

間隔投与を選択することとした。また、用量については、国立がんセンター中央病院における転移性乳癌を対象とした paclitaxel 週 1 回 80 mg/m² 1 時間投与 (6 週連続投与) の第 II 相試験と同一の用量を選択することとした⁵⁾。また、paclitaxel 1 週間隔レジメンでの投与回数は、海外の術前化学療法臨床試験で用いられている 12 回投与に設定した³⁾。

HER2 過剰発現例に対しては、抗癌剤との併用による腫瘍縮小効果の増強を期待して trastuzumab⁶⁾を paclitaxel 1 週間隔投与に併用することとした。

なお、本臨床試験は国立がんセンター中央病院 乳腺グループによる院内研究である。

1) 評価項目

(a) 主評価指標

病理学的完全寛解率

(b) 副評価指標

臨床的奏効率(導入部の化学療法終了時およびすべての化学療法終了時)、乳房温存術施行率、手術拒否例の無増悪生存期間、有害事象発生率

2) 対象症例

(a) Disease characteristics

- ・組織診(core needle biopsy)で乳癌と診断された症例
- ・臨床病期 (AJCC 2002 年⁷⁾) II 期または IIIa, b 期で次のいずれかに該当する症例
 - －腫瘍径 2cm 以上 3cm 未満で臨床的に腋窩リンパ節転移陽性と判断できる症例
 - －腫瘍径 3cm 以上の症例
 - －大きさを問わず、胸壁または皮膚に直接浸潤が及ぶもの
- ・原発巣のホルモン受容体は、以下に示す

症例を適格とする。

－ER あるいは PgR のいずれか一方のみ陽性

－ER および PgR が共に陰性

(b) Patient characteristics

- ・年齢：65 才以上の症例
- ・PS (ECOG) 0-2 の症例
- ・以下にあげる諸臓器機能を有する症例

－骨髄機能

白血球数 3,000/mm³ 以上または好中球数 1,500/mm³ 以上

血小板 100,000/mm³ 以上

－肝機能

AST(GOT)および ALT(GPT)

60 IU/L 以下

総ビリルビン 1.5mg/dl 以下

－腎機能

血清クレアチニン 1.5mg/dl 以下

－心機能

心電図で正常又は治療を必要としない程度の変化

・本人より文書による同意 (Informed Consent) が得られた症例

3) 治療内容

1) HER2 過剰発現なしの症例

Paclitaxel 80 mg/m² 60 分点滴静注 (day 1, 8, 15, 22, 29, 36)

を 6 週 1 コースとして 2 コース施行

2) HER2 過剰発現ありの症例

Paclitaxel 80 mg/m² 60 分点滴静注 (day 1, 8, 15, 22, 29, 36)

Trastuzumab 4 mg/kg 60 分点滴静注 (day 1)

2 mg/kg 60 分点滴静注

(day 8, 15, 22, 29, 36)

を 6 週 1 コースとして 2 コース施行

4) 予定症例数

予定登録症例数：40 例

登録期間 1 年、追跡期間：登録終了後 1 年、

総研究期間：2 年

5) 倫理面への配慮

本臨床試験では以下の倫理面に配慮し計画された。

(a) 研究の対象とする個人の人権の擁護

- ・説明文書を渡して十分に説明した上で同意の得られた患者だけを対象とする。
- ・同意を得られない場合は他の治療により最善を尽くすことを保証する。
- ・同意した後いつでも同意を撤回できることを知らせる。
- ・同意されない場合でも不利益を受けないこと。
- ・プライバシーは保護されること。

(b) 被験者に同意を求め理解を得る方法

臨床試験の意味を十分に説明し、理解を求める。

- ・臨床試験がよりよい治療を目指すためにおこなわれること。
- ・最先端の医療を受けられること。
- ・新しい治療法は科学性と倫理性が十分に検討された上で「臨床試験」という形で行われること。

以上を説明する。

(c) 研究により生じる個人への不利益と医学上の利益または貢献度の予測

臨床試験で行われる治療が必ずしも標準的治療よりも良い結果をもたらすとは限らない可能性があること。

医学上の利益・貢献度に関しては本試験で行われる治療法は我が国では先駆的な治療法であり、今後の乳癌の治療成績の向上を目指すための大切な試験であると考えら

れる。

C. 研究結果

本臨床試験計画は、平成 15 年 1 月 31 日国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。

平成 15 年 2 月 1 日より登録開始し、平成 15 年 3 月 31 日現在までのところ、登録例はない。

D. 考察

今回、高齢者の手術可能乳癌の治療成績の向上を目指し、術前化学療法において高い病理学的寛解率が得られる可能性があり、また有害事象の頻度および程度がより軽度な可能性のある化学療法レジメンを用いた臨床試験を計画した。

今後、治療の安全性について十分に配慮し、試験登録を推進する予定である。症例登録を重ねることにより、本臨床研究の附随研究である治療前後の乳癌組織および正常組織(末梢血単核球あるいは手術時切除標本の正常組織部)における各種遺伝子発現量検討し、効果・副作用を予測するマーカー遺伝子の検討を行う基礎研究の活性化をはかって行きたい。

E. 結論

高齢者の手術可能な原発性乳癌に対する術前化学療法においてパクリタキセル週 1 回投与(HER2 過剰発現例にはトラスツズマブを併用)による術前化学療法の病理学的完全寛解率を評価する第 II 相臨床試験を計画した。科学および倫理面を十分に考慮した臨床試験をデザインした。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that Overexpresses HER2. N Engl J Med 344:783-792, 2001

7) American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging Manual Chapter 25 Breast, p223-240, 6 th ed, Springer, 2002

引用文献

1) Fisher B, Brown A, Mamounas E, et al: Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. J Clin Oncol 15:2483-2493, 1997

2) Hage JA, Velde CJH, Julien JP, et al: Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 10902. J Clin Oncol 19:4224-4237, 2001

3) Green MC, Buzdar AU, Smith T, et al: Weekly (wkly) paclitaxel (P) followed by FAC as primary systemic chemotherapy (PSC) of operable breast cancer improves pathologic complete remission (pCR) rates when compared to every 3-week (Q 3 wk) P therapy (tx) followed by FAC- final results of a prospective phase III randomized trial. Proc Am Soc Clin Oncol 21:35a, 2002(abstr135)

4) Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, et al: Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: Significantly Enhanced Response With Docetaxel. J Clin Oncol 20:1456-1466, 2002

5) 第 37 回癌治療学会,1999(抄録 MW 03-4)

6) Salmon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al:

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書

相関を考慮した DNA アレイデータの統計解析

分担研究者 大橋 靖雄 東京大学医学系研究科健康科学・看護学専攻教授

研究要旨 cDNAアレイ測定技術の発展により遺伝子発現に関して1度に多量の情報を得ることができるようになり、疾患の予後予測などの臨床応用が期待されている。しかし、膨大で、かつノイズの多いcDNAアレイデータは解析・解釈に関して新たな統計学的問題を引き起こしている。このようなデータから、貴重な情報を正確に得るためには、妥当な検定方法の用いることが重要であると考えられる。本研究では、検定の多重性を考慮する方法として、Fisher's combined probability testを原法どおり χ^2 分布で行う方法とその検定統計量をpermutation testする方法とを α エラーと検出力の観点から比較した。結果、permutation testの方が妥当であることが示されたが、この方法に対しても問題は残り、さらに状況に応じた妥当な検定方法の必要性が示唆された。

A. 研究目的

cDNAにより測定される遺伝子を機能別に分類し、異なる薬剤に対してどの遺伝子群に感受性があるかということを検討することは、それぞれの薬剤の遺伝子レベルでの特徴付けを行う際に有用な方法である。また、この手法は、個々の遺伝子に対する統計的有意性検定をまとめるという意味で、検定の多重性の問題を回避できるという利点がある。このような手法の一つとして、Fisher's combined probability testが挙げられるが、個人内における遺伝子間の発現の相関を考慮していない。この相関を考慮するために、この検定統計量に関してpermutation testを適用することが既に提案されている。この方法によって α エラーが名義水

準に抑えられ、妥当な検定となることが期待されるが、その検出力については明らかではない。そこで本研究では、個人内における遺伝子間の発現の相関や一つの機能としてまとめる遺伝子数などが検定の α エラーや検出力に与える影響をシミュレーションにより検討することを目的とする。

B. 研究方法

1、薬剤感受性に関する検定方法およびp値の結合

対象患者*i*、遺伝子*j*に関する発現比の対数を反応変数 y_{ij} 、ある薬剤の投与量を説明変数 x_i 、測定誤差 ε_{ij} が互いに独立に正規分布に従うと仮定して、

$$y_{ij} = \mu_j + \beta_j x_i + \varepsilon_{ij} \quad i=1, \Lambda, n, \quad j=1, \Lambda, k$$

という線形モデルを立てる。 μ_j は切片、 β_j は回帰係数である。この回帰係数 β_j が0であるかどうかの検定が、遺伝子 j がある薬剤に関して感受性があるかどうかの検定となる。この検定による p 値を機能別の遺伝子群としてまとめる方法がFisher's combined probability testであり、その検定統計量は次のように求められる。

$$t = -2 \sum_{j=1}^k \ln p_j$$

この検定統計量 t は個々の検定が独立であるという仮定の下で、自由度 $2k$ の χ^2 分布に従うが、 p 値が独立でないときには χ^2 分布からの乖離が生じ、 α エラーを名義水準の5%に抑えることができなくなる。そこで、この検定統計量の並べ替え分布を用いて p 値を計算するpermutation testの適用が考えられる。原法どおり χ^2 分布により検定を行う方法（以下 χ^2 近似）とpermutation testを行う方法に関して、 α エラーと検出力を比較するために、シミュレーションを行った。

2、シミュレーションの設定

シミュレーション1： 相関による χ^2 分布からの乖離

遺伝子間の相関の増加によってFisher's combined probability testの検定統計量の標本分布が χ^2 分布からどのくらい乖離するかを検討するために、遺伝子数を k とし、平均0、分散1、共分散 r^2 の k 変量正規分布に従う確率変数 x_1, x_2, Λ, x_k の累積分布から相関のある一様乱数 p_1, p_2, \dots, p_k を発生させ、Fisher's combined probability testの検定統計量 t を求める。遺伝子数 k は30、50、60、100、190とし、 r は0から1.0まで0.1ずつ変化させることとする。シミュレーション回数は10000回とし、これらの条件下で α エラーを求める。

シミュレーション2： 相関がある場合の χ^2 近似とpermutation testの α エラー

先行研究と同様の状況下における相関の影響を検討するために、シミュレーション1の確率変数 x_1, x_2, Λ, x_k を14サンプル発生させ、これを帰無仮説（ $\beta=0$ ）の下での対数発現比 y_1, y_2, \dots, y_k とみなし、この発現比に対して投与量 x を100mg:2人、200mg:3人、300mg:6人、400mg:3人と割り当て、回帰分析を行う。得られた p 値からFisher's combined probability testの検定統計量 t を求め、同時に投与量の割り当てを並び換えることによってpermutation testを行う。並び換え回数は400回とする。遺伝子数 k は30、50、60、100、190とし、 r は0、0.2、0.4、0.6、0.8とする。シミュレーション回数は200回とし、これらの条件下で α エラーを求める。

シミュレーション3： 相関がある場合の χ^2 近似とpermutation testの検出力

χ^2 近似とpermutation testの検出力を、以下のシミュレーションにより検討する。先行研究を参考に、ある遺伝子群の遺伝子のうち1/3の遺伝子において、薬剤感受性を表わす β が0.0025、0.005、0.01となることを想定する。これは、投与量の100mg増加に対して発現比が1.19倍、1.41倍、2倍となる設定である。これらの対立仮説の下で、シミュレーション2と同様に対数発現比を発生させる。遺伝子数 k は60とし、 r は0、0.2、0.4、0.6、0.8とする。シミュレーション回数は100回とし、これらの条件下で検出力を求める。

シミュレーション4： 先行研究の相関構造を用いた場合の α エラーと検出力

先行研究において χ^2 近似とpermutation

test の双方で棄却された遺伝子群(Group1)と χ^2 近似でのみ棄却された遺伝子群(Group2)の相関構造を用いて、シミュレーション 2 および 3 と同様の検討を行う。相関係数の平均は Group1 が 0.08、Group2 が 0.23 であり、標準偏差は Group1 が 0.338、Group2 が 0.312 である。また、対立仮説における β としては 0.005、0.01 のみ取り上げる。

