

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

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による
放射線化学療法感受性予測の臨床導入を目指した基盤的研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 嶋田 裕

平成19(2007)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性 予測の臨床導入を目指した基盤的研究 嶋田 裕	1
II. 分担研究報告	
1. 食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性 予測の臨床導入を目指した基盤的研究 福島雅典	5
2. 食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性 予測の臨床導入を目指した基盤的研究 松井茂之	8
3. 食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性 予測の臨床導入を目指した基盤的研究 辻本豪三	10
4. 食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性 予測の臨床導入を目指した基盤的研究 平岡真寛	13
5. 食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性 予測の臨床導入を目指した基盤的研究 千葉 勉	15
6. 食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性 予測の臨床導入を目指した基盤的研究 加藤 健	17
7. 食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性 予測の臨床導入を目指した基盤的研究 篠田雅幸	19
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

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

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性
予測の臨床導入を目指した基盤的研究 （H18-ファーマコー—般-003）

（主任）研究者 嶋田 裕 兵庫医科大学第一外科 講師

研究要旨

食道癌は未だ予後不良の難治癌で、治療成績向上の為に集学的治療が不可欠であるが、生検による治療前診断に有効な評価法が未だ存在しない。本研究ではNEDOにて開発された高感度マイクロアレイチップを使用し、生検標本の遺伝子解析プロファイルによる食道癌の化学放射線療法感受性予測に関する多施設共同研究（32施設）を開始した。既に主任研究者施設での倫理委員会の承認、先端医療振興財団の承認を受け、プロトコルを登録した（登録番号：R000000579，試験ID:UMIN000000479）。検体搬送システムの確立，Web登録システムの確立が終了し2007年2月より症例登録を開始し、今後2年2ヶ月で160例の症例集積を目指している。チップが256遺伝子搭載型から9000搭載型となり、精度確保のために少し技術的改良が必要となったが、ほぼ改良しえた。

共同研究者

福島雅典 京都大学医学研究科 臨床試験管理学
松井茂之 京都大学医学研究科 生物統計学
辻本豪三 京都大学薬学研究科 ゲノム創薬科学
平岡真寛 京都大学医学研究科 放射線医学
千葉勉 京都大学医学研究科 消化器内科学
加藤健 国立がんセンター中央病院 第一領域外来部
篠田雅幸 愛知県がんセンター中央病院 食道外科

A. 研究目的

食道癌は未だ予後不良の難治癌で、治療成績向上の為に集学的治療が不可欠であるが、現時点では有用な指標が無い。従って化学放射線療法の副作用と手術療法の大きな侵襲を回避すべき患者を選択できず、効果的な医療費の使用とはなっていない。近年の化学放射線治療は食道癌の治療に新たな治療法選択の可能性をもたらしたが、不適切な患者への化学放射線療法の施行や過度の化学放射線療法への期待から治癒できた患者が治癒不

可能となる場合や副作用で重篤な状態となる患者が少なからず存在する。現在までの画像診断ならびに少数の遺伝子解析では化学放射線療法感受性予測には限界が有り新たな解析法が望まれてきた。マイクロアレイは遺伝子の網羅的解析を可能としたが、治療前にこれらの予測を行うには生検標本による解析が不可欠である。本研究ではNEDOにて開発された高感度マイクロアレイチップを使用して、食道生検標本による食道癌化学放射線療法感受性の責任遺伝子群を網羅的・体系的に明ら

かにし、化学放射線感受性予測アルゴリズムを作製する。このアルゴリズムを用いて化学放射線療法感受性予測を前向き臨床試験で検証し、臨床応用につなげる。

この研究により、化学放射線療法の効果がないと予測された場合は副作用のある化学放射線療法を回避して根治切除を行い、化学放射線療法の効果が期待できる患者では侵襲の大きな手術を回避できる。このことは患者個別のテーラーメイド治療が具現化することとなり、効果的な医療費の使用がなされ、患者への負担を軽減し、社会全体の医療費が削減できることとなる。化学放射線療法感受性の責任遺伝子群の解明が行われれば、分子標的治療のターゲットとして有用である。また胃癌、大腸癌などの他の消化癌における生検標本や増加が著しい肺癌、乳癌の針生検による治療選択にも応用できる。

