HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	切除不能進行・再発大腸癌患者におけるHER2遺伝子増幅が抗EGFR抗体薬の治療効果と生命予後に与える影響
Author(s)	澤田, 憲太郎
Description	配架番号：2458
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13444号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13444
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74267
Type	doctoral thesis
File Information	Kentaro_Sawada.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

切除不能進行・再発大腸癌患者における *HER2* 遺伝子増幅が抗 EGFR 抗体薬の治療効果と生命予後に与える影響

(Prognostic and predictive value of *HER2* amplification in patients with metastatic colorectal cancer)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

澤田　憲太郎

学 位 論 文

切除不能進行・再発大腸癌患者における *HER2* 遺伝子増幅が抗 EGFR 抗体薬の治療効果と生命予後に与える影響

(Prognostic and predictive value of *HER2* amplification in patients with metastatic colorectal cancer)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

澤田　憲太郎

目　　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・　1

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　6

研究方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　15

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　20

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　30

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　35

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　37

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　39

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　40

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論文に発表した。
1. Kentaro Sawada, Yoshiaki Nakamura, Takeharu Yamanaka, Yasutoshi Kuboki, Daisuke Yamaguchi, Satoshi Yuki, Takayuki Yoshino, Yoshito Komatsu, Naoya Sakamoto, Wataru Okamoto, Satoshi Fujii.

Prognostic and Predictive value of *HER2* amplification in patients with metastatic colorectal cancer

Clinical Colorectal Cancer. 17, 198-205. 2018.

本研究の一部は以下の学会に発表した。
1. Kentaro Sawada, Wataru Okamoto, Yoshiaki Nakamura, Takeharu Yamanaka, Satoshi Yuki, Takayuki Yoshino, Yoshito Komatsu, Naoya Sakamoto, Satoshi Fujii.

Survival Outcome in *HER2*-amplified Metastatic Colorectal Cancer (mCRC)

ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium 2018（2018 年 1 月 22 日・サンフランシスコ，米国）

2. Kentaro Sawada, Yoshiaki Nakamura, Takeharu Yamanaka, Daisuke Yamaguchi, Yasutoshi Kuboki, Satoshi Yuki, Takayuki Yoshino, Yoshito Komatsu, Naoya Sakamoto, Wataru Okamoto, Satoshi Fujii

Prognostic and predictive values of *HER2* amplification in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC)

第 16 回日本臨床腫瘍学会学術総会（2018 年 7 月 23 日・神戸）

要　　旨

【背景と目的】

切除不能大腸癌の予後は不良であるが、最近の化学療法の進歩により、その予後は延長してきている。大腸癌化学療法のキードラッグの 1 つとして抗 EGFR 抗体薬があるが、*RAS* 遺伝子変異型、*BRAF* 遺伝子変異型の癌に対しては効果が乏しいことが判明している。しかし、*RAS* 野生型かつ *BRAF* 野生型に限っても抗 EGFR 抗体薬の効果がない症例も多く存在し、さらなるバイオマーカーの探索が重要である。

基礎研究において、*HER2* 遺伝子増幅は抗 EGFR 抗体薬の治療抵抗性に関わっていることが示唆されており、その頻度は全大腸癌の 1-5%と報告されている。しかしこれらの報告は海外のものであり、本邦からの *HER2* 遺伝子増幅の頻度の報告はない。また、先行研究でも *HER2* 遺伝子増幅の測定方法は報告によって異なっているほか、実臨床において *HER2* 遺伝子増幅が抗 EGFR 抗体薬の治療効果に与える影響および生命予後に与える影響について検討した報告は少ない。そのため、本研究では本邦の大腸癌における *HER2* 遺伝子増幅の頻度、およびその臨床的意義を検討することを目的とした。

【対象と方法】

2005 年から 2015 年の間に、国立がん研究センター東病院において原発巣切除を施行され手術検体が入手可能な症例のうち、根治切除不能大腸癌として化学療法を含む緩和的治療を受けた症例を対象とした。全例に対して Tissue microarray（TMA）標本および Whole section 標本を作製し、HER2 免疫染色（Immunohistochemistry：IHC）を行い、いずれかの標本で IHC score が 3+もしくは 2+と判定された症例に対して fluorescence *in situ* hybridization（FISH）を行った。*HER2* 遺伝子増幅ありの定義は、FISH において *HER2/CEP17* 比≥2.0 であることとした。また、*RAS* 遺伝子変異、*BRAF* V600E 遺伝子変異の有無を評価し、対象症例を Group R（*RAS* 遺伝子変異あり）、Group B（*BRAF* V600E 遺伝子変異あり）、Group H（*RAS* 遺伝子、*BRAF* V600E 遺伝子変異なし、かつ *HER2* 遺伝子増幅あり）、Group W（いずれの遺伝子も異常なし）の 4 つのグループに分類した。全生存期間（Overall survival（OS））をグループ分類された全症例で検討し、さらに抗 EGFR 抗体薬による治療の無増悪生存期間（Progression free survival

（PFS)）を、抗 EGFR 抗体薬単独、もしくはイリノテカン不応後に抗 EGFR 抗体薬＋イリノテカンで治療された症例で検討した。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて計算し、グループ間の比較は Log-rank 法によって行った。

【結果】

370 例に対し HER2 の IHC を施行した。TMA 標本もしくは Whole section 標本で IHC score 3+もしくは 2+と判断された 23 例に対して *HER2* FISH を施行し、15 例（4.1%）に *HER2* 遺伝子増幅を認めた。15 例の *HER2* 遺伝子増幅症例は、Whole section 標本では全例が IHC score 3+もしくは 2+と診断されていたが、TMA 標本では 4 例が IHC score 0 と診断されていた。

370 例のうち 359 例で *RAS* 遺伝子、*BRAF* V600E 遺伝子、*HER2* 遺伝子のすべてを評価可能であり、グループ分類は Group R が 204 例（56.8%)、Group B が 13 例（4.5%)、Group H が 11 例（3.1%)、Group W が 131 例（36.5%）となった。*RAS* 遺伝子変異と *HER2* 遺伝子増幅の重複が 4 例（1.1%）にみられ、Group R に分類した。

対象症例全体の生存期間中央値（Median survival time（MST)）は 27.4 か月であり、観察期間中央値は 63.2 か月であった。各グループの MST は、Group R が 24.0 か月、Group B が 14.2 か月、Group H が 19.9 か月、Group W が 39.1 か月であり、Group H は、Group W と比べて OS が短い傾向があった（HR=1.92、p=0.08)。

グループ分類された 359 例のうち、75 例が抗 EGFR 抗体薬単剤療法、もしくはイリノテカン不応後にイリノテカン＋抗 EGFR 抗体薬によって治療された。75 例の内訳は、Group R が 17 例、Group B が 4 例、Group H が 5 例、Group W が 49 例であった。各グループでの抗 EGFR 抗体を用いた治療の PFS 中央値は、Group R で 2.6 か月、Group B が 1.2 か月、Group H が 2.2 か月、Group W が 6.4 か月であり、Group R、B、H はいずれも Group W よりも有意に PFS が短かった（p<0.01)。

【考察】

本研究における *HER2* 遺伝子増幅の割合は 4.1%（15/370 例）で、*RAS* 遺伝子野生型かつ *BRAF* V600E 遺伝子野生型の症例に限れば 7.7%（11/142 例）であり、これらの結果は海外からの報告と同等であ

った。また、TMA 標本による検討では *HER2* 遺伝子増幅症例を見落とす可能性があるため、Whole section 標本での検討が望ましいことが示された。

本研究では *HER2* 遺伝子増幅を持つ症例は抗 EGFR 抗体薬の効果が乏しいことが示され、かつその効果は *RAS* 変異型の症例と同等であった。これは、*HER2* 遺伝子増幅によって過剰に発現した HER2 タンパクが、EGFR とは独立した経路で MAPK 経路を介して下流へのシグナル伝達を行うことが、結果として *RAS* 遺伝子変異症例と同様に抗 EGFR 抗体薬によるシグナル伝達の阻害を無効化しているためであると考えられた。また、*HER2* 遺伝子増幅を認める症例の生存期間は、*RAS*、*BRAF*、*HER2* 遺伝子すべてに異常を認めない症例と比較して不良な傾向があり、大腸癌において *HER2* 遺伝子増幅が予後因子であることが示唆された。

これまでに、*RAS* 遺伝子変異症例、*BRAF* V600E 遺伝子変異症例との予後の比較を行った研究はなく、本研究が初めての研究となる。しかしながら本研究は、原発巣切除を施行した症例のみを対象としていること、抗 EGFR 抗体薬による治療が 2 次治療、3 次治療以降などで症例により違いがあること、単施設での後ろ向き検討であることであることなどの制約が結果に影響を及ぼした可能性があるため、さらに大きなコホートを用いた研究での検証が必要であると考えられる。

【結論】

本邦における転移・再発大腸癌患者において、*HER2* 遺伝子増幅の頻度は海外の報告研究とほぼ同等であった。*HER2* 遺伝子増幅は *RAS* 遺伝子変異、*BRAF* V600E 遺伝子変異と同様に予後因子である可能性が示唆され、さらに抗 EGFR 抗体薬の治療抵抗性に関わっていることが示された。現在、*HER2* 遺伝子増幅を有する大腸癌に対する抗 HER2 抗体薬の臨床試験が国内外で計画・進行しており、その効果が期待されているが、大腸癌における *HER2* 遺伝子増幅は比較的稀であるため、各試験の統合解析を行うために、統一された HER2 診断基準の確立が望まれる。

略　語　表

本文中および図表に記載した略語は以下の通りである.

AKT/PKB	Protein kinase B
BSC	Best supportive care
CEP17	Centromeric probe for chromosome 17
CI	Confidence interval
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FISH	Fluorescence *in situ* hybridization
HE	Hematoxylin and Eosin
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hazard ratio
IHC	Immunohistochemistry
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MST	Median survival time
Muc	Mucinous adenocarcinoma
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
OS	Overall survival
PFS	Progression free survival
Por	Poorly differentiated adenocarcinoma
Sig	Signet-ring cell adenocarcinoma
TMA	Tissue microarray
Tub	Tubular adenocarcinoma
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular endothelial growth factor

緒　　言

本邦における死因の第 1 位は悪性腫瘍であり、その中で大腸癌（結腸癌および直腸癌）の死亡率は男性では肺癌・胃癌に次いで第 3 位、女性では第 1 位であり、非常に重要な疾患の 1 つである（国立がん研究センターがん情報サービス：https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html）。

大腸癌の根治のために最も重要な治療は手術である。全国がんセンター協議会の生存率共同調査（2018 年 6 月集計）によると、一般的に根治切除可能とされる大腸癌 StageⅠ、Ⅱ、Ⅲの 5 年生存率はそれぞれ 98、90、84%であり、根治切除可能な段階で病変を発見することができれば大腸癌の予後は比較的良好であるといえる。しかしながら、StageⅣの大腸癌の 5 年生存率は 20%と予後不良である。StageⅣの症例でも、根治切除が可能と判断された症例（限局した少数個の肺転移、肝転移など）に対しては根治手術が選択されることがあるが、多数の転移を認める症例や骨転移を認める症例など、いわゆる切除不能大腸癌に対しては根治を望むことはできず、緩和的な化学療法を行うことが予後を延長するとされている（Venook A et al. Oncologist. 2005）。

