

- 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) Jain KK, Casper ES, Geller NL, et al: A prospective randomized comparison of epirubicin and doxorubicin in patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 3:818-826, 1985
  - 6) The Italian Multicentre Breast Study with Epirubicin: Phase III randomized study of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide v fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in advanced breast cancer: an Italian Multicentre Trial. *J Clin Oncol* 6: 976-982, 1988
  - 7) Piccart MJ, Leo AD, Beauduin M, et al: Phase III trial comparing two dose levels of epirubicin combined with cyclophosphamide with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 15 : 3103-3110, 2001
  - 8) Pélissier P, Delaloge S, Mathieu MC, et al: Intensified anthracyclin doses do not improve clinical and pathological responses to neoadjuvant FEC for operable breast cancer (BC): results of a multicenter randomized trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21:64a, 2002 (abstr254)
  - 9) Cocconi G, Blasio BD, Boni C, et al: Randomized trial comparing cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) with rotational CMF, epirubicin and vincristine as primary chemotherapy in operable breast carcinoma. *Cancer* 95: 228-235, 2002
  - 10) 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
  - 11) Bastholt L, Dalmark M, Gjedde SB, et al: Dose-response relationship of epirubicin in the treatment of postmenopausal patients with metastatic breast cancer: A randomized study of epirubicin at four different dose levels performed by the Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 14:1146-1155, 1996
  - 12) The French Epirubicin Study Group: A

prospective randomized trial comparing epirubicin monochemotherapy to two fluorouracil, cyclophosphamide, and epirubicin regimens differing in epirubicin dose in advanced breast cancer patients. *J Clin Oncol* 9: 305-312, 1991

13) 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

14) 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

#### 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

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

閉経後の手術可能、ホルモン高感受性乳癌の術前内分泌療法において、アロマターゼ阻害剤であるアナストロゾールの臨床的腫瘍縮小効果を評価する第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22例を登録され、うち15例に外科手術を施行した。

#### A. 研究目的

手術可能な閉経後の手術可能、ホルモン高感受性乳癌の術前内分泌療法において、アロマターゼ阻害剤であるアナストロゾールの臨床的腫瘍縮小効果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

現時点で乳癌の術前に治療を行うことにより、原発巣の腫瘍縮小により患者個々の抗腫瘍効果を評価できること、乳房温存率の向上によりよいQOLを確保できる可能性が増すことから、術前薬物療法という概念そのものは標準的な治療法としてとらえられつつある。術前薬物療法として化学療法が行われることが多いが、術前内分泌療法についても少数ながらいくつかの検討が行

われている。局所進行乳癌に対するTamoxifen投与の第II相試験として、Mansi<sup>1)</sup>、Hoff<sup>2)</sup>らの報告があるが、奏効率はそれぞれ41%、47%であった。これらの臨床試験においてはホルモン受容体の発現を全例について調べていなかった。またMauriac<sup>3)</sup>らは閉経後45%であった。

手術可能な乳癌での術前内分泌療法については、高齢者での報告がいくつかある。Gazetらは70歳以上の乳癌患者200例を手術またはTamoxifenに割付け、追跡期間中央値5年で無病期間に差を認めなかった<sup>4)</sup>。

またMustacchiらは、70歳以上の手術可能な乳癌に対して手術後Tamoxifen投与群対Tamoxifen投与単独群の無作為化比較試験を行った<sup>5)</sup>。追跡期間の中央値36ヶ月で、Tamoxifen投与群において局所進行が多く

認められたものの、遠隔転移は少なく、生存率には明らかな差を認めなかった。

乳癌のホルモン感受性を予測するホルモン受容体にはエストロゲンレセプター(ER)と、プロゲステロンレセプター(PgR)がある。Ravdinらは398名のER陽性転移性乳癌患者について、PgRの発現の程度別に、Tamoxifenの奏効率を前向きに検討した<sup>6)</sup>。PgRの測定値が10 fmol/mg未満, 10-99 fmol/mg, 100fmol/mg以上の3群に分けて比較したところ、Tamoxifenの奏効率はそれぞれ43%, 53%, 61%であり、ER, PgR共に高発現している場合にホルモン療法への感受性がより高いことが示唆された。

また国立がんセンター中央病院 乳腺グループでは閉経後ER, PgR共に陽性の原発性乳癌患者に対する術前Tamoxifen療法の第II相試験を施行中である。最終的な解析は行われていないが、途中経過を清水らが2001年の乳癌学会総会に発表しているが、19例中13例に臨床的腫瘍縮小効果を認めた<sup>7)</sup>。

