

トラスツマブ単独の奏効率が約 25%と予測される状況においては、十分な症例数が得られるまで解析を待つよりも、臨床効果の予測・評価因子が生物学的に同定された時点で、その統計的信頼性は前向き臨床試験にて評価すべきである。よって、対象症例は、期間内(2 年半年)にて当病院にて集積可能な全症例とする。目標症例数は、網羅的解析において、一定の統計的信頼性が得られると考えられる、奏効症例 10 例を得る事を目標とした。

図1 本研究の流れ（単独群/併用群）

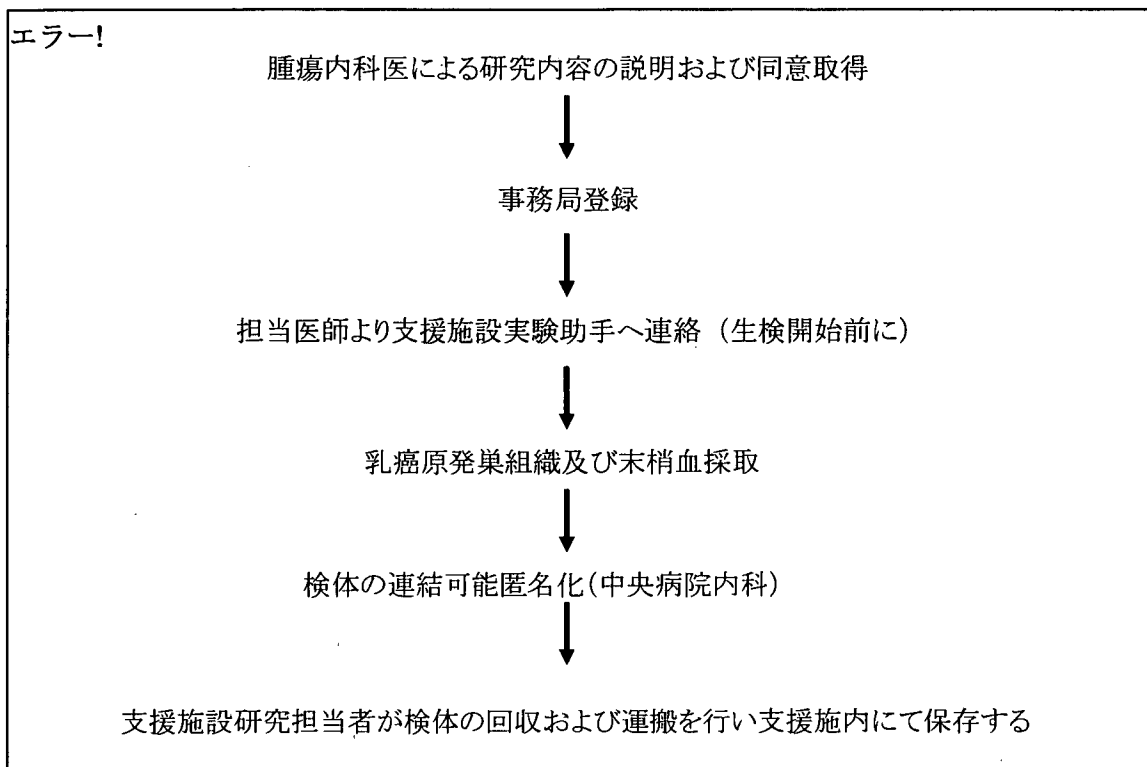
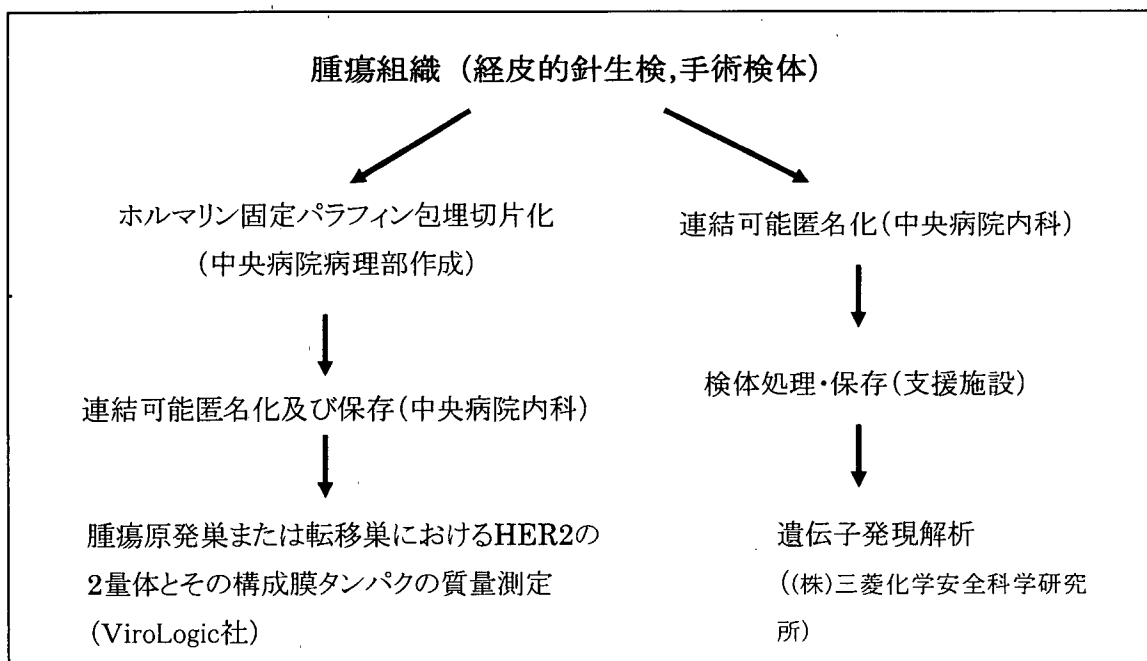