切除不能大腸癌に対する化学療法はこの 20 年で劇的に変化している。1950 年代から 1990 年代半ばまでは、切除不能大腸癌に使用できる薬剤はフッ化プリミジン系の代謝拮抗薬であるフルオロウラシル、およびフルオロウラシルの作用を増強する目的で併用されるフォリン酸のみであり、生存期間中央値（Median survival time（MST））は 12 ヶ月程度であった（Poon MA et al. J Clin Oncol. 1989）。1990 年代後半に、制限酵素の 1 つであるトポイソメラーゼ I を阻害することで抗腫瘍効果を発揮するイリノテカンが開発され、イリノテカンとフルオロウラシルとの併用である IFL 療法が登場したことで、MST は 18 ヶ月程度まで改善した（Saltz LB et al. N Engl J Med. 2000）。さらに、2000 年代に DNA 鎖内および DNA 鎖間に架橋を形成することで抗腫瘍効果を発揮するオキサリプラチンが開発され、フルオロウラシルの急速投与と持続投与を組み合わせた投与法（de gramont 法）とオキサリプラチンを併用した FOLFOX 療法、およびオキサリプラチンに代わりイリノテカンを de gramont 法と併用する FOLFIRI 療法は、MST を 20 か月まで延長した（Tournigand C et al. J Clin Oncol. 2004）。その後、抗血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor（VEGF））抗

体であるベバシズマブと FOLFOX 療法、FOLFIRI 療法を組み合わせることでさらに抗腫瘍効果が高まることが示され、2000 年代中盤になると切除不能大腸癌の MST は 25 か月以上が期待できるまでになった（Cassidy J et al. J Clin Oncol. 2008, Grothey A et al. J Clin Oncol. 2004）（図 1）。

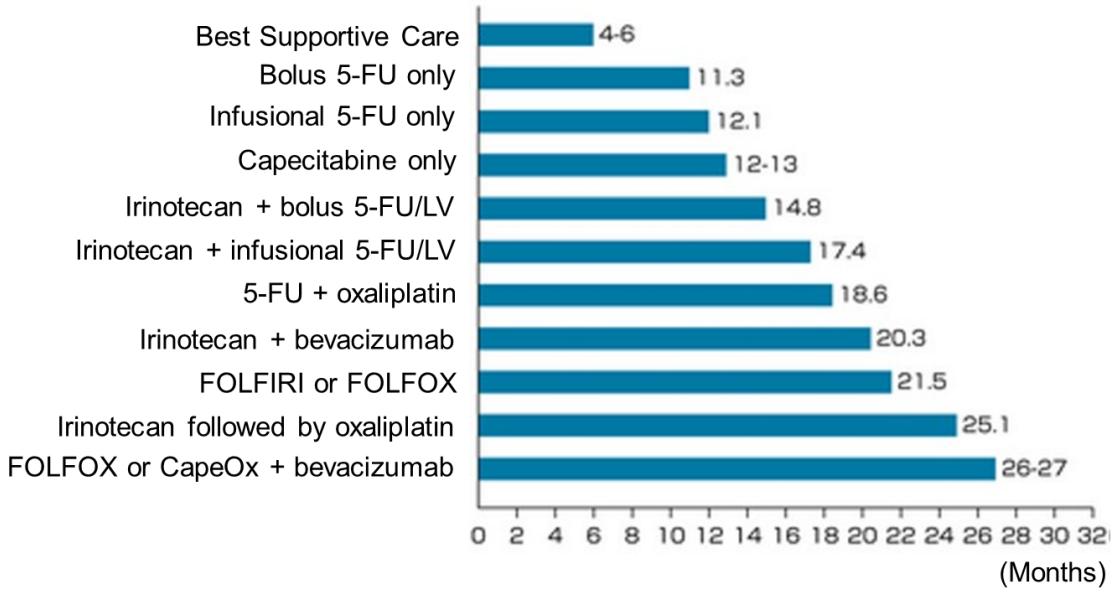


図 1 ：切除不能大腸癌における治療レジメンの推移と生存期間中央値
フルオロウラシル、イリノテカン、オキサリプラチンなどのキードラッグの開発と共に予後が改善してきていることがわかる（Grothey A et al. J Clin Oncol. 2004 より引用）。

また、2000 年代後半には細胞増殖の重要なシグナル経路である Mitogen-activated protein kinase（MAPK）経路の細胞外レセプターの 1 つである上皮成長因子受容体（Epidermal growth factor receptor（EGFR））に結合する抗 EGFR 抗体薬であるセツキシマブ、パニツムマブが登場した。IgG1 サブクラスのヒト／マウスキメラ型モノクローナル抗体であるセツキシマブは、フルオロウラシル、イリノテカン、オキサリプラチンに対して不応となった切除不能大腸癌において、奏効率 8%と十分ではないものの統計学的に有意に予後を延長し（Jonker DJ et al. N Engl J Med. 2007）、完全ヒト型モノクロ―ナル抗体であるパニツムマブも、セツキシマブと同等の抗腫瘍効果を示した（Price TJ et al. Lancet Oncol. 2014）。現在、抗 EGFR 抗体薬は 1 次治療におい

てフルオロウラシル、イリノテカン、オキサリプラチンなどと併用されており、現在の切除不能大腸癌の MST は約 30 ヶ月まで延長している（Heinemann V et al. Lancet Oncol. 2014）。

しかしながら、抗 EGFR 抗体薬の治療効果はすべての症例において同等に得られるわけではないことが判明している。切除不能大腸癌において、がん遺伝子の 1 つである *RAS* 遺伝子に変異をもつ症例（*RAS* 変異型）が約 50%に認められるが、*RAS* 変異型の症例は *RAS* 遺伝子に変異をもたない症例（*RAS* 野生型）と比較して抗 EGFR 抗体薬の治療効果が乏しいことが、多くの臨床試験の結果から示されている（Amado RG et al. J Clin Oncol. 2008, Karapetis CS et al. N Engl J Med. 2008）。さらに近年では大規模な臨床試験のサブ解析によって、がん遺伝子の 1 つである *BRAF* 遺伝子の 600 番目のアミノ酸がバリンからグルタミン酸に変異した、*BRAF* V600E 遺伝子変異が認められる症例においても抗 EGFR 抗体薬の治療効果が乏しいことが示されており、その頻度は切除不能大腸癌の 5～10%とされている（Maughan TS et al. Lancet. 2012, Di Nicolantonio F et al. J Clin Oncol. 2008）。これらの遺伝子変異をもつ症例において抗 EGFR 抗体薬の治療効果が乏しい原因として、抗 EGFR 抗体薬によって阻害される MAPK 経路は、EGFR のリン酸化によって発生したシグナルが RAS タンパク、BRAF タンパクを経て核内転写因子に伝達される経路であるが（Lito P et al. Nat Med. 2013、図 2）、*RAS* 遺伝子や *BRAF* 遺伝子に変異が認められる症例では、RAS タンパクおよび BRAF タンパクが恒常的に下流へのシグナル伝達を行っているため、抗 EGFR 抗体薬により EGFR をブロックすることが MAPK 経路のシグナル阻害につながらないためと考えられている（Sanz-Garcia E et al. Ann Oncol. 2017）。

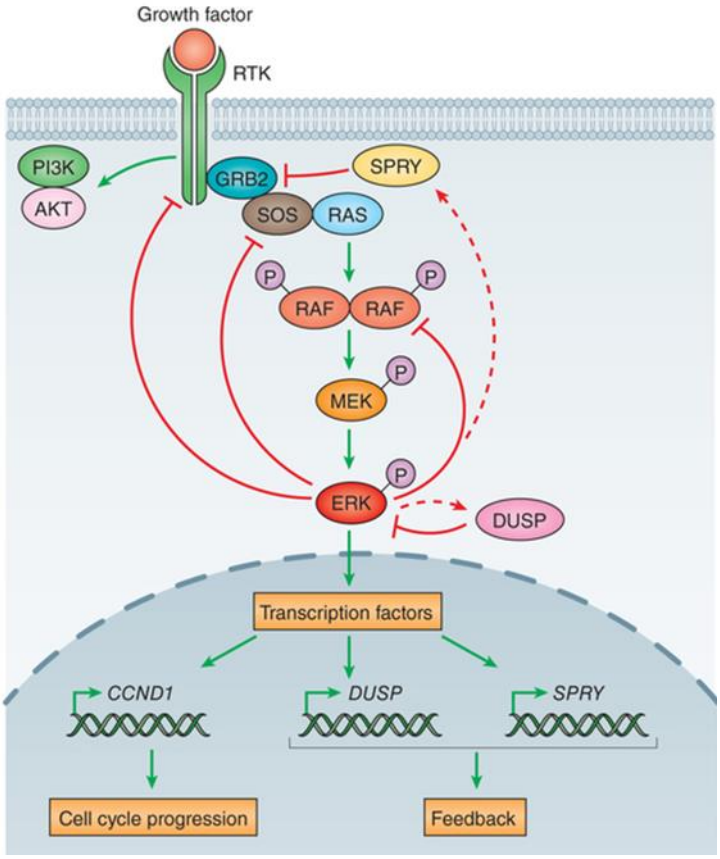


図 2：Mitogen-activated protein kinase 経路（MAPK 経路）の模式図
EGFR などの受容体型チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase: RTK）の細胞外ドメインにリガンドが結合することで、シグナルが RAS-RAF-MEK タンパクを経て核内の転写因子に伝達される（Lito P et al. Nat Med. 2013 より引用）。

これらの知見を基に、現在の国内外のガイドラインにおいても抗 EGFR 抗体薬の使用は *RAS* 遺伝子、および *BRAF* V600E 遺伝子変異のない症例のみに限定して推奨されている（Yoshino T et al. Ann Oncol. 2018, Van Cutsem E et al. Ann Oncol. 2016, Benson AB et al. J Natl Compr Cancer Netw. 2018）。これを受けて、本邦においても 2015 年 4 月より切除不能大腸癌における *RAS* 遺伝子検査診断薬としてマルチプレックス PCR 法を用いた MEBGEN™ RASKET KIT（Medical & Biological Laboratories 社、名古屋、日本）が、また 2018 年 8 月からは RAS 遺伝子検査と *BRAF* V600E 遺伝子検査が同時に測定可能である MEBGEN™ RASKET-B KIT （Medical & Biological Laboratories 社）が保険償還され、抗 EGFR 抗体薬の治療

効果を予測するバイオマーカーとして広く臨床で用いられている（Yoshino T et al. EBioMedicine. 2015, Taniguchi H et al. Neoplasia. 2018）。

これらのバイオマーカーの確立により、抗 EGFR 抗体薬による治療の恩恵を受けられる患者の選別がなされ、すべての患者を対象とした場合は 10%以下であった抗 EGFR 抗体薬単剤療法の奏効率は（Jonker DJ et al. N Engl J Med. 2007）、*RAS* 遺伝子野生型かつ *BRAF* V600E 遺伝子野生型の患者に限定して治療を行うことで、30%程度まで上昇している（Kim TW et al. Clin Colorectal Cancer. 2018）。しかしながら、*RAS* 遺伝子野生型かつ *BRAF* V600E 遺伝子野生型の中でもなお抗 EGFR 抗体薬の治療効果が得られない症例があり、さらなる患者選別のために新たなマーカーの探索が重要である。

