

CASE REPORT

# ALK immunohistochemistry (IHC) 陽性, EML4-ALK fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 判定不能の肺腺癌に対して crizotinib が奏効した 1 症例

横山琢磨<sup>1</sup>・高田佐織<sup>1</sup>・大塚弘毅<sup>2</sup>・  
藤原正親<sup>3</sup>・滝澤 始<sup>1</sup>・後藤 元<sup>1</sup>

## Successful Treatment with Crizotinib in a Case of Lung Adenocarcinoma Positive on ALK Immunohistochemistry but Indeterminate on EML4-ALK Fluorescence *In Situ* Hybridization

Takuma Yokoyama<sup>1</sup>; Saori Takata<sup>1</sup>; Hiroki Otsuka<sup>2</sup>;  
Masachika Fujiwara<sup>3</sup>; Hajime Takizawa<sup>1</sup>; Hajime Goto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, <sup>3</sup>Department of Pathology, Kyorin University School of Medicine, Japan.

**ABSTRACT** — **Background.** The EML4-ALK (echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase) fusion gene is an oncogenic driver mutation observed in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Crizotinib has been shown to be effective in treating EML4-ALK-rearranged NSCLC detected using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Case.** A 54-year-old male was diagnosed with adenocarcinoma of the lungs. We evaluated the presence of the EML4-ALK fusion gene in two specimens, a pretherapeutic specimen and a specimen obtained after the subsequent administration of third-line chemotherapy. The results of both examinations were positive on ALK immunohistochemistry but indeterminate on EML4-ALK FISH. However, treatment with crizotinib was effective. The incidence of indeterminate EML4-ALK FISH results at our hospital is 13 of 23 samples (57%). In our facility, mercurochrome is used to mark the tissue prior to embedding, and, because mercurochrome has a fluorescent green color, this makes it difficult to assess the results of specimens examined using EML4-ALK FISH. **Conclusions.** In order to correctly diagnose EML4-ALK-rearranged NSCLC, it is essential to appropriately store and identify effective means of processing tissue specimens to accurately detect the ALK fusion gene.

(JLCC. 2013;53:893-898)

**KEY WORDS** — EML4-ALK-rearranged non-small cell lung cancer, Crizotinib, EML4-ALK FISH, Mercurochrome

Reprints: Takuma Yokoyama, Department of Respiratory Medicine, Kyorin University School of Medicine, 6-20-2 Shinkawa, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan.

Received August 11, 2013; accepted December 13, 2013.

**要旨** — **背景.** echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase (EML4-ALK) 融合遺伝子は、非小細胞肺癌における oncogenic driver mutation の 1 つである。crizotinib は fluorescence *in situ* hybridization (FISH) で EML4-ALK 陽性の肺癌 (ALK 肺癌) に対して有効性が示されている。**症例.** 54 歳男性、肺腺

癌。初診時と 3 次治療後の組織検体はどちらも ALK immunohistochemistry は陽性、EML4-ALK FISH は判定不能であったが、crizotinib を開始し、良好な奏効を認めた。当院でこれまでに提出した EML4-ALK FISH の検査結果は 13/23 (57%) が判定不能であった。当院で包埋前の組織マーキング時に使用されていたマーキュロクロムは、

杏林大学医学部付属病院 <sup>1</sup>呼吸器内科, <sup>2</sup>臨床検査医学, <sup>3</sup>病理学教室。  
別刷請求先: 横山琢磨, 杏林大学医学部付属病院呼吸器内科,

〒181-8611 東京都三鷹市新川 6-20-2。  
受付日: 2013 年 8 月 11 日, 採択日: 2013 年 12 月 13 日。

緑色に蛍光発色するため、FISHの評価を困難にする。結論。ALK肺癌の正確な診断には、検体の保存や処理方法の確認をすることも重要であると考えられた。

## はじめに

EML4-ALK (echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase) 遺伝子は、2007年に間野らによって初めて発見された非小細胞肺癌における driver oncogene の1つである。<sup>1</sup> ALK阻害薬である crizotinib は、EML4-ALK fluorescence *in situ* hybridization (FISH) で EML4-ALK 陽性と診断された肺癌 (ALK肺癌) に対して高い奏効が証明され、<sup>2</sup> 2012年には本邦でも実地診療で使用が可能となった。ALK肺癌に対する治療戦略として、診断が極めて重要であるが、検体採取、検査方法、偽陰性などの問題が報告されている。<sup>3,4</sup> 今回、ALK immunohistochemistry (IHC) が陽性、EML4-ALK FISH が判定不能の肺腺癌に対し、crizotinib が奏効した症例を経験した。実地診療における課題について考えさせられた症例であり、報告する。

## 症例

症例：54歳男性。

主訴：咳嗽、喀痰。

既往歴：特記事項なし。

家族歴：父が胃癌。

喫煙歴：30本/日×25年間。

現病歴：2010年8月上旬より咳嗽、喀痰が出現。画像検査にて、左S<sup>9</sup>に3cm大の腫瘤陰影、縦隔リンパ節の腫大を認めた。気管支鏡検査を施行し、肺腺癌 cT2aN3M0 stage IIIB, epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子変異：wild type と診断。1次治療：cisplatin/pemetrexed×4コース、2次治療：carboplatin/paclitaxel/bevacizumab (Bev)×6コース、Bev維持療法×4コース、3次治療：docetaxel×8コースを行った後、再増悪となり、治療目的に入院となった。

入院時現症：身長164cm、体重59kg、意識清明、体温36.2℃。呼吸音清、下肢に軽度の浮腫を認めた。

入院時検査所見 (Table 1)：Hb 12.7 g/dl と軽度の貧血、CRP 1.9 mg/dl、CEA 110.8 ng/ml と上昇を認めた。

胸部単純X線写真：左下肺野に約4.8cmの腫瘤陰影を認めた (Figure 1a)。

胸部CT：左S<sup>9</sup>に辺縁不整の腫瘤陰影、左胸水、縦隔リンパ節の腫大を認めた (Figure 2a, 2b)。

病理組織所見：腫大した類円形核とPAS陽性、好酸性

索引用語——EML4-ALK 転座肺癌, Crizotinib, EML4-ALK FISH, マーキュロクロム

の細胞質を有する異型細胞の充実性増殖を認めた (Figure 3a)。TTF-1, napsin A, p63 (Figure 3b~3d), SP-A, CK903, CK7が陽性、CK20が陰性であり、これらは2010年初診時と同じ染色パターンであった。

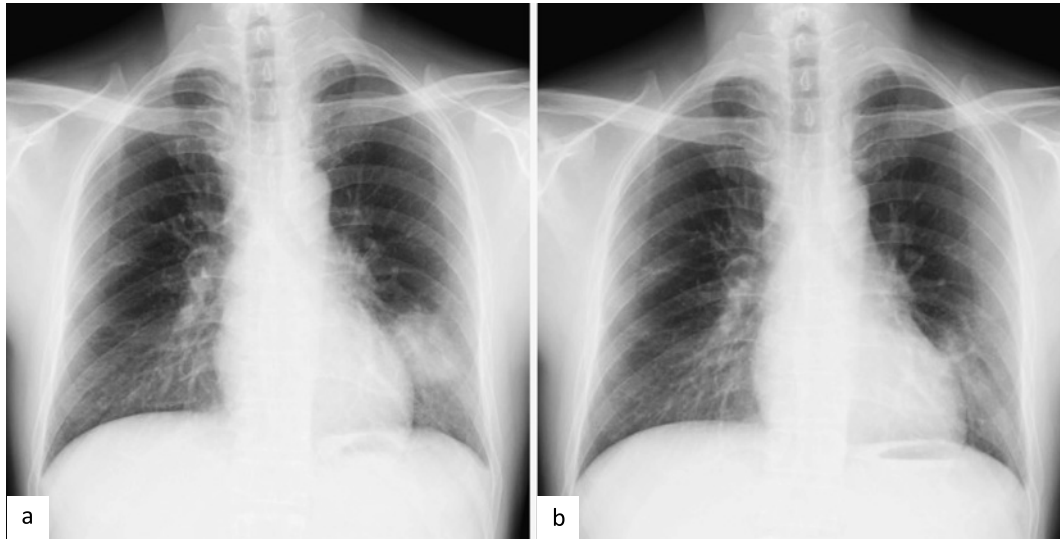
臨床経過：初診時の組織検体では、ALK IHC は陽性 (Figure 4)、EML4-ALK FISH は判定不能であったため、再度、左S<sup>9</sup>の病変に対して経気管支肺生検を行い、EML4-ALK 遺伝子について再検した。しかし、前回と同様 IHC は陽性、FISH は判定不能であった。ALK肺癌として、2012年8月より crizotinib (500 mg/日) を開始した。投与4日目には、左下肺野の腫瘤陰影は縮小し、投与20日目にはさらなる縮小を認め (Figure 1b)、胸部CTにて奏効を認めた (Figure 2c, 2d)。有害事象は、投与2日目よりG1の下痢、霧視が出現、G1のAST/ALT上昇を認めた。本症例は crizotinib に良好な奏効を示したため、c-MET についても調べたが FISH は判定不能であった。また、EML4-ALK 遺伝子を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) で診断するために、再度気管支鏡検査を行ったが、原発巣はかなり縮小しており、細胞診は class II、RT-PCR は陰性であった。

## 考察

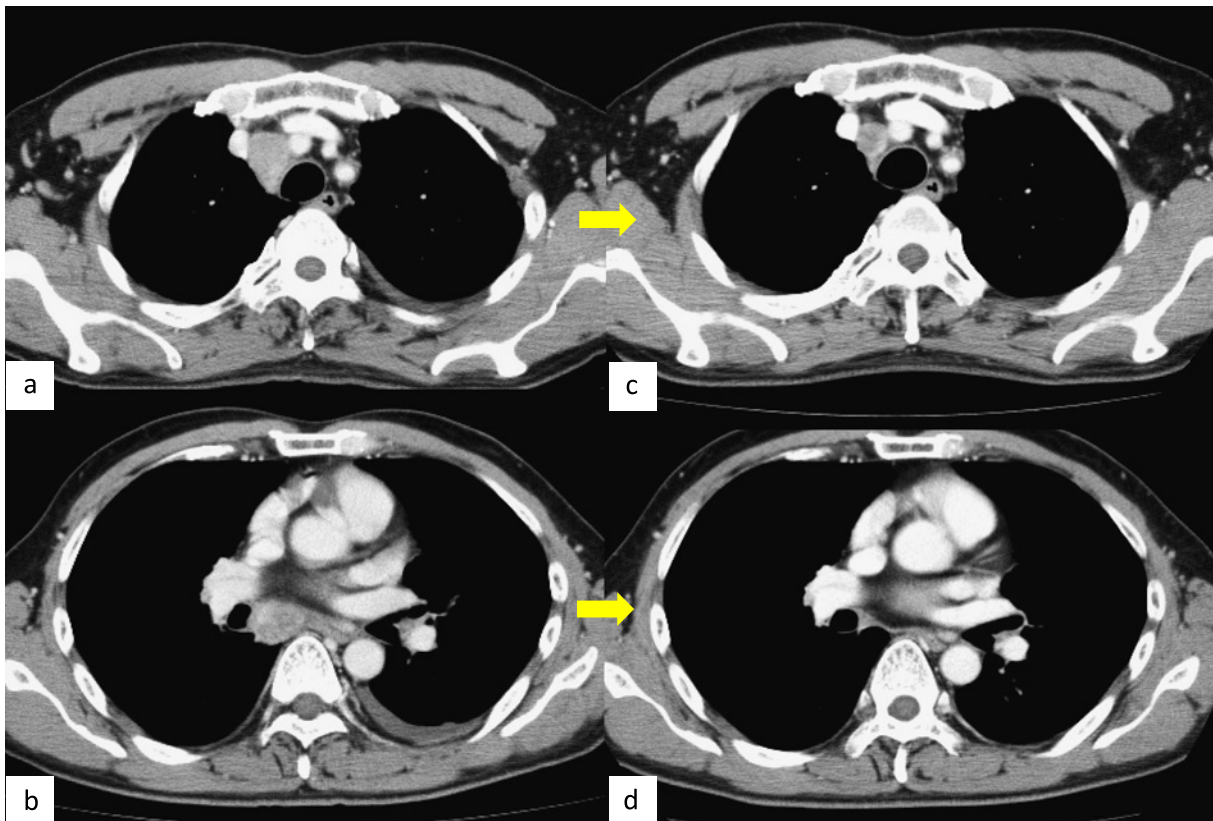
2007年に間野らによって、微小管会合タンパク EML4 遺伝子と受容体チロシンキナーゼ ALK 遺伝子が融合し

Table 1. Laboratory Data on Admission

< Hematology >		< Blood chemistry >	
WBC	6400/μl	TP	7.0 g/dl
RBC	464×10 <sup>4</sup> /μl	Alb	3.8 g/dl
Hb	12.7 g/dl	T-Bil	0.7 mg/dl
Ht	39.3%	AST	18 U/l
Plt	26.5×10 <sup>4</sup> /μl	ALT	12 U/l
		γ-GTP	26 U/l
< Serology >		LDH	289 U/l
CRP	1.9 mg/dl	ALP	280 U/l
		UA	4.2 mg/dl
< Tumor markers >		BUN	16.5 mg/dl
CEA	110.8 ng/ml	Cr	0.9 mg/dl
SLX	35 U/ml	Na	138 mEq/l
		K	4.5 mEq/l
		Cl	95 mEq/l
		Ca	9.2 mg/dl
		CRP	1.9 mg/dl



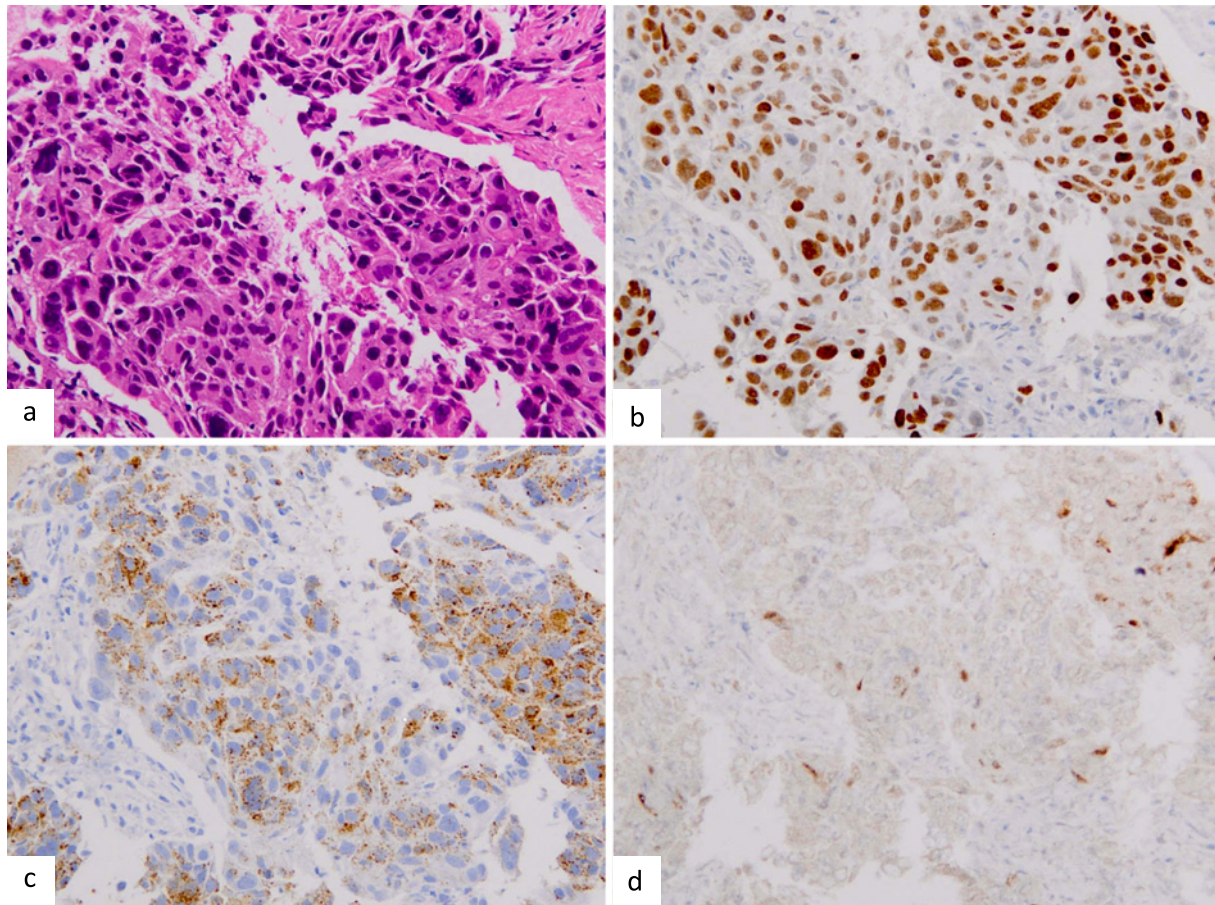
**Figure 1.** Chest X-ray on admission. (a) A mass shadow in the left lower lung field (day 0). (b) Appearance after the administration of crizotinib (day 20).



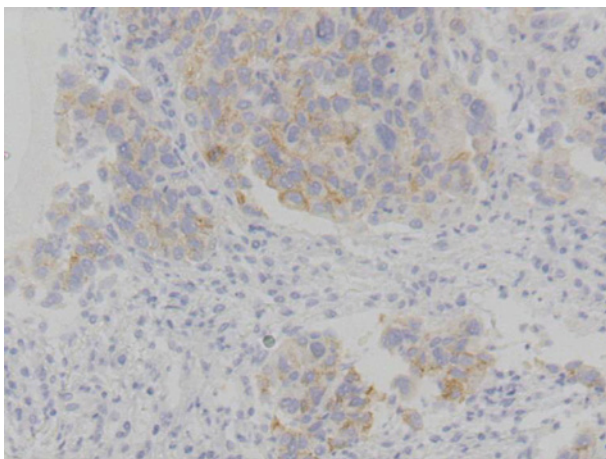
**Figure 2.** Enhanced chest computed tomography scan showing #2R and #7 lymph nodes with lymphadenopathy. (a, b) Appearance on admission. (c, d) Appearance after the administration of crizotinib (day 133).

た *EML4-ALK* が非小細胞肺癌の約 5% に発現していることが報告された。<sup>1</sup> crizotinib は *ALK* と *c-MET* を阻害する分子標的薬であり、FISH で *EML4-ALK* 陽性と確認

された肺癌に対して奏効率 57%、病勢制御率 90%、6 ヶ月無再発生存割合 72% と良好な成績が報告されている。<sup>2</sup> このことから、*ALK* 肺癌と確定診断することが治



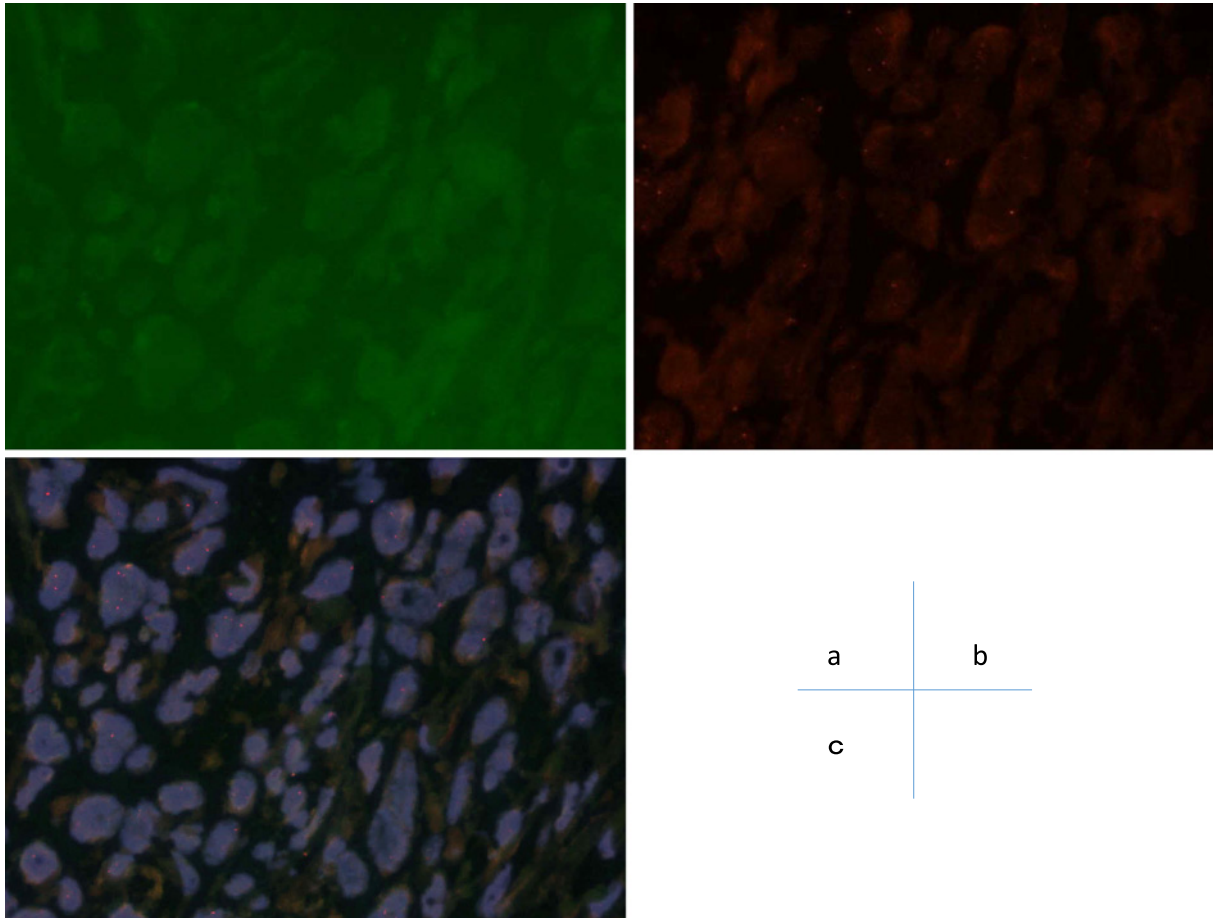
**Figure 3.** Histological and immunohistochemical findings of the primary tumor. (a) Hematoxylin and eosin staining (×40). (b) The thyroid transcription factor 1 expression (×40). (c) The napsin A expression (×40). (d) The p63 expression (×40).



