

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推進事業

cDNAアレイを用いた新しい乳癌治療体系の構築に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 藤原 康弘

平成17(2005)年 5月

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推進事業

cDNAアレイを用いた新しい乳癌治療体系の構築に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 藤原 康弘

平成17(2005)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- cDNAアレイを用いた新しい乳癌治療体系の構築に関する研究 ----- 1
藤原 康弘

II. 分担研究報告

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相試験に関する研究 ----- 8
木下 貴之、長谷川 匡
2. 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 ----- 12
安藤 正志、長谷川 匡
3. 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相試験に関する研究 ----- 19
安藤 正志、長谷川 匡
4. カスタムアレイによる原発性乳癌の遺伝子発現解析に関する研究 ----- 24
西尾 和人、関島 勝

(資料)

- 図1 新カスタムアレイを用いた臨床サンプルの遺伝子発現解析
(ホルモン関連遺伝子)
- 図2 新カスタムアレイを用いた臨床サンプルの遺伝子発現解
(全遺伝子でのクラスタリング)
- 図3 L3/L2サンプルにおけるP 値およびオッズ比と選択される
遺伝子数 (左) およびP値-オッズ比の関係 (右)
- 図4 選択した各遺伝子の末梢神経障害グレード0または1の群と2
の群とにおける発現状態

5. DNAアレイによる抗癌剤感受性決定遺伝子探索方法の検討 ----- 33
大橋 靖雄

(資料)

- 図1. p値の負の対数の合計を指標とした場合の参照線
- 図2. プロットの曲線下面積を指標としたときの参照線
- 表1. group 1および 2の遺伝子のAUCとオッズ比

図3, 4. 遺伝子のQ-Q plot

6. Per Gene Basis Analysisによる遺伝子発現の再現性に関する研究 ----- 41

竹内 正弘

(資料)

表 1. 2乗差の中央値の大きい遺伝子

表 2. 2乗差の分散の大きい遺伝子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 52

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推進事業）
総括研究報告書

cDNAアレイを用いた新しい乳癌治療体系の構築

主任研究者 藤原康弘 国立がんセンター中央病院

研究要旨

乳癌の術前化学療法による病理学的完全寛解及び重篤な副作用出現を予測する因子を同定するために、3つの臨床試験及び3つの附随研究を実施した。現在で92例を登録、治療を実施し、28例で外科的切除を終了した。これらの臨床試験において患者の末梢血単核球および乳癌組織を採取し、匿名化、核酸精製、品質管理をおこないほぼ良質な核酸が得られた。新カスタムアレイを用いて、臨床サンプルの遺伝子発現解析を行った。新カスタムアレイを用い末梢血単核球および乳がん組織から得られた遺伝子発現データの解析をおこない、クラスタリングを行った。遺伝子発現プロファイルは大きく、末梢血単核球と乳がん組織の2群に分けられ、発現プロファイルが異なることが示された。乳癌に過剰発現を示す遺伝子（estrogen-responsive 遺伝子等）が得られた。

パクリタキセル投与による神経障害の早期検出のための遺伝子発現プロファイルおよび病理学的完全寛解と相関を示す遺伝子発現プロファイルの探索おこなった。末梢神経障害予測遺伝子として58の遺伝子が選択された。同予測遺伝子セットをテストセットにおいて検証した。パクリタキセルによる末梢神経障害の発現が代替組織である末梢血単核球の遺伝子変動を指標に早期検出もしくは予測されうると示された。

針生検と治療前末梢血単核球サンプルを用いた病理学的評価との相関遺伝子の検索し病理学的評価に匹敵する予測遺伝子42（細胞接着、骨格、G-蛋白質、膜受容体、増殖調節関連遺伝子）が得られた。

