

200807009A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 嶋田 裕

平成21 (2009) 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  
(資料) ヒートマップ図

### 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
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
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
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
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
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
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

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

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）

（研究代表者） 所属 嶋田 裕 富山大学消化器・腫瘍・総合外科 准教授

### 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（26施設）を行った。平成20年度はJCOG9907の結果から化学放射線療法の治療成績が術前化学療法後の食道切除に劣ることが判明し、登録対象患者が激減したが、4例の登録が得られ、2009年3月までの登録数は17例となった。これらの症例については既に25Kchipで遺伝子解析を行った。適応患者の拡大の為に、施設数の拡大を行い、元来化学放射線療法の適応であるT4M1を追加対象として症例登録を促し4例のサンプル採取がなされ解析可能症例は21例である。今後1年間の登録期間延長とT4M1を含むことにより解析可能症例を集積したい。

### 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	第一領域外來部
篠田雅幸	愛知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、食道癌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23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。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stage2,3 (nonT4)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。⑤症例集積が不十分であり研究協力施設の拡大と対象患者の拡大(T4 and/or M1)を行う。⑥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、検体取り扱いの説明会を開催する。⑦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当初は9Kチップでの解析であったが、その後開発された25Kチップにてマイクロアレイ解析を行う。⑥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、新たに登録可能な少数症例数に応じた予測システムにても解析する。

## <倫理面への配慮>

①研究者代表者の施設で継続研究に向けて2009年3月に研究期間の継続、さらには遺伝子解析の対象症例にT4 and/or M1を含めることの承認を得た。今後各施設において順次承認を受ける。

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26施設で承認されている。

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、遺伝子解析担当施設に送付し、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Web登録による各種臨床試験の管理を行い、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情報はマスクされた状態で解析される。

## C. 研究結果

2008年3月まで13例が登録されたが、JCOG9907の結果から化学放射線療法の治療成績が術前化学療法後の食道切除に劣ることが判明し、登録対象患者が激減した。このため平成20年度は4例の登録で、2009年3月時点での全登録数は17例にとどまった。これらの症例については既に25Kchipで遺伝子解析を行った(図1)。適応患者の拡大の為に、施設数の拡大を行い、さらには元来化学放射線療法の適応であるT4 and/or M1(Lymph)を追加対象として症例登録を促し4例のサンプル採取がなされ現時点での解析可能症例は21例である。

共同研究施設にアンケート調査を行い、stage2,3(nonT4)とT4/M1(lymph)の登録可能症例数を集積し、今後の方針を検討した。その結果、stage2,3(nonT4)についてはこれまでの症例を無駄にしないためにも1年の登録期間の延長を行うが、そこで登録を打ち切り解析すること。T4/M1については別個に集積すること。Stage2,3とT4/M1の中で感受性予測として解析可能な症例があれば、取りまとめて解析することとなった。

技術的な問題として、9Kチップからその後開発された25Kとなり、ゆがみなどの問題が生じたが、ハイブリチエンパ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。

統計解析手法では、当初予定された登録症例数を大幅に下回ることから50例以下の症例でも、解析可能となるようにアルゴリズムの開発を行う。

## D. 考察

平成20年度は4例の登録に留まり全登録数は17例に留まった。少しでも多くの症例集積を目指すために、参加施設の増加を検討するとともに、対象患者の拡大を図り遺伝子解析可能症例は21例となったが、未だ解析に十分な症例数ではない。25Kチップでの解析は行えていることから、今後1年間の登録期間延長とT4M1への対象拡大により解析可能症例を集積したい。

## 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を開始し、現在まで17例の登録と21例の遺伝子解析可能症例が得られた。今後の研究継続にて解析可能となるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

本研究において、現在までの治療症例では特に重篤な副作用等は発生していない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Shimada Y, Tsujimoto G et al. cDNA microarray analysis of esophageal cancer: Discoveries and prospects.

Gene Thorac CardioVasc Surgery.

In press 2009

2) Iriyama T, Shimada Y et al. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. EMBO Journal. Advance online publication 12 February 2009

3) Ito T, Shimada Y et al. PTTG1 increases cell motility and promotes lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma.