図2 腫瘍検体の流れ（単独群/併用群）



手術検体は、可能な場合のみ遺伝子発現解析に用いる

図3 末梢血検体の流れ (単独群/併用群)

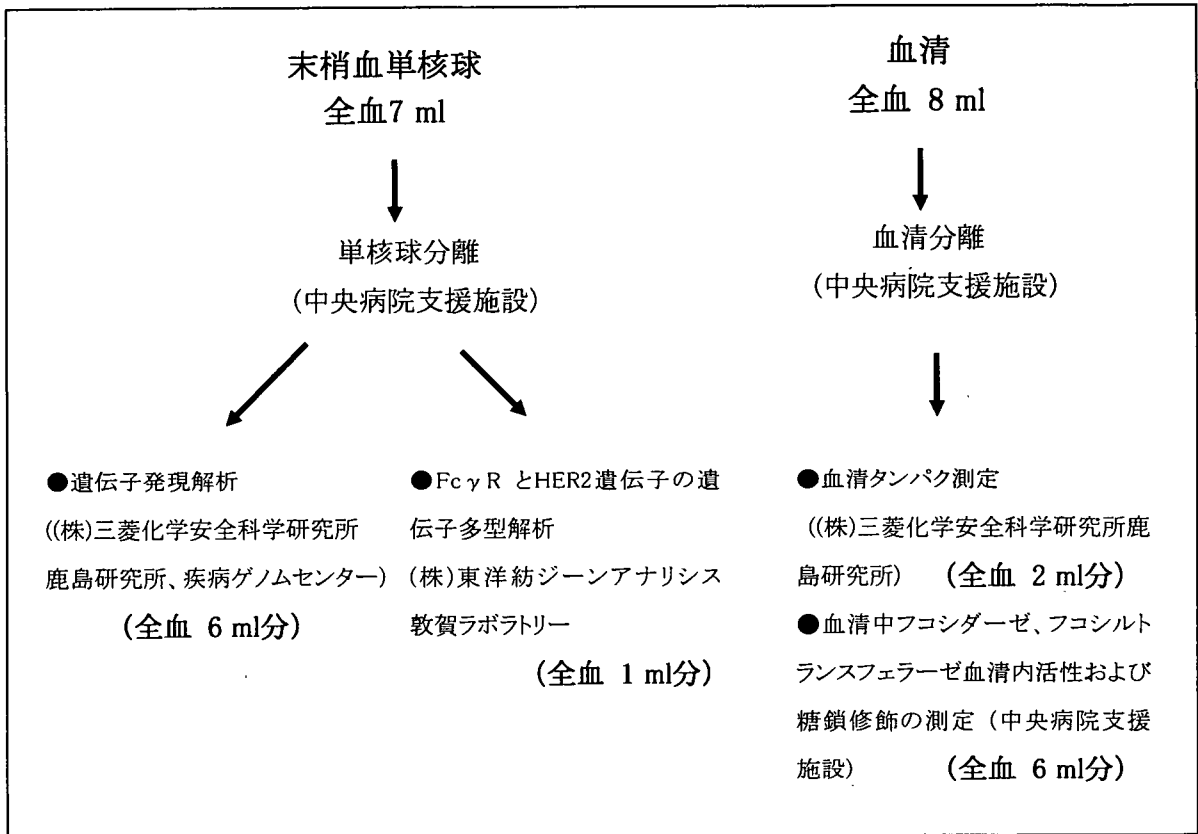
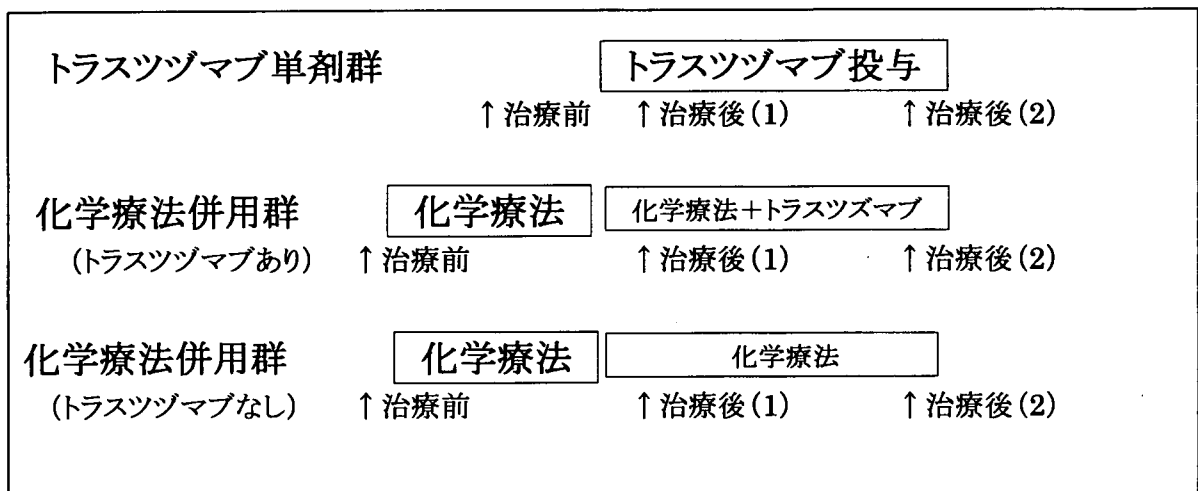


図4 採血ポイント (単独群/併用群)



治療前・・・全項目採血(トータル 15ml)

治療後・・・トラスツズマブ投与後採血、遺伝子発現解析と血清タンパク解析のみ

(トータル 7ml×2回: 治療後 1(1週間後)、治療後 2(8週間後)).