Human epidermal growth factor receptor 2（HER2）タンパクは細胞膜表面に存在する 185 kDa の分子であり、EGFR や HER3 などとともに EGFR ファミリーに区分される。HER2 に特異的に結合するリガンドはこれまでに発見されておらず、EGFR や HER3 などの他の EGFR ファミリーの受容体と二量体を形成することでシグナルを細胞内に伝達している。HER2 のシグナル伝達経路として、EGFR と同様の MAPK 経路のほか、Protein kinase B（PKB/AKT）経路が指摘されており、これらの経路を通じて細胞分裂を調節していると考えられている（Akiyama T et al. Science. 1985, 図 3）。HER2 タンパク質をコードしている *HER2* 遺伝子は 17 番染色体長腕に存在し、*HER2* 遺伝子増幅は HER2 タンパクの過剰発現に密接に関与している。正常細胞において *HER2* 遺伝子増幅が起こると、HER2 タンパクが細胞膜へ過剰に発現し、増殖シグナルが異常に活性化されることで、細胞の分化・成長に異常をきたすことから、*HER2* 遺伝子増幅は癌化の原因の 1 つであると考えられている（Coussens L et al. Science. 1985）。

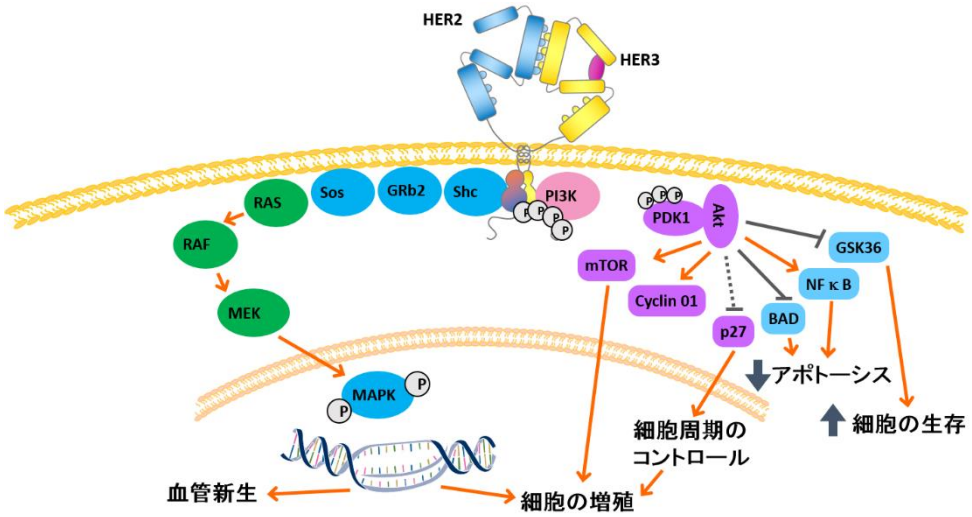


図 3：HER2 タンパクを介したシグナル経路
HER2 タンパクは、MAPK 経路や PKB/AKT 経路を通じて細胞分裂を調節し、細胞の増殖・分化に関わっている（Amler LC et al. Expert Opin Biol Ther. 2010 より引用・改変）。

HER2 遺伝子増幅および HER2 タンパク過剰発現の頻度は癌腫によって大きく異なっている。乳癌では 20～25%、胃癌では 15～20%に認められ、これらの癌腫では HER2 タンパクに特異的に結合し抗腫瘍効果を発揮するトラスツズマブや、HER2 と他の EGFR ファミリーとの二量体の形成を阻害することで抗腫瘍効果を発揮するペルツズマブなどを用いた抗 HER2 治療が良好な治療効果を示している（Romand EH et al. N Engl J Med. 2005, Bang Y et al. Lancet. 2010）。一方、大腸癌における *HER2* 遺伝子増幅および HER2 タンパク過剰発現の頻度は、研究によって *HER2* 遺伝子増幅の測定方法が異なるものの、全症例のおよそ 1～5%であると報告されている（Richmann SD et al. J Pathol. 2016, Ingold-Heppner B et al. Br J Cancer. 2014, Marx AX et al. Hum Pathol. 2010, Gong J et al. Oncotarget. 2017）。しかし、これらの報告はすべて海外からのものであり、本邦からの報告はない。

これまでの報告における *HER2* 遺伝子増幅の測定方法の違いの一つとして、病理標本の作製方法がある。病理標本の作製方法には、各症例において得られた検体のホルマリン固定・パラフィン包埋（Formalin-fixed paraffin-embedded（FFPE））ブロックから直接プレパラート標本を作製する方法（Whole section 標本）と、各症例において得られた

検体の FFPE ブロックから一部分をくりぬき、複数症例分の検体を 1 つの FFPE ブロックとして再構成し、プレパラートを作製する方法（Tissue microarray 標本（TMA 標本））がある。一般的に、TMA 標本を用いることで多数例の免疫染色などの検討を集約的に効率よく行うことができる。しかしその一方、Whole section 標本では腫瘍検体の全体を評価しているのに対し、TMA 標本では検体の一部を観察するため、腫瘍の一部に発現しているタンパク等を検出できない可能性があるとされている（Oga A. Cytomery Res. 2007）。先行研究においては、TMA 標本を用いて HER2 タンパクの発現を評価する研究（Ingold-Heppner B et al. Br J Cancer. 2014）と、Whole section 標本を用いて評価を行う研究（Richmann SD et al. J Pathol. 2016）が混在しており、どちらが *HER2* 遺伝子増幅および HER2 タンパク過剰発現の評価に適しているのかは検討されていない。

また、*HER2* 遺伝子増幅および HER2 タンパク過剰発現は、そのシグナル経路の 1 つに MAPK 経路をもつことから、新たな抗 EGFR 抗体薬の耐性機序の候補として注目されている。大腸癌患者から採取した癌細胞株をマウスに移植し作製されたゼノグラフトモデルを用いて抗 EGFR 抗体薬の治療効果を検討した基礎研究では、*HER2* 遺伝子増幅、HER2 タンパク過剰発現を認める大腸癌株においては、抗 EGFR 抗体薬の効果が認められなかったと報告されている（Bertotti A et al. Cancer Discov. 2011, 図 4）。

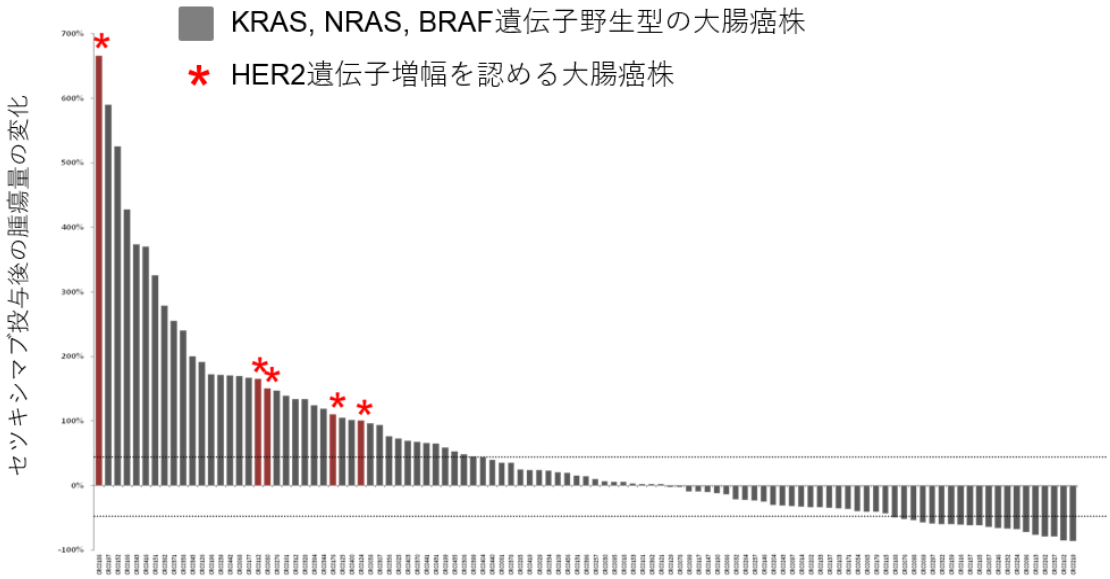


図 4：大腸癌ゼノグラフトモデルにおけるセツキシマブの治療効果
HER2 遺伝子増幅を認めるモデルでは、セツキシマブ投与後に腫瘍縮小効果が得られていない（Bertotti A et al. Cancer Discov. 2011 より引用）。

この結果を受けて、これまでにいくつかの臨床研究において大腸癌における *HER2* 遺伝子増幅および HER2 タンパク過剰発現と抗 EGFR 抗体薬の治療効果についての検討がなされ、*HER2* 遺伝子増幅が認められる症例では抗 EGFR 抗体薬の効果が乏しいことが示唆されているが、まだ報告が少ないためコンセンサスを得るには至っていない（Jeong JH et al. Clin Colorectal Cancer. 2017）。

一方、切除不能大腸癌において *RAS* 遺伝子や *BRAF* 遺伝子などの遺伝子変異を測定することは、抗 EGFR 抗体薬の治療効果予測を行う上で臨床的に重要であるが、生命予後を予測する因子としても重要である。切除不能大腸癌において、*BRAF* V600E 遺伝子変異を認める症例は、*BRAF* V600E 遺伝子変異を認めない症例と比して明らかに予後が不良であることが示されており、強力な予後因子とみなされている（Di Nicolantonio F et al. J Clin Oncol. 2008）。また、*RAS* 遺伝子変異をもつ症例は、*RAS* 遺伝子変異を認めない症例と比して予後が不良であることも示されている。*RAS* 遺伝子変異は抗 EGFR 抗体薬の治療効果予測因子でもあるため、抗 EGFR 抗体薬の治療効果が得られないことが予後に関与している可能性があるが、抗 EGFR 抗体薬を使用しない治療においても *RAS* 遺伝子変異症例は予後不良であることが示さ

れており（Garde NJ et al. Mol Clin Oncol. 2017）、独立した予後不良因子であると考えられている。一方、切除不能大腸癌における *HER2* 遺伝子増幅および HER2 タンパク過剰発現と予後との関係は明らかではない。これまでに大きなコホートを用いていくつかの検討が行われたが、予後不良であるとの報告（Ingold-Heppner B et al. Br J Cancer. 2014）と、予後とは無関係であるという報告（Richmann SD et al. J Pathol. 2016）があり、一定の見解が得られていない。しかしながら、これらの先行研究では Stage Ⅰ～Ⅳの症例が混在している点や、*HER2* 遺伝子増幅の有無の測定法が異なる点などの問題があり、切除不能大腸癌における検討は不十分である。

以上のことから、本研究では本邦における切除不能大腸癌における *HER2* 遺伝子増幅の頻度を明らかにすることと、その測定方法の検討（Whole section 標本と TMA 標本の検討）を行うことを目的とした。さらに、切除不能大腸癌における *HER2* 遺伝子増幅が抗 EGFR 抗体薬の効果予測因子、および予後因子としてどのような役割を果たしているのかを明らかにするために、既存のバイオマーカーである *RAS* 遺伝子変異、*BRAF* 遺伝子変異を測定し、それらの結果を比較、検討することとした。

研　究　方　法

（1）研究の種類・デザイン

侵襲を伴わない単施設後ろ向き研究

（2）対象患者

国立がん研究センター東病院において、2005 年から 2015 年の間に原発巣切除が行われた症例のうち、緩和的治療が行われた転移・再発大腸癌症例を対象とした。

（3）研究対象者から取得する試料の種類とその採取方法

本研究では、すでに採取された対象患者の手術検体を用いた。手術時に採取された検体はすべてホルマリン固定の後にパラフィン包埋されていた。対象患者の FFPE ブロックから作製された薄切標本に Hematoxylin and Eosin（HE）染色を行い、癌部を十分に含む部位を同定した。