B. 研究方法

- ①申請者を中心とした参加施設（共同研究者3施設ならびに研究協力者31施設）でインフォームドコンセントの基に生検標本を採取し、連結可能匿名化する（研究協力者リストを添付する）。
- ②化学療法、放射線療法を標準的プロトコール（CDDP+5Fu）により行われた患者を対象とする。
- ③患者を先端医療振興財団の臨床研究情報センターにWebで登録し管理する。
- ④検体を解析担当施設に送付し、マイクロアレイで解析する。
- ⑤RNAの質を考慮した症例数の再計算から必要症例数を設定する。
- ⑥症例集積が順調に進めば、3年目にアルゴリズムの検証を行う。
- ⑦検体のロスを出るだけ少なくする為に、検体採取方法、保存方法、検体送付のマニュアルを作成し、各施設に徹底周知をはかる。
- ⑧検体採取と解析にあたってはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針等に従って実行する。

<マイクロアレイと解析方法>

- ①各施設のサンプルのRNAの質を申請者の施設で検討し、質が保証された検体について解析する。
- ②癌と正常の判別チップで正しく癌と正常を判別する。
- ③NEDOプロジェクトでの情報を参考に作成した次世代高感度チップを使用し、化学放射線感受性予測に適した遺伝子群を選別する。
- ④このアレイは従来比、百倍程度の高感度が得られており、生検標本の遺伝子増幅なしに検討する。
- ⑤解析法は各種統計学的手法を使った遺伝子抽出、およびそれらの遺伝子の発現情報による人工神経回路と機械学習などを使用するが、これらの解析法も十分でなく、新たに開発する予測システムにても解析する。
- ⑥作成された解析アルゴリズムを前向きの化学放射線療法にて評価する。

（倫理面への配慮）

- ①主任研究者の施設ではプロトコールが倫理委員会で承認されているが、主任研究者の異動（10月16日）に伴い、異動先の倫理委員会でも再審査を受け承認（12月12日）された。
- ②現在まで、共同研究者および研究協力者において倫理委員会へのプロトコール申請が行われており、主任研究者施設以外の12施設で承認され、今後順調に各施設で承認予定である。
- ③患者にとっては臨床研究のための生検標本採取となる苦痛を伴う内視鏡検査を受けて貰わなくてはならないことから、その為の説明書および同意書を別個に作成して、生検に伴う危険性についての説明と試験に参加しなくても不利益が生じないことに同意を得ている。
- ④遺伝子解析指診に沿って、インフォームドコンセントを行い、各施設の検体は匿名化し、研究申請者の施設に送付し、一括して同じ条件で解析する。
- ⑤臨床情報研究センターではすでにWeb登録による各種臨床試験の管理が行われており、個人情報管理のシステムが既に構築されている。遺伝子情報と臨床情報は独立して解析され、解析者には個人情報にはマスクされた状態で解析される。

C. 研究結果

統計学的に化学放射線療法感受性を検証可能な良質の検体は約160例と計算され、JCOGを中心とした食道癌治療の専門施設による多施設共同研究が不可欠と判断された。生検標本の遺伝子解析プロファイルによる食道癌の化学放射線療法感受性予測に関する多施設共同研究を組織するに当たり、既に概要において協力に同意がえられたがんセンターを中心とした施設でプロトコル試案を作成した（2006.6月 第一回班会議）。

プロトコル概要は以下のごとくとした。

- 1) 対象患者は化学療法、放射線療法を標準的プロトコル (CDDP 70mg/m² day1, day 29, 5-FU 700mg/m² day 1-4, day 29-32+照射60gyまたはCDDP 75mg/m² day1, day 29, 5-FU 1000mg/m² day 1-4, day 29-32 + 照射50.4Gy) により行われた患者とする。
- 2) 臨床情報は先端医療振興財団の臨床研究情報センターにWebで登録し管理する。
- 3) 遺伝子解析は京都大学薬学研究科に検体を搬送して解析する。
- 4) 遺伝子解析結果と臨床情報をバイオインフォマティクスにて解析し、化学放射線療法感受性に関与する遺伝子を同定し、感受性予測のアルゴリズムを作製する。

プロトコル試案を基に6月末にプロトコルを作成した。まず、生検標本からの遺伝子解析について主任研究者の前任地である京都大学における医の倫理委員会の遺伝子解析小委員会にて審査を受け、承認された。これを受けてプロトコルを親委員会である医の倫理委員会に提出し、7月22日に京都大学の承認を受けた。ついで、8月28日に登録番号: R00000579, 試験ID: UMIN00000479としてUMINに臨床試験の登録を行い、2007年2月に公開した。Web登録システム作成のために財団法人先端医療振興財団の倫理委員会で承認を受け（9月28日）、Web登録システムの作成を開始した。8月末より、プロトコルを共同研究者および研究協力者に提示し、Web登録システムの概要作成が整った10月19日に第2回班会議を行った。班会議の意見に従い、プロトコルの微修正を行い、さらに現在進行中