4-2 検体、個人情報の取り扱い

本研究の流れを図1に、検体の流れを図2、図3に示す。臨床サンプルは、登録された時点で、がんセンター中央病院内にて検体管理責任者(清水)により、連結可能匿名化される。臨床サンプルの処理・管理は研究責任者、国立ガンセンター中央病院支援施設内で行う。「国立がんセンター遺伝子解析研究取扱規定」により、個人情報管理者として中央病院副院長を置く。検体の測定および解析は基本的に国立がんセンター中央病院・疾病ゲノムセンターにて実施するが、一部の検体は、(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所および(株)東洋紡ジーンアナリシス 敦賀ラボラトリーにて測定を行う。症例・符号対照表は、国立がんセンター中央病院乳腺内科の検体管理責任者(清水)により厳重に保管するものとし、支援施設や、測定解析担当者に対して個人を特定するような臨床情報は一切伝えない。

4-2-1 腫瘍組織

進行・再発乳癌患者において生検を行った場合、腫瘍内科医は当研究内容を説明し同意が得られれば、生検組織の一部を本研究目的に保存する。術前化学療法併用療法を予定されている患者については、腫瘍内科医により当研究内容を説明後、同意を得られた患者について、治療前に本研究目的の **core needle biopsy(CNB)** 標本を2本採取する。治療開始後に生検もしくは当院にて手術治療を受ける患者については、可能な限り腫瘍組織を採取する。

採取された CNB 及び生検検体は、タンパク解析と遺伝子発現解析用に分離し、遺伝子発現解析用は直ちに ISOGEN(RNA 保存液)に浸透させ、可及的速やかに破砕処理を行った後、 -80°C にて、支援施設内にて保存する。保存チューブには、患者氏名などが特定できない様、提供者識別番号のみを記入する。

タンパク解析用検体は、病理部において、ホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を作成する。プロトコール同意前に診断のために採取された腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いることが可能であれば、それを用いる。プレパラートを病理部より借り受ける場合には、患者氏名などが特定できない様、提供者識別番号のみを記入する。

4-2-2 末梢血

腫瘍内科医により当研究内容を説明後、同意を得られた患者のうち、トラスツズマブ投与予定患者から治療前およびトラスツズマブ投与 1、8週間後に、血液それぞれ 15 ml、7m、7ml 採取する(図 4)。術前化学療法のトラスツズマブ非投与患者においては、トラスツズマブ投与患者と同じタイミングで治療前後の血液を採取する。

採取された検体は、測定項目に応じ、支援施設内にて、末梢血単核球もしくは血清に遠心分離し、 -80°C にて保存する。末梢血単核球の分離は **Lymphocyte Separation Medium (LSM, ICN Biochemical Inc.)** 処置を行い、ISOGEN (Nippon Gene)にて保存する。保存チューブには、患者氏名などが特定できない様、提供者識別番号のみを記入する。

4-3 検体等の保存および廃棄

研究期間中は研究実施担当者が研究実施機関である国立がんセンター中央病院支援施設内の冷凍庫内に保管する。提供者の同意が得られた場合には、更なる研究の貴重な資源として、研究期間終了後も同所に保管する。ただし、更なる研究の目的はトラスツマブの効果や有害事象に関連したバイオマーカーの研究に限定したものとする。提供者の希望により試料を廃棄する場合には、しかるべき破壊処理を施した後、廃棄する。

4-4 測定項目

a. 末梢血単核球における FcγR 遺伝子、HER2 遺伝子多型の解析

支援施設内にて、分離保存された末梢血単核球サンプルを、(株)東洋紡ジーンアナリシス 敦賀ラボラトリーに於いて、DNA を抽出し、解析を行う。FcγR 遺伝子、HER2 遺伝子ともに遺伝子多型が報告されている領域を含んだプライマー、ビオチン化プライマーを作成し、Allele Specific Primer-PCR (ASP-PCR) 増幅後、プローブに相補的な遺伝子多型を持つ PCR 産物のみをプローブにハイブリダイゼーションさせ、遺伝子多型を解析する。遺伝子多型とトラスツマブの治療効果、有害反応について相関性を統計学的手法により解析を行う。

b. フコシダーゼ、フコシルトランスフェラーゼの活性測定およびトラスツマブ糖鎖修飾の測定

患者血清サンプルより、フコシダーゼおよびフコシルトランスフェラーゼ活性を測定する。具体的には、血清をトラスツマブと混和し、PROSEP-A(Millipore)カラムにてトラスツマブを抽出する。トラスツマブの糖鎖修飾の変化は、PA-labeled oligosaccharide standards (TAKARA)を使用し、糖鎖をビリジリアミノ(PA)化し、HPLC にて糖鎖解析を行う。血清中の血清中フコシダーゼ、フコシルトランスフェラーゼの酵素活性は蛍光基質を用いて検出する。

c. 腫瘍部における HER2 の 2 量体の測定

ホルマリン固定パラフィン包埋切片 (8μm 切片、10 枚) を使用し、ViroLogic 社に於いて eTag に目的とする抗体を結合し、光刺激にて eTag を遊離させる。これら遊離 eTag をキャピラリー電気泳動装置にて、ピーク位置、高さおよび面積にて標的分子の定量を行う。これにより、HER2 の 2 量体形成量、またその構成タンパク(IGFR など)の定量を行い、トラスツマブの治療効果についての相関解析を行う。

d. 遺伝子発現解析

治療前、もしくはトラスツマブ投与後の腫瘍組織、末梢血単核球における遺伝子発現解析を行う。治療前の採血の一部(5ml)は、ex vivo にてトラスツマブ暴露(20 μg/mL 3 時間)を行う。疾病ゲノムセンター及び(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所に於

