

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

RNA測定による膵癌血液診断法の実用化研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 金子 周一

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人金沢大学学長 山崎 光悦が実施した平成26年度「RNA測定による膵癌血液診断法の実用化研究」の成果を取りまとめたものです。

# 目 次

## I. 委託業務成果報告(総括)

### RNA測定による膵癌血液診断法の実用化研究

金子 周一 ----- 1

## II. 委託業務成果報告(業務項目)

### 1. 膵癌の病態解析と膵癌高精度判定血液RNA測定診断薬の開発

金子 周一、酒井 佳夫 ----- 7

### 2. 膵癌高精度判定血液RNA測定診断薬の臨床性能試験

金子 周一 ----- 13

III. 学会等発表実績 ----- 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 19

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

RNA測定による膵癌血液診断法の実用化研究

業務主任者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

**研究要旨：**本研究は、血液において消化器癌の有無により発現が変動する遺伝子群のメッセンジャーRNAを測定し消化器癌を診断する既開発済の「消化器がんマイクロアレイ血液検査」を、膵癌を高精度に診断する「膵癌血液mRNA測定検査」に改良、実用化を目的とする。業務項目「膵癌の病態解析と膵癌高精度判定血液RNA測定診断薬の開発」では、全体のプロジェクト進捗管理と、膵癌の病態解析、膵癌高精度判定血液mRNA測定診断薬への改良開発を実施する。業務項目「膵癌高精度判定血液RNA測定診断薬の臨床性能試験」では、「膵癌血液mRNA測定検査」の臨床性能試験案策定、医薬品・医療機器総合機構の体外診断用医薬品対面助言の実施、臨床性能試験実施、体外診断用医薬品承認申請を実施する。本年度は、「膵癌血液mRNA測定検査」の開発のための膵癌病態解析において、切除膵癌組織の炎症状態、膵癌末梢血液細胞の遺伝子発現変化の特徴を解析し、CD4+細胞、単球/マクロファージ系細胞の膵癌組織および末梢血液における重要な役割を明らかとした。RNA測定診断薬「消化器がんPCRマイクロアレイ血液検査」で測定した遺伝子発現データを基に、生物統計解析によって、血液で膵癌に反応しmRNAの発現が変化する40個までの遺伝子群を同定し、診断アルゴリズム構築への準備が完了した。体外診断薬臨床性能試験計画案についての医薬品・医療器総合機構の体外診断用医薬品対面助言、臨床性能試験実施、承認申請の工程を策定した。

担当責任者：

金子 周一

金沢大学医薬保健研究域医学系・教授

酒井 佳夫

金沢大学医薬保健研究域医学系・准教授

A. 研究目的

膵癌は、我が国で約2万9千人が年間死亡し、部位別癌死亡数の第5位を占める重要な悪性腫瘍である。膵癌の5年生存率は

約10%と極めて予後不良であり、その原因には、多くが進行状態で診断される、外科的根治術以外に予後を著しく改善する治療法がない、ことがある。有症状を契機に診断される膵癌は殆どが進行状態である。膵癌特異的なリスク因子もなく、ハイリスク対象の困り込みも困難である。そのため、簡便で普及性のある膵癌診断法の実用化が極めて重要である。

これまでに我々は、癌局所炎症細胞の遺

伝子発現プロファイルにみられる生体反応が、末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイルにも反映されていることを発見した(Cancer Res 2008)。多施設臨床研究にて消化器癌患者の血液中の RNA 発現を網羅的に解析し、消化器癌患者の末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイルの特徴が健常者と異なることを見出した(BBRC 2010)。この研究をもとに、世界で初めて消化器癌の有無により変動する血液中の遺伝子群を同定し、血液を検体とする消化器癌の有無を判別する遺伝子群として特許を取得(特許番号 4953334 号(2011年))、8カ国において PCT 出願している。この技術は、大学発ベンチャー企業による RNA 測定診断薬「消化器がんマイクロアレイ血液検査」の作製、事業化に至り、現在までに 230 施設以上で 4,300 例を超える健康診断を実施、無症状の膵癌 4 例を診断した。この血液診断法の開発により、公益財団法人発明協会の平成 25 年度発明賞を受賞、また、この産業技術にて H25 年の中日産業技術賞を得た。本研究では、膵癌組織の炎症細胞、末梢血液細胞の遺伝子発現解析を行い、膵癌の生体反応の特徴を解析し、開発済の RNA 測定診断薬「消化器がんマイクロアレイ血液検査」を、膵癌を高精度に診断する「膵癌血液 mRNA 測定検査」に改良、実用化を目標とする。

業務項目「膵癌の病態解析と膵癌高精度判定血液 RNA 測定診断薬の開発」では、a. プロジェクトの総合推進、b.膵癌患者の末梢血液、癌組織の解析による遺伝子発現解析診断技術基盤開発、c.消化器癌 RNA 測定

