

# Appendix VII

## Appendix VII

### GOG-0218 における研究の手順

章	目次	ページ
I.	GOG-0218 における研究室試験の早見表	-
II.	GOG-0218 における免疫組織化学的分析	-
III.	GOG-0218 におけるゲノム解析	-
IV.	GOG-0218 における酵素免疫測定法	-
V.	GOG-0218 におけるハプロタイプ解析	-

#### I. GOG-0218 における研究室試験の早見表

分析	検体	成果	試験研究室
免疫組織化学的分析 (IHC)	ホルマリン固定パラフィン包埋保存腫瘍組織 (FT01)	CD-31 と 血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現	Dr. Robert Burger <sup>1</sup>
ゲノム解析	ホルマリン固定パラフィン包埋保存腫瘍組織 (FT01) と凍結腫瘍 (RT01)	選択遺伝子の RNA 発現	Dr. Michael Birrer <sup>2</sup>
酵素免疫測定法 (ELISA)	治療前の血清 (SB01) と血漿 (PB01)	VEGF の循環レベル	Dr. Robert Burger <sup>1</sup>
ハプロタイプ解析	DNA	WNK1、GRK4 および KLKB1 遺伝子の遺伝子型判定	Dr. Douglas Levine <sup>3</sup> と Narciso Olvera <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dr. Robert A. Burger, M.D. の連絡先  
Associate Director for Research, Section of Gynecol, Oncol.  
Department of Surgical Oncology  
Co-Director, Ovarian Cancer Research Program  
Fox Chase Cancer Center  
333 Cottman Avenue  
Philadelphia, PA 19111  
Phone: 215-728-3150  
E-mail: [robert.burger@fccc.edu](mailto:robert.burger@fccc.edu)

<sup>2</sup> Dr. Michael Birrer, M.D., Ph.D. の連絡先  
Professor of Medicine  
Harvard Medical School  
Director of Gynecologic Medical Oncology  
Massachusetts General Hospital  
Yawkey 9072  
55 Fruit Street  
Boston MA 02114  
Phone: (617) 726-8624  
E-mail: [mbirrer@partners.org](mailto:mbirrer@partners.org)

<sup>3</sup>Douglas A Levine, M.D. の連絡先  
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center  
1275 York Avenue  
New York, NY 10065  
Phone: 212-639-7335  
FAX: 212-717-3789  
E-mail: [LevineD@mskcc.org](mailto:LevineD@mskcc.org)

<sup>4</sup> Narciso Olvera の連絡先  
Narciso Olvera - GYN Res. Lab  
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center  
417 E, 68<sup>th</sup> Street, Z-445E  
New York, NY 10065  
Phone: 646-888-3208  
E-mail: [OlveraN@mskcc.org](mailto:OlveraN@mskcc.org)

腫瘍、血清、血漿あるいは DNA の検体を用いて評価される他の腫瘍マーカーや検査項目、実施される解

## Appendix VII

析についての厳密な選択は、この領域で得られたデータを基に再評価される予定である。

### II. GOG-218 における免疫組織化学的分析

免疫組織化学分析は、GOG-0218 に参加する患者の原発巣もしくは転移巣のホルマリン固定腫瘍組織の従来の組織切片もしくは組織マイクロアレイ (TMA) における CD-31 や VEGF などの angiogenic marker の発現を検査するために Dr. Robert Burger の監督の下に行われる予定である。治療前の腫瘍検体を用いて評価/実施される他の angiogenic marker/分析についての厳密な選択は、この領域で得られたデータを基に決定される予定である。

#### A. 免疫組織化学的分析の手順

厚さ約 5  $\mu$ m の無染色の連続切片を脱パラフィンし、3%過酸化水素水溶液に 10 分浸漬後、水道水、蒸留水の順で洗浄する。免疫組織化学的分析は、下の表に示す市販の一次抗体と、自動染色装置 (Ventana, Tucson AZ; BioGenex, San Ramon, CA) と高感度アビジン-ビオチン検知キット (BioGenex) を用いて行う。CD-31 と VEGF のプロナーゼ消化は antigen retrieval method に含まれている。非特異結合物質をヤギ血清室温 10 分でブロッキングする。検体を適量の一次抗体溶液に室温で 30-60 分浸漬、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、ビオチン標識抗マウス抗体で室温で約 30 分反応させる。PBS で 5 回洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを室温で 30 分反応させ、PBS で洗浄後、3,3'-diaminobenzidine を室温で 5 分間反応させる。検体を PBS で洗浄後、ヘマトキシリン溶液で 1 分間対比染色させ、水道水で約 10 分間洗浄し、アルコールにて脱水後、キシレンで透徹し、Permount を用いて封入する。Titration は全ての抗体試薬で、最小限での background staining と任意の抗原の発見を確実にするためにやっている。全ての免疫組織化学染色での background staining の Negative 抗体コントロールは、一次抗体の抗マウス IgG 抗体として活用する。

Biomaker	一次抗体の種類	Source	Clone #
CD-31	anti-CD-31 mouse antibody	Dako	JC/70A
VEGF	anti-VEGF mouse antibody	Dako	SN6h

#### B. 検体および分析の control:

VEGF の免疫組織化学染色の positive control は、高レベルの VEGF を発現するホルマリン固定パラフィン包埋 MCF7-WT ヒト乳癌細胞株と、低レベルの VEGF を発現するドキシソルピシン耐性誘導体 MCF7-40F である。VEGF 免疫組織化学的分析の negative control では、VEGF を発現しないホルマリン固定パラフィン包埋浸潤乳癌細胞株を用いる。適切な CD-31 の染色を確実にするために、平

## Appendix VII

均血管数による血管新生の control は、各々の検体のスライドを平行な断面として作成する。浸潤乳癌の検体で、毛細血管が高度に染色している部分を positive control とし、同じ腫瘍内で染まっていない部分をこのマーカーの negative control とする。CD31 の発現は内皮細胞で評価する。VEGF は分泌性蛋白であるが、この研究では腫瘍内と内皮細胞内の免疫組織染色での VEGF の発現の評価に焦点をあてる。

