

201118007B

厚生労働科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業

がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発

平成21年度～平成23年度

総合研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成24（2012）年 5月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金  
第 3 次対がん総合戦略研究事業

がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発

平成 2 1 年度～平成 2 3 年度

総合研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成 2 4 ( 2 0 1 2 ) 年 5 月

## 別添 2

### I. 総合研究報告

がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発・・・・・・・・・・ 1  
山田哲司

I I. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・ 2 1

I I I. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・ 2 3

### 別添 3

## 厚生労働科学補助金（第3次対がん総合戦略研究事業） 「がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発」

### 総合研究報告

研究代表者 山田哲司 国立がん研究センター研究所 上席副所長

#### 研究要旨

がんの治療成績の向上のためには、無症状の段階でのがんを発見し、早期に治療を開始することが最も有効であることは論を待たない。しかし現状ではがん検診の受診率が充分でなく、また膵がんのように検診方法が確立していない疾患も多い。

本課題ではがん検診のプレスクリーニングに応用できるような新規の血液腫瘍マーカーを開発することを目的として研究を行った。精密ながん検診を行うべき症例を、検診者の負担が少ない簡易な方法により効率良く絞ることが出来れば、がんの早期発見・治療成績の向上につながると考えられる。

#### 【プロテオーム解析に特化した血清・血漿バンクの構築】

血漿・血清のタンパク質は採血や保存状況によってはしばしば不安定であり、腫瘍マーカー開発のためには、タンパク質解析用に厳密に管理された検体バンクが必要である。本課題では多施設共同研究により膵がん、胃がん、大腸がん、肝細胞がんなどの消化器がん患者、鑑別疾患の対象となる良性疾患患者、および健常者より血漿・血清検体を同一の採血・保存方法で1860例の血清・血漿検体を収集し、腫瘍マーカーの探索・検証に使えるよう整備した。さらにバンクの拡充を現在続けている。

#### 【新規プロテオーム解析基盤技術の開発】

##### 1. 血漿タンパク質の網羅的解析技術の確立

タンパク質の標識なしで、理論上無制限の数の臨床検体が比較定量解析の出来る独自の質量分析技術 2DICAL (Two Dimensional Image Converted Analysis of Liquid chromatography and Mass Spectrometry) 法を開発した(特許出願中)。東レ株式会社との共同研究で中空糸膜による血漿タンパク質の濃縮技術を取り入れ、低濃度の血漿タンパク質を高感度に解析できるようにした。

## 2. 血漿タンパク質マイクロアレイ技術の確立

日立ハイテクノロジーズ社との共同研究で逆相担体をコートしたスライドガラス上にタンパク質を高密度に定量スポットするアレイ化技術(reverse phase protein array: RPPA)を開発し、スライドガラス1枚で6144検体の定量解析が可能になった。がん患者と対照者の血漿をランダムにスポットした膵がん血漿アレイと大腸がん血漿アレイを作成した。

### 【新規プロテオーム解析技術で同定した腫瘍マーカー】

#### 1. 高分解能質量分析による膵がん患者の血漿タンパク質プロファイル

従来より報告している8765と17252 m/zのマーカートンパク質が、いずれもアポリポ蛋白の異なる翻訳後修飾に起因することをつきとめた。国内7施設とドイツ1施設の共同研究で収集した4つの独立したコホート1314例の検体を用い、二つの研究施設で独立した検証実験を行った。いずれも病期I期の症例を含めてROC (Receiver Operator Characteristics)解析でAUC (Area Under the Curve) 値0.88以上の精度で膵がんが検出できた。無症候の集団における膵がんの簡易なプレスクリーニング法として応用可能性があると思われる。

欧州で特許が成立し(特許番号:1870711)、さらに東レ株式会社との共同研究でアポリポ蛋白A2の翻訳後修飾特異的な抗体が作成できたことで、臨床応用が期待される。

#### 2. 血漿フィブリノーゲンの翻訳後修飾

フィブリノーゲンの2箇所のproline残基に膵がん患者で酸化修飾が見られることを見出し、内1箇所を特異的に検出できるモノクローナル抗体を株式会社トランスジェニックとの共同研究で作成した。競合ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)を構築し、合計685例の血漿検体で定量解析中を行い、その臨床応用可能性を明らかにした。

国内で特許が成立し(特許番号:4319700)、新規診断法として現在ライセンスを進めている。

#### 3. 大腸がんの新規腫瘍マーカーの開発

大腸がん31例と年齢・性別を一致された対照者59名(合計90名)の血清検体例を用い、2DICAL法にてプロテオーム解析を行い、complement component C9がステージI期の症例でも有意に( $P=3.02 \times 10^{-3}$ )増加することを見出した。さらに大腸がん115例、対照者230名の血清を高密度にスポットした大腸がん血漿マイクロアレイを用いて、診断有用性を検証した。C9は既存の腫瘍マーカー

である carcinoembryonic antigen (CEA) に比べより早期の症例でも上昇することから、検診への応用可能性があると考えられた。

#### 4. 中空糸膜による前処理を用いた定量質量分析による膵がんの新規腫瘍マーカーの開発

中空糸膜によるサンプル分画技術を用いて膵がん患者の血漿タンパク質を濃縮し、2DICAL 法による定量質量分析で血漿中の炎症性サイトカイン CXC Chemokine Ligand 7 (CXCL7) が膵がん症例で有意に ( $P=5.0 \times 10^{-5}$ ) 低下することを見出した。独立した検証コホート (膵がん 140 例、健常者 87 例) でも早期症例を含めて判別能は  $AUC=0.85$  と良好であった。CA19-9 と組み合わせることで判別能を有意に改善し ( $AUC=0.96$ )、CA19-9 の診断性能を補完する新たな腫瘍マーカーであると考えられた。

#### 5. 高密度アレイによる新規膵がん腫瘍マーカーの探索

Abnova 社との共同研究で 1197 種のモノクローナル抗体を得、膵がん患者 164 例と健常者 102 例の血漿をスポットしたマイクロアレイで直接スクリーニングし、 $AUC$  値 0.80 以上の成績を持つ血漿タンパク質を 33 種同定した。

それらのうち  $AUC$  値がそれぞれ 0.897、0.883、0.864 で、 $P$  値が  $3.44 \times 10^{-30}$ 、 $1.04 \times 10^{-29}$ 、 $2.07 \times 10^{-27}$  と統計学的に最も高い有意差を示した 3 種の血漿タンパク質については、臨床応用性が高いと判断し、Abnova 社とともに ELISA の構築と特許出願を進めている。

#### 6. 早期大腸がん症例における血清中ダーモカインの解析

ダーモカイン (以下 DK) の ELISA を構築し、大腸がん 130 症例で血清中濃度測定を行った。早期大腸がん症例 (Tis/T1, 33 症例) における感度は DK : 28.6% / 36.8%、DK/CEA/P53 自己抗体/CA19-9 の 4 項目測定 : 64.3%/57.9% となった。DK 単独では特異度 : 92.0%、 $AUC:0.75$ 、 $P=0.037$  であり早期がんに対する血清診断マーカーとして有用性を認めた。免疫組織染色では早期大腸がんでは DK が強発現しており、ELISA の結果を裏付ける結果であった。

#### 【分担研究者】

関根茂樹

国立がん研究センター研究所ユニット長

近藤格

国立がん研究センター研究所分野長

佐藤雄一

北里大学 教授

菊池正二郎

兵庫医科大学 講師

有吉靖則  
大阪医科大学 講師

弦間昭彦  
日本医科大学 教授

藤田茂之  
和歌山県立医科大学 教授

土田明彦  
東京医科大学 准教授

中森正二  
大阪医療センター 診療統括部長

井岡達也  
大阪府立成人病センター 副部長

八木原一博  
埼玉県立がんセンター 医長

西 洋孝  
東京医科大学 講師

#### A. 研究目的

がん検診で無症状の段階でがんを発見し、早期に治療を開始することが有効ながん対策法の一つと考えられる。本研究班では、全国どの医療施設でも同じ条件で、被験者の負担が少なく、非侵襲的に得られる血液を検体を用い、精密検診を行うべき症例を効率良く絞るプレスクリーニングに使用できる新規腫瘍マーカーを開発するこ

とを最終的な目的としている。平成から18年から20年度までの第3次対がん総合戦略研究事業研究課題「がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発」では、高分解能・高質量精度の質量分析装置を使用し、難治性の高い膵がん患者を90%以上の正診率で診断でき、さらに既存の腫瘍マーカーであるCA19-9と組み合わせることで、病期I期の早期症例を含めた100%が検出可能な新規腫瘍マーカーを開発した。この成果は血液バイオマーカーによるがん検診に現実性があることを示したものと思われる。

平成21年度以降は対象を膵以外の臓器にも範囲を拡げ、新たな腫瘍マーカーの探索を行った。

#### B. 研究方法

各地のがん医療の中核となる医療機関が参加する多施設共同研究により同一の採血、輸送、保存プロトコールで、膵がん以外にも胃がん、大腸がん、などの比較的罹患率の高いがんの罹患者、および鑑別疾患の対象となる良性疾患患者および健常者から血清・血漿を匿名化された精度の高い臨床情報とともに前向きに集めている。この検体などを用いて新規腫瘍マーカーを探索・検証した。

われわれは、昨年度までに384例の血漿検体をマイクロアレイした逆相血漿アレイ(reverse phase plasma array:RPPA)の開発を行ってきた。本年はこの基盤技術を利用し、他の方法

で抽出された血漿診断マーカー候補の診断学的有用性を検証した。

(倫理面への配慮)

多施設共同研究の実施にあたっては「臨床研究に関する倫理指針(平成15年厚生労働省告示第255号、平成16年12月28日改正)」等の指針に沿った計画を作成し、各施設で倫理委員会あるいはそれに相当する組織による審査を受け、研究によって提供者に危険や不利益が生じない事、匿名化が厳重に行われ、個人情報厳重に管理されていること、提供者に同意を得る方法に倫理的な問題がないことを確認し、施設審査委員会の承認を得た後に研究を開始した。

### C. 研究結果

**【プロテオーム解析に特化した血清・血漿バンクの構築】**  
 血漿・血清のタンパク質は採血や保存状況によってはしばしば不安定であり、腫瘍マーカー開発のためには、タンパク質解析用に厳密に管理された検体バンクが必要である。  
 本課題では多施設共同研究により下記症例の血漿・血清検体を同一の採血・保存方法で収集し、大規模な腫瘍マーカーの探索・検証に使えるよう整備した。

健常者・良性疾患	348
浸潤性膵管がん	385

浸潤性膵管がん以外の腫瘍・のう胞	89
膵内分泌腫瘍	9
慢性膵炎	14
胃がん	272
肝がん	84
胆管がん・胆のうがん	58
胆のう炎	87
大腸がん・直腸がん	312
口腔がん	12
肺がん	24
食道がん	43
卵巣がん	11
子宮体がん	2
その他	18
<u>最終病名未登録</u>	<u>177</u>
合計	1860

### 【新規プロテオーム解析基盤技術の開発】

#### 1. 低発現血清・血漿タンパク質の高感度解析技術の確立

東レ株式会社との共同研究で、中空糸膜によるタンパク質の濃縮技術を2DICAL (Two Dimensional Image Converted Analysis of Liquid chromatography and Mass Spectrometry)法(特許出願中、製品化済み)に応用し、低濃度の血清・血漿タンパク質の定量プロテオーム解析を可能にした。

#### 2. 血漿タンパク質マイクロアレイ技術の確立

①逆相担体で被覆したスライドガラスにタンパク質検体を高密度にマイ



クロススポットするアレイ化技術 (reverse phase protein array: RPPA) を開発し、ナノリッターレベルの微量検体で血漿タンパク質の定量を可能にした。

②がん患者と対照者合計 384 例の血漿をランダムにスポットした「膵がん血漿アレイ」と「大腸がん血漿アレイ」を作成した。

**【新規プロテオーム解析技術で同定した腫瘍マーカー】**

1. 血漿フィブリノーゲンの翻訳後修飾

①膵がん患者で、血漿  $\alpha$  フィブリノーゲンの特定のプロリン残基に、特有の酸化修飾が見られることを見出した。

②この僅かな翻訳後修飾を特異的に検出できるモノクローナル抗体を、高親和性抗体作製技術を持つ株式会社トランスジェニックと共同で開発した。

③合計 685 例の血漿検体を定量解析し、病期 I B 期以上の膵がん症例を検出できることを明らかにした (国内特許成立)。

**【実用化状況】**

測定キットを構築し、2011 年 12 月 12 日より、まずは研究用試薬として市販することになった。

2. 高分解能質量分析による膵がん患者の血漿タンパク質プロファイル

①以前より報告している 17252 m/z の膵がんの早期マーカー (Honda et al., Cancer Res. 2005;65:10613-22、欧州で特許成立) が、片方のペプチド鎖の

C 末よりアミノ酸 1 個が欠失したアポリポ A 2 のヘテロダイマー

(ApoAII-2) であることを突き止めた。

②4 コホート合計 1314 症例で質量分析を行い、病期 I 期を含めて Area Under Curve (AUC) 値 0.9 以上の精度で膵がんが検出できることを証明した。

③正常型と C 末端よりアミノ酸 1 個が欠失したアポリポ A 2 鎖をそれぞれ特異的に検出できる抗体を開発した。

**【実用化状況】** 得られた 2 種類の末端配列特異的な抗体を用いて、現在、東レ株式会社と共同で、ヘテロダイマーを検出できるサンドイッチアッセイを構築している。

3. 細胞骨格タンパク質 T 由来のペプチドフラグメント

①50 例の膵がん切除標本の組織マイクロアレイで、1212 種の抗体をスクリーニングし、細胞骨格タンパク質 T が膵がんでは特異的に高発現することを見出した。

②膵がん患者の血中には、このタンパク質の一部がフラグメントとして分泌され、健常者に対し病期 I 期の症例を含めて AUC 値 0.89 で識別できることを明らかにした (特許出願中)。

**【実用化状況】** フラグメントのアミノ酸残基 1052-1424 を認識するモノクローナル抗体を 2 種、1324-1424 の 1 種を樹立し、現在サンドイッチアッセイを構築中である。

4. 統合ゲノム・プロテオーム解析で同定された22種の血漿タンパク質正常膵管上皮に比べ有意に膵がんを高発現する遺伝子を、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析データより抽出し、その産物に対する179抗体を膵がん患者と対照者の合計384例の血漿がスポットされた「膵がん血漿アレイ」でスクリーニングし、AUC値0.85以上を示す血漿タンパク質3種、0.80以上を示す19種を同定した（特許出願中）。

【実用化状況】アブノバ社との共同研究で、各タンパク質に対しエピトープの異なる複数のモノクローナル抗体を、工業的な規模で作製中である。

#### 5. CXCL7

中空糸膜によるサンプル分画技術を用いて膵がん患者24例と健常者21例の血漿タンパク質を濃縮し、2DICAL法による比較定量解析で、血漿中の炎症性サイトカインCXC Chemokine Ligand 7 (CXCL7)が、膵がん症例で有意に( $P=5.0 \times 10^{-5}$ )低下することを見出した。独立した検証コホート(膵がん140例、健常者87例)でも早期症例を含めて判別能はAUC=0.85と良好であった。さらにCA19-9と組み合わせることで判別能を有意に改善し

(AUC=0.96)、CA19-9の診断性能を補完する新たな腫瘍マーカーであると考えられた。

#### 6. アディポフィリン

中空糸膜によるサンプル分画技術を用いて大腸がん患者22例と健常者21例の血漿タンパク質を濃縮し、2DICAL法による比較定量でadipophilin (別名 perilipin-2)が病期I期の症例を含めて、有意に( $P=0.0004$ )増加することを見出した。さらに2つの独立した大規模コホート[コホート1(210例)とコホート2(113例)]を解析し、早期診断の腫瘍マーカーとして有用なことを証明した。

#### 7. 補体第9成分

大腸がん31例と年齢・性別を一致させた対照者59名(合計90名)の血清検体例を用い、2DICAL法にてプロテオーム解析を行い、complement component C9が病期I期の症例でも有意に( $P=3.02 \times 10^{-3}$ )増加することを見出した。さらに大腸がん115例、対照者230名で診断有用性を検証した。C9は既存の腫瘍マーカーであるcarcinoembryonic antigen (CEA)に比べより早期の症例でも上昇することから、検診への応用可能性があると考えられた。

#### 8. ダーモカイン

ダーモカイン(以下DK)のELISAを構築し、大腸がん130症例で血清中濃度測定を行った。早期大腸がん症例(Tis/T1, 33症例)における感度はDK: 28.6%/36.8%、DK/CEA/P53自己抗体/CA19-9の4項目測定: 64.3%/57.9%となった。DK単独では特異度: 92.0%、AUC: 0.75、 $P=0.037$ であ

り早期がんに対する血清診断マーカーとして有用性を認めた。免疫組織染色では早期大腸がんでDKが強発現しており、血清中濃度測定の結果を裏付ける結果であった。

#### D. 考察

臨床検体のプロテオーム解析を行う場合は、その検体の採血、保存方法で、結果は大きく左右される。今回われわれは日本全国の地理的に異なる計7施設から同一の方法で検体を前向きに採取して輸送・保存した検体を用いことにより、バイアスのないより信頼性の高い腫瘍マーカーが得られたものと思う。今後症例数を増やして解析するとともに、より汎用性の高いがん検診に応用可能な血液診断法を開発するため、新たな腫瘍マーカーの探索が必要である。

#### E. 結論

膵がん、大腸がんで早期症例の検出が可能で検診応用可能性のある腫瘍マーカーの候補が得られた。遠隔地を含む大小規模に係らず全国のどの医療施設でも、被験者の負担が少なく、非侵襲的に得られる血清あるいは血漿を検体に用い、精密検診を行うべき症例を効率良く絞ることができれば、安全にがんの早期発見率を向上させるのみならず、検診費用の削減や地方への均てん化も期待できる。また、国際がんバイオマーカーコンソーシアム(ICBC, International Cancer

Biomarker Consortium)へ参加する唯一の日本チームとして活動し、国際的にも評価が得られた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

分担研究報告書に記載

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1、特許出願

分担研究報告書に記載

##### 2、実用新案登録

なし

##### 3、その他

なし

# 「がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発」

## 研究計画書

国立がん研究センター研究所 創薬臨床研究分野  
大阪医科大学 感覚器機能形態医学講座口腔外科  
和歌山県立医科大学 口腔顎顔面外科学講座  
日本医科大学内科学 呼吸器・感染症・腫瘍部門  
東京医科大学 第三外科  
国立病院機構大阪医療センター  
大阪府立成人病センター 検診部  
埼玉県立がんセンター 歯科口腔外科  
東京医科大学 産科婦人科学  
日本大学松戸歯学部  
医薬基盤研究所 プロテオームリサーチセンター  
東レ株式会社

平成22年1月18日

平成22年2月17日改訂

平成23年11月改訂

平成24年2月23日改訂（4版）

### 添付資料

1. 説明文書例
2. 同意書例

(対象とする臓器は施設により異なるため、〇〇と記載している)

## 1. 研究概要

### 【背景】

平成20年度まで実施された厚生労働省科学研究費補助金 第3次対がん総合戦略研究事業 研究課題「がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発」において、我々はプロテオミクス的手法を用い、膵がんと健常者を比較解析することから、いくつかの有力な新規血漿マーカーを発見し、膵がんの血液診断法の開発に一定の研究成果をあげた（同研究課題総合研究報告）。この研究の過程から、さらにより疾患特異的なマーカーを開発することと、膵がん以外の臓器のがんの発見を目指したマーカー開発が必要であることを認識した。しかし、同研究課題で行った多施設共同研究「プロテオーム解析による新しい膵がん血液診断法の有用性を検討する多施設共同研究（17-88）（平成21年3月31日にて終了）」で集積された検体は膵がんなどの消化器領域のがんや鑑別疾患の対象となる良性疾患患者のものに限られ、またがん検診に応用した際に比較対象となる健常者の症例数が充分ではなかった。

一方、最近2DICAL (2-Dimensional Image Converted Analysis of Liquid chromatography and mass spectrometry) 法やRPPA (Reverse-Phase Protein Arrays) 法などの新たなプロテオミクス解析手法が開発されてきている。これらの手法は従来にない感度を有し、今までは困難とされた低発現量のタンパク質の解析も可能であり、これらの方法を応用することで新たな腫瘍マーカーが発見される可能性が出てきた。また、平成20年度よりは厚生労働省科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業 研究課題「疾患関連創薬バイオマーカー探索研究」に研究分担者として加わり、医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターの大規模な研究設備を用いて、さらなる解析能力の向上が得られてきている。

今回種々の臓器のがんに特異的な血液腫瘍マーカーの開発を目的として新規の多施設共同研究を計画する。「プロテオーム解析による新しい膵がん血液診断法の有用性を検討する多施設共同研究」（以下「研究17-88」とする）で行われた血液収集法は合理性と倫理性が十分確保されたものであることが実証されており、同じ検体収集法を本研究に採用し、「研究17-88」の検体と併合解析する。

### 【目的】

がん検診に有用な血液腫瘍マーカーを開発することを最終的な達成目標として、種々臓器のがん患者と対照者で量あるいは翻訳後修飾に変化のある血清・血漿タンパク質を同定することを目的とする。

### 【対象】

下記の疾患患者および健常者を対象とする

1) 肺がん、膵がん、胃がん、大腸がん、卵巣がん、口腔がん、その他の臓器のがん

## 2) 同じ臓器の良性腫瘍、炎症性疾患等の良性疾患

【方法】多施設共同研究にて、種々のがん患者、良性腫瘍・炎症性疾患等の良性疾患患者、健常者の血清・血漿を集積し、国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野や医薬基盤研究所にてプロテオーム解析手法を用いて臓器・疾患特異的、かつ早期から量や翻訳後修飾が変化するタンパク質を同定する。さらに測定系を構築し、検診への応用可能性を検討する。

## 2. 多施設共同研究か、班研究か、全体の組織と責任者氏名

1) 本研究は多施設共同研究である。

2) 研究者の一部は平成21年度より23年度の3ヵ年計画で申請する厚生労働省第3次対がん総合戦略研究事業、平成23年度より25年度の3ヵ年計画で申請する厚生労働省難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業の研究組織に属する。利益相反に関して厚生労働科学研究費補助金の申請時に委員会へ申出る。

### 3) 全体の組織

#### 研究総括

国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野 分野長 山田哲司

#### 試料採取、匿名化、個人情報管理

大阪医科大学 感覚器機能形態医学講座	口腔外科	教授	島原政司
和歌山県立医科大学	口腔顎顔面外科学講座	教授	藤田茂之
日本医科大学内科学	呼吸器・感染症・腫瘍部門	主任教授	弦間昭彦
国立病院機構大阪医療センター		統括診療部長	中森正二
東京医科大学	第三外科	准教授	土田明彦
大阪府立成人病センター	検診部	副部長	井岡達也
埼玉県立がんセンター	歯科口腔外科	医長	八木原一博
東京医科大学	産科婦人科学	講師	西 洋孝
日本大学松戸歯学部放射線学講座		教授	金田 隆
日本大学松戸歯学部口腔インプラント学講座		教授	加藤仁夫

(順不同)

(上記以外の施設にも今後共同研究者を増やす予定であるが、その際には国立がん研究センター倫理審査委員会に変更申請を行う。)

#### プロテオーム解析、統計解析、免疫測定系開発

国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野	ユニット長	尾野雅哉
	ユニット長	本田一文
医薬基盤研究所 プロテオームリサーチセンター	センター長	朝長 毅
東レ株式会社 先端融合研究所	主席研究員	河合英樹
	研究員	小林道元

(上記以外の施設にも今後共同研究者を増やす予定であるが、その際には国立がん研究センター倫理審査委員会に変更申請を行う。)

さらに上記の研究者が指導・管理する癌研究振興財団のリサーチレジデント、医師または歯科医師、研究補助員が研究協力者として研究を実施する。

#### 4) 責任者氏名

山田哲司 (研究所創薬臨床研究分野長)

### 3. 統計学的背景：症例数と算定根拠など

#### 予定 (目標) 症例数：

膵がん：	60例 (担当：井岡、中森、土田)
口腔がん：	20例 (担当：島原、藤田、八木原、 金田、加藤)
胃がん：	60例 (担当：中森、土田)
大腸がん：	60例 (担当：中森、土田)
肺がん	40例 (担当：弦間)
卵巣がん	20例 (担当：西)
その他の悪性腫瘍：	50例 (担当：上記全員)
良性腫瘍：	20例 (担当：上記全員)
その他の良性疾患：	100例 (担当：上記全員)
健常者：	200例 (担当：上記全員)
合計	630例

#### 算定根拠：

理想的にはできるだけ多くの症例数を確保したいが、「研究17-88」での実績と厚生労働科学研究費補助金の予算規模、研究期間を加味し、集積予定症例数を集計した。

#### 4. 対象選定基準

20 歳以上で、本研究の参加について添付した説明文を用いて、十分な説明を行った後、自由意志に基づいて書面により同意を得ていること。提供者よりの同意の撤回があった場合は迅速に対象から除外し、検体は適切な方法で破棄する。

腫瘍患者（肺がん、膵がん、胃がん、大腸がん、卵巣がん、口腔がん、その他の臓器のがんおよび良性腫瘍）

病理学的診断がなされているか、または 3 ヶ月以内に病理学的診断が予定されている

悪性腫瘍に対する前治療歴のある例は除外する

他のがんの既往や合併のある例は除外する

炎症性疾患患者、良性疾患患者

診断基準に沿った臨床診断がなされている確診例

悪性腫瘍に対する前治療歴のある例は除外する

他のがんの既往や合併のある例は除外する

健常者

各施設を検診や歯科治療、インプラント治療などの目的で受診した例  
がんの既往のある例は除外する

#### 5. 研究の実施の場所と方法

研究の実施場所

試料採取、匿名化など個人情報管理、臨床情報収集、検体一時保存

大阪医科大学病院、日本医科大学病院、和歌山県立医科大学病院、東京医科大学病院、国立病院機構大阪医療センター、大阪府立成人病センター、埼玉県立がんセンター、日本大学松戸歯学部

検体一時保存、既存腫瘍マーカーの測定

株式会社エスアールエル

検体保管、プロテオーム解析、統計解析、臨床応用性の検討

国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野



## プロテオーム解析

医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンター

(上記以外の施設にも今後共同研究者を増やす予定であるが、その際には国立がん研究センター倫理審査委員会に変更申請を行う。)

## 研究の方法

### 5-1. 検体の種類・量

末梢血： 2検体 (合計 13 ml)

1検体 (7 ml) から血漿を分離し、プロテオーム解析に用いる。

1検体 (6 ml) から血清を分離し、既存の腫瘍マーカー(CEA, CA19-9, DuPan2, CA125, CYFRA など対象疾患によって異なる)を測定する。

### 5-2. 検体の採取

がん患者に対しては未治療時と手術後再来時に採血をおこなう。良性疾患、および健常者に対しては、承諾が得られた時点で採血を行う。別添の説明同意文書を利用して十分な説明の上、書面で承諾を得た上で、全血を符号化した検体識別番号以外、姓名などの個人情報に関連するような事項が記載されていない専用の血漿採取用 EDTA 2Na 含有真空採血管に 7 mL、血清採取用真空採血管に 6 mL 採取し、各施設で一時保存する。採血管には連番の検体番号以外、個人情報に関連するような事項は記載されない。

### 5-3. 検体の搬入・処理

検体は担当医師の記入した検体識別番号以外、姓名などの個人情報に関連するような事項が記載されていない専用の匿名化専用依頼書とともに、検体検査委託契約を結んだ株式会社エスアールエル (東京都立川市曙町二丁目 41 番 19 号) の地域担当営業所によって各施設より収集され、同社の八王子ラボラトリー (東京都八王子市小宮町) に集められる。

同社は血清を用いて既存腫瘍マーカーを測定する。残りの検体は一時的に同社八王子ラボラトリーに $-20^{\circ}\text{C}$ 保存され、1週間に1回、凍結保存状態で国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野に搬入する。

国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野にて専用の凍結保存チューブに分注し、再度 $-80^{\circ}\text{C}$ にて測定まで専用の冷凍庫で凍結保存する。凍結保存チューブには検体識別番号以外、個人情報に関連するような事項は記載されない。同実験室は作業時間以外常時施錠し、関係者以外を入室させない。

また、医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターへは、測定必要量を検体識別番号のみを記載したチューブに分注し、凍結保存状態で輸送する。仮に残存が出た場合の検体は廃棄する。

#### 5-4. 検体の保存および廃棄

検体は国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野の冷凍庫で凍結保存する。提供者との同意事項により検体を廃棄する場合には、充分の水道水で希釈し、廃棄する。

検体は研究期間終了後も同所に保管され、国立がん研究センターの倫理審査委員会による審査と承認後、別の研究に使用される場合がある。ただし、更なる研究の目的は腫瘍マーカーの開発に限定した（遺伝子研究は含まない）ものとする。

#### 5-5. 個人識別情報の管理と符号化の方法

検体は登録された時点で、各施設の検体管理責任者が検体識別番号により符号化する。具体的には症例登録時に検体に対応する個人識別情報は施設、症例番号を示す6文字の英数字に変換し、以後、検体は符号化された番号のみで取り扱い、解析に用いる。症例・符号対照表は、各施設の共同研究者により厳重に保管する。

#### 5-6. 測定結果の開示

提供者にプロテオームの解析結果は開示しない。既存の腫瘍マーカーに関しては株式会社エスアールエルより担当医師に報告する。

#### 6-7. プロテオーム解析方法

国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野および医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターにてプロテオーム解析を行い、タンパク質の発現や翻訳後修飾を網羅的に解析する。

### 6. 研究材料、使用機器とそれらを得る方法

#### 研究材料

末梢血： 2検体（合計 13 ml）

1検体（7 ml）から血漿を分離し、1検体（6 ml）から血清を分離し、マーカー開発、および、既存腫瘍マーカーの測定を行う。

## 使用する機器

- 1) 質量分析計 Q-star XL (Applied Biosystems 社製)
- 2) 質量分析計 Q-star pulsar-i (Applied Biosystems 社製)
- 3) 質量分析計 QTOF ultima (Waters 社製)
- 4) 質量分析計 NanofrontierLD (Hitachi 社製)
- 5) 質量分析計 LTQ Orbitrap XL ELD (Thermo 社製)
- 6) 質量分析計 AB SCIEX QTRAP5500 (Applied Biosystems 社製)
- 7) 質量分析計 Ultra flexIII (Burker 社製)
- 8) 質量分析計 Maxis (Burker 社製)
- 9) 質量分析計 Synapt HDMS (Waters 社製)
- 10) 質量分析計 PrOTOF 2000 (パーキンエルマー社製)
- 11) プロテインマイクロアレイヤー (カケンジェネックス社製)
- 12) プロテインアレイスキャナー (イノプシス社製)
- 13) その他の関連機器

いずれの機器も既に国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野、または医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターに設置済みである。

## **7. 観察項目、臨床検査項目、観察方法、追跡観察期間**

### 創薬臨床研究分野に提供される観察項目、臨床検査項目

臨床情報は、担当医師から検体とは別途郵送される検体識別番号により符号化された採血前確認書と症例報告書を用いて郵送にて収集する。個人の特定につながるような情報は含まれない。採血前確認書と症例報告書はそれぞれの施設で倫理審査委員会あるいはそれに相当する組織で審査を受ける。

送付先：〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1  
国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野 山田哲司

#### 7-1. 採血前確認書

生年月日、年齢、性別、採血日、採血前診断名、病理学的診断の有無（予定）、前治療の有無、がんの既往や合併の有無

#### 7-2. 症例報告書

全例に共通の情報

病理学的診断の有無（組織型）、最終診断名

がん患者からの情報

原発部位、UICC-TNM 分類（各がんの最新版）、原発巣の最大径、転移臓器

良性腫瘍患者からの情報

原発部位、病名、原発巣の最大径

他の良性疾患患者からの情報

病名

全症例からの情報

逸脱事項の有無

本研究は上記の項目とプロテオーム解析結果を比較する研究であり、追跡観察は行わない。

#### 8. 患者およびその家族に対する説明と同意を得る方法

担当医師あるいは担当医師が指導・指定した代理人により、研究の内容・目的、不同意による不利益がないこと、さらに同意がいつでも撤回できること、個人情報 は 厳重に管理されることを口頭と説明文書を用いて説明した後、自由意志にて同意を得られ、同意文書に署名した提供者の検体を持ちいる。説明文書と同意文書はそれぞれの倫理審査委員会あるいはそれに相当する組織で審査を受ける。

#### 本研究で予測される成果

本研究では各種がん患者、良性疾患患者、健常者の血液を臨床情報とともに多施設の共同研究によりプロスペクティブに多数の症例を集積し、プロテオーム解析による臓器・疾患特異的、かつ早期のがんから量や翻訳後修飾が変化する血液タンパク質を同定し、新たな腫瘍マーカーを開発する。本研究の推進により、がんの早期発見を実現し、がん死亡率の激減に寄与する成果が期待される。

9. 評価方法とその基準、解析方法、判定の指標とその判定基準は明示されるか。

学術論文や学会発表として発表する際に明示される。

#### 10. 有害事象のチェック項目とチェック方法、報告方法

本研究で用いる検体は血漿、血清のみであり、通常の臨床上必要な採血に際し、13 mL の採血管を追加するのみで可能である。従って、身体的な危険や負担