Cancer Res, 68: 3214-3224, 2008

4) Ortiz C, Shimada Y et al.

Gankyrin oncoprotein overexpression as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its clinical significance.

Int J Cancer, 122: 325-332, 2008

##### 2. 学会発表

1) 嶋田 裕、篠田雅幸、加藤健、辻本豪三、ほか

食道癌生検標本の網羅的遺伝子発現解析によるリンパ節転移診断の試み

第62回日本食道学会 東京 2008.6.21

2) 嶋田 裕、篠田雅幸、加藤健、辻本豪三、ほか

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感受性予測研究とその問題点

第63回日本消化器外科学会総会、札幌、2008.7.17

3) 嶋田裕、篠田雅幸、加藤健、辻本豪三、福島雅典、他

食道癌生検材料を用いたリンパ節転移と化学放射線療法感受性予測の試み

第67回日本癌学会総会、名古屋、2008.10.30

4) 嶋田 裕、篠田雅幸、加藤健、平岡真寛、千葉勉、辻本豪三、松井茂之、福島雅典 ほか

stageII・III食道癌に対する治療選択のための化学放射線療法感受性予測の臨床試験(中間経過)

第46回日本癌治療学会総会、名古屋、2008、11、1

5) Shimada Y, Shinoda M, Kato K, Tsujimoto G,

Predicting lymph node metastasis by DNA microarray analysis of preoperative endoscopic biopsy specimens from esophageal cancer patients.

