25)	
腹膜(%)	なし	69(61)	17(77)	0.136	51(63)	35(64)	0.936	68(60)	18(78)	0.101	58(72)	28(51)	0.014
	あり	45(39)	5(23)		30(37)	20(36)		45(40)	5(22)		23(28)	27(49)	
腹部リンパ節(%)	なし	76(67)	17(77)	0.327	56(69)	37(67)	0.819	77(68)	16(70)	0.894	46(57)	47(85)	<0.001
	あり	38(33)	5(23)		25(31)	18(33)		36(32)	7(30)		35(43)	8(15)	
胸郭内臓器*(%)	なし	110(96)	17(77)	0.006	76(94)	51(93)	0.531	106(94)	21(91)	0.470	77(95)	50(91)	0.270
	あり	4(4)	5(23)		5(6)	4(7)		7(6)	2(9)		4(5)	5(9)	
骨、骨髄(%)	なし	106(93)	22(100)	0.234	75(93)	53(96)	0.300	105(93)	23(100)	0.217	76(94)	52(95)	0.585
	あり	8(7)	0(0)		6(7)	2(4)		8(7)	0(0)		5(6)	3(5)	
局所(%)	あり	105(92)	21(95)	0.496	75(93)	51(93)	0.626	103(91)	23(100)	0.146	76(94)	50(91)	0.374
	なし	9(8)	1(5)		6(7)	4(7)		10(9)	0(0)		5(6)	5(9)	

*胸郭内臓器には、肺転移、縦隔リンパ節転移、胸膜転移(播種)、がん性リンパ管症を含む

予後についての検討も行った。単変量解析ではEGFR陽性群およびFGFR2陽性群が予後不良因子として抽出されたが、多変量解析では独立した予後因子として抽出されなかった。しかし、EGFR 強発現(スコア 3+)腫瘍が多変量解析において独立した予後不良因子として検出された。

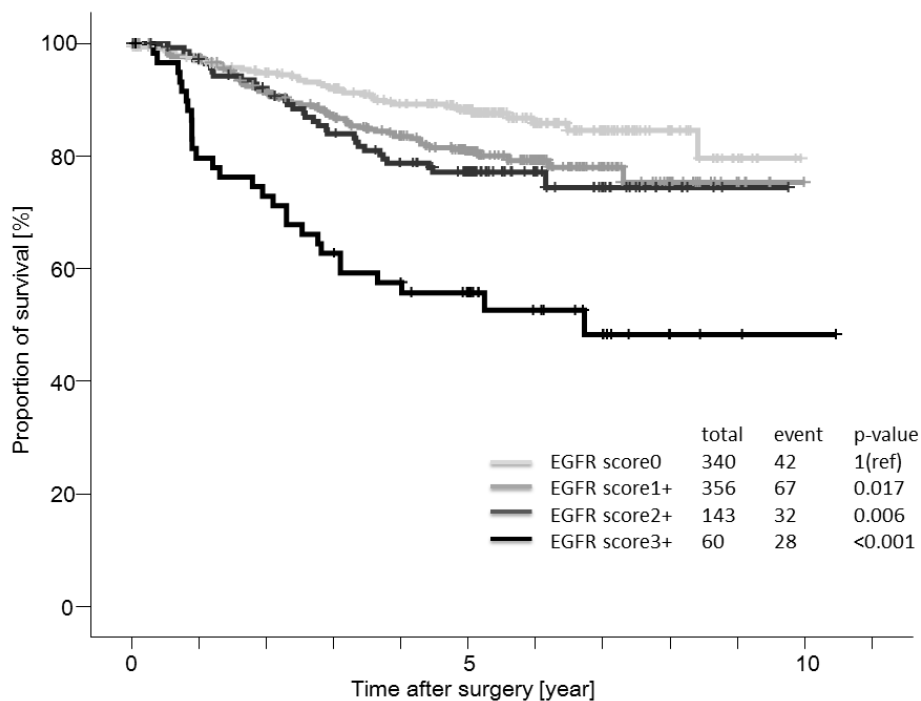


図 25) EGFR-IHC スコア別の生存曲線

EGFR-IHC スコア 0 に比して EGFR-IHC スコア 3+は有意に予後不良であった。

5. 考察

950 例の大規模コホートを用いて胃・食道胃接合部腺癌の標的分子蛋白発現プロファイルを行ったところ、HER2、EGFR、MET、FGFR2 の 4 種類の RTK だけで全体の 2/3 を陽性と分類することができた。複数の蛋白発現を同一検体で検討した報告はこれまでも存在していた[99-102]が、現在の胃癌分子標的治療開発を見据えて 4RTK を選択した本研究により、胃癌の 2/3 の症例が抗体薬を中心とした分子標的薬剤の治療対象となる可能性が示唆された。さらに、蛋白過剰発現は相互排他的でなく 2 種類以上の RTK の重複発現が全体の 1/4 を占めていたことは驚くべきことであった。がん細胞は特定の RTK を過剰発現することで増殖や生存に有利な状況を生み出していると考えられていたが、2 種類以上の RTK を過剰に発現している場合においてこれら RTK の役割とはいったいどのようなものなのだろうか。RTK の下流シグナルとして 2 つの代表的な MAPK 経路と PI3K-Akt-mTOR 経路があるが、これらの経路はその重要性が故に相互依存関係を構築しており[56]、一方の経路が何らかの理由で障害を受けてももう一方の代替経路により機能シグナルを伝達することが可能である。さらに、EGFR 遺伝子変異を有する肺腺癌に Gefitinib や Erlotinib 治療を実施すると後に耐性化が生じるが、その機序として MET 遺伝子増幅により自己リン酸化した MET 受容体が HER3 と会合しシグナルを伝達する機構[103]や、MET 受容体のリガンドである HGF 過剰発現による MET 受容体の活性化[104]など、EGFR 以外の RTK を介した生存シグナルの伝達が指摘されている。がん細胞は、自身の増殖・転移といった内的要因や薬剤投与などの外的要因からくる様々な環境変化に合わせてゲノムを変化させたり、エピゲノムを調節したりするなどして対応しており、複数の RTK 蛋白の発現もがん細胞が生存していくために獲得した性質の一つと考えられる。