このように術前内分泌療法については、至適投与期間、病理学的評価、効果予測因子、レジメンなどに関して、十分なエビデンスが得られているとはいいがたい。しかし術後補助療法では個々の患者において確実な奏効が得られるかどうか不確実なまま薬物が投与され、術後内分泌療法の評価には長い年数がかかるため、新規内分泌療法剤の乳癌初期治療としての評価・開発には長期間を要する。術前内分泌療法は、ホルモン受容体陽性乳癌において術前に内分泌療法の反応性を確認し、効率的に薬剤を評価する系として適切であると考えられる。

アロマターゼ阻害剤は、副腎由来のアン

ドロゲンからエストロゲンへの変換を触媒する酵素であるアロマターゼを阻害し、エストロゲンの生合成を妨げる薬剤である。Anastrozoleは、トリアゾール誘導体である新世代の経口アロマターゼ阻害剤であり、より選択的にアロマターゼを阻害し、閉経後女性において血中エストロゲン濃度を著明に低下させた<sup>8)</sup>。Anastrozoleは閉経後乳癌の治療において従来のtamoxifenに並んで有効性が期待されている内分泌治療薬である。

本試験では登録適格基準としてER/PgR共に陽性であることを要件としており、ホルモン感受性乳癌でもより高い効果が予測される母集団を対象としている。内分泌療法の最大の効果を得るための投与期間についてコンセンサスは得られていないが、転移性乳癌での経験から4ヶ月の投与期間は内分泌療法の臨床的効果判定には十分であると考えられ、また最近の海外の術前内分泌療法の臨床試験での投与期間も4ヶ月程度としているものが多い。

術後に行う治療は本試験の評価指標には直接影響するものではないが、本試験では規定してある。Anastrozole 4ヶ月投与にて奏効(PRまたはCR)した症例は、手術後5年間Anastrozoleを内服するものとした。腋窩リンパ節転移陽性乳癌においてはホルモン受容体の有無に関わらず術後化学療法を行うことを推奨されており、また術前化学療法後の腋窩リンパ節の遺残は予後不良因子とされているので、本レジメンでは腋窩リンパ節遺残例に対して、腋窩リンパ節転移陽性乳癌の術後補助療法として行われるAC(ADM/CPA)療法4コースまたはCMF療法(CPA/MTX/5-FU)6コースを追加するこ

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

臨床的腫瘍縮小率

### (b) 副評価指標

病理学的完全寛解率、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<sup>9)</sup>) II期またはIIIa, b期で次のいずれかに該当する症例

一腫瘍径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

一腫瘍径3cm以上の症例

一大きさを問わず、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。

一ERおよびPgRが共に陽性 (IHC法による)

### (b) Patient characteristics

・年令：閉経後の症例であれば年齢は問わない

・PS (ECOG) 0-2 の症例

・以下の条件を満たす閉経後の女性症例。

① 50歳以上の女性で、過去12ヶ月間に生理がない症例。

② FSHの値が施設における閉経後の範囲内の値である。

・以下にあげる諸臓器機能を有する症例

一骨髄機能

白血球数 $3,000/\text{mm}^3$ 以上

血小板  $100,000/\text{mm}^3$ 以上

一肝機能

AST(GOT)およびALT(GPT)100 IU/L以下

総ビリルビン 1.5mg/dl以下

一腎機能

血清クレアチニン1.5mg/dl以下

一心機能

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

アナストロゾール 1mg/分1 4ヶ月間内服

## 4) 予定症例数

予定登録症例数：45例

登録期間2年、追跡期間：登録終了後1年、総研究期間：3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

平成14年12月1日より登録開始し、平成17年3月8日現在、22例が登録された。プロトコル治療を終了したのは20例である。うち1例はStage IVで不適格となった。現在までのところ、重篤な副作用による治療中止例は認めていないが、2例が治療中にPDとなった。残る18例中当院で外科手術を施行したのは15例であった。

15例の病理組織学的効果(日本乳癌学会乳癌取扱い規約第14版)は、grade 3: 0例、grade 2: 0例、grade 1b:4例、grade 1a:10例、grade 0: 1例であった。

#### D. 考察

今回、閉経後、ホルモン感受性のある手術可能乳癌の治療成績の向上を目指し、術

前内分泌療法においてより高い臨床的腫瘍縮小効果の高いことが期待されるアナストロゾールによる第II相試験を計画した。

試験登録開始より2年3ヶ月の時点で22例が登録された。試験計画時には、2年の登録期間で45例を集積する予定であった。しかし、現在の登録の進捗状況は不良である。この理由として、1) 本試験に適格であるERおよびPgRが共に陽性の症例が少ないこと、2)閉経後の症例であっても、本試験と同時期に実施されている5-FU/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(土ラズツズマブ)併用による術前化学療法の第II相試験へ登録され治療を受ける症例も存在したこと(実際には本試験に登録された症例は65以上の高齢者であった)が挙げられる。