（4）観察及び測定項目とその実施方法

本研究では、対象症例の FFPE ブロックを用いて HER2 タンパク発現の有無、*HER2* 遺伝子増幅の有無、*RAS*（*KRAS* および *NRAS*）遺伝子、*BRAF* 遺伝子変異の有無について検討した。また、診療録を後方視的に検討し、患者の診断時年齢、性別、腫瘍の組織型（高分化腺癌、低分化腺癌等）、転移臓器、化学療法の治療歴、抗 EGFR 抗体薬の治療効果、全生存期間（Overall survival（OS））などについて検討を行った。

<u>HER2 タンパク発現の有無の検討</u>

対象症例全例の FFPE ブロックより、2 種類の標本を作製した。

1. TMA 標本：

各症例につき 1 つの FFPE ブロックから、2 mm 径の円筒によって腫瘍部の 2 カ所を抽出したのち、24 症例分（48 本）の細径検体を 6 行×8 列に配置し、再度パラフィンで固定し 1 つの FFPE ブロックを作製した（TMA ブロック）。その後、このブロックより 4 μm 厚の薄切標本を 2 枚作製した（この薄切標本 1 枚で、24 症例分の腫瘍部を一度に観察可能である）。

2. Whole section 標本：

各症例において、TMA 標本を作製した際に使用されたものとは異なる FFPE ブロックより、4 μm 厚の薄切検体を 2 枚作製した。

上記の通り、TMA 標本および Whole section 標本から作製された各 2 枚の薄切標本に対し、各 1 枚に HE 染色、各 1 枚に HER2 免疫染色（Immunohistochemistry：IHC）を行った。

3. IHC 染色

IHC 染色には、抗 HER2 モノクローナル抗体（PATHWAY HER2 [4B5]、Ventana 社、ツーソン、米国）を用いた。まず、HE 染色の標本を用いて腫瘍細胞の占拠する部位を同定したのち、同部位の IHC 染色における細胞膜の染色強度を確認した。HER2 IHC score の決定に際しては、胃癌の診断基準をもとに以下のように定めた。IHC score 3+：全体の 10%を超える腫瘍細胞の側面もしくは全周の細胞膜が強く染色される。score 2+：全体の 10%を超える腫瘍細胞の側面もしくは全周の細胞膜が中等度に染色される、もしくは全体の 10%以下の腫瘍細胞の側面もしくは全周の細胞膜が強く染色される。1+：全体の 10%を超える腫瘍細胞の側面もしくは全周の細胞膜がかすかに染色される、0：腫瘍細胞膜に染色が全く見られない、もしくは全体の 10%以下の腫瘍細胞の側面もしくは全周の細胞膜がかすかに染色される。評価は 1 人の病理専門医（F.S）によって行われ、TMA 標本における IHC score と Whole section 標本における IHC score の対比を行った。

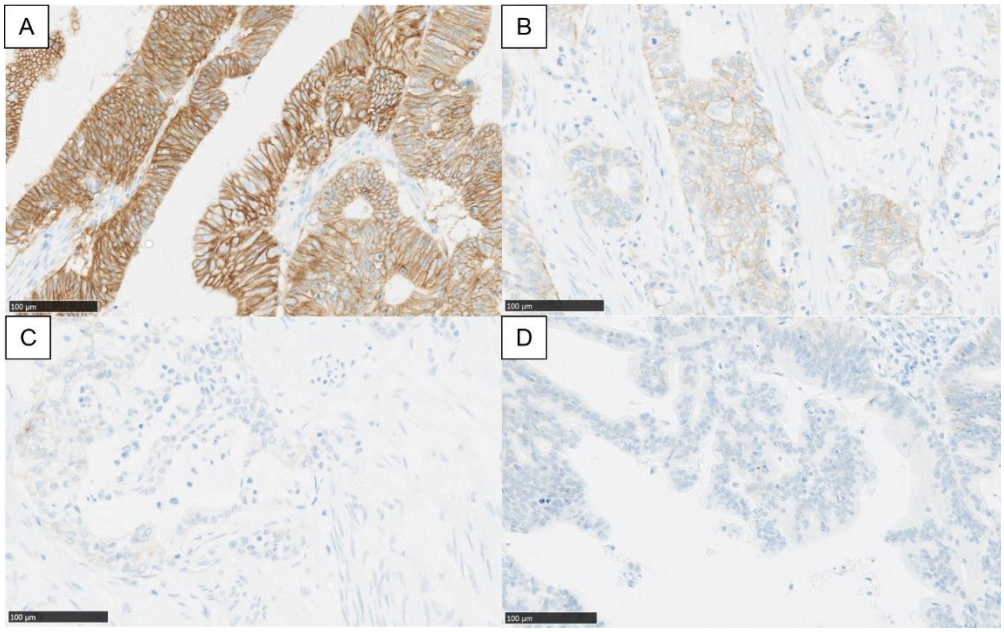


図 5：HER2 IHC の染色像の一例（A：score 3+、B：score 2+、C：score 1+、D：score 0）

HER2 遺伝子増幅の有無の検討

対象症例のうち、TMA 標本もしくは Whole section 標本において HER2 タンパク発現が強度（IHC score 3+）または中等度（IHC score 2+）であるものに対して、*HER2* 遺伝子増幅の有無の検討を行った。*HER2* 遺伝子増幅は、胃癌や乳癌において確立した方法である fluorescence *in situ* hybridization（FISH）を用いて検討し、検査キットとして PathVysion HER-2 probe kit （Abbott Laboratories 社、シカゴ、米国）を用いた。*HER2* 遺伝子増幅は、胃癌の診断基準を基に *HER2/CEP17* 比 2.0 以上と定義した（Centromere probe 17 （CEP17））。

KRAS、*NRAS*、*BRAF* 遺伝子変異の有無の検討

KRAS 遺伝子および *NRAS* 遺伝子については MEBGEN™ RASKET KIT によって exon2、3、4 の測定が行われた。

また、大腸癌においては *BRAF* 遺伝子変異と *RAS* 遺伝子変異は互いに排他的であることが知られているため（Smith CG et al. Clin Cancer Res. 2013）、*BRAF* 遺伝子変異は *RAS* 変異を認めない症例において測定された。測定キットとして MEBGEN™ RASKET-B KIT もしくは MuPACK KIT （Medical & Biological Laboratories 社）が用い

られ、hotspot mutation である V600E 変異を測定した。

遺伝子異常（遺伝子変異・遺伝子増幅）に基づいたグループ分類

遺伝子異常を測定可能であったすべての症例を、Group R：*RAS* 遺伝子変異、Group B：*RAS* 野生型かつ *BRAF* V600E 変異、Group H：*RAS*/*BRAF* がともに野生型かつ *HER2* 遺伝子増幅あり、Group W：*RAS*/*BRAF* がともに野生型かつ *HER2* 遺伝子増幅なしに分類した。

統計解析

グループ分類された全ての患者で OS を検討した。OS は、緩和的療法（全身化学療法もしくは Best supportive care（BSC）を含む）を開始された日から死亡までの期間と定義した。また、抗 EGFR 抗体薬の無増悪生存期間（Progression free survival（PFS））は抗 EGFR 抗体薬単剤、もしくはイリノテカン不応後にイリノテカン＋抗 EGFR 抗体薬にて治療された患者において検討した。抗 EGFR 抗体薬＋FOLFOX 療法などの施行例は、抗 EGFR 抗体薬以外の抗腫瘍薬の影響を考慮して解析から除外した。PFS は、抗 EGFR 抗体薬による治療の開始日から病勢進行確認日もしくは死亡日のうち早い方までの期間と定義した（図 6）。

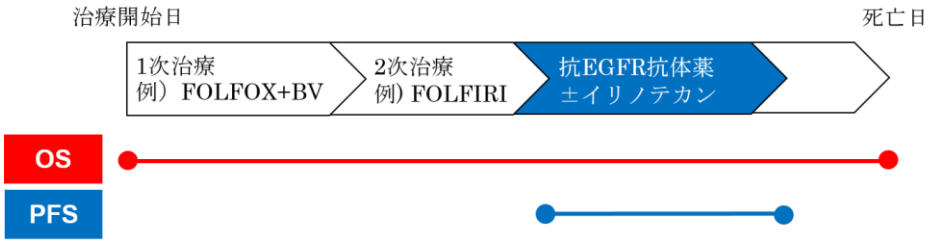


図 6：本研究における OS、PFS の定義
OS は全症例で、PFS は抗 EGFR 抗体薬単剤、もしくはイリノテカン不応後にイリノテカン＋抗 EGFR 抗体薬にて治療された患者において検討した。

OS、PFS ともに事象が確認される前に追跡を終了した場合はデータ打ち切り（センサー）とした。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて計算し、グループ間の比較は Log-rank 法によって行った。ハザード比（Hazard ratio（HR））は Cox 回帰ハザードモデルで計算した。これ

らの事項の解析は SAS version 9.3（SAS Institute 社、ケーリー、米国）を用いて行われ、すべての P 値は両側で検定し P 値<0.05 を統計学的に有意であると定義した。

（5）倫理的遵守事項

本研究は腫瘍組織のタンパク発現および遺伝子異常に関する研究であり正常細胞の遺伝子解析は実施されないため、文部科学省、厚生労働省、経済産業省の三省合同指針である「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象とはならず、文部科学省および厚生労働省の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」の対象となる。あらかじめ臨床研究実施計画書を国立がん研究センター東病院の長へ提出し、研究の実施に関して自主臨床研究審査委員会（以下、審査委員会）の承認及び研究機関の長の許可を得て行われた（自主臨床研究番号 2016-246)。本研究では、研究参加同意（包括同意含む）が得られている試料を用い、すでに死亡している症例など同意を得ることが困難な場合については同意取得を行わなかったが、研究実施に際し遺族等の拒否機会を設けるために国立がん研究センターのホームページで本研究の情報公開を行った。また、研究実施に係る試料・情報は氏名・住所等を別の管理番号（研究用 ID）に置き換えたうえで厳重に管理し、研究用 ID と個人情報の対応表は、施錠された個室で管理した。共同研究機関・共同研究者に試料・情報を提供する場合には、患者氏名や施設 ID は用いず、この研究用 ID を使用して行った。

（6）研究実施期間

本研究は 2016 年 12 月 1 日～2018 年 3 月 31 日に実施した。

（7）研究実施施設

国立がん研究センター東病院

結　果

適格症例

2005 年から 2015 年の間に原発巣切除が行われた転移・再発大腸癌症例は 512 例であったが、手術検体を入手可能であったのは 475 例であった。475 例のうち 105 例は周術期化学療法のみが行われており、緩和的化学療法が行われていなかったため、適格基準を満たす症例は 370 例であった。

HER2 IHC

HER2 IHC が本研究解析対象である 370 例に行われた。TMA 標本での評価では、IHC score 3+が 8 例（2.2%）、2+が 5 例（1.4%）、1+が 27 例（7.3%）、0 が 330 例（89.2%）であった。また、Whole section 標本では、IHC score 3+が 11 例（3.0%）、2+が 11 例（3.0%）、1+が 14 例（3.8%）、0 が 334 例（90.2%）であった。それぞれの標本における IHC score の関連を表 1 に示す。

TMA 標本と Whole section 標本における IHC score の一致率は、339/370 例（91.7%）であった。TMA 標本において score 1+もしくは 0 と診断されたものの Whole section 標本で score 3+もしくは 2+と診断された症例は 10 例、Whole section 標本において score 1+もしくは 0 と診断されたものの TMA 標本で score 3+もしくは 2+と診断された症例は 1 例であった。

表 1：TMA 標本および Whole section 標本における IHC score の関連

IHC score		TMA標本				
		3+	2+	1+	0	合計
Whole section 標本	3+	8	1	0	2	11
	2+	0	3	3	5	11
	1+	0	1	9	4	14
	0	0	0	15	319	334
	合計	8	5	27	330	370

HER2 遺伝子増幅

TMA 標本もしくは Whole section 標本において IHC score3+および 2+

と判定された 23 例に FISH を施行した。TMA 標本においては、IHC score 3+の全例（8/8 例、100%）と 2+のうち 3 例（3/5、60.0%）、および 0 のうち 4 例（4/7 例、57.1%）で *HER2* 遺伝子増幅を認めた。一方、Whole section 標本においては、IHC score 3+の全例（11/11 例、100%）と 2+のうち 4 例（4/11、36%）で *HER2* 遺伝子増幅を認め、1+および 0 では *HER2* 遺伝子増幅を認めた症例はなかった。結果、370 例のうち 15 例（4.1%）の症例が *HER2* 遺伝子増幅ありと判定された（表 2）。

HER2 遺伝子増幅ありと判断された 15 例のうち、Whole section 標本では全症例を IHC score 3+もしくは 2+と判定していたが、TMA 標本では 4 例が IHC score 0 と判定されていた。

表 2：各標本における IHC score と *HER2* 遺伝子増幅（FISH 比≧2.0）の割合の関連

FISH比 ≥2.0の割合		TMA標本におけるIHC				
		3+	2+	1+	0	合計
Whole section 標本における IHC	3+	8/8	1/1	-	2/2	11/11 (100%)
	2+	-	2/3	0/3	2/5	4/11 (36.4%)
	1+	-	0/1	-	-	0/1 (0.0%)
	0	-	-	-	-	-
	合計	8/8 (100%)	3/5 (60.0%)	0/3 (0.0%)	4/7 (57.1%)	15/23 (65.2%)

HER2 遺伝子増幅を認めた 15 例の患者背景を表 3 に示す。症例の多く（12/15 例、80%）は左側結腸および直腸に局在した。15 例のうち、TMA 標本で IHC score が 0 と判定された 4 例（No.3, 9, 11,13）は、いずれも Whole section での IHC で染色を認める細胞の割合（陽性細胞割合）が 20～30%と低かった。

表 3. *HER2* 遺伝子増幅を認めた 15 例の患者背景

Tub: Tubular adenocarcinoma, Muc: Mucinous adenocarcinoma, Por: Poorly differentiated adenocarcinoma

患者背景						HER2				
						IHC (Whole)		IHC(TMA)	FISH	
No.	年齢	性別	原発部位	組織型	RAS/ BRAF	Score	陽性細胞割合 (%)	Score	HER2/ CEP17比	HER2遺伝子コピー数
1	63	男	直腸	Tub	–	3+	95	3+	5.5	20.6
2	61	男	直腸	Tub>Muc	–	3+	70	2+	4.9	16.5
3	57	男	S状結腸	Tub	–	3+	20	0	3.3	15.0
4	60	女	横行結腸	Tub	–	3+	100	3+	2.9	14.6
5	79	男	直腸	Tub	–	3+	95	3+	4.3	12.3
6	56	女	直腸	Tub>Por	–	3+	20	3+	2.6	10.9
7	64	女	S状結腸	Tub	–	3+	100	3+	3.5	10.7
8	65	女	S状結腸	Tub	–	3+	60	3+	3.3	9.2
9	64	女	直腸	Tub	–	2+	30	0	4.3	12.0
10	63	男	直腸	Tub	–	2+	60	2+	2.5	8.2
11	78	男	盲腸	Por>Tub	–	2+	20	0	3.3	7.5
12	70	男	直腸	Tub	$KRAS^{G13D}$	3+	100	3+	3.4	20.6
13	74	男	盲腸	Tub	$KRAS^{G13D}$	3+	20	0	9.2	17.0
14	74	男	S状結腸	Tub	$KRAS^{G12D}$	3+	90	3+	3.9	10.8
15	70	女	直腸	Tub	$KRAS^{G12D}$	2+	40	2+	2.0	6.5

RAS、*BRAF* 遺伝子変異の有無

RAS 遺伝子変異の有無は 370 例のうち 359 例（97.0%）で解析可能であった。*RAS* 遺伝子変異が 204 例で認められ、そのうち *KRAS* 遺伝子変異が 188 例、*NRAS* 遺伝子変異が 17 例であった（1 例で *KRAS* 遺伝子変異と *NRAS* 遺伝子変異の重複を認めた）。*RAS* 遺伝子変異を認めた 204 例のうち 4 例（1.9%）では *HER2* 遺伝子増幅を認め、これらは Group R に分類した。*RAS* 遺伝子変異の有無が解析不能であった 11 例は、4 つのグループ分類から除外した。

BRAF V600E 変異は *RAS* 遺伝子変異のない 155 例で測定された。155 例のうち 13 例に *BRAF* V600E 変異が同定された。この 13 例の中に *HER2* 遺伝子増幅を認めた症例はなく、これらはすべて Group B に

分類した。

これらの遺伝子異常によるグループ分けの結果、Group R が 204 例（56.8%）、Group B が 13 例（3.6%）、Group H が 11 例（3.1%）、Group W が 131 例（36.5%）であった（図 7）。

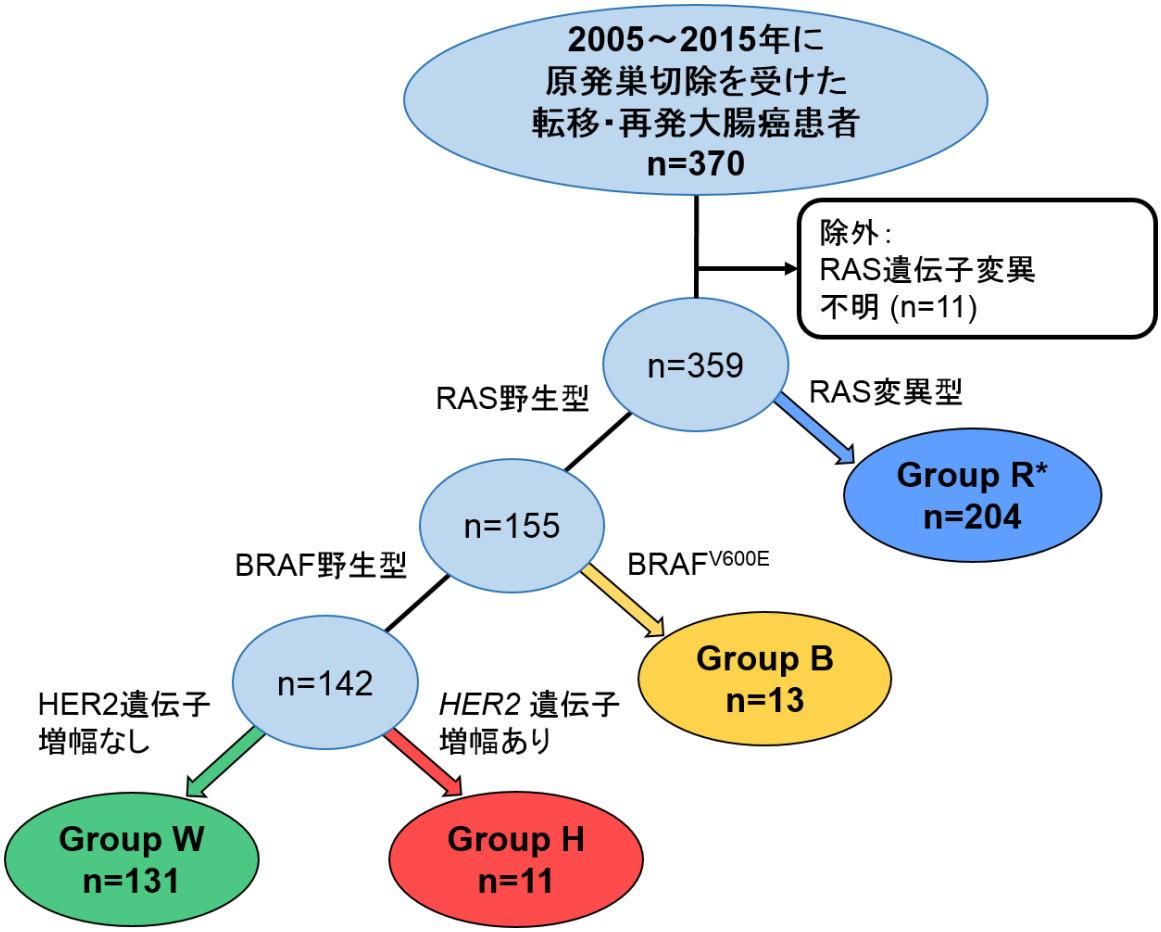


図 7：*RAS*、*BRAF*、*HER2* によるグループ分類

研究対象症例 370 例のうち、359 例が Group R(*RAS* 変異型)、Group B(*RAS* 野生型かつ *BRAF* V600E 変異型)、Group H(*RAS*/*BRAF* がともに野生型かつ *HER2* 遺伝子増幅あり)、Group W(*RAS*/*BRAF* がともに野生型かつ *HER2* 遺伝子増幅なし)に分類された。

*Group R は *RAS* 遺伝子変異型かつ *HER2* 遺伝子増幅ありの 4 例を含む。

それぞれの群の患者背景を表 4 に示す。Group H の患者は左側結腸もしくは直腸に多くみられる傾向にあったが、有意差はなかった（オッズ比 1.34（95%信頼区間（Confidence interval（CI）：0.38-6.34））。そ

の他、年齢、性別、治療経過は Group H とその他のグループに差を認めなかった。

表 4. 各グループの患者背景

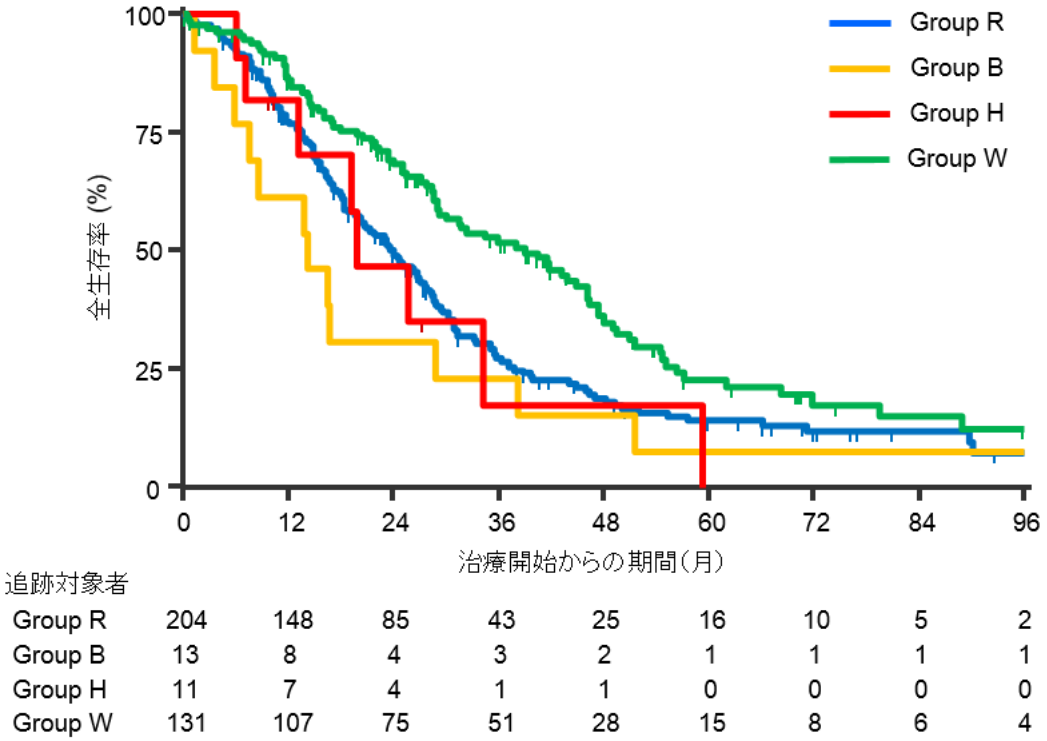
Sig: Signet-ring cell adenocarcinoma,

a：盲腸、上行結腸、横行結腸　b：下行結腸、S 状結腸

	Group R (n = 204)	Group B (n = 13)	Group H (n = 11)	Group W (n = 131)
年齢中央値（範囲）	66 (28–82)	69 (29–81)	65 (56–81)	62 (31–81)
性別、n (%)				
男性	125 (61.3)	5 (38.5)	5 (45.5)	85 (64.9)
女性	79 (38.7)	8 (61.5)	6 (54.5)	46 (35.1)
診断時病期（UICC第7版）、n (%)				
I–III	110 (53.9)	6 (46.2)	5 (45.5)	61 (46.6)
IV	94 (46.1)	7 (53.8)	6 (54.5)	70 (53.4)
原発部位、n (%)				
右側結腸[a]	53 (26.0)	6 (46.2)	2 (18.2)	21 (16.0)
左側結腸[b]	34 (16.7)	3 (23.1)	3 (27.3)	48 (36.6)
直腸	117 (57.3)	4 (30.8)	6 (54.5)	62 (47.3)
組織型、n (%)				
Tub	189 (92.6)	9 (69.2)	10 (90.9)	118 (90.0)
Por/Sig/Muc	15 (7.4)	4 (30.8)	1 (9.1)	13 (10.0)
転移臓器、n (%)				
肝	95 (46.6)	6 (46.2)	7 (63.6)	74 (56.5)
肺	77 (37.7)	3 (23.1)	4 (36.4)	28 (21.4)
腹膜	35 (17.2)	4 (30.8)	1 (9.1)	18 (13.7)
リンパ節	33 (16.2)	3 (23.1)	1 (9.1)	29 (22.1)
転移臓器個数、n (%)				
1	140 (68.6)	9 (69.2)	8 (72.7)	97 (74.0)
2	51 (25.0)	3 (23.1)	2 (18.2)	26 (19.8)
≥3	13 (6.4)	1 (7.7)	1 (9.1)	8 (6.1)
化学療法治療歴、n (%)				
フルオロピリミジン	195 (95.6)	13 (100.0)	9 (81.8)	124 (94.7)
オキサリプラチン	174 (85.3)	13 (100.0)	9 (81.8)	117 (89.3)
イリノテカン	132 (64.7)	8 (61.5)	7 (63.6)	93 (71.0)
ベバシズマブ	146 (71.6)	7 (53.8)	9 (81.8)	90 (68.7)
抗EGFR抗体薬	23 (11.3)	5 (38.5)	7 (63.6)	77 (58.8)

全生存期間

カットオフ日を 2017 年 3 月 31 日とすると、観察期間中央値は 63.2 か月（範囲 0.3～108.7 か月）であり、グループ分けされた 359 例の MST は 27.4 か月（95%CI: 24.0-29.4 か月）であった。グループ別の生存曲線を図 8 に示す。グループ別の MST は、Group R で 24.0 か月（95%CI: 20.0-27.5 か月）、Group B で 14.2 か月（95%CI 5.8-28.9 か月）、Group H で 19.9 か月（95%CI: 7.1-59.3 か月）、グループ W で 39.1 か月（95%CI: 29.1-46.2 か月）であった。グループ H は、Group W と比べて予後が不良な傾向にあり（W vs. H; HR=1.92; 95% CI, 0.93–3.97; P = 0.080）、Group R とはほぼ同等の予後であった（R vs. H; HR: 0.83, 95% CI: 0.41–1.70; P = 0.618）。また、Group H と Group B の予後には有意差を認めなかった（B vs. H; HR=1.16; 95% CI, 0.47–2.84; P = 0.748）。なお、Group R に含まれた *HER2* 遺伝子増幅ありの症例の MST は 14.9 か月であった。



追跡対象者									
Group R	204	148	85	43	25	16	10	5	2
Group B	13	8	4	3	2	1	1	1	1
Group H	11	7	4	1	1	0	0	0	0
Group W	131	107	75	51	28	15	8	6	4

図 8：グループ別全生存期間（MST）

MST は、Group R で 24.0 か月、Group B で 14.2 か月、Group H で 19.9 か月、Group W で 39.1 か月であった。

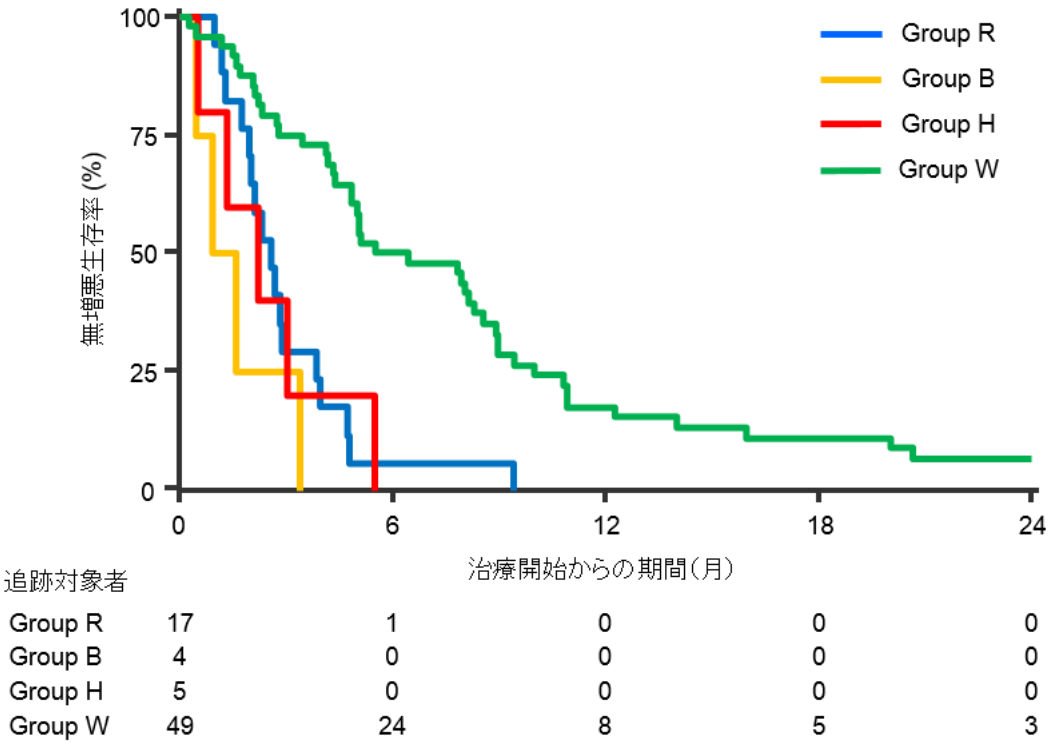
抗 EGFR 抗体薬の治療効果

グループ分けされた 359 例のうち、75 例が抗 EGFR 抗体薬単剤、もしくはイリノテカン不応後にイリノテカン＋抗 EGFR 抗体薬にて治療されていた。各グループ別では、Group R が 17 例、Group B が 4 例、Group H が 5 例、Group W が 49 例であった。各グループの患者背景を表 5、無増悪生存曲線を図 9 に示す。PFS の中央値は Group R で 2.2 か月、Group B で 1.2 か月、Group H で 2.6 か月、Group W で 6.0 か月であり、Group R、B、H はいずれも有意差をもって Group W よりも PFS が短かった（$p<0.01$）。各グループでの奏効率は、Group R で 6.3%、Group B で 0.0%、Group H で 20.0%、Group W で 35.4%であった。Group R に含まれた *HER2* 遺伝子増幅を認めた 4 例には、抗 EGFR 抗体薬で治療を受けた症例はなかった。

表 5. 抗 EGFR 抗体薬治療を受けた症例における患者背景

a：盲腸、上行結腸、横行結腸　b：下行結腸、S 状結腸

	Group R (n = 17)	Group B (n = 4)	Group H (n = 5)	Group W (n = 49)
年齢中央値（範囲）	66 (28–82)	69 (29–81)	65 (56–81)	64 (41–79)
性別、n (%)				
男性	10 (58.9)	2 (50.0)	1 (20.0)	30 (61.2)
女性	7 (41.1)	2 (50.0)	4 (80.0)	19 (38.8)
診断時病期（UICC第7版）、n (%)				
I–III	6 (35.3)	3 (75.0)	1 (20.0)	26 (53.1)
IV	11 (64.7)	1 (25.0)	4 (40.0)	23 (46.9)
原発部位、n (%)				
右側結腸[a]	9 (52.9)	2 (50.0)	1 (20.0)	6 (12.2)
左側結腸[b]	2 (11.8)	1 (25.0)	3 (60.0)	18 (36.7)
直腸	6 (35.3)	1 (25.0)	1 (20.0)	25 (51.0)
抗EGFR抗体薬の治療ライン、n (%)				
≤2	3 (17.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (18.4)
3	11 (64.7)	4 (100.0)	5 (100.0)	32 (65.3)
≥4	3 (17.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (16.3)
治療内容、n (%)				
イリノテカン併用	14 (82.4)	2 (50.0)	3 (60.0)	35 (71.4)
単剤	3 (17.6)	2 (50.0)	2 (40.0)	14 (28.6)



追跡対象者					
Group R	17	1	0	0	0
Group B	4	0	0	0	0
Group H	5	0	0	0	0
Group W	49	24	8	5	3

図 9：グループ別無増悪生存期間（PFS）

抗 EGFR 抗体薬による治療の PFS の中央値は Group R で 2.2 か月、Group B で 1.2 か月、Group H で 2.6 か月、Group W で 6.0 か月であり、Group W は他のグループと比して有意に良好であった。

考　　察

本研究では、本邦における切除不能進行・再発大腸癌における *HER2* 遺伝子増幅割合、およびその評価方法について検討を行い、さらに *HER2* 遺伝子増幅が生命予後に与える影響、および抗 EGFR 抗体薬の治療効果予測因子としての役割について検討を行った。これまでに報告された研究において、*HER2* 遺伝子増幅を認める切除不能大腸癌に対する抗 EGFR 抗体薬の治療効果や生命予後を、すでに確立した抗 EGFR 抗体薬治療のバイオマーカーである *RAS* 遺伝子変異、*BRAF* 遺伝子変異と比較した研究はなく、本研究が初めての報告となる。

本研究で行った切除不能大腸癌の手術検体を用いた検討において、*HER2* 遺伝子増幅は 4.1%（15/370 例）に認められ、この頻度は海外からなされたこれまでの報告と同等であった。病理組織標本の検討方法として TMA 標本および Whole section 標本を用いた検討の比較を行った結果、TMA 標本を用いた検討では、IHC score が 0 であっても FISH にて *HER2* 遺伝子増幅を認める症例が認められた（4/370 例: 1.1%)。そのような症例は、Whole section 標本における検討で腫瘍内の HER2 IHC 陽性細胞の割合が少なかったため（腫瘍全体の 20～30%)、TMA 標本を作製する際に HER2 IHC 陽性細胞の存在しない部分を選択する可能性があることが、IHC score と FISH における *HER2* 遺伝子増幅の乖離が生じた原因であると考えられた。これらの結果より、切除不能大腸癌における *HER2* 遺伝子増幅を正確に診断するためには、手術標本の Whole section 標本を用いた検討が望ましいことが示唆された。しかしながら、日常臨床では手術検体ではなく生検検体を用いて組織診断や免疫染色を行う機会も多いため、今後は生検検体を用いて *HER2* 遺伝子増幅を評価した場合の結果を、手術検体を用いて評価した場合の結果と比較することが必要であると考えられる。

本研究における *HER2* 遺伝子増幅は、*RAS*/*BRAF* 遺伝子野生型に限れば 7.7%に認められ、全体の 4.1%と比較して高い割合であった。先行研究においても、*HER2* 遺伝子増幅は *RAS* 変異型よりも *RAS* 野生型の症例において多くみられることが示されている（Richman SD et al. J Pathol. 2016)。この理由は明らかになっていないが、*RAS* 変異型の症例では、がんの発生・進展において直接的に重要な役割を果たすドライバー遺伝子の役割を、すでに *RAS* 遺伝子変異が担っているために、*HER2* 遺伝子増幅のような他のドライバー遺伝子異常を必要としないた

めと考えられる。本研究において、強力なドライバー遺伝子である *BRAF* V600E 遺伝子の変異を認める症例では *HER2* 遺伝子増幅を認めなかったことや、既報にて *BRAF* 遺伝子変異と *RAS* 遺伝子変異が排他的に存在していると報告されていることも（Smith CG et al. Clin Cancer Res. 2013）、この仮説を支持していると考えられた。

HER2 遺伝子増幅と患者背景因子との関係についてはいくつかの報告があるが、Sartore-Bianchi らは、特に左側結腸および直腸に *HER2* 遺伝子増幅が多くみられることを報告している（Sartore-Bianchi A et al. ASCO-GI 2018）。本研究でも *HER2* 遺伝子増幅を認めた 15 例のうち 12 例が左側結腸もしくは直腸原発であり、既報と同様の傾向があると言えるが、本研究のコホートは左側結腸および直腸原発の症例が多くを占めている（277/359 例：77.2%）ことから、解釈には注意が必要である。

これまでの報告において、特に乳癌では、*HER2* 遺伝子増幅を認める腫瘍は高い細胞分裂能および化学療法への抵抗性をもつことが指摘されており、独立した予後不良因子とされている（Slamon DJ et al. Science. 1987）。しかしながら、切除不能大腸癌において *HER2* 遺伝子増幅が生命予後に関係しているかはまだ不明であった。Ingold-Heppener らは、1945 例の大腸癌の検討を行い、*HER2* 遺伝子増幅をもつ症例は *HER2* 遺伝子増幅をもたない症例よりも予後が不良であると報告したが（Ingold-Heppner B et al. Br J Cancer. 2014）、Richman らは複数の臨床試験のメタ解析により、*HER2* 遺伝子増幅の有無によって予後に差は見られないと報告している（Richman SD et al. J Pathol. 2016）。本研究では、対象症例を *RAS* 遺伝子変異、*BRAF* V600E 遺伝子変異、*HER2* 遺伝子増幅の有無によって 4 つのグループに分けて検討した結果、*HER2* 遺伝子増幅をもつ症例（Group H）は、*RAS* 変異および *BRAF* 遺伝子変異および *HER2* 遺伝子増幅をもたない症例（Group W）よりも予後が不良な傾向があることが示唆された。また、*HER2* 遺伝子増幅をもつ症例（Group H）の予後は *RAS* 遺伝子変異をもつ症例（Group R）とは同様の予後であることも示唆された。この結果は、*HER2* 遺伝子増幅がドライバー遺伝子として細胞の増殖に与える影響は、*RAS* 遺伝子と同等であることを示唆していると考えられる。

また、本研究では *RAS* 遺伝子変異、*BRAF* 遺伝子変異、*HER2* 遺伝子増幅の有無と抗 EGFR 抗体薬による治療効果の検討を行った。これ

までの報告で、抗 EGFR 抗体薬の 1 つであるセツキシマブを用いて治療を行った 142 例の *RAS*/*BRAF* 野生型患者において、*HER2* 遺伝子増幅を持つ症例は抗 EGFR 抗体薬の PFS が短いことが示唆されていたが（Jeong JH et al. Clin Colorectal Cancer. 2017）、本研究においても同様の結果が得られた。その理由として、*HER2* 遺伝子増幅がある場合は、EGFR からのシグナルを阻害したとしても HER2 タンパクが形成する二量体を介して MAPK 経路のシグナル伝達が行われるため、結果として *RAS* 遺伝子変異による MAPK 経路の活性化と同様の機序によって、抗 EGFR 抗体薬の治療抵抗性の原因となっていることが考えられる。これらの知見は既に基礎研究によって示されているが（Bertotti A et al. Nature. 2015）、本研究の結果は臨床的側面からもその説を支持しているといえる。

本研究における限界点として、3 つの点が上げられる。第一に、転移・再発大腸癌患者のうち、原発巣切除を受けた症例のみを本研究の対象としていることである。手術検体のみに対象を限定したのは、HER2 タンパク発現の陽性割合を詳細に確認する必要があったためであるが、このことが生命予後を実際よりも良好に見せている可能性がある。なぜならば、転移・再発大腸癌において原発切除が不可能な症例は全身状態が不良、もしくは病勢の進行が急速であることが多く、そのような症例は予後が不良と予想されるからである。第二に、抗 EGFR 抗体薬の治療効果を 2 次治療、3 次治療、それ以降などすべてをまとめて解析していることである。抗 EGFR 抗体薬単剤、もしくはイリノテカン不応となった後の抗 EGFR 抗体薬＋イリノテカン療法に治療レジメンは統一されているものの、治療ラインの違いによって治療効果に違いが生じる可能性はあり得ると思われる。第三に、本研究のサンプルサイズが生命予後や抗 EGFR 抗体薬の治療効果について結論を下すには小さかったことが挙げられる。本研究における大腸癌での *HER2* 遺伝子増幅の割合は 4%と希少であり、サンプルサイズの拡大は難しい側面もあるが、可能であればより大きなコホートでさらなる検討が望まれる。

近年、*HER2* 遺伝子増幅を認める切除不能大腸癌に対する抗 *HER2* 療法の臨床試験がいくつか報告されはじめている。イタリアで行われた単アーム第Ⅱ相試験である HERACLES 試験では、トラスツズマブとラパチニブの併用療法により 30.0%の奏効率が得られており、標準治療終了後のサルベージ治療としては非常に良好な結果であった（Sartore BA et al. Lancet Oncol. 2016）。さらに、現在米国で行われている

MyPathway 試験ではトラスツズマブとペルツズマブの併用療法が行われており、中間解析ではあるが 38.4%という良好な奏効率が報告されている（Hurwitz H et al. J Clin Oncol. 2017）。MyPathway 試験では、HER2 陽性の適格基準を従来の評価法であった IHC/ISH 法に限定せず、腫瘍組織を用いた次世代シーケンサーによる解析によって *HER2* 遺伝子増幅を認める症例も登録可能としている点が特徴である。

現在、本研究の結果を基として、本邦においても HER2 陽性大腸癌に対してトラスツズマブとペルツズマブの併用療法を行う単アーム第Ⅱ相試験が計画、実施されている（TRIUMPH 試験：Nakamura Y et al. Ann Oncol. 2017)。前向き介入臨床試験である本試験の目的は、HER2 陽性切除不能大腸癌に対するトラスツズマブとペルツズマブの有効性を証明することであるが、本試験の登録予定症例数は 25 例と少数であるため、この試験の結果のみでトラスツズマブとペルツズマブの有効性を判断することは難しいと思われる。そのため、同一の薬剤によって治療を行っている MyPathway 試験との試験間における統合解析が予定されているほか、HER2 陽性大腸癌の症例の中で、抗 HER2 療法を行わなかった患者の自然史を別途収集することで本試験の仮想対照群とし、治療群との比較を行うことが予定されている。この解析により、本試験は通常の単アームの第Ⅱ相試験と比較して強固なエビデンスを構築することが期待されている。

多数の臨床試験グループで臨床試験が行われることで、*HER2* 遺伝子増幅をもつ切除不能大腸癌に対する抗 HER2 療法のエビデンスが構築されることは非常に好ましいが、各試験の HER2 陽性基準、および適格基準が異なるため、各試験の結果の比較については注意が必要である。特に複数の研究グループの結果の統合解析を行う場合は、前述のように研究ごとに異なる診断基準を用いているという問題点を解決しなくてはならない。そのため、TRIUMPH 試験では従来の IHC/FISH 法によって *HER2* 遺伝子増幅の有無を確認する以外に、探索的に MyPathway 試験と同様に次世代シーケンサーを用いた *HER2* 遺伝子増幅の検討を行い、両試験の対象患者の比較を行うためのデータを収集している。また、従来の IHC/FISH 法であっても、IHC score の定義をどのように設定するか（細胞膜の染色強度の定義、染色範囲の定義など)、あるいは HER2 陽性細胞の割合のカットオフ値をどのように設定するかを研究グループ内で統一するため、MyPathway 試験の母体である米国の研究グループだけではなく、HERACLES 試験におけるデータ

を蓄積しているイタリアの研究グループも含め、最も適切な大腸癌における HER2 診断基準について国際的協調ができることをめざしている。2019 年には大腸癌における HER2 診断国際コンセンサスが発表される予定であり、今後のより一層の *HER2* 遺伝子増幅をもつ切除不能大腸癌における治療開発が進むことが期待されている。

総括および結論

①本研究全体から得られた新知見

・本邦における切除不能大腸癌における *HER2* 遺伝子増幅の割合が 4.1%と、海外の先行研究と同等であることが示された。

・*HER2* 遺伝子増幅および HER2 タンパクの過剰発現はすべての癌細胞に均等にみられるわけではないため、TMA 標本を用いた検討では *HER2* 遺伝子増幅を認める症例を見落とす可能性があることが示され、Whole section 標本を用いた検討が望ましいことが示された。

・切除不能大腸癌において、*HER2* 遺伝子増幅を認める症例は、*RAS* 遺伝子変異および *BRAF* V600E 遺伝子変異および *HER2* 遺伝子増幅をすべて認めない症例と比較し、予後が不良な傾向があった。

・切除不能大腸癌における抗 EGFR 抗体薬を用いた治療において、*HER2* 遺伝子増幅を認める症例は PFS が短く、*HER2* 遺伝子増幅は抗 EGFR 抗体薬の負の治療効果予測因子である可能性が示された。

②新知見の意義

・これまで、本邦における *HER2* 遺伝子増幅を認める切除不能大腸癌の頻度は一定の見解が得られていなかったが、本研究によって海外からの先行研究と同等の頻度であることが示されたことで、本邦における新規臨床試験計画の際の基礎データとなった。

・*HER2* 遺伝子増幅をもつ大腸癌は予後不良な傾向にあることから、新規治療の開発の必要性が高いことが改めて示された。

・*HER2* 遺伝子増幅が、大腸癌における抗 EGFR 抗体薬に対する新規バイオマーカーとして有望であることが示された。

③本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

・手術検体における Whole section 標本を用いた *HER2* 遺伝子増幅の診断を Gold standard としたときの、生検検体を用いた場合の検査感度、特異度を検討する研究