現時点で、胃癌に対する複数の分子標的治療薬の併用療法は HER2 を標的としたものに限られており、本研究で明らかとなったような異なる標的を対象としたものではない。事実、MET 蛋白過剰発現進行胃癌の一次治療を対象とした RILOMET-II 試験の適格規準は「MET 蛋白過剰発現かつ HER2 陰性」とされていた。標準治療と試験治療の位置づけから現時点においてこの規準はやむを得ないものと考えられるが、理想は標的病変における RTK の発現状況や割合、薬剤の特性(作用機序)を加味したうえで優先度を決定していくことであろう。図 11 のように同一の強度で同一の領域に 2 種類の RTK が共発現している腫瘍にどちらか一方の RTK 治療を優先させた後その薬剤が無効の判断となった場合、その原因が一次無効(もともと無効であった成分が増殖した)のか、二次無効(薬剤の標的領域がその薬剤に反応しなくなり増殖した)のかを

見極める必要があるし、また最初から分子標的薬剤の併用を考慮すべきなのかもしれない。しかし、実際には様々な程度で蛋白発現が重複しており、その決定は容易ではない。今回の研究では染色強度の強さや染色割合の広さから「蛋白発現における predominant RTK」を定義したが、実臨床ではそれぞれの抗体薬の作用機序や結合能等により使用されるコンパニオン診断も判定基準も異なる、「薬剤間の predominance」が決定され使用されていくのではないかと推察する。今後 4RTK を標的とする薬剤が胃癌においても有効性を示しかつ一次治療から実施されていくと、重複過剰発現の存在をどのように検出・判断し、どのように治療を組み立てていくべきかが重要な課題となろう。

本研究においては DISH 法を用いたことで、細胞単位における遺伝子増幅と蛋白発現の関係性を解析することができた。同一組織内で行われた複数の RTK 遺伝子増幅の検討として、FISH 法における HER2、MET、EGFR の遺伝子増幅は相互排他的[73]、FISH 法における HER2 と FGFR2 の遺伝子増幅は相互排他的[105]、SNP array における FGFR2、HER2、EGFR、MET 遺伝子増幅は相互排他的[82]、などの報告がある。今回の重複遺伝子増幅と従来の相互排他的である結果の乖離の原因は、組織標本を用いた FISH 法は暗視野での観察のため個々のがん細胞レベルにおける染色体コピー数状態の詳細な把握は困難であること、染色体のコピー数増加は採取した組織全体の量的推定でしか推し量れないこと、が挙げられる。

本研究において、部分的および不均一な蛋白発現および遺伝子増幅分布の存在が大規模コホートを用いた検討により、改めて確認することができた。乳癌に比較すれば胃癌の HER2 蛋白発現に不均一さは目立つものの、4RTK の中では不均一分布の頻度は低く、胃癌の EGFR、MET、FGFR2 の不均一な蛋白発現はさらに際立っていた。さらに、不均一な強い蛋白発現を有する領域の多くで遺伝子増幅を伴っていたことは、これまで得られていなかった新たな知見である。

一般にがんは遺伝子異常の蓄積により発生、増殖、進展の各段階が引き起こされていると考えられており、胃癌においても様々な genetic および epigenetic な変化が蓄積している[106]。さらに、今回検討を行った 4 種類の分子は一連の遺伝子異常のうち後期にあたるがんの増殖進展に関与すると考えられており、それが故に治療標的としての開発が進んできている。本研究においても脈管内に浸潤したがん細胞のみが EGFR や MET 蛋白を過剰に発現し遺伝子増幅を伴うなど、進展や転移に伴い新たな遺伝子変化を獲得したと考えられる現象が認められた。EGFR 蛋白発現は腫瘍の深

達度とも正の相関を示しており、がんの進展に伴ってみられる蛋白発現との関係が示唆されるものである。

* 今後雑誌掲載等の形での刊行を予定している部分であり、削除の上非公開とした。

さらに、胃癌は多段階発癌の代表的癌腫である大腸癌などと異なり、多くが *Helicobacter pylori* 感染による慢性胃炎を発生母地としている。慢性的な炎症に伴う組織内の血流不均衡、炎症細胞を含め増生した間質組織による影響などが影響し、複雑な蛋白発現や遺伝子増幅分布の不均一が生じている可能性も考えられるが、今回の検討では解明には至らず今後の課題としたい。近年では、*Helicobacter pylori* 感染による炎症性刺激により、がん領域のみならず非がん領域の感染胃粘膜細胞内の両方において異所性に遺伝子編集酵素 AID が発現しており[109]、標的遺伝子の DNA 配列上の cytosine を uracil に変化させることで遺伝子変化を導入することが明らかとなっている。さらに *Helicobacter pylori* 感染による慢性炎症は、フリーラジカルによる直接的な遺伝子変異やエピゲノム変化を誘発することも知られている。このような慢性炎症に起因するがん化や進展における現象が、胃癌におけるこれら特殊性を解明する糸口となることも期待したい。

