

病理形態学を基盤とした独自のシステムによる

新規融合遺伝子の同定

所属機関 公益財団法人がん研究会 がん研究所

研究者名 竹内賢吾

《研究の概要》

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) はチロシンキナーゼ (TK) であり、多くの阻害剤が存在または開発中であるので、その発見は肺癌の診断および治療の革新的進歩に直結する。

本研究は、病理形態学を基盤とした独自の解析システムを用い、1) *ALK* 肺癌やその他の *ALK* 陽性腫瘍の頻度と臨床病理学的特徴を明らかにすること、2) 悪性腫瘍において、融合遺伝子、とくに TK 融合遺伝子を新規同定すること、を目的とした。

ALK 肺癌については 1,529 例の肺癌症例中に 44 例の陽性例を見だし、その頻度と臨床病理学的特徴を明らかにし報告した。新規同定遺伝子として、炎症性筋線維芽細胞腫における *PPFIBP1-ALK*、腎癌における *TPM3-ALK*、*EML4-ALK* を報告した。リンパ腫においては、*SQSTM1-ALK* を新規同定している。また、融合遺伝子の同定法として RACE 法をホルマリン固定・パラフィン包埋検体 (FFPE) 用に最適化し、肺癌において *KLC1-ALK* を新規同定した。ALK 以外では、肺癌において *ROS1* 融合遺伝子 4 種、*RET* 融合遺伝子 2 種を新規同定した。キナーゼ以外では、低悪性度 B 細胞性リンパ腫において免疫グロブリン軽鎖遺伝子と *IRF4* の融合を新規に報告した。

竹内賢吾	公益財団法人がん研究会がん研究所 分子標的病理プロジェクト プロジェクトリーダー	研究全般
杉山裕子	公益財団法人がん研究会がん研有明病院 婦人科副部長・細胞診断部部長	臨床検体・データ収集
秋山 太	公益財団法人がん研究会がん研究所 病理部 副部長	組織学的解析
坂田征士	公益財団法人がん研究会がん研究所 分子標的病理プロジェクト 嘱託研究員	スクリーニング 分子生物学的解析

研究報告

I 研究目的

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) はチロシンキナーゼ (TK) であり、多くの阻害剤が存在または開発中であるので、その発見は肺癌の診断および治療の革新的進歩に直結する。

本研究は、病理形態学を基盤とした独自の解析システムを用い、1) *ALK* 融合遺伝子陽性肺癌の頻度と臨床病理学的特徴を明らかにすること、2) 肺癌以外の固形癌、とくに子宮癌と卵巣癌につき融合 TK 遺伝子を新規同定することを目的とする。

子宮癌、卵巣癌は、本邦における推定罹患数がそれぞれ 24,422 人、8,655 人 (2004 年)、推定死亡数は 5,709 人、4,599 人 (2008 年) に上る代表的な癌腫であり (国立がんセンター推計)、特に有効な治療法に乏しい進行例での新規治療法が渴望されている。

婦人科癌において融合 TK は未だ同定されていない。同定に成功した場合は極めて強いインパクトをもって迎えられることは想像に難くない。すなわち、本研究の意義を臨床的に換言すれば婦人科癌における分子標的薬の導入を目指すものといえる。したがって、本研究の意義を総括すると、がんの個性診断やオーダーメイド医療のための基礎研究から臨床応用につながる実践的トランスレーショナル研究、となる。

(以上は研究新規申請時に記載した研究目的の抜粋である。その後の研究の進捗により、上記 1) には肺癌以外の ALK 陽性腫瘍の探索・臨床病理学的検討を、上記 2) の対象としてあらたに腎癌、大腸癌、およびリンパ腫を研究対象として継続申請時に加えた)。

II 研究計画及び材料と方法

1. 種々の腫瘍における *ALK* 融合遺伝子の頻度と臨床病理学的特徴を明らかにする
申請者が考案し、KIF5B-*ALK* の発見につながった iAEP 免疫染色法、FISH 法を用い、種々の腫瘍で *ALK* 融合遺伝子スクリーニングを行う。

2. 種々の腫瘍において融合遺伝子を新規同定する

- #1. フォルマリン固定パラフィン包埋ブロックより径 1mm 大の組織アレイを作成する。
- #2. 組織アレイに代表的チロシンキナーゼ、その他の遺伝子に対する split FISH を施行する。
- #3. 2 で得られた候補症例に対し、5'-RACE、inverse RT-PCR 法などにより fusion partner を同定する。
- #4. 融合遺伝子の完全長 cDNA を取得し癌化能の証明をおこなう (focus formation assay、ヌードマウス造腫瘍 assay、in vitro kinase assay、および IL3 依存性 BA/F3 細胞を用いたサイトカイン非依存性増殖の確認など)。
- #5. キナーゼ阻害剤を用いた治療効果実験を行う。

