

CASE REPORT

再検査で異なる FISH 結果が得られた EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌の 1 例

勝島詩恵¹・岡田秀明¹・駄賀晴子¹・
井上 健²・武田晃司¹

Different ALK Results Between Two Examinations in a Case of EML4-ALK-positive Lung Cancer

Utae Katsushima¹; Hideaki Okada¹; Haruko Daga¹;
Takeshi Inoue²; Koji Takeda¹

¹Department of Clinical Oncology, ²Department of Pathology, Osaka City General Hospital, Japan.

ABSTRACT — **Background.** The echinoderm microtubule-associated protein-like 4 gene with the 3' end of the anaplastic lymphoma kinase gene (EML4-ALK fusion gene) is present in 5% of patients with non-small cell lung cancer. This fusion gene is an important predictive factor for making a quick and accurate diagnosis of ALK lung cancer in order to facilitate individual treatment, as patients with this gene respond to crizotinib, an ALK inhibitor. In such cases, screening using the highly sensitive immunohistochemistry (IHC) method and a diagnostic algorithm confirmed on fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is used to diagnose ALK lung cancer. However, we herein report a case involving inconsistent test results obtained using these methods. **Case.** The patient was a 70-year-old, non-smoking female with a histopathological diagnosis of moderately differentiated adenocarcinoma with a ductal structure and mucus production, clinical stage cT2aN3M1b/stage IV, on a bronchoscopic biopsy. Her epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation status was wild-type; however, she exhibited a strong positive expression on the highly sensitive IHC method compared to a negative expression on a FISH analysis (positive cells: 2/50) according to consecutive ALK examinations of the specimen. On 4'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining, a yellowish structure was identified around the cell nucleus. The submitted specimen was considered to be insufficient for enzyme treatment prior to hybridization, although a reexamination of the specimen using an extending enzyme treatment time showed a positive result (29/50). Tumor shrinkage was consequently noted following the administration of crizotinib. **Conclusions.** We herein reported a case of EML4-ALK-positive lung cancer with different ALK results between the first and second examinations.

(JLCC. 2014;54:206-211)

KEY WORDS — IHC, FISH, EML4-ALK

Reprints: Utae Katsushima, Department of Clinical Oncology, Osaka City General Hospital, 2-13-22 Miyakojimahondori, Miyakojimaku, Osaka 534-0021, Japan.

Received April 17, 2014; accepted June 21, 2014.

要旨 — **背景.** EML4-ALK 融合遺伝子は非小細胞肺癌の約 5% に存在し, ALK 阻害薬であるクリゾチニブに奏効し, 個別化治療を進めるうえで正確, 迅速な ALK 肺癌の診断が重要である. 我々は, 再検査で異なる FISH 結果が得られた ALK 肺癌の症例を経験したので報告する. **症例.** 症例は非喫煙者の 70 歳女性. 気管支鏡生検の病理組織診断は腺管構造と粘液産生を認める中分化型腺癌で, 臨床病期は cT2aN3M1b, stage IV であった. EGFR

遺伝子変異は野生型であり, ALK 検索を同検体で行ったところ, 高感度 IHC 法では強陽性, FISH 法では陰性陽性細胞 (2/50 個) であった. 提出した標本の染色の状態を見直すとハイブリダイゼーション前の酵素処理が不十分であることが示唆されたため, 酵素処理時間を延長して同検体で再検した結果, 陽性 (29/50 個) と判定された. クリゾチニブの投与により腫瘍縮小効果を認めた. **結論.** 再検査にて異なる FISH 結果が得られた EML4-

大阪市立総合医療センター 1 臨床腫瘍科, ²病理診断科.
別刷請求先: 勝島詩恵, 大阪市立総合医療センター臨床腫瘍科,

〒534-0021 大阪市都島区都島本通 2 丁目 13 番 22 号.
受付日: 2014 年 4 月 17 日, 採択日: 2014 年 6 月 21 日.