いて RNA を抽出後、RNA を増幅し、cDNA、cRNA を得る。cRNA を RI または蛍光標識し、これらをプローブとして、affimetrix 社などのマイクロアレイとのハイブリダイゼーションを行う。蛍光あるいは RI 強度を可視化し、各遺伝子の発現を数値化し、遺伝子発現プロファイルを解析する。治療前後に変動を示す遺伝子を捕らえる事により、トラスツマブの薬力学的効果を分子レベルで捕らえ、患者ごとに変動解析をおこなう。抗腫瘍縮小効果やトラスツマブ血中濃度と相関を示す遺伝子群を捉えることにより、トラスツマブの作用機序を遺伝子レベルで解析する。また、治療前の採取血液を、ex vivo にてトラスツマブを暴露することにより得られるプロファイリングで、治療後の遺伝子変動を治療前に捕らえる事ができるか検証し、腫瘍の遺伝子発現解析データと合わせて、治療効果予測モデルを創出する。

e. 血清タンパク測定

Bio-Plex (BIO-RAD) を使用し、(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所にて患者血清サンプルと各種抗体等と反応し、アビジン-ビオチン反応後に Bio-Plex サスペンションアレイシステムにより測定する。サイトカイン(インターロイキン、TNF など)やチロシンキナーゼ膜型タンパク(HER2、pHER2 など)等の血清タンパクの発現量とトラスツマブの腫瘍縮小効果、有害反応及び予後との関係を統計的に解析を行う。

4-5 臨床効果の判定

腫瘍縮小効果は①トラスツマブ単独投与群においては、原則としてトラスツマブ投与開始 8 週後に画像診断により判定し、PR 以上の場合は 12 週後に確認する。②化学療法併用療法(5FU/エピルビシン/シクロfosファミド投与後、パクリタキセル/トラスツマブ投与)群及び、同化学療法単独(5FU/エピルビシン/シクロfosファミド投与後、パクリタキセル投与)群においても上記と同様の評価を行うが、手術可能症例は病理学的評価も含める。化学療法併用療群においては、トラスツマブ投与群/非投与群の 2 群において、バイオマーカーによる腫瘍効果の差を検出できるか検討する。

5 予想される結果および危険

本研究の主たる目的はトラスツマブ療法に対する感受性予測に関わる遺伝子情報の検索である。トラスツマブによる効果を予測することができれば、将来 HER2 陽性乳癌において、より副作用の少ないレジメンの選択など、治療の個別化が実現されることが期待されると共に、効果が期待できない患者への無意味な治療を省くことが可能となる。また、本研究においては、実際の治療で用いられる事の多い化学療法との併用療法での検討も行うが、併用療法と単独療法との感受性に関わるマーカーの差異を検討した報告はなく、臨床的にも意義深い。

腫瘍検体の採取について、実地臨床においては術前化学療法施行例には原発巣に対する

CNBが必須である。研究目的のCNBを2本追加することにより少量の出血や痛みなどのリスクはあるが、その侵襲は健康に影響するものではない。再発時には初発時とホルモン受容体、HER2発現状況が変化することがあるので、実地臨床でも可能ならば生検を行ってホルモン受容体、HER2発現状況を検索するのが一般的であり、組織の採取は研究によって生じる不利益には該当しない。

本研究における遺伝子発現解析は、RNAを調べるため、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象ではない。しかしその趣旨を踏まえた上での対応を行い、検体の提供者およびその家族への不利益を最小限に留めるよう配慮する。一方、末梢血単核球におけるFcγR、HER2の遺伝子型の測定は正常組織から抽出したゲノム解析に当たる為、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に遵守されなければならない。今回の研究において得られる情報は治療効果などの関連性は必ずしも明らかでなく、また開示することで提供者又は第三者の生命、身体等の権利利益を害する恐れがあるために遺伝情報は開示しない。つまり、FcγRおよびHER2の遺伝子多型の有無、またこれによる治療効果との関連性の有無に関わらず、情報提供は行わない。検体提供者個人の識別につながる情報は、個人情報管理者により管理され、第三者に渡ることはない。「国立がんセンター遺伝子解析研究取扱規定」により、個人情報管理者として中央病院副院長を置く。

6 インフォームドコンセント

研究責任者または研究担当者は提供者に対し、本研究の意義、目的、方法、予想される結果、提供者が蒙る可能性のある不利益、資料の保存及び使用方法などについて、十分な説明を行い、文書による同意を取得する。

提供者は自らが与えた同意について、随時、不利益を受けることなく撤回することができる。研究責任者は提供者から同意の撤回があった場合には、当該提供者に関わる資料や結果を廃棄する。ただし、すでに結果が公表されている場合には、研究結果については廃棄しなくてもよい。

7 説明・同意文書

説明同意文書は本研究計画書に添付する。同意文書は原本を診療記録へ保管する。また、コピーを患者本人へ手渡す。

8 遺伝情報開示に関する考え方

本研究において得られる遺伝情報は提供者の状態を評価するための情報として精度や確実性に欠く可能性があり、提供者に還元する情報としては未成熟である。従って、提供者に解析結果は

開示しない。その為、遺伝子カウンセリングは行わない。提供者本人の同意がない場合には、提供者以外の人に対し情報は開示しない。

9 本研究の grant support について

本研究は平成17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:ファーマコゲノミクス分野、研究課題「乳癌患者における抗体療法の効果・副作用規定因子の探索」(H17-ファーマコ-006、研究代表者:藤原康弘)によりサポートされる。