の臨床試験との整合性をとり、最終的に12月26日にプロトコルを確定した。

プロトコル確定を受けて、Web登録システムの作成を急ぎ、2007年1月22日にWeb登録がオープンとなった。その後、倫理委員会の承認を受けた施設から施設登録および新規ユーザー登録を行い、現在まで11施設が登録している。多数の症例を有するがんセンター中央病院およびがんセンター東病院の倫理委員会は現在申請中で、多数の症例の登録にはまだ少し期間が必要である。

平行して、検体の採取、保存、搬送システムの構築を行い（ファルコバイオ）、施設登録が終了した施設から各施設で担当者が具体的な取り扱い法について説明会を行った。

技術的な問題として、検体の採取保存法については採取直後の搬送や、RNA laterでの短期間保存後の搬送ではRNAの質は非常に高く、症例のロスが起きないことが判明し、登録症例数が10%程度少なくても解析できることが判明してきた。またDNAチップが256チップより9000チップとなり、ゆがみなどの問題が生じたが、ハイブリチェンバーやハイブリ法に修正を加えることによりほぼ解消した。チップは1症例3チップ（腫瘍2チップ、正常1チップ）をワンセットとし、63症例が検討可能な191枚のDNAチップを購入した。

D. 考察

初年度はプロトコルの作成、倫理委員会の承認、プロトコルの登録、検体登録システムの作成をほぼ終了した。今後、倫理委員会の承認が得られた施設から登録を開始する。次年度は少しでも多くの症例集積を目指すために、参加施設の増加の必要性があり、現時点で1施設の追加承諾が得られ、さらに1施設検討中である。今後も症例数の確保に向けた取り組みを継続する。チップ作成による技術的な細かな問題点を改善する。3年目は検体採取を継続するとともに、絞り込まれた遺伝子解析にて感受性を予測するアルゴリズムを完成させ、前向きに検証につなげる予定である。

E. 結論

生検標本の遺伝子解析プロファイルによる食道癌の化学放射線療法感受性予測に関する多施設共同研究（32施設）を開始した。既に主任研究者施設での倫理委員会の承認、先端医療振興財団の承認を受け、プロトコールを登録した（試験ID:UMIN00000479）。検体搬送システムの確立、Web登録システムを確立し、2007年2月より症例登録受付を開始した。今後2年2ヶ月で160例の症例集積を目指している。

F. 健康危険情報

本研究において、特に副作用等は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 嶋田裕 分子生物学を考慮した食道癌3領域郭清の適応 外科治療95 : 337-342, 2006
- 2) Tanaka E, Hashimoto Y, Ito T, Kondo K, Higashiyama M, Tsunoda S, Ortiz C, Sakai Y, Inazawa J, Shimada Y.
The suppression of Aurora-A/STK15/BTAK expression enhances chemo-sensitivity to Docetaxel in human esophageal squamous cell carcinoma.
Clin Cancer Res 13:1331-1340, 2007
- 3) Kondo K, Yamasaki S, Sugie T, Teratani N, Kan T, Imamura M, Shimada Y.
Cisplatin-dependent upregulation of death receptors 4 and 5 augments induction of apoptosis by TNF-related apoptosis-inducing ligand against esophageal squamous cell carcinoma.
Int J Cancer 118:230-42, 2006
- 4) Umeoka S, Koyama T, Togashi K, Saga T, Watanabe G, Shimada Y, Imamura M.
Esophageal Cancer: Evaluation with triple-phase Dynamic CT-Initial Experience.
Radiology 239: 777-783, 2006

- 5) Kan T, Yamasaki S, Kondo K, Teratani N, Kawabe A, Kaganoi J, Imamura M, Shimada Y.
New specific gene expressions in squamous cell carcinoma of esophagus using representational difference analysis and cDNA microarray
Oncology 70 : 25-33, 2006

2. 学会発表

- 1) Shimada Y, Ito T, Tanaka E, Higashiyama M, Itami A, Watanabe G, Kan T, Sato F, Matsumoto S, Miyamoto S, Mitsumori M, Kadowaki M, Tsujimoto G, Akiyama H, Nomura O, Nobumasa H.
New establishment of diagnostic algorithm of esophageal cancer and high sensitivity oligo chip.
Annual meeting of American Gastroenterological Association
Los Angeles 2006.5.24
- 2) Shimada Y Induction of microarray in esophageal cancer. 16th World congress of the International Association of Surgeons & Gastroenterologists. Madrid 2006.5.26
- 3) 嶋田 裕、田中英治、東山元臣、角田茂、相馬俊也、加賀野井純一、伊丹淳、渡辺剛、井上立崇、坂井義治、辻本豪三、秋山英雄、妙本陽、信正均。
食道癌における分子生物学の臨床応用の現状と今後の戦略 第60回日本食道学会 東京 2006.7.1 シンポジウム