現時点では、アナストロゾール内服に伴う重篤な副作用による治療中止は認められておらず、副作用の側面からは認容性の高い治療と考えられる。

一方、病理学的効果については腫瘍組織の変性は、概して軽度であった。術前の内分泌療法の投与期間が不十分である可能性も否定できないが、実際には臨床的に明らかな腫瘍の縮小を認めた症例も含まれており、内分泌療法の治療効果の判定基準として、化学療法の効果判定法(本試験では日本乳癌学会による乳癌取扱い規約(第15版)を用いた)を用いることの妥当性について、他のバイオマーカーを利用した効果判定など今後の検討を要する。また本研究の附随研究であるcDNAアレイを用いた効果予測の結果にも期待が寄せられる。

今後は、予定症例集積期間の延長を検討し、試験登録を継続する予定である。

#### E. 結論

閉経後の手術可能、ホルモン高感受性乳癌の術前内分泌療法において、アロマターゼ阻害剤であるアナストロゾールの臨床的腫瘍縮小効果を評価する第II相臨床試験を計画した。

#### 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) Mansi JL, Smith IE, Walsh G, et al. Primary medical therapy for operable breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25: 1623, 1989.
- 2) Hoff PM, Valero V, Buzdar AU, et al. Combined modality treatment of locally advanced breast carcinoma in elderly patients or patients with severe comorbid conditions using tamoxifen as the primary therapy. *Cancer* 88: 2054, 2000.
- 3) Mauriac L, Debled M, Durand M et al. Neoadjuvant tamoxifen for hormone-sensitive non-metastatic breast carcinomas in early postmenopausal women. *Ann Oncol* 13: 293, 2002
- 4) Gazet LC, Ford HT, Coombs RC, et al. Prospective randomized trial of tamoxifen vs surgery in elderly patients with breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 20: 207, 1994.
- 5) Mustacchi G, Milani S, Pluchinotta A, et al. Tamoxifen or surgery plus tamoxifen as primary treatment for elderly patients with operable breast cancer: The G.R.E.T.A. Trial. Group for Research on Endocrine Therapy in the Elderly. *Anticancer Res* 14:2197, 1994.
- 6) Ravdin PM, Green Sm Dorr TM, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 10: 1284, 1992.
- 7) 清水千佳子、渡辺 亨、勝俣範之、他。閉経後ホルモンレセプター陽性乳癌に対する術前Tamoxifen(TAM)療法。第9回日本乳癌学会総会（抄録）
- 8) Geiser J, King N, Dowsett M, et al. Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, non-steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma oestrogen levels in post-menopausal women with breast cancer. *Br J Cancer* 74: 1286, 1996.
- 9) 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

カスタムアレイによる原発性乳癌の遺伝子発現解析

分担研究者 西尾和人 国立がんセンター研究所薬効試験部 室長  
分担研究者 関島 勝 三菱化学安全科学研究所鹿島研究所  
応用生物研究細胞生物部 部長

研究要旨

乳がん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、患者の末梢血単核球、乳がん組織を採取し、検体管理、RNA抽出、品質管理をおこない、新カスタムアレイによる遺伝子発現解析を実施した。乳癌治療（癌化学療法、抗体療法）において、腫瘍部および末梢血で測定が可能な末梢神経毒性を評価、比較的早期に予知可能な遺伝子マーカーを選択した。

A 研究目的

本年度の目的は、（1）臨床サンプルの採取、検体管理、RNA抽出、品質管理  
（2）新カスタムアレイを用いた遺伝子発現解析の実施と定量的PCRなどによるその再現性の確認である。

B 研究方法

本年度は、

（1）前年度までに得た基礎データを基に、ホルモン関連遺伝子を選択し、新カスタムアレイをデザイン、作製し、その評価をがん細胞株、ヒト臨床サンプルを用いて実施してきたが、

（1）臨床サンプルの採取、検体管理、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。

（2）新カスタムアレイを用いた臨床検体の遺伝子発現解析を実施した。また得られた遺伝子発現解析データの評価を目的として、クラスタリングをおこない、臨床像と相関するカーマ遺伝子の選択をおこなった。  
（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などでおこなった。