分子の蛋白不均一発現は、全腫瘍細胞における染色割合を加味した現行の評価基準においては陽陰性の判定と密接に関わる。HER2 の不均一性に関してはこれまで数々の報告がなされているが、生検組織が手術組織の分子発現を反映しないことも 2 割程度で生じており、スコアが低い症例ほどその傾向は強い[63, 110-112]。これには HER2 の腫瘍内不均一分布のみならず生検組織と手術組織間で固定までの時間や固定時間など、病理ブロック作製までの工程に問題があることも関係していると思われる。腫瘍全体を反映するには生検材料を複数個所から採取することが各国のガイドラインにおいて推奨されており[113, 114]、腫瘍内不均一にも対応できる。後に様々な標的分子の状態を検査する可能性も加味すると、一症例に複数の病理ブロックが存在する利点は大きい。今回は原発巣のみの検索であったが、原発巣と転移巣での HER2 発現にも 1 割程度の症例で判定が異なっている[115-118]。さらに、前治療や腫瘍の進展により分子発現の状態は変化していることは容易に想像される。当該治療直前の組織における標的分子の状態を常に確認することが分子標的治療薬の選択には理想であるかもしれないが、そもそも生検で得られる組織は全身に存在する腫瘍のご

く一部を反映しているにすぎず、緩和的化学療法を目的を考慮すれば過度の侵襲は避けるべきで、むしろ腫瘍内における分子の状況は不均一かつ流動的であることを想定して治療にあたるのが現実的な対応であろう。

6. 展望

これまで分子標的治療薬の治療開発は「一標的分子の発現/遺伝子異常を有する症例」をターゲットとしたものであり、この治療開発戦略は肺腺癌や GIST などのような主に driver mutation が相互排他的に存在しうる癌腫において成功を収めてきた。しかしながら今回の研究結果を踏まえると、胃癌では標的 RTK の発現が非常に不均一であり分子標的治療薬の効果が一部の腫瘍細胞に限定的にならざるを得ないこと、RTK の重複発現例が数多く含まれているため一つの RTK に対する分子標的治療薬を投与しても無効例や早期の耐性獲得に寄与している可能性があることなどが類推された。4 種類の RTK の中で HER2 が比較的均一性が高く他の RTK との重複例も少なかったことが Trastuzumab の成功につながったのかもしれないし、胃癌分子標的治療におけるもう一つの成功薬である抗 VEGFR2 抗体 Ramucirumab は RTK ではなく腫瘍周囲微小環境を標的とした治療法であったことも、胃癌においては成功要因であったのかもしれない。driver gene が同定されておらず分子発現において不均一性の高い胃癌を対象とした治療開発は、それぞれの分子に特化した戦略だけでなく、複数の標的を組み合わせる、multi-target drug を用いる、腫瘍間質や腫瘍免疫といったこれら特徴に左右されにくい多角的な治療法を用いる、エピゲノムを対象とした治療法を開発する、など工夫が必要と考える。

本研究をさらに発展させ、現在では国立がん研究センター東病院消化内科と病理診断科が連携し、緩和的化学療法を実施する切除不能再発胃癌および AEGJ を対象に HER2 蛋白に加え EGFR や MET 蛋白発現状況を IHC 法で調べ、現在実施されている分子標的治療薬の臨床試験における候補患者をより効果的に抽出する前向き臨床研究(胃癌スクリーニングシステム:研究許可番号 2013-178)を実施している。胃癌スクリーニングシステムは標的分子の網羅的プレスクリーニングとしての役割を担っており、標的蛋白過剰発現患者をあらかじめ抽出することで個々の臨床試験への患者リクルートがより迅速になされている。胃癌では HER2、EGFR、MET 以外にも多くの標的分子治療薬が早期相も含め試験治療として行われており、有望な分子標的については積極的に胃癌スクリーニングシステムに組み入れプレスクリーニングの充足を図っていきたい。

7. 謝辞

本学位論文は、著者が国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 臨床腫瘍病理分野(現 国立がん研究センター 先端医療開発センター 臨床腫瘍病理分野)において行った研究をまとめたものです。本論文を作成するにあたり、終始ご指導ご鞭撻をいただきました指導教官の自治医科大学大学院 地域医療学専攻 臨床腫瘍学教授 藤井博文博士に心より感謝申し上げます。また、本論文をご精読いただき学位論文審査において貴重なご指導およびご助言をいただきました、審査委員長の自治医科大学 内科学講座消化器内科学部門教授 武藤弘行博士、審査委員の同 病理診断部教授 福嶋敬宜博士および同 内科学講座循環器内科学部門准教授 今井靖博士に深謝いたします。

本研究を進めるにあたり、国立がん研究センター 先端医療開発センター 臨床腫瘍病理分野 落合淳志博士から、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。また、桑田健博士、中村優香技師、福田幸子技師他、臨床腫瘍病理分野の皆様には研究を遂行するにあたり多くのご助言およびご協力をいただきました。ここに感謝の意を表します。