UICC World Cancer Congress Geneva, 2008.8.30

6) 嶋田裕、ほか 本学における食道癌に対する集学的治療のレトロスペクティブな検証

第70回日本臨床外科学会総会、東京、2008.11.27

#### 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

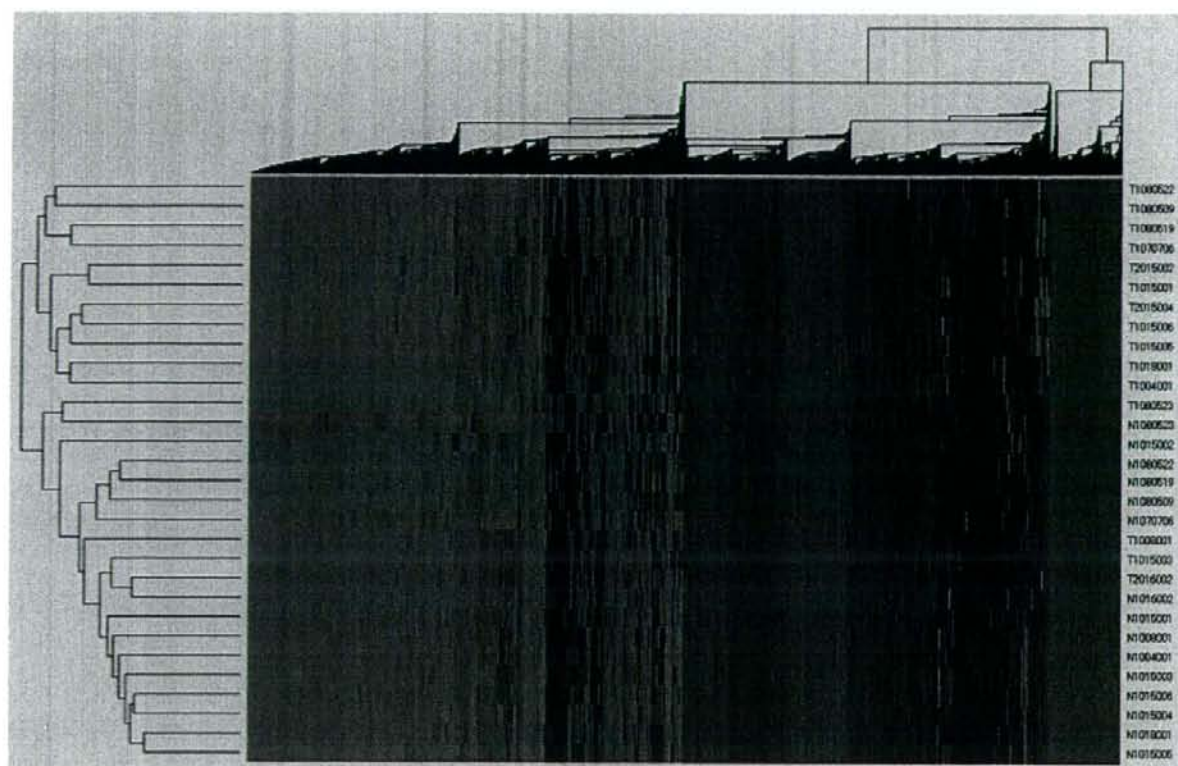
3. その他

なし



資料

ヒートマップ図



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基盤的研究（H18-ファーマコー—般-003）

（研究分担者） 所属 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 教授

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、化学放射線療法に關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 富山大学医学部第二外科 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平成 20 年度も引き続き分担することとした。

B. 研究方法：

施設登録および症例登録、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) 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 登録システムにより症例登録を行うこととし、臨床研究を行うにあたり必要な事項が整理できるようにした。本年度は、一昨年度 TRI にて整備した Web 登録システムを維持・運営し、症例登録を引き続き行うこととした。

また、2009 年 3 月に研究全体について主任研究者と打ち合わせを行い、今後の研究の進め方について検討が行われた。標準治療である手術療法を選択する患者が増加し、本試験の対象とする化学放射線療法を選択する患者が減少するなか、本試験についても症例登録が減少しているという現状への対策が検討された。ただし、食道癌を対象とした遺伝子解析の研究で、十数例でもその結果を論文として発表することができ、研究としても一定の意義があることが確認されたため、最大限症例登録を実施し必用な項



目を解析することとした。

#### B) 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 (Web 症例報告書) に入力することとしているが、このシステムを継続して運用した。

#### C) 検体の移送・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ため、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により検体収集業務を効率的に運営した。

(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) により照合することとし、本年度もこれを継続した。

#### 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し、本年度もこれを継続した。

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こととし、本年度もこれを継続した。

#### C. 研究結果：

平成 19 年 1 月 22 日に運用を開始した Web 登録システム、平成 19 年 8 月 1 日に運用を開始した Web 症例報告書を本年度も継続して運用した。平成 21 年 3 月 27 日現在、24 施設の施設登録が行われ、17 例の症例登録が行われた。

#### D. 考察：

本年度は、一昨年度に作成した研究計画書・Web 登録システムを用いて質の高い臨床研究を継続的に実施し、24 施設 17 例の登録が行われた。

また、昨年度に作成した Web 症例報告書を用いて、症例データの投入を進めた。

さらに、検体の搬送・管理を効率的に行うシステムも維持した。

上記のことから、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本年度も構築・維持でき、症例データの管理を行なうデータマネジメント、検体の移送・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たと考えられる。

#### E. 結論：

本年度までに、Web 登録システムにより 24 施設 17 例の登録が行われ、計画当初の目標症例数よりは少ないものの研究として一定の意義があることが確認された。Web 症例報告書に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、質の高いデータによる精密な最終解析の準備ができたと考えられる。

#### F. 研究発表：

##### 1. 論文発表：

該当せず

##### 2. 学会発表：

該当せず

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当せず

##### 2. 実用新案登録

該当せず

##### 3. その他

該当せず



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基盤的研究（H18-ファーマコー一般-003）

（研究分担者）所属 松井茂之 情報・システム研究機構 統計数理研究所 准教授

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統計解析責任者として、前年度に引き続き、マイクロアレイ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。遺伝子発現データを用いた臨床アウトカム（生存期間など）の予測法、臨床アウトカムと関連の強い遺伝子を検出するための必要症例数設計法を新たに開発した。前年度までの研究成果も含めて、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本臨床研究の計画と解析に必要な統計的手法の検討と整備がなされた。