C. 研究結果

シミュレーション 1 から、相関がない場合には α エラーは 5%以下に抑えられたが、相関がある場合には α エラーは 5%を超えることが明らかとなった。 α エラーは、遺伝子数の増加に伴い一様に増加する傾向を示し、相関係数 0.5 において遺伝子数 30 で α エラーは約 25%、遺伝子数 190 では約 35%であった。一方、相関係数に関しては、相関係数 0.1 でも、遺伝子数 30 で α エラーは約 15%、遺伝子数 190 では約 30%となり、相関係数の増加よりも、相関の有無が α エラーの増加に寄与していた。

シミュレーション 2 から先行研究と同様の状況で、 χ^2 近似の α エラーが名義水準である 5%を超えている可能性が示唆された。 χ^2 近似の α エラーは相関係数が 0 の場合には 5%となるが、相関係数の増加とともに直線的に増加し、遺伝子数 100 で相関係数 0.8 のときの α エラーは約 30%となった。遺伝子数に関しては遺伝子数が多いほど α エラーは大きくなる傾向があった。一方、permutation test では相関の大きさにかかわらず α エラーが 5%以下となることが確認された。

シミュレーション 3 から、相関係数の増加に伴って検出力が下がることが明らかとなった。この傾向は permutation test を用いた場合に顕著であり、 $\beta=0.005$ で相関係数が 0 のときに

はどちらの検定方法でも検出力は 100%であるが、相関係数が 0.2 になると χ^2 近似では 90%、permutation test では 60%となり、相関係数が 0.4 になると χ^2 近似では 80%、permutation test では 30%となった。

シミュレーション 4 の結果から、 χ^2 近似を用いると、どちらの遺伝子群においても α エラーが約 20%となることが示された。一方、permutation test を用いた場合には α エラーは 5%以下となった。Group1 における検出力は、 β が 0.005 のときに、 χ^2 近似で 73%、permutation test で 12%となり、 β が 0.01 では χ^2 近似で 100%、permutation test で 79%となった。Group2 においては、 β が 0.005 のときに、 χ^2 近似で 63%、permutation test で 26%となり、 β が 0.01 では χ^2 近似で 100%、permutation test で 95%となった。

D. 考察

本研究では Fisher's combined probability test を原法どおり χ^2 分布 (近似) を用いて行う場合と、permutation test を行う場合とについて遺伝子間の相関構造の影響を検討した。permutation test と比較し χ^2 近似の方が常に同等以上の検出力を持つことが示されたが、これは χ^2 近似における α エラーの増大によるものと考えられる。

先行研究において、 χ^2 近似で有意となり、permutation test で有意とならなかった遺伝子群が存在するという問題は、仮にその群に薬剤感受性を持つ遺伝子が含まれていたとすると、permutation test の検出力不足によって起こったものと考えられる。しかし、 χ^2 近似による α エラーの増加は許容しがたいレベルであるため、現時点では permutation test の結果を用いるべきであろう。

シミュレーション 4 における χ^2 近似の α エラーは、シミュレーション 2 における対応する遺伝子数と平均相関係数の場合の α エラーよりも大きいものであった。また、検出力に関しても、 $\beta = 0.01$ で、相関係数の平均値が大きい Group2 の方が高い検出力を示すなど、シミュレーション 3 とは異なる傾向が示された。これは α エラーおよび検出力が、相関係数の平均値のみではなく、そのバラツキにも影響を受けていることを示唆するものである。

permutation test の欠点は 1 回の検定に時間がかかることである。例えば、遺伝子数 60 を 400 回の permutation により検定を行うと約 2 時間かかる (CPU : pentium4 2.00GHz、RAM : 512MB)。そのため、今回の並び換え回数は 400 回、シミュレーション回数は α エラーに関して 200 回、検出力に関しては 100 回であり、考えられるすべての状況に対してシミュレーションを行うことは時間的に困難である。実は、 X_1, X_2, \dots, X_n が同時正規分布に従い、 $V(X_i) = 1$ $Cov(X_i, X_j) = \rho_{ij}$ であれば、統計量 $Y = \sum_{i=1}^n X_i^2$ の分布は自由度を調整することにより定数倍した χ^2 分布で近似できることが既に示されている。この近似を利用して検定統計量の並び替え分布の近似式を求めることができるのではないかと考えられる。これにより、様々な対立仮説に対する検討を行うことが可能となる。また、相関構造を考慮することのできる新たな検定方法につながるのではないと思われるので、今後の課題としたい。

また、permutation test を行う際には、どのような検定統計量を用いるかが重要となる。今回用いた Fisher's combined probability test の検定統計量は、たいていの場合で適切であるとされている方法である。しかし、この検定の対立仮説は遺伝子群内の少なくとも一つの遺伝子が有意であるというものであり、いわゆるオムニバス検定となる。また、この検定統計量は p 値の幾何平均に基づく値であり、小さい p 値により影響されやすい。そのため、検討対象となる遺伝子群での状況に則した検定統計量、例えば、遺伝子群内の全体的な傾向を見たい場合には、 p 値の合計を用いる P_{sum} test や Liptak-Stouffer method を用いることによって、より頑健で検出力の高い検定を行うことができるのではないかとと思われる。

E. 結論

Fisher's combined probability test における検定統計量を原法どおり χ^2 分布により検定を行う方法と permutation test を行う方法では、後者が妥当な検定であるといえる。しかし、計算時間がかかること、また、検出力が高いとはいえない状況が見られることから、さらに状況に適した方法の検討が必要であると思われる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