III・IV 研究成果・考察

概要

ALK 肺癌については 1,529 例の肺癌症例中に 44 例の陽性例を見だし、その頻度と臨床病理学的特徴を明らかにし報告した¹。新規同定遺伝子として、炎症性筋線維芽細胞腫における *PPFIBP1-ALK*²、腎癌における *TPM3-ALK*、*EML4-ALK*³ を報告した。リンパ腫においては、*SQSTM1-ALK* を新規同定している⁴。また、融合遺伝子の同定法として RACE 法をフォルマリン固定・パラフィン包埋検体 (FFPE) 用に最適化し、肺癌において *KLC1-ALK* を新規同定した⁵。ALK 以外では、肺癌において *ROSI* 融合遺伝子 4 種、*RET* 融合遺伝子 2 種を新規同定した¹。キナーゼ以外では、低悪性度 B 細胞性リンパ腫において免疫グロブリン軽鎖遺伝子と *IRF4* の融合を新規に報告した⁶。また、ALK 肺癌診断法についてのコメントを、世界肺癌学会の学会誌である *Journal of Thoracic Oncology* 誌で公表した⁷。

以上が、代表研究者が corresponding author として報告したものであるが、代表研究者らが開発した ALK 肺癌診断法を用い、他グループとの共同研究として 16 本の論文を投稿した⁸⁻²³。

婦人科癌、大腸癌においては、それぞれ 1 種、3 種の新規融合遺伝子を同定し現在解析中である。

ALK 肺癌

ALK 融合遺伝子は 44 例に同定され、1,485 例の非小細胞肺癌のうち 3.0% を占めた。その総てが腺癌であり、陽性率は 3.9% であった (44/1,121)。内訳は 41 例が *EML4-ALK*、3 例が *KIF5B-ALK* であった。腺癌における ALK 融合遺伝子陽性は、若年発症、非ないし軽度喫煙者、小腫瘍径、特徴的組織像 (mucinous cribriform pattern)、*EGFR* および *KRAS* 変異陰性と相関した。多変量解析により、50 歳以上、男性、ALK 融合遺伝子陰性、中-低分化度、高い病理学的ステージ、が、有意に生存期間の減少と相関していた。

これらの研究の過程で確立した ALK 肺癌診断法は、国内初の ALK 阻害剤 CH5424802 治験の患者選択に採用され、その治験結果が最近論文化された²²。また、この診断アルゴリズムを別のコホートで検証した論文も採択され印刷中となっている²³。

炎症性筋線維芽細胞種における *PPFIBP1-ALK* の同定

抗 ALK 免疫染色は 1995 年以来、*anaplastic large cell lymphoma* をはじめとする様々な腫瘍において施行されてきたが、*EML4-ALK* が発見されたのは 2007 年である (表 1)。これは、*EML4-ALK* が抗 ALK 免疫染色で検出しがたかったことと無縁ではないであろう。逆に言うと、従来の染色法により ALK 陰性である腫瘍が、高感度法である iAEP 法で ALK 陽性であれば、その腫瘍は新たな ALK 融合パートナーを持っている可能性がある。*ALK* 融合遺伝子の発現強度は融合パートナーのプロモーター活性に依存しているため、従来法で同定できないような低発現の融合パートナーを持っている可能性が挙げられるということである。

Inflammatory myofibroblastic tumor (IMT) は比較的稀な低悪性度の肉腫であり、約 50% の症例に *ALK* 融合遺伝子が存在するとされてきた。肺は好発臓器の一つであるが、がん研究会に ALK 陰性 IMT が 2 例あった。この 2 例に iAEP 法による抗 ALK 免疫染色を施行したところ陽性となった。一例において凍結検体が保存されていたので RACE 法により *PPFIBP1-ALK* を得た。もう一例に *PPFIBP1-ALK* の fusion FISH を施行したところ、こちらも陽性となった²。発現強度の差をきっかけとし新規 ALK 融合を得た事例といえる。