10 研究結果の発表

研究の結果は研究責任者あるいは共同研究者がしかるべき英語論文発表及び学会発表の形で発表する。共著者は、投稿前に論文内容をレビューのうえ発表内容に合意した者に限る。

11 研究組織および研究者

研究責任者

国立がんセンター中央病院 内科 藤原康弘

研究事務局

国立がんセンター中央病院 内科 清水千佳子

共同研究者

国立がんセンター中央病院 支援施設 西尾和人

横手秀行

下山 達

武田真幸

国立がんセンター中央病院 病理部

関 邦彦

国立がんセンター中央病院 外科

木下貴之

四国がんセンター 外科

青儀健二郎

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所

関島 勝

(株)東洋紡ジーンアナリシス 敦賀ラボラトリー

井上浩明

曾根義博

国立がんセンター研究所 情報研究部

山本精一郎

柴田大朗

国立がんセンター研究所疾病ゲノムセンター

吉田輝彦

ViroLogic 社

Mike Dunn

Sharat Singh

研究協力者

国立がんセンター中央病院 内科

勝俣範之

安藤正志

河野 勤

松本光史

米盛 勸

14 参考文献

- 1 Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D et al. Multinational study of the efficacy of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-2648, 1999.
- 2 Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 719-726, 2002.
- 3 Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapy plus monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344: 783-792, 2001.
- 4 Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 19: 2587-2595, 2001.
- 5 Esteva FJ, Valero V, Booser D et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 1800-1808, 2002.
- 6 Burstein HJ, Kuter I, Campos SM et al. Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 19: 2722-2730, 2001.
- 7 Clynes RA, Towers TL, Presta LG et al. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nature Med* 6: 443-446, 2000.
- 8 Wu J, Edberg JC, Redecha PB et al. A novel polymorphism of Fc γ RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* 100: 1059-1070, 1997.
- 9 Koene HR, Kleijer M, Algra J et al. Fc γ RIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γ RIIIa, independently of the Fc γ RIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90:1109-1114, 1997.
- 10 Carton G, Dacheux L, Salles G et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism of IgG Fc receptor Fc γ RIIIa. *Blood* 99: 754-758, 2002.
- 11 Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E et al. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of Fc γ RIIIa functional polymorphism. *Clin Cancer Res* 10: 6248-6255, 2004.
- 12 Lu Y, Xi X, Zhao Y et al. Insulin-like growth factor-1 receptor signaling and resistance to trastuzumab (HERceptin). *J Natl Cancer Inst* 93: 1852-1857, 2001.
- 13 Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y et al. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. *Hum Pathol* 35:1537-1542, 2004.
- 14 Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y et al. Relation between insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) expression and the efficacy of trastuzumab monotherapy for hormone resistant HER2-positive metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: abstr 9578, 2004.
- 15 Harris LN, Witkiewicz A, Freidman P et al. *Breast Cancer Res Treat* 82 suppl 1: Abstr 316, 2003.
- 16 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129-2139, 2004.
- 17 Cancer Genome Project and Collaborative Group. Intragenic ErbB-2 kinase mutation in tumours. *Nature* 431: 525-526, 2004.
- 18 A case-control study of the HER2 Ile655Val polymorphism in relation to risk of

invasive breast cancer. *Breast Cancer Research* 7: 357-364, 2005

19. Milano GA, Lescaut W, Formento JL et al. HER2 genetic polymorphism and pharmacodynamics of trastuzumab-based treatment in breast cancer patients.

Abs#500: proc ASCO, 2005

「乳癌患者におけるトラスツツマブ療法の効果規定因子に関する研究」への参加のお願い

1. はじめに

私たちは、乳がんに対するよりよい治療法を開発していくため、「乳癌患者におけるトラスツツマブ療法の効果規定因子に関する研究」を計画いたしました。この説明書は、研究の目的や方法について患者さんのご理解をいただき、研究へ参加を検討していただくために作成したものです。お読みになってわからないことなどがありましたら、担当医または研究事務局に遠慮なくお尋ねください。

2. 研究の目的

ハーセプチンは、HER2 タンパクというがん細胞の表面にあるタンパク質に対する抗体であり、HER2 タンパクをたくさん発現している乳がん（これを過剰発現といいます）の治療薬として近年定着してきました。

しかしハーセプチンの効果は、かならずしも HER2 タンパクを過剰発現しているすべての方に得られるわけではありません。ハーセプチンは、基礎的な研究ではがん細胞の表面にある HER2 タンパクに結合し、免疫反応をおこしたり、がんの細胞増殖をうながす細胞内の情報伝達を遮断したりすることによって治療効果を発揮すると考えられていますが、どのような方に効果が出やすく、どのような方に効果がでにくいかということについてはまだ十分わかっていません。

今回の研究ではハーセプチンの働きを分子レベルで捉えることを目標としています。実際に、患者さんの免疫反応やがん細胞そのものを分子レベルで調べることによって、ハーセプチンに効く「がん」のタイプをより正確に予測できるようにしたいと思っています。これらの研究によって、ハーセプチンの効果や副作用に関わるメカニズムを見つけ出すことが出来れば、将来、患者さんがハーセプチンの治療を受ける前に、効果や副作用をより正確に予測できるようになると考えています。

3. 研究の方法

この研究ではこれからハーセプチン単独療法での治療を受ける患者さんと、ハーセプチンを含むまたは含まない術前化学療法を受ける患者さんを対象にしています。

ハーセプチン単独療法を受ける患者さんには、治療前に1回(15 ml)、治療後2回(1週間後と8週間後 各7ml)の採血をお願いします。治療前に治療方針を決定するための生検(組織を採取すること)を行った場合には、その生検の検体を研究目的に利用させていただきます。

術前化学療法を受ける患者さんについては、治療内容にハーセプチンを含む場合、抗がん剤治療前、ハーセプチン併用化学療法の投与1週後、8週後に、それぞれ15ml、7ml、7mlの採血をお願いします。ハーセプチンを含まない術前化学療法を受ける患者さんには、ハーセプチンを投与した患者さんと比較するため、ハーセプチンを投与される場合と同じタイミングで同じ量の採血をお願いします。また術前化学療法を行う方は、治療方針を決定するために太い針を用いて乳がん組織を採取します(針生検)が、その際に研究目的に2本余分に組織を採取することをお願いいたします。

ご提供いただいた血液からは、①ハーセプチンの免疫反応にかかわる血液中の酵素活性と、免疫に関わると考えられる蛋白の測定、②血液中単核球の遺伝子発現解析、④血液中単核球の抗体受容体部分の遺伝子解析、⑤血液中単核球のHER2遺伝子の遺伝子解析を行います。ご提供いただいた腫瘍組織からは、⑥乳がん細胞内の情報伝達経路に関連する蛋白の測定、これらの測定結果を実際のハーセプチンの治療効果と比較し、治療効果に関連する因子を検討します

4. 予測される不利益

ハーセプチン治療を受けられる患者さんに対しては3回の採血がありますが、通常診察の採血と同時に行うようにいたします。採血によって健康状態が影響されることはありません。また生検を行う場合には、出血や痛みがある可能性はありますが、出血が健康へ与える影響はほとんどありませんし、痛みに対しては局所麻酔をしてなるべく苦痛がないよう配慮いたします。

患者さん自身の個人情報、病院内担当医師以外には知らされません。実際血液や生検のサンプルの測定や解析を行う研究者には、患者さんのお名前や病歴番号を数字などの記号にして検体を渡すため、患者さん個人を特定することはできません。また、測定は外部の測定機関によって行われること

もありますが、患者さんのお名前や臨床経過などの個人的な情報が外部に漏れることのないよう厳重に配慮いたします。

今回の研究において一部、正常細胞の遺伝子情報（DNA）を調べさせていただきます。しかし、この情報は研究途上の段階であり、得られる情報は治療効果などの関連性は必ずしも明らかではありません。またこの情報を開示することで患者さんご自身の権利利益を損なう可能性も考えられますので、個々の患者さんに対して遺伝情報を開示することはありません。

5. 研究成果の発表について

研究の結果はしかるべき医学雑誌あるいは学会において公表いたします。研究成果を公表するにあたって、あなたのお名前や個人を特定できるような情報が使用されることはありません。またこの研究はまだ初期の検討段階であり、この研究の結果をもって治療方法が変更されるということはありません。

6. 研究にかかる費用

この研究の費用は、厚生労働省の科学研究費によってまかなわれます。ハーセプチンなどの薬剤を含め治療にかかる費用は、通常の保険診療でおこなわれます。

7. 臨床試験の科学的・倫理的妥当性について

臨床試験の科学的倫理的妥当性についてこの臨床試験の計画内容について、人権と安全性に最大限の配慮を行うため、国立がんセンター倫理審査委員会において科学的および倫理的な側面が審議され、承認を受けています。

8. 研究への参加について

この研究へ参加されるかどうかは患者さまご自身の自由な気持ちでお決めください。研究に参加されなくても、今後の治療の内容や対応には影響しませんのでご安心ください。またいちど研究への同意をいただいた場合にも、いつでも同意を取り消すことができますので、担当医にお申し出ください。但し、同意の取り消しの要求があった場合、すでに結果が公表されている場合には、研究結果については破棄できないことをご容赦ください。

なお、この研究に関してわからない言葉や疑問がありましたら、担当医師に遠慮なくご質問ください。

研究責任者

国立がんセンター中央病院

内科

藤原康弘

研究事務局

国立がんセンター中央病院

内科

清水千佳子

〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

電話番号 03-3542-2511 (代表)

同意文書

国立がんセンター中央病院長 殿

私は「乳癌患者におけるトラスツズマブ療法の効果規定因子に関する研究」について、

研究の背景と目的

研究の方法

予想される不利益

プライバシーの保護

研究にかかる費用

研究への参加と同意の自由

臨床試験の科学的・倫理的妥当性について

その他（ ）

上記の内容を担当医より十分に説明を受け、理解いたしましたので、

研究への参加に

同意します。

同意しません。

説明日 年 月 日 担当医署名 _____

同意日 年 月 日 本人署名 _____

乳癌患者における抗体療法の効果・副作用規定因子の探索

分担研究者 小泉 史明
国立がんセンター研究所 腫瘍ゲノム解析・情報研究部 室長

研究要旨

抗HER2抗体トラスツマブの効果、有害事象を規定する因子を探索する目的で、前向き臨床試験で得られる腫瘍組織、末梢血液を用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を施行した。術前化学療法群は目標症例数である40例が登録され、不適格症例5例を除いた35例（計137検体）のマイクロアレイ解析、および転移・再発乳癌症群では登録30例中、26例（78検体）のマイクロアレイ解析が終了し、現在解析結果と臨床情報の関連解析を施行している（他分担研究者担当）。臨床検体から抽出されたRNAは末梢血単核球に関しては概ね品質は良好であったが、乳癌組織検体においては28s/18s比が1.0未満のものが10検体存在した（29%）。

また、末梢血を用いてADCCを定量化する系を確立した。健常人3人の血液を用いた検討では、ADCC活性には再現性を持って、個人差が存在することが判明した。現在、末梢血単核球分画の各種サイトカイン、炎症細胞遊走因子の誘導能を検討している。

A. 研究目的

トラスツマブの抗腫瘍効果は、HER2シグナル抑制による直接効果とADCC効果の両者が存在することが知られている。化学療法施行前の乳がん生検組織検体、およびADCC効果を惹起するエフェクター細胞分画を含む末梢血単核球検体を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、トラスツマブの効果規定因子を探索する。また、現時点ではADCC活性を抗体療法選択のためのバイオマーカーとすることは、直接臨床応用が困難である。そこでADCC活性を定量化する系を確立すると同時に、末梢血単核球の各種サイトカイン、炎症細胞遊走因子分泌能との関連解析をおこない、サロゲートマーカーを探索する。

B. 研究方法

1. 乳がん生検検体、末梢血単核球を用いたマイクロアレイ解析

いずれもAffymetrix社の Human Genome U133 plus 2.0を用いて解析した。生検検体は採取後直ちにISOGEN中に浸し、約20分ほど室温で放置後に、Quia gen社のTissue Lyserを用いて5分間、20 (1/S)にて組織を破碎後-80度で保存した。末梢血単核球は、血液採

取後30～1時間ほど室温で穏やかに攪拌後、QP社のLS M®を用いて、末梢血分核球分画を分離後ISOGENに浸し、ピペッティングにより攪拌後、-80℃に保存した。既定の方法により抽出されたRNAはすべてAgilent 2100 バイオアナライザーを用いて質をチェックした。品質確認後、Two-Cycle cDNA Synthesisを用いて、RNAを増幅、標識し、マイクロアレイ解析に用いた。

2. ADCC測定系の確立

ADCC活性評価にはクロムリリース法が一般的であるが、放射性物資を用いる煩雑性とスループットが問題である。我々は、ADCC 評価結果がクロムリリース法と相関することがすでに報告されている、より簡便なMTT法、及び試験時間が短いCalcein リリース法を用いて、活性を評価した。また活性測定に複数の乳がん細胞株を用いて、臨床応用可能な適切な評価系の確立を試みた。

C. 研究結果

1. 乳がん生検検体、末梢血単核球を用いたマイクロアレイ解析

術前化学療法群では、目標症例数である40例が登録され、適格症例35例すべての検体の収集が終了し、乳

がん生検組織34検体（1検体はRNA品質不良のため、マイクロアレイ施行せず）、末梢血単核球検体103検体のマイクロアレイ解析が終了した。転移・再発乳癌症群では登録30例中、26例（78検体）のマイクロアレイ解析が終了した。マイクロアレイの結果は、付属のGCOSにより数値化し、統計解析に供与された。

RNA検体はすべて、Agilent 2100 バイオアナライザーにより品質をチェックした。末梢血単核球分画から抽出されたRNAは181検体すべてにおいて28s/18s比が1以上であり、170検体は1.5以上であった（94%）。一方、乳がん生検組織から抽出されたRNAは、34検体中10検体（29%）が28s/18s比が1.0未満であり、低い質のRNAが混在することが確認された。RNAの質が十分ではないものに関しては、統計解析の情報として供与した。

2. ADCC測定系の確立

3人の健常人ボランティアより採取した末梢血単核球（PBMC）を用いて、ADCCの個人差を検討した
<MTT法>

HER2が過剰発現している乳癌細胞株MCF-7およびBT474を用いて、E/T比（エフェクター細胞/腫瘍細胞比）10のPBMC存在下に0-5ug/mlのハーセプチンを投与し、72時間後のMTTアッセイを行った。3被験者間でADCCに差が認められ、さらにその個人差は日を変えて同被験者で行った再実験においても再現された。（図1. a) b)

<Calcein assay>

MCF-7を用いてCalcein-AM(BD bioscience)にて染色し、E/T比10のPBMC存在下に5ug/mlのハーセプチンを投与した。4時間培養後に上清中のCalcein遊離を蛍光測定した。MTT法と同様の個人差が認められた。（図2）

今回の検討で、方法、施行日の違いに関係なく、ADCC活性は同様の個人差を確認することができた。使用する細胞株は、MCF-7においてより顕著に活性の差を検出でき、またCalcein assayが、短時間で結果を得られることより、ADCC活性の評価系として、MCF-7細胞を用いたCalcein assayが適していると考えられた。

（補足）

全血中の白血球を熱処理IgGや抗体で刺激し、白血球

回収用のフィルタープレートから抽出したmRNAをリアルタイムPCRで定量する方法で、細胞障害に直接影響するTNFSF、細胞遊走因子のCCL、CXCL、interleukin、免疫応答の初期反応としてIL-2やIL-4などを測定する実験を開始した。ADCC活性とこれらのmRNA発現との関連を検討することで、新しいサロゲートマーカーを確立することを目指している。