「DNAアレイによる原発性乳癌の術前化学療法におけるホルモン剤感受性決定遺伝子の検索」の基礎的検討

分担研究者 関島 勝（株式会社三菱化学安全科学研究所科鹿島研究所応用生物研究部主任研究員）

乳がんの術前化学療法による病理学的完全寛解を予測する因子を同定するために、ヒトの乳がん細胞株を用いたcDNAアレイによる遺伝子発現解析を開始した。エストロゲン受容体（ER）特異的に発現変動する遺伝子を解析するために、乳がん細胞株としてエストロゲン感受性（ER+）のMCF-7とBT-474およびエストロゲン非感受性（ER-）のSK-BR-3とMDA-MB-231を用いて、エストロゲン（E2）とアンタゴニストであるタモキシフェン（TM）の暴露濃度を決定した。現在4種の乳がん細胞について内因性エストロゲン除去した環境下にE2およびTMを単独または組み合わせて暴露し、計32条件の薬剤暴露の乳がん細胞からRNAを抽出してcDNAアレイ解析を実施している。MCF-7とSK-BR-3について遺伝子発現プロファイルのクラスター解析の結果、エストロゲン感受性の違いによる細胞特有の遺伝子が明確に区別され、両者間で発現に差のある56遺伝子を抽出した。また、これらの遺伝子情報を基に新たにホルモン剤感受性決定のためのcDNAアレイを設計した。今後乳がんのホルモン療法の臨床試験を進める中で、個々の効果などに関連する遺伝子の選択、薬剤投与前後の比較による薬力学的評価の指標として活用が可能になると考えられる。

A. 研究目的

本試験は乳がん組織、末梢血単核球のホルモン療法前後の遺伝子発現（腫瘍はホルモン療法施行後も採取可能な場合に限る）をcDNAアレイを用いて解析し、病理学的完全寛解を予測する因子、予後、有害事象関連因子を同定すること、またホルモン療法前後の遺伝子発現を比較することにより、薬力学的評価を行うことである。遺伝子発現解析を用いて正しい情報を得るためには、ホルモン剤に感受性を示す遺伝子の抽出が必須であり、ホルモン療法に活用するために最適な遺伝子情報を有するcDNAアレイの設計を行う。

B. 研究方法

・細胞実験の予備的検討

通常の細胞実験に使用する血清中には内因性のエストロゲン（E2）が含まれるため、E2感受性の細胞実験を行う前に、個々の乳がん細胞の増殖性を検討する必要がある。E2感受性（エストロゲン受容体陽性：ER+）のMCF-7とBT-474およびエストロゲン非感受性（エストロゲン受容体陰性：ER-）のSK-BR-3とMDA-MB-231を用い、E2を除去した血清（不含血清）条件下で各細胞の増殖性と細胞周期の変化を測定した。

・E2感受性試験では、不含血清で前処理した4種の乳がん細胞にE2単独（ 10^{-9} または 10^{-11} M）またはE2と 10^{-6} Mおよび 10^{-7} Mのタモキシフェン（TM）を組み合わせて暴露し、cDNAアレイで遺伝子発現プロファイルのクラスター解析から、MCF-7とSK-BR-3特有の発現遺伝子を抽出した。

C. 研究結果

不含血清条件下で培養した場合、何れの細胞株でも死滅細胞の増加は認められなかったが、細胞増殖

性には、ER(+)株とER(-)株で明瞭な違いが観察され、細胞周期解析からER(+)のMCF-7とBT-474ではS期細胞の減少とG1期細胞の増加が観察された。ER(-)のSK-BR-3とMDA-MB-231では、通常の血清条件下での培養と比較すると増殖性の低下は認められるが、細胞周期の比率には大きな変化は認められなかった。一方、不含血清で培養した後、各濃度のE2を暴露すると、ER(-)株では変化しないが、ER(+)株ではS期の増加が濃度依存的に観察できた。一方、TMを単独に暴露してもS期の増加は認められなかった。

E2感受性試験から得られたMCF-7とSK-BR-3由来のRNAを用いてcDNAアレイによる遺伝子発現をクラスター解析したところプロファイルは明確に区別された。これらの結果から両細胞毎の特有に発現している遺伝子は、MCF-7細胞ではinterleukin 18 precursor、interferon gamma-inducing factor、interleukin 1 gamma、insulin receptor substrate 1、cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2B等25個が、SK-BR-3細胞ではepidermal growth factor receptor、tumor necrosis factor receptor 1、HER2、rho GDP dissociation inhibitor 2、insulin-like growth factor binding protein 5 precursor等31個が抽出された。これらの遺伝子はがんの生物学的特徴からも矛盾していない遺伝子であった。

D. 考察

乳がんのER感受性に関する情報は、療法方針を立てる上で重要な要素であるが、必ずしも適正な治療効果が得られるとは限らない。E2感受性が異なる乳がん細胞の遺伝子発現プロファイル解析から、

細胞株固有に発現している遺伝子を抽出する事ができたため、ホルモン剤の臨床試験に活用するための遺伝子情報を有する cDNA アレイの設計が可能となった。一方、E2 やそのアナタゴニストによって変動する共通の遺伝子と固有の遺伝子を区別するための統計学的な解析は現在進行中であることから、それらの成果を踏まえて、今後予定しているホルモン剤等の臨床試験における遺伝子発現解析の手法を確立していきたい。

E. 結論

複数のヒト乳がん細胞株を用いたエストロゲン感受性細胞実験から、感受性の異なる細胞株間で特有の発現遺伝子が抽出できた。これらの情報を基に、ホルモン剤療法の臨床試験評価に用いる cDNA アレイが設計できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

「DNAアレイによる原発性乳癌の術前化学療法における抗癌剤感受性決定遺伝子の検索」の基礎的検討

分担研究者 西尾 和人 国立がんセンター薬効試験部長

研究要旨

乳がんの術前化学療法による病理学的完全寛解を予測する因子を同定するために、臨床試験において患者の末梢血単核球、乳がん組織を用いた cDNA array による遺伝子発現解析を開始した。良質の RNA を得るため、脂肪組織に富むことが多い乳がん組織からの RNA 抽出法を決定した。現在 12 症例のがん組織、末梢血単核球検体から RNA を抽出し、ほぼ全例において cDNA アレイ試行可能な良質の RNA が得られている。また遺伝子発現解析は、がん 2 検体、単核球 2 検体、計 4 検体のアレイ解析が終了している。乳がんと末梢血単核球の遺伝子発現プロファイルはクラスター解析により明確に区別され、両者間で発現に差のある 27 遺伝子を抽出した。今後臨床試験が進み、解析結果、効果、有害事象のデータが蓄積するにつれ、それぞれの効果などに関連する遺伝子の選択、薬物投与前後の比較による薬力学的評価が可能になると考えられる。