**Figure 4.** Immunohistochemical analysis of the anaplastic lymphoma kinase protein expression in the tumor cells.

療する上で非常に重要なポイントとなる。ALK 肺癌の病理学的特徴は TTF-1 陽性、低分化、cribriform pattern、

solid growth, signet ring cells が多いとされている。<sup>5,6</sup> *EML4-ALK* 遺伝子の診断法として、① IHC (intercalating antibody-enhanced polymer : iAEP),<sup>7</sup> ② FISH, ③ RT-PCR<sup>8</sup> があり、日本肺癌学会バイオマーカー委員会から肺癌患者における *ALK* 遺伝子検査の手引きが示されている。<sup>9</sup> まず、IHC でスクリーニングを行い、FISH で確認することで、その対象を絞るのが適当であるとしている。IHC が陰性であっても、臨床的 (40 歳以下、非喫煙者)、形態学的に *ALK* 肺癌が疑われる場合には、FISH による確認を行ってもよいとし、さらに、IHC 陽性にもかかわらず FISH 陰性という場合には可能な限り RT-PCR での検討が望まれるとしている。本症例は、IHC 陽性、FISH 判定不能であったが、4 次治療であり、有効な治療が乏しく、*ALK* 肺癌として crizotinib による治療を行った。臨床経過から crizotinib が奏効しており、FISH が判定不能であることに疑問を抱いたため、これまで当院で提出した *EML4-ALK* FISH の結果を調べたところ、13/23 (57%) が判定不能であった (13 例の IHC



**Figure 5.** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase (*EML4-ALK*). (a) The 5' DNA probe (green) shows no appreciable signals when employing the 5' band-pass filter due to the fluorescent green background. (b) Only the 3' DNA probe exhibits an isolated red signal with the 3' band-pass filter. (c) The green background fluorescence makes the detection of *EML4-ALK* indeterminate on FISH employing dual-color break-apart probes.