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を関連づけ、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。本年度の具体的なテーマは、遺伝子発現データを用いた臨床アウトカム（生存期間など）の予測法、臨床アウトカムと関連の強い遺伝子を検出するための必要症例数設計法の検討である。これらの検討は、プロトコルで計画されている研究途中での中間評価における必要症例数の再設計、並びに、最終解析に適用される予定である。

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の分野の論文（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を開発する。

C. 研究成果

マイクロアレイ研究で数千の遺伝子と臨床アウト

カムを関連づける際、多くの遺伝子が関連ありとして報告されることが多々ある。このとき、遺伝子間の相関を考慮して、予測に特に役立つ遺伝子サブセットを抽出する方法を開発した。実際の臨床データにこの方法を適用した結果、従来の予測法よりも優れた予測能を示した。また、多くの関連遺伝子から、特に関連の強い遺伝子を選んで、遺伝子機能解析や再現性評価などのバリデーションを行う際の必要症例数の設計法を新たに開発した。以上の研究成果は、医療統計学、生物統計学分野で最も権威のあるジャーナルに掲載された。

D. 考察

従来のデータ解析では、一つ一つの遺伝子について臨床アウトカムとの関連を検定し、統計的有意性の最も高い（例えば、P値が最も小さい）上位数個の遺伝子を用いて、臨床アウトカムの予測が試みられるケースが多い。しかし、遺伝子パスウェイにおける遺伝子間の相関により、この方法が必ずしも最良とは限らないことが示された。開発した方法は、遺伝子間の相関を考慮して予測に特に役立つ遺伝子サブセットを同定するものであるが、先行研究や生物学的機序に関する知見などの外部情報を取り入れることも容易に行える。従って、開発した方法は、統計的に予測能に優

れることが期待されるだけでなく、生物学的にも意味のある予測システムの作製に役立つものであり、食道癌に対する本臨床研究においても有効な方法であると考えられる。

一方、マイクロアレーを用いた本臨床研究によって同定された関連遺伝子の一部は、遺伝子機能解析や再現性評価を含めたバリデーションなど、より詳細な検討の対象となることが予想される。開発した症例数設計法は、研究資源の制限により対象遺伝子数に上限があることも考慮しており、そのような後続研究の計画に特に有用であると考えられる。

#### E. 結論

前年度までの研究成果も含めて、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本臨床研究の計画と解析に必要な統計的手法の検討と整備がなされた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 論文発表

Matsui S, Yamanaka T, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Crowley J. Clustering of significant genes in prognostic studies with microarrays: application to a clinical study for multiple myeloma. *Statistics in Medicine* 2008; 27(7):1106-1120.

Matsui S, Zeng S, Yamanaka T, Shaughnessy J. Sample size calculations based on ranking and selection in microarray experiments. *Biometrics* 2008; 64(1): 217-226.

#### 学会発表

松井茂之. がんの分子診断研究：FDR は有用か？ 2008 年度日本計量生物学会年会特別セッション「多重検定の新展開：false discovery rate (FDR) とその周辺」. 2008 年 6 月 5 日. 筑波大学. 2008 年度日本計量生物学会年会講演予稿集 77-82.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



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基盤的研究（H18-ファーマコー一般-003）

（研究分担者） 所属 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、高精度な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たゲノム機能解析に基づくゲノム臨床研究のモデルを提示する。

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ろうとしている。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提示する。

B. 研究方法

本年度は、再現性の高くないcDNA法に変わる標本のラベリング方法を探索した。このプロジェクトに参加している施設から集められた、15症例30標本（1症例2標本：非癌部と癌部）について、改良された標本ラベリング法を用いてハイブリシ、各標本の遺伝子発現プロファイルを取得した。また、臨床情報と関連させる前段階として、Unsupervised法のクラスタリング解析を用いて、各施設間に標本の遺伝子発現データにバイアスがかかっているかをチェックした。

（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

RNA標本のラベリング法として、cDNA法とaRNA法を比較し、その再現性を比較したところ、aRNA法の方が再現性が高い事が示され、このaRNA法を標準のラベリング法とした。このプロジェクトに参加している施設から集められた、15症例30標本（1症例2標本：非癌部と癌部）について、改良された標本ラベリング法を用いてハイブリシ、各標本の遺伝子発現プロファイルを取得した。データをQuantile Normalization法を用いてノーマライズを施行した。放射線化学療法の効果判定の結果と関連させる事は時期尚早であると判断し、その前段階としてHierarchical Clustering法を用いた解析を行った。遺伝子プロファイルによると、①非癌部と癌部標本は、別れてクラスタリングされる。②適格基準適合症例と適合外症例とは、比較的別れてクラスタリングされる。③臨床施設やハイブリ施行日に明らかなバイアスを認めなかった。

D. 考察

癌・非癌部標本からのデータが別々にクラスタリングされる事や、臨床施設やハイブリ施行日等による明らかなバイアスが認められなかった事により、臨床施設での標本採集から搬送、実験施行、解析に至るまでのプロジェクト体勢に技術的な問題がない事が示された。この事は、解析に十分な症例数の蓄積が進み、放射線化学療法の効果判定の結果と関連させることになれば、放射線化学療法感受性に関連した遺伝子の発見と高精度の予測アルゴリズムの構築が可能になると期待され



る。

## E. 結論

本年度の15症例30標本からの遺伝子発現解析により、臨床施設での標本採集から搬送、実験施行、解析に至るまでのプロジェクト体勢に技術的な問題がない事が示された。

## G. 研究発表

### 論文発表

(英文)

1. Takahara Y, Kobayashi T, Takemoto K, Adachi T, Osaki K, Kawahara K, Tsujimoto G. Pharmacogenomics of cardiovascular pharmacology: development of an informatics system for analysis of DNA microarray data with a focus on lipid metabolism. *J Pharmacol Sci.* 107:1-7,2008

2. Kawanishi H, Matsui Y, Ito M, Watanabe J, Takahashi T, Nishizawa K, Nishiyama H, Kamoto T, Mikami Y, Tanaka Y, Jung G, Akiyama H, Nobumasa H, Guilford P, Reeve A, Okuno Y, Tsujimoto G, Nakamura E, Ogawa O. Secreted CXCL1 is a potential mediator and marker of the tumor invasion of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 14:2579-87, 2008.

3. Ruike Y, Ichimura A, Tsuchiya S, Shimizu K, Kunimoto R, Okuno Y, Tsujimoto G. Global correlation analysis for micro-RNA and mRNA expression profiles in human cell lines. *J Hum Genet.* 53:515-23,2008

4. Awakura Y, Nakamura E, Takahashi T, Kotani H, Mikami Y, Kadowaki T, Myoumoto A, Akiyama H, Ito N, Kamoto T, Manabe T, Nobumasa H, Tsujimoto G, Ogawa O. Microarray-based identification of CUB-domain containing protein 1 as a potential prognostic marker in conventional renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 134:1363-9, 2008

5. Tsuchiya S., Okuno Y. and Tsujimoto G. (2008) MicroRNAs and discovery of new targets. In Innocenti, F. (ed.), *Genomics and Pharmacogenomics in Anticancer Drug Development and Clinical Response.* p47-56, Humana Press, Totowa, NJ.

(邦文)

1) 辻本豪三. IT創薬が鍵となるゲノム創薬戦略  
テクノカレント No.458 2008. 世界経済情報サー

ビス

2) 辻本豪三. IT創薬

ファルマシア Vol.44 No.6:520-522 2008. 日本薬学会

3) 土屋創健、清水一治、辻本豪三. DNA チップ/マイクロアレイ臨床応用の実際

遺伝子医学 MOOK 10: 182-186 2008. メディカルドゥ

4) 佐藤史顕、清水一治、辻本豪三. トランスクリプトーム解析に基づくがん科学治療法の最適化とゲノム創薬。

医薬ジャーナル Vol.44 No.12:104-108, 2008. 医薬ジャーナル社

### 学会発表

(海外)

1) Tsujimoto G, Okuno Y, Terasawa K, Tsuchiya S. Comprehensive analysis of microRNA target networks. The Uehara Memorial Foundation Symposium-2008, Hyatt Regency Tokyo Japan, June 30-July 2,2008.