A. 研究目的

本試験は乳がん組織、末梢血単核球の化学療法前後の遺伝子発現（腫瘍は化学療法施行後も採取可能な場合に限る）を cDNA アレイを用いて解析し、病理学的完全寛解を予測する因子、予後、有害事象関連因子を同定すること、また化学療法前後の遺伝子発現を比較することにより、薬力学的評価を行うことである。遺伝子発現解析を用いて正しい情報を得るためには、検体からの良質な RNA を確保することが必須であり、乳がん組織における最適な RNA 抽出法を決定する。これまでの限られた結果から、がんとリンパ球の遺伝子発現プロファイルを検討し、がんと正常組織で発現に差のある遺伝子を抽出する。また抽出された遺伝子が生物学的特徴に矛盾しないかを考察し、アレイが正確に施行されているかを判断する。

B. 研究方法

・ RNA 抽出の予備的検討

乳がん組織は脂肪組織に富むため、RNA later が十分浸透せずに RNA が変性する可能性が考えられる。乳がん CNB 検体を、RNA later により室温 24 時間保存後 RNA を抽出した場合と、ISOGEN 内に浸透後、 -160°C で凍結後、破碎した場合で、RNA の質をバイオアナライザーを用いて検討した。

・ 乳がん組織、末梢血単核球の遺伝子発現解析
これまでに cDNA アレイが終了した乳がん検体 2 例、末梢血単核球検体 2 例（いずれも化学療法施行前の検体）の遺伝子発現プロファイリングをクラスター解析し、また両組織で有意に遺伝子発現が異なる遺伝子を T-Test を用いて抽出した。

C. 研究結果

CNB による乳がん組織の採取は検体重量約 20mg 前後で、いずれも $5\mu\text{g}$ 以上 ($5-40\mu\text{g}$) の total RNA が得られ、その後の増幅過程に十分な量が確保できた。RNA の抽出は、RNA later、ISOGEN それぞれの方法で抽出した RNA をバイオアナライザーにて比較検討したところ、後者で rRNA の

ピークがより鮮明に得られ、良質の RNA が得られることが判明した。現在までに RNA を抽出した 12 症例のほぼ全例で cDNA アレイ試行可能な良質の RNA が得られている。

がん組織 2 例、単核球 2 例の遺伝子発現をクラスター解析したところ両組織のプロファイルは明確に区別された。これらの結果から両組織で発現に差のある遺伝子を T-Test ($p < 0.05$) により 27 個抽出した。抽出された遺伝子の中で、がん組織で有意に発現が増加しているものとして IGF-binding protein、Insulin Receptor precursor (IR)、MAPK 6、metalloprotease/disintegrin/cysteine-rich protein precursor (MDC9)、cadherin 3、cadherin 6 precursor、BCL2、発現が低下しているものに CDK4 inhibitor などが含まれていた。これらの遺伝子はがんの生物学的特徴からも矛盾しない遺伝子であった。

D. 考察

通常組織からの RNA 抽出は、5mm 以下の小片であれば、RNA later が速やかに浸透し、RNA を安定させることが知られている。しかしながら乳がん組織は脂肪成分が多く含まれることがあり、疎水性のため RNA later の浸透が不十分である可能性が考えられたため、初期の段階で RNA の品質に関しての検討を加えた。これらにより脂肪組織に富む乳がんのような組織においては、フェノール抽出 (ISOGEN) が適していることが判明した。

今回限られた症例数のアレイ解析の結果から、がん組織と単核球組織は遺伝子発現プロファイルが明確に区別された。また上記の抽出された遺伝子はがんの生物学的特徴から矛盾しない結果であり、アレイの妥当性がある程度確認された。しかし今回の遺伝子には、いわゆる乳がんにおいて特徴的とされる Estrogen Receptor、HER2/neu などは検出されなかった。今後は、化学療法の効果、毒性と関連する遺伝子の抽出に、単純にがん組織どうしの遺伝子発現パターンの差異から遺伝子を抽出する方法ばかりではなく、個々のレベルにおける正常組織（末梢血単核球）とがん組織の遺伝子発現の差などを予測

に用いる方法、また薬力学的差異を用いる方法などを検討し cross validation 法を用いて、最も有効な方法を確立していきたい。

E. 結論

乳がん組織からのRNA抽出と品質を検討し、最善の方法でRNAの確保が可能となった。遺伝子発現解析でがん組織（乳がん）と正常組織（末梢血単核球）は明確に区別され、がんの特異的な発現をみる遺伝子が抽出された。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Usuda, J., Inomata, M., Fukumoto, H., Iwamoto, Y., Suzuki, T., Kuh, H.J., Fukuoka, K., Kato, H., Saijo, N., Nishio, K. Restoration of p53 gene function in 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-resistant human leukemia K562/TPA cells. *Int. J. Oncol.*, 22:81-86 (2003)
2. Kawamura-Akiyama, Y., Kusaba, H., Kanzawa, F., Tamura, T., Saijo, N., and Nishio, K. Non-cross resistance of ZD0473 in acquired cisplatin-resistant lung cancer cell lines. *Lung Cancer*, 38:43-50 (2002)
3. Naruse, I., Fukumoto, H., Saijo, N., and Nishio, K. Enhanced anti-tumor effect of trastuzumab in combination with cisplatin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93:574-581 (2002)
4. Fukuoka, K., Arioka, H., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Kanzawa, F., Kimura, H., Saijo, N., and Nishio, K. Mechanism of vinorelbine-induced radiosensitization of human small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 49:385-390 (2002)
5. Takahashi, F., Akutagawa, S., Fukumoto, H., Tsukiyama, S., Ohe, Y., Takahashi, K., Fukuchi, Y., Saijo, N., and Nishio, K. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice. *Int. J. Cancer*, 98:707-712 (2002)
6. Natsume, T., Koh, Y., Kobayashi, M., Fukumoto, H., Takahashi, F., Nakamura, T., Ohe, Y., Saijo, N., and Nishio, K. Enhanced antitumor activities of TZT-1027 against TNF- α or IL-6 secreting Lewis lung carcinoma *in vivo*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 49:35-47 (2002)
7. Koh, Y., Tsunoda, T., Iwahashi, M., Yamaue, H., Ishimoto, K., Tanimura, H., Fukumoto, H., Nakamura, T., Tatsumi, Y., Shimizu, M., Saijo, N., and Nishio, K. Decreased expression of α 2,8 sialyltransferase and increased

expression of β 1,4 N-acetylgalactosaminyl-transferase in gastrointestinal cancers. *Exp. Biol. Med.*, 227:196-200 (2002)

8. Naruse, I., Ohmori, T., Ao, Y., Fukumoto, H., Kuroki, T., Mori, M., Saijo, N., and Nishio, K. Antitumor activity of the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) IressaTM (ZD1839) in a EGFR-expressing multidrug resistant cell line *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer*, 10:98:310-315 (2002)
9. Koh, Y., Nishio, K., and Saijo, N. Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: topoisomerase inhibitors. In "Cancer Handbook" Reference Nature Publishing Group, Crinan Street, London, UK. Chap. 84C, 1313-1322 (2002)
10. Ohira, T., Akutagawa, S., Usuda, J., Nakamura, T., Hirano, T., Tsuboi, M., Nishio, K., Taguchi, F., Ikeda, N., Nakamura, H., Konaka, C., Saijo, N., and Kato, H. Up-regulated gene expression of angiogenesis factors in post-chemotherapeutic lung cancer tissues determined by cDNA macroarray. *Oncology reports*, 9:723-728 (2002)

2. 学会発表

11. Fukuoka K, Hontsu S, Kai Y, Kobayashi S, Kimura H, Saijo N, Nishio K. : Vinorelbine can act as a radiosensitizer against human non-small cell lung cancer cells. American Association for Cancer Research 93rd Annual Meeting 2002.4.6-10 Sun Francisco
12. Ohmori T, Yamaoka T, Nishio K., Arteaga CL, Saijo N, Adachi M, Kuroki T : ZD1839(Iressa) enhances TNF α -induced apoptotic cell death by inhibition of the Akt/NF- κ B pathway in human non-small-cell lung cancer PC-9 cells. American Association for Cancer Research 93rd Annual Meeting 2002.4.6-10 Sun Francisco
13. Yamaoka T, Ohmori T, Kadofuku T, Noda M, Tsukiyama M, Koizumi F, Nishio K., Saijo N, Kawaguchi T, Adachi M, Kuroki T : Characteristics and resistance mechanism(s) of human non-small-cell lung cancer cell lines with acquired resistance to an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. American Association for Cancer Research 93rd Annual Meeting 2002.4.6-10 Sun Francisco
14. Taguchi F, Koh Y, Koizumi F, Ueda Y, Tsukiyama S, Tamura T, N. Saijo, K. Nishio : Activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (VEGFR [KDR]-TKI), in a model of ZD1839 ('Iressa') resistance. 14th NCI-EORTC-AACR Symposium on "Molecular Targets and Cancer Therapeutics "Eur J Cancer" 2002.11.19-22 Frankfurt, Germany

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Koh, Y., Nishio, K., Saijo, N.	Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic Agents: topoisomerase inhibitors.	Malcolm R. Alison	Cancer Handbook	Nature Publishing Group	Crinan Street, London, UK.	2002	Chap.84C, 1313-1322

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Usuda, J., Inomata, M., Fukumoto, H., Iwamoto, Y., Suzuki, T., Kuh, H.J., Fukuoka, K., Kato, H., Saijo, N., Nishio, K.	Restoration of p53 gene function in 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-resistant human leukemia K562/TPA cells.	Int. J. Oncol.	22	81-86	2003
Kawamura-Akiyama, Y., Kusaba, H., Kanzawa, F., Tamura, T., Saijo, N., and Nishio, K.	Non-cross resistance of ZD0473 in acquired cisplatin-resistant lung cancer cell lines.	Lung Cancer	38	43-50	2002
Naruse, I., Fukumoto, H., Saijo, N., and Nishio, K.	Enhanced anti-tumor effect of trastuzumab in combination with cisplatin.	Jpn. J. Cancer Res.	93	574-581	2002
Fukuoka, K., Arioka, H., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Kurokawa, H., Ishida, T., Tomonari, A., Suzuki, T., Usuda, J., Kanzawa, F., Kimura, H., Saijo, N., and Nishio, K.	Mechanism of vinorelbine-induced radiosensitization of human small cell lung cancer cells.	Cancer Chemother. Pharmacol.	49	385-390	2002
Takahashi, F., Akutagawa, S., Fukumoto, H., Tsukiyama, S., Ohe, Y., Takahashi, K., Fukuchi, Y., Saijo, N., and Nishio, K.	Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice.	Int. J. Cancer	98	707-712	2002
Natsume, T., Koh, Y., Kobayashi, M., Fukumoto, H., Takahashi, F., Nakamura, T., Ohe, Y., Saijo, N., and Nishio, K.	Enhanced antitumor activities of TZT-1027 against TNF- α or IL-6 secreting Lewis lung carcinoma <i>in vivo</i> .	Cancer Chemother. Pharmacol.	49	35-47	2002
Koh, Y., Tsunoda, T., Iwahashi, M., Yamaue, H., Ishimoto, K., Tanimura, H., Fukumoto, H., Nakamura, T., Tatsumi, Y., Shimizu, M., Saijo, N., and Nishio, K.	Decreased expression of α 2,8 sialyltransferase and increased expression of β 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase in gastrointestinal cancers.	Exp. Biol. Med.	227	196-200	2002
Naruse, I., Ohmori, T., Ao, Y., Fukumoto, H., Kuroki, T., Mori, M., Saijo, N., and Nishio, K.	Antitumor activity of the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) Iressa TM (ZD1839) in a EGFR-expressing multidrug resistant cell line <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	Int. J. Cancer	98	310-315	2002
Ohira, T., Akutagawa, S., Usuda, J., Nakamura, T., Hirano, T., Tsuboi, M., Nishio, K., Taguchi, F., Ikeda, N., Nakamura, H., Konaka, C., Saijo, N., and Kato, H.	Up-regulated gene expression of angiogenesis factors in post-chemotherapeutic lung cancer tissues determined by cDNA macroarray.	Oncology reports	9	723-728	2002

資料

目次

資料1) - 1

原発性乳癌に対する 5-FU/エピルビシン/シクロフォスファミドに続くパクリタキセル週 1 回投与 (±トラスツズマブ) 併用による術前化学療法の第 II 相試験 試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料1) - 2

附随研究「DNA アレイによる原発性乳癌の術前化学療法における抗癌剤感受性決定遺伝子の検索」 試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料2) - 1

ホルモン高感受性の閉経後乳癌に対するアナストロゾール投与による術前内分泌療法の第 II 相試験試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料2) - 2

附随研究 DNA アレイによる原発性乳癌の術前内分泌療法におけるホルモン剤感受性決定遺伝子の検索」 試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料3) - 1

高齢者の原発性乳癌に対するパクリタキセル週 1 回±トラスツズマブ投与による術前化学療法の第 II 相試験のプロトコール 試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料3) - 2

附随研究「DNA アレイによる原発性乳癌の術前化学療法における抗癌剤感受性決定遺伝子の検索」 試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料4) 付随研究のサンプリングの流れ

資料5) カスタムアレイの遺伝子の選択とカスタムアレイの質の向上のためのデザイン (非公開)

資料6) カスタムアレイリスト (非公開)

資料7) サンプルの QC と保存法改善についての基礎研究

資料8) ホルモン接触時、Tamoxifen 投与時の前臨床データの解析

資料9) 乳癌サンプルの遺伝子発現の解析例

原発性乳癌に対する5-FU/エピルビシン/シクロフ
ォスファミドに引き続くパクリタキセル週1回投与
(±トラスツズマブ)併用による術前化学療法の
第Ⅱ相試験

国立がんセンター中央病院 乳腺グループ

研究代表者

安藤 正志

国立がんセンター中央病院 内科

連絡先：〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1

TEL：03-3542-2511

FAX：03-3542-3815

E-mail：mandoh@ncc.go.jp

試験計画書第1案作成

平成14年8月16日

試験計画書第2案作成

平成14年10月21日

国立がんセンターIRB承認

平成14年11月27日

資料

目次

資料 1) - 1

原発性乳癌に対する 5-FU/エピルビシン/シクロホスファミドに続くパクリタキセル週 1 回投与 (±トラスツズマブ) 併用による術前化学療法の第 II 相試験 試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料 1) - 2

附随研究「DNA アレイによる原発性乳癌の術前化学療法における抗癌剤感受性決定遺伝子の検索」 試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料 2) - 1

ホルモン高感受性の閉経後乳癌に対するアナストロゾール投与による術前内分泌療法の第 II 相試験試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料 2) - 2

附随研究 DNA アレイによる原発性乳癌の術前内分泌療法におけるホルモン剤感受性決定遺伝子の検索」 試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料 3) - 1

高齢者の原発性乳癌に対するパクリタキセル週 1 回±トラスツズマブ投与による術前化学療法の第 II 相試験のプロトコール 試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料 3) - 2

附随研究「DNA アレイによる原発性乳癌の術前化学療法における抗癌剤感受性決定遺伝子の検索」 試験実施計画書 (プロトコール) (非公開)

資料 4) 付随研究のサンプリングの流れ

資料 5) カスタムアレイの遺伝子の選択とカスタムアレイの質の向上のためのデザイン (非公開)

資料 6) カスタムアレイリスト (非公開)

資料 7) サンプルの QC と保存法改善についての基礎研究

資料 8) ホルモン接触時、Tamoxifen 投与時の前臨床データの解析

資料 9) 乳癌サンプルの遺伝子発現の解析例

目 次

0. 概要	4
0-1 シェーマ	4
0-2 目的	5
0-3 対象症例	5
0-4 治療	6
0-5 予定症例数と研究期間	6
1 目的	7
2 背景	7
2-1 原発性乳癌の治療戦略	7
2-2 原発性乳癌に対する術前化学療法	7
2-3 原発性乳癌に対する術前化学療法の治療レジメン	8
2-4 本試験の治療レジメンおよび試験デザイン	10
2-5 試験参加患者に予想される利益と危険(不利益)の要約	11
3 症例選択規準	13
3-1 適格規準	13
3-2 除外規準	14
4 登録	14
4-1 登録の手順	14
5 治療計画	14
5-1 プロトコール治療	14
5-2 プロトコール治療中止・終了規準	16
5-3 後治療	17
5-3-1 外科的切除	17
6 予想される有害反応と治療変更規準	18
6-1 有害反応の評価	18
6-2 予期される有害反応	19
6-3 導入部の化学療法における治療変更規準	19
6-4 Weekly paclitaxel における治療変更規準	20
6-5 併用療法・支持療法	21
7 評価項目・臨床検査・評価スケジュール	23
7-1 登録前(治療前)評価項目	23
7-2 治療期間中の安全性及び有効性評価	24
7-3 治療終了後の安全性及び有効性評価項目	26
7-4 記録用紙の種類と提出期限	27

8	有害事象の報告	27
9	効果判定	29
10	統計学的事項	30
11	倫理的事項	30
11-1	患者の保護	30
11-2	インフォームドコンセント	30
11-3	プロトコルの遵守	31
11-4	施設の倫理審査委員会（機関審査委員会）の承認.....	32
12	研究組織.....	32
12-1	研究代表者および研究事務局.....	32
12-2	試験担当医師.....	32
12-3	効果・安全性評価委員会	32
13	研究結果の発表	33
14	附随研究.....	33
15	参考文献.....	34

Appendix 1: 説明・同意文書、同意書

Appendix 2: CRF 一式

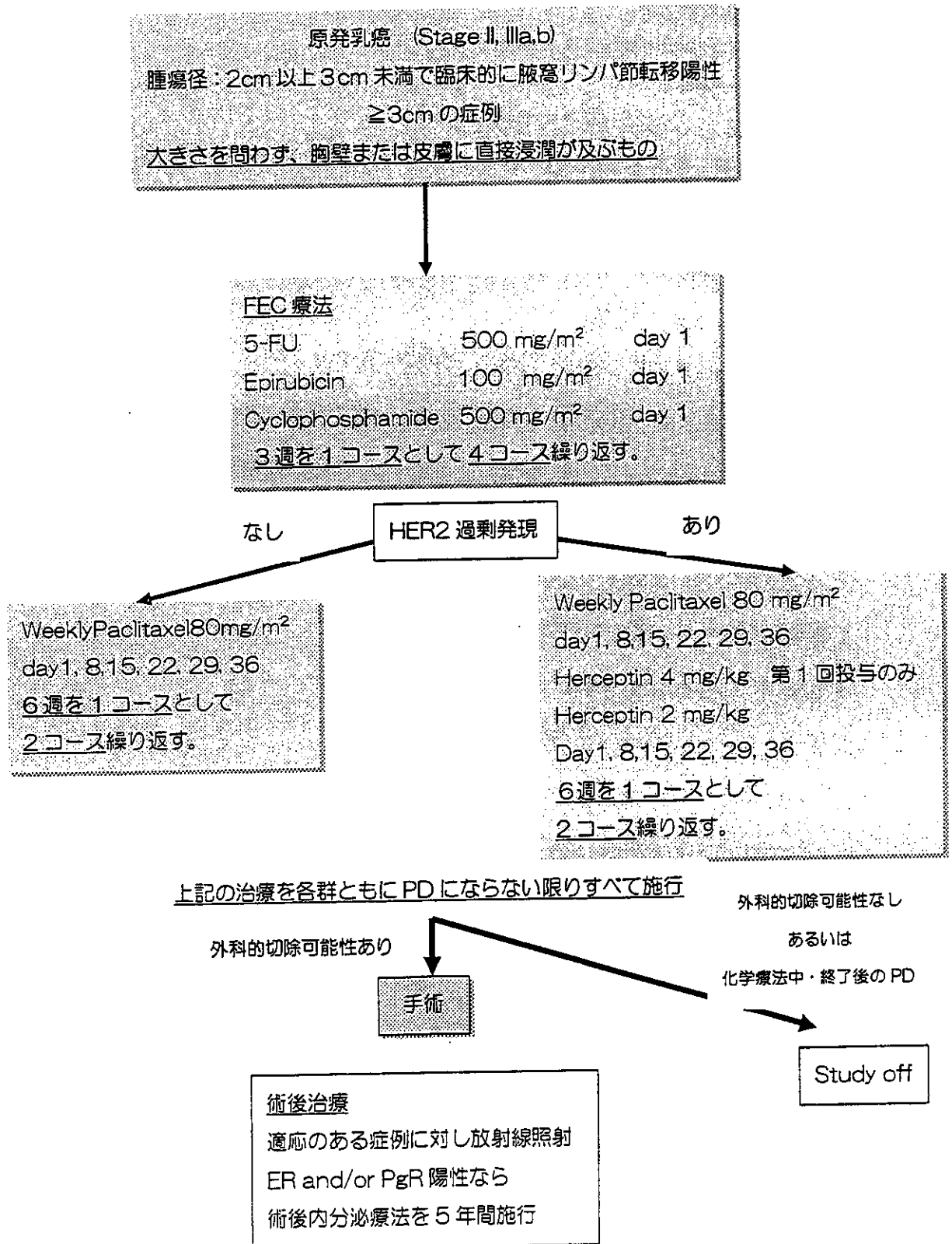
Appendix 3: 乳癌の組織学的分類(乳癌取り扱い規約第14版(2000年))

Appendix 4: 乳癌のAJCC-TNM分類(2002)

Appendix 5: 5-FU、Epirubicin、Cyclophosphamide、Paclitaxel、Herceptin 添付文書

0. 概要

0-1 シェーマ



0-2 目的

手術可能な原発性乳癌に対する術前化学療法において、5-FU/Epirubicin/Cyclophosphamide (FEC) followed by weekly paclitaxel の病理学的完全寛解率を評価する。

1) 主評価指標 (プライマリーエンドポイント)

病理学的完全寛解率

2) 副評価指標 (セカンダリーエンドポイント)

臨床的奏効率(導入部の化学療法終了時およびすべての化学療法終了時)、乳房温存術施行率、有害事象発生率

0-3 対象症例

1) Disease characteristics

- (a) 組織診(core needle biopsy)で乳癌と診断された症例
- (b) 臨床病期 (AJCC 2002 年) II 期または IIIa, b 期で次のいずれかに該当する症例
 - ・ 腫瘍径 2cm 以上 3cm 未満で臨床的に腋窩リンパ節転移陽性と判断できる症例
 - ・ 腫瘍径 3cm 以上の症例
 - ・ 大きさを問わず、胸壁または皮膚に直接浸潤が及ぶもの
- (c) 原発巣のホルモン受容体の状況は問わない

2) Patient characteristics

- (a) 年齢：18 才以上 65 才未満の症例
- (b) PS (ECOG) 0-2 の症例
- (c) 以下にあげる諸臓器機能を有する症例
 - ・ 骨髄機能
 - 白血球数 $3,000/\text{mm}^3$ 以上または好中球数 $1,500/\text{mm}^3$ 以上
 - 血小板 $100,000/\text{mm}^3$ 以上
 - ・ 肝機能
 - AST(GOT)およびALT(GPT) 60 IU/L 以下
 - 総ビリルビン 1.5mg/dl 以下
 - ・ 腎機能
 - 血清クレアチニン 1.5mg/dl 以下
 - ・ 心機能

心電図で正常又は治療を必要としない程度の変化

(d) 本人より文書による同意 (Informed Consent) が得られた症例

0-4 治療

5-FU	500 mg/m ²	15 分点滴静注
Epirubicin	100 mg/m ²	15 分点滴静注
Cyclophosphamide	500 mg/m ²	30 分点滴静注 Day 1

3 週間隔 4 コース施行

引き続いて

1) HER2 過剰発現なしの症例

Paclitaxel 80 mg/m² 60 分点滴静注 (day 1, 8, 15, 22, 29, 36)
を 6 週 1 コースとして 2 コース施行

2) HER2 過剰発現ありの症例

Paclitaxel 80 mg/m² 60 分点滴静注 (day 1, 8, 15, 22, 29, 36)
Herceptin 2 mg/kg 60 分点滴静注 (day 1, 8, 15, 22, 29, 36)
(ただし、第 1 回目の投与のみ Herceptin は 4mg/kg とする)
を 6 週 1 コースとして 2 コース施行

0-5 予定症例数と研究期間

予定登録症例数：50 例

登録期間 1 年、追跡期間：登録終了後 1 年、総研究期間：2 年