（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) 本研究に供した臨床検体の総数は、451で、その内訳は末梢血単核球 (PBMC) が221、乳がん組織の生検が130、乳がん組織の外科的手術切除検体が100であった。これらの検体から得られるRNAの品質は、以降の遺伝子発現解析の結果に大きく影響することから、採材、前処理、RNA抽出、RNAの品質測定の各工程を標準化することを試みた。特に採材から検体を前処理する工程がRNAの品質を維持する上で重要であった。採材する検体が乳がん組織でという特徴からIsogen (ニッポンジーン) でホモジナイズすることで、乳がん組織のように脂肪が多く含まれる場合でも、RNAの品質と収量を維持することが出来た。また、PBMCの血液からの分離はFicoll-Hypaqueを用いてリンパ球・単核球を回収し、生検検体と同様にRNAを抽出した。RNAの品質は、バイオアナライザーにより18S/28Sの比を計測し、一定以上の品質を有するRNA検体について遺伝子発現解析を実施した。遺伝子発現解析に供することが出来た検体は、末梢血単核球が214 (96.8%)、乳がん組織の生検検体が82 (63%)、手術切除検体が42 (42%)であった。不適として判断した主な原因は、ほとんどがRNA品質の劣化で、採材からIsogen保存までに時間を要する手術検体ほど成績が悪いが、採材・抽出工程を標準化されてからは、著しい劣化は半減した。遺伝子発現解析で精度に影響する他の要因として、バイオアナライザーで計測した場合に高分子領域に観察されるゲノムDNAの混入が低頻度に認められた。この遺

伝子発現解析への影響としては、カスタムアレイに複数設置したハウスキーピング遺伝子 (G3PDH) のシグナルの低値が共通に観察されたため、混入が疑われる検体については評価対象から除外した。RNA品質に問題ない場合で、PBMC由来のRNAを2回増幅法でacRNAを調製した場合、特定の遺伝子群の過増幅が5.6%の頻度で認められた。この原因としては、網状赤血球等の混入によるもので、それらに含まれる大量のグロビン遺伝子の非特異的ハイブリ形成と検出可能な遺伝子数の低下などが報告されている。しかしながら、本研究で開発したカスタムアレイは、乳がん等に限定した遺伝子を配置していることから、汎用性のあるゲノムワイドのアレイに比べてグロビン遺伝子の影響はほとんど観察されず、研究目的に特化したマイクロアレイの有用性が確認できた。

### 2) 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、治療前採血

(L1)、CEP治療後かつパクリタキセル±トラスツズマブ治療前 (L2)、パクリタキセル±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。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ァイルが明確に分離された（図2）

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（図3）。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  $> \text{平均} + 2$  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（図4）。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の遺伝子が選択された。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osis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。分類結果を図5に示す。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う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1a1b群と2+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

新カスタムアレイは本臨床試験実施の目的で適切にデザインされ、高い再現性と高精度の遺伝子発現データが得られている。臨床サンプルの採取、検体管理、RNA抽出、品質管理は概ね順調である。手術切除標本由来のRNAの質の劣化は、本研究実施の大きな障害とはならないと考えられるが、劣化を防ぐ最善の対策を講じる。

新カスタムアレイを用いた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解析データは、クラスタリングによるプロフィールから、良好なデータが集積されていることを示している。作成したアレイに付加された乳がん、ホルモン関連遺伝子群によりクラスタリングした乳がん組織の結果が全遺伝子群でクラスタリングした場合

と近似したことは、乳がん組織がこれらの遺伝子により規定されている可能性を類推させる結果と考えられる。集積されるアレイデータと臨床効果との相関を統計学的に新たなアルゴリズムでの解析のために現在の品質の維持が重要と考えられる。

#### 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 特になし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Korfee, S., Eberhardt, W., Fujiwara, Y., Nishio, K. The role of DNA-microarray in translational cancer research. *Curr. Pharmacogenomics*, (in press).
2. Koizumi, F., Shimoyama, T., Taguchi, F., Saijo, N., Nishio, K. Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. *Int. J. Cancer*, (in press).
3. Yamamoto, N., Tamura, T., Murakami, H., Shimoyama T., Nokihara, H., Ueda, Y., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Y., Kodama, T., Shimizu, M., Nishio, K., Ishizuka, N., Saijo, N. Randomized pharmacokinetic and pharmacodynamic study of docetaxel: dosing based on body-surface area compared with individualized dosing based on cytochrome p450 activity

- estimated using a urinary metabolite of exogenous cortisol. *J. Clin. Oncol.*, 23:1061-1069, 2005.
4. Arao, T., Fukumoto, H., Shimoyama, T., Takeda, M., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor as a target for ZD6474. *Cancer Res.*, 64:9101-9104, 2004.
  5. Taguchi, F., Koh, Y., Koizumi, F., Tamura, T., Saijo N., Nishio K. Anticancer effects of ZD6474, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in gefitinib ("Iressa")-sensitive and resistant xenograft models. *Cancer Sci.*, 95:984-989, 2004.
  6. Park, J.K., Lee, S.H., Kang, J.H., Nishio, K., Saijo, N., Kuh, H.J. Synergistic interaction between gefitinib (Iressa, ZD1839) and paclitaxel against human gastric carcinoma cells. *Anticancer Drugs*, 15:809-818, 2004.
  7. Nishio, K., Korfee, S., Eberhardt, W., Fujiwara, Y., Saijo, N. The translational study for lung cancer. *Lung Cancer*, 45:S16-S17, 2004.
  8. Taguchi, F., Kusaba, H., Asai, A., Iwamoto, Y., Yano, K., Nakano, H., Mizukami, T., Saijo, N., Kato, H., Nishio K. hnRNP L enhances sensitivity of the cells to KW-2189. *Int. J. Cancer*, 108:679-685, 2004.
  9. Koizumi, F., Kanzawa, F., Ueda, Y., Koh, Y., Tsukiyama, S., Taguchi, F., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ("Iressa") and the DNA topoisomerase II inhibitor CPT-11 (Irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*, 108:464-472, 2004.
2. 学会発表
1. Nishio, K. Preclinical And Molecular Correlative Study For EGFR-specific Tyrosine Kinase Inhibitors In Japan. The 20th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium & Meet the Expert. 2005.3.10-12. Nagoya.
  2. Nishio, K. Targeted Drugs. 7th Essen Thoracic Oncology Expert Meeting. 2004.12.9-12. Essen Germany.
  3. Nishio, K., Korfee, S., Eberhardt, W., Saijo, N., Tamura, T. Translational research for lung cancer-An update. 9th Central European Lung Cancer Conference. 2004.9.23-25. Gdansk Poland.
  4. Fukumoto, H., Arao, T., Watanabe, T., Shiomi, K., Korfee, S., Hayama, N., Shimoyama, T., Koizumi, F., Saijo, N., Nishio, K. Effect of transcriptional downregulation of EGFR on downstream signaling in human cancer cells. American Association for Cancer Research 95<sup>th</sup> Annual Meeting. 2004.3.27-31. Orlando Florida.
  5. Hayama, N., Fukumoto, H., Suzuki, T., Tanabe, S., Arao, T., Koizumi, F.,

- Korfee, S., Shiomi, K., Shimoyama, T., Eguchi, K., Saijo, N., Nishio, K. Cloning of candidate genes related to gefitinib ('Iressa', ZD1839) resistance. American Association for Cancer Research 95<sup>th</sup> Annual Meeting. 2004.3.27-31. Orlando Florida.
6. Shimoyama, T., Koizumi, F., Korfee, S., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Schedule –dependent interactions between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ('Iressa', ZD1839) and the DNA topoisomerase I inhibitor SN-38 in human lung cancer cells. American Association for Cancer Research 95<sup>th</sup> Annual Meeting. 2004.3.27-31. Orlando Florida.
7. Matsuda, M., Ohmori, T., Inoue, F., Ando, K., Hirose, T., Horichi, N., Nishio, K., Saijo, N., Arteaga, C.L., Adachi, M., Kuroki, T. Combination effect of gefitinib ('Iressa', ZD1839) with other anticancer agents on non-small-cell lung cancer cells. American Association for Cancer Research 95<sup>th</sup> Annual Meeting. 2004.3.27-31. Orlando Florida.
8. Arao, T., Yanagihara, K., Takigahara, M., Fukumoto, H., Koizumi, F., Nishio, K. Antitumor effect of ZD6474 in a VEGF-producing primary gastric cancer model. American Association for Cancer Research 95<sup>th</sup> Annual Meeting. 2004.3. 27-31. Orlando Florida.
9. Inoue, F., Ohmori, T., Ando, K., Yamaoka, T., Matsuda, M., Hirose, T., Horichi, N., Nishio, K., Saijo, N., Adachi, M., Arteaga, C.L., Kuroki, T. Elucidation of the gefitinib ('Iressa', ZD1839)-resistant mechanisms in acquired gefitinib-resistant human non-small-cell lung cancer cell lines. American Association for Cancer Research 95<sup>th</sup> Annual Meeting. 2004.3.27-31. Orlando Florida.

H.知的財産権の出願・登録状況  
特になし

(資料) 分担研究者 西尾 関島

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)。

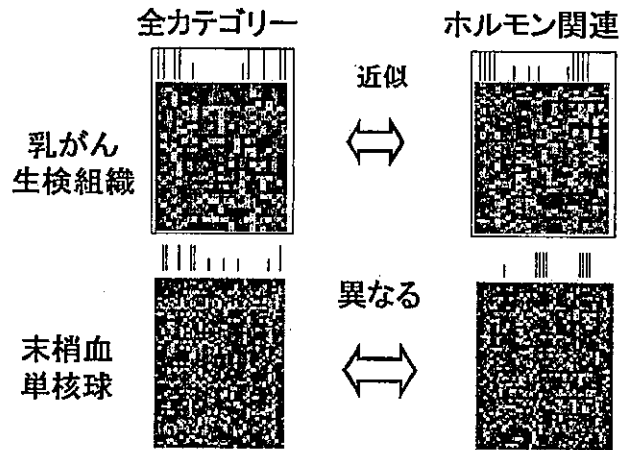


図2 新カスタムアレイを用いた臨床サンプルの遺伝子発現解析 (全遺伝子でのクラスタリング)

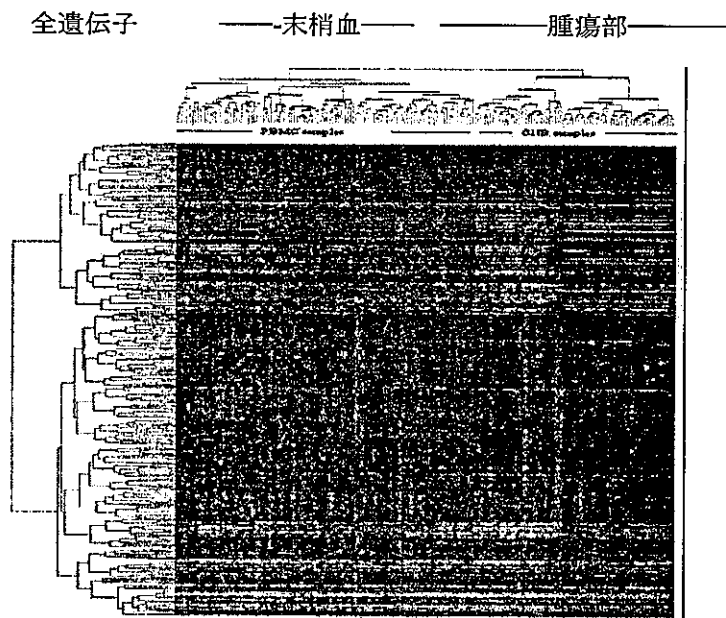
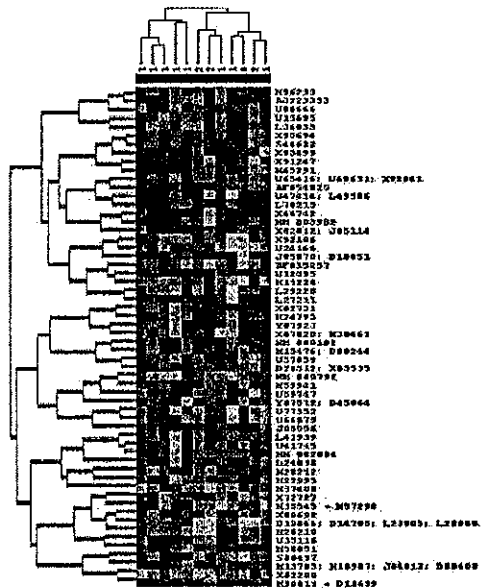




図5 テストセット12例を選択した遺伝子群で分類した状態  
末梢神経障害有り無しがほぼ区別できた。





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

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

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。対象者が少ない場合、予後予測モデルに基づく探索結果は一般に不安定であり、結果の安定性に関する検討が必要である。本研究では、the delete-d jackknife methodとQ-Q plotを組み合わせた検討方法を提案し、原発性乳癌の組織学的効果を予測するために測定された遺伝子データに応用する。その結果、プロットの曲線下面積(AUC)を指標とした参照線は交差することなく、参照線として適切と考えられた。また、2.5%点の参照線のAUCよりも大きなAUCを持つ遺伝子群と、2.5%点と5%点の間のAUCを持つ遺伝子群はそれぞれ2.5%点の参照線の上側と2.5%点と5%点の参照線の間に位置しており、AUCが参照線を求める際の指標として適当であることが示された。選択された遺伝子は、Jackknife法における多くの部分集団において組織学的効果を予測するものであり、この結果は一定の安定性を有するものと考えられる。

研究協力者

伊藤 陽一 東京大学医学系研究科健康科学・  
看護学専攻

A、研究目的

抗癌剤の感受性を予測する遺伝子変動を探索することは、患者に最も適した治療を行うというテーラーメイド医療を実現する上で極めて重要である。このような目的のために近年注目を浴びているのがDNAアレイ技術である。DNAアレイはmRNAの発現量を測定するプローブをア

レイ上に高密度で配置したもので、一度に数百から数万個の遺伝子発現量を測定することができるものである。しかし、その反面測定におけるバラツキは大きく、得られる結果を慎重に解釈する必要があると思われる。

現在国立がんセンターで実施されている原発性乳癌に対する5-FU/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相試験では、付随研究として「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」が計画されている。この研究の主な目的は、組織学的効果を予測する遺伝子の探索であるが、対象者数が少ない状況における遺伝子探索は一部の対象者の極端なデータに依存しやすく、結果の安定性を検討することが重要である。

そこで本研究では、対象者数が少ない状況における効果予測遺伝子の探索の際に有用なバリデーション方法を検討することを目的とする。

## B、研究方法

### 1、本研究で用いるデータ

本研究の対象者は、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相試験の参加者のうち、初回化学療法施行前に乳癌原発巣および末梢血の単核球における遺伝子発現量が測定され、組織学的効果判定が行われた34名である。組織学的効果判定の結果はGrade 1aおよび1bが20名、Grade 2が5名、Grade 3が9名である。

各検体における遺伝子発現量は、Custom ATLAS™ Array (Clontech社)によって測定する。本アレイによって測定される遺伝子数は988個である。本アレイはスポット位置による効果が大いことが分かっている。そこで、このスポット位置の効果を打ち消すために、各遺伝子における原発巣による対数発現量と末梢血単核球における対数発現量の差をとることとする。この対数発現量の差が正に大きい場合は、正常細胞よりも癌細胞において発現が多く、負に大きい場合は、正常細胞よりも癌細胞において発現が少ないことを意味する。

### 2、予測モデルとバリデーション法

組織学的効果の予測モデルとしては、各遺伝

子の発現量を説明変数とした比例オッズモデルを用いる。このモデルはGrade 3またはGrade 2以上となる対数オッズに対して線形モデルを仮定するものであり、ある遺伝子を説明変数としたときのオッズ比の推定値が1より大きい場合には、癌細胞におけるその遺伝子の発現量が正常細胞よりも多いほど、Grade 2以上またはGrade 3の組織学的効果が得られやすいことを表している。各遺伝子に関する検定方法としては尤度比検定を採用し、p値を計算する。

本研究の対象者数は34名と少ないため、一部の対象者の極端なデータに依存して、小さなp値が得られる可能性がある。そこで、バリデーション法として、the delete-d jackknife method (Efron and Tibshirani, 1993)を用いることとする。この方法ではまず全体からd人の対象者を除いたサンプルを考える。全体からd人の対象者を除く全て組み合わせに対して任意の解析をし、その結果を併合することで結果の安定性を検討するものである。本研究では11名(およそ3分の1)のデータを除外することとした。34名から11名を除外する組み合わせの数は25億通り以上と大変多いため、ここからランダムに1000通りの組み合わせを抽出することとした。

### 3、結果の安定性の検討

ある遺伝子が一部の対象者のデータに依存することなく、組織学的効果を予測していることを示すためには、the delete-d jackknife method におけるどの部分集団においてもp値が小さいことを示す必要がある。そこで、小さなp値が集積していることを視覚化する方法として、p値に関するQ-Q plot (伊藤・大橋, 2002)を用いることとする。この方法は、独立かつ一様分布に従うp値の負の対数を昇順に並べ替えた場合、その期待値がSavage Scoreに一致することを利用するも

ので、p値が独立かつ一様分布に従っている場合には、プロットが左下から右上に延びる対角線となり、小さなp値が多い場合には左上側の領域にせりだすようになるものである。しかし、Jackknife法より得られたp値は独立しているとは考えられないため、たとえある遺伝子が全く効果を予測していなかったとしても、プロットが対角線上に乗ることを期待できない。そこで本研究では、あらかじめ組織学的効果とは全く無関係に発生させたデータから得られたプロットと比較することによって、各遺伝子の結果の安定性を検討することを提案する。

まず34名全員に関して、平均0標準偏差0.3の正規乱数を1000回発生させ、この変数に関して遺伝子発現量と同様にthe delete-d jackknife methodを適用し、Q-Q plotを得る。1000個のプロットに関して、p値の負の対数の合計と、台形法を用いて推定したプロットのAUCを計算し、それらの値の2.5%点、5%点、10%点、25%点、50%点、75%点、90%点、95%点、97.5%点を持つプロットを参照線として採用し、比較検討する。最後に、実際の遺伝子に関して、参照線として適切な方の指標を用いて検討を行う。

### C、研究結果

正規乱数を説明変数として得られたQ-Q plotの結果を図1と図2に示す。図1はp値の負の対数の合計に基づくものであり、図2はプロットのAUCに基づくものである。プロットのAUCに基づく方が、各線の交差が少なく、参照線として適切と思われる。

AUCに基づく参照線の具体的なAUCの値は、2.5%点が45.8、5%点が39.8、10%点が34.0、25%点が26.2、50%点が19.6、75%点が15.7、90%点が13.7、95%点が12.5、97.5%点が11.7であった。実際の遺伝子のプロットに関してAUCを計算する

と、2.5%点より大きいAUCを持つ遺伝子の数は6個であり、2.5%点から5%点の間が5個、5%点から10%点の間が20個、10%点から25%点の間が96個、25%点から50%点の間が262個、50%点から75%点の間が377個、75%点から90%点の間が179個、75%点から95%点の間が31個、95%点から97.5%点の間が10個、97.5%点以下が2個だった。

安定的に小さなp値が得られている遺伝子として、AUCが2.5%点より大きい遺伝子群をgroup 1とし、2.5%点から5%点の間となる遺伝子群をgroup 2として選択する。これらの遺伝子の遺伝子名とAUC、Jackknifeサンプルにおけるオッズ比の中央値と、2.5%点、97.5%点を表1に示す。また、group 1のQ-Q plotを図3に、group 2のQ-Q plotを図4に示す。図3と図4における黒い点線はAUCを指標とした際の参照線である。

### D、考察

本研究で採用したQ-Q plotはp値の分布を視覚化するひとつの方法であり、特にp値が小さいところでの分布状況を強調している。この図ではp値が0.05のとき、その負の対数はおよそ3であり、3以上(つまりp値が0.05以下)のp値がどれくらいあるかということが一目瞭然となるため、有用である。

本研究では、Q-Q plotのAUCを指標に遺伝子の選択を行った。p値の負の対数の合計を指標にした場合の参照線がAUCに比べ、不適切であったのは、p値の大きなJackknifeサンプルの影響と考えられる。Q-Q plotではSavage Scoreの小さいところに多くの遺伝子が集まっており、これらのp値は大きい。本研究では小さなp値(たとえば0.05未満)が集積しているかどうかに関心があるため、p値が大きいところでの分布状況には興味がない。ところが、p値の負の対数の合計を基準

にした場合、このp値が大きいところで分布状況が過大に見積られる傾向があるため、参照線として適切性を欠くプロットが得られたものと思われる。

本研究により選択された遺伝子は、その遺伝子が全く効果を予測しないと仮定した場合には5%以下の確率でしか得られないようなAUCを持ったものであり、小さなp値がかなり集積していると考えられる。また、Jackknife法によるどの部分集団でも効果を予測しているという意味で、一定の結果の安定性を有すると考えて良いと思われる。

本研究の限界としては、参照線を求めるための正規乱数の発生回数を1000回とした点が挙げられる。参照線を求めるためには、より多くの乱数を用いた方が望ましいが、1回あたり1000回のロジスティック回帰を実行する必要があるため、計算時間の問題から増やすことが難しい。また、バリデーション方法として、the delete-d jackknife methodを用いたが、他の方法としては、Bootstrap法も考えられる。バリデーション方法間で結果に違いがあるかどうかは今後の検討課題である。

#### E. 結論

組織学的効果を予測する遺伝子の探索方法の安定性を検討するために、The delete-d jackknife methodとQ-Q plotを組み合わせた方法を提案した。その結果、一定の安定性を持つ遺伝子を探索する方法として有用であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

Hagino A. Hamada C. Yoshimura I. Ohashi Y. et

al: Statistical Comparison of Random Allocation Methods in Cancer Clinical Trials. *Controlled Clinical Trials* 2004;25:572-584.

Tsuda H. Birrer M J., Ito Y M., Ohashi Y. et al: Identification of DNA Copy Number Changes in Microdissected Serous Ovarian Cancer Tissue Using a cDNA Microarray Platform. *Cancer Genetics and Cytogenetics*2004;155:97-107.

Tanaka N. Kinoshita T. Asada T. Ohashi Y.: Long-Linear Models for Assessing Gene-Age Interaction and Their Application to Case-Control Studies of the Apolipoprotein E(apoE) Gene in Alzheimer's Disease. *Journal of Human Genetics* 2003;48:520-524.

大橋靖雄：臨床統計学・臨床試験を中心として。数理科学2004；3(489)：60-67。

大橋靖雄：日本の医療情報伝達分野における問題点。薬理と治療2004；32(10)：707-710。

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

該当なし。