なお、本研究の一部は厚生労働科学研究費補助第3次対がん総合戦略研究経費を用いて実施されました。

8. 参考文献

1. Ministry of Health LaW. Vital Statistics Japan. 2012.
2. Matsuda T, Marugame T, Kamo K, Katanoda K, Ajiki W, Sobue T. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2006: based on data from 15 population-based cancer registries in the monitoring of cancer incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol*. 42:139-147,2012.
3. Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, Kinoshita T, Fujii M, Nashimoto A, Furukawa H, Nakajima T, Ohashi Y, Imamura H, Higashino M, Yamamura Y, Kurita A, Arai K. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N Engl J Med*. 357:1810-1820,2007.
4. 星原 芳雄, 木暮 喬, 福地 創太郎, 秋山 洋, 宮本 明正. 下部食道縦走血管の内視鏡的観察とその臨床的意義. *Gastroenterol Endosc*. 28:941-946,1986.
5. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg*. 85:1457-1459,1998.
6. Hayward J. The lower end of the oesophagus. *Thorax*. 16:36-41,1961.
7. 西 満正, 加治佐 隆, 阿久根 務, 肝付 兼達, 永田 政幸, 川 進浩, 西瀬戸 紀征, 末永 豊邦, 木原 晃一, 泊 直十郎. 噴門癌について -食道胃境界部癌の提唱-. *外科診療*. 15:1328-1338,1973.
8. DeMeester SR. Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment. *Ann Surg Oncol*. 13:12-30,2006.
9. 菊地 正悟. 【Helicobacter pylori 感染と食道-胃接合部病変】食道下部腺癌と胃噴門部癌は将来急増する可能性がある. *Helicobacter Res*. 11:14-18,2007.
10. van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ, Steyerberg EW, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BP, Richel DJ, Nieuwenhuijzen GA, Hospers GA, Bonenkamp JJ, Cuesta MA, Blaisse RJ, Busch OR, ten Kate FJ, Creemers GJ, Punt CJ, Plukker JT, Verheul HM, Spillenaar Bilgen EJ, van Dekken H, van der Sangen MJ, Rozema T, Biermann K, Beukema JC, Piet AH, van Rij CM, Reinders JG, Tilanus HW, van der Gaast A, Group C. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Engl J Med*. 366:2074-2084,2012.
11. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson

- JA. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med.* 345:725-730,2001.
12. Kodera Y, Yamamura Y, Shimizu Y, Torii A, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Kato T. Adenocarcinoma of the gastroesophageal junction in Japan: relevance of Siewert's classification applied to 177 cases resected at a single institution. *J Am Coll Surg.* 189:594-601,1999.
 13. Hasegawa S, Yoshikawa T, Cho H, Tsuburaya A, Kobayashi O. Is adenocarcinoma of the esophagogastric junction different between Japan and western countries? The incidence and clinicopathological features at a Japanese high-volume cancer center. *World J Surg.* 33:95-103,2009.
 14. Kusano C, Gotoda T, Khor CJ, Katai H, Kato H, Taniguchi H, Shimoda T. Changing trends in the proportion of adenocarcinoma of the esophagogastric junction in a large tertiary referral center in Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* 23:1662-1665,2008.
 15. Blaser MJ, Saito D. Trends in reported adenocarcinomas of the oesophagus and gastric cardia in Japan. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 14:107-113,2002.
 16. Hasegawa S, Yoshikawa T. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: incidence, characteristics, and treatment strategies. *Gastric Cancer.* 13:63-73,2010.
 17. Wilke HJ, Van Cutsem E. Current treatments and future perspectives in colorectal and gastric cancer. *Ann Oncol.* 14 Suppl 2:ii49-55,2003.
 18. Janunger KG, Hafstrom L, Nygren P, Glimelius B. A systematic overview of chemotherapy effects in gastric cancer. *Acta Oncol.* 40:309-326,2001.
 19. Pyrhonen S, Kuitunen T, Nyandoto P, Kouri M. Randomised comparison of fluorouracil, epirubicin and methotrexate (FEMTX) plus supportive care with supportive care alone in patients with non-resectable gastric cancer. *Br J Cancer.* 71:587-591,1995.
 20. Murad AM, Santiago FF, Petroianu A, Rocha PR, Rodrigues MA, Rausch M. Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer.* 72:37-41,1993.
 21. Moore GE, Bross ID, Ausmans R, Nadler S, Jones R, Jr., Slack N, Rimm AA.

- Effects of 5-fluorouracil (NSC-19893) in 389 patients with cancer. Eastern Clinical Drug Evaluation Program. *Cancer Chemother Rep.* 52:641-653,1968.
22. Cullinan SA, Moertel CG, Fleming TR, Rubin JR, Krook JE, Everson LK, Windschitl HE, Twito DI, Marschke RF, Foley JF, et al. A comparison of three chemotherapeutic regimens in the treatment of advanced pancreatic and gastric carcinoma. Fluorouracil vs fluorouracil and doxorubicin vs fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin. *JAMA.* 253:2061-2067,1985.
 23. Cullinan SA, Moertel CG, Wieand HS, O'Connell MJ, Poon MA, Krook JE, Mailliard JA, Tschetter LK. Controlled evaluation of three drug combination regimens versus fluorouracil alone for the therapy of advanced gastric cancer. North Central Cancer Treatment Group. *J Clin Oncol.* 12:412-416,1994.
 24. Wils JA, Klein HO, Wagener DJ, Bleiberg H, Reis H, Korsten F, Conroy T, Fickers M, Leyvraz S, Buyse M, et al. Sequential high-dose methotrexate and fluorouracil combined with doxorubicin--a step ahead in the treatment of advanced gastric cancer: a trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 9:827-831,1991.
 25. Webb A, Cunningham D, Scarffe JH, Harper P, Norman A, Joffe JK, Hughes M, Mansi J, Findlay M, Hill A, Oates J, Nicolson M, Hickish T, O'Brien M, Iveson T, Watson M, Underhill C, Wardley A, Meehan M. Randomized trial comparing epirubicin, cisplatin, and fluorouracil versus fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced esophagogastric cancer. *J Clin Oncol.* 15:261-267,1997.
 26. Kim NK, Park YS, Heo DS, Suh C, Kim SY, Park KC, Kang YK, Shin DB, Kim HT, Kim HJ, et al. A phase III randomized study of 5-fluorouracil and cisplatin versus 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin C versus 5-fluorouracil alone in the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer.* 71:3813-3818,1993.
 27. Ohtsu A, Shimada Y, Shirao K, Boku N, Hyodo I, Saito H, Yamamichi N, Miyata Y, Ikeda N, Yamamoto S, Fukuda H, Yoshida S. Randomized phase III trial of fluorouracil alone versus fluorouracil plus cisplatin versus uracil and tegafur plus mitomycin in patients with unresectable, advanced gastric cancer: The Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9205). *J Clin Oncol.*