ALK 融合遺伝子陽性肺癌の 1 例を経験した。

索引用語 — IHC, FISH, EML4-ALK

背景

EML4-ALK 融合遺伝子は、2007 年に初めて Soda らによって報告され、非小細胞肺癌の約 5% に存在する強力な driver oncogene であることが示された。¹ EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌 (以下、ALK 肺癌) は、非あるいは軽喫煙者、若年者 (平均年齢 50 歳代半ば) に多く、やや女性に多い。^{2,3} 組織型は腺癌が多く、腺房型 (acinar type adenocarcinoma)、印環細胞型 (signet ring cell carcinoma) など特徴的な形態を示す。^{3,4} ALK 阻害作用を有するクリゾチニブは、既治療 ALK 肺癌に対する第 I 相試験で、奏効率 60.8%、無増悪生存期間の中央値は 9.7 カ月 (95% confidence interval [CI], 7.7~12.8 カ月) と良好な結果であり、⁵ 本邦でも 2012 年 3 月に ALK 肺癌に対する承認を得た。EML4-ALK 融合遺伝子は、限られた患者しか有さないものの、クリゾチニブが著効することが多いため、^{2,6} 正しい診断による患者選択が必要である。EML4-ALK 融合遺伝子の検出方法には、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法、immunohistochemistry (IHC) 法、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法がある。ALK 遺伝子検査のアルゴリズム (日本肺癌学会編) では、ホルマリン固定パラフィン包埋標本 (formalin-fixed paraffin embedded; FFPE) に対しては IHC 法によるスクリーニング、FISH 法による確認という方法によって確実な診断を得ることが推奨されている。⁷ しかしながら、近年両者の検査結果の不一致を認める症例が一定頻度存在することが報告されている。⁸ 今回我々は、ALK 遺伝子検査において高感度 IHC 法で強陽性、FISH 法で陰性であり、再検査にて FISH 陽性となった症例を経験したので報告する。

症例

症例：70 歳女性。

主訴：咳嗽。

喫煙歴：なし。家族歴：特記事項なし。合併症：糖尿病。

現病歴：2012 年 7 月より咳嗽が出現し、近医を受診。胸部 X 線で異常陰影を指摘された。右下葉に 3.5 cm 大の腫瘤陰影、縦隔リンパ節、右肺門リンパ節、対側肺門リンパ節腫大、脳転移を認めた (Figure 1)。組織診断のために行った気管支鏡検査では、右 B⁶ 入口部は狭窄が強くなり、気管支鏡は通過できず、生検鉗子は細径のものに変更して、かろうじて右 B⁶ 入口部を通過でき、透視下で右

下葉の腫瘤部分を 1 度のみ生検できた。生検検体は径 1 mm 大の微小なものであった。病理組織所見は、内腔に粘液産生を伴う mucinous cribriform pattern を示す中分化型腺癌で、EGFR 遺伝子変異検査の結果は野生型であった。臨床病期は cT2aN3M1b, stage IV となった。腫瘍進展と癌性リンパ管症による咳嗽のため、酸素吸入が必要であり、performance status (ECOG) は 2 と判断した。シスプラチン併用化学療法は困難であると考え、2012 年 7 月下旬より、初回化学療法としてカルボプラチン＋ペメトレキセド療法を 4 コース施行し、最良総合効果は partial response (PR) であった (RECIST Ver. 1.1)。EGFR 遺伝子変異は野生型であること、非喫煙者の女性であること、mucinous cribriform pattern を示す病理像などより、本症例が ALK 肺癌である可能性を考慮して、1 次治療と併行して EML4-ALK 融合遺伝子検査を BML 社に外注依頼した。高感度 IHC 法では強陽性を示したが (Figure 2)、FISH 法では陰性 (陽性細胞数 2/50 個) の結果であった (Figure 3)。臨床背景、病理所見、IHC 強陽性を示したことより、提出した気管支鏡検体を見直したところ、提出した標本は、4'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 染色では不均一に染色され、プロテアーゼによる酵素処理が不十分であることが示唆された (Figure 4)。そこで、プロテアーゼによる酵素処理時間を通常の 2 倍に延長して再検したところ、陽性 (29/50 個) の判定となり、本症例は ALK 肺癌であると考えられた (Figure 5)。1 次治療 4 コース投与後より腫瘍の再増大が見られ、2 次治療への移行が必要となったため、クリゾチニブを導入した。クリゾチニブ 500 mg/日 内服開始後より、腫瘍は縮小を認め、最良総合効果は PR であった。腫瘍マーカーもクリゾチニブ導入時 CEA 1816 ng/ml から内服開始 4 カ月で CEA 115 ng/ml まで低下した。有害事象は Grade 1 の光視症のみであった。EML4-ALK 融合遺伝子の確認は RT-PCR 法では行っていないが、クリゾチニブにて腫瘍の縮小および腫瘍マーカーの低下を認めており、本症例は ALK 肺癌であると考えられた (Figure 6)。クリゾチニブ内服開始 5 カ月目で癌性リンパ管症の増悪にて progressive disease (PD) となり、3 次治療として、ドセタキセル 60 mg/m² を投与したが、3 コースで PD となった。その後、クリゾチニブの再投与を行ったところ、約 1 カ月半の間癌性リンパ管症は改善傾向であったが、その後病勢は悪化、診断より 1 年 3 カ月の経過で死亡した。