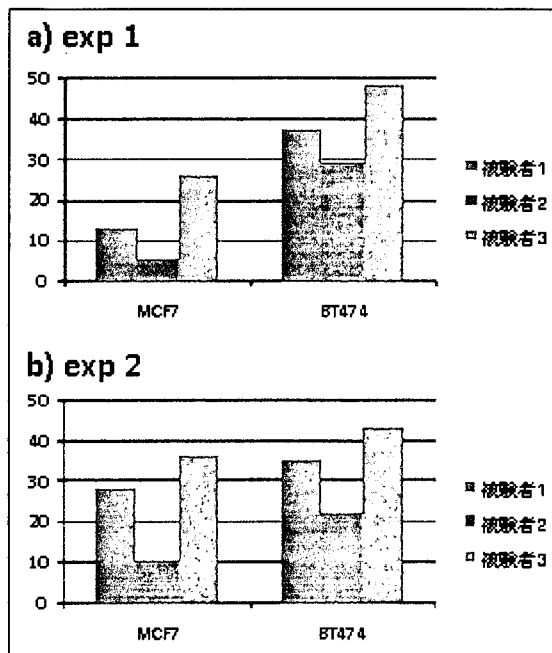


図 1

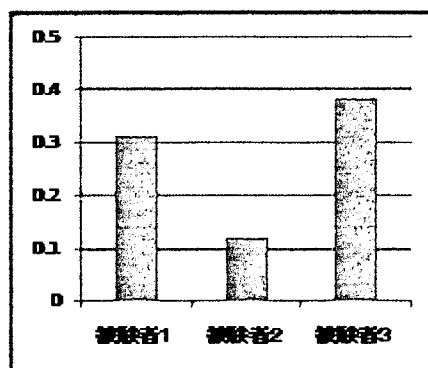


図 2

D. 考察

術前化学療法群は予定登録数である40例が登録され、不適格症例である5例を除く35例のマイクロアレイ解析が終了した。転移・再発乳がん群では、30例の登録が終了し、26例のマイクロアレイの解析が終了し、結果を統計解析の担当者に提供した。マイクロアレイに

用いたRNAの質は、末梢血単核球ではほぼ問題なかったが、生検腫瘍組織において劣化したRNAが混在する例があることが確認された。生検検体は採取後、直ちに用意されたISOGEN中に浸され、その後速やかに（概ね20分程度）ホモジェナイズされ-80℃に保管されるため、処理過程において30%程度の検体において、RNAの劣化が生じたとは考えにくい。腫瘍組織においてはある程度の壊死組織の混在があり、その影響を受けた可能性もある。病理組織学所見との関連を検討する必要があると考えられた。

これまでADCC活性の個人差については多くは検討されていない。ADCC活性に影響を与える因子として、FcR γ の遺伝子多型、抗体の糖鎖修飾などが報告されているが、これらの因子のみでは活性の個人差を十分に説明できないことが判明しつつある。我々の検討では、ADCCの個人差は、再現性を持って存在することが示唆された。ADCC活性の測定系を確立したが、今後は、臨床応用のためのさらなる簡素化のため、白血球分画を用いたreal-time PCRの系で、サロゲートマーカーを探索する予定である。

E. 結論

乳がん前向き臨床試験の中で集められた、乳がん生検組織、および末梢血単核球を用いたマイクロアレイ解析を施行した。ADCCの個人差を確認し、その評価系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima TE, Yasunaga M, Kano Y, Koizumi F, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, Matsumura Y. Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer*. 2008; 122(9): 2148-2153.
2. Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, Sone T, Araya T, Tamori S, Koizumi F, Nishio K, Miyamoto K, Fujimura M, Nakao S. Evaluation of epidermal

growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer*. 2007; 97(6): 778-784.

2. 学会発表

国際

1. Fukai J, Sakai K, Kimura H, Kuroda J, Fukui T, Kawaishi M, Kato T, Taguchi F, Yokote H, Itakura T, Koizumi F, Nishio K. Anti-tumor activity of cetuximab in malignant glioma cells overexpressing deletion mutant EGFR variant III. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA. Abstract 653
2. Kawaishi M, Yokote H, Fukai J, Fukui T, Kato T, Nishio K, Koizumi F. The regulation of STAT activity by ErbB family members. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA. Abstract 3772
3. Nakajima T, Matsumura Y, Koizumi F, Yasunaga M, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y. Synergistic antitumor activity of novel polymeric micelles incorporating SN-38 (NK012) in combination with 5-fluorouracil (5-FU) in mouse model of colon cancer. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting. 2007. April 14-18. Los Angeles, CA. Abstract 4729
4. Nakajima T, Matsumura Y, Yasunaga M, Koizumi F, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y. Synergistic antitumor activity of novel polymeric micelles incorporating SN-38 (NK012) combined with 5FU in colon cancer. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.
5. Yamamoto Y, Koizumi F, Ochiya T. MicroRNA involvement in liver development and hepatocarcinoma. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.

6. Kawaishi M, Yokote H, Fukai J, Fukui T, Kato T, Nishio K, Koizumi F. The regulation of STAT activity by ErbB family members. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.
7. Fukai J, Kodera Y, Fukui T, Kawaishi M, Kato T, Taguchi F, Yokote H, Nishio K, Koizumi F. Anti-tumor activity of cetuximab in malignant glioma cells overexpressing EGFR deletion mutant variant III. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.
8. Maegawa M, Yokote H, Matsumoto K, Tanaka K, Kaneda H, Fujita Y, De Velasco M, Arao T, Koizumi F, Ito F, Nishio K. A novel signaling pathway of deletional mutant EGFR. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.
9. Fukui T, Masuda N, Nishio K, Taguchi F, Kato T, Kawaishi M, Fukai J, Kodera Y, Yoshida T, Sakamoto H, Watanabe T, Koizumi F. Synergistic interactions between the synthetic retinoid TM411 (Tamibarotene) and Glucocorticoids in human myeloma cells. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007. Pacifico Yokohama, Yokohama.

国内

1. 河石真、横手秀行、福井朋也、加藤晃史、西尾和人、小泉史明. The regulation of STAT activity by ErbB family members in non-small cell lung cancer cell line. 第48回日本肺癌学会総会、2007年11月8-9日、名古屋市
2. 住友誠、小泉史明、黒田健司、浅野貴子、伊藤敬一、佐藤全伯、松村保広、垣添忠生、早川正道. 新規DDS抗癌剤SN-38内包ミセル-NK012の腫瘍血管増生腎細胞癌モデルにおける抗腫瘍効果. 第95回日本泌尿器科学会総会、2007年4月14-17日、神戸市

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし