



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	切除不能進行・再発胃癌における血清HER2タンパクと組織HER2発現の一致率に関する検討
Author(s)	佐々木, 尚英
Description	配架番号 : 2090
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11218号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11218
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58160
Type	doctoral thesis
File Information	Takahide_Sasaki.pdf



学 位 論 文

切除不能進行・再発胃癌における血清 HER2 タンパクと

組織 HER2 発現の一致率に関する検討

(Relationship between serum HER2 level and tissue HER2 status
in patients with advanced/recurrent gastric cancer)

2 0 1 4 年 3 月

北 海 道 大 学

佐 々 木 尚 英

目 次

発表論文目録および学会発表目録	2 頁
緒言	3 頁
略語表	14 頁
研究方法	15 頁
研究結果	18 頁
考察	30 頁
総括および結論	33 頁
謝辞	35 頁
引用文献	36 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は、以下の学術雑誌に投稿した。

1. T. Sasaki, N. Fuse, T. Kuwata, Shogo Nomura, K. Kaneko, T. Doi, T. Yoshino, H. Asano, A. Ochiai, Y. Komatsu, N. Sakamoto, A. Ohtsu
Serum HER2 levels and HER2 status in tumor cells in advanced/recurrent gastric cancer patients
Japanese Journal of Clinical Oncology (on the reviewing process)

本研究の一部は、以下の学会に発表した。

1. T. Sasaki, N. Fuse, T. Kuwata, M. Takahashi, H. Asano, K. Kaneko, T. Doi, T. Yoshino, T. Kojima, A. Ochiai, A. Ohtsu
Relationship between serum HER2 level and histologic HER2 status in patients with advanced/recurrent gastric cancer.
Gastrointestinal Cancers Symposium (ASCO-GI)
January, 19-21, 2012. San Francisco, California, USA

緒 言

(1) HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 ; HER2)

ヒト上皮成長因子受容体 (Human Epidermal Growth Factor Receptor ; HER) ファミリーは、HER1 (もしくは Epidermal Growth Factor Receptor ; EGFR)、HER2、HER3、HER4 の 4 種の、いずれも類似した構造をもつ細胞膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼである¹。1960 年代に上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor ; EGF) がマウス新生児の歯牙萌生と開眼を促進する因子として見いだされ、その後、細胞表面で EGF と特異的に結合し細胞内に取り込まれる分子として 1975 年に EGFR が発見され²、さらに、EGFR と類似した構造・機能をもつ分子として、HER2、HER3、HER4 が発見された^{3,4}。HER ファミリーの基本的な構造は、EGF、ニューレグリンなどのリガンドと結合し細胞外からのシグナルを受け取る細胞外ドメイン、脂溶性の高い膜貫通ドメイン、チロシンキナーゼ活性を有する細胞内ドメインの 3 つのドメインから成るが、このうち HER2 の細胞外ドメインはリガンドとの結合能を有さず、また、HER3 の細胞内ドメインのチロシンキナーゼ活性は極めて低いといった特徴がある⁵。リガンドと結合した HER は、それぞれのホモ二量体、もしくは他の HER ファミリーとのヘテロ二量体を形成して相互をリン酸化し、リン酸化カスケードによる細胞内のシグナル伝達の起点となる¹。HER ファミリーが関わる細胞内の主なシグナル伝達経路には、RAS-RAF-MAPK 系経路、phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin 系経路、JAK-STAT 系経路が知られており、HER と結合したリガンドのシグナルは最終的に核内に伝えられ、細胞の分化、増殖を惹起し、また、アポトーシスの制御を含めた生存・維持に関与する¹。

HER2 (または ErbB-2) は、分子量 185 kDa の糖タンパクで、1984 年にラット発現モデルの神経芽細胞腫およびシュワン細胞腫からがん遺伝子として発見され³、対応する遺伝子である *HER2/neu* は 1985 年に 17 番染色体長腕上 (17q11.2-q12;17q21.1) に同定された⁶。細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインから構成されるのは他の HER ファミリーと同様だが、HER2 の細胞外ドメインはリガンドの結合部位を有さず、HER2 はリガンドとの結合なしに、ホモ二量体、もしくはリガンドの結合した他の HER ファミリーとのヘテロ二量体を形成する¹。機能は他の HER ファミリーと同様で、細胞の分化・増殖・生存・維持に関与し、特に HER2 が他の HER ファミリーとヘテロ二量体を形成した際に強いチロシンキナーゼ活性が発揮され、強い作用を惹起する⁷。

HER2 の発現について、正常組織、および種々の腫瘍細胞での検討がなされている。ヒト成人の正常組織における HER2 の発現の検討では、消化管、呼吸器、生殖器、尿

路上皮、皮膚、乳腺などの上皮細胞の細胞膜上に弱い染色像として認められたものの、乳癌細胞においては発現なしと判定する相当のもので、また、正常組織における *HER2* 遺伝子の増幅は認められなかった⁸。一方、腫瘍細胞においては、*HER2* の過剰発現は、乳癌では 22%、肺腺癌では 28%、肺扁平上皮癌では 11%、結腸直腸癌では 17%、膀胱癌では 13%、胃癌では 11%、前立腺癌では 8%に認められた⁹。なお、*HER2* の過剰発現は多くの腫瘍細胞で認められたが、すべての悪性腫瘍において認められたわけではなく、腎細胞癌、肝細胞癌、胆道癌、悪性黒色腫においては過剰発現を認めなかった⁵。また、悪性腫瘍において *HER2/neu* の遺伝子変異はまれとされる³。

こうして *HER2* は、がん遺伝子としての発見の経緯、増殖因子のシグナルを伝達する機能、および腫瘍細胞での過剰発現などから、一部のがん細胞の発生・維持に関与した特異的なバイオマーカーと推定された³。

(2) 乳癌に対する分子標的療法としての *HER2*

分子生物学の進歩により、がん細胞の発生・増殖に特異的に関与する分子が次第に明らかとなり、1970 年代後半から、これらの特定の分子を選択的に阻害する分子標的薬の研究開発が盛んに行なわれるようになった。1975 年に Kohler と Milstein らにより、免疫したマウスの脾臓中の B 細胞とマウス骨髄腫細胞株の細胞融合を用いたマウスモノクローナル抗体の作成法が報告され¹⁰、特定の抗原に対する特異的な抗体を量産することが可能となると、腫瘍細胞の表面に発現した特定の分子を標的としたモノクローナル抗体を用いた分子標的治療が積極的に検討された。抗体には、マクロファージや Natural Killer 細胞などの免疫細胞を介した抗体依存性細胞間在性細胞障害反応 (antibody-dependent cell mediated cytotoxicity) や補体依存性細胞障害反応 (complement-dependent cytotoxicity)、また、標的抗原に直接作用しリガンドと競合することや、抗原がもつ機能そのものの阻害 (細胞内へのシグナルの遮断) などの効果が期待された¹¹。しかし、マウス抗体はヒトへの反復投与によりヒト抗マウス抗体を高頻度に産生し、重篤なアレルギーを惹起するのみでなく、半減期が短縮し抗腫瘍効果が安定せず¹¹、この時点では実用には至らなかった。次いで、1984 年代にマウスモノクローナル抗体可変領域遺伝子にヒト定常領域遺伝子を遺伝工学的につなぐことによりマウスヒトキメラ抗体が作成され¹²、さらには、可変領域の中でも直接抗原と結合する超可変領域以外の部分 (フレームワーク領域) をすべてヒト由来に置き換えたヒト化モノクローナル抗体の作成が可能となり、これによりマウスモノクローナル抗体の際にみられた抗原性を大幅に低下し、モノクローナル抗体による分子標的療法が急速に発展した¹¹。

正常細胞において発現が少なく、特定の腫瘍細胞において過剰発現が認められる *HER2* は分子標的治療の恰好の標的と考えられ、*HER2* は癌治療の標的分子として早

い時期から検討が進められた。1987年に Salmon らは 103 例中 19 例（18%）の乳癌において *HER2* 遺伝子の過剰発現を認め、またリンパ節転移陽性の乳がん手術例 86 例のうち、*HER2* 遺伝子が 5 コピー以上増幅していた 11 例は、*HER2* 遺伝子発現を認めない 52 例と比較して有意に術後の無再発生存期間、および全生存期間が短いことを報告した¹³。乳癌ではもともとエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体といったホルモン受容体を発現するサブグループが知られており、*HER2* は乳癌の新たなサブグループを形成するバイオマーカー候補として注目された。そして、1989年に *HER2* を過剰発現している乳癌細胞系に対して抗 *HER2* マウスモノクローナル抗体処理を行い細胞増殖が抑制された報告がなされ¹⁴、その後、1992年には特に *HER2* との親和性が高く認められたマウス抗体である 4D5 の超可変領域と、ヒト immunoglobulin (Ig) G1 のフレームワーク領域を組み合わせた抗 *HER2* ヒト化 IgG1 抗体である Trastuzumab が作成された¹⁵。Trastuzumab の臨床試験はすみやかに開始され、第 I 相試験では Trastuzumab に特異的な重篤な有害事象の出現はなく¹⁶、既治療の転移性乳癌を対象とした複数の第 II 相試験において奏効例が認められた¹⁷。続いて行われた第 III 相試験は、根治切除不能の術後再発を来した *HER2* 過剰発現を認める女性乳癌患者の初回治療において、殺細胞性抗癌剤（術後補助化学療法にアントラサイクリン系抗癌剤の使用歴のない症例では、Adriamycin または Epirubicin と Cyclophosphamide の併用、アントラサイクリン系抗癌剤の使用歴がある症例では Paclitaxel）に Trastuzumab 併用あり・なしをランダム化した投与スケジュールで、非盲検で行われた。1995 年 6 月から 1997 年 3 月までに、米国、欧州、豪州から 469 例が登録され、うち 235 例に Trastuzumab 併用化学療法群、234 例に Trastuzumab 非併用化学療法群に割り付けられた。結果は、Trastuzumab 併用化学療法群、非併用群でそれぞれ、無増悪生存期間（主要評価項目）7.4 ヶ月対 4.6 ヶ月（ハザード比 0.51、95%信頼区間 0.41～0.63、*P* 値<0.001）、奏効率 50%対 32%（*P* 値 0.001）、全生存期間 25.1 ヶ月対 20.3 ヶ月（ハザード比 0.80、95%信頼区間 0.64～1.00、*P* 値 0.046）といずれも統計学的に有意に Trastuzumab 併用群で良好な成績が示された¹⁸。この試験の結果を受け Trastuzumab は、1998 年に *HER2* 過剰発現を有する転移性乳癌の治療薬として米国食品医薬品局（Food and Drug Administration）に承認され、本邦においても 2001 年に承認された。その後、初回化学療法のみでなく、二次化学療法、術後補助化学療法、術前補助化学療法の症例を対象とした多数の臨床試験が行われ、転移・再発乳癌においては殺細胞性抗癌剤への Trastuzumab の併用による全生存期間、無増悪生存期間、奏効率の改善が再現性をもって示され¹⁹、術後補助化学療法、術前補助化学療法においては全生存期間、無再発生存期間の改善、遠隔転移の減少が示された²⁰。現在、*HER2* を標的とした分子標的治療薬には、Trastuzumab のほか、*HER2* の細胞外ドメインの第 II ドメインに特異的に結合する IgG1 型のヒト化モノクローナ

ル抗体である Pertuzumab（なお、Trastuzumab は第Ⅳドメインに結合し、Pertuzumab と Trastuzumab が HER2 と結合する部位は異なる）、Trastuzumab に微小管障害作用をもつ殺細胞性抗癌剤の emtasine を結合させた製剤である Trastuzumab-DM1、また、HER2 の細胞内ドメインのチロシンキナーゼ領域に結合する小分子化合物である Lapatinib の 4 剤の分子標的薬が有効性を示し、実臨床において単剤または併用により使用されている²¹。これらの分子標的薬が標準的に使用されるようになったことで、HER2 過剰発現を認める乳癌の予後は飛躍的に向上し、従来乳癌において予後不良の因子であった HER2 の過剰発現は、予後良好の因子となるに至った^{19,20}。

(3) 胃癌における抗 HER2 療法

胃癌における HER2 の過剰発現は、2001 年の Koeppen らの報告では 62 例中 7 例（11%）と決して高いとは言えない頻度であったが、そのうち 5 例（8%）が HER2 の高発現（細胞膜表面上に強く染色されるものが全体の 10%を超えるものとして定義）を示した⁵。この報告で Koeppen らは、胃癌のほか、乳癌をはじめとした 16 種、575 例の腫瘍細胞の HER2 過剰発現を検討しているが、胃癌における HER2 の高発現は、乳癌の 59 例中 7 例（12%）に次いで高い頻度で認められた⁵。また、Yano らは 200 例の胃癌切除標本を検討し、46 例（23%）に HER2 タンパクの過剰発現、54 例（27%）に *HER2* 遺伝子の過剰発現が認められ、これらの一致率は 86.9%と高い割合で一致したと報告している²²。またこの頃、HER2 タンパクを過剰発現する胃癌細胞株に対する Trastuzumab の抗腫瘍効果²³、HER2 を過剰発現するヒト胃癌細胞の異種移植モデルを持ち用いた殺細胞性抗癌剤（Cisplatin および Capecitabine）と Trastuzumab との併用による腫瘍増殖抑制効果の上乗せなどが示され²⁴、胃癌においても HER2 を標的とした治療の臨床開発が進められることとなった。Gravalos らにより HER2 過剰発現を認める根治切除不能進行胃癌・食道胃接合部癌の初回化学療法症例を対象に行われた第Ⅱ相試験では、2002 年 4 月から 2007 年 8 月までに 228 例の胃癌・食道胃接合部癌患者のスクリーニングが行われ、そのうち HER2 の過剰発現を認めた 22 例について Trastuzumab と Cisplatin の併用療法がおこなわれた。本試験は後述の第Ⅲ相試験の開始に伴い症例登録が中止となり、少数例での検討となったが、奏効率 32%、病勢制御率 64%、無増悪生存期間 5.1 ヶ月、全生存期間 12.9 ヶ月と、良好な成績であった²⁵。胃癌に対する Trastuzumab 投与の初の第Ⅲ相試験は、HER2 過剰発現を認める根治切除不能進行胃癌・食道胃接合部癌の初回化学療法症例を対象とし、治療スケジュールは Cisplatin とフッ化ピリミジン系抗癌剤（5-fluorouracil ; 5-FU もしくは Capecitabine のいずれかを担当医が選択）を対照群、同療法に Trastuzumab を併用した試験群として、ランダム化非盲検試験にて行われた。本試験の登録期間は 2005

年 9 月から 2007 年 12 月で、アジア、欧米、中南米、豪州を中心とする 24 か国で国際共同試験として行われ、本邦も参加した。根治切除不能進行胃癌・食道胃接合部癌患者 3807 例のスクリーニングが行われ、評価可能であった 3668 例から 810 例が HER2 陽性と判定され、そのうち 594 例について 298 例が試験群、296 例が対象群に割り付けられた。結果は、試験群、対照群で、全生存期間（主要評価項目）13.8 ヶ月対 11.1 ヶ月（ハザード比 0.74、95%信頼区間 0.60～0.91、*P* 値 0.0046）、無増悪生存期間 6.7 ヶ月対 5.5 ヶ月（ハザード比 0.71、95%信頼区間 0.59～0.85、*P* 値 0.0002）、奏効率 47%対 35%（オッズ比 1.70、95%信頼区間 1.22～2.38、*P* 値 0.00175）と、いずれにおいても試験群が統計学的に有意に良好な結果であった²⁶。この試験の結果から、HER2 過剰発現を認める根治切除不能進行・再発胃癌における標準的な一次治療は、Cisplatin とフッ化ピリミジン系抗癌剤、および Trastuzumab の併用療法となり、米国・欧州では 2010 年、本邦においては 2011 年に胃癌への適応追加がなされた。

このようにして、HER2 は胃癌においても治療選択に関わる重要なバイオマーカーとなり、根治切除不能進行・再発胃癌では、日常臨床において初回治療前に必須の測定項目となった。さらに、胃癌における抗 HER2 療法は、乳癌同様に開発が進められ、現在、Pertuzumab、Trastuzumab-DM1 などの臨床試験も進められている。

(4) HER2 の測定法

腫瘍組織を対象とした HER2 の検査法は、DNA レベルの増幅をみる方法、RNA レベルでの過剰発現をみる方法、そしてタンパクレベルでの過剰発現をみる方法に分類される。それぞれの代表的な検査法として、DNA レベルの増幅には Southern blot 法、in situ hybridization (ISH) 法、polymerase chain reaction (PCR) 法、RNA レベルでの過剰発現には Northern blot 法、Reversed transcription-PCR 法、タンパクレベルでの過剰発現には、Western blot 法、免疫組織化学法 (immunohistochemistry ; IHC) 法、酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 法、Chemiluminescent immunoassay (CLIA) 法などが挙げられる。実臨床においては、これらの検査のうち、乳癌・胃癌の大規模臨床試験において HER2 過剰発現を確認する際に用いられた IHC 法と ISH 法が用いられ、ISH 法には蛍光 in situ hybridization (FISH) 法が頻用されている。

IHC 法は、組織切片を対象に特定分子に対する抗体を用い、抗原抗体反応によって組織上で特定分子の発現や局在を知る方法である。病理検査として一般的に行われている方法であり、ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて実施が可能である。多くの HER2 免疫染色用抗体が商品化され市販されているが、本邦ではダコ HercepTest II（ダコ・ジャパン社）、ベンタナ I-VIEW パスウェーHER2（4B5）（ロシュ・ダイアグノスティックス社）、協和ステイン HER2/neu（M）（バイオジェネックス社、協和

メデックス社)、ヒストファイン HER2 キット (MONO) (ニチレイバイオサイエンス社)、ヒストファイン HER2 キット (POLY) (ニチレイバイオサイエンス社) が体外診断用医薬品として承認されている²⁷。IHC 法による HER2 過剰発現の程度に際しては半定量的な評価が可能で、癌細胞の細胞膜の染色の程度により 0、1+、2+、3+の 4 段階のスコアに分けられ、0 および 1+を陰性、2+を境界域、3+を陽性と判定するが、それぞれのスコアの内訳は乳癌、胃癌でそれぞれ個別の判定基準が用いられる^{26,28,29}。乳癌の IHC 法の判定では、癌細胞の細胞膜の染色なし、あるいは細胞膜の染色がある癌細胞が 10%未満のものをスコア 0、ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色がある癌細胞が 10%以上、もしくは癌細胞は細胞膜のみが部分的に染色されているものをスコア 1+、弱ないし中程度の完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞が 10%以上、もしくは強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞が 10%以上 30%以下のものをスコア 2+、強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞が 30%を超えるものスコア 3+とする (表 1)²⁸。胃癌の IHC 法の判定では、手術材料を用いた際と生検材料を用いた際に異なる定義が用いられ、手術検体における判定では、細胞膜に染色なし、あるいは細胞膜の染色がある癌細胞が 10%未満のものをスコア 0、識別できないほどのかすかな細胞膜の染色がある癌細胞が 1 切片上に 10%以上認められるものをスコア 1+、基底膜または側方の細胞膜の弱ないし中程度の陽性染色がある癌細胞が 1 切片上に 10%以上認められるものをスコア 2+、基底膜または側方の細胞膜の強い陽性染色がある癌細胞が 1 切片上に 10%以上認められるものをスコア 3+とし、生検検体における判定では、細胞膜に染色がある細胞が 5 細胞未満のものをスコア 0、識別できないほどのかすかな細胞膜の染色がある癌細胞が 5 細胞以上認められるものをスコア 1+、弱ないし中程度の陽性染色がある癌細胞が 5 細胞以上認められるものをスコア 2+、強い陽性染色がある癌細胞が 5 細胞以上認められるものをスコア 3+とする (表 2)^{26,29}。

スコア	癌細胞の細胞膜の染色パターン	判定
0	細胞膜の染色なし、あるいは細胞膜の染色がある癌細胞が 10% 未満	陰性
1+	ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色がある癌細胞が 10% 以上、もしくは癌細胞は細胞膜のみが部分的に染色されている	陰性
2+	弱ないし中程度の完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞が 10% 以上、もしくは強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞が 10% 以上 30% 以下	境界域
3+	強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞が 30% を超える	陽性

表 1. 乳癌の IHC 評価基準

スコア	手術材料の染色パターン	生検材料の染色パターン	判定
0	細胞膜に染色なし、あるいは細胞膜の染色がある癌細胞が 10% 未満	細胞膜に染色がある細胞が 5 細胞未満	陰性
1+	識別できないほどのかすかな細胞膜の染色がある癌細胞が 1 切片上に 10% 以上	識別できないほどのかすかな細胞膜の染色がある癌細胞が 5 細胞以上	陰性
2+	基底膜または側方の細胞膜の弱ないし中程度の陽性染色がある癌細胞が 1 切片上に 10% 以上	弱ないし中程度の陽性染色がある癌細胞が 5 細胞以上	境界域
3+	基底膜または側方の細胞膜の強い陽性染色がある癌細胞が 1 切片上に 10% 以上	強い陽性染色がある癌細胞が 5 細胞以上	陽性

表 2. 胃癌の IHC 評価基準

FISH 法は、ホルマリン固定組織切片上で、蛍光標識した特定の DNA プローブを用い癌細胞の間期核において目的とする遺伝子のコピー数を検出することにより、DNA の遺伝子増幅を定量的に判定する方法であり、観察には蛍光顕微鏡を要する。本邦ではパシビジョン HER2 DNA プローブキット（アボット・モレキュラー社、アボット・ジャパン社）が体外診断用医薬品として承認されている。本キットを用いた HER2 の

判定は、ホルマリン固定組織のプレパラート上で、*HER2* 遺伝子の DNA をオレンジ色、17 番染色体のセントロメア DNA (CEP17) を緑色に標識するデュアルカラー FISH 法である³⁰。乳癌においては、20 個の癌細胞での *HER2* (オレンジ)、CEP17 (緑色) の各々の蛍光シグナル数を計数し、癌細胞 20 個の CEP17 シグナル総数に対する *HER2* シグナル総数の比率を算出する。*HER2*/CEP17 比が 2.2 を超えるものを増幅陽性 (FISH 法陽性)、1.8 未満を増幅陰性 (FISH 法陰性)、1.8~2.2 を境界域と定義し、境界域と判定された場合は、さらに 20 個の癌細胞のシグナルを同様にカウントし、再び境界域と判定された場合は、2.0 以上を FISH 法陽性、2.0 未満を FISH 法陰性とする²⁸。胃癌における FISH 法の判定は乳癌に準じて行われるが、*HER2*/CEP17 のシグナル比の解釈については、Bang らの第Ⅲ相試験の際に用いられた、2.0 以上を FISH 法陽性、2.0 未満を FISH 法陰性とする判定基準に従う²⁶。

HER2 過剰発現の判定は、IHC 法と FISH 法を組み合わせ、IHC 法がスコア 0、スコア 1+であったものは、FISH 法の結果に関わらず組織 *HER2* 陰性、スコア 2+であったものは FISH 法で陰性であれば組織 *HER2* 陰性、FISH 法で陽性であれば組織 *HER2* 陽性、スコア 3+であったものは FISH 法の結果に関わらず組織 *HER2* 陽性と判定される²⁸。乳癌においては IHC 法と FISH 法のいずれを先行するかに明確な規定はないが、組織の不均一性が高い胃癌においては、腫瘍の全体像を把握しやすい IHC 法を FISH 法に先行することが推奨されている³¹。

(5) *HER2* 測定における IHC 法、FISH 法の問題点

現行の日常診療において乳癌、胃癌の *HER2* の過剰発現を判定するための検査の golden standard は、IHC 法と FISH 法である。これらはすでに広く普及しているものの、いくつかの問題点を有する。

IHC 法、FISH 法はいずれも検査材料として腫瘍組織を用いることから、生検、もしくは手術といった腫瘍組織の採取が必須となる。この際、化学療法の対象となる進行・再発癌患者の多くは、原発巣切除により予後が改善せず、原発巣切除の適応とはならないことから、組織 *HER2* の診断は主に、生検検体を用いて行われることとなる。通常、乳癌においては体表から腫瘍を直接穿刺する針生検、胃癌においては上部内視鏡検査下の生検が行われることとなるが、これらはいずれも患者の苦痛を伴い、出血のリスクを有する侵襲的なものである。

また、採取した検体はホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切などの複数の処理工程を要し、さらに IHC 法、FISH 法は各抗体、キットごとに異なった試薬および検査手順が要求され、労力は少なくない。IHC 法、FISH 法のいずれにおいても、ホルマリンによる過固定および固定不足、薄切スライドの保存状況不良、誤った試薬の使用などによる偽陰性を生じることが知られており、質の高い精度管理を要する^{28,32}。さ

らに、HER2 の IHC 法、FISH 法は高度な病理診断であり、専門のトレーニングを受けた日本病理学会認定病理専門医が判定する必要がある^{27,28}。そして、IHC 法、FISH 法はいずれも 5~7 日の検査期間を必要とする。ここで、胃癌において HER2 の IHC 法が 2+であった場合、HER2 の判定には FISH 法の追加が必要となり、腫瘍採取から HER2 発現の判定までに約 2 週間を費やすこととなってしまう。

このように、IHC 法、FISH 法による HER2 の測定には多くの労力と時間を要し、より簡便な代替の検査法が望まれる。

(6) 血清における HER2 の測定

HER2 タンパクの基本的な構造は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインから成り、HER2 タンパクの細胞外ドメインの一部は、細胞膜上での酵素的な切断、もしくはメッセンジャーRNA の段階で選択的スプライシングが行われ^{33,34}、血中に遊離することが知られている³⁵。この可溶性のタンパクである遊離した HER2 細胞外ドメイン（血清 HER2）は、それ自体は細胞膜上に存在する HER ファミリーに競合し拮抗的に作用するとの報告があるが³⁴、機能について定まったことはわかっていない。酵素的な血清 HER2 の遊離には、A Disintegrin And Metalloproteases (ADAM) やマトリックスメタロプロテアーゼファミリーなどの酵素が関わりとされ³⁶、血清 HER2 の離断は膜貫通ドメインの 648 番目のアラニン残基の周囲で生じ、分子量 105~110kDa の血清 HER2 が遊離した後の細胞膜上には従来の HER2 の 10~100 倍強いチロシンキナーゼ活性を有する p95^{HER2} が残される。選択的スプライシングに際しては、HER2 の細胞外ドメインをすべて含む、633 個のアミノ酸からなる分子量 100kDa のバリエーションと、細胞外ドメインのうちドメイン I と II のみを含み 340 個のアミノ酸からなる分子量 68kD のバリエーションが知られており、後者は Herstatin と呼ばれる³⁷。

血清 HER2 は ELISA 法または CLIA 法を用いて定量的に測定可能であり^{35,38}、本邦においてはケミルミ Centaur HER2/neu（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社）が血清 HER2 を測定する体外診断用医薬品として承認されている。本法による HER2 の測定原理は、HER2 の細胞外ドメインの異なる部位に特異的に結合する抗 HER2 マウス抗体である TA-1 と NB-3 をアクリジニウムエステル標識、フルオレセイン標識固相化試薬としたサンドイッチ法に基づいた化学発光免疫測定法である。検体中の血清 HER2 がこれらの抗体と反応して免疫複合体を形成し、さらに固相化試薬中の抗フルオレセイン抗体結合磁性粒子と反応した後に、免疫複合体を分離・洗浄し、酸化剤、酸化補助剤を加えると化学発光を生じる。この際、相対発光量と検体中の血清 HER2 の量には正の対応関係にあり、検体中の血清 HER2 は定量的に測定可能となる³⁸。ケミルミ ADIVA Centaur CP 全自動化学発光免疫測定装置では、測定手順はす

べて自動化されており、計測された検査結果は数値として得られる。

血清 HER2 の正常値は、健康成人女性 241 名を対象とした検討において平均値+2 標準偏差が 14.78ng/mL であった報告から、米国食品医薬品局では上限値を 15ng/mL と設定している³⁹。また、血清 HER2 は早期乳癌の 9～22.9%、進行乳癌の 22～73% に増加が認められ⁴⁰、乳癌における組織 HER2 タンパク発現に対する血清 HER2 の感度は 47～90%、特異度は 55～95%と報告されている⁴¹⁻⁴⁵。また、乳癌においては治療開始前の血清 HER2 は予後不良と関連し⁴⁶、予後因子として有用であったとする報告、化学療法開始後の血清 HER2 の低下と奏効率良好との関連¹⁸、無増悪生存期間延長との関連⁴⁷、また、血清 HER2 は Trastuzumab を含む化学療法の画像的増悪に先駆けて増加し、ルーチンの血清 HER2 測定が有用であったとする報告などがある⁴⁰。一方で、血清 HER2 による治療効果判定、治療効果予測は困難で、測定の意義は乏しいとする報告もある⁴⁸。これらのように HER2 過剰発現を認める乳癌における血清 HER2 の測定は、診断マーカーのほか、予後因子、治療効果予測因子、治療効果判定とモニタリングについて検討されており、いずれについてもまだ *controversial* な報告を含むものの、日常臨床において測定が行われ始めている。一方、胃癌においては血清 HER2 発現の頻度、組織 HER2 との相関についてのまとまった報告はなされていない。

(7) 胃癌における血清の HER2 の測定意義

胃癌は、乳癌と比べ腫瘍組織内の不均一性が高いことが知られている。胃癌の不均一性は、同一病変内に複数の組織型が混在することのみでなく、HER2 の IHC 法においても、FISH 法においても認められる⁴⁹。そのため、HER2 の IHC スコアの判定に際しても、乳癌で 3+と判定されるためには強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞が 30%を超える必要があるのに対し、胃癌の 3+の判定は、強い陽性染色が手術検体では 10%以上、生検検体では 5 細胞以上と定義された。また、IHC スコア 2+以上の乳癌においては HER2 の陽性染色像は全周に認められる必要があるが、胃癌では陽性染色が全周性に認められることは少なく、基底側と側方もしくは側方のみに認められたものを 2+以上と判定できる³¹。乳癌と胃癌の腫瘍組織内の不均一性、HER2 の染色性の差異について、腫瘍のなりたちや性質の違いが推定され、特に染色性については、胃癌における HER2 陽性例には分化型腺癌が多く、その管腔形成の性質を残したものだとの推定がなされているが、この原因についての明確な報告はない⁴⁹。

胃癌においては不均一性を考慮した HER2 の判定基準が定められてはいるものの、日常臨床における腫瘍組織の HER2 の過剰発現の確認は、1 枚の組織スライドでなされるため、当該のスライドが腫瘍全体の HER2 の状態を表さず、サンプリングエラーによる偽陰性を生じる可能性は乳癌よりも高く推定される。血清マーカーは均一な材料による客観的な検査であり、また、短時間で簡便に測定することが可能であるため、

胃癌において組織によらず血清 **HER2**にて **HER2** 陽性胃癌というサブグループの診断が可能となれば、乳癌において以上に有用となりうる。

以上から、胃癌における血清 **HER2** と組織 **HER2** の過剰発現の関連を研究することの臨床的な意義は大きいと考え、胃癌における組織 **HER2** と血清 **HER** の関連について、遡及的な検討を行うこととした。検討方法は、根治切除不能進行・再発胃癌症例について、保存腫瘍組織を材料として、**IHC** 法および **FISH** 法による組織 **HER2** 発現の確認し、また、それと独立して、保存血清を材料として、**CLIA** 法による血清 **HER2** の測定を行い、まず、胃癌における血清 **HER2** 上昇の頻度、分布を確認し、次いで組織 **HER2** 発現と血清 **HER2** の関連について、血清 **HER2** の診断マーカーの意義を検討することとした。また、血清 **HER2** が高値となるような胃癌患者の背景因子を探索した。対象の選択に際しては、臨床的に **Trastuzumab** 投与の適否を検討すべき対象での血清 **HER2** の診断的意義が最も重要と考え、根治切除不能の進行・再発胃癌とした。

略語表

AUC	area under the curve
CLIA	chemiluminescence immunoassay
DNA	deoxyribonucleic acid
ECOG	Eastern cooperative oncology group
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FISH	fluorescent in situ hybridization
HER	human epidermal growth factor receptor
Ig	immunoglobulin
IHC	immunohistochemistry
ISH	in situ hybridization
JAK	Janus kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
PCR	polymerase chain reaction
PS	performance status
RAS	rat sarcoma viral oncogene homolog
RNA	ribonucleic acid
ROC	Receiver Operating Characteristic

研究方法

1. 対象

本研究では、組織学的に腺癌と診断され、2007年9月から2011年1月までに国立がん研究センター東病院において胃癌の化学療法を開始された切除不能または再発胃癌で、化学療法開始時に活動性の重複癌がなく、化学療法前に採取された癌組織生検検体もしくは手術切除癌組織のパラフィン包埋病理標本、および血清検体が保管されている症例を対象とした。

2. 組織検体と IHC 法、FISH 法の測定

腫瘍組織は、化学療法開始前に採取され、採取後に 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋固定されたものを使用した。採取方法は、腫瘍の外科的切除、もしくは上部消化管内視鏡による腫瘍からの生検とした。外科的切除検体と生検検体のいずれもが入手可能であった症例では、手術検体を用いた。パラフィン包埋された腫瘍組織から 4 μ m の薄切切片を作成してスライドにマウントし、組織 HER2 発現の確認のため IHC 法、FISH 法を行った。

IHC 法は、ロシュ・ダイアグノスティックス社（東京都港区）のベンタナ I-VIEW パスウェーHER2（4B5）キット（抗ヒト HER2 ウサギ抗体）を用い、スライドの染色は株式会社エスアールエル（東京）に委託して行った。IHC スコアの判定は、胃癌における HER2 の IHC 判定法に準拠し、スコア 0、1+、2+、3+に分類した^{26,29}。IHC のスコア判定の基準は手術検体と生検検体で個別に定義され、手術検体における判定では、スコア 0 は細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞が 10%未満のもの、スコア 1+は識別できないほどのかすかな細胞膜の染色がある癌細胞が 1 切片上に 10%以上認められるもの、スコア 2+は基底膜または側方の細胞膜の弱いし中程度の陽性染色がある癌細胞が 1 切片上に 10%以上認められるもの、スコア 3+は基底膜または側方の細胞膜の強い陽性染色がある癌細胞が 1 切片上に 10%以上認められるものとした。生検検体における判定では、5 個以上の細胞集塊で認められた陽性染色像の強度により、手術検体の判定基準と同様のスコア付けを行った。IHC のスコアの検査結果は、株式会社エスアールエルの病理医が判定したスコアの数値として報告され、また、IHC 法による染色を行ったスライドの返却を受け、国立がん研究センター東病院の病理医が確認した。

FISH 法は、ブイシス社（Downers Grove, IL, USA）のパスビジョン HER2 DNA プローブキットを用い、スライドの染色と結果の判定は株式会社エスアールエルに委託して行った。エスアールエル社からの結果は、HER2 の DNA シグナルと 17 番染色体

のセントロメア DNA のシグナルの比 (HER2/CEP17) の数値として報告され、HER2/CEP17 が 2.0 以上となったものを HER2 遺伝子増幅あり、すなわち FISH 陽性と判定した。

組織 HER2 発現は、IHC 法と FISH 法を組み合わせ、IHC 法がスコア 0、スコア 1+であったものは、FISH 法の結果に関わらず組織 HER2 陰性、スコア 2+であったものは FISH 法で陰性であれば組織 HER2 陰性、FISH 法で陽性であれば組織 HER2 陽性、スコア 3+であったものは FISH 法の結果に関わらず組織 HER2 陽性と判定した。

3. 血清検体と、血清 HER2 の測定

採取後に -80°C で凍結保存された血清検体を使用し、血清 HER2 の測定を行った。血清 HER2 は、国立がん研究センター東病院にて凍結保存された検体を匿名化のうえシーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社（東京都品川区）に輸送し、検査試薬にケミルミ Centaur HER2/neu キットを使用し、ケミルミ ADIVA Centaur CP 全自動化学発光免疫測定装置を用いて測定した。ケミルミ ADIVA Centaur CP 全自動化学発光免疫測定装置では、測定手順はすべて自動化されており、計測された検査結果は数値として得られた。

4. 統計学的解析

組織 HER2 の発現を標準とした際の血清 HER2 の感度、特異度、一致率、陽性的中率、陰性的中率を評価した。本研究では、血清 HER2 のカットオフ値には、米国食品医薬品局における上限値である 15ng/mL ³⁹を用いた。

乳癌における組織 HER2 に対する血清 HER2 の感度は 47~90%、特異度は 50~95%と報告されており、HER2 陽性胃癌のサブグループ診断のためのマーカーの有用性として、血清 HER2 の組織 HER2 に対する一致率 90%かつ感度 90%を期待し、また、感度が 70%を下回った場合には診断マーカーとして有用でないと判定することとした。組織 HER2 陽性率を 20%とした際に、一致率 90%かつ感度 90%の場合の血清 HER2 陽性率は 26%、一致率 90%かつ感度 70%の場合の血清 HER2 陽性率は 18%となる。血清 HER2 の期待陽性率を 26%、閾値陽性率を 18%と設定し、 α エラーを 0.2、検出力を 70%とした際、87 例の登録が必要となる。若干の測定不能例を想定し、本検討では 90 例を目標症例数とした。

血清 HER2 と組織 HER2 の関連の検討では、連続値、順位を含む 2 変量の相関についてはケンドールの順位相関係数を、2 群の比較についてはウィルコクソンの符号順位検定を用いて検定し、 P 値が 0.05 未満となるものを統計学的に有意とした。

背景因子の比較に際しては、単変量解析には Fisher の正確検定、多変量解析にはロジスティック回帰分析を用いた。ロジスティック回帰分析は、単変量比較にて P 値が

0.20 以下となった項目について強制投入法により行い、 P 値が 0.05 未満となるものを統計学的に有意と判断した。

なお、統計解析にはウインドウズ版 IBM SPSS statistics version 21 (日本 IBM 社、東京) を用いた。

5. 倫理的事項

本研究は院内に保管されている試料を用いた遡及的な検討であり、「疫学研究に関する倫理指針」を遵守した上で、国立がん研究センター東病院の倫理審査委員会の承認を受け行った。

研究結果

1. 患者背景

国立がん研究センター東病院において、2007年9月から2011年1月までに胃癌の化学療法を開始した症例は169例おり、そのうち根治切除後の補助化学療法として化学療法を開始された3例、食道腺癌と判定された2例、内分泌癌と判定された2例、他院での前治療歴があった7例、重複癌を有した5例、癌組織が保管されていなかった16例、血清検体が保存されていなかった34例を除外した100例が適格となった。

全適格例の背景について表3に示す。男性が66例、女性が34例で、年齢の中央値は66歳（範囲：29-85歳）であった。Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status（ECOG-PS：判定は、0は無症状で社会活動ができ、制限を受けることなく発病前と同等にふるまえるもの、1は軽度の症状があり肉体労働は制限を受けるが、歩行、軽労働や座業はできるもの、2は歩行や身の回りのことはでき、軽労作はできないが日中の50%は起居しているもの、3は身の回りのことはある程度できるが、しばしば介助が要り、日中の50%は就床しているもの、4は身の回りのこともできずに、常に介助が要り、終日就床を必要とするものと定義され、0から4までの5段階で評価される）は0が60例、1が35例、2が5例で、3以上の症例は含まれず、全身状態良好な例が多く含まれた。切除不能進行例が96例であったのに対し、再発例は4例と、対象患者には切除不能進行例が多く含まれた。原発巣の部位は、U領域が39例、M領域が36例、L領域が25例であった。転移臓器は、リンパ節が83例、肝が38例、肺が12例、腹膜が50例、骨が3例で、転移臓器数は0が2例、1臓器が42例、2臓器が21例で、3臓器以上の転移は35例に認められた。病理学的分類には、胃癌取扱い規約第10版⁵¹による分類を使用した。乳頭状腺癌が2例、高分化腺癌が14例、中分化腺癌が36例、低分化腺癌が40例、印鑑細胞癌が7例、粘液腺癌が1例であった。また、組織HER2を検査するために使用した腫瘍検体は、生検検体が87例で、手術検体は13例と、生検検体が多数であった。

症例数	100
性別	
男性／女性	66／34
年齢（歳）	
中央値（範囲）	66（29-85）
ECOG* performance status	
0／1／2	60／35／5
進展形式	
切除不能進行／再発	96／4
原発巣の部位	
U 領域／M 領域／L 領域	39／36／25
転移臓器	
リンパ節	83
肝	38
肺	12
腹膜	50
骨	3
転移臓器数	
0／1／2／3 以上	2／42／21／35
病理学的分類（胃癌取り扱い規約第 10 版）	
乳頭状腺癌	2
高分化腺癌	14
中分化腺癌	36
低分化腺癌	40
印鑑細胞癌	7
粘液腺癌	1
腫瘍検体	
生検検体／手術検体	87／13

* ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

表 3. 患者背景

適格となった 100 例の患者背景を示す。

2. 血清 HER2 の検査結果

血清 HER2 は全例で測定可能であった。全症例における血清 HER2 の分布を図 1 に示す。胃癌において、血清 HER2 が高値となる症例が確認された。血清 HER2 は、中央値 9.3 ng/mL、範囲 5.0~332.4 ng/mL であった。血清 HER2 が 15ng/mL を超えたものは 16 例であった。

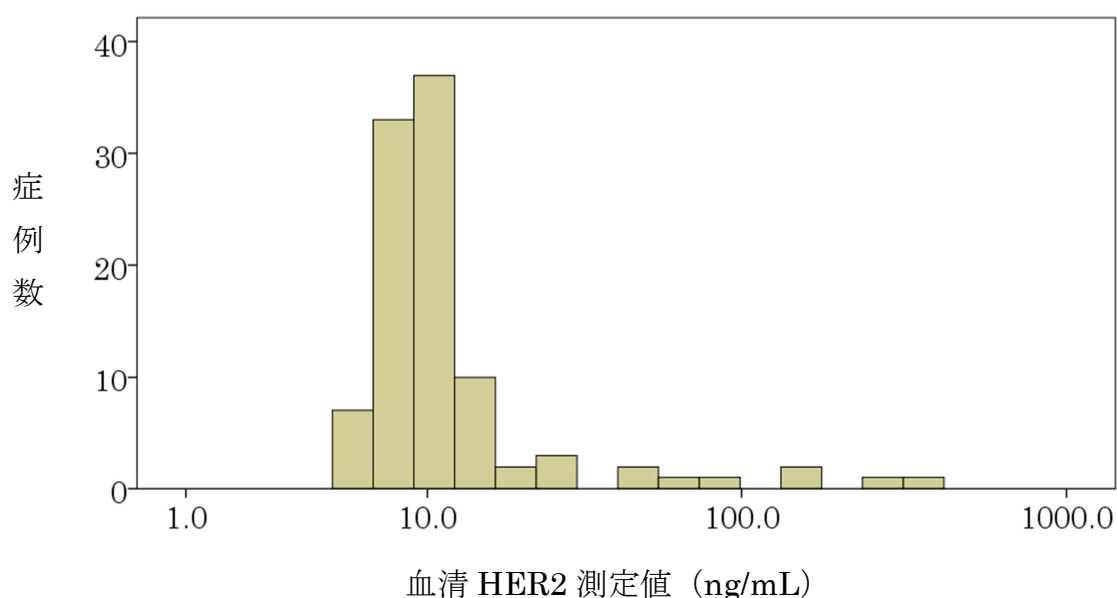
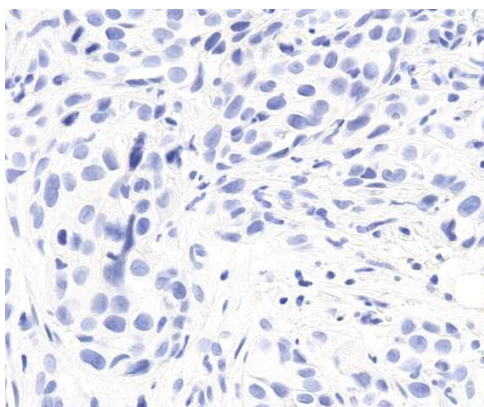


図 1. 全症例における血清 HER2 の分布

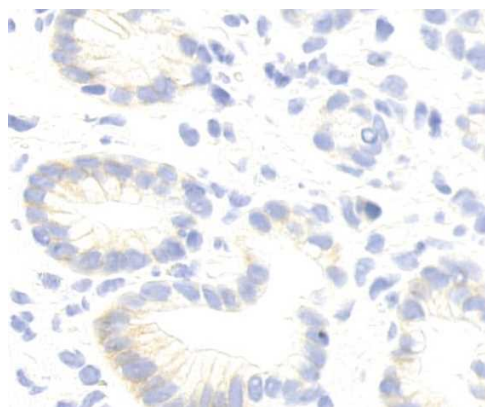
症例数を縦軸、血清 HER2 の測定値 (ng/mL) の対数値を横軸にとり、ヒストグラムを作成した。血清 HER2 は、中央値 9.3 ng/mL、範囲 5.0 ~332.4 ng/mL で、15ng/mL を超えたものは 16 例であった。

3. IHC 法、FISH 法の検査結果

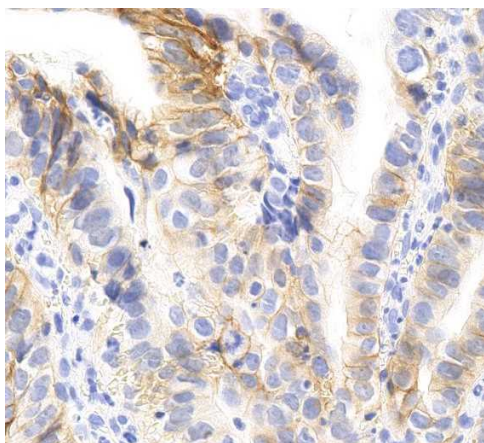
得られた腫瘍検体は全例で IHC 法、FISH 法による測定が可能であった。IHC 法の判定例を図 2 に示す。IHC の評価は、スコア 0 が 41 例、スコア 1+ が 32 例、スコア 2+ が 6 例、スコア 3+ が 21 例であった。



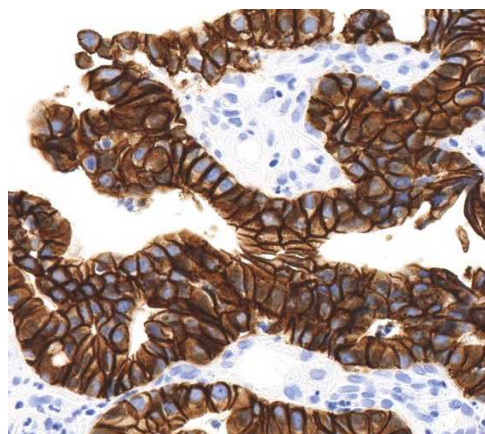
IHC スコア 0



IHC スコア 1+



IHC スコア 2+



IHC スコア 3+

図 2. HER2 IHC スコアの判定例

胃癌組織の IHC 法は、ロシュ・ダイアグノスティックス社（東京都港区）のベンタナ I-VIEW パスウェーHER2（4B5）キットを用い、判定は、胃癌における HER2 の IHC 判定法に準拠した²⁹。評価は、スコア 0 が 41 例、スコア 1+ が 32 例、スコア 2+ が 6 例、スコア 3+ が 21 例であった。

FISH 法の測定結果を図 3 に示す。結果は、HER2/CEP17 比の数値で得られ、中央値は 1.1、範囲は 0.5～8.6 であった。HER2/CEP17 が 2.0 以上の 28 例を FISH 法陽性、2.0 未満の 72 例を FISH 法陰性と判定した。

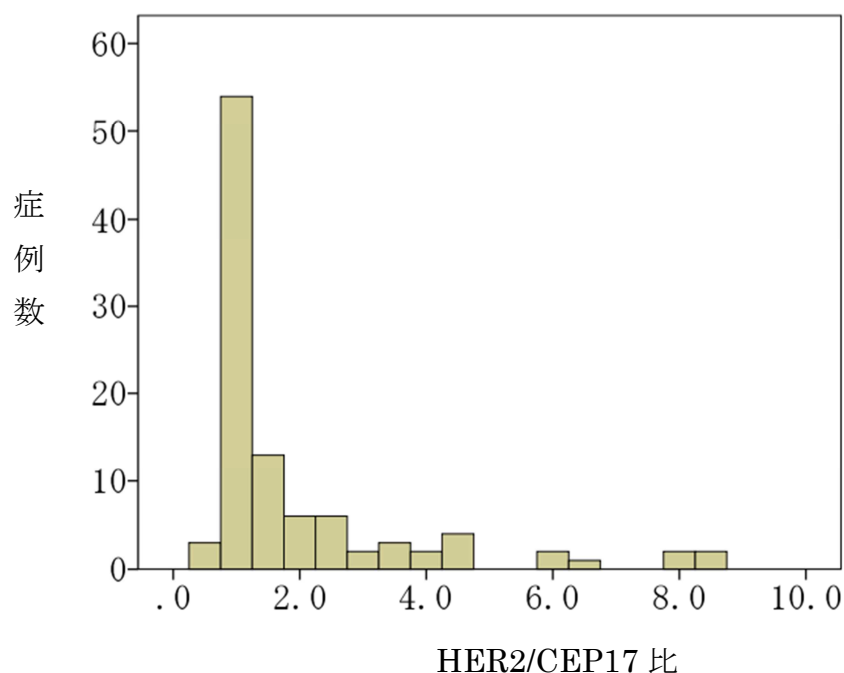


図 3. FISH 法の測定結果

胃癌組織の FISH 法は、ブイシス社（Downers Grove, IL, USA）のパスビジョン HER2 DNA プローブキットを用い、HER2/CEP17 が 2.0 以上となったものを陽性と判定した。症例数を縦軸、HER/CEP17 比を横軸にとり、ヒストグラムを作成した。HER2/CEP17 の中央値は 1.1、範囲は 0.5～8.6 で、HER2/CEP17 が 2.0 以上の 28 例を陽性、2.0 未満の 72 例を陰性と判定した。

IHC 法と FISH 法の間係を表 4 に示す。IHC でスコア 2+であった 6 例はいずれも FISH 陰性であった。また、IHC でスコア 3+であった 21 例はいずれも FISH 陽性であった。組織 HER2 陽性例（IHC のスコア 3+、または、IHC のスコア 2+かつ FISH 陽性）は、21 例に認められた。

	IHC 0	IHC 1+	IHC 2+	IHC 3+	合計
FISH 陽性	2	5	0	21	28
FISH 陰性	39	27	6	0	72
合計	41	32	6	21	100

表 4. IHC 法、FISH 法の結果

4. 組織 HER2 と血清 HER2 の関係

IHC のスコア別の血清 HER2 の散布図を図 4 に示す。各 IHC スコアにおける血清 HER2 の平均値と標準誤差は、スコア 0 の 41 例では $9.1 \pm 0.4 \text{ ng/mL}$ 、スコア 1+ の 32 例では $10.1 \pm 0.6 \text{ ng/mL}$ 、スコア 2+ の 6 例では $10.5 \pm 1.5 \text{ ng/mL}$ 、スコア 3+ の 21 例では $22.8 \pm 19.8 \text{ ng/mL}$ であった。血清 HER2 が高値となる症例は、IHC スコア 3+ に多く認められ、 τ 値=0.380 (ケンドールの順位相関係数)、 P 値<0.001 の弱いある程度の正の相関が認められた。

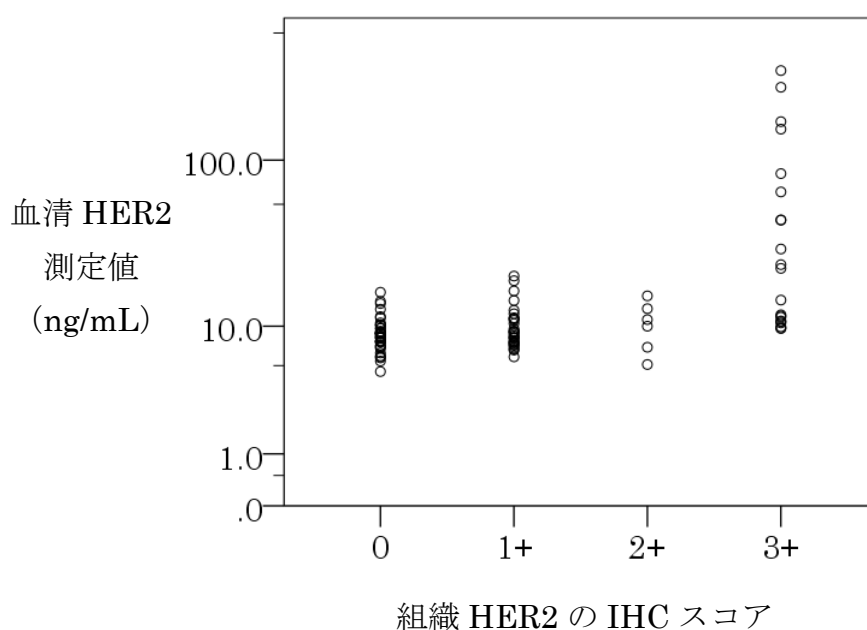


図 4. HER2 の IHC スコア別の血清 HER2 の分布

血清 HER2 測定値 (ng/mL) の対数値を縦軸、組織 HER2 の IHC スコアを横軸にとった散布図を示す。各 IHC スコアにおける血清 HER2 の平均値と標準誤差は、スコア 0 の 41 例では $9.1 \pm 0.4 \text{ ng/mL}$ 、スコア 1+ の 32 例では $10.1 \pm 0.6 \text{ ng/mL}$ 、スコア 2+ の 6 例では $10.5 \pm 1.5 \text{ ng/mL}$ 、スコア 3+ の 21 例では $22.8 \pm 19.8 \text{ ng/mL}$ であった。

FISH の実測値を横軸とした血清 HER2 の散布図を図 5 に示す。血清 HER2 と FISH 実測値には τ 値=0.295 (ケンドールの順位相関係数)、 P 値<0.001 と、弱い正の相関が認められた。血清 HER2 は、FISH 法よりも IHC 法においてやや強い相関を示した。

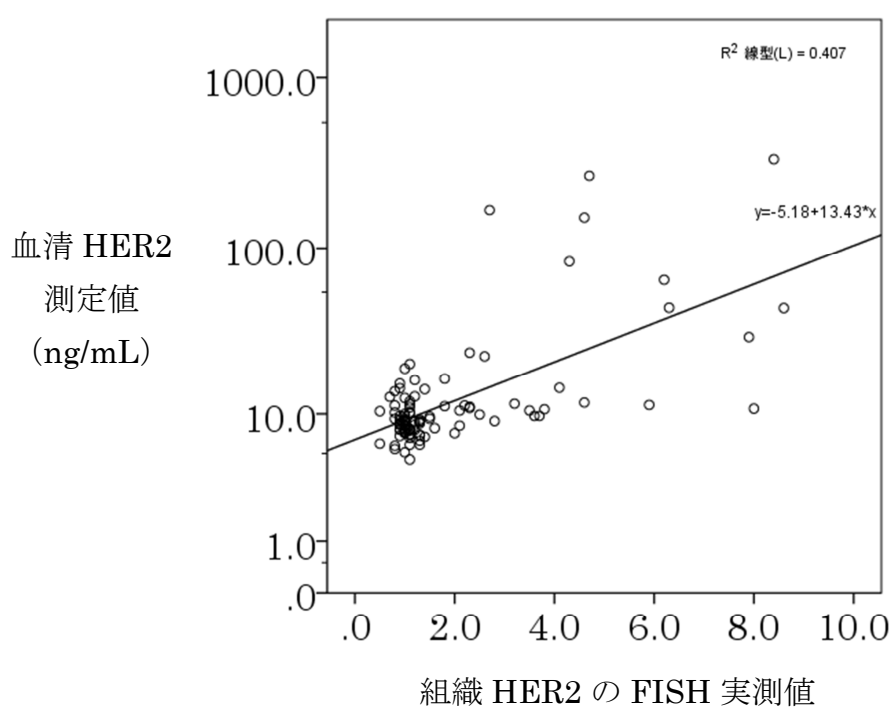


図 5. HER2 の FISH 実測値と血清 HER2 の分布
血清 HER2 測定値 (ng/mL) の対数値を縦軸、組織 HER2 の FISH 実測値 (HER2/CEP17 比) を横軸にとった散布図を示す。血清 HER2 と FISH 実測値には τ 値=0.295 (ケンドールの順位相関係数)、 P 値<0.001 と、弱い正の相関が認められた。

組織 HER2 陰性・陽性別の血清 HER2 の散布図を図 6 に示す。組織 HER2 陰性の 79 例における血清 HER2 の平均値と標準誤差は $9.6 \pm 0.3 \text{ ng/mL}$ 、組織 HER2 陽性の 21 例では $63.9 \pm 19.8 \text{ ng/mL}$ であった。また、組織 HER2 陽性例と陰性例の間で、血清 HER2 の分布について統計学的に有意な差が認められた (P 値 < 0.001 、ウィルコクソンの符号付順位検定)。

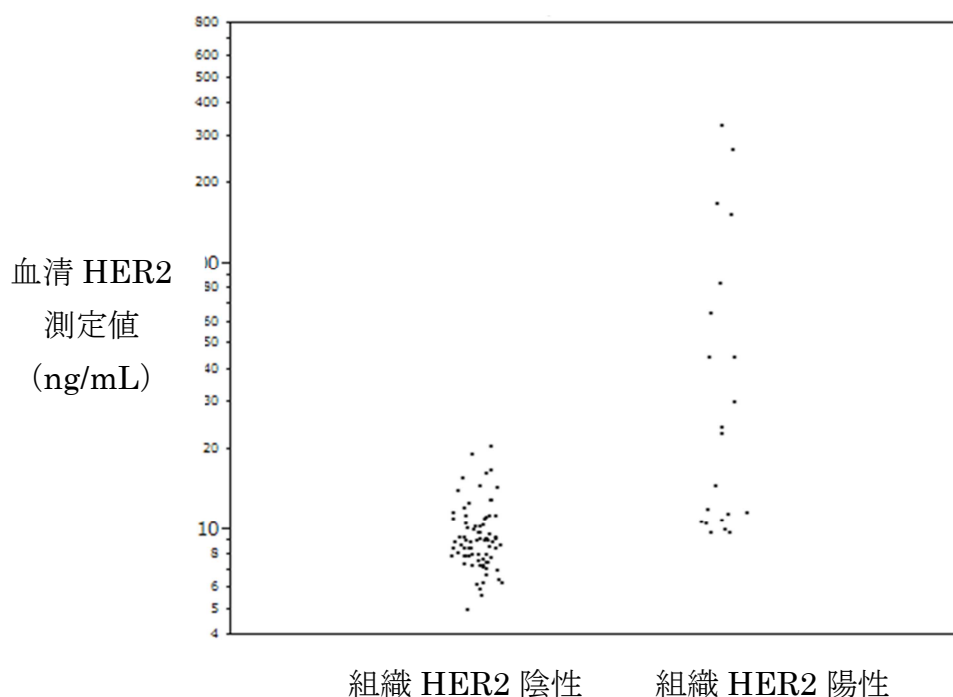


図 6. 組織 HER2 別の血清 HER2 の分布

血清 HER2 測定値 (ng/mL) の対数値を縦軸、組織 HER2 の陰性、陽性を横軸とした散布図を示す。組織 HER2 陰性の 79 例における血清 HER2 の平均値と標準誤差は $9.6 \pm 0.3 \text{ ng/mL}$ 、組織 HER2 陽性の 21 例では $63.9 \pm 19.8 \text{ ng/mL}$ であった。組織 HER2 陽性例と陰性例の間で、血清 HER2 の分布について統計学的に有意な差が認められた (P 値 < 0.001 、ウィルコクソンの符号付順位検定)。

5. 血清 HER2（カットオフ値 15 ng/mL）と組織 HER2 との関係

血清 HER2 のカットオフ値を 15 ng/mL とした際の組織 HER2 との関係を表 5 に示す。組織 HER2 を基準とした、血清 HER2 の感度は 52.4%、特異度は 93.7%、陽性的中率は 68.8%、陰性的中率は 88.1%で、一致は 85.0%であった。

	組織 HER2 陽性	組織 HER2 陰性	合計
血清 HER2 $\geq$ 15ng/mL	11	5	16
血清 HER2 < 15ng/mL	10	74	84
合計	21	79	100

表 5. 血清 HER2 のカットオフ値を 15 ng/mL とした際の組織 HER2 との関係

6. Receiver Operating Characteristic（ROC）解析

組織 HER2 に対する血清 HER2 の Receiver Operating Characteristic（ROC）曲線を図 7 に示す。血清 HER2 のカットオフ値を 21ng/mL とした際には、感度 52.4%、特異度 100%となった。ROC 曲線の曲線下面積（area under the curve ; AUC）は 0.894（95%信頼区間 0.827～0.960）であった。

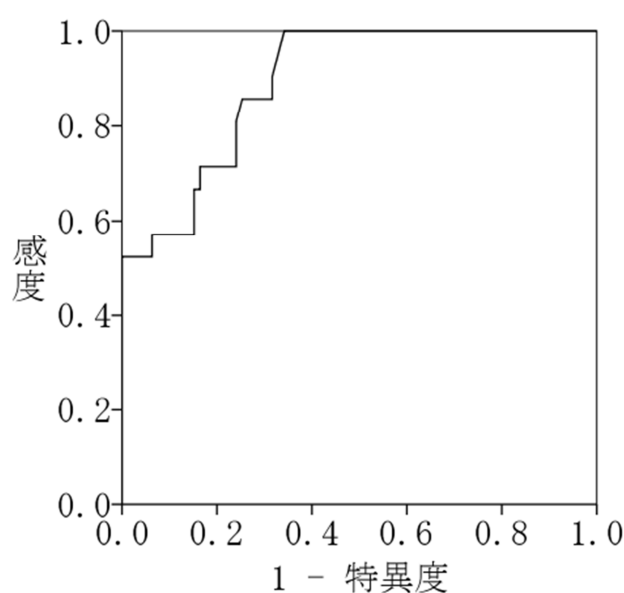


図 7. 組織 HER2 に対する血清 HER2 の ROC 曲線

組織 HER2 に対する血清 HER2 の感度を縦軸に、1 - 特異度を横軸にして作成した Receiver Operating Characteristic（ROC）曲線を示す。

ROC 曲線の曲線下面積（area under the curve ; AUC）は 0.894

（95%信頼区間 0.827～0.960）であった。

7. 血清 HER2 と背景因子の関連

血清 HER2 が 15ng/mL 未満の症例群、15ng/mL 以上の症例群に分け、背景因子を比較した。表 5 に結果を示す。血清 HER2 が 15ng/mL 未満の症例群、15ng/mL 以上の症例群の間で、性別、年齢、ECOG-PS、進展様式、胃内における原発巣の部位、転移臓器数、ならびに病理学的分類については、統計学的に有意な差を認めなかった。転移臓器について、血清 HER2 が 15ng/mL 以上となる症例群でリンパ節転移、肝転移を有する症例が多く認めたが、ロジスティック回帰モデルを用いて交絡因子を調整した結果、肝転移のみが有意であった (P 値=0.022)。

	血清 HER2 15ng/mL 未満	血清 HER2 15ng/mL 以上	P 値* (単変量)	P 値** (多変量)
症例数	84	16		
性別				
男性／女性	55／29	11／5	1.000	
年齢				
65 歳未満／65 歳以上	37／47	9／7	0.420	
ECOG performance status				
0／1 および 2	50／34	10／6	1.000	
進展形式				
切除不能進行／再発	81／3	15／1	0.508	
原発巣の部位				
U 領域／M および L 領域	34／50	5／11	0.583	
転移臓器				
リンパ節	67	16	0.066	0.174
肝	26	12	0.001	<u>0.022</u>
肺	9	3	0.402	
腹膜	45	5	0.171	0.520
骨	3	0	1.000	
転移臓器数				
0-1／2 以上	40／44	4／12	0.108	0.325
病理学的分類				
分化型腺癌／未分化型腺癌	39／45	11／5	0.171	0.834

* Fisher の正確検定、**ロジスティック回帰分析

表 5. 血清 HER2 別 (15ng/mL 未満、15ng/mL 以上) の背景因子
また、組織 HER2 陽性の 21 例についての血清 HER2 別の背景因子の比較を表 6 に、

組織 HER2 陰性の 79 例についての血清 HER2 別の背景因子の比較を表 7 に示す。いずれの比較においても、血清 HER2 が 15ng/mL 以上の症例が少なく、単変量解析での *P* 値が十分小さくなる因子に乏しかったため、多変量解析は施行しなかった。組織 HER2 陽性例においてのみでなく、組織 HER2 陰性例においても、血清 HER2 が 15ng/mL 以上の群では肝転移を有する症例が多い傾向にあった。

	血清 HER2 15ng/mL 未満	血清 HER2 15ng/mL 以上	<i>P</i> 値* (単変量)
症例数	10	11	
性別			
男性／女性	10／0	9／2	0.476
年齢			
65 歳未満／65 歳以上	5／5	6／5	1.000
ECOG performance status			
0／1 および 2	7／3	3／5	0.659
進展形式			
切除不能進行／再発	9／1	10／1	1.000
原発巣の部位			
U 領域／M および L 領域	4／6	3／8	0.659
転移臓器			
リンパ節	10	11	-
肝	3	8	0.086
肺	3	2	0.635
腹膜	5	4	0.670
骨	0	0	-
転移臓器数			
0-1／2 以上	4／6	3／8	0.659
病理学的分類			
分化型腺癌／未分化型腺癌	8／2	8／3	1.000
腫瘍検体			
生検検体／手術検体	8／2	10／1	0.586

* Fisher の正確検定

表 6. 組織 HER2 陽性例における血清 HER2 別の背景因子

	血清 HER2 15ng/mL 未満	血清 HER2 15ng/mL 以上	P 値* (単変量)
症例数	74	5	
性別			
男性／女性	45／29	2／3	0.390
年齢			
65 歳未満／65 歳以上	32／42	3／2	0.650
ECOG performance status			
0／1 および 2	43／31	4／1	0.643
進展形式			
切除不能進行／再発	72／2	5／0	1.000
原発巣の部位			
U 領域／M および L 領域	30／44	2／3	1.000
転移臓器			
リンパ節	57	5	0.579
肝	23	4	0.044
肺	6	1	0.379
腹膜	40	1	1.000
骨	3	0	1.000
転移臓器数			
0-1／2 以上	36／38	1／4	0.364
病理学的分類			
分化型腺癌／未分化型腺癌	31／43	3／2	0.647
腫瘍検体			
生検検体／手術検体	64／10	5／0	1.000

* Fisher の正確検定

表 7. 組織 HER2 陰性例における血清 HER2 別の背景因子

考 察

本研究では、化学療法の対象となる根治切除不能の進行・再発胃癌において、血清 HER2 の分布と組織 HER2 の過剰発現の関連について検討を行った。本研究に適格となった 100 例について、血清 HER2 の測定は全例において可能で、血清 HER2 の中央値は 9.3 ng/mL、範囲 5.0～332.4 ng/mL であった。正常上限である 15ng/mL を超えたものは 16 例 (16%) で、胃癌において血清 HER2 高値となる症例が確認された。

また、組織 HER2 陽性例と陰性例の間で、血清 HER2 の分布には統計学的に有意な差を認め (P 値<0.001、ウィルコクソンの符号順位検定)、組織 HER2 陽性例では血清 HER2 はより高値で分布すること判明した。組織 HER2 との関連のうち、IHC スコア、FISH の実測値のいずれとも正の相関を示したが (ケンドールの順位相関係数が前者において τ 値=0.380、後者において τ 値=0.295)、IHC 法でやや強い相関を認めた。収集しえた文献のうち、乳癌において血清 HER2 と IHC 法、FISH 法との相関を直接比較した報告は認められなかったが、Leary らの review では、転移性乳癌における血清 HER2 の IHC 法に対する感度が 40～72%、特異度が 56～83%であったのに対し、FISH 法では感度が 55～90%、特異度が 50～100%と⁵¹、FISH 法がより強い相関を示唆する結果であった。乳癌と胃癌においては、血清 HER2 の出現機序が異なる可能性も考慮される。

続いて、血清 HER2 のカットオフ値を 15 ng/mL とした際の、組織 HER2 を基準とした血清 HER2 の診断性能を検討したが、感度は 52.4%、特異度は 93.7%、陽性的中率は 68.8%、陰性的中率は 88.1%で、一致は 85.0%であった。高い特異性を示す一方で、感度は低く、本検討で設定した 70%という HER2 の過剰発現に対する診断マーカーとしての閾値感度を下回り、血清 HER2 検査は、IHC 法、FISH 法を用いた組織検査の代用とはならないと考えられた。均一な材料である採血検体を用いて HER2 の検査を行うことで、不均一な材料である腫瘍組織を用いた HER2 検査よりも偽陰性が減ることを期待して開始した研究であったが、組織 HER2 陽性例の約半数では血清 HER2 の上昇が認められない結果となった。一方で、本検討では血清 HER2 は胃癌に対し高い特異度を示し、特に、カットオフ値を 21ng/mL に設定した場合、感度を低下させずに特異度を 100%とすることが可能であった。組織が入手不能である場合や、組織 HER2 検査の偽陰性を疑う際の診断補助としての有用性は検討されてもよいものと考えられる。特に、胃癌の生検検体は上部消化管内視鏡検査で採取される少量の材料を用いて行われるものであり、HER2 検査の偽陰性を生じる危険性が指摘されている¹¹。矢野らは胃癌の手術検体と生検検体を用いて HER2 の一致率を検討し、89%において HER2 の結果が一致した報告をしており、この報告から胃癌の HER2 検査に際

しては手術検体と生検検体のいずれでも同等であるとみなされるようになったが、この検討では一方で、手術検体で **HER2** 陽性と判定された 46 例のうち 13 例が生検では **HER2** 陰性であったと報告している²²。このような **HER2** 陽性胃癌の見落としを減らすためにも、今後も血清マーカーによる **HER2** 診断の探索は必要である。

診断マーカー以外の腫瘍マーカーとして、予後因子、治療効果予測因子、治療効果判定、モニタリングなどを含め、乳癌においてはすでに有用性の報告が多数行われている⁴¹。胃癌についても血清 **HER2** が高値となる症例が認められたことは、胃癌において血清 **HER2** を用いた腫瘍マーカーの有用性の検討を行う根拠となるものと考ええる。

次に、血清 **HER2** 上昇の有無別に、探索的な背景因子の比較を行った。ロジスティック回帰を用いた多変量解析にて交絡因子を調整した結果、血清 **HER2** が 15ng/mL 以上の症例には肝転移が、統計学的な有意差をもって多く認められた。なお、**HER2** 発現と胃癌の背景因子の報告では、分化型腺癌において有意に組織 **HER2** 陽性率が高いとする報告があるが²⁶、本研究では分化型腺癌は組織 **HER2**、血清 **HER2** のいずれにおいても差を生じる因子とはならなかった。肝転移についてさらに検討するため、組織 **HER2** 陽性と陰性に分けて、血清 **HER2** 別の背景因子を検討したところ、組織 **HER2** 陰性群においても血清 **HER2** が 15ng/mL となる症例では肝転移陽性が多い傾向が認められた。組織 **HER2** 陰性例での増加であり、血清 **HER2** は腫瘍細胞以外に由来したものと推定されるが、この群における血清 **HER2** の上昇はいずれも 15～21ng/mL までの軽微な範囲であった。血清 **HER2** の 15ng/mL というカットオフ値は、健康成人女性の平均値+2 標準偏差から決定されたものであり¹⁵、腫瘍の biology を考慮して決定された値ではない。胃癌において有用なカットオフ値の決定には別途の検討が必要と考えられる。なお、今回の対象のうち組織 **HER2** 陰性例における平均値+2 標準偏差は 15.36ng/mL であった。

本研究は遡及的な検討であるため、対象の選択にはバイアスが存在する。比較的小数例での検討であることに加え、切除不能進行例 96 例に対し再発例は 4 例と、症例が切除不能進行例に偏り、そのため、組織 **HER2** を検査するために使用した腫瘍検体に生検検体が多かったことは、本研究の **limitation** として考慮されなければならない。この原因には、研究当時に国立がん研究センターで行われていた血液バンクは初診患者を主な対象としており、再発症例の採血保存は、再発が判明した直後ではなく、初回手術前（根治切除可能な時点）になされたためと推定される。本研究は **Trastuzumab** の投与対象の候補となる症例を対象として計画したものであり、切除不能進行例と同様の治療選択となる再発例は対象症例に加えて症例集積を開始した。再発例が少なかったことは、症例登録が終了した時点で判明した、結果の一部である。また、本試験に登録された再発例 4 例のうち、2 例に組織 **HER2** 陽性が認められ、うち 1 例は血清 **HER2** の上昇（22.8ng/mL）を認めており、これらから、本研究の結果は再発症例に

おける血清 HER2 測定の意義を否定するものではないと判断した。

総括および結論

① 本研究から得られた新知見

- 1) 切除不能進行・再発胃癌において血清 HER2 高値となる症例が認められた。
- 2) 組織 HER2 陰性例と比べ、組織 HER2 陽性例では、血清 HER2 が高い値で分布した (P 値 <0.001 、ウィルコクソンの符号順位検定)。
- 3) 組織 HER2 発現に対する血清 HER2 の感度は 52.4%、特異度は 93.7%、陽性的中率は 68.8%、陰性的中率は 88.1%で、一致は 85.0%であった。
- 4) 血清 HER2 が 15ng/mL 以上の症例の背景因子には、肝転移陽性例が有意に多く認められた (P 値=0.022、ロジスティック回帰分析)。

② 新治験の意義

切除不能進行・再発胃癌において血清 HER2 が増加する症例が確認されたことは、今後、HER2 陽性胃癌の腫瘍マーカーとして血清 HER2 を用いた検討を行う根拠となる。また、組織 HER2 発現に対する血清 HER の感度は低く、現状において、血清 HER2 検査は組織 HER2 の検査の代用とはならないと判断できた。

③ 今後展開される研究

今後展開すべき事項としては、血清 HER2 の胃癌における腫瘍マーカーとしての意義の検討とカットオフ値の探索が挙げられる。

腫瘍マーカーとしての意義の検討には、乳癌において行われた研究を参考とし、胃癌の予後予測、治療効果予測、治療効果判定の因子としての検討を行う。治療効果判定の因子は遡及的研究では困難であり、あらかじめ採血ポイントを決定したうえで行う HER2 陽性胃癌を対象とした前向き研究が望まれる。HER2 陽性胃癌は頻度が低く、十分な症例数を集積するためには多施設試験が必要となる。

胃癌におけるカットオフ値の探索は、内容的には腫瘍マーカーの検討とほぼ同義であり、これらは同一の研究で可能であると見込まれる。腫瘍マーカーの研究を行う際に、血清 HER2 のカットオフ値を 15ng/mL に限定せず、臨床的に有用となる値そのものを検討することで、それぞれの状況におけるカットオフ値の探索となる。

また、本研究から胃癌においては血清 HER2 が 15ng/mL 以上の症例において肝転移が多く認められるという現象はわかったが、血清 HER2 高値となる性質をもつ胃癌において肝転移を生じやすいのか、肝転移を来すことで血清 HER2 を分泌する性質を獲得するのかといった、血清 HER2 の変動と臨床経過との関連は明らかではない。画像評価と組み合わせた前向き研究を行うことは、HER2 陽性胃癌の biology を把握

するうえでも重要となると考えられる。

④ 今後の課題

血清 **HER2** の測定という疫学的な調査により、臨床的に有用な血清 **HER2** の使用法を探索することは可能であるが、血清 **HER2** が高値となる（もしくは、ならない）ことの原因の推定には限界がある。本研究において、組織 **HER2** 陽性を 21 例に認め、このうち 11 例は血清 **HER2** が 15ng/mL と増加し、10 例は血清 **HER2** の増加を来さなかったが、今回の検討項目からはこの差が生じた原因の推定は不可能であった。ここで腫瘍細胞を材料とした基礎研究が追加できれば、血清 **HER2**、ならびに **HER2** 陽性胃癌の理解が進むものと期待される。

今後の研究に際して、基礎研究をどのように効果的に組み入れるか（基礎研究者とどのように連携するか）は、非常に重要な課題である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始適切な助言を賜り、学位提出用論文作成においても丁寧に指導して下さった北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野、坂本直哉教授に深甚なる謝意を示します。

また、国立がん研究センターへの国内留学の機会を与えていただき、研究と臨床のいずれにおいても多岐にわたるご指導をいただきました、北海道大学病院腫瘍センター、小松嘉人准教授に深く感謝いたします。毎日の診療における援助と臨床腫瘍学へのご指導をいただきました北海道大学大学院医学研究科消化器内科学分野、結城敏志助教、福島拓助教、また、研究のあり方や考察の方法などの細部までの相談を快く受け、常に刺激的な議論をいただいた化学療法グループの諸先生、大学院生の皆様、データマネージャーの片岡直子女史に心から感謝します。

ご多忙の中、本研究の計画段階から一貫して御指導、的確な御助言、惜しみない御支援協をいただきました国立がん研究センター東病院早期・探索開発センター長、大津敦先生、同消化管腫瘍科医員、布施望先生には感謝の念が絶えません。

最後になりましたが、北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野教室員の皆様、国立がん研究センター東病院消化管内科の皆様には、重ねて感謝いたします。

引用文献

1. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2, 127-37 (2000).
2. Cohen, S. EGF and its receptor: historical perspective. Introduction. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2, 93-96 (1997).
3. Harari, D. & Yarden, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*. 19, 6102-6114 (2000).
4. Koutras, A. K., et al. The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 74, 73-78 (2010).
5. Hudis, C.A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 357, 39-51 (2007).
6. Coussens, L., et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 230, 1132-1139 (1985).
7. Olayioye, M. A., et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 19, 3159-3167 (2000).
8. Press, M. F., et al. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene*. 5, 953-962 (1990).
9. Koeppen, H. K., et al. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology*. 38, 96-104 (2001).
10. Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256, 495-497 (1975).
11. Reichert, J. M. & Valge-Archer, V. E. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 6, 349-356 (2007).
12. Morrison, S.L. et al. Production and characterization of genetically engineered antibody molecules. *Clin Chem*. 34, 1668-75 (1988).
13. Slamon, D. J., et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 235, 177-182 (1987).
14. Hudziak, R. M. et al. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol*. 9, 1165-1172 (1989).
15. Carter, P., et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 4285-4289 (1992).

16. Tokuda, Y., et al. Dose escalation and pharmacokinetic study of a humanized anti-HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 81, 1419-1425 (1999).
17. Baselga, J. Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab). *Eur J Cancer*. 37, 18-24 (2001).
18. Slamon, D. J., et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 344, 783-792 (2001).
19. Harris, C. A. et al. The efficacy of HER2-targeted agents in metastatic breast cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol*. 22, 1308-1317 (2011).
20. Dahabreh, I. J. et al. Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist*. 13, 620-630 (2008).
21. Incorvati, J. A., et al. Targeted therapy for HER2 positive breast cancer. *J Hematol Oncol*. 6, 38 (2013).
22. Yano, T. et al. 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).
23. Gong, S. J., et al. Growth inhibitory effects of trastuzumab and chemotherapeutic drugs in gastric cancer cell lines. *Cancer Lett* 214, 215-224 (2004).
24. Fujimoto-Ouchi, K., et al. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol*. 59, 795-805 (2007).
25. Gravalos, C., et al. Phase II study of trastuzumab and cisplatin as first-line therapy in patients with HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer. *Clin Transl Oncol*. 13, 179-184 (2011).
26. Bang, Y. J. 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, 687-697 (2010).
27. HER2 検査ガイド第三版 (トラスツズマブ病理部会), 中外製薬株式会社. 東京都, 2009 年 9 月
28. Wolff, A. C., et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor

- receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 25, 118-145 (2007).
29. Hofmann, M., et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology.* 52, 797-805 (2008).
 30. McCormick, S. R., et al. HER2 assessment by immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: comparison of HercepTest and PathVysion commercial assays. *Am J Clin Pathol.* 117, 935-943 (2002).
 31. Ruschoff, J., et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol.* (2012)
 32. Sauter, G., et al. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol.* 27, 1323-1333 (2009).
 33. Scott, G. K., et al. A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 13, 2247-2257 (1993).
 34. Aigner, A., et al. Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation. *Oncogene.* 20, 2101-2111 (2001).
 35. Lennon, S. *et al.* Utility of serum HER2 extracellular domain assessment in clinical decision making: pooled analysis of four trials of trastuzumab in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 27, 1685-1693 (2009).
 36. Sanderson, M. P., et al. Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors. *Growth Factors.* 24, 121-136 (2006).
 37. Tse, C., et al. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: Biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews.* 38, 133-142 (2012).
 38. Luftner, D. *et al.* ADVIA Centaur HER-2/neu shows value in monitoring patients with metastatic breast cancer. *Int J Biol Markers.* 19, 175-182 (2004).
 39. Carney, W. P. *et al.* HER-2/neu diagnostics in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 9, 207 (2007).
 40. Tsé, C., Gauchez, A.S., Jacot, W., Lamy, P.J. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 38, 133-42 (2012).
 41. Tse, C. *et al.* Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and

- comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. *Clin Chem.* 51, 1093-101 (2005).
42. Fornier, M.N. *et al.* Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate. *Ann Oncol.* 16, 234-9 (2005).
43. Kong, S.Y. *et al.* Predicting tissue HER2 status using serum HER2 levels in patients with metastatic breast cancer. *Clin Chem.* 52, 1510-5 (2006).
44. Fehm, T. *et al.* Prognostic significance of serum HER2 and CA 15-3 at the time of diagnosis of metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* 24, 1987-92 (2004).
45. Sandri, M.T. *et al.* Serum levels of HER2 ECD can determine the response rate to low dose oral cyclophosphamide and methotrexate in patients with advanced stage breast carcinoma. *Anticancer Res.* 24, 1261-6 (2004).
46. Ludovini, V. *et al.* Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. *Ann Oncol.* 19, 883-90 (2008).
47. Köstler, W.J. *et al.* Monitoring of serum Her-2/neu predicts histopathological response to neoadjuvant trastuzumab-based therapy for breast cancer. *Anticancer Res.* 24, 1127-30 (2004).
48. Leary, A. *et al.* A phase II trial evaluating capecitabine and irinotecan as second line treatment in patients with oesophago-gastric cancer who have progressed on, or within 3 months of platinum-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64, 455-462 (2009).
49. Albarello, L., Pecciarini, L. & Doglioni, C. HER2 testing in gastric cancer. *Adv Anat Pathol.* 18, 53-59 (2011).
50. Ruschoff, J., *et al.* HER2 testing in gastric cancer: a practical approach." *Mod Pathol* (2012).
51. 胃癌取扱い規約第 14 版(日本胃癌学会), 金原出版株式会社. 東京都, 2010 年 3 月 3 日