

厚生労働科学研究研究費補助金

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

平成14-16年度 総合研究報告書

主任研究者 藤原 康弘

平成17(2005)年 4月

厚生労働科学研究研究費補助金  
総合研究報告書

cDNAアレイを用いた新しい乳癌治療体系の構築

平成14－16年度 総合研究報告書

主任研究者 藤原 康弘

平成17(2005)年 4月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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

- 資料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相試験のプロトコール (非公開)
- 資料2 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 (非公開)
- 資料3 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 (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
- 資料10 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)。
- 資料11 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)
- 資料12 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およびP 値-オッズ比の関係
- 資料13 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。
- 資料14 テストセット1 2例を選択した遺伝子群で分類した末梢神害の有無 (クラスタリング)
- 資料15 p値の負の対数の合計を指標とした場合の参照線
- 資料16 プロットの曲線下面積を指標としたときの参照線
- 資料17 group 1および 2の遺伝子のAUCとオッズ比
- 資料18 group 1の遺伝子のQ-Q plot

資料19 group 2の遺伝子のQ-Q plot

資料20 2乗差の中央値の大きい遺伝子

資料21 2乗差の分散の大きい遺伝子

資料22 フィルターアレイの信頼性および抗癌剤感受性遺伝子

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	75
III. 研究成果の刊行物・別刷	_____	83

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）  
総合研究報告書

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

現在の乳癌の薬物療法は、原発腫瘍の病理学的評価と、年齢あるいは閉経状況に関する情報により方針を決定しているが、治療前に効果・副作用予測を十分に行えていない。我々は乳癌の術前治療のセッティングにおいて、化学療法、内分泌療法、免疫療法を組み込んだ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、乳癌化学療法において、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。

分担研究者：

藤原康弘 国立がんセンター中央病院内科  
医長  
安藤正志 国立がんセンター中央病院内科  
医員  
木下貴之 国立がんセンター中央病院外科  
医長  
大橋靖雄 東京大学大学院医学系研究科  
教授  
関島勝 ㈱三菱化学安全科学研究所  
鹿島研究所  
西尾和人 国立がんセンター研究所  
薬効試験部  
長谷川匡 国立がんセンター研究所  
病理部  
竹内正弘 北里大学大学院薬学研究科  
教授

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

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

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

### 1. 遺伝子発現解析を用いた新カスタムアレイのデザインと作製

#### ① ホルモン感受性関連遺伝子群の抽出

ヒト乳癌細胞株について、内因性エストロゲンを除去した環境下で、エストラジオール(E2)とタモキシフェンにさまざまな条件で暴露し、乳癌細胞からRNAを抽出してcDNA解析を行った。上記の実験によりホルモン感受性関連遺伝子群を抽出した。

② 新カスタムアレイのデザインと作成  
細胞株に対しカスタムアレイを用いて遺伝子発現量を測定したデータを用い、カスタムアレイによる遺伝子発現量測定の際に生じる結果のばらつきを推定し、それらの要因を考慮した実験デザインを検討した。その結果の基づき1-①で選択された遺伝子群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、新しいカスタムアレイを作成した。

③ 新カスタムアレイの信頼性の評価  
新カスタムアレイの遺伝子解析の再現性を検討したうえで、新カスタムアレイを用いて臨床検体の遺伝子発現解析を実施し、全遺伝子群および新たに追加した遺伝子群の発現プロファイルをクラスタリングし、

新カスタムアレイの生物学的妥当性を評価した。

### 2. 原発性乳癌に対する術前薬物療法に関する前向き臨床試験の実施

乳癌術前薬物療法の適応となる患者を対象に、乳房針生検（core needle biopsy, CNB）を行い、年齢、閉経状況、ホルモン受容体、HER2タンパク発現状況により下記の3本の臨床試験へリクルートした。

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引き続くパクリタキセル週1回投与(トラスツマブ)併用による術前化学療法の第II相試験

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相臨床試験を計画・実施した。

#### 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、乳房温存術施行率、有害事象発生率

#### 2) 対象症例

18才以上65才未満、PS (ECOG) 0-2、組織診で乳癌と診断、臨床病期 (AJCC 2002年) II期またはIIIa, b期で腫瘍径2cm以上3cm未満で臨床的に腋窩リンパ節転移陽性または腫瘍径3cm以上、原発巣のホルモン受容体の状況は問わない、適切な諸臓器機能を有し、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 mg/m<sup>2</sup> 15分点滴静注

EPI 100 mg/m<sup>2</sup> 15分点滴静注

CPA 500mg/m<sup>2</sup> 30分点滴静注 以上 day1  
3週間隔4コース施行。

上記に引き続いて

・HER2過剰発現なしの症例

Paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> 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

・HER2過剰発現ありの症例

Paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> 60分点滴静注 (day 1, 8, 15, 22, 29, 36)に加えTrastuzumab 4 mg/kg 60分点滴静注 (day 1)、に引き続き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：50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の第II相試験

閉経後の手術可能、エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体共に養成の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・実施した。

### 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

閉経後の女性症例 (50歳以上の女性で、過去12ヶ月間に生理がない、またはFSHの値が施設における閉経後の範囲内)、PS (ECOG) 0-2、組織診で乳癌と診断された症例、

臨床病期 (AJCC 2002年) II期またはIIIa, b期で腫瘍径2cm以上3cm未満で臨床的に腋窩リンパ節転移陽性または腫瘍径3cm以上、ERおよびPgRが共に陽性、適切な臓器機能を有し、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：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回土トラスツズマブ投与による術前化学療法の第II相試験

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・実施した。

### 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、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

65才以上、PS (ECOG) 0-2、組織診で乳癌と診断された症例、臨床病期 (AJCC 2002年) II期またはIIIa, b期で腫瘍径2cm以上3cm未満で臨床的に腋窩リンパ節転移陽性または腫瘍径3cm以上、ERあるいはPgRのいずれかが陰性、適切な臓器機能を有し、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

・HER2過剰発現なしの症例

Paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> 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

・HER2過剰発現ありの症例

Paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> 60分点滴静注 (day 1,

8, 15, 22, 29, 36)に加えTrastuzumab 4 mg/kg 60分点滴静注 (day 1)、に引き続き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：40例

### 3. 術前薬物療法の治療前後の臨床検体を用いたcDNAアレイ解析の実施

#### ① 検体の採取方法と処置

上記3本の臨床試験の附随研究として計画した「DNAアレイによる原発性乳がんの術前薬物療法における薬剤感受性決定遺伝子の検討」研究に同意を得られた患者を対象に、通常の病理組織学的検討に用いる検体のほかに、cDNAアレイ用の検体を2本採取した。薬物療法開始前、開始後（臨床試験2-①についてはpaclitaxel開始前と開始後）に静脈血を採取し、単各級を分離した。手術時には乳癌組織（肉眼的遺残がない場合には乳腺組織）を採取した。

検体はRNA保存液中で処理したあとに-80°Cで保存、約1週間以内にRNAを抽出、増幅の後、保管した。その後、RIラベルを行って1.により作成した新カスタムアレイにハイブリダイズした。遺伝子発現は関島らがイメージアナライザーで解析、数値化したのち、西尾らが標準化、大橋らが統計解析を実施した。

#### ② 臨床検体の品質管理

新カスタムアレイを用い、臨床検体（末梢血単核球および乳癌組織）の遺伝子解析を実施し、これらの検体から得られるRNA

の品質を評価し、採材、前処理、RNA抽出、RNAの品質測定各工程を標準化することを試みた。

#### ③ cDNAアレイ解析の実施

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、臨床像と相関するマーカー遺伝子の選択をおこなった。

#### 1) 乳がん術前化学療法による有害事象予因子の同定

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相試験について、paclitaxel開始前と開始後の末梢血単核球検体における遺伝子発現プロファイルの変化により末梢神経障害（NCI-CTC ver2による）と相関する遺伝子を検索した。

2) CNB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  
臨床試験2-①について、CNBと治療前末梢血単核球サンプルを用いて、術前化学療法の病理学的効果と相関する遺伝子を検索した。

#### ④ バイオインフォマティクスに関する検討

膨大かつノイズの多いDNAアレイデータの解析においては、対象者数が少なく、結果が一部の極端なデータに依存しやすい。本研究では対象者が少ない状況において、安定かつ妥当な結果を得るために有用な検定方法を検討した。

#### （倫理面への配慮）

本研究の主目的であるcDNAアレイを用いた乳癌薬物療法の効果・副作用予測に関



する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、実施した。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。

臨床試験および附随研究はいずれも国立がんセンター中央病院乳腺グループの院内研究として計画され、倫理委員会の審査の後、承認を得たものである。研究の実施にあたっては以下の倫理面に配慮した。

**(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各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**

**1. 遺伝子発現解析を用いた新カスタムアレイのデザインと作製**

① ホルモン感受性関連遺伝子群の抽出  
基礎実験によるデータをもとに、ホルモン感受性に関連する167遺伝子を選択した。

② 新カスタムアレイのデザインと作成  
細胞株でのカスタムアレイによる遺伝子発現量測定では、測定日や遺伝子による測定結果のばらつきが大きかった。RNA増幅を行った場合と行わない場合では、行わない場合のほうが測定日間のばらつきは小さくなった。測定日間で測定値のばらつきの多かった原因としては、測定日間の実験条件のほか、実験者の技術的向上の影響が考えられた。またアレイ上で同一遺伝子の繰り返しがないことが十分な信頼性を得られなかった原因と考えられた。

上記の結果のもとづき、選択されたホルモン感受性関連遺伝子群を、以前より選択していた775の抗がん剤関連遺伝子に加えて、新カスタムアレイにスポットする際に、アレイのスポットの位置を無作為化し、また無作為に抽出した遺伝子を複数化した。

**③ 新カスタムアレイの信頼性評価**

乳癌細胞株について、単独実験者が実験日を変えて新カスタムアレイによる実験を

行ったところ、測定日間の測定値の相関は良好であり、結果の再現性が高いことが示された。

末梢血単核球と乳癌組織において新カスタムアレイによって得られた遺伝子発現データについて、全遺伝子群によるクラスタリングを実施した結果、遺伝子プロファイルは大きく末梢血単核球と乳癌組織の2群に分けられた。

## 2. 原発性乳癌に対する術前薬物療法に関する前向き臨床試験の実施

### ① 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

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。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。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。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。

### 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の第II相試験

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。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いない。手術を施行された15例の病理組織学的効果(乳癌取扱い規約第14版)は、grade 3(病理学的完全寛解):0例、grade 2:0例、grade 1b:4例、grade 1a:10例、grade 0:1例であった。

### 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

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。

### 3. 術前薬物療法の治療前後の臨床検体を用いたcDNAアレイ解析の実施

#### ① 臨床検体の採取と品質管理

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。検体採取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。乳癌組織は脂肪が多く含まれるが、Isogen（ニッポンジーン）でホモジナイズすることで、RNAの品質と収量を維持することが出来た。また血液からの末梢血単核球の分離にはFicoll-Hypaqueを用い、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、検体採取からIsogen保存までに時間を要する手術検体ほど成績が悪いが、検体採取・RNA抽出工程を標準化してからは、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

問題ない場合で末梢血単核球由来の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、混入した網状赤血球等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 cDNAアレイ解析の実施

附随研究への症例集積が良好であった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相試験について、新カスタムアレイによる遺伝子発現測定を行い、臨床像との相関するマーカー遺伝子を選択すべく、下記の解析を行った。

##### 1) paclitaxelによる末梢神経障害の早期予測

paclitaxel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り関連遺伝子を同定した。平成16年12月20日までに数値化された28例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。

まずトレーニングセットにおいてpaclitaxel投与前における末梢血単核球の遺伝子発現からみたpaclitaxel投与後の変動遺

伝子を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。Paclitaxel投与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、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。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群に分類し比較すると、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。この手法により、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。選択された遺伝子は細胞骨格、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。選択された遺伝子群の妥当性を検証するため、12例をテストセットとして用いた。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。

## 2) 病理学的完全寛解の予測

病理学的効果が低い(1a, 1b)群と高い(2, 3)群完全寛解となった群を比較し、治療前末梢血単核球からみたCNBの遺伝子発現状態の差異をP値およびオッズ比により検討した。オッズ比 $<$ 1となる遺伝子においても、オッズ比 $>$ 1となる遺伝子と同等に、P値の低いものが認められた。これは病理学的効果と逆相関を示す遺伝子の存在を示唆した。

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あるいは治療前末梢血単核球の遺伝子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。病理学的効果が低い(1a, 1b)群と高い(2, 3)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であることが示唆された。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。

## ③ バイオインフォーマティクスに関する検討

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、

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名を対象とした。このように対象者が少ない場合、予後予測モデルに基づく遺伝子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した。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%点の参照線の上に位置しており、AUCが参照線を求める際の指標として適切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、結果の安定性を示唆した。

#### D. 考察

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アレイによるファルマコゲノミクス解析の手法を用いて効果・副作用を予測し、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。

臨床サンプルの採取、検体管理、RNA抽出、および検体処理にあたっての品質管理

は標準化された。一方、新カスタムアレイは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た。特に本研究ではカスタムアレイのデータの信頼性評価を行うために、遺伝子スポットの無作為化、無作為抽出遺伝子のスポット複数化による設計を行ったことは、特筆すべきである。新カスタムアレイから得られたデータを、もとした旧アレイによるデータと比較検証した結果、アレイの特性としてスポットされた遺伝子の位置的要因が誤差を生じさせる要素として大きな比重を持つことが統計学的に証明された。アレイのスポット位置の無作為化は提唱されているものの、実際に証明を行ったものは見受けられず、アレイによる遺伝子発現解析が日常化されつつある昨今、本研究の意味は大きいものと考えられた。

「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」においては順調に登録症例数を伸ばした。同試験において、新カスタムアレイによる遺伝子発現を行い抽出した副作用および病理学的効果予測に関するマーカー遺伝子は、本試験で用いたカスタムアレイの高い信頼性を考えると有望な結果な結果である。また比較的少数例でのDNAアレイの解析において、一定の安定性を持つ遺伝子を探索するバリデーション法を提示できた。今後選択されたマーカー遺伝子の妥当性と再現性を評価するためには、基礎実験や、独立したデータセットでの再現性試験、多施設検体での検証試験など、更なる検討を要する。

「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」、「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第II相試験」については当初の見込みより試験の進捗が遅れ、現時点でcDNAアレイの解析を行うに足る症例数に達していないが、これは年齢、ホルモン受容体発現状況により対象症例が限定されたためと考える。しかし、アロマターゼ阻害剤や抗体療法の前後でcDNAアレイやDNAチップを用いて遺伝子発現の変動をみた報告はなく、今後も症例集積を継続し、本研究によって確立・標準化した手法を用いて効果・副作用予測に有用なマーカー遺伝子を同定していくことは、乳癌の個別化治療を確立していくうえで重要であると思われる。

#### E. 結論

乳癌術前薬物療法に関する前向き臨床試験を実施し、薬物療法前後の乳癌組織および末梢血リンパ球検体より、標準化した品質管理のもとRNAを抽出し、新規に作成したcDNAアレイによる遺伝子発現解析を行った。少数例でも安定した結果を得られる解析方法により、術前化学療法の治療効果および副作用を予測するマーカー遺伝子が選択された。現在計測中の検体のデータ集積が完了した後に、選択されたマーカー遺伝子の妥当性評価を行う予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shimizu C, Ando M, Katsumata N, Kinoshita T, Akashi T, Fukutomi T, Hasegawa T, Fujiwara Y. Phase II study of neoadjuvan

t 5FU /epirubicin /cyclophosphamide followed by weekly paclitaxel treatments for primary breast cancer, with trastuzumab for HER 2-positive tumors. (投稿中)

##### 2. 学会発表

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

準備中

##### 2. 実用新案登録

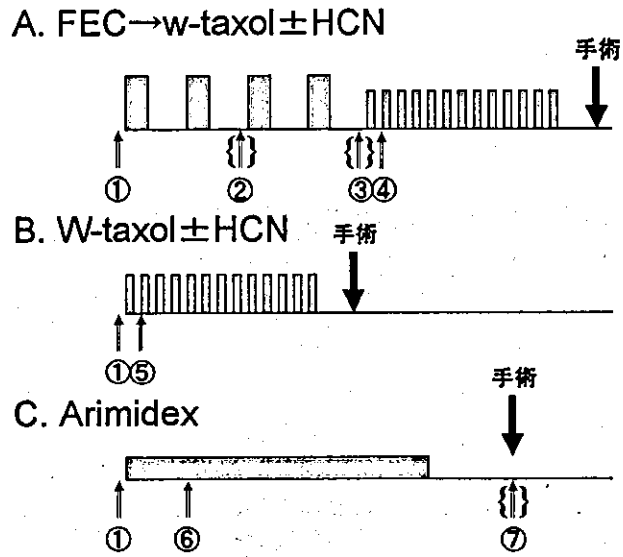
なし

##### 3. その他

なし

資料

資料4 付随研究の採血ポイント



## 資料5 カスタムアレイの遺伝子の選択

### 5-1) 遺伝子選択の過程

- A) 既に抗がん剤、分子標的薬剤用に作製し、実用中のカスタムアレイ (Pharmacology array ver 3) の遺伝子を採用。ホルモン治療用に新たに追加される遺伝子を追加する上位互換タイプのカスタムアレイとした。
- B) 文献的引用  
Env H Prespect p403/2000, NEJM Jed p539/2001, p1999/2002, JNCI p353/2003 p338/2003 などに発表された乳癌に関連する遺伝子を整理、検討し計 100 遺伝子程度を候補として選択した。
- C) 環境ホルモン array  
公開されている環境ホルモン用アレイには 300 弱の遺伝子が選択されているが、ヒト以外の遺伝子も選択されている。上記 1) により選択された遺伝子にヒト遺伝子を加えた。
- D) 乳癌細胞株に女性ホルモン、タモキシフェンなどを接触された際に有意に変動する遺伝子を統計的に選択、リストに追加。

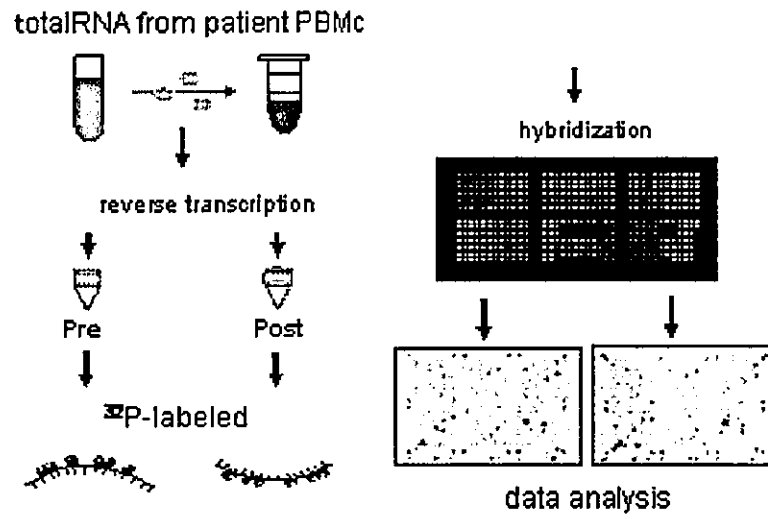
### 5-2) アレイデザインの改善

大橋らの報告により、実験計画法に基づいたアレイのデータの質の評価がなされたが、フィルター内の遺伝子を評価し、信頼性向上のために、選択した遺伝子をランダムに配置させることとした。また、同一遺伝子を重複してスポットすることにより、さらなる信頼性、再現性の向上をはかった。また、過剰に発現しており、周囲の遺伝子の発現データに影響を与える遺伝子を既存発現解析結果から選択し、周辺に影響を与えない場所に移動した。最終的に作製した遺伝子リストは Pharmacology Array V4.3 とした。(資料 5-3) リストは ABC 順に遺伝子の名前で並べて表示した。

\*緑色で示したものが加えた遺伝子、青色で示したものが重複させた遺伝子、黄色くで示したものがサンプル間での差が少なく恒常的に強いシグナルが検出されてしまうと考えられる遺伝子、赤および紫色は Clone Tech により指定された位置決め用の遺伝子もしくはコントロール遺伝子である。



## RNA isolation and microarray hybridization

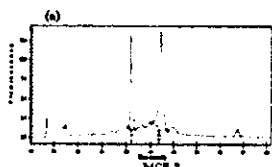


資料7 サンプルのQC と保存法改善についての基礎研究

(臨床サンプルから抽出したRNAの質の評価と保存法の改善)

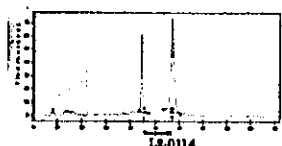
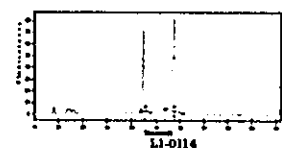
臨床サンプル例におけるBioanalyzer2100によるRNA解析結果

a) Cell line (MCF-7)



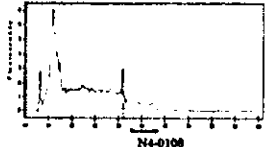
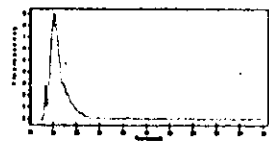
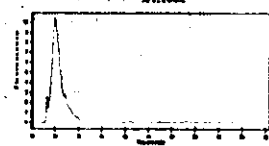
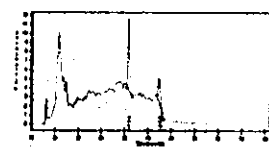
RNAlater浸透後抽出も  
ISOGENで直接抽出もほ  
ぼ同様の結果

b) 末梢血単核球



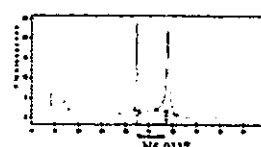
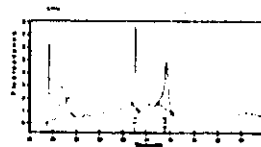
単核球抽出後RNAlater使  
用もISOGEN直接抽出も  
同様の結果

c) CNB検体  
(RNAlater使用:  
24時間laterに浸透後抽出)



いずれも著明なRNAの変性が  
認められる

d) CNB検体  
ISOGEN浸透、凍結後、  
homogenizeして抽出



良好なRNAが得られている

本研究において、乳癌組織においては、脂肪組織に富み、RNAlaterによるRNA保存は、不適であると考えられたため、Isogen処理を実施することと minor change した。以降、良質のRNAの回収が行われている。

資料8 ホルモン接触時、Tamoxifen 投与時の前臨床データの解析

試験の概要

- cDNA カスタムアレイ 20 枚を使用
  - 10 枚 : MCF7 細胞株
  - 10 枚 : SK-BR-3 細胞株
- 細胞株への処理
  - エストロゲン (E) 濃度 : 2 段階 (10e-11, 10e-9M)
  - Tamoxifen (T) 濃度 : 2 段階 (10e-7, 10e-6 M)

処理群と ID

		対照	Eのみ	E+T7	E+T6	T6のみ
MCF7	E11	MN11T0	ME11T0	ME11T7	ME11T6	MN11T6
	E9	MN09T0	ME09T0	ME09T7	ME09T6	MN09T6
SK-BR-3	E11	SN11T0	SE11T0	SE11T7	SE11T6	SN11T6
	E9	SN09T0	SE09T0	SE09T7	SE09T6	SN09T6

発現データの特徴

1. 平均値の比較 (アレイ毎、変換なし)

		対照	Eのみ	E+T7	E+T6	T6のみ
MCF7	E11	95.7	85.6	94.3	86.7	78.1
	E9	70.9	66.5	80.3	95.1	67.7
SK-BR-3	E11	80.3	76.4	78.4	64.4	57.9
	E9	30.7	30.0	30.2	36.9	27.3

2. 中央値の比較 (変換なし)

		対照	Eのみ	E+T7	E+T6	T6のみ
MCF7	E11	63.3	57.5	67.7	70.4	66.3
	E9	53.5	50.3	47.8	54.0	44.9
SK-BR-3	E11	59.0	48.8	58.7	41.1	39.6
	E9	15.2	15.0	15.8	16.2	17.0

解析

1. 平均値、中央値に対して分散分析を行う

```
proc glm data = ARMEANS;
class EXPR TRT;
model EXP = EXPR TRT;
lsmeans EXPR TRT;
run;
```

結果 I. (平均値)  
R2 = 0.932110

変数	DF	Type I SS	Mean Square	F 値	Pr > F
EXPR	3	9206.858000	3068.952667	52.09	<.0001
TRT	4	500.437000	125.109250	2.12	0.1405

EXPR

MCF7, E11 88.08  
MCF7, E9 76.10  
SK-BR-3, E11 71.48  
SK-BR-3, E9 31.02

TRT

Cont. 69.400  
E 64.625  
E+T7 70.800  
E+T6 70.775  
T6 57.750

結果 II. (中央値)