分担研究者：所属施設 国立がんセンター
中央病院

氏名 藤原康弘

氏名 安藤正志、木下貴之

所属施設 東京大学大学院医学系研究科

氏名 大橋靖雄

所属施設 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿
島研究所

氏名 関島勝

所属施設 国立がんセンター研究所

氏名 西尾和人、長谷川匡

所属施設 北里大学大学院薬学研究科

氏名 竹内正弘

A. 研究目的

本邦女性における乳癌死亡者数は約9000人（2000年）であり、癌主別に第5位である。さらに大阪府癌登録を例に人口10万あたりの罹患率では、乳癌のそれは第1位であり、1960年代に比べて約4.5倍もの増加を示している。乳癌患者の増加傾向は世界的な現象であり、乳癌治療体系の充実に対する社会的要請は高い。現在の乳癌治療は、HE染色と免疫染色（エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体の発現の有無）を用いて病理組織検体を評価した結果と、腫瘍サイズ、患者の年齢あるいは閉経の有無等に関する情報で、治療方針を決定しているが、効果・副作用予測を治療前には十分に行えていない。すなわち癌遺伝子産物HER2が陽性の乳癌であっても、HER2に対するモノクローナル抗体であるトラスツズマブ治療が奏効しない症例や、エストロゲン受容体が陽性であっても抗エストロゲン剤に耐性の症例、あるいは治療前の全身状態が良好であっても癌化学療法により重篤な副作用が発現する症例を稀ならず経験する。そこで本研究の目的は、乳癌の術前治療のセッティングにおいて、前向き臨床試験を実施し、治療前後の腫瘍組織及び正常組織（末梢血単核球）における各種遺伝子発現量をcDNAアレイ等のファルマコゲノミクス解析の手法を用いて検討し、その結果を臨床経過及び前臨床試験成績と比較・考察することで、既存の効果・副作用予測因子を凌駕するマーカー遺伝子を同定す

ることである。

B. 研究方法

I. 原発性乳癌の術前治療における遺伝子発現解析により腫瘍縮小効果と副作用を予測することが可能なマーカー遺伝子の探索（初～3年度）同時に、集積されたデータの統計的な解析を進め、既存の効果・副作用予測因子を凌駕するマーカー遺伝子を同定、検証した。

1) 対象

初年度計画の4試験のうち2年度から2試験を統合し、下記の3試験とし、ホルモン療法下でのcDNAアレイ解析研究への集積予定症例数を増加させた。

(A)原発性乳癌に対する5FU/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（登録81例）(B)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（登録22例）(C)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（登録11例）

2) 方法

① 検体採取方法と処置

術前療法施行前、及び手術時（術前療法終了後1ヶ月以内）に静脈血、乳癌組織、正常乳腺組織を採取。検体（静脈血の場合は単核球分離後）からRNAを抽出、増幅、保管する。その後、RIラベルをおこない、本研究で作製したカスタムフィルターにハイブリダイズさせる。遺伝子発現を画像解析し、数値化した後、標準化、統計解析を実施する。得られた統計データと臨床像（治

療効果、副作用、既存の予後因子)、病理診断との相関性、意義付けに関して考察した。

② 測定項目：癌および薬物に関連する約1000の遺伝子の発現を解析する独自のカスタムアレイを用い、症例、検体間の発現の差異、および治療前後における遺伝子発現を比較検討した。

③ 解析：各遺伝子の発現量を数値化、標準化の後、多変量解析をベースにした統計学的手法に解析より、臨床像を予測する遺伝子を選択した。また、クラスタリングを施行し、関連因子遺伝子群を抽出した。解析デザインとして、達成される症例数の3分の2をtrial set, 残り3分の1をtest setとするvalidation study designとした。

II. 遺伝子発現解析を用いた毒性の予測(初～3年度)：臨床対象薬剤を、細胞株に接触あるいは担がんマウスモデルに全身的投与することにより、標的腫瘍組織および正常組織における遺伝子発現変動を解析した。遺伝子発現解析は、cDNAアレイを用い、数千から数万の遺伝子の発現を接触前後で比較した。薬力学的効果を解析するために、濃度依存性変化を示す遺伝子を統計学的に選択するとともに、主成分解析により、特に大きく関与する遺伝子を特定した(初～2年度)。3年度は、臨床試験での発現解析との相関解析から、前臨床試験において、臨床での予測が可能な遺伝子を特定した。