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

（分担）研究報告書

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性

予測の臨床導入を目指した基盤的研究 （H18-ファーマコ一般-003）

（分担）研究者 福島 雅典 京都大学医学部附属病院探索医療センター検証部

研究要旨

病期II・III（T4を除く）の食道扁平上皮癌患者を対象に化学放射線療法と高感度・高再現性DNAチップによる食道癌治療前生検標本の発現遺伝子プロファイルを解析し、化学放射線療法治療効果を予測する可能性の高い遺伝子群を同定し、食道癌における化学放射線療法感受性予測アルゴリズムの作成を目標とする研究<食道癌生検標本の遺伝子プロファイル解析による化学放射線療法感受性予測に関する探求的研究>において研究計画作成支援、登録、データマネジメント、検体の搬送・管理、統計解析を行う基盤を形成し共同研究を支援して質管理を行う。

A. 研究目的

食道癌は近年、早期食道癌の発見頻度が増加し治療成績が向上しているが、いまだ治療対象となる食道癌患者の多くを予後不良な進行癌が占めており、その治療成績の向上は大きな課題である。一方で、食道癌は化学療法や放射線療法に反応しやすいなどの特徴も持っているが現在までの画像診断ならびに少数の遺伝子解析では化学放射線療法感受性予測には限界が有り新たな解析法が望まれてきた。

発癌や増殖、化学放射線療法の感受性には多様な遺伝子群が関与していると考えられており、多数の遺伝子を同時に解析するマイクロアレイのような解析方法による検討が必要であることが近年明らかとなって来ている。

そこで、生検標本が採取できた患者において、化学放射線療法を行いその効果判定を行い、その結果と生検標本における遺伝子プロファイル解析と照合し、バイオインフォマティクスにより、化学放射線療法に関与する遺伝子群を同

定し、化学放射線療法感受性予測のアルゴリズムを作成する研究を主任研究者 兵庫医科大学第一外科 嶋田 裕 が計画し、研究計画作成支援、登録、データマネジメント、検体の搬送・管理、統計解析を行う基盤の形成を分担することとした。

B. 研究方法

研究計画作成支援、登録、データマネジメント、検体の搬送・管理、統計解析を行う基盤を以下の方法で形成した。

A) 研究計画作成支援

京都大学医学部附属病院探索医療センター検証部ならびに（財）先端医療振興財団臨床研究情報センター（TRI）にて共同開発したプロトコルテンプレートを用いて研究計画書を作成した。またその過程で必要な調査項目も整理し、これに基づき統計解析を過不足なく行うための症例報告書の様式も作成した。

B) 登録

各試験責任医師は、当該試験を実施するに前に、所属する研究参加施設の倫理審査委員会に本プロトコルの倫理審査を申請し、承認を得ることとし、倫理審査委員会での承認が得られた後、TRI データセンターに施設登録を行うこととした。

施設登録が行われた後、試験責任医師または試験分担医師は、患者が試験に参加する前に説明文書を用いて十分説明し、試験への参加について自由意思による同意を本人から文書として得ることとした。

その後、試験責任医師または試験分担医師は、Webシステムにより症例登録を行うこととし、臨床研究を行うにいたり必要な事項が整理できるようにし、TRIにてWeb登録のためのシステムを整備することとした。

C) データマネジメント

試験により発生したデータは、試験責任医師または試験分担医師がWeb画面により提供される症例報告書に入力することとし、TRIにてWeb画面の作成に必要な症例報告書の様式を作成することとした。

D) 検体の搬送・管理

本研究では遺伝子解析用検体を採取することになっているが、生検にて採取された検体を効率的に提出・移送する手順を記載した手順書、および効率的に検体を管理するための帳票を作成した。

E) 統計解析

個々のエンドポイントについて、解析対象集団を反応ありと反応なしの二つのグループに分け、グループ間で発現量に差がある遺伝子（関連遺伝子）を同定すること、また、いくつかの関連遺伝子を同時に用いて、個々の患者の反応を予測するための予測式の作成を試みることを目的と設定し、その統計解析が可能となる症例数や調査項目を設計し研究計画書に記載した。

(倫理面への配慮)

A) 遵守すべき諸規則

まず、本臨床研究において「世界医師会ヘルシンキ宣言」および「臨床試験に関する倫理指針」を遵守する。遺伝子解析についても「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守することとした。