### C. データ収集と評価手順:

#### 1. 半定量的方法

各々の免疫組織化学的分析の終了後、レビューアは、検体の内容と同様に病理組織学的・臨床的データを隠された状態で、光化学顕微鏡にて独立してそれぞれのスライドを診断する。個々のスライドは、内皮細胞および/あるいは腫瘍細胞内、または各々の細胞内の CD-31 と VEGF の染色の程度と割合を数値化する。可能であれば、最低 1000 個の細胞で CD-31 と VEGF の染色に関して各々評価する。それぞれの Biomarker の結果は染色陽性の割合で評価し (0-100%)、染色の程度は+1 から+5 にて評価し、0~500 までの免疫組織化学的スコアの総計もしくは亜分類化を行う。

#### 2. 計量的手法

CAS 200 system (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いた画像解析 (IA) は、CD-31 もしくは VEGF 陽性細胞の染色の程度を定量化するために行われる。細胞と核抗原の定量化プロトコルを利用する。技術者は、臨床データと細胞株の詳細を隠された状態で IA を行う。CAS 200 IA system から得られた全ての値は、測定された画素情報の変換から派生させる。CD-31 もしくは VEGF の IA に関して、器機の開始時には、細胞膜、細胞質、核間が最も識別できる positive、negative スライドを用いてセットする。抗体は、同程度の関連性のないモノクローナル抗体にて 0 画素に読み取るようにセットする。各々の検体で、陽性の領域の中の少なくとも 10 視野を解析する。値は陽性の領域と染色の程度の結果を CAS 200 software を用いて光学密度 (O.D.) 単位として変換する。抗原の保存状態は、ほとんどの場合 positive control のスライドとビメンチン染色 (希釈 1:200, Dako, Carpinteria, CA) にて評価される。これらの研究において、IHC score、IA の結果、ヒト乳癌細胞中の分子数として表現された標的タンパクの量は、密接に関連していた ( $r > 0.9$ )。

### D. データ転送:

Dr. Burger は、それぞれのスライドの CD-31 や VEGF の免疫組織化学分析の結果の電子サマリーを、検体の識別情報 (GOG プロトコル番号、Bank ID、検体コード、採取日) とともに GOG Statistical Data Center に転送する責任を負う。各々のスライドの Biomarker のレベルと検体の追跡情報は、

## Appendix VII

臨床データと合わせ、GOG Statistical Data Center において study chair と scientific collaborator らの協力のもとに適正な統計解析が行われる。study chair と科学協力者らは、この研究結果の報告と論文を準備するために GOG Statistical Data Center と連携する。

### E. 残存検体の GOG Tissue Bank への返却:

Dr. Burger は、しかるべき GOG 検体識別情報のラベルが貼られた適切な未使用腫瘍組織を、この部分の治験完了後に各症例のすべての Q/C データおよび関連情報とともに GOG Tissue Bank へ返却する責任を負う。

## III. GOG-0218 におけるゲノム解析

遺伝子発現アレイ解析は、GOG-0218 に参加する患者の腫瘍検体を用いて Dr. Michael Birrer の監督の下に行われる予定である。評価される遺伝子および採用されるプラットフォームについての厳密な選択は、この領域で得られたデータを基に決定される予定である。

### A. RNA 抽出

#### 1. ホルマリン固定パラフィン包埋組織

Microdissection 法によるパラフィン包埋切片からの、もしくは厚さ 50  $\mu$ m の腫瘍からの total RNA の分離には Affymetrix expression array analysis を用いる。ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) からの RNA 抽出では、Bioanalyzer System (Agilent) を用いてのサンプルの定量化と品質検証は禁止する。18S と 28S のリボソーム RNA の持続的に分解することにおける器機の未熟性のためである。しかし、これは必然的にサンプルの質の低下を意味する。FFPE 検体の RNA の状態を効果的に評価するために、二つの異なったプライマーを用いて GADPH と action の発現を評価する real-time PCR を行う。最初の 3' プライマーセットは、転写の 3' 末端の前の 200 塩基の中に存在しており、二番目の 5' プライマーセットは Poly-A tail の上流のおよそ 400 塩基に配置される。二本鎖 cDNA は FFPE 検体から抽出された total RNA を用いて合成され、保管された組織の cDNA の合成には Paradise Reagent System が用いられる (Arcturus)。この方法によって、5ng の total RNA (細胞数およそ 5000 個) から real-time の分析と in vitro transcription に十分な量の cDNA の作成が可能である。

正常な cDNA 検体は、以下に記す方法で転写、hybridization、染色、解析を行う。簡潔には、T7 promoter にリンクした poly-A primer にて FFPE 検体から作成した 100ng の二本鎖 cDNA を、MEGAscript T7 High Yield Transcription Kit (Ambion) を用いて最初の増幅を行う。一回洗浄後、増幅された RNA は、二本鎖 cDNA を作成するために GeneChip IVT Labeling Kit

## Appendix VII

(Affymetrix)を用いて2回目の増幅が行われる。増幅の間、biotinylated ribonucleotidesは、GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix)にて45°C 16時間 hybridization後にアレイのプロープの検出と定量化のために増幅されたRNAに結合する。プロープを視覚化するために、アレイは streptavidin phycoerythrin (Molecular Probes)によって染色され、biotinylated antistreptavidin 抗体 (Vector Laboratories)によって incubate され、Fluidics Station 400 (Affymetrix)で streptavidin phycoerythrinによって再度染色される。染色されたマイクロアレイは、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix)にてスキャンされ、結果画像は全般的な質について GeneChip Operating Software (GCOS) version 1.0 (Affymetrix)にて解析、評価される。この方法論は、過去に FFPE の乳癌検体の解析で行われ、高性能な Human X3P GeneChip Arrays (Affymetrix)が用いられた。GeneChip Arrays を複製するために hybridize されたサンプルは、強度相関度  $R=0.983$  の結果であった。

