

0. 概要

0.1. 目的

1) 目的 1: MGMT 測定 of 最適な方法の検討

膠芽腫において、O⁶-methylguanine DNA-methyltransferase (MGMT) DNA 修復遺伝子がプロモーターのメチル化により後成的に Silencing することで、アルキル化剤で障害を受けた腫瘍細胞の DNA の修復が妨げられ、生存期間が延長すると報告されている。しかし、MGMT 測定法は数多く報告されており、どの手法が適切なものかについての結論は下されていない。本研究では、タンパクと DNA メチル化の双方を定性的、定量的に測定し、膠芽腫に対する予後予測にとって最も適切な MGMT 測定法を探索的に検討することを第一の目的とする。

2) 目的 2: IT 療法の治療効果と MGMT 発現の関連の検討

JCOG0911「初発膠芽腫に対するインターフェロン-β + テモゾロミド併用化学放射線療法のランダム化第 II 相試験」では、膠芽腫の標準治療であるテモゾロミド(TMZ)と放射線併用療法にインターフェロン(IFN)-β を上乗せした IT 療法を試験治療として設定している。これは、IFN-β により腫瘍細胞の MGMT の発現が低下し、TMZ の作用が増強するであろうという理論的背景があるためである。この仮説が正しいければ、第 1 の目的で得られた最適な MGMT の測定方法で MGMT の発現割合が高い患者(MGMT プロモーターDNA メチル化の低い患者)に対して IFN-β の上乗せ効果が高いことになる。この仮説が正しいかどうかを探索的に検討することを第 2 の目的とする。

3) 目的 3: 膠芽腫における既知・未知バイオマーカーの探索的な検討

第 3 の目的として、腫瘍細胞の第 10 染色体長腕(10q)の欠失や第 1 染色体短腕(1p)および第 19 染色体長腕(19q)の欠失、TP53、CDKN2A 遺伝子の変異、また EGFR の過剰増幅や PTEN の異常などの既知の予後因子を個々に評価し、さらに mRNA、microRNA 発現の網羅的解析、SNP-Microarray による全染色体の網羅的解析を行うことで、膠芽腫に対する予後因子、効果予測因子となりうる既知・未知バイオマーカーを探索的に検討する。

0.2. 対象

本附随研究は、試料の外部提供を含めて本附随研究計画書に関する倫理審査委員会(Institutional Review Board: IRB)などの審査承認に基づく医療機関の長の承認が得られた施設で、JCOG0911「初発膠芽腫に対するインターフェロン-β + テモゾロミド併用化学放射線療法のランダム化第 II 相試験」に登録された 120 例の患者を対象とする。本附随研究の参加に際しては、本体研究である JCOG0911 への参加同意とは別に、患者の同意を必要とし、患者本人より同意が得られ、かつ、手術時切除腫瘍組織の凍結保存検体が得られている場合のみ、本附随研究に登録する。

本体研究 JCOG0911 の予定登録数が 120 例であることから、本附随研究の登録数は 80-120 例と見込んでいる。

0.3. 方法

1) 本附随研究への参加同意が得られた場合、下記の①から④のすべてを参加施設から附随研究事務局(以下、試料解析研究事務局)に送付する。

- ① 腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本
- ② 凍結腫瘍標本
- ③ 血液標本
- ④ JCOG 登録番号、患者イニシャルを記載した「標本依頼書」

2) 各試料解析実施施設において以下の測定を行う。

試料解析研究事務局は、提出された標本依頼書と試料を各試料解析施設にまとめて送付する。①腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本は、静岡県立静岡がんセンター病理診断科に送付する。②凍結腫瘍標本、③血液標本に関しては、試料解析研究事務局にて DNA、RNA、miRNA の抽出を行った後、JCOG 登録番号、患者イニシャルを記載したサンプルチューブを、名古屋大学脳神経外科、ファルコバイオシステムズ、東京大学医学部附属病院 Cancer board 研究室へ送付する。

- ① 名古屋大学脳神経外科: MGMT メチル化解析、TP53、IDH1/2 変異解析、mRNA 発現解析、microRNA(miRNA)解析
- ② 静岡県立静岡がんセンター病理診断科: MGMT 免疫染色
- ③ ファルコバイオシステムズ: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法
- ④ 東京大学医学部附属病院 Cancer board 研究室: SNP-array

- 3) JCOG データセンターおよび試料解析研究事務局で、試料の測定結果と、JCOG0911 における化学療法の効果および患者背景等の臨床情報との関連性を解析する。

MGMT メチル化および、MGMT 免疫染色の測定結果は、試料解析研究事務局から JCOG データセンターに送付され、JCOG データセンターにて、目的 1、目的 2 の関連を検討する。

JCOG データセンターから試料解析研究事務局に JCOG0911 で得られた臨床データが送付され、*TP53*、*IDH1/2* 変異解析、mRNA 発現解析、miRNA 解析、MLPA 法、SNP-array の測定結果と臨床データとの関連解析を試料解析研究事務局で行う。

- ① 目的 1:MGMT 測定の最適な方法の検討
- ② 目的 2:IT 療法の治療効果と MGMT 発現の関連の検討
- ③ 目的 3: 膠芽腫における既知・未知バイオマーカーの探索的な検討

0.4. 使用予定試験と研究期間

JCOG0911 の予定登録数が 120 例であることから、本附随研究の登録数は 80-120 例と見込んでいる。附随研究参加施設で最初の倫理審査委員会等の承認に基づく医療機関の長の承認(以下、IRB 承認)が得られた日をもって研究開始とし、順次、承認が得られた参加施設からの試料の収集を行う。研究期間は 5 年間を見込む。

0.5. 研究機関

- 1) JCOG0911「初発膠芽腫に対するインターフェロン-β + テモゾロミド併用化学放射線療法のランダム化第 II 相試験」の参加施設のうち、試料の外部提供を含めて本附随研究計画書に関する IRB 承認が得られた施設
- 2) JCOG データセンター
- 3) 名古屋大学脳神経外科
- 4) 静岡県立静岡がんセンター病理診断科
- 5) 株式会社ファルコバイオシステムズ
- 6) 東京大学医学部附属病院 Cancer board 研究室

0.6. 問い合わせ先

試料解析研究事務局: 夏目敦至

名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経外科

〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65

TEL: 052-744-2355 (ダイヤルイン)

FAX: 052-744-2361

E-mail: anatsume@med.nagoya-u.ac.jp

目次

0. 概要.....	2
0.1. 目的.....	2
0.2. 対象.....	2
0.3. 方法.....	2
0.4. 使用予定試験と研究期間.....	3
0.5. 研究機関.....	3
0.6. 問い合わせ先.....	3
1. 目的.....	6
2. 背景.....	7
2.1. 膠芽腫の病理と分子遺伝学.....	7
2.2. 膠芽腫における MGMT の役割と評価方法.....	7
2.3. 膠芽腫で予後と関連すると考えられる MGMT 以外のバイオマーカー.....	9
2.4. 本研究の意義.....	10
3. 対象.....	10
4. 方法.....	11
4.1. 試料解析研究参加施設.....	11
4.2. 試料解析実施施設.....	11
4.3. 対象となる臨床試験(本体研究).....	11
4.4. 参加施設の役割.....	11
4.5. 試料解析研究事務局の役割.....	13
4.6. 試料解析実施施設の役割.....	14
4.7. JCOG データセンターの役割.....	16
5. 統計的事項.....	16
5.1. 解析対象となるデータの要約、一般化を否定する状況に無いことの確認.....	16
5.2. 目的 1: MGMT 測定之最適な方法の検討.....	16
5.3. 目的 2: IT 療法の治療効果と MGMT 発現の関連の検討.....	17
5.4. 目的 3: 既知のバイオマーカーの評価および網羅的解析手法による新たな予後因子、効果予測因子の探索.....	18
5.5. 統計解析施設.....	20
6. 予測されるメリットおよびデメリット.....	20
6.1. 本附随研究に参加した患者のメリットおよびデメリット.....	20
6.2. JCOG のメリットおよびデメリット.....	20
7. 倫理的配慮.....	20
7.1. 患者の保護.....	20
7.2. インフォームドコンセント.....	21
7.3. 個人情報の保護と患者識別.....	21
7.4. 医療機関の倫理審査委員会の承認.....	22
7.5. JCOG 研究に関わる者の利益相反(COI)の管理について.....	23
8. 研究資金.....	23
9. 予定検体数と研究期間.....	23

10.	研究組織	23
10.1.	グループ代表者	23
10.2.	研究代表者	23
10.3.	試料解析研究事務局	23
10.4.	試料解析実施施設及び責任者	24
10.5.	参加施設	24
10.6.	統計解析責任者	24
11.	委託研究契約	24
12.	研究結果の公表	25
13.	附図: 試料の流れ	26
14.	参考文献	26

1. 目的

1) 目的 1

膠芽腫において、O6-methylguanine DNA-methyltransferase (*MGMT*) DNA 修復遺伝子がプロモーターのメチル化により後成的に Silencing することで、アルキル化剤で障害を受けた腫瘍細胞の DNA の修復が妨げられ、生存期間が延長すると報告されている。しかし、*MGMT* 測定法は数多く報告されており、どの手法が適切なのかについての結論は下されていない。本研究では、タンパクと DNA メチル化の双方を定性的、定量的に測定し、膠芽腫に対する予後予測にとって最も適切な *MGMT* 測定法を探索的に検討することを第一の目的とする。