は全て陰性). 日本肺癌学会バイオマーカー委員会によれば, 2012年4月から5月にFISHとIHCが両方行われた2337検体において, 両者の不一致は48検体(2%)であり, そのうちFISH陽性249検体中IHC陰性が36例, IHC陽性225検体中FISH陰性が12例(5%)であった. この不一致例48例中37例について再解析したところ, 7例(19%)がFISH判定不能であった.<sup>4</sup> FISHに相応しくない検体として, 酸脱灰処理した検体, 重金属を含む固定液で固定した検体, 壊死を多く含む検体,<sup>10</sup> 過固定・固定不足の検体,<sup>11</sup> 未染標本作製後, 日数が経った切片検体<sup>12</sup>が示されているが, SRL社に本症例が判定不能と評価された要因を確認したところ, 提出したスライドグラスを処理すると, 背景がgreen signal band-pass filter (*ALK* 遺伝子5'側)と同色の緑色に蛍光発色しており, *ALK* 遺伝子5'側のDNAプローブ(5' DNA)を確認できず判定不能になったことが判明した (Figure

5a~5c). break-apart法によるFISHは*ALK* 遺伝子の3' DNAを赤, 5' DNAを緑の蛍光色素で標識し, 赤と緑のシグナルが離れていることを確認して転座陽性と判定される. 検査・手術などで採取された検体は固定・包埋する前段階で, 組織を見失わないようにするためにマーキングされるが, 当院ではマーキュロクロム (mercurochrome: MC)が用いられていた. MCは背景を緑色に蛍光発色させ, これと同色に蛍光発色する5' DNAが確認できなくなるため判定不能を招くことがわかった. 当院のFISH判定不能は先述の報告に比べて多く, MCからヘマトキシリンに変更して以降, FISHの判定不能はない(0/6:1例は陽性). SRL社からもMCやエオジンなどの色素が付いた検体では解析困難の確率が高くなることを指摘されており, MCは全国の施設でも使用されている可能性があるため, 注意すべき点と思われた. 当院では院外の検査機関でIHCとFISHでの確定診断を行

い、細胞診検体しか用いることができない場合は RT-PCR で確認するようにしている。FISH は標本の切断面や判定医の熟練度で検査結果に影響を及ぼす可能性があるが、RT-PCR は極めて微量な検体でも診断が可能で、感度・特異度ともに優れているとされる。<sup>1</sup> また、複数の EML4-ALK バリエーションに関しては、multiplex RT-PCR によって検出可能である。<sup>8</sup> しかし、検査には新鮮標本が必要であり、RT-PCR に用いられる RNA は非常に不安定であるため、標本採取から遠心分離、冷蔵保存までの工程を 30 分以内に終了することが理想とされ、これは全ての施設において可能という検査ではない。さらに組織診断、EGFR 遺伝子変異の有無が確認されていない状況で検体を保存するべきか、といった問題がある。そのため、本症例のように IHC、FISH が不一致の症例では、RT-PCR を目的とした second biopsy まで考慮することが重要であると考えられる。ALK 肺癌に対する crizotinib の治療は、EML4-ALK 遺伝子の有無を正確に診断することが必須である。IHC、FISH による検査結果の不一致の原因として、検体の処理方法や検体の状況を確認すること、RT-PCR を行うための検体処置・保存が大変重要である。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

本論文の要旨は、第 166 回日本肺癌学会関東支部会にて発表した。

## REFERENCES

- Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448:561-566.
- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:1693-1703.
- Wallander ML, Geiersbach KB, Tripp SR, Layfield LJ. Comparison of reverse transcription-polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization methodologies for detection of echinoderm microtubule-associated proteinlike 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-positive non-small cell lung carcinoma: implications for optimal clinical testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136:796-803.
- 日本肺癌学会バイオマーカー委員会. ALK 遺伝子検査における FISH 法と高感度 IHC 法の不一致についてのお知らせと対応 (第 2 報). 2013. <http://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/589.pdf>
- Wong DW, Leung EL, So KK, Tam IY, Sihoe AD, Cheng LC, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer*. 2009;115:1723-1733.
- Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol*. 2009;22:508-515.
- Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:3143-3149.
- Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6618-6624.
- 光富徹哉, 谷田部恭, 秋田弘俊, 弦間昭彦, 曾田 学, 豊岡伸一, 他. 肺癌患者における ALK 遺伝子検査の手引き. 2011. <http://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/366.pdf>
- Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2013;8:823-859.
- Goldstein NS, Ferkowicz M, Odish E, Mani A, Hastah F. Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2003;120:86-92.
- 伊藤 緑, 柴田典子, 秋野真也, 林 香織, 石田廣次, 谷田部恭. 技術講座 病理 乳がんパラフィン標本における HercepTest と FISH 法の比較. 検査と技術. 2003;31:787-792.