### 2. 凍結組織

全て原発巣もしくは転移巣の凍結組織は、提出された施設または Dr. Birrer の研究室で OCT に包埋され、-80°Cで保存される。凍結切片は、低温保持装置のなかで-20°C下に厚さ 5µm に切断し、非粘着性の Superfrost Microscope Slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) に固定する。組織標本を-80°Cから-20°Cへ頻回に移動することによる RNA の変性を予防するため、十分な数(10)の切片を一度の凍結切片作業時に切断・固定する。研究を通じて、RNase-free technique を実践する。HistoGene LCM Frozen Section Staining Kit (Arcturus Bioscience, Inc., Mountain View, CA)を用いて、プラスチック容器で一回最大4枚まで凍結切片をフード内で染色する。二次的なコンタミネーションを避けるために、プラスチック容器内の溶液は毎回交換する。染色と脱水の手順は、スライドを70%エタノール、蒸留水、100 µl の HistoGene Staining Solution、水、70% エタノール、95% エタノール、100%エタノールに30秒浸漬後、キシレンにて5分間 incubate する。空気乾燥されたスライドは、microdissection の準備が出来るまで新しい乾燥剤の入った乾燥器にて保管し、microdissection は AutoPix Laser Capture Microdissection (LCM) System (Arcturus)を使って2時間以内に行う。大規模 LCM を迅速に処理するために、完全自動化された AutoPix が使用される。新しいシステムは、PixCell II System (Arcturus)と比較して、より正確な microdissection とより良い画質を保証している。代用として、凍結切片(7µm)を FRAME Slides (Leica, Germany)に貼り、70%アルコールに30秒固定後、1% methylgreen で染色し、水で洗浄後空気乾燥させる。その後、MD LMD laser microdissecting microscope (Leica, Germany)を用いて microdissection を行う。

Microdissection の前の検体の pathology review によって、高い割合の壊死や間質組織や浸潤癌のない切片などが確実に除外される。浸潤癌細胞の部分を顕微鏡で特定、標的とした後、レーザー光波動が CapSure LCM Macro Cap (Arcturus)上のフィルムを活性化させる。約3000個の腫瘍細胞が AutoPix LCM もしくは MD LMD 装置によってそれぞれ得られる。LCM caps 上も

## Appendix VII

しくはレーザー切離によって取り込まれた腫瘍細胞は 50 $\mu$ l 抽出緩衝液に直ちに溶解され、Pico Pure RNA Isolation Kit (Arcturus)により製造者のプロトコルに従って RNA が抽出純化される。RNase-Free DNase Set (Qiagen, Valencia, CA)による DNase treatment step も行われる。各々の卵巣癌の検体の microdissection と平行して、間質や悪性上皮を含んだ凍結組織はスライドから剥がされ、品質管理目的で処理される。

マイクロアレイ解析の前に、RNA 6000 Pico LabChip on the Agilent 2100 Bioanalyzer Automated Analysis System (Agilent)を用いて、製造元の推奨により、精製した total RNA の質と濃度の評価が行われる。一サンプルあたり 200 pg/ $\mu$ l の少量の RNA を含んだ 10 個の卵巣腫瘍サンプルと、それに加えて control RNA、an-RNA ladder (RNA 6000) (Ambion, Austin, TX)がチップごとに詰め込まれる。凍結組織から得た尖った 18s と 28s の ribosomal peak が高品質の RNA が得られたことを示唆する。total RNA での RNase の変性は、RNA の分布が小さいフラグメントへ偏位したり ribosomal peak の蛍光シグナルが減少することによって、容易に発見できる。変性した RNA を含んだサンプルは、その先の解析で除外される。また、Bioanalyzer は RNA を定量化し、確実に 2 サイクルの cDNA 合成開始時に RNA を 10 ng 以上にする。

### B. Affymetrix GeneChip Hybridization

ゲノム解析は、パラフィン包埋切片から RNA を効果的に抽出する X3P GeneChip array や凍結標本から RNA を効果的に抽出する Human U133 Plus 2.0 array を含む何種類かの遺伝子発現マイクロアレイチップを用いて行われる。また、このプロトコルのためにカスタムデザインされた Affymetrix GeneChip array が NCI と Affymetrix の共同で作られる。

原形を保持した分離は、Affymetrix による in vitro amplification procedure によって、cDNA と調和した線形増幅 2 サイクルを伴う。1st-strand DNA は、1 反応あたり 2 $\mu$ l の 5X 1st strand reaction mix 含有の 10 $\mu$ l 反応液、1 $\mu$ l の 0.1M DTT、0.5 $\mu$ l RNase 阻害剤、0.5 $\mu$ l 10mM dNTP、1 $\mu$ l の SuperScript II 逆転写酵素を含んだ Two-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) 試薬を用いて、25ng の totalRNA と 2 $\mu$ l の 5 $\mu$ M T7 オリゴ dT プライマーから合成される。これらの反応が一貫して incubate されていることを確実にするため、すべての incubate の段階で Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600 thermal cycler (Perkin Elmer Life Science, Boston, MA) を使用する。1st-strand DNA 合成は以下のプログラムで行われる。70 $^{\circ}$ C、6 分間 (RNA とプライマーの incubation)  $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C で反応液の混合  $\rightarrow$ 42 $^{\circ}$ C、1 時間 (1st-strand DNA 合成)  $\rightarrow$ 70 $^{\circ}$ C、10 分間 (酵素不活化)。1st-strand DNA 合成後直ちに、4.8 $\mu$ l の RNase-free 水、4 $\mu$ l の 17.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.4 $\mu$ l の 10mM dNTP、0.2 $\mu$ l の RNase H、0.6 $\mu$ l の E. coli DNA Polymerase I を各々の反応液に加えて 16 $^{\circ}$ C、2 時間 incubate し、つづいて第 1 サイクル、2 本鎖 cDNA を生じさせるために 75 $^{\circ}$ C、10 分間の incubate を行う。T7 オリゴ (dT) プライマーと結合した非精製 2 本鎖 cDNA は、1 反応あたり全量 50 $\mu$ l に、5 $\mu$ l の 10X reaction buffer、5 $\mu$ l ATP 溶液、5 $\mu$ l CTP 溶液、5 $\mu$ l UTP

## Appendix VII

溶液、 $5\mu\text{l}$  GTP 溶液、 $5\mu\text{l}$  酵素混合液を含んだ Ambion<sup>®</sup> s MEGAscript T7 High Yield Transcription Kit (Ambion) を用いて、 $37^\circ\text{C}$ 、16 時間で第 1 ラウンド目の転写 (in vitro transcription; IVT) が行われる。第 1 サイクルの cRNA 生成物は、非結合ヌクレオンドを除去するために、GeneChip Sample Cleanup Module IVT column (Affymetrix) に通される。その溶出液は、 $2\mu\text{l}$  の  $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$  random hexamer プライマーと混和して  $70^\circ\text{C}$ 、10 分間 incubate し、つづいて  $42^\circ\text{C}$ 、1 時間の incubate に先立って、 $4\mu\text{l}$  の 5X 1st-strand reaction mix、 $2\mu\text{l}$  の  $0.1\text{M}$  DTT、 $1\mu\text{l}$  の  $10\text{mM}$  dNTP、 $1\mu\text{l}$  の Superscript II 逆転写酵素を添加後に  $42^\circ\text{C}$ 、1 時間の incubate をする。1st-strand 合成の第 2 サイクルを完全にするため、 $1\mu\text{l}$  の RNase H を各々の反応液に添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、20 分間 incubate する。2nd-strand 合成は、すぐに  $4\mu\text{l}$  の  $5\mu\text{M}$  T7 オリゴ (dT) プライマーの添加と  $70^\circ\text{C}$ 、6 分間の incubate にすすみ、つづいて  $88\mu\text{l}$  の RNase-free 水と  $30\mu\text{l}$  の 5X 2nd-strand buffer、 $3\mu\text{l}$   $10\text{mM}$  dNTP、 $4\mu\text{l}$  の E. coli DNA polymerase I の存在下で  $16^\circ\text{C}$ 、2 時間の incubation を行う。第 2 サイクルでは、2 本鎖 cDNA は GeneChip Sample Cleanup Module cDNA column (Affymetrix) で精製され、その溶出液には、 $4\mu\text{l}$  10X IVT labeling buffer、 $12\mu\text{l}$  IVT labeling NTP mix、 $4\mu\text{l}$  の T7 IVT labeling enzyme mix を試薬とした GeneChip IVT Labeling Kit (Affymetrix) を含んだ  $40\mu\text{l}$  の IVT 反応液が添加される。このラベリングの手順は、伸長反応の間、マイクロアレイの target 遺伝子の同定と定量を促進させるため、ビオチン化リボヌクレオンドを結合させる。最終的には第 2 サイクルのビオチン標識 cRNA は、GeneChip Sample Cleanup Module IVT column にて分離され、Beckman Coulter DU-65 UV spectrometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA) で  $260\text{nm}$  の吸光度を用いて定量される。 $260\text{nm}/280\text{nm}$  の吸光度はまた、サンプルの純度の決定にも用いられる (吸光度  $1.8\sim 2.1$  が許容範囲)。

最適な分析感度を得るために、 $15\mu\text{g}$  の増幅産物は  $6\mu\text{l}$  の 5X fragmentation buffer (Affymetrix) を含んだ  $30\mu\text{l}$  の反応液中で、 $94^\circ\text{C}$ 、35 分間の熱とイオン加水分解により分解される。 $5\mu\text{l}$  の  $3\text{nM}$  control oligonucleotide B2、 $15\mu\text{l}$  の 20X eukaryotic hybridization controls (bioB、bioC、bioD、cre)、 $3\mu\text{l}$  の  $10\text{mg}/\text{ml}$  BSA、 $150\mu\text{l}$  の 2X Hybridization Buffer、 $30\mu\text{l}$  の DMSO、 $67\mu\text{l}$  の RNase-free 水を含んだ hybridization cocktail は各々の target に添加され、 $99^\circ\text{C}$ 、5 分間 incubate し、つづいて次の  $45^\circ\text{C}$ 、5 分間の incubate を行う。Target hybridization cocktail は、GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix) により、47000 を上回る transcript や variant、38500 を上回る実証済みのヒトゲノムを含んだ Human U133 Plus 2.0 oligonucleotide array (Affymetrix) のような適切な GeneChip で  $45^\circ\text{C}$ 、16 時間で hybridize される。プローブを視覚化するために、製造元の推奨により、アレイは Fluidics Station 400 (Affymetrix) によって連続した染色サイクルを施される。要するにこのプロセスは、 $300\mu\text{l}$  の 2X Stain Buffer、 $24\mu\text{l}$  の  $50\text{mg}/\text{ml}$  BSA、 $6\mu\text{l}$  の  $1\text{mg}/\text{ml}$  SAPE、 $270\mu\text{l}$  の DI water を含んだ streptavidin phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene OR) (SAPE) 溶液から始まり、ついで  $300\mu\text{l}$  の 2X Stain Buffer、 $24\mu\text{l}$  の  $50\text{mg}/\text{ml}$  BSA、 $10\text{mg}/\text{ml}$  goat IgG stock、 $3.6\mu\text{l}$  の  $0.5\text{mg}/\text{ml}$  ビオチン標識抗体、 $266.4\mu\text{l}$  の DI water からなるビオチン標識抗 streptavidin 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame CA) 溶液による染色が行われる。2 回目定分量の SAPE 溶液の使用で染色過程が完了する。

## Appendix VII

その後、染色されたマイクロアレイは、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) でスキャンされ、その画像結果は GeneChip Operating Software (GCOS) version 1.0 (Affymetrix) で全体的な質についてレビューする。測定の際、特に注意する点は、1) 平均 background 値が 75 未満、2) スキャナー操作による電氣的ノイズが原因のピクセル間の変動が、すべてのアレイで類似している、3) B2 hybridization control oligo は、各アレイにおける輝度の交互パターンがはっきりと立証されている、4) 細菌学的 oligo hybridization control の bioB、bioC、bioD、cre の spike は信号強度の上昇によって反応する、5) 内部制御遺伝子である GAPDH とアクチンが、各アレイにおいて 3' / 5' ratio が 3 未満のときに反応する、6) 遺伝子の存在する割合がすべての解析サンプルで類似している、である。

### C. RNA 増幅と定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

RNA の線形増幅は、製造元のプロトコルで解説されている通り、NuGEN Ovation Nanosample RNA Amplification System (NuGEN Technologies, Inc., San Carlos, CA) を用いて行われる。増幅された 1 本鎖 DNA は spectrometer で定量化される。mRNA の絶対量は、2 つの非標識遺伝子特異的 PCR プライマーと、FAM<sup>™</sup> 標識遺伝子特異的 TaqMan<sup>®</sup> MGB プローブと Applied Biosystems ABI PRISM<sup>®</sup> 7300 Sequence Detection Systems によって測定される。ノーマライゼーションは、house-keeping sequence cyclophilin を複合させて行われる。

### D. データ転送:

Dr. Birrer は、GOG-0218 のホルマリン固定と凍結の腫瘍検体を用いて行われたゲノム解析から得られたすべてのデータの電子コピーを、該当する検体の識別情報 (GOG プロトコル番号、Bank ID、検体コード、採取日) とともに GOG Statistical Data Center に転送する責任を負う。検体の識別情報に該当するゲノム情報は、臨床データと合致させ、GOG Statistical and Data Center とこのプロトコルの study chair、共同研究者らによって適正な統計解析が行われる。study chair と共同研究者らは、この研究の報告と論文を準備するために GOG Statistical and Data Center と連携する。

### E. 残存検体の GOG Tissue Bank への返却:

Dr. Birrer は、しかるべき GOG 検体識別情報のラベルが貼られた未使用腫瘍組織もしくは RNA を、この部分の治験完了後に各症例のすべての Q/C データおよび関連情報とともに GOG Tissue Bank へ返却する責任を負う。

## IV. GOG-0218 における酵素免疫測定法 (ELISA)



## Appendix VII

酵素免疫測定法 (ELISA) は、GOG-0218 に参加する患者の治療前の血清と血漿中の VEGF の定量化のために、Dr. Robert Burger の監督の下に行われる。治療前の血清と血漿を用いて評価される他の血管新生マーカーや実施される解析についての厳密な選択は、この領域で導き出されたデータを基に決定される予定である。

### A. VEGF ELISA:

市販の ELISA キットを用いて GOG-218 参加患者の血清、血漿の VEGF を定量する。

Biomarker	ELISA キット (R&D Systems, Inc.)	カタログコード
VEGF	Quantikine Human VEGF Immunoassay	DVE00

簡単に説明すると、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) で市販しているマイクロタイター用プレートは VEGF 特異的モノクローナル抗体が塗布済みのもとなる。standard、control、検体はウェル内で incubate され、これらのサンプル中に含まれる VEGF の多くはその固定化抗体と結合する。個々のサンプルは複数希釈された複製で評価し、分析直前に溶解する。標準曲線は組み換え型ヒト VEGF の適正な希釈を使用して作成される。control、standard は各々の ELISA プレートに含まれている。非結合抗体は洗浄され、VEGF 特異的酵素抗体はウェル内で incubate される。非結合抗体洗浄後、色素試薬または基質と増幅溶液をウェルに加える。ついで停止溶液は着色過程を終了させるために添加する。

### B. データの取得と評価手順:

発光輝度は最初の段階で結合した VEGF の量に直接的に比例し、automatic microplate reader により 450nm で計測される。個々のサンプルは 4 回検討され、分析直前に溶解させる。標準曲線は 6 ケのコントロール蛋白(組み換え型ヒトアンジオジェニンまたは VEGF)の 2 倍希釈液を使用したそれぞれの分析結果から作成される。各々の standard、control、サンプルを、4 回測定して平均化し、それぞれから平均 background control が差し引かれる。各サンプル中の VEGF 濃度は各々の標準曲線にて補正される。さらに血清と血漿検体のサブセットについて、異なった量で測定を繰り返すことにより、分析法の信頼性を明確にできる。また、濃度がわかっている精製組み換え蛋白を、分析結果の直線性と再現性を確認するために、いくつかの血清と血漿の検体に加える。すなわちこれらの異なる測定により、このプロトコルで得られた血清と血漿の検体の使用において、分析内と分析間での精度、感度、特異度の裏づけができる。

### C. データ転送:

Dr. Burger もしくはその代理人が、ELISA を施行した各々の検体と control を検討するために、VEGF の補正された ELISA の結果を適切な検体の識別情報 (GOG プロトコル番号、Bank ID、検体コード、採取日) とともに GOG Statistical and Data Center へ転送する。対応する検体の追跡情報を伴

## Appendix VII

った Biomarker レベルのデータは、GOG Ingres relational database にダウンロードされ、各々のケースの臨床データと結合する。適正な統計解析が GOG Statistical and Data Center にて行われる。study chair はこの研究の報告と論文を準備するために GOG Statistical and Data Center と連携する。

### D. 残存検体の GOG Tissue Bank への返却:

Dr. Burger は、しかるべき GOG 検体識別情報のラベルが貼られた未解凍の血清もしくは血漿の検体を、この部分の治験完了後に各症例のすべての Q/C データおよび関連情報とともに GOG Tissue Bank へ返却する責任を負う。

## V. GOG-0218 におけるハプロタイプ解析

WNK1、GRK4 および KLKB1 遺伝子のハプロタイプ解析は、GOG-0218 に参加する患者の DNA を用いて、Dr. Douglas Levine と Narciso Olvera の監督の下に行われる。DNA 検体を用いて評価される遺伝子および実施される解析についての厳密な選択は、この領域で導き出されたデータを基に決定される予定である。

### A. 血液もしくは FFPE 腫瘍からの DNA の抽出:

DNA は、GOG プロトコルの標準操作手順を用いて GOG Tissue Bank で血液から抽出される。PCR 増幅および htSNP 遺伝子型判定のために、関連する品質管理データを添付して少なくとも 250 ng の DNA (濃度  $\geq 20$  ng/ $\mu$ l) を Memorial Sloan Kettering Cancer Center の GYN Research Laboratory へ発送する必要がある。あるいは、Memorial Sloan Kettering Cancer Center の GYN Research Laboratory で QIAGEN 社の DNeasy Blood and Tissue Kit (CAT: #69504) を用いて 1~2 枚の FFPE 腫瘍切片 (腫瘍のサイズおよび検体の細胞質による) から DNA を抽出する方法もある。最初に Proteinase K を用いてサンプルを溶解する。その溶解液を DNeasy Mini spin column に充填する。遠心分離中、不純物が通過する際に DNA は選択的に DNeasy のメンブレンに吸着する。残っている不純物および酵素阻害物質は 2 回の効率的な洗浄処理で除去され、DNA はバッファーで溶出されて使用できるようになる。その後、純度を評価するために DNA の品質管理評価を行う。精製した DNA の A260/A280 の比率は 1.7~1.9、吸光度スキャンでは 260 nm に左右対称なピークがある。

DNeasy のメンブレンは、シリカ系メンブレンの結合特性と簡単なマイクロスピンの方式を兼ね備えている。DNA は、溶液中の水和分子から水分を除去する高濃度カオトロピック塩の存在下で、メンブレンに吸着する。バッファーは、DNA がシリカメンブレンへ特異的に吸着し不純物および酵素阻害物質を最適に除去できるようにデザインされている。切片のサイズおよび検体の細胞質にもよるが、1 枚の FFPE 切片から、大体、50~300ng の DNA が得られる。

## Appendix VII

### B. PCR 増幅および htSNP 遺伝子型判定:

DNA は使用濃度 20 ng/ $\mu$ l に希釈する。遺伝子型判定は、Sequenom 社の iPLEX マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 飛行時間型質量分析法を用いて行う。htSNPs 用のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) アッセイおよび一塩基伸長 (SBE) プライマーは、MassARRAY AssignDesigner software version 3.0 (Sequenom 社) を用いてデザインする。PCR および SBE のオリゴヌクレオチドは、Integrated DNA Technologies 社 (Coralville, IA) によって合成される。マルチプレックスのプールには、10~24 の combined SNP アッセイが含まれる。スタンダード PCR アッセイを用いて、最終的に 5  $\mu$ l の容量において 20ng の DNA から DNA 産物を増幅する。PCR 増幅後、産物に shrimp alkaline phosphatase を加えて混ざり合っていないヌクレオチド 3 リン酸を中和する。iPLEX の酵素と質量改変ターミネーターを用いることで SBE 反応が起こる。合成オリゴヌクレオチドは、標的 SNP 部位に隣接して結合しヌクレオチドを鋳型 SNP に相補的に組み込む。標的 SNP の組み込み後、質量改変ヌクレオチドは伸長反応を停止し、対立遺伝子依存的な質量差を持つ産物を生成する。その SBE 産物を脱塩し、SpectroCHIP (Sequenom 社) 上にスポットして MALDI-TOF 質量分析装置を用いて分離する。遺伝子型は、SpectroTyper software (Sequenom 社) で判定される。ピークおよびクラスター分析によってコールを評価し手動で編集する。各 96 ウェルプレートには、Duplicate の検査サンプルおよびネガティブコントロールが含まれる。

品質を保証するために、fidelity の高い試薬を使って ABI prism 7900 sequence detection system で行った TaqMan® 対立遺伝子識別アッセイを用いて、典型的な SNPs の遺伝子型判定を行う。プライマーおよび蛍光標識された MGB-NFO プローブは、Applied Biosystems 社 (Foster City, CA) によりデザインされ合成される。アッセイは、約 20 ng のゲノム DNA、2.5  $\mu$ l の 2 $\times$ Taqman Universal PCR Master Mix、0.125  $\mu$ l の 40 $\times$ Taqman probes/primers mix、および 2.375  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O を加えて最終的な反応容量が 5  $\mu$ l になる状態で、384 ウェルフォーマットで行う。熱サイクルの状態は、95 $^{\circ}$ C が 10 分、引き続き 92 $^{\circ}$ C で 15 秒と 62 $^{\circ}$ C で 1 分のサイクルを 40 回行う。蛍光データは、post-PCR プレートリード中に採取し、対立遺伝子識別 SDSv2.1 プログラム (Applied Biosystems 社) を用いて解析する。Sequenom と Taqman の間の遺伝子型判定の一致率は、これまでのデータから 99% と見込まれている。

### C. データ転送:

Dr. Levine は、GOG-0218 の DNA 検体を用いて実施したハプロタイプ解析から得たすべてのデータの電子コピーを、該当する検体の識別情報 (GOG プロトコル番号、Bank ID、検体コード、採取日) とともに GOG Statistical Data Center に転送する責任を負う。該当する検体の追跡情報を伴うゲノム情報については、これらの症例の臨床データと合致させ、GOG Statistical and Data Center、本プロトコルの主任研究者および研究協力者が協力し合って適正な統計解析を行う。主任研究者と研究協力者は、本治験の報告書および原稿を作成するために GOG Statistical and Data Center と連携する。

## Appendix VII

### D. 残存検体の GOG Tissue Bank への返却

Dr. Levine は、しかるべき GOG 検体識別情報のラベルが貼られた残存 DNA もしくは腫瘍組織を、この部分の治験完了後に各症例のすべての Q/C データおよび関連情報とともに GOG Tissue Bank へ返却する責任を負う。

## Appendix VIII

### CANCER TRIALS SUPPORT UNIT (CTSU)を通じて GOG0218 へ参加する手順

#### 登録/ランダム化

この試験に患者を募集する前に、治験担当医師はCTSUのメンバーとして登録されていなければならない。各治験担当医師はNCI investigator numberを取得し、investigator registration packet(自筆サイン入りのFDA Form1572、現在の履歴書、サイン入り追加の治験担当医師データフォーム、自筆サイン入りの資産公開フォーム)を記載、提出してPharmaceutical Management Branch (PMB)、CTEP、DCTD、NCIに毎年提出することで、登録“可能”な治験担当医師の状態を維持しなくてはならない。これらのフォームは、CTSU registered member Web site あるいは Pharmaceutical Management Branch (TEL: 301-496-5725) (月曜から金曜、午前8:30から午後4:30、Eastern time) に電話をして入手する。

CTSU メンバー医師または医師のグループは、1つの臨床施設において、本プロトコルのIRBでの承認を得なければならない。すべてのIRBの承認通知書と支援書類を、患者登録前にCTSU Regulatory Officeに提出しなければならない。試験センターは、CTSU member web site (<http://members.ctsu.org>) 中のRegulatory Support System (RSS) siteの登録状況ページで、Registration packetの状況を確認することができる。

本試験に関するすべての記入用紙と文書はCTSU registered member Web site (<http://members.ctsu.org>)のGOG-0218 Web ページよりダウンロードできる。治療前の評価が完了し、すべての適格規準を満たし、試験施設がCTSU RSSに“承認=Approved”されて登録された後に、はじめて患者登録が可能となる。

#### GOG-0218の施設登録の必要書類

- CTSU IRB Certification
- CTSU IRB/Regulatory Approval Transmittal Sheet
- CTSU Supply Request Formを記入し、CTSU Data Operations Centerへファクスし、CTSUにGOG-0218 QOL Scantron formのハードコピーを請求する。このRequest Formへのリンクは、Registration documents sectionの中のGOG-0218web ページにある。

#### GOG-0218の患者登録の必要条件:

- 適格規準のすべてを満たし、除外規準のいずれにも該当しない患者である。
- 患者が、全ての適切な同意書と承認書に、署名と日付を記載している。
- すべてのベースライン臨床検査と試験前の評価がおこなわれている。

## Appendix VIII

- プロトコルの Appendix VI に記載されている通りに、オハイオ州コロンバスにある GOG Tissue Bank から GOG Bank ID を取得し、GOG-0218 用検体キットを請求する。

\*\*\*CTSU が GOG データベースに前もって入力できるように、新規施設は最初の患者登録の 24 時間以上前に CTSU に通知しなければならない。各施設は CTSU に以下の情報を提供しなければならない: (03/17/08)

- IRB による承認日
- 登録する施設の NCI Site Code
- 登録する施設の名称
- 登録する試験担当医師の氏名、電子メールアドレスおよび電話番号
- データ管理者の氏名、電子メールアドレスおよび電話番号
- 登録する試験担当医師の NCI Investigator number

### 患者登録に関する CTSU の手続き:

#### Phase A - 初回登録/ランダム化

1. CTSU Patient Registration Office へ電話 (1-888-462-3009) をする。近々、Phase A - 初回登録/ランダム化があることを CTSU Patient Registration Office に知らせるため、ボイスメールを残す。直ちに登録が必要な場合、例えば 1 時間以内に等、登録用携帯電話 1-301-704-2376 へ電話する。以下の Form を記入する。
  - CTSU Patient Enrollment Transmittal Form
  - GOG 0218 Fast Fact Sheet
  - GOG-0218 用 CTSU Specimen Consent Form
2. CTSU Patient Registrar (月曜から金曜、午前 9 時から午後 5 時 30 分、Eastern Time (祝祭日を除く)) にこれらのフォームをファクス (1-888-691-8039) する。CTSU 登録担当者は、規定された必要要件が全て満たされていることを保証するために、治験担当医師および施設情報を確認する。また、登録担当者はフォームが完全に記載されているか確認し、なにか矛盾があればそれを解決するために施設をフォローアップする。(03/17/08)
3. 治験担当医師の適格性が確認され、登録書類の整合性が確認された後、CTSU 登録担当者は GOG に連絡をする。CTSU 登録担当者は GOG オンライン登録システムにアクセスし、治療群の割り付けと患者固有の ID (この先のすべてのフォームおよび文書で使用される) を取得する。CTSU 登録担当者はファクスにより登録を確認する。

本試験はランダム化二重盲検試験である。Phase A の web 登録手順により、自動的に GOG SDC に Drug Order / Re-order Application (DORA) のロードが行われ、2 重盲検の患者個別に、臨床試験薬としての GOG-0218 用ペバシズマブもしくはプラセボを、初回患者登録/ランダム化時に PMB に対して電子的に提出される

## Appendix VIII

(Phase A)。Phase A 臨床試験薬等はランダム化から約 7-10 日以内に医療施設に到着する。請求された薬剤はすべて、患者登録をした医師宛に直接配送される。

### Phase B - 化学療法の終了/再登録

1. 以下のフォームを記入する。
  - DrugOrder / Re-order Form (Form DORA)
2. Form DORA は、CTSU registered member Web site (<http://members.ctsu.org>) の Pharmacy Form の下にある、GOG-0218web よりダウンロードできる。6 サイクルの治療の day1 にすべての薬剤の投与が完了した後、Phase B - 化学療法の終了/再登録に際して、CTSU を通じて登録された施設は Form DORA を手書きで記入する。
3. GOG SDC (1-800-523-2917) (月曜から金曜、午前 9 時から午後 5 時、Eastern time (祝祭日を除く)) に電話をし、Phase B - 化学療法の終了/再登録が迫っていることを GOG SDC に知らせる。また、Form DORA を GOG SDC (716-845-8854) にファックスする。

### データの提出と修正

1. この試験に関する全ての症例報告書(CRF)は、CTSU registered member Web site (<https://members.ctsu.org>) の GOG-0218 web ページからダウンロードしなければならない。施設は最新バージョンの報告書を使用し、プロトコルに概説された注意事項と提出スケジュールを厳守すること。
2. すべての記入済み CRF (患者登録フォームを除く)、臨床報告書、伝票類は、直接 GOG (連絡窓口表を参照) に提出する。試験データは CTSU に送ってはならない。また CTSU-GOG カバーシートを全提出データに添付して郵送する。本プロトコルでは電子データによる提出が可能であり、強く推奨される。GOG User Support へ電話 (716-845-7767) して user name と password を入手し、GOG Statistical and Data Center Electronic Data Entry System (SEDES) をナビゲートする際の支援を得る。(3/17/08)
3. GOG Statistical and Data Center は修正を求めてクエリー通知と遅延報告を直接施設へ送付する。クエリーの回答と遅延したデータは GOG Statistical and Data Center へ指示通りに送付すること。「CTSU Data Operation」をコピーをしてはならない。各施設には指定された CTSU 管理者とデータ管理者を置き、彼らの CTEP AMS account contact の情報を常に最新版のものとする。これにより、試験施設と GOG Statistical and Data Center の間のタイムリーな連絡が可能となる。

### 特記事項

#### 病理 (3/17/08)

- プロトコルに概説されている通りに検体を収集、準備、提出する。染色したスライドを直接 GOG Statistical and data center (Roswell park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY14263) に提出する (無染色スライドもしくは腫瘍ブロックを提出してはならない)。
- CTSU に検体、臨床参考書類、伝票類を送付してはならない。

#### トランスレーショナルリサーチ

患者の同意が得られていることを条件として、米国内の CTSU 施設は、プロトコル Section 7.2 および Section 10.2 と Appendix VI (GOG-0218 の検体の手続き) に記載されているように、このプロトコルのトランスレーショナルリサーチに参加しなければならない。

- プロトコルに概説されている通りに検体を収集、準備、提出する。
- CTSU に検体、臨床参考書類、伝票類を送付してはならない。

#### クオリティ・オブ・ライフ

QOL Scantron form のハードコピーを請求し、治療開始前に手元になければならない。医療施設は CTSU Supply Request Form に記入し、それを CTSU Data Operations Center にファクスすることで Scantron form を請求することができる。CTSU Supply Request Form へのリンクは、CTSU member site の GOG-0218 web ページの site registration documents の下にある。プロトコル Section 10.2 に概説されている全ての時点において、フォームを記入しなくてはならない。患者が質問票を完全に記載している、していないにかかわらず、すべての質問票のコピーを GOGSDC に郵送する。また、記載された質問票とフォームのコピーを貴施設で保管する。QOL Form を CTSU に送付してはならない。

#### 重篤な有害事象 (AE) 報告 (Section 10.1)

1. CTSU 施設は、有害事象の文書作成および提出に関して、治験審査委員会 (IRB) の取り決めに従わなければならない。全ての報告すべき重篤な有害事象は、施設 IRB に通知されなければならない。
2. CTSU 施設はプロトコルに規定されたガイドラインとスケジュールに従って有害事象を評価し報告する。CTSU member ホームページ (<https://members.ctsu.org>) の Adverse Events tab から、または、protocol number Web ページのドロップダウンリスト内の document center から Adverse Event



## Appendix VIII

Reporting Form を選択することで、CTEP Adverse Event Expedited Report System (AdEERS) に進むことができる。

3. Adverse Event Report は CTSU に送付してはならない。
4. 二次性の AML/MDS/ALL の報告: 二次性の AML、MDS、ALL の発生は、AdEERS の代わりに NCI/CTEP AML-MDS Report Form で報告する。プロトコルに記載されている通り、記入したフォームと参考書類を提出する。

### 薬剤の入手 (Section 4)

研究薬剤: ベバシズマブ、プラセボ

市販薬剤: カルボプラチン、パクリタキセル、ドセタキセル

1. 薬剤の剤形、入手方法、保存方法、作用、投与方法、潜在的毒性の情報はプロトコル Section 4.0 に記載されている。
2. GOG0218web ページのドロップダウンリスト内の document center から Pharmacy Forms を選択することで、Drug form に進むことができる。

### 規制とモニタリング

#### 試験の監査

Federal regulatory requirements (CFR21 の part 50, 54, 56, 312, 314 と HHS45 CFR46) を遵守していること、および、臨床試験実施と試験データの妥当性のため、National Cancer Institute (NCI)/ Cancer Therapy Evaluation Program (CTEP) Clinical Trials Monitoring Branch (CTMB) のガイドラインを遵守していることを確認するために、CTSU を通して患者登録を行う、NCI/CTEP に承認された全てのプロトコルは監査を受ける。

監査の割り当てに対する責務は、共同研究グループあるいは CTEP に加盟した主施設により決定される。グループで行っている施設に対しては、CTSU を通して登録された患者の監査は、患者登録のクレジットを受けたグループの責任となる。CTSU Independent Clinical Research Sites (CICRS) に対しては、CTSU が全ての監査手順を調整する。

CTSU を通して登録された患者について、そのグループがプロトコルで扱っている主要疾患について進行

## Appendix VIII

中の臨床試験プログラムを持っていて、そのグループと提携のあるグループのいずれに対しても登録症例の credit を要求することができる。(たとえば、NSABP メンバーは乳癌または大腸癌に関連するプロトコルに対して credit を要求することが出来る。) 他の疾患を扱うプロトコルへの登録は、NSABP 活動に対しての credit を受け取ることはできないが、CTSU を通して登録できる。一人当たりの払い戻しは CTSU から直接発行される。

監査の評価項目、施設の選択、症例の選択、調査対象となる資料、施設の準備、調査と評価に対する施設の対処、結果の報告、フォローアップに関する詳細は CTSU Member Web site 内の CTSU Operations Manual からダウンロードして入手可能である。

### Health Insurance Portability and Accountability Act of 1996 (HIPAA)

The HIPAA Privacy Rule は、保護された健康情報が、研究を目的として、この法律の適用をうける組織により使用・公開される可能性があるという状況を作り出した。研究については HHS 45 CFR 164.501 を参考にして Privacy Rule のなかで定義されている。NCI-U.S. HIPAA ガイドラインの定型用語については、CTSU website 上の HIPAA Authorization Form に掲載されている。

The HIPAA Privacy Rule は、米国外の参加者には適応されない。保護された健康情報を開示する権限については、米国外で臨床試験に登録した患者からの要請には応えることはできない。

### Clinical Data Update System (CDUS) のモニタリング

この試験は Clinical Data Update System (CDUS) Version 3.0. によりモニターされる。蓄積された CDUS のデータは、電子媒体により 3 ヶ月ごとに CTEP へ提出する。スポンサーグループは試験独自の症例報告書で収集された CDUS データを CTEP へ電子的に移管する報告義務を遂行する。