- 21:54-59,2003.
28. Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E, Risse ML, Ajani JA. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol.* 24:4991-4997,2006.
 29. Cunningham D, Starling N, Rao S, Iveson T, Nicolson M, Coxon F, Middleton G, Daniel F, Oates J, Norman AR. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med.* 358:36-46,2008.
 30. Kang YK, Kang WK, Shin DB, Chen J, Xiong J, Wang J, Lichinitser M, Guan Z, Khasanov R, Zheng L, Philco-Salas M, Suarez T, Santamaria J, Forster G, McCloud PI. Capecitabine/cisplatin versus 5-fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: a randomised phase III noninferiority trial. *Ann Oncol.* 20:666-673,2009.
 31. Boku N, Yamamoto S, Fukuda H, Shirao K, Doi T, Sawaki A, Koizumi W, Saito H, Yamaguchi K, Takiuchi H, Nasu J, Ohtsu A. Fluorouracil versus combination of irinotecan plus cisplatin versus S-1 in metastatic gastric cancer: a randomised phase 3 study. *Lancet Oncol.* 10:1063-1069,2009.
 32. Koizumi W, Narahara H, Hara T, Takagane A, Akiya T, Takagi M, Miyashita K, Nishizaki T, Kobayashi O, Takiyama W, Toh Y, Nagaie T, Takagi S, Yamamura Y, Yanaoka K, Orita H, Takeuchi M. S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial. *Lancet Oncol.* 9:215-221,2008.
 33. Ajani JA, Buyse M, Lichinitser M, Gorbunova V, Bodoky G, Douillard JY, Cascinu S, Heinemann V, Zaucha R, Carrato A, Ferry D, Moiseyenko V. Combination of cisplatin/S-1 in the treatment of patients with advanced gastric or gastroesophageal adenocarcinoma: Results of noninferiority and safety analyses compared with cisplatin/5-fluorouracil in the First-Line Advanced Gastric Cancer Study. *Eur J Cancer.* 49:3616-3624,2013.
 34. Ajani JA, Rodriguez W, Bodoky G, Moiseyenko V, Lichinitser M, Gorbunova V, Vynnychenko I, Garin A, Lang I, Falcon S. Multicenter phase III comparison of cisplatin/S-1 with cisplatin/infusional fluorouracil in advanced gastric or

- gastroesophageal adenocarcinoma study: the FLAGS trial. *J Clin Oncol.* 28:1547-1553,2010.
35. Thuss-Patience PC, Kretzschmar A, Bichev D, Deist T, Hinke A, Breithaupt K, Dogan Y, Gebauer B, Schumacher G, Reichardt P. Survival advantage for irinotecan versus best supportive care as second-line chemotherapy in gastric cancer--a randomised phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Eur J Cancer.* 47:2306-2314,2011.
 36. Kang JH, Lee SI, Lim do H, Park KW, Oh SY, Kwon HC, Hwang IG, Lee SC, Nam E, Shin DB, Lee J, Park JO, Park YS, Lim HY, Kang WK, Park SH. Salvage chemotherapy for pretreated gastric cancer: a randomized phase III trial comparing chemotherapy plus best supportive care with best supportive care alone. *J Clin Oncol.* 30:1513-1518,2012.
 37. Hironaka S, Ueda S, Yasui H, Nishina T, Tsuda M, Tsumura T, Sugimoto N, Shimodaira H, Tokunaga S, Moriwaki T, Esaki T, Nagase M, Fujitani K, Yamaguchi K, Ura T, Hamamoto Y, Morita S, Okamoto I, Boku N, Hyodo I. Randomized, Open-Label, Phase III Study Comparing Irinotecan With Paclitaxel in Patients With Advanced Gastric Cancer Without Severe Peritoneal Metastasis After Failure of Prior Combination Chemotherapy Using Fluoropyrimidine Plus Platinum: WJOG 4007 Trial. *J Clin Oncol.* 31:4438-4444,2013.
 38. Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, Hundahl SA, Estes NC, Ajani JA, Gunderson LL, Goldman B, Martenson JA, Jessup JM, Stemmermann GN, Blanke CD, Macdonald JS. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. *J Clin Oncol.* 30:2327-2333,2012.
 39. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ, Participants MT. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med.* 355:11-20,2006.
 40. Ychou M, Boige V, Pignon JP, Conroy T, Bouche O, Lebreton G, Ducourtieux M, Bedenne L, Fabre JM, Saint-Aubert B, Geneve J, Lasser P, Rougier P.

- Perioperative Chemotherapy Compared With Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Adenocarcinoma: An FNCLCC and FFCD Multicenter Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 29:1715-1721,2011.
41. Sasako M, Sakuramoto S, Katai H, Kinoshita T, Furukawa H, Yamaguchi T, Nashimoto A, Fujii M, Nakajima T, Ohashi Y. Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer. *J Clin Oncol*. 29:4387-4393,2011.
 42. Bang YJ, Kim YW, Yang HK, Chung HC, Park YK, Lee KH, Lee KW, Kim YH, Noh SI, Cho JY, Mok YJ, Kim YH, Ji J, Yeh TS, Button P, Sirzen F, Noh SH. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 379:315-321,2012.
 43. Noh SH, Park SR, Yang HK, Chung HC, Chung IJ, Kim SW, Kim HH, Choi JH, Kim HK, Yu W, Lee JI, Shin DB, Ji J, Chen JS, Lim Y, Ha S, Bang YJ. Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 15:1389-1396,2014.
 44. Paoletti X, Oba K, Bang YJ, Bleiberg H, Boku N, Bouche O, Catalano P, Fuse N, Michiels S, Moehler M, Morita S, Ohashi Y, Ohtsu A, Roth A, Rougier P, Sakamoto J, Sargent D, Sasako M, Shitara K, Thuss-Patience P, Van Cutsem E, Burzykowski T, Buyse M. Progression-free survival as a surrogate for overall survival in advanced/recurrent gastric cancer trials: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 105:1667-1670,2013.
 45. Chau I, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Hawkins R, Iveson T, Nicolson M, Harper P, Seymour M, Hickish T. The impact of primary tumour origins in patients with advanced oesophageal, oesophago-gastric junction and gastric adenocarcinoma--individual patient data from 1775 patients in four randomised controlled trials. *Ann Oncol*. 20:885-891,2009.
 46. Kawano A, Nakajima TE, Oda I, Hokamura N, Iwasa S, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Fujii H, Shimada Y. Comparison of advanced adenocarcinomas of esophagogastric junction and distal stomach in Japanese patients. *Gastric Cancer*. 17:54-60,2014.

47. Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, Jonas C, Klippenstein D, Dallaire B, Varns C. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol.* 17:268-276,1999.
48. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 350:2129-2139,2004.
49. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Ribas A. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.* 366:707-714,2012.
50. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 364:2507-2516,2011.
51. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med.* 347:472-480,2002.
52. Pao W, Hutchinson KE. Chipping away at the lung cancer genome. *Nat Med.* 18:349-351,2012.
53. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science.* 297:63-64,2002.

54. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 362:2380-2388,2010.
55. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, De Pas T, Besse B, Solomon BJ, Blackhall F, Wu YL, Thomas M, O'Byrne KJ, Moro-Sibilot D, Camidge DR, Mok T, Hirsh V, Riely GJ, Iyer S, Tassell V, Polli A, Wilner KD, Janne PA. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 368:2385-2394,2013.
56. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* 9:550-562,2009.
57. Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Mori K, Tanaka Y. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol.* 59:795-805,2007.
58. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Ruschoff J, Kang YK. 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.* 376:687-697,2010.
59. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 363:711-723,2010.
60. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, Weber JS, Joshua AM, Hwu WJ, Gangadhar TC, Patnaik A, Dronca R, Zarour H, Joseph RW, Boasberg P, Chmielowski B, Mateus C, Postow MA, Gergich K, Ellassaiss-Schaap J, Li XN, Iannone R, Ebbinghaus SW, Kang SP, Daud A.

- Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet*. 384:1109-1117,2014.
61. 医薬品インタビューフォーム, オプジーボ®点滴静注. 2014.
62. LoRusso PM, Weiss D, Guardino E, Girish S, Sliwkowski MX. Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer. *Clin Cancer Res*. 17:6437-6447,2011.
63. Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep*. 15:65-71,2006.
64. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Ruschoff J, Henkel T. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 52:797-805,2008.
65. Kim KC, Koh YW, Chang HM, Kim TH, Yook JH, Kim BS, Jang SJ, Park YS. Evaluation of HER2 protein expression in gastric carcinomas: comparative analysis of 1,414 cases of whole-tissue sections and 595 cases of tissue microarrays. *Ann Surg Oncol*. 18:2833-2840,2011.
66. Terashima M, Kitada K, Ochiai A, Ichikawa W, Kurahashi I, Sakuramoto S, Katai H, Sano T, Imamura H, Sasako M. Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 18:5992-6000,2012.
67. Shan L, Ying J, Lu N. HER2 expression and relevant clinicopathological features in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a Chinese population. *Diagn Pathol*. 8:76,2013.
68. Aizawa M, Nagatsuma AK, Kitada K, Kuwata T, Fujii S, Kinoshita T, Ochiai A. Evaluation of HER2-based biology in 1,006 cases of gastric cancer in a Japanese population. *Gastric Cancer*. 17:34-42,2014.
69. Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology*. 52:738-746,2008.