腎癌における *TPM3-ALK*, *EML4-ALK* の同定

PPFIBP1-ALK の発見の経緯を元に、様々な腫瘍において、iAEP 法による再検討を行った。355 例の腎癌に iAEP 法による抗 ALK 免疫染色を施行したところ 2 例に陽性例が見つかった。RACE により、それぞれの症例に *TPM3-ALK*、*EML4-ALK* を新規同定した³。これに先立ち、異なる二つのグループから腎癌において *VCL-ALK* が存在することが 2011 年初頭に報告されていたが、これらはともに鎌状赤血球症を有する小児に発症した髄様癌とその成分を有する分類不能癌という特殊な症例であった。我々の二例はこうした特殊な背景を有していない。このような、より common な症例に *ALK* 融合遺伝子が見つかったということは、腎癌における ALK 阻害剤治療の可能性を高めたと言えるだろう。ちなみに研究代表者らの 2 例も腎細胞癌で最も多い淡明細胞癌 (約 85% をしめる) ではなく、乳頭癌およびその成分を有する分類不能癌に見つかったことは興味深い。非淡明細胞型腎細胞癌の数%に *ALK* 融合遺伝子が存在するのではないかと考えられる。

ALK 陽性大細胞型 B 細胞性リンパ腫における *SQSTM1-ALK* の同定

ALK-positive large B-cell lymphoma (ALK+LBCL) は、これまでに 50 例ほどの報告しかない比較的稀なリンパ腫である。コンサルテーションとしてとして寄せられた一例に、抗 *NPM-ALK* とは異なるものがあった。抗 ALK 免疫染色の染色パターンは、*ALK* 融合タンパクの細胞内局在を反映する。*ALK* 融合タンパクの細胞内局在は融合相手により決まる。したがって、これまでにない抗 ALK 免疫染色パターンを呈する症例は未知の融合相手を持っている可能性が高い。この症例からは *SQSTM1-ALK* が得られた⁴。免疫染色の染色パターンに違いをきっかけとし新規融合を得た事例である。

非浸潤性肺腺癌 (細気管支肺胞上皮癌) における *KLC1-ALK* の同定

これまでに同定してきた *ALK* 融合遺伝子は、FFPE 検体に対する抗 ALK 免疫染色をき

かけとし、当該症例の凍結保存検体を用いて *inverse RT-PCR* や *RACE* 法によって融合パートナーを同定したものであった。あるとき代表研究者らは、抗 *ALK* iAEP 免疫染色陽性、*EML4-ALK* および *KIF5B-ALK fusion FISH* 陰性、凍結検体なし、という細気管支肺胞上皮癌症例に遭遇した。新規 *ALK* 融合パートナーが想定されたわけであるが、FFPE 検体には、これまで行ってきた *inverse RT-PCR* や *RACE* 法は適用できない。ホルマリン固定中に核酸が数 100 bp に寸断されるため良質な核酸を抽出することができないからである。そこで、*RACE* 法を FFPE 検体用に最適化しようと試みた。簡単に言えば、*ALK* 融合遺伝子産物の融合点は多くの場合 *exon 20* の先端であるので、この部位近傍に *RACE* 用のプライマーを集中させた。試行錯誤の末、*KLC1-ALK* を同定した⁵。

固形癌において、摘出された検体の凍結保存がルーチンで行われている施設は、大学病院など研究を行う少数の施設のみであろう。大半の施設では、すべてがホルマリン固定され病理診断に供される。したがって FFPE 検体（パラフィンブロック）は、どこの施設においても一定期間から半永久的に保管されている。FFPE 検体を使い *inverse RT-PCR* や *RACE* 法ができれば、研究に使用しうる見かけの検体量が 100 倍以上増加することに等しく、有意義であると考えられる。

肺癌における *RET*、*ROSI* 融合遺伝子の同定

2007 年に Rikova らが、肺癌において *ROSI* 融合遺伝子を同定した。肺癌 1 症例、肺癌細胞株 1 つから、それぞれ *CD74-ROSI*、*SLC34A2-ROSI* が同定されたのであるが、頻度や臨床的特徴は不明であった。そこで、*ROSI* に対するプローブを作成し *FISH* スクリーニングを施行したところ、1,529 症例のうち 13 例に陽性所見が得られた。12 例で融合パートナーの同定に成功し、既知の *SLC34A2-ROSI* が 1 例、*CD74-ROSI* が 3 例含まれていた。これらに加え *TPM3-ROSI* が 2 例、*SDC4-ROSI* が 3 例、*EZR-ROSI* が 2 例、*LRIG3-ROSI* が 1 例に新規同定された¹。