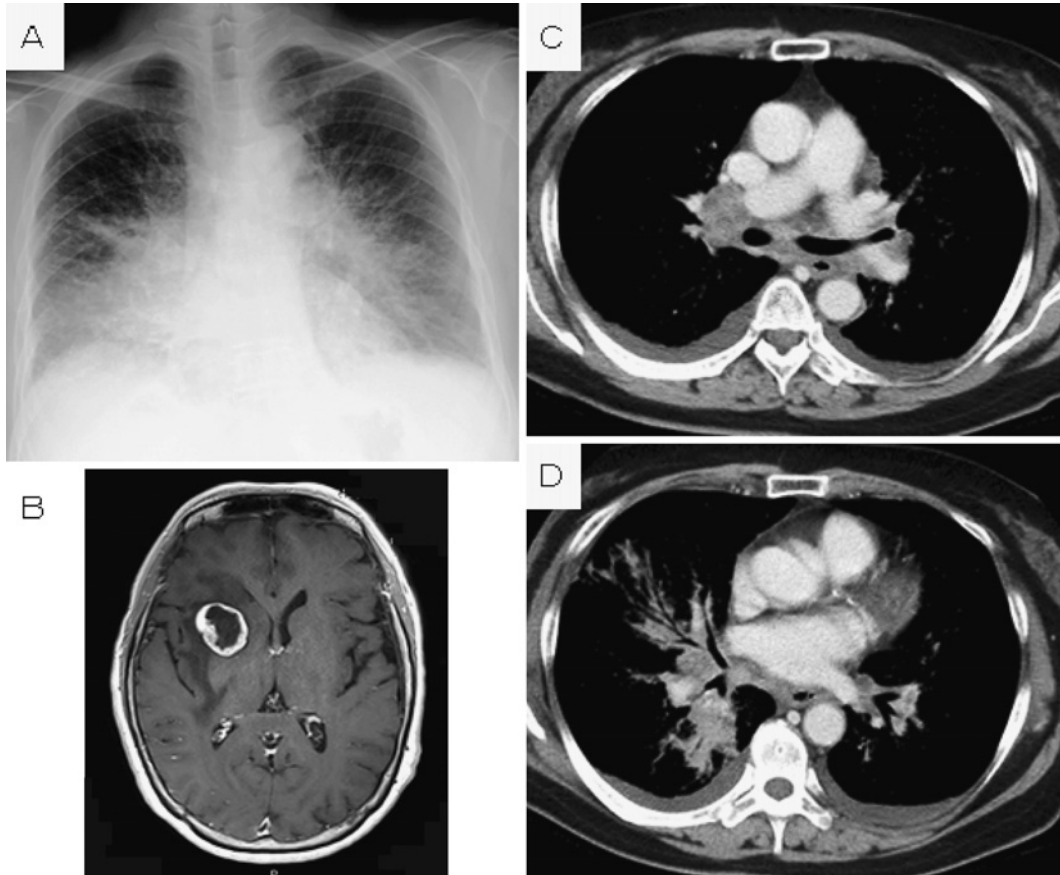


Figure 1. **A:** Chest roentgen graph obtained at the first visit to our hospital. Lymphangitis carcinomatosa was detected in the bilateral lung fields. **B:** Brain MRI showed a solitary metastatic tumor with peripheral edema. **C:** The right mediastinal lymph nodes were swollen. **D:** Computed tomography (CT) showed a tumor measuring 5 cm in size in the right lower field.

考 察

再検査で異なる FISH 結果が得られた EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌の 1 例を経験した. ALK 遺伝子検査については, 日本肺癌学会より高感度 IHC 法によるスクリーニング, FISH 法による確認という診断アルゴリズムが示されているが,⁷ 近年, 両者の検査結果の不一致を認める症例が一定頻度存在することが報告されている. Cabillic らは, 非小細胞肺癌 3244 例を対象に FISH 法と IHC 法を同時に実施した ALK 遺伝子検査結果を報告し, FISH 陽性または IHC 陽性であった 150 例のうち, 両検査とも陽性であったのは 150 例中わずか 80 例であったことを報告している.⁹ どのような症例が検査結果不一致となりやすいのかは明らかではないが, IHC 法で陰性であっても, 臨床病理学的背景, 例えば若年, 非喫煙者, および篩状構造や印環細胞などの組織像では, さらに FISH 法まで行うことを検討する. IHC 法陽性で FISH 法陰性の場合, 奏効例の報告もあるため可能で

あれば RT-PCR の結果を参考にし, 臨床的な功罪のバランスで判断する.⁸

FISH 法は, 蛍光色素でラベルした DNA プローブを標本上で標的遺伝子とハイブリダイズさせ, そのシグナルを蛍光顕微鏡で観察する方法であり, 保険適応のある EML4-ALK 融合遺伝子を検出する標準検査と位置付けられている.^{2,7} 融合遺伝子の観察は, ALK 遺伝子の切断点を隔てて 2 つのプローブを置き, ALK 遺伝子が切断されて他の遺伝子と融合することを検出する break-apart assay 法が標準的であるのだが,^{4,7} その判定には技術的熟練を要する.^{2,4,10,11}

細胞および組織の蛍光染色において, 核を染色するための蛍光色素として DAPI が用いられるが, 本症例において, 1 度目の FISH 法では DAPI 染色で染色された核は辺縁がより強く染色され, 中央部分は黒くぬけた不均一な染色となっており, 核は不鮮明に見え, 核の周囲には非特異反応による黄色いもや状の発色が残存していた (Figure 4). このような DAPI 染色パターンは, 蛋白分解

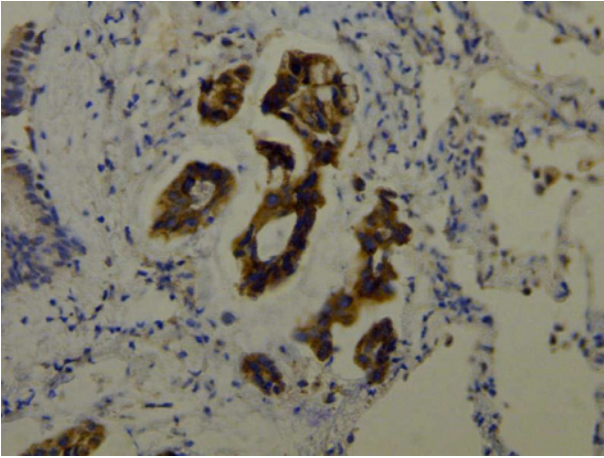


Figure 2. IHC. The lung adenocarcinoma was strongly stained with 5A4 antibodies (Santa Cruz Biotechnology) on IHC according to the EnVision Flex method (DAKO).

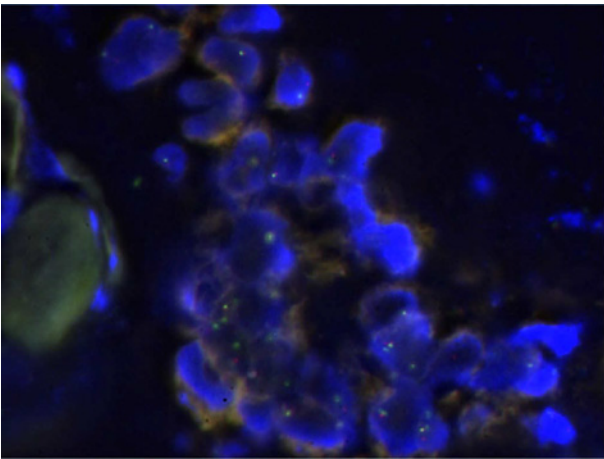


Figure 3. First FISH examination. Two of 50 cells were positive for a break-apart status on FISH performed according to the standard procedure.

酵素の過消化が原因であり、本来このような標本は評価すべきでないと言われている。⁴ このような DAPI 染色パターンが認められる要因として考えられることは、検体のホルマリン過固定、繊維性結合織の多い検体であること、薄切切片が厚いこと、薄切切片の長時間の保存、が挙げられる。¹² 通常薄切切片は、組織の採取、ホルマリン固定、切り出し、パラフィンへの包埋、薄切という工程で作製される。ホルマリン固定は 10% ホルマリンで 6~24 時間で固定することが標準であるが、ホルマリンは 1 mm/h の速度で浸透するとされるため、本症例のように微小検体や細長い形状の検体ではホルマリン固定の影響が大きくなり、過固定となる可能性があり注意が必要である。¹³ 繊維結合織の多い検体や、厚い標本(本来は 5±

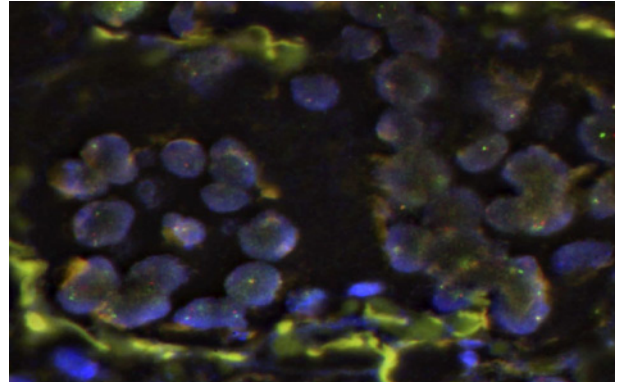


Figure 4. DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) staining. The nuclei were faintly stained with DAPI, as the tissue was fixed with excess formalin.

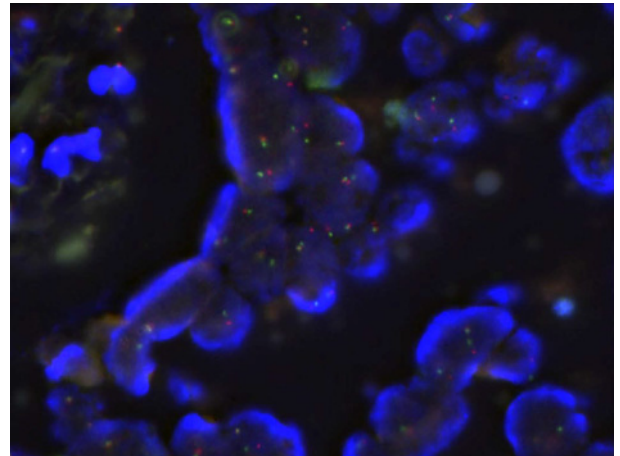


Figure 5. Second FISH examination. Twenty-nine of 50 cells were positive for a break-apart status after treating the tissue with protease.

1 μm の厚さが推奨) の場合は、酵素処理が不十分となる可能性がある。標本の保管については、当院では、FFPE 包埋ブロックは HE 染色用の薄切切片を作製後、標本箱の中に室温で保管され、IHC 法の依頼があった時点でブロックに熱処理を加えて伸展させ、FISH 法に提出する分も含めて、数枚薄切切片を作製する。FISH 検査は IHC 陽性の結果を受けてから検査依頼を行うため、FISH 用の薄切切片は、IHC 用薄切切片の作製日よりさらに 10 日程度長く空気にさらされた状態で保管されていることになる。The College of American Pathologists (CAP) / The International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) / The Association for Molecular Pathology (AMP) より示されている EGFR, ALK 検査ガイドラインでは、薄切標本作製から 2 週間以内に FISH 検査を実施することが推奨されているし、² より長く空気に

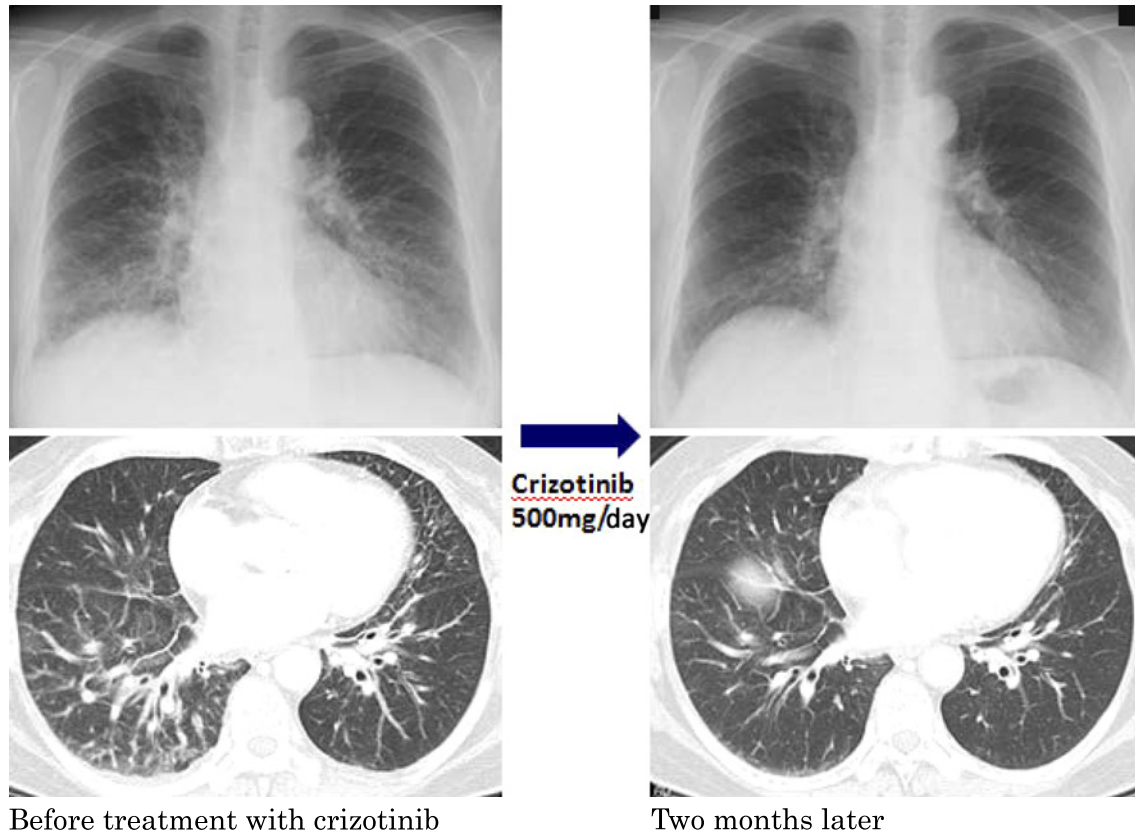


Figure 6. Objective response to crizotinib. The administration of crizotinib (500 mg/day) for two months achieved a good disease response.

さらされて保管された標本ほど酸化による経時的劣化が進むことが報告されている。¹³ 本症例では1 mmの微小検体であったが、固定は10%ホルマリンにて行われ、固定時間も6時間と適切であった。1度目のFISH用の薄切切片はIHC用薄切切片作製から16日が経過したものが使用されていたが、2度目のFISH検査は薄切後2日で行われていたため、標本の劣化は少なかったと思われる。

前出のEGFR、ALK検査ガイドラインでは、FISH法を行う際に、病理医から検体の質や腫瘍の存在部位について検査技師に情報が伝えられるべきであり、その解釈についても十分話し合われるべきであるとされている。² 本症例では、採取した組織に腫瘍細胞が含まれていることは病理医が確認したうえでFISH検査を依頼したが、FISH検査は外部委託しているため、検体の質について当院病理医と受託施設の病理医や検査技師との情報交換は必ずしも綿密に行われてはいなかった。また、当院から送付した4枚の未染スライドは、受託施設において1枚をHE染色用に、残りをFISH検査用と再検用の予備にしているが、HE染色の評価やFISH検査の結果については、受託施設の病理医と検査技師間での討議は全

例で行われているわけではなかった。さらに、IHC法が強陽性であったという情報は、FISH解析者には原則伝えない体制であった。FISH法を依頼する際には、主治医が患者の臨床経過とともに、より適切な状態での検体の提出ができるようにALK遺伝子検査の時期を考慮することや、病理医と検査技師との情報共有は今後の課題と思われた。

本症例を通じ、FISH法においては、検体採取や保存・処理方法、FISH検査にかかわる臨床医-病理医-検査技師との連携に関して様々な課題があることが示唆された。しかしながら、検査の不一致例が少なからず存在することを完全に回避することは難しい。検査結果不一致例でもALK阻害薬が著効した症例の報告も散見されることから、¹⁴ 検査の精度や条件を改善する努力と併行して、臨床判断によりALK肺癌と考えられる患者にはALK阻害薬を使用することを考慮してもよいと考えられる。

結 語

再検査で異なるFISH結果が得られたEML4-ALK融合遺伝子陽性肺癌の1例を経験した。

本論文内容に関連する著者の利益相反：武田晃司 [委受託研究 (治験等)] 中外製薬 (株), 協和発酵キリン (株), 日本ペーリンガーインゲルハイム (株), 特定非営利活動法人西日本がん研究機構, メルクセローノ (株), 大日本住友製薬 (株)

謝辞：FISH 法に関する技術的な指導およびコメントを大屋智裕氏 (株式会社ピーシーエルジャパン) と泉澤康弘氏 (アボット ジャパン株式会社) よりいただき, ここに深謝する。

本論文内容の要旨は, 第 97 回日本肺癌学会関西支部会で発表し, 優秀演題賞を受賞した。

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.
- 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.
- Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 2009;27:4247-4253.
- Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer. 2013. <http://www.iaslc.org/publications/iaslc-atlas-alk-testing-lung-cancer>
- Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase I study. *Lancet Oncol*. 2012;13:1011-1019.
- 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.
- 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>
- 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>
- Cabillie F, Gros A, Dugay F, Begueret H, Mesturoux L, Chiforeanu DC, et al. Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances. *J Thorac Oncol*. 2014;9:295-306.
- 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.
- 竹内賢吾. ALK 融合遺伝子陽性肺癌. *病理と臨床*. 2010;28:139-144.
- 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.
- JCCLS 日本臨床検査標準協議会 JCCLS 遺伝子関連検査標準化専門委員会. 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル Approved Guideline (承認文書). 2011. <http://www.jccls.org>
- 横山琢磨, 高田佐織, 大塚弘毅, 藤原正親, 滝澤 始, 後藤 元. 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. *肺癌*. 2013;53:893-898.