2) 目的 2

JCOG0911「初発膠芽腫に対するインターフェロン- β + テモゾロミド併用化学放射線療法のランダム化第 II 相試験」では、膠芽腫の標準治療であるテモゾロミド (TMZ) と放射線併用療法にインターフェロン (IFN)- β を上乗せした IT 療法を試験治療として設定している。これは、IFN- β により腫瘍細胞の *MGMT* の発現が低下し、TMZ の作用が増強するであろうという理論的背景があるためである。この仮説が正しいければ、第 1 の目的で得られた最適な *MGMT* の測定方法で *MGMT* の発現割合が高い患者 (*MGMT* プロモーター DNA メチル化の低い患者) に対しては IFN- β の上乗せ効果が高いことになる。この仮説が正しいかどうかを探索的に検討することを第 2 の目的とする。

3) 目的 3

第 3 の目的として、腫瘍細胞の第 10 染色体長腕 (10q) の欠失や第 1 染色体短腕 (1p) および第 19 染色体長腕 (19q) の欠失、*TP53*、*CDKN2A* 遺伝子の変異、また *EGFR* の過剰増幅や *PTEN* の異常などの既知の予後因子を個々に評価し、さらに mRNA、microRNA 発現の網羅的解析、SNP-Microarray による全染色体の網羅的解析を行うことで、膠芽腫に対する予後因子、効果予測因子となりうる既知・未知バイオマーカーを探索的に検討する。

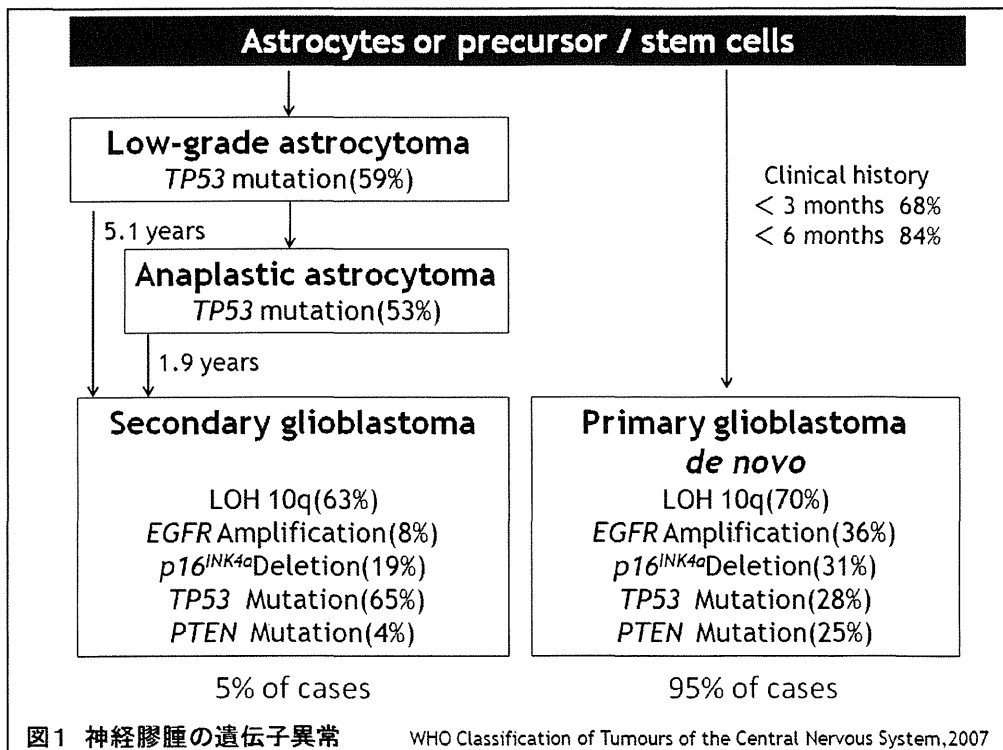
2. 背景

2.1. 膠芽腫の病理と分子遺伝学

神経膠腫 (glioma) は成人原発脳腫瘍の約 3 割を占め、その最も悪性型である膠芽腫 (glioblastoma) は生存期間中央値が 1 年以下と非常に予後不良である。分子生物学、分子遺伝学の進歩と、その知識の癌研究への応用によって、腫瘍とは遺伝子の異常によっておこる病気であることが明らかになってきた。細胞が腫瘍化するためには、ひとつの遺伝子異常だけでなく、いくつもの遺伝子異常が重なる必要があるという多段階発癌説が現在の共通認識であり、実際に腫瘍は様々な遺伝子異常を示している。理論的にはそうした遺伝子異常のパターンによって腫瘍細胞の生物学的特性を予測することは可能であり、それが遺伝子診断の根拠になっている。上衣腫を除く神経膠腫は、星細胞腫系腫瘍 (astrocytic tumor) と乏突起膠腫系腫瘍 (oligodendroglial tumor) が連続的なスペクトラムを構成し、多彩な組織像を呈するため、病理診断は必ずしも容易ではなく、診断医によってかなりばらつきがある。膠芽腫の病理診断は星細胞腫系腫瘍と乏突起膠腫系腫瘍という形態的な組織像の区分に依らず、異形成の強い腫瘍細胞、核分裂像、壊死や血管増生が随所に認められれば、膠芽腫と診断される。

膠芽腫には、短期間に症状が進行して予後不良の転帰をとる一次性膠芽腫 (primary glioblastoma) と、low-grade astrocytoma や anaplastic astrocytoma から悪性転化する比較的予後良好な二次性膠芽腫 (secondary glioblastoma) があるが (図1)、両者は同様の組織形態を示すことから組織学的には鑑別は不可能である。しかし、primary glioblastoma では *TP53* 遺伝子の変異率は低く (~28%)、*EGFR* の過剰発現や増幅が高頻度であり、逆に secondary glioblastoma では *TP53* 変異が高頻度で、*EGFR* の過剰発現は稀であることから、Genotype の解析により、両者の鑑別はある程度可能と言える。また、primary glioblastoma に高頻度にみられる遺伝子異常として、*PTEN* 変異、*p16INK4a* homozygous deletion、10q 欠失が知られている (図1)。

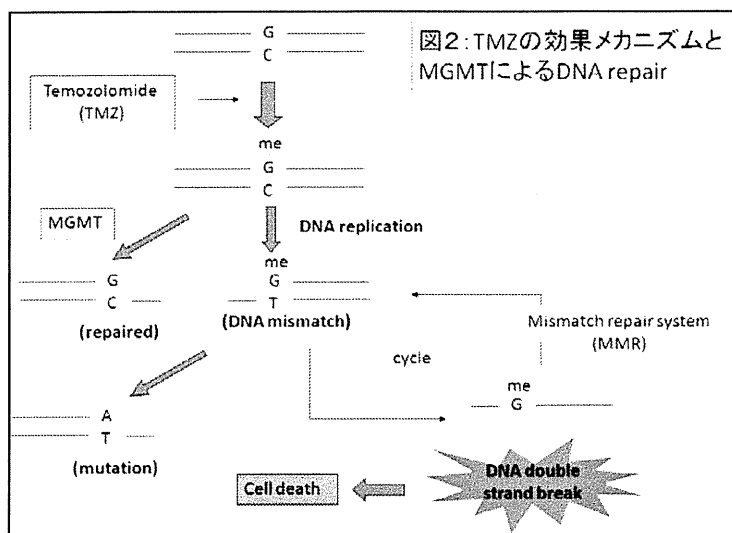
一方、乏突起膠腫系腫瘍に染色体 1p、19q の欠失などの特徴的な遺伝子異常が存在することが見出され、その遺伝子異常を示す腫瘍が化学療法に高い感受性を示し予後が良好なことはよく知られている。



2.2. 膠芽腫における MGMT の役割と評価方法

膠芽腫に対する標準治療は、局所放射線照射と TMZ の併用である。しかし、未だ、治癒が得られる治療法とはなっていない。その主な原因は、腫瘍細胞での MGMT 発現によるアルキル化薬剤に対する耐性であると考えられている。アルキル化剤は、DNA 中の guanine をアルキル化し O^6 -methylguanine (O^6 -meG) を形成する。 O^6 -meG は DNA 複製の際、thymine とミスマッチを形成し、細胞は mismatch repair system を介して、thymine を除去する。ところが、 O^6 -meG が存在する限り、再び thymine とミスマッチを形成し、このサイクルを繰り返していく

うちに細胞死に至る。これがアルキル化剤の抗腫瘍メカニズムのひとつであると考えられている⁽¹⁾(図 2)。しかし、細胞に MGMT が発現していると O⁶-meG のメチル基を脱転移する。これまでの報告では腫瘍細胞の MGMT 発現が高い場合、アルキル化剤の感受性が悪いため予後不良となることが示唆されている⁽²⁻⁶⁾。また、MGMT は悪性神経膠腫の約 70% に発現し、その発現は *CDKN2A* 癌抑制遺伝子などと同様に遺伝子プロモーターのメチル化により調節されていて、MGMT プロモーターがメチル化されると転写不活化され、MGMT 遺伝子の発現が見られないことが分かっている^(7,10-13)。さらに、European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) と National Cancer Institute of Canada (NCIC) との共同第Ⅲ相試験において、MGMT プロモーターのメチル化を認めた場合は、予後が有意に良好である (hazard ratio: 0.45, 95%CI: 0.32 to 0.61) と報告され⁽¹³⁾、MGMT プロモーターのメチル化の有無が TMZ 療法を施行した場合の悪性神経膠腫患者の重要な予後因子であると考えられている。



2.2.1. MGMT の評価方法

先述の EORTC と NCIC との共同第Ⅲ相試験では、methylation-specific PCR (MSP)法によって MGMT プロモーターのメチル化を評価し、メチル化ありの群で有意に予後が良好であることを報告した⁽¹³⁾。よって現在までのところ、MSP 法が標準的な評価方法とみなされている。しかし、MSP は DNA の質に結果が大きく左右されるために結果のバラツキが大きいとともに、鋭敏な PCR を用いることから少量のメチル化 DNA の混在で陽性になり偽陽性が多く、また定量性に欠ける。

一方、pyrosequencing は、酵素と基質試薬を使用して、ポリメラーゼ塩基伸長反応によるルシフェラーゼ発光反応を検出することで塩基配列を解読する方法であり、伸長反応の際に生成されるピロリン酸と発光強度が完全に比例関係にあるため高精度な定量解析を行うことが可能である。

また、抗 MGMT 抗体による免疫組織化学染色は、汎用性のある評価方法であるが、定量性に乏しく、また、MGMT プロモーターのメチル化との関連は未だ確立されていない。

なお、その他、mRNA 解析の定量 RT-PCR 法やタンパク発現解析の Western blot 法もあるが、採取する組織検体の保存状況などで結果が左右される可能性があることから、本附随研究には含めない。

以上より、MGMT の評価方法として、MSP、pyrosequencing、免疫染色はそれぞれ長所、短所があり、どの評価方法が最適であるかは確立されておらず、また、どれによる結果が最も予後を反映するかは分かっていない。

2.2.2. MGMT と IFN- β の関連性

IFN- β は MGMT の発現を抑制することが報告されており、IFN- β を TMZ 投与前に前処置として用いることにより TMZ の効果が高まることが期待できる。低メチル化プロモーターにより MGMT を発現している脳腫瘍細胞株に対して IFN- β は MGMT 発現を抑制し、TMZ の抗腫瘍効果が増強されることや⁽⁷⁾、これらの脳腫瘍細胞株をヌードマウス皮下に移植した動物モデルで、IFN- β と TMZ それぞれ単独では抗腫瘍効果がみられない投与量においても腫瘍縮小効果を認めたことから、IFN- β と TMZ が相乗的な抗腫瘍効果を有することが示唆されたことが Natsume らにより報告されている⁽⁹⁾。これらの基礎研究が、JCOG0911 の試験治療である IT 療法の理論的根拠となった。脳腫瘍株では、MSP、pyrosequencing、免疫染色の結果は関連しているが、臨床腫瘍検体では、リンパ球や血管の混入など不均一な細胞組織成分から構成されるため、より複雑である。

2.3. 膠芽腫で予後と関連すると考えられる MGMT 以外のバイオマーカー

1) 第 1 番染色体短腕 (Chromosome 1p) と第 19 番染色体長腕 (Chromosome 19q) の欠失

神経膠腫における第 1 番染色体短腕 (1p) と第 19 番染色体長腕 (19q) の共通染色体欠失 (loss of heterozygosity: LOH) 領域は 1p36 と 19q13 とされるが、1pLOH は、一次性膠芽腫、二次性膠芽腫とも同じような割合で認められる(12-15%)。また 19qLOH は膠芽腫全体の 20-25%に認められ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾、特に、二次性膠芽腫の方が(54%)、一次性膠芽腫(6%)よりも頻度が高いと報告されている⁽¹⁶⁾。また乏突起膠細胞系腫瘍では、1p と 19q の LOH が認められる症例は治療反応性が良いとされている⁽¹⁷⁾。2006 年 EORTC と Radiation Therapy Oncology Group (RTOG)における共同第Ⅲ相試験では、退形成性乏突起膠腫、退形成性乏突起星細胞膠腫に対する化学療法が PCV 療法 (Procarbazine+CCNU+Vincristine) かそれ以外の治療かに依らず、1p19qLOH がある場合には生存期間が長かった。したがって、1p19qLOH を有する腫瘍は生物学的に治療反応性が高いと報告されている^(18,19)。さらに、1p19qLOH は PCV 療法に対する反応性のみならず、退形成性乏突起膠腫に対する TMZ 感受性予測因子であることも報告され⁽¹²⁻¹⁴⁾、低悪性度神経膠腫においても MGMT のメチル化と 1p19qLOH を認めれば、TMZ による良好な治療成績が認められている^(19,20)。また膠芽腫においては、1p と 19q 双方の欠失は膠芽腫の 73 例中 5 例 (7%) にみられ、この 5 例の生存期間は有意に長かったとの報告がある⁽²¹⁾。

2) 第 10 番染色体長腕 (Chromosome 10q) の欠失

第 10 番染色体長腕 10q の欠失は、一次性、二次性いずれの膠芽腫でも最も高頻度で見られるが(60-80%)⁽²²⁻²⁵⁾、二次性膠芽腫では部分欠失であるのに対し、一次性膠芽腫では全欠失であることが多いとされている。初発膠芽腫の遺伝子解析の結果、10q の欠失がある方が予後不良であったとの報告がある⁽²⁵⁾。

3) Phosphatase and tensin homolog (PTEN)

第 10 番染色体長腕 10q23.3 領域に存在する癌抑制遺伝子である phosphatase and tensin homolog (PTEN) は、PIP3 の活性をコントロールし細胞増殖や浸潤の抑制に関わっていると考えられている⁽²⁶⁾。

一次性膠芽腫においては PTEN 異常が 15-40%にみられ、4%しかないと言われる二次性膠芽腫とは明らかに異なる⁽²⁷⁾。

4) Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

EGFR 遺伝子は、第 7 番染色体 (Chromosome 7) に存在し、細胞表面に発現する 170kDa の糖蛋白を code しており、受容体型チロシンキナーゼの一種で、癌遺伝子として知られている。特に EGFR の増幅は予後不良の primary glioblastoma で secondary glioblastoma よりも有意に高頻度で検出される。膠芽腫のうち小型の類円形の細胞が密に増殖する small cell glioblastoma では通常の膠芽腫よりも高頻度に (~65%) で EGFR の増幅が検出される⁽²⁸⁾。

5) Tumor protein 53 (TP53)

TP53 遺伝子は染色体 17p13.1 に存在する約 20kb の遺伝子であり、腫瘍抑制遺伝子の 1 つである。15 カ国の多施設から WHO が収集した 987 例の膠芽腫の TP53 変異を検索したところ、TP53 変異が見られる膠芽腫が優位に予後良好であったという報告がある⁽²⁵⁾。また TP53 変異を持つ低悪性度の神経膠腫から膠芽腫に悪性化する progression pathway と、TP53 変異を認めず第 10 番染色体長腕の欠失と EGFR 増幅を持ちながら膠芽腫が発生する de novo pathway があると言われている⁽²⁹⁾。TP53 変異は二次性膠芽腫の 65%以上に認められ、一次性膠芽腫では約 25%と頻度が少なく、両者では変異の位置も異なっていることから、異なった分子学的メカニズムが存在することが示唆されている^(25,30)。

6) Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)

CDKN2A 遺伝子は第 9 番染色体短腕上 9q21 に存在し、その遺伝子変異が低悪性度神経膠腫の 10%、高悪性度神経膠腫の 60%と高いと言われている。CDKN2A は細胞周期を正に制御する CDK4 に結合しその機能を抑制している。CDKN2A のプロモーター領域のメチル化による転写抑制や点突然変異など CDKN2A 不活化の他のメカニズムが報告されている^(31,32)。

7) Isocitrate dehydrogenase (IDH) 1, IDH 2

IDH1 遺伝子変異は膠芽腫において 20,661 遺伝子を網羅的に解析したことによって見出された新しい遺伝子異常である⁽³³⁾。IDH1 変異は TP53 変異をもつ二次性膠芽腫や、低悪性度の神経膠腫に多く認められ、一次性膠芽腫では稀である。それに対し IDH2 変異は全ての神経膠腫において稀である。IDH 変異の起こるコドンはほぼ決まっていて、IDH1 においてはコドン 132 のアルギニンがヒスチジンに変化(R132H)する人が多い。IDH は TCA サイクルにおいてイソクエン酸を α ケトグルタル酸に変換する酵素であるが、R132H IDH1 変異体は α ケトグルタル酸をさらに還元し、2-ヒドロキシグルタル酸を生成する⁽³⁴⁾。一般的に二次性膠芽腫が一次性膠芽腫よりも予後が良いと知られているので、膠芽腫において IDH1 変異が予後良好因子であることは理にかなっている。

一方、退形成性星細胞腫においても *IDH1* 変異は予後良好因子であると報告されている。

以上に示す膠芽腫関連の遺伝子変異の予後因子候補の他に、今後、新たに候補として考えられる分子についても研究対象とする。なお、腫瘍標本により、抽出される DNA の収量には多寡が予測されるため、DNA 量の制限により上記の全てを測定できない場合も予想される。その際の測定優先順位は上記の記載順とする。

2.4. 本研究の意義

JCOG0911 は初発膠芽腫に対する Temozolomide(TMZ)と Interferon- β (IFN- β)を併用した化学放射線療法の有効性と安全性を検討し、同療法が TMZ 単独での化学放射線療法との第 III 相試験を行うべき有望な治療法であるかどうかを判断することを目的とした試験であり、Primary endpoint として全生存期間、Secondary endpoint として無増悪生存期間、完全奏効割合、奏効割合、有害事象発生割合、重篤な有害事象発生割合を評価することになっている。2010 年 4 月より登録が開始され、予定登録期間は 1.5 年、追跡期間は 2 年の総研究期間が 3.5 年の研究である。

本附随研究の意義を目的別に記載する。

1) 目的 1

目的 1 の意義は、MGMT 評価法の確立である。上述のように、MGMT には数多くの評価法があるが、どの測定法が最も予後予測に有用であるかは分かっておらず、MSP も標準的な評価方法とは言えない。代表的な 3 つの MGMT 評価方法(免疫染色、MSP、pyrosequencing)を解析したタンパクと DNA メチル化の双方を定性的、定量的に測定することで、本研究により膠芽腫に対する予後予測にとって最も適切な MGMT 測定法が得られる価値は大きい。

2) 目的 2

本附随研究と JCOG0911 の結果のサブ解析で「MGMT が高発現をしている膠芽腫患者では、TMZ 単独療法よりも IT 併用療法の方が予後が良い」という結果が示唆された場合、MGMT が高発現している膠芽腫に対しては IFN- β と TMZ の併用化学放射線療法を行い、MGMT が低発現の膠芽腫に対しては TMZ 単独療法を行うなどの、個別化治療にもつながる可能性があると考えている。

3) 目的 3

現在世界で実施されている大規模臨床試験の中で、1p/19qLOH の有無が患者選択規準や、割り付け調整因子と設定されている。MLPA 法によって既知の関連ゲノム領域検査の臨床応用のバラツキを小さくすることができる可能性がある。

更に、本臨床研究において得られる臨床的なデータの分子生物学的な裏付けの一助として、神経膠芽腫におけるゲノム異常や mRNA 発現の多寡、microRNA の異常な発現を網羅的に調べることによって、一つの分子異常では説明できない臨床的データであってもその分子に関連するシグナル上の別の分子異常によって説明できる可能性を有するという点で意義のあることと思われる^(33,34,35)。つまり、病理組織分類では同一の膠芽腫であっても、臨床データとこれらの分子的な網羅的解析データを統合することによって、化学放射線療法における感受性や予後に関連した再分類をすることができる可能性がある。

3. 対象

JCOG0911 に登録された 120 例の患者のうち、試料の外部提供を含めて本附随研究計画書の IRB 承認が得られ、本人より同意が得られた患者を対象とする。

対象となる臨床試験の予定登録数が 120 例であることから、本附随研究の登録数は 80-120 例と見込んでいく。

4. 方法

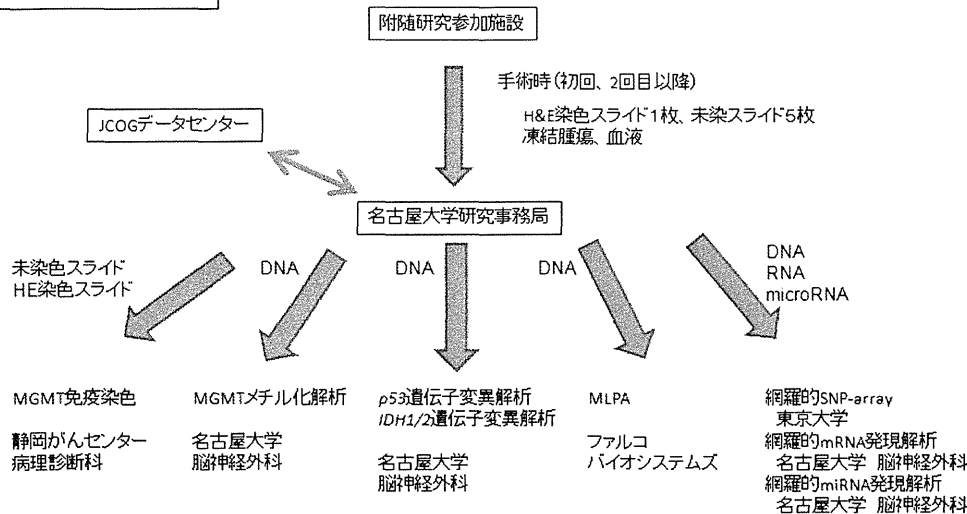
4.1. 試料解析研究参加施設

JCOG0911 の参加施設のうち、本附随研究の実施について倫理審査委員会等の審査承認に基づく医療機関の長の承認が得られた施設。

4.2. 試料解析実施施設

名古屋大学脳神経外科、静岡県立静岡がんセンター病理診断科、株式会社ファルコバイオシステムズおよび東京大学医学部附属病院 Cancer board 研究室。

図3 研究組織図



4.3. 対象となる臨床試験(本体研究)

脳腫瘍グループ: グループ代表者 渋井壮一郎

JCOG0911「初発膠芽腫に対するインターフェロン β + テモゾロミド併用化学放射線療法のランダム化第II相試験」

研究代表者 若林俊彦、JCOG0911 研究事務局 夏目敦至

4.4. 参加施設の役割

4.4.1. 同意取得

JCOG0911 への参加の同意が得られた患者に対して、本附随研究参加への同意を得る。なお、本体研究JCOG0911 のデザイン上、腫瘍が摘出されて腫瘍標本が得られる手術もしくは生検は、JCOG0911 に対する参加への同意および本附随研究に対する参加への同意に先だって行われているため、摘出腫瘍標本は、手術の前に本研究とは別に研究利用に対する同意を得て(いわゆる包括同意を含む)試料保存されている場合に限り利用することが出来る。

4.4.2. 試料の採取および標本作製方法

1) 腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本

各施設の病理部門において、パラフィン薄切未染標本と Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色標本を作成する。

① パラフィン薄切未染標本: 3~5 μ m厚、5枚、シランコーティング済みスライドガラスを使用。

② Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色標本: 1枚

③ 未染標本、HE染色標本ともに、JCOG0911 患者登録番号と患者イニシャルをスライドガラスの磨りガラス部分に鉛筆で記入する。

④ 計6枚のスライドガラスを試料解析研究事務局に郵送する(郵送の方法は4.4.3参照)。

作製したパラフィン包埋薄切標本のみを試料解析研究事務局へ送付することし、原則としてパラフィンロックの送付は行わない。

2) 凍結腫瘍標本

本研究では、登録前に①、②の手順で保存された凍結腫瘍標本のみを用いることができる。、JCOG0911A1 登録以降は、③以降の手順に従って行う。

- ① 腫瘍摘出後3時間以内に、約5mm角(米粒大)の腫瘍組織4片を採取し、アルミホイルで梱包し、それぞれ別々のサンプルチューブ(エッペンチューブなど、それに準じた容器で可)に入れる。試料からは可及的に付着血液を除くこと。もし4片の5mm角の組織を採取できない場合は、採取できる量で可とする。液体窒素の使用の有無は問わない。
- ② 腫瘍片の入ったサンプルチューブをドライアイスの中に入れて手術室より各施設の -80°C deep freezer 内に運搬し保管する。
- ③ JCOG0911 登録後、JCOG0911 患者登録番号と患者イニシャルを凍結腫瘍標本が保存されているサンプルチューブに油性マジックで記載する。
- ④ 術中所見で、腫瘍辺縁ではなく、腫瘍内部を採取する。
- ⑤ サンプルチューブをドライアイスにて冷却し、試料解析研究事務局へ郵送する(郵送の方法は4.4.3.参照)。

3) 血液標本

血液標本は、SNP-array の reference DNA (正常 DNA) として使用する。採血の時期は規定しない。

- ① 血液(全血)採血サンプルは、EDTANa 入り採血管(血算用)に4ml 採取する。ヘパリンの混入はPCR 反応が不良になる可能性があるため避ける。
- ② 血液入りの採血管を 4°C あるいは on ice として運搬し、各施設の -20°C freezer 内に保管する。
- ③ サンプルチューブには、JCOG0911 登録後、JCOG 登録番号と患者イニシャルを油性マジックで記載する。
- ④ サンプルチューブをドライアイスにて冷却し、試料解析研究事務局へ郵送する(郵送の方法は4.4.3.参照)。

4.4.3. 参加施設から試料解析研究事務局への試料の送付

施設研究責任者または施設コーディネーターまたは担当医は、事前に配布される3枚の「標本依頼書」(1枚目:施設保管用、2枚目:ホルマリン固定パラフィン切片用、3枚目:冷凍試料用)に必要な事項を記入し、以下の作業を行う。

- 1) 標本依頼書の1枚目は参加施設が保管するためのものである。1枚目に必要事項(患者カルテ番号、患者氏名、生年月日等、個人情報が含まれる)を記入し、カルテに保管する。
- 2) 標本依頼書の2枚目は試料解析研究事務局へFAXし、その後腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本(4.4.2.1)とともに試料解析研究事務局へ送付する。
- 3) 標本依頼書の3枚目は試料解析研究事務局へFAXし、その後凍結腫瘍標本(4.4.2)、血液標本(4.4.2.3)とともに試料解析研究事務局へ送付する。

標本依頼書の2枚目および3枚目には、患者識別情報としてJCOG0911患者登録番号と患者イニシャルのみが用いられる。以下の宛先に試料送付前にFAXする。試料の送付に関しては、標本依頼書の2枚目および3枚目とともに「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2009-2010年版」に沿った方法および包装で行う。本研究の試料である、凍結腫瘍標本、血液標本は、「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2009-2010年版」でのカテゴリーBの試料に該当するため、試料容器にサンプルチューブ、採血管を入れ、所定の外装容器にて送付を行う。これ以外の容器・包装での試料送付は試料輸送の安全性の観点から行わない。腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本はカテゴリーBに相当しないので、破損を防ぐためのスライドガラスケースに入れて送付する。

標本依頼書2枚目・3枚目のFAX先および試料送付先

名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科 夏目敦至宛
〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町65
TEL:052-744-2355 (ダイヤルイン)
FAX:052-744-2361

試料搬送業者

日本郵便・JPエクスプレス

4.5. 試料解析研究事務局の役割

4.5.1. 参加施設から送付された試料に関する取り扱い

試料解析研究事務局は、参加施設から提出された標本依頼書の写しと JCOG 登録番号、患者イニシャルが記載された試料を、JCOG0911 登録終了後すみやかに各試料解析施設にまとめて送付する。

1) 腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本および H&E 染色標本

試料解析研究事務局から静岡県立静岡がんセンター病理診断科に郵送する。

2) 凍結腫瘍標本および血液標本

試料解析研究事務局にて、凍結腫瘍標本より DNA、RNA、miRNA の抽出を、血液標本より DNA の抽出を下記の手順で行う。

- ① DNA 抽出: 凍結腫瘍標本と血液標本を用いる。QIAGEN 社の DNA 抽出キットにて DNA 抽出を行い、JCOG0911 患者登録番号と患者イニシャルを記載したサンプルチューブで凍結保存する。
- ② RNA の抽出: 凍結腫瘍標本を用いる。Trizol を用いて RNA 抽出を行い、JCOG0911 患者登録番号と患者イニシャルを記載したサンプルチューブで凍結保存する。
- ③ microRNA の抽出: 腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本(FFPE)から laser microdissection (Leica)と RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE Tissues (Ambion)を用いて micro RNA を抽出する。JCOG0911 患者登録番号と患者イニシャルを記載したサンプルチューブで凍結保存する。

JCOG0911 登録番号、患者イニシャルを記載した凍結腫瘍標本由来 DNA, RNA, miRNA 入りサンプルチューブを名古屋大学脳神経外科へ、凍結腫瘍標本由来 DNA 入りサンプルチューブをファルコバイオシステムズへ、凍結腫瘍標本由来および血液標本由来 DNA 入りサンプルチューブを東京大学医学部附属病院 Cancer board 研究室へ郵送する。

試料の送付に際しては、腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本および H&E 染色標本、腫瘍、血液から抽出済みの DNA 等は「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2009-2010 年版」でのカテゴリー B の試料に該当するため、試料容器にサンプルチューブ、採血管を入れ、所定の外装容器にて送付を行う。これ以外の容器・包装での試料送付は試料輸送の安全性の観点から行わない。

郵送先

静岡県立静岡がんセンター病理診断科 渡邊麗子

〒411-8777 静岡県駿東郡長泉町下長窪 1007

TEL: 055-989-5222

FAX: 055-989-5714

E-mail r.watanabe@scchr.jp

株式会社ファルコバイオシステムズ 東央晋

〒604-0911 京都市中京区河原町通二条上る清水町 346

TEL: 075-257-8541

FAX: 075-257-8544

E-mail:h-higashi@mail.falco.co.jp

東京大学医学部附属病院 Cancer board 研究室 小川誠司

〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

TEL: 03-5449-5331

FAX: 03-5449-5451

E-mail: todaiips@ims.u-tokyo.ac.jp

名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科 夏目敦至

〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65

TEL: 052-744-2355 (ダイヤルイン)

FAX: 052-744-2361

E-mail: anatsume@med.nagoya-u.ac.jp

試料搬送業者

日本郵便・JPエクスプレス

4.5.2. 試料解析施設から送付された試料解析果の取り扱い

試料解析研究事務局は試料解析実施施設より、JCOG0911登録番号と患者イニシャルが付記された試料解析データと、JCOGデータセンターより本体試験であるJCOG0911で得られた臨床情報を含む診療データパッケージ（解析に用いる主な導出変数を含むデータセット、ならびに、データベースに含まれる変数の定義表）を受け取る。

1) **目的1、目的2について**

試料解析研究事務局は、4.6.1.MGMT 免疫染色、4.6.2. Methylation-specific PCR および Pyrosequence 法の試料解析結果と診療データを統合したデータパッケージ（試料解析結果、並びに、データパッケージに含まれる変数の定義表）を JCOG データセンターへ電子メールにて送付する。

2) **目的3について**

試料解析研究事務局は、統計的事項(5.4)に記載された手順に従い解析を行い、解析終了後、解析結果のダブルチェックのため、以下をJCOGデータセンターへ直接送付する。

- ・ 試料解析結果と診療情報データを統合したデータパッケージ（試料解析結果、並びに、データパッケージに含まれる変数の定義表）
- ・ SAS (Statistical Analysis System) のプログラム/Log/Output (raw data が output や log に表示されないような program とする)
- ・ 他の解析パッケージの実行 program/log/output

4.6. 試料解析実施施設の役割

試料解析研究事務局から送付された試料を、それぞれの試料解析実施施設で解析を行う。

- 1) 名古屋大学脳神経外科: 試料解析研究事務局より、凍結腫瘍標本由来 DNA、RNA、microRNA が送付される。
- 2) 静岡県立静岡がんセンター病理診断科: 試料解析研究事務局より、腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本および H&E 染色標本が送付される。
- 3) 株式会社ファルコバイオシステムズ: 試料解析研究事務局より、凍結腫瘍標本由来 DNA が送付される。
- 4) 東京大学医学部附属病院 Cancer board 研究室: 試料解析研究事務局より、凍結腫瘍標本由来 DNA および血液標本由来 DNA が送付される。

全ての試料解析が終わった段階で、その解析結果をまとめて試料解析研究事務局に送付する。

(余剰検体の取り扱いについては、4.6.8.参照)

4.6.1. MGMT 免疫染色

静岡県立静岡がんセンター病理診断科が、以下の手順で行う。

試料解析研究事務局から送付されたパラフィン薄切未染標本 5 枚、Hematoxylin and Eosin (H&E) 染色標本 1 枚を使用する。

1) 免疫染色は以下の手順で行う。

- ① 脱パラフィン後、オートクレーブ法による抗原賦活化 (121°C、10 分、10mM citrate buffer、pH 6.0)、抗ウマ血清にてブロッキング。
- ② 一次抗体 (抗 MGMT 抗体、Clone MT3.1、NeoMarkers)、50 倍希釈、16 時間、4°C で反応
- ③ PBS 洗浄後、ポリマー試薬反応 (Envision, DAKO)
- ④ PBS 洗浄後、DAB 発色反応
- ⑤ 対比染色 (ヘマトキシリン)、脱水、透徹、封入

2) 判定: H&E 標本および GFAP 免疫染色で組織の構築、腫瘍細胞の形態を観察後、腫瘍細胞全体に占める MGMT 陽性腫瘍細胞の占める割合をもとに (0, ±, +(10%以上 50%未満), ++ (50%以上)) の 4 群に分け、0 および ± を陰性、+ および ++ を陽性と判定する。この際、必要に応じて LCA 免疫染色、KP-1 免疫染色等の追加的染色を行う。

判定に関しては、少なくとも 2 人以上の神経病理医が独立して判定を行うこととする。

判定が終了した標本は、研究が終了した段階で、名古屋大学脳神経外科学講座に保管する。その後の扱いは、7.3.5 に準じる。

4.6.2. MGMT メチル化解析: Methylation-specific PCR および Pyrosequence 法

試料解析研究事務局が以下の手順で行う。

- 1) 試料解析研究事務局において凍結腫瘍標本から抽出された DNA を使用する。
- 2) バイサルファイト処理 (DNA を bisulfite (亜硫酸水素塩) で処理をすると、シトシンはウラシルに変換 (C→U) され、メチル化シトシンは変換されず (mC→C) そのまま残る。Bisulfite 処理後は、メチル化 DNA と非メチル化 DNA とは CpG 部位が異なる塩基配列を持つようになる。) : 2.0 μg の試料 DNA に NaOH を混合して単鎖化を行った後、Bisulfite 溶液を添加混合してスルホン化、脱アミノ化反応を行う。反応液全量に精製吸着液と磁性ビーズを加えて吸着後、精製して回収する。精製された DNA 溶液に脱スルホン化溶液を添加・混合し、脱スルホン化反応を行う。この過程は、QIAGEN 社の EpiTect Bisulfite を使用して行う。
- 3) Methylation-specific PCR: バイサルファイト処理後の DNA に対して、MGMT プロモーター領域のメチル化 DNA と非メチル化 DNA で異なる塩基配列の部位に、それぞれに特異的な PCR プライマーを用いて PCR にて増幅後、電気泳動によるバンドの有無によりメチル化あり/なしを判定する。
- 4) Pyrosequence 法: バイサルファイト処理後の DNA に対して、5' 末端にビオチンのタグが付いたプライマーを用いて PCR を施行。増幅された PCR 産物をストレプトアビジンでコーティングされたビーズにゲノム DNA 断片を吸着させた後、PCR 反応試薬が入った油滴の中に取り込ませ、個々のビーズごとに DNA の増幅反応を行う。各々のビーズについて、ポリメラーゼが酵素反応するとき生じるピロリン酸を、ルシフェラーゼによる蛍光反応で検出し、発光の強度とパターンから DNA の塩基配列を決定する。4 種類の核酸を順次加えることで、発光パターンから配列を決定し、メチル化の程度を数値化する。

名古屋大学脳神経外科にて行われた膠芽腫の retrospective study で得られた知見から、cut-off 値を 14% と設定し、14% 以上を陽性、14% 未満を陰性と評価する (論文投稿中)。

4.6.3. 1p, 19q, TP53, PTEN, CDKN2A, p10 の LOH、及び EGFR 遺伝子増幅の解析: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法

株式会社ファルコバイオシステムズが、以下の手順で実施する。

SALSA® MLPA® kit のうち 2 種の kit (品番: P088-Glioma1, P105-Glioma2) を用いて、1p, 19q, TP53, PTEN, CDKN2A, p10 の LOH の有無、及び EGFR 遺伝子増幅の測定を行う。DNA denaturation を行った後、サイズ調節配列が融合された標的配列特異的 MLPA probe の hybridization を、overnight で行う。次に Ligation 反応にて各 MLPA probe を連結化させ、一本鎖 probe を形成し、PCR 反応によって、異なる連結化 probe の長さに従ったさまざまな長さの PCR 増幅産物を得ることができる。それをキャピラリー電気泳動によって分離することで、サンプル中の probe 標的配列の量的変化を、サンプルとコントロール間で、PCR フラグメント面積の相対的な違いとして検出を行う。

以上の測定結果より、1p, 19q, TP53, PTEN, CDKN2A, p10 の LOH のあり/なし、及び EGFR 遺伝子増幅あり/なしを判定する。

4.6.4. TP53, IDH1/2 変異の解析: DNA sequencing 法

試料解析研究事務局が、以下の手順で行う。

神経膠腫における TP53 の遺伝子異常のほとんどは exon 5, 6, 7, 8 にあることが確かめられているため、この 4 つの exon をカバーする 5 組の PCR 用プライマーを設定して PCR 増幅し、キャピラリー電気泳動を行うことで、TP53 の遺伝子異常あり/なしを判定する。

IDH 変異の起こるコドンはほぼ決まっています、IDH1 においてはコドン 132 のアルギニンがヒスチジンに変化 (R132H) するのが多く、IDH2 においてはコドン 172 の変異が多いと言われている。

この領域をターゲットとした PCR 用プライマーを作成し PCR 増幅し、キャピラリー電気泳動を行うことで、IDH1/2 の遺伝子異常あり/なしを判定する。

4.6.5. 染色体の網羅的解析: SNP-array 法

東京大学医学部附属病院 Cancer board 研究室が、以下の手順で実施する。

Affymetrix 社の microarray-chip を使った SNP-Microarray 法により、腫瘍細胞の全染色体を網羅的に解析し、ゲノムの異常を検出する。

4.6.6. mRNA 発現の網羅的解析:cDNA Microarray 法

試料解析研究事務局が、以下の手順で実施する。

Agilent 社の Human whole genome (4x44K)を使った cDNA Microarray により、mRNA 発現を網羅的に Gene-Spring software を用いて解析する。

4.6.7. microRNA(miRNA)発現の網羅的解析:miRNA microarray 法

試料解析研究事務局が、以下の手順で実施する。

Agilent 社の Human miRNA microarray を使い、miRNA の発現を網羅的に解析する。

4.6.8. 余剰検体の取り扱いについて

4.6.1.MGMT 免疫染色で使用された全ての腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本および H&E 染色標本は、解析終了後、試料解析研究事務局に送付する。試料解析研究事務局はこれらを、研究が終了するまで保管する。研究終了後、JCOG 患者登録番号なども削除し全ての試料を破棄する。

4.6.1.MGMT免疫染色以外の試料解析で生じた余剰検体は、各試料解析施設においてJCOG患者登録番号なども削除し全ての試料を破棄する。試料解析研究事務局と試料解析実施施設は適宜連絡を取り合い、試料の破棄状況について確認を行う。

4.7. JCOG データセンターの役割

JCOG データセンターは本体研究である JCOG0911 より得られた診療情報パッケージからカルテ番号等の個人情報を削除したデータパッケージを作成し、試料解析研究事務局に送付する。この診療情報データパッケージには JCOG 登録番号が含まれる。

1) 目的 1、目的 2 について

試料解析研究事務局より送付されたデータパッケージ(4.5.2.1)参照)を用い、統計的事項 5.2.、5.3.の手順に従い解析を行う。

2) 目的 3 について

試料解析研究事務局で行われた解析結果のうち、試料解析結果と診療データを統合したデータパッケージを対象として行われる解析部分のダブルチェックを行うために、試料解析研究事務局より、解析結果のデータ(4.5.2.2)参照)、データパッケージに含まれる変数の定義表、並びに、統計解析結果を受け取り、解析結果のダブルチェックを行う。

5. 統計的事項

5.1. 解析対象となるデータの要約、一般化を否定する状況に無いことの確認

本附随研究は JCOG0911 に登録された全例を対象として実施するものではないことから、結果の一般化を否定する状況に無いことを確認する目的で、JCOG0911 に登録された全登録例と本附随研究の対象となる全症例、JCOG0911 に登録されたものの本附随研究の対象とならなかった症例と本附随研究の対象となる全症例との間で、背景因子、予後の比較を行う。

5.2. 目的 1: MGMT 測定の最適な方法の検討

1) 対象

JCOG0911 の A 群(TMZ 単独療法)に割り付けられ、本研究に参加した患者

2) 用いる試料解析結果

4.6.1.MGMT 免疫染色、4.6.2. Methylation-specific PCR および Pyrosequence 法

3) 解析方法

試料解析結果ごとに実施する。累積生存曲線の推定は Kaplan-Meier 法を用いて行い、Greenwood の公式を用いて 95%信頼区間を求める。また、予後に影響する他の臨床的な因子は、事前に試料解析研究事務局と JCOG データセンターで話し合って決定しておき、(i)-(iv)全ての方法にて共変量に含める。

また、ブートストラップ法により目的 1 で選択された方法を選択する割合を算出する。

- (i) MGMT 免疫染色:事前に定められた cut-off 値に従って、陽性/陰性の 2 群に分ける。エンドポイントである OS に関して、陰性に対する陽性の HR とその 95%信頼区間を、事前に定めた共変量を含めた Cox の比例ハザードモデルにより算出する。このとき、HR は 1 以下になることが期待される。カットオフ値の検討のために、MGMT 発現割合の判定(0, ±, +, ++)4 群に対して、Cox 比例ハザ

ードモデルにより複数の対比((-3, -1, 1, 3)、(-3, 1, 1, 1)、(-1, -1, 1, 1)、(-1, -1, -1, 3)など)を当てはめ、カットオフ値の妥当性や発現割合と OS の関連を検討する。さらに、long survivor と short survivor を定義し、MGMT 発現割合の判定ごとに時間依存性 ROC 流の感度・特異度を算出し、全生存期間の surrogate としての性能を検討する。long survivor と short survivor の境界は、2年を中心に何通りかのパターンを設定する。

- (ii) Methylation-specific PCR: 事前に定められた cut-off 値に従って、陽性/陰性の 2 群に分ける。エンドポイントである OS に関して、陰性に対する陽性の HR とその 95%信頼区間を、事前に定めた共変量を含めた Cox の比例ハザードモデルにより算出する。このとき、HR は 1 以上になることが期待される。

さらに、long survivor と short survivor を定義し、陽性/陰性ごとに時間依存性 ROC 流の感度・特異度を算出し、全生存期間の surrogate としての性能を検討する。long survivor と short survivor の境界は、2年を中心に何通りかのパターンを設定する。

- (iii) Pyrosequence 法: 名古屋大学脳神経外科にて行われた膠芽腫の retrospective study の結果を元に、cut-off 値を 14%とし、陽性/陰性の 2 群に分ける。エンドポイントである OS に関して、陰性に対する陽性の HR とその 95%信頼区間を、事前に定めた共変量を含めた Cox の比例ハザードモデルにより算出する。このとき、HR は 1 以上になることが期待される。また、参考としてメチル化の定量値をヒストグラム、分位点などから 4 群(0, ±, +, ++)に分類し、Cox 比例ハザードモデルにより複数の対比((-3 -1 1 3)、(-3 1 1 1)、(-1 -1 1 1)、(-1 -1 -1 3)など)を当てはめ、カットオフ値の妥当性や発現割合と OS の関連を検討する。

また、探索的な検討として以下の手順で、Pyrosequence 法における cut-off 値の検討も行う。① Pyrosequence 法によって得られた MGMT のメチル化の値から、累積分布の分位点を 10%点～90%点まで 10%ごとに算出する。② 分位点ごとに陽性/陰性の 2 群に分ける。③ エンドポイントである全生存期間(OS)に関して、陰性に対する陽性のハザード比(HR)とその 95%信頼区間を、事前に定めた共変量を含めた Cox の比例ハザードモデルにより算出する。このとき HR は 1 以上になることが期待される。④ 各分位点点の中で最も HR が大きい分位点を Pyrosequence 法の cut-off 値とする。

同様に、単変量でのカットオフ値の探索的な検討として、long survivor と short survivor を定義し、時間依存性 ROC により、全生存期間の surrogate としての性能を検討する。long survivor と short survivor の境界は、2年を中心に何通りかのパターンを設定する。

4) 結果の解釈

結果を示す際は、HR の解釈を同じ方向にするため、Methylation-specific PCR と Pyrosequence 法は陽性に対する陰性の HR も算出する。OS の HR が最も小さい測定方法を、膠芽腫の予後と最も関連している MGMT 測定法とする。ただし、3 つの測定方法で HR がほぼ等しい場合、最も簡便な MGMT 免疫染色を選択することとする。

5.3. 目的 2: IT 療法の治療効果と MGMT 発現の関連の検討

1) 対象

本研究に参加したすべての患者(A 群(TMZ 単独療法)、B 群(IT 療法))

2) 用いる試料解析結果

4.6.1.MGMT 免疫染色、4.6.2. Methylation-specific PCR、Pyrosequence 法

3) 解析方法

累積生存曲線の推定は Kaplan-Meier 法を用いて行い、Greenwood の公式を用いて 95%信頼区間を求める。また、Cox の比例ハザードモデルを用いた解析を行う際は、目的 1 で用いた共変量を含める。

目的 1 と同様に、MGMT の測定結果をもとに 2 群に分ける。Pyrosequence 法は目的 1 の検討で得られた A 群で予後と最も関連する cut-off 値も検討する。A 群、B 群それぞれエンドポイントである OS に関して、陰性に対する陽性の HR とその 95%信頼区間を、事前に定めた共変量を含めた Cox の比例ハザードモデルにより算出する。参考として群とカットオフ値で分類したサブグループの交互作用項の検定を有意水準 20%で行う。

また、ブートストラップ法により目的 1 で選択された方法が、HR が B 群でより 1 に近くなっており、かつ交互作用項の検定で有意となる割合を算出する。

4) 結果の解釈

結果を示す際は、HR の解釈を同じ方向にするため、MGMT 免疫染色、Methylation-specific PCR と Pyrosequence 法は陽性に対する陰性の HR も算出する。目的 1 で最も予後と関連している MGMT の測定法において A 群と B 群の OS の HR を比較し、HR が B 群で、より 1 に近くなっているかを確認し、交互作用項の検定の結果有意と判断された場合、目的 1 で選択した MGMT 測定方法 IT 療法の効果予測因子になりうるかと判断する。その他の 2 つの MGMT 測定方法においても同様の検討を行うが、これらは、目的 2 の解析結果の一貫性をみるものである。目的 1 で最も予後と関連している MGMT の測定法において HR が B 群で、より 1 に近くなっていた場合でも、その他の 2 つの MGMT 測定方法において結果が大きく異なる場合は、結果の解釈に注意を要する。

5.4. 目的 3: 既知のバイオマーカーの評価および網羅的解析手法による新たな予後因子、効果予測因子の探索

1) 対象

本研究に参加したすべての患者

2) 目的 3 で用いる試料解析結果

4.6.3. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法

4.6.4. *TP53*, *IDH1/2* 遺伝子変異解析

4.6.5. SNP-array 法、4.6.6. mRNA 発現解析、4.6.7. microRNA(miRNA) 解析

3) 解析方法

4.6.3. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法:

4.6.4. *TP53*, *IDH1/2* 遺伝子変異解析

6 因子 (1p, 19q, *TP53*, *PTEN*, *CDKN2A*, *p10*) における LOH の“あり/なし”及び、*EGFR* 遺伝子増幅の“あり/なし”、*TP53*, *IDH1/2* 変異の“あり/なし”の 2 群に分け、それぞれの測定法について累積生存曲線の推定は Kaplan-Meier 法を用いて行い、Greenwood の公式を用いて 95% 信頼区間を求める。また OS に関して Cox の比例ハザードモデルにより、各因子を共変量とした“なし”に対する“あり”の HR を算出する。その際、予後因子の検討を行うために、各因子の他に、治療法並びに目的 1 の解析で用いた共変量を含めて、同様に HR を算出する。さらに、効果予測因子の検討を行うために、因子と治療群、並びにこれらの交互作用項を説明変数に加え、Cox の比例ハザードモデルにより交互作用の検定を行う。交互作用の検定は検出力が低いことが知られているため、有意水準 20% で有意となったものを、IT の効果予測因子の候補とする。これらの解析を総合的に判断し、選択された遺伝子が新たな効果予測因子の候補となるかを検討する。

4.6.5. SNP-array 法、4.6.6. mRNA 発現解析、4.6.7. microRNA(miRNA) 解析

予後因子の検討は以下のように行う。OS が 2 年以上の症例を「long survival group」、2 年未満の症例を「short survival group」とする。対象とする遺伝子は、① mRNA microarray、microRNA microarray にて検出された発現量が long survival group と short survival group の少なくとも一方で検出限度以上かつ、long survival group と short survival group の発現量の比が 2 倍以上の遺伝子、② 事前に予後因子の候補として報告されている遺伝子のうち、少なくとも一方に当てはまる遺伝子とする。

long survival group と short survival group の 2 群間で遺伝子発現量の平均値について 2 標本 t 検定を行い、有意水準 5% で有意となった遺伝子を次のステップに進める。得られた予後因子の候補について、それぞれ中央値で Low、High の 2 値に分け、Kaplan-Meier 法を用いて累積生存曲線の推定を行う。信頼区間の構成は Greenwood の公式を用いる。同様に、log-rank 検定や、治療法と遺伝子群 (Low、High)、その他の共変量を説明変数に含めた Cox の比例ハザードモデルにより遺伝子群の HR とその 95% 信頼区間を算出する。遺伝子発現量をモデルに含める場合、パーセントイルに基づき等分する 2 値あるいは 3 値に分類し、AIC により適切なモデルを選択する。3 値に分類したモデルが選択された場合は、傾向性を評価するため、複数の対比 ((-1, 0, 1), (-2, 1, 1), (-1, -1, 2)) を当てはめ、もっとも当てはまりの良い対比を探索する。これらの解析から総合的に判断し、選択された遺伝子が新たな予後因子の候補となるかを検討する。網羅的解析における検定の多重性の問題に対処するため、Benjamini &

Hochberg 法により, False Discovery Rate の計算を行う。

効果予測因子の検討は以下のように行う。対象とする遺伝子は、①mRNA microarray、microRNA microarray にて検出された発現量が、TMZ 群および IT 群の少なくとも一方で検出限度以上かつ、IT 群の Long survival group と short survival group の遺伝子を対象とするの遺伝子数の比が2倍以上の遺伝子、②事前に IT の効果予測因子の候補として報告されている遺伝子のうち、少なくとも一方に当てはまる遺伝子とする。

遺伝子の発現量は分布等を確認した上で、中央値で Low、High の 2 値に分類する。ただし、予後因子の解析の際に 3 値に分類するモデルが選択されていた場合は 3 値での解析を行くこととし、その際、無イベントのプロファイルが存在するなど、交互作用項の検討が出来ない場合もあり得ることから、解析に用いる区分は、①単純な 3 値への分類、②予後因子解析で検討した最も当てはまりの良い対比が (-2, 1, 1)、(-1, -1, 2) であった場合には、当該対比に基づく 2 値への分類、③同じく最も当てはまりの良い対比が (-1, 0, 1) であった場合には中央値による 2 値への分類、の優先順位で解析方法を選択する。エンドポイントである OS に関して、遺伝子群 (Low、High) と治療群、それらの交互作用項を説明変数に加え、Cox の比例ハザードモデルにより交互作用の検定を行う。交互作用の検定は検出力が低いことが知られているため、有意水準 20% で有意となったものを、IT の効果予測因子の候補とする。さらに、遺伝子群に関して、Kaplan-Meier 法による累積生存曲線の推定や、log-rank 検定等を行う。これらの解析を総合的に判断し、選択された遺伝子が新たな効果予測因子の候補となるかを検討する。

また、サンプルの背景情報に依存しない unsupervised な手法により、治療群の中での新たなクラスの見出しを行う。具体的には、SNP-array 法、mRNA microarray、microRNA microarray で計測された信号を多変量データとみなしたクラスタ解析を行う。クラスタ解析のアルゴリズムとしては k-平均法および階層型クラスタ解析法を用いる。k-平均法におけるクラスタ数 k の決定は Gap 統計量に基づいて決定する。また、階層型クラスタ解析においては、木構造の各枝の統計的有意性について bootstrap 法を用いて定量化する。

さらに、SNP-array 法、mRNA microarray、microRNA microarray にて検出された 2 群間で発現の異なるマーカー候補群によるクラス予測等の解析を行うなどの supervised な手法等を用い、IFN の効果予測因子や IFN 治療を行った患者の予後因子や IFN の効果予測因子となり得る遺伝子群を多方面から探索する。具体的には、SNP-array 法、mRNA microarray、microRNA microarray で計測された信号を多変量データとみなした判別分析を行う。判別分析のアルゴリズムとしては、まず、線形判別境界を持つ予測モデルとして線形判別分析、ロジスティック回帰分析を適用する。必要であれば、L2 正則化および L1 正則化に基づく変数選択を行う。正則化係数の選択には leave-one-out cross-validation を用いる。さらに、非線形な判別境界を持つ予測モデルとして、最近傍判別分析、サポートベクトルマシンを適用する。最近傍判別分析の近傍数およびサポートベクトルマシンのハイパーパラメータの決定には leave-one-out cross-validation を用いる。最終的な予測性能の検証にも leave-one-out cross-validation を用いる。すなわち、ハイパーパラメータの選択(モデル選択)と予測性能の検証を行うために、nested leave-one-out cross-validation を行う。

クラス予測に関しては、予後因子として抽出された候補を効果予測因子の検討の対象とすることは可能であるが、計算上の問題から、予後因子として抽出されなかった候補の中で効果予測因子を検討することは困難である。そのため、後者の検討を可能とするため、本試験では、A 群 (TMZ 単独療法)、B 群 (IT 療法) それぞれに対して独立に以下の方針で検討を行うこととする。

- ①A 群 (TMZ 単独療法) を対象に前述の判別分析、並びに、validation を行う。ここで見いだされたものは予後因子と見なす (正確には「予後因子である」、「予後因子であり、かつ、TMZ 療法の効果予測因子である」、「予後因子ではないものの、TMZ 療法の効果予測因子である」のいずれかであるが、本試験では無治療群を置いていないことから、これら 3 通りの可能性のいずれであるのかは結論づけることができない)。
- ②B 群 (IT 療法) を対象に前述の判別分析、並びに、validation を行う。ここで見いだされたものは、「予後因子であるものの IT 療法の効果予測因子ではない」「予後因子であり、かつ、IT 療法の効果予測因子」「予後因子ではないものの IT 療法の効果予測因子」のいずれかである。

③ここまでに選び出された候補に対して、それぞれ、A 群 (TMZ 単独療法) と B 群 (IT 療法) を併合したデータセットにおいて Cox 回帰で評価する。その際、クラス予測のための classifier、治療群、classifier と治療群の交互作用、並びにこれらの交互作用項を説明変数に加え、Cox の比例ハザードモ

デルにより交互作用の検定を行う。交互作用の検定は検出力が低いことが知られているため、有意水準 20%で有意となったものを、IT の効果予測因子の候補とする。これらの解析を総合的に判断し、選択された classifier が新たな効果予測因子の候補となるかを検討する。

なお、これらの解析も探索的なものとは言え、遺伝子発現解析研究の分野における多重性の問題はより重大であるため、false discovery rate (FDR)を算出するなど、解析の目的に応じ、適切な false positive を調整する方法を用いる。結果に関しては、leave-out-one cross-validation,を行うなどして、総合的に妥当性を判断する。これらの解析に関しては、試料解析研究事務局において行い、JCOG データセンターでは試料解析結果と診療情報を統合したデータパッケージに基づく統計解析結果のダブルチェックを行う。

4) 結果の解釈

1p、19q、*TP53*、*PTEN*、などの既知のバイオマーカーが OS とどのように関連しているか、従来の報告と比較し、その相違を確認する。また、網羅的解析によって新たに得られたバイオマーカーが IFN の予後因子、効果予測因子となり得るかどうかが評価する。

5.5. 統計解析施設

目的 1、目的 2 の統計解析: JCOG データセンター

目的 3 の統計解析: 試料解析研究事務局

目的 3 の統計解析のうち、試料解析結果と診療データを統合したデータパッケージを対象として行われる解析部分のダブルチェック: JCOG データセンター

6. 予測されるメリットおよびデメリット

6.1. 本附随研究に参加した患者のメリットおよびデメリット

本附随研究に参加した患者が得られるメリットはないと考えられ、あくまでも将来の膠芽腫患者に還元するための研究である。

本附随研究では、「疫学研究に関する倫理指針」の趣旨を踏まえた対応を行い、試料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。本附随研究では患者識別情報として、JCOG0911 患者登録番号と患者イニシャルのみを使用するため、個人の識別につながる情報が第三者に渡ることはない。

また、本研究で使用する試料は、病理検査用に保存されているホルマリン固定パラフィン包埋標本、手術時に摘出された腫瘍および血液を試料とするため、試料提供者である本附随研究参加患者に及ぼす医学的・経済的な負担は少ないと考えられる。

6.2. JCOG のメリットおよびデメリット

本研究は公的研究費である厚生労働科学研究費補助金がん臨床研究事業(平成 20 年)および国立がん研究センターがん研究開発費指定研究 20 指-4 からの研究費によりサポートされる研究である。貴重な臨床検体から得られる有益な情報を JCOG が享受でき、それを通じて将来の神経膠腫患者に対する医学的意識決定に貢献できることが期待される。

デメリットとしては、各施設の標本作製に要する労力および保存検体の消費、試料解析研究事務局および JCOG データセンターにおけるデータ管理・統計解析業務に要する労力などが挙げられる。

デメリットとしては、各施設の標本作製に要する労力および保存検体の消費、試料解析研究事務局および JCOG データセンターにおけるデータ管理・統計解析業務に要する労力などが挙げられる。

7. 倫理的配慮

7.1. 患者の保護

本附随研究は、特定の人間集団に対する「遺伝子発現に関する研究」および「がん組織にのみ後天的に出現して次世代には受け継がれないゲノム又は遺伝子の変異を対象とする研究」であるため、「疫学研究に関する倫理指針」の適用範囲である。このため、本研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言(付表)および「疫学研究に関する倫理指針」(平成 14 年 6 月 17 日制定、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 17 年 6 月 29 日一部改正、平成 19 年 8 月 16 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正)に従って本研究を実施する。

なお、本研究は JCOG で行われる臨床研究であるため、「JCOG 試料解析研究ポリシー」及び、「JCOG 非ゲノ

ム解析研究ポリシー」にも従って行う。

7.2. インフォームドコンセント

7.2.1. 患者への説明

本附随研究への登録に先立って、担当医は患者本人に施設の IRB 承認が得られた説明文書(添付の説明文書または施設で改変を加えた説明文書)を患者本人に渡し、以下の内容を口頭で詳しく説明する。

- 1) この研究が JCOG の臨床試験(JCOG0911)の附随研究であること。
- 2) 遺伝子とは
- 3) 遺伝子と疾病
- 4) 遺伝子解析研究へのご協力について
- 5) 研究協力の任意性と撤回の自由
研究参加に先立って同意拒否が自由であることや、いったん同意した後の同意の撤回も自由であり、それにより診療上の不利益を受けないこと。
- 6) 提供者または代諾者等により同意が撤回された場合には、撤回に係る試料等が廃棄され、撤回に関わる研究結果が消去されること。
- 7) 研究の意義、目的と方法
- 8) 予測される研究結果および提供者等に対して予測される危険や不利益
- 9) 研究計画書の開示
- 10) 試料の提供は無償であること
- 11) 個人情報の保護について: 氏名や個人情報は守秘されるための最大限の努力が払われること。
- 12) 研究の倫理審査
- 13) 試料から得られた解析結果は、匿名化された上研究成果として公表
- 14) 将来、研究の成果が特許権等の知的財産権を生み出す可能性と研究成果から生じる知的財産権の帰属
- 15) 遺伝子解析研究終了後の試料などの保存、使用または廃棄などの取り扱い方針
- 16) 研究資金について
- 17) 遺伝カウンセリングについて
- 18) 研究責任者の氏名と職名
- 19) 担当医師の連絡先、研究代表者、試料解析研究事務局
担当医の連絡先のみでなく、施設の研究責任者、研究の研究代表者(または試料解析研究事務局)の連絡先を文書で知らせ、個人情報の訂正、同意の撤回および研究について苦情を含めて自由に質問できること。

上記の説明に加えて、当該試料解析実施施設(名古屋大学試料解析研究事務局、静岡県立静岡がんセンター一病理診断科、ファルコバイオシステムズ、東京大学医学部附属病院 Cancer board 研究室)で試料解析を行う旨の説明文書ならびに同意書を併せて取得する。患者に対する説明同意文書は原則としてモデル説明同意文書をそのまま用いるが、参加施設の倫理審査委員会等の承認を得て、モデル説明同意文書の内容を変更した場合には、試料解析研究事務局に変更の内容を連絡すること。

7.2.2. 同意

研究についての説明を行い、十分に考える時間を与え、患者が研究の内容をよく理解したことを確認した上で、研究参加について同意するか否かを確認する。患者本人が研究参加に同意した場合、付表の同意書または医療機関で定められた書式の本研究の同意書を用い、説明をした医師名、説明を受け同意した患者名、同意を得た日付の記載があることを確認する。

同意文書は2部コピーし、1部は患者本人に手渡し、1部は施設コーディネーターが保管する。原本はカルテに保管する。

7.3. 個人情報の保護と患者識別

JCOG は、個人情報および診療情報などのプライバシーに関する情報は個人の人格尊重の理念の下、厳重