III. 多施設共同研究によるマーカー遺伝子の臨床的意義の検証(3年度)
既知の効果・副作用予測因子、生命予後因

子を凌駕する可能性が高いと考えられるマーカー遺伝子について、多施設共同臨床試験によるvalidation studyのプロトコール作成を3年度に試みた。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子発現解析はゲノムを対象とせず、ゲノム解析の範疇に属さない。しかし、当該施設のIRBおよびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理的指針に準拠して実施した。また、小動物を用いた基礎研究では、動物倫理委員会の了承を得、実施する。さらに、同研究過程のすべての実験データは保存し、必要な場合、公表することとした。

C. 研究結果

(1) 乳癌細胞におけるホルモン療法に対する感受性に関連する167種の遺伝子を選択した。これらを以前より選択していた抗がん剤感受性関連遺伝子に加えて、新カスタムアレイにスポットした。アレイ内誤差を評価し、スポット位置による誤差を評価することにより、遺伝子発現の精度を向上するようにデザインした。実際に作製した新カスタムアレイを用い、がん細胞株、ヒト臨床サンプルの遺伝子発現解析を実施し、アレイの評価を統計学的に実施した。アレイの特性として遺伝子スポット位置における要因がシグナル値に及ぼす影響が大きいことを示した。

(2) 臨床試験(国立がんセンター中央病院)で得られた各種臨床サンプルの採取、検体管理保存、RNA抽出、バイオアナライザーを用いた品質管理をおこなった。集積中のサンプルは適正に管理、匿名化されて、

研究は順調に推移した。生検による乳癌組織、末梢血単核球については概ね良好な質のRNA回収を実現したが、手術切除標本から抽出したRNAの質については満足のものではなかった。またその原因について調査した。

(3) 新カスタムアレイを用い末梢血単核球および乳がん組織から得られた遺伝子発現データの解析をおこない、クラスタリングを行った。遺伝子発現プロフィールは大きく、末梢血単核球と乳がん組織の2群に分けられ、発現プロフィールが異なることが示された。乳癌に過剰発現を示す遺伝子 (estrogen-responsive gene等) が得られた。

(4) 得られた遺伝子マーカーの生物学的な再現性の実証を定量的PCRを用いて検討するために、選択された遺伝子のプライマーを設計し、現在は新カスタムアレイに追加した乳がん・ホルモン関連167遺伝子のプライマーデザインが完成した。発現に差の認められた遺伝子の再現性の検討を実施した。

(5) 新カスタムアレイに新たに追加した乳がん、ホルモン関連遺伝子群の発現プロフィールをクラスタリングし、全遺伝子でのクラスタリングを比較した。末梢血単核球の遺伝子発現解析は、全遺伝子とホルモン関連遺伝子群では、異なるパターンを示すのに対し、乳がん組織では両者で近似したパターンが認められた。

(6) 乳がん術前化学療法による有害事象予測因子の同定

前述の臨床試験 (A) におけるサンプルリングポイントは、針生検(CNB)、治療前採血 (L1)、CEF治療後かつパクリタキセル

εトラスツズマブ治療前 (L2)、パクリタキセルεトラスツズマブ治療後 (L3)、可能な場合手術検体における正常部位 (OpeNor) と癌部 (OpeCa) の合計4-6ポイントである。このプロトコールに含まれ平成16年12月20日までに数値化されたCNB、L1、L2,L3のサンプル合計170データをトレーニング-セットとして用い、平成17年1月24日現在までに新規に数値化されたものをテスト-セットとして用いた。同データを用いパクリタキセル投与による神経障害の早期検出のための遺伝子発現プロフィールおよび病理学的完全寛解と相関を示す遺伝子発現プロフィールの探索おこなった。この解析目的に140データを使用した。

①数値化されたデータの解析上の信頼性に関する検討：癌部と正常組織用における差を利用し、解析に使用するサンプル全体における全遺伝子の発現状態をクラスタリングした。乳癌組織と末梢血単核球細胞の発現プロフィールが明確に分離された。

②パクリタキセル治療前後における末梢血単核球遺伝子変動のP値およびオッズ比による関連遺伝子の同定：治療前における末梢血単核球の遺伝子発現 (L2) からみた治療後 (L3) の変動 (L3/L2) 遺伝子数をP値とオッズ比で選択した。変動の大きさの指標であるオッズ比と遺伝子変動の有意性を示すP値の間では、P値が低く差異の有意性が高い遺伝子はオッズ比が大きい傾向があった。治療により変動し末梢神経障害の程度が強く表現される場合に、遺伝子変動も大きいことを示した。

P値かつオッズ比で規定される遺伝子数とP値またはオッズ比で規定される遺伝子数

の関係を検討した。両規定要素に均等に影響を受ける遺伝子を選択する目的で、 $P < 0.01$ またはオッズ比 $>$ 平均 $+ 2$ 分散で遺伝子を選択した。同データセットのオッズ比が大きく、末梢神経障害の程度が重いもので各遺伝子の変動が大きい可能性が高い、そこで各遺伝子を末梢神経障害(NCI-CTC ver.2による)グレード0または1の群と2または3の群の2群に分類し比較した。末梢神経障害グレード2または3の群において選択した遺伝子全てがグレード0または1の群より変動が大きいことが確認された。

③末梢神経障害予測遺伝子：58の遺伝子を選択された。それらは、細胞骨格、細胞外マトリックス、Rhoシグナル伝達系、イオンチャンネル、細胞膜受容体、増殖因子、サイトカインレセプター、シグナル伝達機構、薬剤解毒、代謝、シナプスのエクソサイトシスに関わる遺伝子であった。薬剤への暴露が刺激となり細胞内シグナルを介して細胞の状態を変化させていることが推察された。

④テストセットにおける分類検証

12例のテストセットを検証に用いた。トレーニング-セットにおける末梢神経障害2または3の出現頻度は28例中5例の17.9%であったのに対しテスト-セットにおける頻度は12例中3例の25.0%であった。用いた遺伝子により3例の末梢神経障害グレード2のサンプルが同じ群に分類され、パクリタキセルによる末梢神経障害の発現が代替組織である末梢血単核球の遺伝子変動を指標に早期検出もしくは予測されることが示唆された。

(7) 針生検と治療前末梢血単核球サンプルを用いた病理学的評価との関連遺伝子の

検索

①正常末梢血単核球からみた乳がん細胞の遺伝子発現変移のP値およびオッズ比：病理学的CR群と異なる群間比較におけるL1からみたCNBの遺伝子発現状態の差異をP値で検討した。P値とOdds比との関係は < 1 となる遺伝子においても > 1 となる遺伝子と同等にP値の低いものが認められた。これは病理学的評価と逆相関を示す遺伝子の存在を示唆した。

②P値およびオッズ比から選択した病理学的評価と相関を示す遺伝子：P値とオッズ比を用いて遺伝子を選択し、選択された遺伝子を用いたクラスタリングをおこなった。その結果、これらの遺伝子はCNBの遺伝子プロファイル、L1の発現プロファイルに規定されない遺伝子群であり、その相関は低い傾向にあった。病理学的評価(乳癌取り扱い規約第14版による)1a,1b群と2以上の2群において選択された各遺伝子の発現状態はオッズ比の結果を反映してがん細胞と正常細胞において逆に相関する遺伝子群の存在を示した。がん細胞のデータだけでは、選択しがたい遺伝子群であることが推察された。

③選択された病理学的評価予測遺伝子の内容：選択された遺伝子42は、細胞接着、骨格、G-蛋白質、膜受容体、増殖調節関連遺伝子であった。

D. 考察

本研究は新しい乳癌治療体系の構築を主目的、臨床サンプルの遺伝子発現解析の信頼性向上を副目的として乳がん術前治療の臨床試験の付随研究として実施した。統計的な検討のもと前臨床試験を実施し、新しい

カスタムアレイの作成とその評価をおこなった。基礎から臨床応用へのいわゆるトランスレーショナル研究が推移した。

新カスタムアレイと従来のアレイの比較検証した結果、スポットされた遺伝子の位置的要因が誤差要素として大きいことが統計学的に証明された。それに基づきスポット位置の無作為化により、アレイの質の向上を検証しえたことも成果の1つである。

本研究は前向き臨床試験でおこなわれ、匿名化など倫理的側面に配慮した研究として実施した。また品質管理を厳格におこなった。これらは今後の医師主導型臨床試験のシステムの模範となりえる。

本研究では、投与前後の末梢血単核球のデータを用いた。患者負担が少ない採血にてデータを採取し、治療法を評価、予測が可能であることが示されたことは、負担の少ない検査法により、治療の個別化ができる可能性を示唆していると考えられる。

当初計画した研究を完結できた。3つの臨床試験のうち、1つの臨床試験（原発性乳癌に対する5FU/エピルピシン/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）は十分な症例数がエントリーされ、検定に十分なデータを得ることができた。術前ホルモン療法および、高齢者に対するパクリタキセル週1回投与（±トラスツズマブ）併用による術前化学療法に関する臨床試験についての症例集積が比較的遅かったため、現在も集積を続けており、完結させる。

（2）研究成果の学術的・国際的・社会的意義について
末梢血をもちいた評価、予測が可能である

ことをしめしたことは、患者負担の少ない検査法として臨床的意義は大きいと考えられ、国際的にもユニークなアプローチである。アレイ自身の評価、臨床検体の評価、バイオマーカの検出力の検定などを統計的に実施した点も評価される。各種バイオマーカを臨床試験で正当に評価したうえで、臨床応用されることを示すことができた。

本研究で得られた乳がんの治療予測マーカー遺伝子を用い、乳がん治療予測簡易アレイの作製が可能になった。同簡易アレイを用いて、その有用性を証明する新たな臨床試験の実施が可能である。

E. 結論

乳癌治療（癌化学療法、内分泌療法、抗体療法）において、腫瘍部および末梢血で測定が可能な病理学的効果・副作用を予測できる、マーカー遺伝子を同定した。

F. 健康危険情報

G.

1. 論文発表

Korfee S, Eberhardt W., Fujiwara Y, Nishiho K. The role of DNA-microarray in translational cancer research. *Curr. Pharmacogenomics* (in press)

Shimizu, C., Hasegawa, T., Tani, Y., Takahashi, F., Takeuchi, M., Watanabe, T., Ando, M., Katsumata, N., Fujiwara, Y. Expression of insulin like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: Immunohistochemical analysis. *Human Pathology* (in press)

Yonemori, K., Katsumata, N., Uno H., Mastumoto, K., Kouno, T., Tokunaga, S., Yamanaka, Y., Shimizu, C., Ando, M., Takeuchi, M. and Fujiwara, Y. Efficacy of weekly paclitaxel in patients with docetaxel resistant metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* (in press)

申請準備中

2. 学会発表

1) 国内口頭発表 9 2 件

それ以外（レビュー等）の発表 5 2 件

そのうち主なもの

藤原康弘・外来がん治療とファルマコゲノミクスの融合：cDNAアレイを用いた乳がん術前化学療法及び内分泌療法の効果・副作用予測・第63回日本癌学会総会・シンポジウムS04・2004年（福岡市）

2) 海外口頭発表 2 2 件

原著論文による発表 2 6 件

それ以外（レビュー等）の発表 5 件

そのうち主なもの

Shimizu, C., Fukumoto, H., Fujiwara, Y. et al. Pharmacodynamic changes in gene expression may predict peripheral neurotoxicity of paclitaxel(P) *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2005

Hamano R, Ohide A, Sekijima M, Nishio K, Takeuchi M, Fujiwara Y. Latin Square Design to Gene Expression Experiments, 11th Int Conf Intellig Systems Mol Biol, 2003 (Brisbane, Australia)

H. 知的所有権の出願・取得状況

乳がん治療感受性予測アレイに関する特許

別添 4

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推進事業） 分担研究報告書

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

分担研究者 木下 貴之 国立がんセンター中央病院

分担研究者 長谷川 匡 国立がんセンター研究所第三組織病理研究室

研究要旨

高齢者の手術可能な原発性乳癌に対して、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。本臨床研究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として計画され、平成15年1月31日に国立がんセンター 倫理審査委員会の承認が得られた。平成15年2月1日より登録開始され、平成17年3月8日現在登録症例は11例である。プロトコル治療を終了した9例中、病理学的完全寛解は2例に認められた。

A. 研究目的

高齢者の手術可能な原発性乳癌に対して、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ことを目的として第II相臨床試験を計画した。

B. 研究方法

これまでの術前化学療法後、長期に予後を観察した研究では、術前化学療法により腫瘍縮小効果を認め、乳房温存率の向上を認めても、生存率、無病再発率において有意な差は認められていない^{1,2)}。

しかし、病理学的完全寛解を得られた症例では、全生存率、無再発生存率は良好で

あったという報告¹⁾より、乳癌に対する術前化学療法において、より病理学的完全寛解率の高い治療レジメンが求められている。

最近では、乳癌の術前化学療法において、anthracycline系抗癌剤に sequential に taxane系抗癌剤を追加することによる病理学的完全寛解率の向上を示唆する試験結果が公表されている^{3,4)}。

しかし、高齢者乳癌の術前化学療法においては、前述のanthracycline系抗癌剤に sequential に taxane系抗癌剤を行う治療レジメンは、若年者よりも有害事象の頻度が高く、程度が重篤であることが予想されるため、有効性が期待でき、より毒性の低い治療レジメンを検討することは重要と考えられる。

乳癌の術前化学療法において引き続きFAC療法が行われる治療レジメンに関して、paclitaxel 1週間隔投与群では、3週間隔投与と比較して、病理学的完全寛解率が良好であったことが示されていること³⁾より、本試験におけるpaclitaxelの用法は、1週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の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

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17年3月8日現在、登録例は11例（うちHER2陽性例は5例）。11例中2例は現在プロトコル治療中である。平成17年3月8日までにプロトコル治療を完了したのは9例であり、うち1例は大腸がんによるイレウスのための治療中止であったため臨床効果は評価できない。残りの8例の臨床効果はCR2例、PR4例、NC1例、PD1例であった。病理学的完全寛解は臨床的にCRとなった2症例に認め、いずれもHER2陽性例であった。

本第II相試験登録症例のうち9例にcDNAアレイによる効果・副作用予測についての附随研究の同意が得られた。

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。

予定症例数が40例/1年のところ、約2年間で10例と症例登録の進捗が不良であったのは、対象症例を高齢者かつホルモン受容体いずれかが陰性の症例に限定したためと考える。しかし、少数例の解析ではあるが、とくにHER2陽性例での臨床効果、病理学的効果が高いことから、今後も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意義はあると思われる。

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、実施中である。対象症例が少ないことから試験進捗が遅れているが、今後も試験を継続の予定である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

H. 参考資料

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: 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

別添 4

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推進事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 安藤正志 国立がんセンター中央病院 内科

分担研究者 長谷川 匡 国立がんセンター 研究所第三組織病理研究室

研究要旨

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/エピルビシン/シクロフォスファミドに引き続きパクリタキセル週1回投与(HER2過剰発現例にはトラスツズマブを併用)を併用すること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。本臨床研究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として計画され、平成14年11月27日に国立がんセンター倫理審査委員会の承認が得られた。平成14年12月1日より登録開始され、平成17年3月8日現在で81例を登録、治療を実施し、65例で外科的切除を終了した。

A. 研究目的

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/エピルビシン/シクロフォスファミドに引き続きパクリタキセル週1回投与(HER2過剰発現例にはトラスツズマブを併用)を併用することによる術前化学療法の病理学的完全寛解率を評価することを目的として第II相臨床試験を計画した。

B. 研究方法

これまでの術前化学療法後、長期に予後を観察した研究では、術前化学療法により腫瘍縮小効果を認め、乳房温存率の向上を認めても、生存率、無病再発率において有

意な差は認められていない^{1,2)}。

しかし、病理学的完全寛解を得られた症例では、全生存率、無再発生存率は良好であったという報告¹⁾より、乳癌に対する術前化学療法において、より病理学的完全寛解率の高い治療レジメンが求められている。

最近では、乳癌の術前化学療法において、anthracycline系抗癌剤に sequential に taxane系抗癌剤を追加することによる病理学的完全寛解率の向上を示唆する試験結果が公表されている^{3,4)}。

乳癌の術前化学療法において現時点で最も高い病理学的完全寛解率が得られる可能性のあるレジメンである anthracycline系抗癌剤に引き続く paclitaxel投与のレジメン

において、anthracycline 系抗癌剤である doxorubicin (DOX)を中心にした併用療法による検討は既にいくつか報告されている^{12,16)}。転移性乳癌に対する化学療法において、anthracycline 系抗癌剤である epirubicin (EPI)は DOX と同様に中心的役割を占める薬剤である^{5,6)}。また、乳癌に対する術後化学療法においても、EPI を含む併用レジメンの有効性は検証されている⁷⁾。しかし、乳癌の術前化学療法における EPI を含む併用療法の報告は少なく^{8,9)}、また taxane 系抗癌剤との sequential な投与の試験成績は報告されていない。このため、本試験では、anthracine 系抗癌剤として EPI を選択し、EPI の併用レジメンとして広く用いられている FEC 療法 (5-FU/EPI/Cyclophosphamide(CPA))を用いることとした。

現時点では、sequential に paclitaxel を投与することにより最も高い病理学的完全寛解率が得られる anthracycline 系抗癌剤の投与コース数は 4 コースであるため^{3,10)}、FEC 療法の治療コース数は 4 コースに設定した。転移性乳癌に対して、EPI 単剤は用量依存性に腫瘍縮小効果の増強が認められている¹¹⁾。また、腋窩リンパ節陽性の乳癌に対する術後化学療法における FEC 療法について、EPI の 1 回投与量 50 と 100 mg/m² の比較では、EPI の 1 回投与量が 100 mg/m² が 50 mg/m² より無病生存期間が優れていた⁷⁾。以上より、本試験における FEC 療法の 1 回投与量は、腫瘍縮小効果の増強が望め、また骨髄毒性が許容できる範囲であると考えられる 5-FU 500 mg/m²/EPI 100 mg/m²/CPA 500 mg/m² day 1、3 週間隔投与とした¹²⁾。なお、国内で

は EPI の 1 回投与量は 60 mg/m² が承認されているが、今回の臨床試験で用いる EPI の 1 回投与量は 100 mg/m² である。

乳癌の術前化学療法において paclitaxel 1 週間隔投与群では、3 週間隔投与と比較して、病理学的完全寛解率が良好であったことが示されていること³⁾より、本試験における FEC 療法に引き続いて行われる paclitaxel の用法は、1 週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。

HER2 過剰発現例に対しては、paclitaxel との併用で腫瘍縮小効果の増強が認められている trastuzumab¹³⁾を anthracycline 系抗癌剤の併用療法に引き続いて行われる 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、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¹⁴⁾) 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の状況は問わない

(b) Patient characteristics

・年齢：18 才以上 65 才未満の症例

・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 $3,000/\text{mm}^3$ 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

・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

FEC 療法

5-FU $500 \text{ mg}/\text{m}^2$ 15 分点滴静注

EPI $100 \text{ mg}/\text{m}^2$ 15 分点滴静注

CPA $500\text{mg}/\text{m}^2$ 30 分点滴静注 以上 day1

3 週間隔 4 コース施行

引き続いて

(a) HER2 過剰発現なしの症例

Paclitaxel $80 \text{ mg}/\text{m}^2$ 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

(b) HER2 過剰発現ありの症例

Paclitaxel $80 \text{ mg}/\text{m}^2$ 60 分点滴静注
(day 1, 8, 15, 22, 29, 36)

Herceptin $2 \text{ mg}/\text{kg}$ 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 $4\text{mg}/\text{kg}$ とする)

を 6 週 1 コースとして 2 コース施行

4) 予定症例数

本試験を計画した時点では、予定登録症例数 50 例、登録期間 1 年と設定していた。平成 14 年 12 月 1 日より登録を開始し、平成 15 年 9 月 1 日の時点で 31 例が登録された。この登録状況より、1 年の登録期間で予定症例数 50 例を登録するのは困難であることが予想された。このため、登録期間を 1.5 年へ延長することとした。よって、本試験の登録期間は 1.5 年、追跡期間は登録終了後 1 年、総研究期間は 2.5 年と設定した(平成 15 年 9 月 25 日 国立がんセンター IRB 承認)。実際には平成 16 年 1 月 1 日現在 56 例が登録され、臨床第 II 相試験として予定した症例数は確保できたものの、56 例の解析で効果と安全性に大きな問題がなく、また附随研究に必要な症例数が得られていなかったため、平成 15 年 9 月に再設定した登録期間 (1.5 年) は症例集積を継続することとし、平成 17 年 3 月 8 日現在までに 81 例を集積した

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

平成 14 年 12 月 1 日より登録開始し、登録開始 1 年 1 ヶ月の症例集積期間で 56 例を集積した。56 例中 3 例は治療開始後に遠隔転移が判明したため不適格となった。45 例が HER2 陰性であり、11 例が HER2 陽性であったが、HER2 陽性例のうち 1 例に trastuzumab が投与されなかった。

56 例目の外科手術が終了した時点で、効果および安全性の解析を行った。安全性については 56 例全例について行った。

CEF 部分は全例が完遂した。12 例 (23%) は投与量の変更または延期があった。主な投与スケジュール変更の理由は、好中球減少 (9%)、肝機能障害 (6%)、発熱性好中球減少 (4%) であった。paclitaxel+/-trastuzumab 部分を完遂できたのは 40 例 (75%) であった。主な治療中止の理由は末梢神経障害 (10%)、肝機能障害 (4%)、関節痛 (4%) であった。

抗腫瘍効果については不適格症例 3 例を除く 53 例で行った。全体の奏効率は 88% であったが、PR 症例のうち 2 例が手術を拒否した。手術を施行した 53 例中 22 例 (40%) には乳房温存手術が行われた。全体の病理学的完全寛解率は 13% であった。病理学的完全寛解率を HER2 発現別にみると、CEF 療法に引き続き paclitaxel と trastuzumab を併用した HER2 陽性例において 37%、paclitaxel のみを用いた HER2 陰性例では 10% であった。

なお、56 例中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の同意が得られたのは 41 例 (80%) であった。うち 30 例が HER2 陰性、11 例が HER2 陽性であった。41 例中附随試験に用いる CNB 検体、末梢血 (3 ポイント)、手術検体がすべて得られたのは 31 例であり、附随研究の発現解析を行うには不十分と判断された。

D. 考察

今回、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より高い病理学的寛解率が得られる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。登録開始 1 年 1 ヶ月の症例集積期間で 56 例を集積した。

本試験の全体の奏効率は 88%、病理学的完全寛解率は 13%であり、今までに報告された乳癌の術前化学療法の病理学的完全寛解率は 10~20%程度であるのに対し¹⁻⁴⁾、現時点での本試験による治療成績は特に劣ることはなかった。病理学的寛解率が paclitaxel と trastuzumab を併用した HER2 陽性例において 37%と比較的高く、HER2 陽性乳癌において trastuzumab を併用することにより乳房温存率や予後の改善する可能性が示唆されたが、HER2 陽性例が少ないため現時点では信頼性が乏しく、更なる症例集積が必要である。副作用については paclitaxel 部分において 10%の症例で末梢神経障害による治療中止がみられた。これは生命に関わる重篤な副作用ではなく、多くは可逆性ではあるものの、quality of life の観点から、paclitaxel による重篤な末梢神経障害の予測することは今後の研究課題として重要であると考えられた。

一方、56 例中本臨床試験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の同意が得られたのは 41 例(80%)と良好であった。しかし登録開始後約 1 年で臨床第 II 相試験としての目標症例数は完遂したものの、附随研究開始当初、臨床担当者の不慣れによりリンパ球検体の欠測が多く、また手術検体の mRNA 回収率が不良

であったため、DNA 発現解析を行うに十分なサンプル数を得られなかった。このことから、治療の安全性について十分に配慮しながら、平成 15 年 9 月に再設定した登録期間(1.5 年)は症例集積を継続することとし、平成 17 年 3 月 8 日現在までに 81 例を集積した。

E. 結論

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/エピルビシン/シクロフォスファミドに引き続きパクリタキセル週 1 回投与(HER2 過剰発現例にはトラスツマブを併用)を併用すること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 相臨床試験を実施した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

Shimizu C, Ando M, Katsumata N, Kinoshita T, Akashi T, Fukutomi T, Hasegawa T, Fujiwara Y. Phase II study of neoadjuvant 5FU /epirubicin /cyclophosphamide followed by weekly paclitaxel treatments for primary breast cancer, with trastuzumab for HER 2-positive tumors. (投稿中)

H. 参考資料

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