B) インフォームドコンセント

試験責任医師または試験分担医師は、本試験の実施にあたっては倫理的な配慮を慎重にし、下記内容について十分説明した上で、文書で患者本人の同意を得ることとした。

C) 検体情報の管理に関する事項

患者本人から、説明文書と同意書を用いてインフォームドコンセントを取得する。患者の個人名（イニシャルを含む）は使用せずに、登録センターより発番される検体番号を検体に付与する。この検体番号を用いて検体の匿名化を行った上で研究に供することとした。したがって、本研究過程のどの段階においても検体の提供者の氏名、住所等の個人を同定しうる情報は各医療機関の試験分担医師以外の目に触れることはなく、極めて厳重に保護される。マイクロアレイ解析と臨床情報収集が個別の施設で行われ、バイオインフォマティクスによる検討時に個人情報でない情報（登録番号）により照合される。

D) 個人情報の保護

症例登録票および症例報告書、原資料などの直接閲覧ならびに試験の結果の公表に関しては被験者のプライバシー保護に十分配慮する。また、モニタリングまたは監査担当者、倫理審査委員会および規制当局は直接閲覧についても、被験者の秘密を保全する。なお、被験者の特定は被験者識別コードを用いて行うこととする。

症例登録票および症例報告書のデータは、主要エンドポイント、副次エンドポイントが観測された時点で、統計解析責任者によって別途に行われる遺伝子解析の解析データとマッチングされる。遺伝子解析データはすでに匿名化され個人識別出来ない形で扱われる。その為に、各施設において個人情報管理者を選定し、個人情報の管理を行う。

C. 研究結果

平成18年12月に研究計画書等の必要文書を完成させ、研究参加施設の倫理審査委員会に審議を依頼した。

また、18年12月に症例報告書の様式を作成し、平成19年1月22日Web登録システムの運用を開始した。

平成19年3月19日現在、10医療機関から施設登録があり、いまだ症例登録はないものの本試験を実施する体制の準備は整っている。

D. 考察

研究計画作成支援については、プロトコルテンプレートを用いることで、標準的で汎用性の高い研究計画書を作成することが出来た。今後も研究計画書に従い質の高い臨床研究が実施されることが期待できる。

また、いまだ症例登録はないが、Web登録システムを構築することができ、また検体の搬送・管理を効率的に行うシステムを構築することができ、これにより試験実施中や試験終了後の症例や検体を効率的に管理できる基盤を構築できたと考えられる。

今後もこういった効率的な臨床試験実施基盤の構築により、症例データの管理を行なうデータマネジメント、検体の搬送・管理、およびそれらの結果を用いる統計解析も効率的に実施できるものと考えられる。

E. 結論

本年度では、科学性の高い研究に必要な研究計画書と症例報告書、そして登録に必要なWeb登録システムを構築することが出来た。次年度以降には、Webシステムに症例データを入力するWeb症例報告システムを完成させ、より効率的なデータマネジメントを行い、また収集した検体の搬送・管理を適切に行うことで、質の高いデータの集積し精密な最終解析を行うことを目指す。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

（分担）研究報告書

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性

予測の臨床導入を目指した基盤的研究 （H18-ファーマコ一般-003）

（分担）研究者 松井 茂之 京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻

健康解析学講座薬剤疫学分野 助教授

研究要旨

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による化学放射線療法感受性予測の臨床導入を目指した臨床研究のプロトコルの作成を支援し、統計解析責任者として、統計的考察を要する事項について検討した。とりわけ、マイクロアレイからの遺伝子発現データの統計解析法と必要症例数設計法について検討した。これらの検討をもとに、当該臨床研究のプロトコルにおける統計的考察部分を作成した。

A. 研究目的

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による化学放射線療法感受性予測の臨床導入を目指した臨床研究では、化学放射線療法前の食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイルと化学放射線療法感受性との関連づけを行い、予測システムの構築を試みる。マイクロアレイで測定される数千遺伝子の発現量の統計解析手法や症例数設計法は十分確立しておらず、これらについて検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

過去の生物統計学、バイオインフォーマティクス分野の論文（方法論の論文）、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した臨床研究論文をレビューし、当該臨床研究に即した統計的手法について検討する。

C. 研究結果

遺伝子発現データの統計解析については、統計的判別分析、機械学習理論における手法が適切と判断し、これらを当該臨床研究で実施することとした。必要症例数の設計については、適切な手法が存在しなかったため、新たに手法の開発を行った。この手法は、化学放射線療法感受性関連遺伝子の同定のための多重検定に基づく手法であり、遺伝子間に想定される相関を考慮した症例数設計が可能である。食道癌についての過去の遺伝子発現解析のデータを踏まえ、達成したい予測精度を与えたもとで必要症例数を設定した。以上の検討をもとに、臨床研究のプロトコルにおける統計的考察部分を作成した。

D. 考察

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を伴う臨床研究での統計的手法は十分確立しておらず、個々の臨床研究の目的・疾患や治療などの特殊性を考慮した個別の検討が必要である。マイクロアレイからの遺伝子発現データの統計解析に関する方法論・手法は、近年、生物統計学やバイオインフォマティクスで大変精力的に研究されている分野である。この分野での研究成果は今後も定期的にモニタリングする必要がある。当該臨床研究に有用と考えられる手法が出現した場合には、当該臨床研究での適用可能性についての詳細な検討が随時必要となる。プロトコルには、当該臨床研究の最終解析に先だて、過去の研究成果を踏まえて統計解析計画書を作成する旨を記載した。

E. 結論

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による化学放射線療法感受性予測の臨床導入を目指した臨床研究の立案にあたっては、この臨床研究に即した統計的手法の検討が欠かせない。この種の検討は研究開始後も継続的に行う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし（注；本年度、開発した必要症例数設定法を論文化する予定です）
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽の先端医療技術推進研究事業）

（分担）研究報告書

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性

予測の臨床導入を目指した基盤的研究 (H18-ファーマコー一般-003)

（分担）研究者 辻本 豪三 京都大学薬学研究科 教授

研究要旨

少量かつ貴重な臨床検体を扱うテーラーメイド医療の推進には、高精度、発現プロファイル解析技術の開発が必須である。本研究では高感度チップを用いゲノム機能解析に基づくゲノム臨床研究のモデルを呈示する。

A. 研究目的

ヒトゲノム計画の成果により、患者の遺伝的体質に合わせた処方・治療計画を行う、いわゆるテーラーメイド医療が現実のものになるようとしている。ゲノム構造並びに遺伝子発現の量的変動に関する包括的情報を活用し、テーラーメイド医療を実現するには、ゲノム機能情報と臨床情報を統合することが必要である。本研究ではこの高感度チップを用いた解析システムを臨床応用し、各種難治性疾患に関して低侵襲的操作により採取される微量臨床検体を、ゲノム機能解析、臨床情報との統合ゲノム情報データベースの構築、それに基づくテーラーメイド医療、ゲノム臨床薬理研究の実施を目指し、ゲノム臨床研究のモデルを呈示する。

B. 研究方法

我々が開発した特殊形状のDNAチップは、従来方式と比して約100倍の感度を有し、また実際の臨床試料の解析においても定量性を保持して微量臨床試料でも十分に計測可能であるが、その解析遺伝子数は300以下で、網羅的解析には向かない。したがって、まず培養食道がん細胞を用いる網羅的発現遺伝子解析は従来型のDNAチップにより行い、まず化学療法・放射線療法に関連する候補遺伝子群を抽出する。それらをコンテンツとする高感度DNAチップを用い、食道がん生検試料の遺伝子発現プロファイル解析を行う。

（倫理面への配慮）

研究対象者に対する人権擁護上の配慮のため検体は匿名化し個人情報の管理を適切に行う。研究遂行に際し研究対象者に対して不利益、危険性の排除に関する説明を行い理解（インフォームド・コンセント）を得た上で検体を採取している。また大学の倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

我々の開発したDNAチップ基板は、上述のプロジェクトにおいて、生検標本の発現遺伝子検出を遺伝子増幅することなく実施可能であることが示されている。この基板は樹脂チップ基板の立体構造と表面修飾、および立体構造を利用したハイブリダイゼーション時の攪拌機構によって、従来のガラス基板による発現遺伝子検出の約100倍の感度を示す。一方で従来用いられてきたガラス基板とほぼ同一の設備、プロトコルで実験が可能であり、導入が容易である。また搭載されている遺伝子群は上述のプロジェクト成果を反映したものであり、食道がん細胞に関連する遺伝子が集中的に搭載されていると考えられた。以上のことから、本プロジェクトに利用するに最適なDNAチップと考えられた。開発したDNAチップを用いたこれまでの検討において、本DNAチップの利用条件をメーカー推奨条件に準じて検討し、既存設備の活用と若干の実験器具導入によって、DNAチップへの検体ハイブリダイゼーションプロトコル、およびスキャナーによる検出画像読み取りの条件を確認した。さらに、食道がん生検検体の搬送・保存システムを構築し、実際に良質のRNA検体を採取できることが15検体において確認できた。