次に実行したのは *TK* の遺伝子ではなく *KIF5B* に対する *FISH* であった。肺癌において *KIF5B* は *ALK* の融合パートナーとして代表研究者らが同定したものである (Takeuchi K, et al. *Clin Cancer Res*;15:3143-3149.2009)。また *KIF5B* は *hypereosinophilic syndrome* において、*RTK* である *PDGFRA* と融合することが知られていた。ならば、肺癌において、*KIF5B* に関して *ALK* 以外の *major* 融合パートナーが存在するのではないかと考えたからである。すなわち、*KIF5B* を *RTK* 融合遺伝子探索の *bait* として用いたわけである。*KIF5B split FISH* 陽性例が 2 例見つかり、3'-*RACE* により *KIF5B-RET* の同定にいたった。つぎに、*RET* に対する *FISH* スクリーニングをおこない、*KIF5B-RET multiplex RT-PCR* を構築し *FISH* 陽性例に適用したところ 5 つの融合バリエーションが同定された¹。

低悪性度 B 細胞性リンパ腫における免疫グロブリン軽鎖遺伝子と *IRF4* の融合の同定

自ラボで調整した *IRF4 split FISH* プローブの性能チェックをリンパ腫検体で施行した際、*IRF4* 再構成症例を偶然発見した (症例 1)。G 分染法による染色体解析レポートによると、本症例には *IGK* と *IRF4* の融合に合致する相互転座 *t(2;6)(p11.2;p25)* が認められていた。症例 2 となった症例はリンパ腫検討会で提示された他施設のもので、その腫瘍細胞像は若干 *paraimmunoblast* が多いものの、症例 1 の細胞像に類似していた。そこで *FISH* で検討した

ところ、*IGL-IRF4* 転座が存在することが明らかとなった。次に、232 例の低悪性度 B 細胞性リンパ腫を含む 784 例のリンパ腫検体に対し *IRF4 split FISH* を施行したところ、もう一例陽性例が見つかり症例 3 とした。記録によると *IGK-IRF4* に合致する相互転座 $t(2;6)(p12;p25)$ が検出されていた。症例 1 も同一コホートにあるので、*IRF4* 再構成陽性症例は低悪性度 B 細胞性リンパ腫のうち 0.86% 程度 (2/232) を占めると推計された。

組織学的には、リンパ節の基本構造は消失し、腫瘍細胞は基本的にびまん性に浸潤している。しかしながら、症例 2 では線維性結合織が結節状に腫瘍組織を圍繞していた。構成細胞は *prolymphocyte*、*paraimmunoblast*、小リンパ球よりなっているが、病変ごとにその割合は若干異なっていた。免疫組織学的には CD5⁻ (症例 3 はフローサイトメトリーでのみ CD5^{dim})、CD10⁻、CD20⁺、CD23⁺、CD43⁺、CD138⁻、MUM1/*IRF4*⁺、BCL2⁺、BCL6⁺、IgM⁺、IgD⁻、TdT⁻、Cyclin D1⁻であった。Ki67-labeling index は約 10% と低値であり低悪性度リンパ腫に合致する。

今回の症例群は形態像、免疫形質、染色体異常および臨床所見の点で既存のリンパ腫 subtype に合致せず、“*prolymphocytic/paraimmunoblastic lymphoma (PPL)*”などの名称で呼称したい。他の低悪性度 B 細胞性腫瘍との関連を明らかにすべきである。この問題の解決のために、多数の“PPL”症例を集積し解析することが望まれる。確定診断のために *IRF4* 再構成に対する FISH が必要であるが、その解析をとくにすべき症例の病理組織学的指標として、*prolymphocytic* ないし *paraimmunoblastic* な細胞像、BCL6 と MUM1/*IRF4* の共発現が考えられた⁶。

上記のうち、TK 融合遺伝子に関しては NIH 3T3 細胞を用いた *focus formation assay*、ヌードマウス造腫瘍 *assay*、および IL3 依存性 BA/F3 細胞を用いたサイトカイン非依存性増殖の確認により、造腫瘍能を証明した。また、KIF5B-RET に関してはバンデタニブを用いた増殖抑制実験をおこない、RET 肺癌に対する RET 阻害薬を用いた分子標的療法の可能性を示した。

最後に、本研究事業遂行にあたり貴重なご支援を賜りました公益財団法人車両競技公益資金記念財団に深甚なる感謝を申し上げます。

V 研究成果の発表

1. **Takeuchi K**, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*;18:378-381.2012.
2. **Takeuchi K**, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification. *Clin Cancer Res*;17:3341-3348.2011.
3. Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y, **Takeuchi K**. Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions

in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method. *Cancer*;118:4427-4436.2012.

