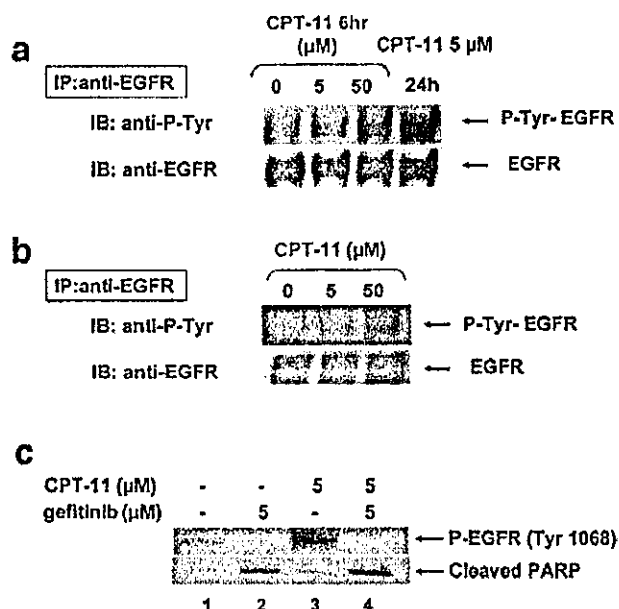


FIGURE 4 – The dose-dependent effect of combination therapy on Lovo cells *in vivo*. (a) Treatment schedule. (b) Significant growth-inhibition was observed in mice treated with the combination. Mice were allocated to 9 groups (6 mice/group) [closed diamond, 5%(W/V) glucose solution; ×, CPT-11 16.7 mg/kg; + CPT-11 33.3 mg/kg; square, gefitinib 30 mg/kg; star, gefitinib 30 mg/kg + CPT-11 16.7 mg/kg; blue line, gefitinib 30 mg/kg + CPT-11 33.3 mg/kg; open triangle, gefitinib 60 mg/kg; circle, gefitinib 60 mg/kg + CPT-11 16.7 mg/kg; light blue line, filled square, gefitinib 60 mg/kg + CPT-11 33.3 mg/kg]. (c) Mean tumor volumes and results of the statistical analysis at days 15 and 22, bars, S.D. \*Significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to the control. (d) T/C(%) at day 15 and 22. (e) Treatment-related body weight loss occurred in mice treated with gefitinib 60 mg/kg (triangle, circle, and light blue line).



**FIGURE 5** – The effect of CPT-11 on EGFR phosphorylation in WiDR cells. Lovo (a) and WiDR (b) cells ( $5 \times 10^6$ ) were treated with 5 or 50  $\mu\text{M}$  CPT-11 for 6 hr. Additionally Lovo cells were treated with 5  $\mu\text{M}$  CPT-11 for 24 hr. The 1,500  $\mu\text{g}$  of total cell lysate was immunoprecipitated with an anti-EGFR antibody. Tyrosine-phosphorylated EGFR was determined with an anti-phosphotyrosine antibody and the membranes were reblotted by anti-EGFR antibody. (c) Lovo cells were treated with gefitinib or CPT-11 alone (lane 2 and 3) and in combination (lane 4) for 24 hr. A 20  $\mu\text{g}$  of protein of each sample was analyzed by Western blotting using antiphospho-EGFR (Tyr 1068) and cleaved PARP antibody.

drugs. These results suggest that this regimen is intensive but can be tolerated, at least in mice.

The *in vitro* and *in vivo* experiments in our study demonstrated the synergistic potential of gefitinib – CPT-11 combination. We previously reported that topoisomerase I up-regulation by counter-part drugs was a possible mechanism for the synergy in an CPT-11 containing regimen.<sup>23</sup> On the other hand, the synergistic potential of gefitinib with topotecan, cisplatin, paclitaxel or radiation has been reported.<sup>18,24–28</sup> To elucidate the biochemical mechanism underlying the synergistic interaction between the gefitinib and CPT-11, the effect of CPT-11 on EGFR-phosphorylation was examined (Fig. 5). Increased phosphorylation of EGFR was observed after exposure to CPT-11 in dose and time-dependent manner in WiDR and Lovo cells. Since EGFR expression and phosphorylation were the major determining factors for sensitivity of the cells to gefitinib-induced growth-inhibition,<sup>14</sup> biochemical modulation of EGFR by CPT-11 might be responsible for the synergistic interaction between gefitinib and CPT-11. EGFR is induced and activated by cellular stress, such as oxidative stress and UV irradiation.<sup>29–34</sup> Ohmori *et al.*<sup>22</sup> demonstrated that increased autophosphorylation of EGFR was obtained in cisplatin-exposure in human lung cancer cells. A number of reports suggest that EGFR promotes cell survival through the activation of the ERK or the AKT pathway.<sup>31,32</sup> EGFR activation induced by these cellular stress may play a survival response against apoptosis.<sup>31,32</sup> In the present study, PARP activation by gefitinib was markedly enhanced by combination with CPT-11 at 5  $\mu\text{M}$  exposure, which is comparable with  $\text{IC}_{50}$  value of CPT-11 in Lovo cells, although no PARP activation was observed by monotherapy of CPT-11. On the other hand, gefitinib does not modify the expression and the activation of topoisomerase I (data not shown). These result suggest that the inhibitory effect of gefitinib on the activated survival signal transduction induced by CPT-11 lead to synergistic effect. The findings of the present study suggest that biological modulation by various anticancer agents including DNA damaging agents will contribute to the synergistic effects of these anticancer agents and gefitinib in EGFR expressing tumor and support clinical evaluation of gefitinib in combination with DNA-targeting agents, especially CPT-11, in the treatment of colorectal cancers.

REFERENCES

- Blijham G, Wagener T, Wils J, de Greve J, Buset M, Bleiberg H, Lacave A, Dalmark M, Selleslag J, Collette L, Sahnoud T. Modulation of high-dose infusional fluorouracil by low-dose methotrexate in patients with advanced or metastatic colorectal cancer: final results of a randomized European Organization for Research and Treatment of Cancer Study. *J Clin Oncol* 1996;14:2266–73.
- O’Connell MJ, Klaassen DJ, Everson LK, Cullinan S, Wieand HS. Clinical studies of biochemical modulation of 5-fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer by the North Central Cancer Treatment Group and Mayo Clinic. *NCI Monogr* 1987;185–8.
- Focan C, Kreutz F, Focan-Henrard D, Moeneclaeu N. Chronotherapy with 5-fluorouracil, folinic acid and carboplatin for metastatic colorectal cancer; an interesting therapeutic index in a phase II trial. *Eur J Cancer* 2000;36:341–7.
- Shimada Y, Yoshino M, Wakui A, Nakao I, Futatsuki K, Sakata Y, Kambe M, Taguchi T, Ogawa N. Phase II study of CPT-11, a new camptothecin derivative, in metastatic colorectal cancer. CPT-11 Gastrointestinal Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1993;11:909–13.
- Cunningham D, Pyrhonen S, James RD, Punt CJ, Hickish TF, Heikila R, Johannesen TB, Starkhammar H, Topham CA, Awad L, Jacques C, Herait P. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 1998;352:1413–8.
- Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirota N, Elfring GL, Miller LL. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer: Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:905–14.
- Rothenberg ML, Meropol NJ, Poplin EA, Van Cutsem E, Wadler S. Mortality associated with irinotecan plus bolus fluorouracil/leucovorin: summary findings of an independent panel. *J Clin Oncol* 2001;19:3801–7.
- Modi S, Seidman AD. An update on epidermal growth factor receptor inhibitors. *Curr Oncol Rep* 2002;4:47–55.
- Saijo N, Tamura T, Nishio K. Problems in the development of target-based drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46:S43–5.
- Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy: focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 2001;37:S16–22.
- Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001;37:S9–15.
- Speer G, Cseh K, Winkler G, Takacs I, Barna I, Nagy Z, Lakatos P. Oestrogen and vitamin D receptor (VDR) genotypes and the expression of ErbB-2 and EGF receptor in human rectal cancers. *Eur J Cancer* 2001;37:1463–8.
- Albanell J, Rojo F, Baselga J. Pharmacodynamic studies with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839. *Semin Oncol* 2001;5:56–66.
- Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000;19:6550–65.
- Woodburn JR, Morris CQ, Kelly H. EGF receptor tyrosine kinase inhibitors as anti-cancer agents—preclinical and early clinical profile of ZD1839. *Cell Mol Biol Lett* 1998;3:348–9.
- Naruse I, Ohmori T, Ao Y, Fukumoto H, Kuroki T, Mori M, Saijo N, Nishio K. Antitumor activity of the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) Iressa™ (ZD1839) in a EGFR-expressing multidrug resistant cell line *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer* 2002;98:310–5.
- Ciardello F, Bianco R, Damiano V, De Lorenzo S, Pepe S, De Placido S, Fan Z, Mendelsohn J, Bianco AR, Tortora G. Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal

- growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin Cancer Res* 1999;5:909-16.
18. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomato G, De Placido S, Bianco A.R, Tortora G. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000;6:2053-63.
  19. Sirotnak FM, Zakowski MF, Miller VA, Scher HI, Kris MG. Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2000;6:4885-92.
  20. Slischenmyer WJ, Fry DW. Anticancer therapy targeting the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Semin Oncol* 2001;28:67-79.
  21. Kusaba H, Tamura T, Nakagawa K, Yamamoto N, Kudoh S, Negoro S, Takeda K, Tanigawara Y, Fukuoka M. A phase I intermittent dose-escalation trial of ZD1839 ('IRESSA') in Japanese patients with solid malignant tumors. *Clin Cancer Res* 2000;6:abs381.
  22. Kris M, Ranson M, Ferry D, Hammond L, Averbuch S, Ochs J, Rowinsky E. Phase I study of oral ZD1839('IRESSA'): A novel inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase (EGFR-TKI)—Evidence of good tolerability and activity. *Clin Cancer Res* 1999;5:abs 99
  23. Kanzawa F, Koizumi F, Koh Y, Nakamura T, Tatsumi Y, Fukumoto H, Saijo N, Yoshioka T, Nishio K. In vitro synergistic interactions between the cisplatin analogue nedaplatin and the DNA topoisomerase I inhibitor irinotecan and the mechanism of this interaction. *Clin Cancer Res* 2001;7:202-9.
  24. Ohmori T, Ao Y, Nishio K, Saijo N, Arteaga CL, Kuroki T. Low dose cisplatin can modulate the sensitivity of human non-small cell lung carcinoma cells to EGFR tyrosine kinase inhibitor (ZD1839; 'Iressa') in vivo. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2000;41:abs 3072.
  25. Magne N, Fischel JL, Dubreuil A, Formento P, Marcie S, Lagrange JL, Milano G. Sequence-dependent effects of ZD1839 ('Iressa') in combination with cytotoxic treatment in human head and neck cancer. *Br J Cancer* 2002;86: 819-27.
  26. Raben D, Helfrich BA, Chan D, Johnson G, Bunn PA Jr. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, alone and in combination with radiation and chemotherapy as a new therapeutic strategy in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2002; 29:37-46.
  27. Sirotnak FM, Zakowski MF, Miller VA, Scher HI, Kris MG. Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2000;6:4885-92.
  28. Williams KJ, Telfer BA, Stratford IJ, Wedge SR. ZD1839 ('Iressa'), a specific oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, potentiates radiotherapy in a human colorectal cancer xenograft model. *Br J Cancer* 2002;86:1157-61.
  29. Goldshmit Y, Erlich S, Pinkas-Kramarski R. Neuregulin rescues PC12-ErbB4 cells from cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Regulation of reactive oxygen species levels by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 2001;276:46379-85.
  30. Meves A, Stock SN, Beyerle A, Pittelkow MR, Peus D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates oxidative stress-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. *Toxicol Lett* 2001;122:205-14.
  31. Miyazaki Y, Hiraoka S, Tsutsui S, Kitamura S, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Epidermal growth factor receptor mediates stress-induced expression of its ligands in rat gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2001;120:108-16.
  32. Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* 2000;275:14624-31.
  33. Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. Cisplatin-induced activation of the EGF receptor. *Oncogene* 2002;21:8723-31.
  34. Kitagawa D, Tanemura S, Ohata S, Shimizu N, Seo J, Nishitai G, Watanabe T, Nakagawa K, Kishimoto H, Wada T, Tezuka T, Yamamoto T, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through Src-dependent epidermal growth factor receptor phosphorylation: its implication in an anti-apoptotic function. *J Biol Chem* 2002;277:366-71.

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

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤原 康弘

平成16(2004)年 4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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤原 康弘

平成16(2004)年 4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. 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	-----	6
安藤正志、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 試験に関する研究	-----	11
安藤正志、長谷川匡		
3. 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	-----	16
木下 貴之		
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	-----	20
西尾和人、関島勝		
資料 1 新カスタムフィルターアレイの作成	-----	23
1 元としたフィルターアレイ (旧アレイ) の特徴		
2 無作為化することにより失われる旧アレイの 長所の保持に関する検討		
3 複数スポットする遺伝子の選択に関する検討		
4 位置的問題の解消および遺伝子の複数配列に関する検討		
5 最終的遺伝子リスト (フィルター上位置情報、カテゴリーフラッグを含む)		
資料 2 臨床サンプル管理と抽出された RNA の品質管理	-----	91
1 臨床サンプルの非連結可能匿名化とその管理		
2 処理された RNA の品質管理		

資料 3	臨床サンプルに関する遺伝子発現解析経過	-----	93
1	新フィルターアレイによる臨床サンプルでのシグナルの状態		
2	末梢血単核球および腫瘍組織を含めたクラスタリング		
3	ホルモン関連遺伝子セットでの組織ごとのクラスタリング		
5.	新カスタムアレイの評価に関する研究	-----	96
	大橋靖雄		
資料 4	フィルターアレイにおいて繰り返し測定された遺伝子の詳細	-----	99
6.	フィルターアレイの信頼性および抗癌剤感受性遺伝子に関する研究	-----	109
	竹内 正弘		
資料 5	ホルモン療法関連遺伝子マーカーの選択	-----	116
図 1	16 種類の実験組み合わせにおける遺伝子発現強度の散布図		
図 2	各遺伝子の平均強度と標準偏差の散布図		
図 3	分散安定化変換後の各遺伝子の平均強度と標準偏差の散布図		
図 4	分散安定化変換後の遺伝子発現強度の散布図		
図 5	p21-activated kinase alpha の発現プロファイル		
図 6	MCF7 細胞株におけるボルケーノプロット		
図 7	MCF7 細胞株における増加傾向遺伝子のプロット		
図 8	MCF7 細胞株における減少傾向遺伝子のプロット		
図 9	BT474 細胞株におけるボルケーノプロット		
図 10	BT474 細胞株における増加傾向遺伝子のプロット		
図 11	BT474 細胞株における減少傾向遺伝子のプロット		
図 12	SK-BR-3 細胞株におけるボルケーノプロット		
図 13	SK-BR-3 細胞株における増加傾向遺伝子のプロット		
図 14	SK-BR-3 細胞株における減少傾向遺伝子のプロット		
図 15	MDA-MB-231 細胞株におけるボルケーノプロット		
図 16	MDA-MB-231 細胞株における増加傾向遺伝子のプロット		
図 17	MDA-MB-231 細胞株における減少傾向遺伝子のプロット		
表 1	細胞株と処理の組み合わせ		
表 2	同一条件の実験間における発現強度のピアソン相関係数		

- 表 3 処理に関連する遺伝子
- 表 4 細胞と処理の交互作用に関連する遺伝子
- 表 5 MCF7 において遺伝子発現に増加傾向が示唆された遺伝子
- 表 6 MCF7 において遺伝子発現に減少傾向が示唆された遺伝子
- 表 7 BT474 において遺伝子発現に増加傾向が示唆された遺伝子
- 表 8 BT474 において遺伝子発現に減少傾向が示唆された遺伝子
- 表 9 SK-BR-3 において遺伝子発現に増加傾向が示唆された遺伝子
- 表 10 SK-BR-3 において遺伝子発現に減少傾向が示唆された遺伝子
- 表 11 MDA-MB-231 において遺伝子発現に増加傾向が示唆された遺伝子
- 表 12 MDA-MB-231 において遺伝子発現に減少傾向が示唆された遺伝子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 145

IV. 研究成果の刊行物・別刷



平成15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)  
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第一領域外来部・通院治療センター 医長

**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、現在約100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。初年度の基礎的成果を基に、ホルモン療法予測遺伝子を含む新カスタムアレイを作製し、信頼性に関する検討をおこなった。また、アレイデータ標準化法の検討をおこない、新カスタムアレイの信頼性向上が統計学的に裏付けられた。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。予備的検討において乳癌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。

**分担研究者**

安藤正志 国立がんセンター中央病院内科  
木下貴之 国立がんセンター中央病院外科  
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  
竹内正弘 北里大学大学院薬学研究科臨床統計部門 教授  
関島勝 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所先端技術研究部・部長  
西尾和人 国立がんセンター研究所薬効試験部耐性研究室 室長  
長谷川匡 国立がんセンター研究所病理部第三組織病理研究室 室長

**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、胃癌、大腸癌、肺癌、肝癌に次ぐ位置を占めている。さらに大阪府癌登録を例に人口10万あたりの罹患率をみると、乳癌のそれは胃癌を抜いて第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。

このような乳癌患者の増加傾向は世界的な現象であり、したがって乳癌治療体系の充実に対する社会的要請は高いものがある。一方、現在の乳癌治療は、H.E.染色(組織異型度の判定)と免疫染色(エストロゲン受容体、プロジェ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、その治療方針を決定している。しかしながら、効果・副作用予測を治療前には十分に行えていないのが現状である。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、あるいは治療前の臓器機能が保たれ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も稀ならず経験する。そこで本研究の目的は、乳癌の手術前治療のセッティング(組織検体の採取が容易)において、治療前後の腫瘍組織及び正常組織(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とした。初年度に引き続き、3つの臨床研究と3つの付随研究が継続進行し、組織の収集、保管、遺伝子発現解析が順調に推移している。

## B. 研究方法

### 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、計3試験と変更するとともに、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ている。

① 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(登録予定35~40例)

② 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第Ⅱ相試験(登録予定45例)

③ 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(登録予定40例)

### 2) 方法

#### ① 検体採取、保管と品質管理

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(10ml)、乳癌組織および正常乳腺組織(術前療法施行後は必須とはしない)を採取(藤原、安藤、木下、長谷川ら)。検体(静脈血の場合は単核球分離後)は西尾らにより、RNA保存液中で処理した後に-80℃で保存、約1週間以内にRNAを抽出、核酸の質をバイオアナライザーで評価し、T7Basedの増幅法にて増幅、保管する。その後、関島らによりRIラベルをおこない、西尾、竹内、藤原らにより作製された新カスタムフィルターにハイブリダイズさせる。遺伝子発現を関島らがイメージアナライザーで解析し、数値化した後、西尾、竹内らにより標準化、大橋らにより統計解析を実施する。藤原、安藤、木下らが、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)との相関性、意義付けについての考察をおこなう。

### ② 測定項目

癌および薬物に関連する約800の遺伝子および、竹内らにより抽出されたホルモン療法関連遺伝子を追加した新カスタムアレイをデザイン、作製する(大橋、西尾ら)。新カスタムアレイを用いて、遺伝子発現を測定、解析する(関島、西尾ら)。新カスタムアレイの信頼性評価として、細胞株のサンプルを繰り返し測定することにより(西尾、関島ら)、カスタムアレイの信頼性、既存アレイとの比較をおこなう(大橋ら)。同時に標準化の方法を確立、評価する(竹内ら)。

臨床サンプルの遺伝子発現解析も開始し、中間解析として、発現データのクラスタリングをおこなう(関島、西尾ら)。

(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・遺伝子解析に関する倫理的指針に準拠して実施する。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、公表することとする。

## C. 研究結果

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つの付随研究の計6つ(プロトコール)を実施した(藤原、木下、安藤、長谷川ら)。現在で90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(西尾、関島ら)。初年度の基礎的成果を基に、ホルモン療法予測遺伝子を含む新カスタムアレイを作製し、作製した新カスタムアレイの信頼性に関する検討をおこなった(竹内、西尾ら)。また、アレイデータ標準化法の検討として、同一実験群アレイ間誤差の分散安定化による補正を細胞株および処理法が異なる16種類の各群から得られた遺伝子発現データを分散安定化処理することにより、各2回の実験結果において全てピアソン相関係数0.8230以上が示されることが明らかとなり、Churchillら(2002)による市販アレイおよび通法による発

ことにより新カスタムアレイにおける測定誤差の方が測定誤差を正しく推定可能であった。また除去不可能なスポット誤差を統計学的に取り除くことができる可能性があり、重複遺伝子をランダムに存在させ設計した新カスタムアレイの信頼性向上が統計学的に裏付けられた(大橋ら)。

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(関島、西尾ら)。予備的検討において乳癌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(西尾、藤原ら)。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。

#### D. 考察

本研究では、新カスタムアレイを用いた遺伝子発現解析を実施している。現在データの集積が順調にすすんでおり、遺伝子発現解析データの解析をはじめている。これら貴重な臨床サンプル情報を、迅速に解析し、実証し、再現性のある結果を得ることは、世界の研究グループとの競争下にある本研究課題を推進していく中で重要な過程である。本研究では、遺伝子発現解析の統計的解析導入を重要課題の一つに挙げており、現在新しいアルゴリズムの設計と、そのアルゴリズムを用いて、得られている膨大な遺伝子発現情報の解析とその検証を行っている。我々の設計したアルゴリズムが、最新の市販遺伝子発現解析ソフトで用いられているアルゴリズムに比べてすぐれていることがあきらかになりつつある。

今後、本研究の成果として得られる予測マーカーの、生物学的な再現性の実証が必要となる。また、次年度の臨床試験の終了とともに、効果・副作用の予測因子を同定することが可能であることを強く示唆する。その成果で得られるバイオマーカーは、乳癌診療体系に対して多大な貢献をされると思われる。作製した新カスタムアレイも、癌化学療法のみならずホルモン療法にまで、その包括する範囲を広げたカスタムcDNAアレイであり、乳癌を巡るヒト検体を用いたトキシコゲノミクス研究に広く活用され

ることが期待される。また本研究で実施しているcDNAアレイ解析に関する統計学的手法は、バイオインフォーマティクスの臨床展開に際して大きく貢献するものと思われる。

#### E. 結論

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の臨床試験が順調に症例の集積が進み、新カスタムアレイを用いた遺伝子発現解析も順調にすすんでいる。次年度臨床試験の終了にともない、乳癌の治療効果、毒性の予測マーカーの選択とその検証がなされると期待される。

#### F. 健康危害情報

特になし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takezaki, T., Inoue, M., Kataoka, H., Ikeda, S., Yoshida, M., Ohashi, Y., Tajima, K., Tominaga, S. Randomized controlled trial comparing oral doxifluridine plus oral cyclophosphamide with doxifluridine alone in women with node-positive breast cancer after primary surgery. *J. Clin. Oncol.* 21: 991-998, 2003.
2. Yanaka, 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. *J. Human Genet.* 48:520-524, 2003.
3. Kawado, M., Hinotsu, S., Matsuyama, Y., Yamaguchi, T., Hashimoto, S., Ohashi, Y. A comparison of error detection rates between the reading aloud method and the double date entry method. *Controlled Clinical Trials* 24: 560- 569, 2003.
4. 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.
5. 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 I inhibitor CPT-11 (Irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*, 108:464-472, 2004.
6. Nishiyama, N., Okazaki, S., Cabral, H., Miyamoto, M., Kato, Y., Sugiyama, Y., Nishio, K., Matsumura, Y., Kataoka, K. Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in Mice. *Cancer Res.*, 63:8977-8983, 2003.
  7. Suzuki, T., Agui, M., Togawa, T., Naganuma, A., Nishio, K., Tanabe, S. MRP5b/SMRP mRNA is highly expressed in metallothionein-deficient mouse liver. *J. Health Sci.*, 49:524-526, 2003.
  8. Tsunoda, T., Koh, Y., Koizumi, F., Tsukiyama, S., Ueda, H., Taguchi, F., Saijo, N., Nishio, K. Differential gene expression profiles and identification of the genes relevant to clinicopathologic factors in colorectal cancer selected by cDNA array method in combination with principal component analysis. *Int. J. Oncol.*, 23:49-59, 2003.
  9. 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.
  10. Saijo, N., Nishio, K., Tamura, T. Translational and clinical studies of target-based cancer therapy. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:187-192, 2003.
  11. Kanzawa, F., Akiyama, Y., Saijo, N., Nishio, K. In vitro effects of combinations of cis-amminedichloro (2-methylpyridine) platinum (II) (ZD0473) with other novel anticancer drugs on the growth of SBC-3, a human small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer*, 40:325-332, 2003.
  12. Nishiyama, N., Koizumi, F., Okazaki, S., Matsumura, Y., Nishio, K., Kataoka, K. Differential gene expression profile between PC-14 cells treated with free cisplatin and cisplatin-incorporated polymeric micelles. *Bioconjug. Chem.*, 14:449-457, 2003.
  13. Hirama, M., Takahashi, F., Takahashi, K., Akutagawa, S., Shimizu, K., Soma, S., Shimanuki, Y., Nishio, K., Fukuchi, Y. Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth. *Cancer Lett.*, 198:107-117, 2003.
  14. Natsume, T., Watanabe, J., Koh, Y., Fujio, N., Ohe, Y., Horiuchi, T., Saijo, N., Nishio, K., Kobayashi, M. Antitumor activity of TZT-1027 (Soblidotin) against VEGF-secreting human lung cancer *in vivo*. *Cancer Sci.*, 94:826-833, 2003.
  15. Saijo, N., Tamura, T., Nishio, K. Strategy for the development of novel anticancer drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 52:S97-S101, 2003.
  16. Yamanaka, R., Akutagawa, S., Taguchi, F., Yajima, N., Tsuchiya, N., Uzuka, T., Morii, K., Takahashi, H., Tanaka, R., Saijo, N., Nishio, K. Selection of surrogate marker genes in primary central nervous system lymphomas for radio-chemotherapy by DNA array analysis of gene expression profiles. *Int. J. Oncol.*, 23:913-923, 2003.
2. 学会発表
1. Hamano, T., Oide, A., Sekijima, M., Nishio, K., Takeuchi, M., Fujiwara, Y. Latin square design to gene expression experiments 11th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 2003.6.30-7.3 Queensland, Australia
  2. Koizumi, F., Taguchi, F., Shimoyama, T., Saijo, N., Nishio, K. Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839: A role for inhibiting phosphorylation of EGFR at Tyr1068. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. 2003.7.11-15 Washington DC USA
  3. Jang, JH., Lee, SH., Kang JH., Nishio, K., Saijo, N., Kuh, HJ. ZD1839 potentiates the antiproliferative activity of paclitaxel and oxaliplatin against human gastric carcinoma cells in vitro. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. 2003.7.11-15 Washington DC USA
  4. Sugiyama, K., Yamashita, K., Nishio, K.

- Akinaga, S., Kanazawa, J. Synergistic combined effect of vinorelbine and ZD1839 (Iressa) in NSCLC cell lines which overexpress the phosphorylated EGFR and ErbB2. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet.. 2003.7.11-15 Washington DC USA
5. Shimoyama, T., Koizumi, F., Saijo, N., Nishio, K. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (irinotecan) in human colorectal cancer cells. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. 2003.7.11-15 Washington DC USA
  6. Ohmori, T., Inoue, F., Yamaoka, T., Hirose, T., Horichi, N., Nishio, K., Adachi, M., Saijo, N., Arteaga, CL., Kuroki, T. EGFR-degradation activity contributed to ZD1839 (Iressa)-resistant mechanism in human non-small cell lung cancer cell lines. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. 2003.7.11-15 Washington DC USA
  7. Taguchi, F., Koh, Y. Koizumi, F., Shimoyama, T., Saijo, N., Nishio, K. Activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (VEGFR (KDR)-TKI), in a model of ZD1839 (Iressa) resistance. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet.. 2003.7.11-15 Washington DC USA
  8. Tsunoda, T., Koh, Y., Nishio, K. Differential gene expression profiles and identification of the genes relevant to clinicopathologic factors in colorectal cancer selected by cDNA array method in combination with principal component analysis. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet.. 2003.7.11-15 Washington DC USA

H. 知的財産の出願・登録状況  
特になし

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 国立がんセンター中央病院 内科 安藤正志  
分担研究者 国立がんセンター研究所 第三組織病理研究室 長谷川 匡

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 16 年 3 月 16 日現在で 8 例を登録し、うち 6 例が外科的切除を受けた。

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<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>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<sup>6)</sup>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り。

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。

アロマトラーゼ阻害剤は、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トラーゼを阻害し、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トラーゼ阻害剤であり、より選択的にアロマトラーゼを阻害し、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效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

－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 および PgR が共に陽性 (IHC 法による)

### (b) Patient characteristics

・年齢：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

－骨髄機能

白血球数 3,000/mm<sup>3</sup> 以上

血小板 100,000/mm<sup>3</sup> 以上

－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

－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

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 16 年 3 月 16 日現在、8 例が登録され治療を受け、6 例に外科的切除を行った。なお、本試験に登録された症例はすべて 65 歳以上であった。

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

現在までのところ、重篤な副作用や無効による治療中止例は認められていない。

#### 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 1 年 3 ヶ月の時点で 8 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、登録に伴う問題や重篤な副作用による治療中止は認められていない。

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。

本試験において、内分泌療法であるアナストロゾールによる治療効果の判定基準は、日本乳癌学会による乳癌取り扱い規約を用いた。この基準は化学療法による治療効果を判定する基準であるため、治療後の HE 標本における腫瘍組織の変性の程度等を評価して効果を判定するものである。このため、治療による明らかな腫瘍組織の変性が認められることが少ない内分泌療法による治療効果を判定する場合には、病理学的治療効果を過小評価する可能性が懸念された。今後、腫瘍組織の細胞分裂の程度を評価するマーカーである Ki-67 等の指標を用いた乳癌の内分泌療法における病理学的治療効果判定基準について検討する予定である。

#### 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。科学および倫理面を十分に考慮することにより、臨床試験を遂行することが可能であった。

#### 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

原発性乳癌に対する 5-FU/エピルビシン/シクロフオ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第 II 相試験

分担研究者 国立がんセンター中央病院 内科 安藤正志

分担研究者 国立がんセンター 研究所第三組織病理研究室 長谷川 匡

### 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/シクロフオ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 16 年 3 月 16 日現在で 47 例を登録、治療を実施し、28 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/シクロフオ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<sup>1,2)</sup>。

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<sup>3)</sup>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<sup>3,4)</sup>。

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<sup>12,16)</sup>。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<sup>5,6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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<sup>8,9)</sup>、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、anthracline 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<sup>3,10)</sup>、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<sup>11)</sup>。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/m<sup>2</sup>の比較では、EPIの1回投与量が 100 mg/m<sup>2</sup>が 50 mg/m<sup>2</sup>より無病生存期間が優れていた<sup>7)</sup>。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/m<sup>2</sup>/EPI 100 mg/m<sup>2</sup>/CPA 500 mg/m<sup>2</sup> day 1、3週間隔投与とした<sup>12)</sup>。なお、国内ではEPIの1回投与量は 60 mg/m<sup>2</sup> 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/m<sup>2</sup> 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<sup>9)</sup>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/m<sup>2</sup> 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 trastuzumab<sup>13)</sup>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<sup>14)</sup>) 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/mm<sup>3</sup>以上または好中球数 1,500/mm<sup>3</sup>以上