70. Liang Z, Zeng X, Gao J, Wu S, Wang P, Shi X, Zhang J, Liu T. Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. *BMC Cancer*. 8:363,2008.
71. Inokuchi M, Murayama T, Hayashi M, Takagi Y, Kato K, Enjoji M, Kojima K, Kumagai J, Sugihara K. Prognostic value of co-expression of STAT3, mTOR and EGFR in gastric cancer. *Exp Ther Med*. 2:251-256,2011.
72. Lee J, Seo JW, Jun HJ, Ki CS, Park SH, Park YS, Lim HY, Choi MG, Bae JM, Sohn TS, Noh JH, Kim S, Jang HL, Kim JY, Kim KM, Kang WK, Park JO. Impact of MET amplification on gastric cancer: possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target. *Oncol Rep*. 25:1517-1524,2011.
73. Lennerz JK, Kwak EL, Ackerman A, Michael M, Fox SB, Bergethon K, Lauwers GY, Christensen JG, Wilner KD, Haber DA, Salgia R, Bang YJ, Clark JW, Solomon BJ, Iafrate AJ. MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *J Clin Oncol*. 29:4803-4810,2011.
74. Lee HE, Kim MA, Lee HS, Jung EJ, Yang HK, Lee BL, Bang YJ, Kim WH. MET in gastric carcinomas: comparison between protein expression and gene copy number and impact on clinical outcome. *Br J Cancer*. 107:325-333,2012.
75. An X, Wang F, Shao Q, Wang FH, Wang ZQ, Wang ZQ, Chen C, Li C, Luo HY, Zhang DS, Xu RH, Li YH. MET amplification is not rare and predicts unfavorable clinical outcomes in patients with recurrent/metastatic gastric cancer after chemotherapy. *Cancer*. 120:675-682,2014.
76. Kilgour E, Su X, Zhan P, Gavine P, Morgan S, Womack C, Jung E-J, Bang Y-J, Im S-A, Kim WH, Grabsch H. Prevalence and prognostic significance of FGF receptor 2 (FGFR2) gene amplification in Caucasian and Korean gastric cancer cohorts. *J Clin Oncol*. 30:abstr 4124,2012.
77. Jung EJ, Min SY, Kim MA, Kim WH. Fibroblast growth factor receptor 2 gene amplification status and its clinicopathologic significance in gastric carcinoma. *Hum Pathol*. 43:1559-1566,2012.
78. 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*. 106:727-732,2012.
79. Xie L, Su X, Zhang L, Yin X, Tang L, Zhang X, Xu Y, Gao Z, Liu K, Zhou M, Gao B, Shen D, Ji J, Gavine PR, Zhang J, Kilgour E, Ji Q. FGFR2 gene amplification in gastric cancer predicts sensitivity to the selective FGFR inhibitor AZD4547. *Clin Cancer Res*. 19:2572-2583,2013.
 80. Betts G, Valentine H, Pritchard S, Swindell R, Williams V, Morgan S, Griffiths EA, Welch I, West C, Womack C. FGFR2, HER2 and cMet in gastric adenocarcinoma: detection, prognostic significance and assessment of downstream pathway activation. *Virchows Arch*. 464:145-156,2014.
 81. Das K, Gunasegaran B, Tan IB, Deng N, Lim KH, Tan P. Mutually exclusive FGFR2, HER2, and KRAS gene amplifications in gastric cancer revealed by multicolour FISH. *Cancer Lett*. 353:167-175,2014.
 82. Deng N, Goh LK, Wang H, Das K, Tao J, Tan IB, Zhang S, Lee M, Wu J, Lim KH, Lei Z, Goh G, Lim QY, Lay-Keng Tan A, Sin Poh DY, Riahi S, Bell S, Shi MM, Linnartz R, Zhu F, Yeoh KG, Toh HC, Yong WP, Cheong HC, Rha SY, Boussioutas A, Grabsch H, Rozen S, Tan P. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut*. 61:673-684,2012.
 83. Kuboki Y, Niwa T, Nagatsuma A, Shitara K, Fuse N, Yamashita S, Doi T, Ushijima T, Ochiai A, Ohtsu A. Comprehensive molecular profiling of advanced gastric cancer (AGC) using NGS and immunohistochemistry (IHC). *J Clin Oncol*. 32 suppl:Abstr 11027,2014.
 84. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 513:202-209,2014.
 85. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arai K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res*. 12:989-995,2006.
 86. Yoda Y, Takeshima H, Niwa T, Kim JG, Ando T, Kushima R, Sugiyama T, Katai

- H, Noshiro H, Ushijima T. Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 18:65-76,2014.
87. Lordick F, Kang YK, Chung HC, Salman P, Oh SC, Bodoky G, Kurteva G, Volovat C, Moiseyenko VM, Gorbunova V, Park JO, Sawaki A, Celik I, Gotte H, Melezinkova H, Moehler M. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 14:490-499,2013.
 88. Amgen. Amgen Announces Termination Of All Amgen-Sponsored Clinical Studies Of Rilotumumab In Advanced Gastric Cancer.
http://wwwext.amgen.com/media/media_pr_detail.jsp?year=2014&releaseID=1992492. 2014.
 89. Lordick F, Kang Y-K, Salman P, Oh SC, Bodoky G, Kurteva GP, Volovat CD, Moiseyenko V, Sawaki A, Park JO, Gorbunova VA, Goette H, Melezinkova H, Stroh C, Moehler M. Clinical outcome according to tumor HER2 status and EGFR expression in advanced gastric cancer patients from the EXPAND study. *J Clin Oncol*. 31:Abstr 4021,2013.
 90. Waddell T, Chau I, Cunningham D, Gonzalez D, Okines AF, Okines C, Wotherspoon A, Saffery C, Middleton G, Wadsley J, Ferry D, Mansoor W, Crosby T, Coxon F, Smith D, Waters J, Iveson T, Falk S, Slater S, Peckitt C, Barbachano Y. Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for patients with previously untreated advanced oesophagogastric cancer (REAL3): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 14:481-489,2013.
 91. Hecht JR, Bang Y-J, Qin S, Chung H-C, Xu J-M, Park JO, Jeziorski K, Shparyk Y, Hoff PM, Sobrero AF, Salman P, Li J, Protsenko S, Buyse ME, Afenjar K, Kaneko T, Kemner A, Santillana S, Press MF, Slamon DJ. Lapatinib in combination with capecitabine plus oxaliplatin (CapeOx) in HER2-positive advanced or metastatic gastric, esophageal, or gastroesophageal adenocarcinoma (AC): The TRIO-013/LOGiC Trial. *J Clin Oncol*. 31 suppl:abstr LBA4001,2013.