4. **Takeuchi K**, Soda M, Togashi Y, Ota Y, Sekiguchi Y, Hatano S, Asaka R, Noguchi M, Mano H. Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma. *Haematologica*;96:464-467.2011.
5. Togashi Y, Soda M, Sakata S, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Nakajima T, Mano H, **Takeuchi K**. KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS One*;7:e31323.2012.
6. **Takeuchi K**, Sakata S, Asaka R, Tsuyama N, Dobashi A, Noguchi M. A low-grade B-cell lymphoma with polymphocytic/paraimmunoblastic proliferation and IRF4 rearrangement. *Haematologica*;98:e32-35.2013.
7. **Takeuchi K**. Interpretation of Anti-ALK Immunohistochemistry Results. *J Thorac Oncol*;8:e67-68.2013.
8. Matsuda I, **Takeuchi K**, Mizuguchi S, Kaji M, Ueda K, Teramura K, Hirota S. A case of synchronous bilateral lung cancers: EML4-ALK positive adenocarcinoma in the right lung and adenocarcinoma in situ (the former bronchioloalveolar carcinoma) in the left lung. *BMC Pulm Med*;13:25.2013.
9. Nishida Y, **Takeuchi K**, Tsuda K, Ugai T, Sugihara H, Yamakura M, Takeuchi M, Matsue K. Acquisition of t(11;14) in a patient with chronic lymphocytic leukemia carrying both t(14;19)(q32;q13.1) and +12. *Eur J Haematol*.2013.
10. Kozu Y, Isaka M, Ohde Y, **Takeuchi K**, Nakajima T. Epithelioid inflammatory myofibroblastic sarcoma arising in the pleural cavity. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*.2013.
11. Ninomiya H, Kato M, Sanada M, **Takeuchi K**, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S, Ishikawa Y. Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes. *BMC Cancer*;13:8.2013.
12. Soda M, Isobe K, Inoue A, Maemondo M, Oizumi S, Fujita Y, Gemma A, Yamashita Y, Ueno T, **Takeuchi K**, Choi YL, Miyazawa H, Tanaka T, Hagiwara K, Mano H. A Prospective PCR-Based Screening for the EML4-ALK Oncogene in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*;18:5682-5689.2012.
13. Yamamoto M, **Takeuchi K**, Shimoji M, Maniwa T, Isaka M, Nakagawa K, Ohde Y, Kondo H, Nakajima T. Small non-mucinous bronchioloalveolar carcinoma with anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity: A novel ALK fusion gene? *Cancer Sci*;103:390-392.2012.
14. Kimura H, Nakajima T, **Takeuchi K**, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, Nakagawara A. ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity. *Lung Cancer*;75:66-72.2012.
15. Kijima T, **Takeuchi K**, Tetsumoto S, Shimada K, Takahashi R, Hirata H, Nagatomo I, Hoshino S, Takeda Y, Kida H, Goya S, Tachibana I, Kawase I. Favorable response to crizotinib in three patients with echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-type oncogene-positive non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*;102:1602-1604.2011.

16. Okuda C, Kim YH, **Takeuchi K**, Togashi Y, Masago K, Sakamori Y, Mio T, Mishima M. Successful treatment with pemetrexed in a patient with mucinous bronchioloalveolar carcinoma: long-term response duration with mild toxicity. *J Thorac Oncol*;6:641-642.2011.
17. Nakajima T, Kimura H, **Takeuchi K**, Soda M, Mano H, Yasufuku K, Iizasa T. Treatment of lung cancer with an ALK inhibitor after EML4-ALK fusion gene detection using endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *J Thorac Oncol*;5:2041-2043.2010.
18. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, **Takeuchi K**, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y, Mano H. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med*;363:1734-1739.2010.
19. Jokoji R, Yamasaki T, Minami S, Komuta K, Sakamaki Y, **Takeuchi K**, Tsujimoto M. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol*;63:1066-1070.2010.
20. Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, Ikebe D, Kageyama H, Soda M, **Takeuchi K**, Itami M, Iizasa T, Yoshino I, Mano H, Kimura H. EML4-ALK fusion gene assessment using metastatic lymph node samples obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Clin Cancer Res*;16:4938-4945.2010.
21. Miyanaga A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiira S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, **Takeuchi K**, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y, Gemma A. Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation. *BMC Cancer*;13:262.2013.
22. Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, Hida T, Yamamoto N, Yoshioka H, Harada M, Ohe Y, Nogami N, **Takeuchi K**, Shimada T, Tanaka T, Tamura T. CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol*;14:590-598.2013.
23. Takamochi K, **Takeuchi K**, Hayashi T, Oh S, Suzuki K. A rational diagnostic algorithm for the identification of ALK rearrangement in lung cancer: A comprehensive study of surgically treated Japanese patients. *PLoS One*;in press.2013.