2) Tsujimoto G. FREE FATTY ACID RECEPTOR GPR120: FUNCTION AND PHARMACOLOGY. Mexico-Japan Workshop 2, February 25, 2009

(国内)

1) 辻本豪三 (オーガナイザーおよびシンポジスト) : 「ゲノム創薬研究: ケモゲノミクス研究への展開」、第118回日本薬理学会関東支部会・第10回応用薬理シンポジウム、星薬科大学、6月7日、2008

2) 辻本豪三 (教育講演) 「テーラーメイド医療の展望」第25回TDM学会学術大会、タワーホール船堀、6月21日、2008

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

（研究分担者） 所属 平岡 真寛 京都大学医学部附属病院放射線治療科 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、臨床試験に登録を行っている。

C. 研究結果

本年度は当院より1例登録した。

D. 考察

病期II・III（T4を除く）の胸部食道癌では標準治療である術前化学療法＋手術療法を選択される場合が多いが、食道温存を希望される症例では全例にインフォームド・コンセントを行っている。

E. 結論

当施設より本年度は1例を登録した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishimura Y, et al. A randomized phase II study of cisplatin/5-FU concurrent hemoradiotherapy for esophageal cancer: Short-term infusion versus protracted infusion chemotherapy (KROSG0101/JROSG021). *Radiother Oncol.* 2009 Jan 21.

Kenjo M. et al. Radiation therapy for Esophageal cancer in Japan: Results of the Patterns of Care Study 1999-2001. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, in press

2. 学会発表

第62回日本食道学会学術集会 平成20年6月21-22日 当院における食道癌の放射線治療成績

第21回日本放射線腫瘍学会 平成20年10月16-18日 食道癌に対する根治的放射線治療の治療成績の検討

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

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

（研究分担者） 所属 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

2007 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。

C. 倫理的配慮

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。

D. 研究結果

当施設では狭帯域光内視鏡（Narrow-BAND Imaging）を積極的に使用し、表在食道癌の早期発見に力を入れている。H20年度は食道表在病変37例に対して内視鏡的切除（うち粘膜下層剥離術17例）、APCによる焼灼術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/sm1を6例認め、このうち3例は化学放射線療法を行い、3例は追加治療を行わず経過観察中である。sm2以深癌を5例に認めた。このうち2例は化学放射線療法を行い、3例はさまざまな理由により追加治療ができず経過観察中である。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、1例を登録した。

## 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。臨床試験(JCOG9907)の結果、stage II・III期食道癌に対しては術前化学療法→手術が標準的治療にはなったがstage III期に対する術前化学療法のメリットは大きくなく、今後、感受性試験を加味した化学放射線療法は特にstage III期食道癌の治療の主流になる可能性を秘めている。進行中の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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Narrow-band imaging of the gastrointestinal tract.

Muto M, Horimatsu T, Ezoe Y, Hori K, Yukawa Y, Morita S, Miyamoto S, Chiba T.

J Gastroenterol. 2009;44(1):13-25.

### 2. 学会発表

当院におけるstage II/III胸部食道扁平上皮癌に対する術前化学療法の検討。

京都大学消化器内科： 天沼裕介、江副康正、堀松高博、森田周子、宮本心一、武藤学、千葉勉

京都大学消化器外科： 田中英治、伊丹淳、渡部剛、坂井義治

2009. 3. 20 第7回 日本臨床腫瘍学会学術集会

## G. 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

### 2. その他

なし

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に関する研究

（研究分担者） 所属 加藤 健 国立がんセンター 第一領域外来部 胃科医師

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子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

平成19年4月に当施設において研究計画承認となった。現在6例の症例登録を行っている。全体の約80%に当たる症例であり、本研究の遂行に貢献している。

D. 考察

食道癌の治療は、大きく分けて、手術療法と、非手術療法に分けられる。手術療法のほうが、治療成績は若干よいが、非手術療法には、食道を温存できるメリットがある。非手術療法の標準治療である化

学放射線療法にて治癒が期待できる割合は35%程度であり、残りの方々にはなんらかの救済治療が必要である。化学放射線療法後に手術を行い、治癒に至る例もあるが、化学放射線療法後の手術は在院死割合が10%と高い。本研究により、化学放射線療法の効果がある患者を予測できれば、食道を温存したまま治癒できる患者の割合が増えることが予測できる。また、化学放射線療法の効果が期待できない患者を予測できれば、最初から手術療法を考慮することで、全体的に食道癌に対する治療の最適化、治療成績の向上を期待することができる。

E. 結論

臨床病期II、III期食道癌患者を対象とした、化学放射線療法の感受性を検証する多施設共同研究プロトコルが完成し、当施設でも倫理審査委員会の承認が得られ、現在までに6症例が登録されている。JCOG9907の結果により、術前化学療法+手術が同患者に対して高い治療成績を示したため、化学放射線療法を希望する患者は減っているが、非手術療法としての化学放射線療法の地位はゆるぎないものと考えられるため、症例を集積してこの試験を完遂することが重要である。

F. 健康危険情報

安全に遂行されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takashima A, Kato K, et al.

Chemosensitivity of patients with recurrent esophageal cancer receiving perioperative chemotherapy.

- 2) Nakajima TE, Kato K, et al. :  
A phase I trial of 5-fluorouracil with  
cisplatin and concurrent standard-dose  
radiotherapy in Japanese patients with stage  
II/III esophageal cancer.  
Jpn J Clin Oncol. 2009 Jan;39(1):37-42.

2. 学会発表

- 1) 加藤 健 他 食道原発低分化神経内分泌癌 28  
症例の検討  
第62回日本食道学会2008年 連続パネルディス  
カッション「超難治癌の克服」
- 2) 加藤 健 他「食道癌のトピックスー基礎から臨  
床までー」 食道癌における化学放射線療法の最  
近  
第67回 日本癌学会総会学術集会 腫瘍別シン  
ポジウム1
- 3) Kotani N., Kato K. et al.,  
Poorly Differentiated Neuroendocrine  
Carcinoma of the Esophagus. : An Analysis of 32  
Cases.  
ASCO-GI 2009

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



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-ファーマー般-003)

(研究分担者) 所属 篠田雅幸 愛知県がんセンター中央病院 病院長

研究要旨

食道癌治療における化学放射線療法は非手術療法のオプションの一つである。しかし、効果を治療前に予測する方法はなく、無効の場合はその後極めて困難な治療を強いられることとなる。そのため、効果予測の基づいた治療の個別化を目指して、マイクロアレー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

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 チップを用いた治療前生検標本の発現遺伝子プロファイルを解析する。治療効果を予測する可能性のある遺伝子群を同定し、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。

B. 研究方法

本研究の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 あるいは CDDP/5FU:75(2)/1000(2):d1/d1-4 と外照射 50.4Gy の化学放射線療法を計画した症例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 RNA-later 液に浸透保存するかマイナス 80℃で保管し、京都大学薬学研究科に移送、マイクロアレー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スクリーニングする。

C. 倫理的配慮

検体には検体番号を付すものの、個人が特定できるような情報は削除し、「匿名化番号対照表」にて一元化管理することにより、個人情報秘匿する。本研究は当院の倫理審査委員会 (IRB) の承認を得たうえで開始している。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。

D. 研究結果

過去 1 年間で、本研究へ 1 例も登録出来なかった。これは、3-4 年以前は化学放射線療法を希望する患者が多かったが、最近再び外科治療が治療オプションの中心となってきているためと思われる。適格症例があれば今後積極的に登録を行う予定である。

E. 考察と結論

化学放射線療法感受性予測アルゴリズムの完成は、食道癌治療の個別化戦略の拡大に寄与する。本研究の重要性を考慮し、早急に結論を出したい。

F. 健康危険情報

損傷, 手術, 62 : 917-923, 2008.

なし

F. 研究発表

波戸岡俊三, 篠田雅幸.

特集 食道(癌)手術における術中トラブル対処法 肺

G. 知的財産の出願・登録状況

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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表