・本邦における *HER2* 遺伝子増幅を伴う切除不能大腸癌に対する抗 HER2 治療を用いる臨床研究

・従来の IHC/FISH 法を用いた *HER2* 遺伝子増幅の診断と、次世代シーケンサーを用いた *HER2* 遺伝子増幅のデータの一致性を確認する研究

④今後の課題

・本邦におけるより大きなコホートでの *HER2* 遺伝子増幅症例割合、生命予後等の検討

・生検検体を用いた *HER2* 遺伝子増幅割合の検討

・切除不能大腸癌に対する抗 HER2 療法の臨床試験のデータの蓄積、およびデータの統合解析に必要な HER2 診断基準の作成

謝　　辞

本研究の実施および本論文の作製において、以下の先生方に御指導いただきました。この場をお借りして深謝申し上げます。

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
藤井　誠志　先生

国立がん研究センター東病院　消化管内科
吉野　孝之　先生、久保木　恭利　先生、中村　能章　先生

国立がん研究センター東病院　臨床研究支援部門
岡本　渉　先生

北海道大学大学院医学研究院　消化器内科学講座
坂本　直哉　先生

北海道大学病院　消化器内科
結城　敏志　先生、大西　俊介　先生、川本　泰之　先生

北海道大学病院　腫瘍センター
小松　嘉人　先生

京都桂病院　消化器内科
山口　大介　先生

横浜市立大学　医学部　臨床統計学講座
山中　竹春　先生

さらに，本研究に御協力いただきました国立がん研究センター東病院　消化管内科　中村優香様、国立がん研究センター東病院　病理検査室　検査技師の方々に心より厚く御礼申し上げます。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（Japan Agency for Medical Research and Development; AMED）岡本班

16lk0201054h0001 の助成を受けたものである。

利　益　相　反

この研究発表の内容に関する利益相反事項はありません。

引用文献

国立がん研究センターがん情報サービス：
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html. Accessed December 12, 2018.

Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K., Yamamoto, T. (1986). The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science. 232, 1644-1646.

Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R. et al. (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 26, 1626-1634.

Amler, L.C. (2010). HER3 mRNA as a predictive biomarker in anticancer therapy. Expert Opin. Biol. Ther. 10, 1343-1355.

Bang, Y.J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H.C., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T. et al. (2010). 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.

Benson, A.B., Venook, A.P., Al-Hawary, M.M., Cederquist, L., Chen, Y.J., Ciombor, K.K., Cohen, S., Cooper, H.S., Deming, D, Engstrom, P.F. et al. (2018). NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. J. Natl. Compr. Cancer. Netw. 16, 359-369.

Bertotti, A., Migliardi, G., Galimi, F., Sassi, F., Torti, D., Isella, C., Corà, D., Di-Nicolantonio, F., Buscarino, M., Petti, C. et al. (2011). A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts (“xenopatients”) identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. Cancer Discov. 1, 508-523.

Bertotti, A., Papp, E., Jones, S., Adleff, V., Anagnostou, V., Lupo, B. Sausen, M., Phallen, J., Hruban, C.A., Tokheim, C. et al. (2015). The genomic landscape of response to EGFR blockade in colorectal cancer. Nature. 526, 263-267.

Cassidy, J., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., Koski, S., Lichinitser, M., Yang, T.S., Rivera, F. et al. (2008). Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 26, 2006-2012.

Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U. et al. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science. 230, 1132-1139.

Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., De Dosso, S., Mazzucchelli, L., Frattini, M., Siena, S. et al. (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 26, 5705-5712.

Garde, N.J., Jantus-Lewintre, E., Gil-Raga, M., Evgenyeva, E., Maciá, E.S., Llombart-Cussac, A., Camps, H.C. (2017). Role of RAS mutation status as a prognostic factor for patients with advanced colorectal cancer treated with first-line chemotherapy based on fluoropyrimidines and oxaliplatin, with or without bevavizumab: A retrospective analysis. Mol. Clin. Oncol. 6, 403-406.

Gong, J., Cho. M., Sy, M., Salgia, R., Fakih, M. (2017). Molecular profiling of metastatic colorectal tumors using next-generation sequencing: a single-institution experience. Oncotarget. 8, 42198-42213.

Grothey, A., Sargent, D., Goldberg, R.M., Schmoll, H.J. (2004). Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of

treatment. J. Clin. Oncol. 22, 1209-1214.

Heinemann, V., von Weikersthal, L.F., Decker, T., Kiani, A., Vehling-Kaiser, U., Al-Batran, S.E., Heintges, T., Lerchenmüller, C., Kahl, C., Seipelt, G. et al. (2014). FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet. Oncol. 15, 1065-1075.

Hurwitz, H., Raghav, K., Burris, H.A., Kurzrock, R., Sweeney, C., Meric-Bernstam, F., Vanderwalde, A.M., Spigel, D.R., Bose, R., Fakih, M. et al. (2017). Pertuzumab + trastuzumab for HER2-amplified/overexpressed metastatic colorectal cancer (mCRC): Interim data from MyPathway. J. Clin. Oncol. 35 (suppl_4), 676-676.

Ingold-Heppner, B., Behrens, H.M., Balschun, K., Haag, J., Krüger, S., Becker, T., Röcken, C. (2014). HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma. Br. J. Cancer. 111, 1977-1984.

Jeong, J.H., Kim, J., Hong, Y.S., Kim, D., Kim, J.E., Kim, S.Y., Kim, K.P., Yoon, Y.K., Kim, D., Chun, S.M. et al. (2017). HER2 amplification and cetuximab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer harboring wild-type RAS and BRAF. Clin. Colorectal Cancer. 16, e147-e152

Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Karapetis, C.S., Zalcberg, J.R., Tu, D., Au, H.J., Berry, S.R., Krahn, M., Price, T., Simes, R.J. et al. (2007). Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 357, 2040-2048.

Karapetis, C.S., Khambata-Ford, S., Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Tu, D., Tebbutt, N.C., Simes, R.J., Chalchal, H., Shapiro, J.D., Robitaille, S. et al. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 359, 1757-1765.

Kim, T.W., Elme, A., Park, J.O., Udrea, A.A., Kim, S.Y., Ahn, J.B., Valencia, R.V., Krishnan, S, Manojlovic, N., Guan, X. (2018). Final analysis of outcomes and RAS/BRAF status in a randomized phase 3 study of

panitumumab and best supportive care in chemorefractory wild type KRAS metastatic colorectal cancer. Clin. Colorectal Cancer. 17, 206-214.

Lito, P., Rosen, N., Solit, D.B. (2013). Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. Nat. Med. 19, 1401-1409.

Maughan, T.S., Adams, R.A., Smith, C.G., Meade, A.M., Seymour, M.T., Wilson, R.H., Idziaszczyk, S., Harris, R., Fisher, D., Kenny, S.L. et al. (2011). Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. Lancet. 377, 2103-2114.

Nakamura, Y., Okamoto, W., Sawada, K., Komatsu, Y., Kato, K., Taniguchi, H., Kato, T., Nishina, T., Esaki, T., Nomura, H. et al. (2017). 612TiP TRIUMPH Study: A multicenter Phase II study to evaluate efficacy and safety of combination therapy with trastuzumab and pertuzumab in patients with HER2-positive metastatic colorectal cancer (EPOC1602). Ann. Oncol. 28 (suppl_5), mdx393.137.

Poon, M.A., O'Connell, M.J., Moertel, C.G., Wieand, H.S., Cullinan, S.A., Everson, L.K., Krook, J.E., Mailliard, J.A., Laurie, J.A., Tschetter, L.K. (1989). Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. J. Clin. Oncol. 7, 1407-1418.

Price, T.J., Peeters, M., Kim, T.W., Li, J., Cascinu, S., Ruff, P., Suresh, A.S., Thomas, A., Tjulandin, S., Zhang, K. et al. (2014). Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. Lancet Oncol. 15, 569-579.

Richman, S.D., Southward, K., Chambers, P., Cross, D., Barrett, J., Hemmings, G., Taylor, M., Wood, H., Hutchins, G., Foster, J.M. (2016). HER2 overexpression and amplification as a potential therapeutic target in colorectal cancer: analysis of 3256 patients enrolled in the QUASAR, FOCUS

and PICCOLO colorectal cancer trials. J. Pathol. 238, 562–570.

Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, PA. et al. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. N. Engl. J. Med. 353, 1673-1684.

Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirotta, N. et al. (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. N. Engl. J. Med. 343, 905-914.

Sanz-Garcia, E., Argiles, G., Elez, E, Tabernero, J. (2017). BRAF mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives. Ann. Oncol. 28, 2648-2657.

Sartore-Bianchi, A., Trusolino, L., Martino, C., Bencardino, K., Lonardi, S., Bergamo, F., Zagonel, V., Leone, F., Depetris, I., Martinelli, E. et al. (2016). Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol. 17, 738-746.

Sartore-Bianchi, A., Amatu, A., Porcu, L., Ghezzi, S., Lonardi, S., Bergamo, F., Bonazzina, E.F., Mauri, G., Cremolini, C., Ciardiello, F. et al. (2018). Clinicopathological characteristics and HER2 status in metastatic colorectal cancer patients: Results of a diagnostic model development study. J. Clin. Oncol. 36 (suppl_4), 581-581.

Shabbir, A., Mirza, T., Khalid, A.B., Qureshi, M.A., Asim, S.A. (2016). Frequency of Her2/neu expression in colorectal adenocarcinoma: a study from developing South Asian Country. BMC Cancer. 16, 855.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with

amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 235, 177-182.

Smith, C.G., Fisher, D., Claes, B., Maughan, T.S., Idziaszczyk, S., Peuteman, G., Harris, R., James, M.D., Meade, A., Jasani, B., et al. (2013). Somatic profiling of the epidermal growth factor receptor pathway in tumors from patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy ± cetuximab. Clin. Cancer Res. 19, 4104-4113.

Taniguchi, H., Okamoto, W., Muro, K., Akagi, K., Hara, H., Nishina, T., Kajiwara, T., Denda, T., Hironaka, S., Kudo, T. et al. (2018). Clinical Validation of Newly Developed Multiplex Kit Using Luminex xMAP Technology for Detecting Simultaneous RAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer: Results of the RASKET-B Study. Neoplasia. 20, 1219-1226.

Tournigand, C., André, T., Achille, E., Lledo, G., Flesh, M., Mery-Mignard, D., Quinaux, E., Couteau, C., Buyse, M., Ganem, G. et al. (2004). FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. J. Clin. Oncol. 22, 229-237.

Van Cutsem, E., Peeters, M., Siena, S., Humblet, Y., Hendlisz, A., Neyns, B., Canon, J.L., Van Laethem, J.L., Maurel, J., Richardson, G., et al. (2007). Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 25, 1658-1665.

Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, JH., Aderka, D, Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., et al. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. Ann. Oncol. 27, 1386-1422.

Venook A. (2005). Critical evaluation of current treatments in metastatic colorectal cancer. Oncologist. 10, 250-261.

Yoshino, T., Muro, K., Yamaguchi, K., Nishina, T., Denda, T., Kudo, T.,

Okamoto, W., Taniguchi, H., Akagi, K., Kajiwara, T. et al. (2015). Clinical Validation of a Multiplex Kit for RAS Mutations in Colorectal Cancer: Results of the RASKET (RAS KEy Testing) Prospective, Multicenter Study. EBioMedicine. 2, 317-323.

Yoshino, T., Arnold, D., Taniguchi, H., Pentheroudakis, G., Yamazaki, K., Xu, RH., Kim, T.W., Ismail, F., Tan, I.B., Yeh, K.H. et al. (2018). Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS.
Ann. Oncol. 29, 44-70.