D. 考察

約1000遺伝子を搭載可能な小型の基板を用いた実験を行っており、この基板とあらかじめ細胞株を用いて選定された食道がん判別用プロトコルは、食道がん組織が全体の6割以上を占める検体を食道がんと判別できる能力があることが明らかとなっている。今後本研究においては、より検出力が高いプロトコル、アルゴリズムを工夫することによって、確度高い予測を目指す。

E. 結論

我々の開発したDNAチップ基板は、微量生検標本の発現遺伝子検出を遺伝子増幅することなく実施可能であり食道がん細胞に関連する遺伝子が集中的に搭載された最適なDNAチップと考えられた。

DNAチップへの検体ハイブリダイゼーションプロトコル、およびスキャナーによる検出画像読み取りの条件を改善した。さらに、食道がん生検検体の搬送・保存システムが構築できた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagino K, Nomura O, Takii Y, Myomoto A, Ichikawa M, Nakamura F, Higasa M, Akiyama H, Nobumasa H, Shiojima S, and Tsujimoto G.
Ultrasensitive DNA chip: gene expression profile analysis without RNA amplification. J Biochem (Tokyo), 2006. 139(4): p. 697-703.

- 2) Kawanishi H, Takahashi T, Ito M, Watanabe J, Higashi S, Kamoto T, Habuchi T, Kadowaki T, Tsujimoto G, Nishiyama H, and Ogawa O.
High throughput comparative genomic hybridization array analysis of multifocal urothelial cancers. Cancer Sci, 2006. 97(8): p. 746-52.

2. 学会発表

1) 辻本豪三

ゲノム創薬：腎炎などの多因子疾患克服アプローチ
特別講演 第54回北海道臨床腎臓研究会
2006. 06. 02 札幌市

2) 辻本豪三

バイオインフォマティクスを活用した創薬
第38回日本動脈硬化学会
2006. 07. 14 東京国際フォーラム

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

（分担）研究報告書

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性
予測の臨床導入を目指した基盤的研究 （H18-ファーマコ一般-003）

（分担）研究者 平岡 真寛 京都大学大学院医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学 教授

研究要旨

食道癌化学放射線療法の治療効果を予測する方法の確立を遺伝子プロファイル解析の手法にて目指す。

A. 研究目的

病期II・III（T4を除く）の胸部食道扁平上皮癌患者を対象に化学放射線療法を行い、食道癌治療前の生検標本の発現遺伝子プロファイルを解析する。化学放射線療法の治療効果を予測する可能性の高い遺伝子群を同定し、食道癌における化学放射線療法感受性予測アルゴリズムの作成を目標とする。

B. 研究方法

化学放射線療法前に正常食道組織と腫瘍組織から生検を行い、高感度・高再現性DNAチップにて遺伝子プロファイル解析を行う。治療成績を照合し、バイオインフォマティクスにより化学放射線療法感受性予測アルゴリズムを作成する。

（倫理面への配慮）

プロトコルは倫理指針を遵守しており、京都大学の倫理委員会の承認を得た。インフォームドコンセント得たうえ、臨床試験に登録する。

C. 研究結果

プロトコル作成終了し、京都大学の倫理委員会を通過、検体搬送システムについて確立した。Web登録が開始され、症例登録可能となった。

D. 考察

当科の本年度の食道癌に対する初回治療として放射線治療の行った症例は42例であった。年間5例、研究期間内にて12例の症例登録を予定している。

E. 結論

臨床試験の症例登録が開始され、当施設も登録可能となった。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

池田 格、光森通英、板坂 聡、小坂恭弘、
荒木則雄、永田 靖、平岡真寛

当科における食道癌trimodality施行症例
の検討

第284回日本医学放射線学会関西地方会

平成18年11月18日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

（分担）研究報告書

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性

予測の臨床導入を目指した基盤的研究（H18-ファーマコ一般-003）

（分担）研究者 千葉 勉 京都大学医学研究科消化器内科 教授

研究要旨

表在食道癌に対する内視鏡治療は近年増加し、その適応も拡大してきている。当科における食道癌の内視鏡下粘膜切除の評価を行った。一方、進行癌では化学放射線療法が次第に位置を占めるようになってきている。しかし、事前にその奏効を予測する方法はなく、無効の場合には通常の手術に比して数倍のリスクを負った救済手術を施行せざるを得なくなる。治療の個別化を目的として、マイクロアレイを用いた遺伝子プロファイル解析による治療感受性予測研究を計画した。

A. 研究目的

表在食道癌における粘膜切除の治療成績からその適応を明らかとする。化学放射線療法を予定した病期Ⅱ・Ⅲ（T4除く）の胸部食道扁平上皮癌患者を対象として、高感度・高再現性DNAチップを用いて治療前生検標本の発現遺伝子プロファイルを解析する。化学放射線療法の治療効果を予測する可能性が高い遺伝子群を同定し、食道癌における化学放射線療法感受性予測アルゴリズムの作成を目的とする。この研究により個別化医療の具現化を目指す。

B. 研究方法

2006年度の表在食道病変36例における治療成績を切除標本の病理学的検索および臨床経過から評価した。また進行癌においては適格基準を満たす食道癌患者のうち、CDDP/5FU:70(2)/700(2):d1/d1-4と外照射60GyかCDDP/5FU:75(2)/1000(2):d1/d1-4と外照射50.4Gyの化学放射線療法を予定したものから、治療開始前に内視鏡生検により腫瘍組織2個、正常組織1個を採取する。検体は採取後液体窒素中に保管し、即座に京都大学薬学研究科に移送、マイクロアレイ法により遺伝子発現レベルの測定を行う。化学放射線療法の臨床効果とのマッチングを行い、感受性または抵抗性関与遺伝子を同定する。

(倫理面への配慮)

臨床研究では個人が特定できる様な情報は検体から削除し、個人の検定には検体番号を付す。さらに各施設において「匿名化番号対照表」にて一元化管理する。これにより遺伝子発現解析時には個人情報秘匿される。本研究は各施設の倫理審査委員会 (IRB) の承認を得たうえで開始する。また、患者本人から文書によるインフォームド・コンセントを得ることを前提としている。

C. 研究結果

食道表在病変36例に対してEMR/ESD (34例) と焼灼 (2例) を行った。粘膜切除を行った病変のうち26病変は粘膜切除の絶対適応であるm1またはm2であった。相対適応となるm3を3例認めたが、追加治療を行わず経過観察中である。sm癌を5例に認めた。このうちRT/CRT後のsalvage (2例) と心肺機能が不良な症例 (2例) は経過観察を行った。追加治療を行った1例は切除によりリンパ節転移は認めなかった。一方、進行癌における臨床試験では多施設共同研究について倫理審査委員会の承認が得られているが、まだ適応症例は認めていない。適格症例があれば今後積極的に登録を行う予定である。

D. E. 考察と結論

食道表在癌に対する粘膜切除の治療成績はほぼ満足のいくものであるが、相対適応症例における評価は今後のfollow upにより明らかにされるものと考えられる。一方、臨床研究により化学放射線療法感受性予測アルゴリズムが完成すれば、II・III期に限らず、あらゆる病期の食道癌の個別化治療戦略に繋がる可能性がある。集中的な症例集積により、早急に結論を出すことが望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
1) 宮本心一、青井貴之、森田周子、千葉勉
新田孝幸、西尾彰功
表在食道癌に対するフード型双極ナイフの有用性’ 2006. 7. 22 京滋食道疾患研究会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

（分担）研究報告書

食道癌生検標本の遺伝子発現プロファイル解析による放射線化学療法感受性

予測の臨床導入を目指した基盤的研究 （H18-ファーマコ一般-003）

（分担）研究者 加藤 健 国立がんセンター中央病院 第一領域外来部

研究要旨

多施設共同研究による化学放射線療法感受性予測チップの作製と検証を計画した。

A. 研究目的

食道癌は未だ予後不良の難治癌で、治療成績向上の為には集学的治療が不可欠であるが、生検による治療前診断に有効な評価法が未だ存在しない。本研究では食道癌生検標本の発現遺伝子プロファイルにより検出した化学放射線療法感受性関与遺伝群を搭載した化学放射線療法感受性予測カスタムチップの作成とその予測効率を検証する臨床試験を立ち上げることにある。

B. 研究方法

食道癌に対して化学放射線療法を行う患者に対して説明を行い、参加に同意した患者より治療前に内視鏡下に癌部及び正常部の組織を採取する。それぞれの検体よりmRNAを採取し、DNAチップにより遺伝子解析を行い、化学放射線療法感受性予測可能なアルゴリズムを確立する。統計解析法に人工神経回路機械学習並びに新しい解析法を使用する。

（倫理面への配慮）

検体採取と解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針などに従って実行する。

C. 研究結果

本年度は研究計画書の作成ならびに、当施設倫理審査委員会に対して研究審査依頼を行った。また、院内各部署（内科、内視鏡部、外科）に対してヒアリングを行い、研究実施手順書の作成を行った。

H19. 3. 26開催予定の倫理委員会において承認予定である。平成18年度において本試験で対象となる病期2-3の40症例に化学放射線療法を行った。

D. 考察

臨床試験について施設内の体勢を整え、倫理委員会に申請中である。年間十数例の登録が期待される。

E. 結論

臨床試験に対する体勢が整った。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし