

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）  
総括研究報告書

未治療原発不明癌に対するDNAチップを用いた原発巣推定に基づく  
治療効果の意義を問う無作為化第II相試験

研究代表者 中川 和彦  
近畿大学医学部内科学腫瘍内科部門 教授

研究要旨 原発不明がん(CUP)を対象とした遺伝子発現解析により原発巣の推定を行う新しい治療戦略の、従来のCUP治療戦略に対する臨床的有用性を問う第III相比較試験の実施妥当性を無作為化臨床第II相試験にて評価する。その際に得られたCUPにおける遺伝子発現プロファイルを用い、より精度の高いCUP診断薬およびCUP特異的分子標的薬の創生を目指す。

倉田 宝保（関西医科大学内科学第一講座 教授）  
西尾 和人（近畿大学医学部ゲノム生物学教室 教授）  
藤田 至彦（近畿大学医学部ゲノム生物学教室 助教）  
坂井 和子（近畿大学医学部ゲノム生物学教室 助教）

A. 研究目的

原発不明がん(CUP)を対象とした遺伝子発現解析により原発巣の推定を行う新しい治療戦略の、従来のCUP治療戦略に対する臨床的有用性を問う第III相比較試験の実施妥当性を無作為化臨床第II相試験にて評価する。その際に得られたCUPにおける遺伝子発現プロファイルを用い、より精度の高いCUP診断薬およびCUP特異的分子標的薬の創生を目指す。

B. 研究方法

1. 臨床試験を継続、割り付けおよび治療が実施された103例の登録が現在まで得られているが、当初の目標症例120例を完遂する。

登録、検体採取、原発巣の推定、無作為化、治療に至る複雑な過程を有しているが、現在までの登録の経験より各施設に周知されるに至っており継続とする。

2. 最終症例の登録から2年が経過した時点でデータセンターは最終解析を行い、「最終解析報告書」を研究事務局に提出する。

3. 本臨床試験において付随的に得られた遺伝子発現プロファイルを用いた付随研究として、以下のトランスレーショナル研究を実施する。

CUPに特徴的な分子の生物学的意義の検討：現在までの解析結果では、個々の原発巣推定に有用な遺伝子セットが選択されている。一方、興味深いことに「CUPに特徴的」な遺伝子群も同定されており、その中には上皮間葉移行(EMT)に関連する遺伝子等が含まれており原発不明癌の転移を主体とする生物学的特徴を反映する結果を得られつつある。CUPに特徴的な遺伝子群は、未知のCUPの生物学的特徴を反映し、治療戦略への応用が可能となると考えられるため、i

n vivo転移モデルでの機能解析を含めた基礎研究を行う。

CUP診断キットの開発：我々の開発した原発巣推定アルゴリズムは、大量の固形癌の遺伝子発現データを基に多施設共同臨床試験症例のデータを数十例使用して改善・機能向上を続けて進化してきた。本研究においては、残りの60例の原発巣推定能力を検証することおよび臨床検体の組織（胸水、リンパ節、転移巣）の遺伝子発現バックグラウンドを考慮した機能向上を目指す。DEFINEは、現在エクセルベースの自動で原発巣推定結果を示すソフトウェアであるが、例えばribosomal proteinなど原発巣推定アルゴリズムで使用した遺伝子群をさらに絞り込み20個前後のリアルタイムPCRベースの遺伝子発現値によって原発巣が特定できる診断キットの開発を目指す。すなわち体外診断薬としての承認を得べく、収集したサンプルによるレトロスペクティブな検証を経て、先進医療申請などのための論文化、臨床的有用性の評価などをすすめ申請に向けて努力する。

（倫理面への配慮）

本研究では、抗癌剤感受性の高い予後良好な原発不明がん患者が本研究から最大限除外されるよう配慮する。さらに、ヘルシンキ宣言およびわが国の「臨床研究に関する倫理指針」に従い、以下の事項を厳守する。

研究実施計画書をWJOGプロトコル審査委員会で審査し、各施設のIRB承認の得られた施設のみ症例登録を可能とする。

全ての患者に説明文書を用いて十分な説明を行い、考慮の時間を設けた後に患者自身の自由意志による同意を文書で取得する。

データの取り扱いに関して、直接個人を識別できる情報を用いず、データベースのセキュリティを確保し、個人情報保護を厳守する。

プロトコル審査委員会、効果・安全性評価委員会を組織し、研究の第三者的監視を行う。

解析でおこなうマイクロアレイによる遺伝子発現解析はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針の対象ではないが、指針の趣旨を尊重し、準じた管理を行うことにより個人情報等倫理的に十分に配慮する。

### C. 研究結果

CUP60症例の発現プロファイルをもとに、正常リンパよりもCUPで発現が大きく亢進している44遺伝子のなかから、CUPの特徴である“転移能”を付与するような遺伝子の探索を試みた。まず、特定のがん種だけに高発現が見られない遺伝子、CUPの全症例のうち半数以上に高発現が起きている遺伝子、CUPのモデル細胞として使った、転移能の優れた非小細胞肺癌株であるA549細胞に高発現する遺伝子、という3つの判定基準をもとに候補遺伝子を23個に絞り、さらに多孔性フィルターを使ってmigration assayを行った。A549細胞は24時間で多孔性フィルターの反対側に遊走するが、siRNAによるノックダウン法で、細胞増殖能は変わらず、遊走能のみが大きく損なわれる遺伝子を見つけたところ、PRG1、MIF、S100A4、SERF2、OAZ1、TIMP1の6個の候補遺伝子が見つかった。

次に、このうちPRG1とMIFのshRNAを発現し、これらの遺伝子（およびタンパク）の発現を恒常的に抑制するA549細胞株を樹立し、vivoの実験（マウス左足底への皮下注射）を行った。shRNAの発現用のベクターは同時にGFPの遺伝子も搭載しており、これらの細胞株のマウスにおける増殖を蛍光でモニターすることが可能である。20日後、実際にがんで膨れた足底に励起光を当てると、その部分（原発巣）に強い蛍光が生じた。また、膝窩リンパ節に相当する部分も弱いが蛍光を発しており、原発巣からの転移が示唆された。コントロール、PRGおよびMIFのshRNAを発現するA549を各群10匹ずつ注射したマウスから摘出した膝窩リンパ節は、注射をしていない右足側のリンパ節と比べて肥大していた。

原発巣からリンパ節転移を起こす細胞の割合は、リンパ節における転移がん細胞が発する蛍光量をimageJをもちいて求め、原発巣である足底の蛍光量との比より評価した。その結果、コントロールに比べて、PRGやMIFのノックアウト（shRNA）がリンパ節転移を有意に阻害していることがわかった。

### D. 考察

転移したがん細胞のリンパ節に占める割合は一樣ではないことから、肥大したリンパ節の大きさを同時期に測定するだけでは、各細胞株の転移能を比較することはできない。個々の遺伝子がどれほど転移に関与するかを評価するには、本実験のようなin vivoの系をもちい、足底（原発巣）およびリンパ節（転移巣）の相対蛍光量を測定する方法により可能とな

ると考えられる。

### E. 結論

PRGやMIFのノックアウト（shRNA）がリンパ節転移を有意に阻害することから、これらはCUPの特徴といえる“転移能”を付与する遺伝子としてCUPの病態に関連していることが示唆された。現在、同様の方法で残りの候補遺伝子（S100A4、SERF2、OAZ1、TIMP1）の解析を進めている。現在、がんのバイオロジー（原発組織の生物学的特徴を持つ遺伝子）から抽出した各がん種特異的遺伝子（100遺伝子）を選択し、次世代シーケンサーを用いた高感度な原発巣推定のための新診断キットの開発を行っている。また、MIFに対する阻害剤であるresveratrolの誘導体の評価を進めており、今後CUP特異的分子標的薬の非臨床試験を展開していく予定である。

### F. 研究発表

#### 論文発表

1. Yang JC, Wu YL, Chan V, Kurnianda J, Nakagawa K, Saijo N, Fukuoka M, McWalter G, McCormack R, Mok TS. Epidermal growth factor receptor mutation analysis in previously unanalyzed histology samples and cytology samples from the phase III Iressa Pan-ASia Study (IPASS). *Lung Cancer*, S0169-5002(13):00535-00537, 2013.
2. Tsuya A, Kurata T, Tamiya A, Okamoto I, Ueda S, Sakai D, Sugimoto N, Matsumoto K, Goto I, Yamamoto N, Fukuoka M, Nakagawa K. A phase II study of cisplatin /S-1 in patients with carcinomas of unknown primary site. *Invest New Drugs*, 31(6):1568-1572, 2013.
3. Kawakami H, Okamoto I, Okamoto W, Takeda M, Ueda S, Kudo T, Nishina S, Fujisaka Y, Miyazaki M, Tsurutani J, Kurata T, Nakagawa K. Practical Use of Gemcitabine and Cisplatin Combination Therapy as First-Line Treatment for Japanese Patients with Advanced Biliary Tract Cancer. *Journal of Cancer Therapy*, 4:1068-1073, 2013.
4. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, De Pas T, Besse B, Solomon BJ, Blackhall F, Wu YL, Thomas M, O'Byrne KJ, Moro-Sibilot D, Camidge DR, Mok T, Hirsh V, Riely GJ, Iyer S, Tassell V, Polli A, Wilner KD, Jänne PA. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*, 368(25):2385-94, 2013.
5. Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, Hida T, Yamamoto N, Yoshioaka H, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Takeuchi

i K, Shimada T, Tanaka T, Tamura T.CH5424802 (R05424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study.Lancet Oncol,14(7):590-598,2013.

6. Yoshioka H, Okamoto I, Morita S, Ando M, Takeda K, Seto T, Yamamoto N, Saka H, Atagi S, Hirashima T, Kudoh S, Satouchi M, Ikeda N, Iwamoto Y, Sawa T, Nakanishi Y, Nakagawa K.Efficacy and safety analysis according to histology for S-1 in combination with carboplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: updated results of the West Japan Oncology Group LETS study.Ann Oncol,24(5):1326-1331,2013.
7. Kurahashi I, Fujita Y, Arai T, Kurata T, Koh Y, Sakai K, Matsumoto K, Tanioka M, Takeda K, Takiguchi Y, Yamamoto N, Tsuya A, Matsubara N, Mukai H, Minami H, Chayahara N, Yamanaka Y, Miwa K, Takahashi S, Takahashi S, Nakagawa K, Nishio K.A microarray-based gene expression analysis to identify diagnostic biomarkers for unknown primary cancer.PLoS One,8(5):e63249,2013.
8. Ogi S, Fujita H, Kashiwara M, Yamamoto C,

Sonoda K, Okamoto I, Nakagawa K, Ohdo S, Tanaka Y, Kuwano M, Ono M.Sorting nexin 2-mediated membrane trafficking of c-Met contributes to sensitivity of molecular targeted drugs.Cancer Science,104(5):573-578,2013.

9. Kawakami H, Okamoto I, Arai T, Okamoto W, Matsumoto K, Taniguchi H, Kuwata K, Yamaguchi H, Nishio K, Nakagawa K, Yamada Y.MET amplification as a potential therapeutic target in gastric cancer.Oncotarget,4(1):9-17,2013.
10. Hayashi H, Tsurutani J, Satoh T, Masuda N, Okamoto W, Morinaga R, Terashima M, Miyazaki M, Okamoto I, Nishida Y, Tominaga S, Tokuhashi Y, Yamaguchi M, Sakamoto J, Nakayama T, Nakagawa K.Phase II study of bi-weekly irinotecan for patients with previously treated HER2-negative metastatic breast cancer: KMBOG0610B.Breast Cancer,20(2):131-136,2013.

#### 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
3. その他 なし