92. Rojo F, Tabernero J, Albanell J, Van Cutsem E, Ohtsu A, Doi T, Koizumi W, Shirao K, Takiuchi H, Ramon y Cajal S, Baselga J. Pharmacodynamic studies of gefitinib in tumor biopsy specimens from patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 24:4309-4316,2006.
93. Kang YK, Muro K, Ryu MH, Yasui H, Nishina T, Ryoo BY, Kamiya Y, Akinaga S, Boku N. A phase II trial of a selective c-Met inhibitor tivantinib (ARQ 197) monotherapy as a second- or third-line therapy in the patients with metastatic gastric cancer. *Invest New Drugs*. 32:355-361,2014.
94. Satoh T, Xu RH, Chung HC, Sun GP, Doi T, Xu JM, Tsuji A, Omuro Y, Li J, Wang JW, Miwa H, Qin SK, Chung IJ, Yeh KH, Feng JF, Mukaiyama A, Kobayashi M, Ohtsu A, Bang YJ. Lapatinib plus paclitaxel versus paclitaxel alone in the second-line treatment of HER2-amplified advanced gastric cancer in Asian populations: TyTAN--a randomized, phase III study. *J Clin Oncol*. 32:2039-2049,2014.
95. Nagatsuma AK, Aizawa M, Kuwata T, Doi T, Ohtsu A, Fujii H, Ochiai A. Expression profiles of HER2, EGFR, MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer*. 2014.
96. Martin AJ, Grant A, Ashfield AM, Palmer CN, Baker L, Quinlan PR, Purdie CA, Thompson AM, Jordan LB, Berg JN. FGFR2 protein expression in breast cancer: nuclear localisation and correlation with patient genotype. *BMC Res Notes*. 4:72,2011.
97. ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社. HER2 検査ガイド-胃癌編-.
98. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Jr., Varella-Garcia M. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 97:643-655,2005.
99. Drescher D, Moehler M, Gockel I, Frerichs K, Muller A, Dunschede F, Borschitz T, Biesterfeld S, Holtmann M, Wehler T, Teufel A, Herzer K, Fischer T, Berger MR, Junginger T, Galle PR, Schimanski CC. Coexpression of receptor-tyrosine-kinases in gastric adenocarcinoma--a rationale for a

- molecular targeting strategy? *World J Gastroenterol.* 13:3605-3609,2007.
100. Drescher D, Gockel I, Timm S, Berger MR, Herzer K, Schmidtman I, Junginger T, Galle PR, Lang H, Moehler M, Schimanski CC. Does expression of receptor tyrosine kinases in gastric adenocarcinoma correlate with clinicopathological parameters? *Hepatogastroenterology.* 57:388-394,2010.
 101. Kurokawa Y, Matsuura N, Kawabata R, Nishikawa K, Ebisui C, Yokoyama Y, Shaker MN, Hamakawa T, Takahashi T, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Prognostic impact of major receptor tyrosine kinase expression in gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 21 Suppl 4:584-590,2014.
 102. Guo T, Fan L, Ng WH, Zhu Y, Ho M, Wan WK, Lim KH, Ong WS, Lee SS, Huang S, Kon OL, Sze SK. Multidimensional Identification of Tissue Biomarkers of Gastric Cancer. *J Proteome Res.* 11:3405-3413,2012.
 103. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Janne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 316:1039-1043,2007.
 104. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, Ogino H, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Nishioka Y, Uehara H, Mitsudomi T, Yatabe Y, Nakamura T, Sone S. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* 68:9479-9487,2008.
 105. Su X, Zhan P, Gavine PR, Morgan S, Womack C, Ni X, Shen D, Bang YJ, Im SA, Ho Kim W, Jung EJ, Grabsch HI, Kilgour E. FGFR2 amplification has prognostic significance in gastric cancer: results from a large international multicentre study. *Br J Cancer.* 110:967-975,2014.
 106. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ.* 327-349,2004.
- * 今後雑誌掲載等の形での刊行を予定している部分であり、削除の上非公開とした。
109. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat*

- Med.* 13:470-476,2007.
110. Lee S, de Boer WB, Fermoye S, Platten M, Kumarasinghe MP. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: issues related to heterogeneity in biopsies and resections. *Histopathology.* 59:832-840,2011.
 111. Yang J, Luo H, Li Y, Li J, Cai Z, Su X, Dai D, Du W, Chen T, Chen M. Intratumoral heterogeneity determines discordant results of diagnostic tests for human epidermal growth factor receptor (HER) 2 in gastric cancer specimens. *Cell Biochem Biophys.* 62:221-228,2012.
 112. Pirrelli M, Caruso ML, Di Maggio M, Armentano R, Valentini AM. Are biopsy specimens predictive of HER2 status in gastric cancer patients? *Dig Dis Sci.* 58:397-404,2013.
 113. NCCN. org. NCCN Clinical Practice Guideline in Oncology Gastric Cancer. version 1:2014.
 114. Scottish Intercollegiate Guideline Network. Management of oesophageal and gastric cancer. A national clinical guideline. 2006.
 115. Cho EY, Park K, Do I, Cho J, Kim J, Lee J, Kim S, Kim KM, Sohn TS, Kang WK. Heterogeneity of ERBB2 in gastric carcinomas: a study of tissue microarray and matched primary and metastatic carcinomas. *Mod Pathol.* 26:677-684,2013.
 116. Kim MA, Lee HJ, Yang HK, Bang YJ, Kim WH. Heterogeneous amplification of ERBB2 in primary lesions is responsible for the discordant ERBB2 status of primary and metastatic lesions in gastric carcinoma. *Histopathology.* 59:822-831,2011.
 117. Bozzetti C, Negri FV, Lagrasta CA, Crafa P, Bassano C, Tamagnini I, Gardini G, Nizzoli R, Leonardi F, Gasparro D, Camisa R, Cavalli S, Silini EM, Ardizzoni A. Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma. *Br J Cancer.* 104:1372-1376,2011.
 118. Kochi M, Fujii M, Masuda S, Kanamori N, Mihara Y, Funada T, Tamegai H, Watanabe M, Suda H, Takayama T. Differing deregulation of HER2 in primary gastric cancer and synchronous related metastatic lymph nodes. *Diagn Pathol.* 8:191,2013.