診断薬の膵癌検出診断薬への改良技術開発、d.膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬開発検討会を実施する。

業務項目「膵癌高精度判定血液 RNA 測定診断薬の臨床性能試験」では、改良開発する mRNA 測定体外診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」について、臨床性能試験案、試験薬概要書を策定し、医薬品・医療機器総合機構の体外診断用医薬品対面助言を実施し、治験に準じた臨床性能試験により、体外診断用医薬品承認申請を行う。本業務項目においても、プロジェクトの総合推進、膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬開発検討会を実施する。

## B. 研究方法

業務項目：「膵癌の病態解析と膵癌高精度判定血液RNA測定診断薬の開発」

### a . プロジェクトの総合推進

膵癌の血液、癌組織の病態解析による、血液遺伝子発現解析診断技術基盤開発、消化器癌 RNA 測定診断薬の膵癌検出診断薬への改良技術開発、膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬開発検討会の実施、の業務計画のプロジェクトマネジメントを実施する。膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬策定後の体外診断薬用医薬品承認への、臨床性能試験、医薬品・医療機器総合機構との体外診断用医薬品相談、承認申請までの目標への進捗を管理する。

b . 膵癌患者の末梢血液、癌組織の解析による遺伝子発現解析診断技術基盤開発

膵癌患者の血液細胞、膵癌組織における炎症状態、遺伝子発現解析を実施し、膵癌

患者の血液で発現が変動する遺伝子の生物学的意義を解析する。血液細胞について、DNA マイクロアレイによる解析、Flow Cytometry による血液細胞分画解析を実施する。膵癌組織について、免疫染色等により、膵癌局所炎症状態の特徴解析を実施する。

#### c . 消化器癌 RNA 測定診断薬の膵癌検出診断薬への改良技術開発

膵癌の血液細胞および膵癌局所における生体反応の解析、得られた遺伝子発現変動と膵癌の有無についての生物統計解析により、「消化器がんマイクロアレイ血液検査」を、膵癌を高精度に判定する診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」へ改良開発する。高精度膵癌診断「膵癌血液 mRNA 測定検査」診断薬の安定性、品質開発は、大学発ベンチャー企業（株）キュービクスが実施する。

#### d . 膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬開発検討会の実施

膵癌病態解析、膵癌高精度判定体外診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」の品質技術開発についての統合的検討会議を実施する。

#### 業務項目：膵癌高精度判定血液 RNA 測定診断薬の臨床性能試験

改良開発する高精度膵癌体外診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」について、多施設臨床性能試験を計画する。膵癌、良性膵嚢胞性腫瘍、自己免疫性膵炎、健常者を対象とし、主要評価項目として、「膵癌血液 mRNA 測定検査」の感度、特異度を、副次評価項目として、「膵癌血液 mRNA 測定検査

」と既存の膵癌腫瘍マーカーの性能を比較する臨床性能試験計画案を策定する。体外診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」および臨床性能試験計画案について、医薬品・医療器総合機構の医療機器・体外診断用医薬品対面助言を実施し、試験を行う。データマネージャー、モニタリングを附属病院先端医療開発センターにより実施する。

（株）キュービクスは、改良型高精度膵癌 RNA 測定診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」の体外診断用医薬品に必要な安定性や品質などを保証し、体外診断用医薬品の承認をめざす。これまでの臨床研究で既に整備されている金沢大学を含む北陸地方の関連施設による多施設共同臨床性能試験を実施する。

#### （倫理面への配慮）

膵癌の病態解析についての研究課題「膵胆道癌に対する生体の癌局所と全身応答の解明」は、学内倫理審査委員会の承認を得ている。

臨床性能試験では、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に留意し、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律及び GCP、試験実施計画書を遵守して実施する計画書を作成する。被験者の登録及び症例報告書における被験者の特定は、被験者識別コードで行うとともに、試験の実施に係わる原資料の直接閲覧、医学雑誌への発表、規制当局等への資料提出等において、本試験に係わる者は被験者の秘密を保全する。実施前に、治験に準じ院内受託研究審査委員会に計画についての審査を受け、承認を得て実施する。

## C. 研究結果

### プロジェクトの総合推進

膵癌病態解析と、血液において膵癌で影響される遺伝子群の発現変動測定による体外診断薬開発、臨床性能試験実施への医薬品・医療機器総合機構との体外診断用医薬品相談、承認申請への全体の進捗管理、プロジェクト推進を円滑に行うため、名古屋大学医学部附属病院の先端医療・臨床研究支援センターが運営する中部先端医療開発円環コンソーシアムによる支援を平成 26 年 10 月 30 日の同理事会において承認された。中部先端医療開発円環コンソーシアムの支援によるプロジェクト全体の進捗推進体制（プロジェクトマネージャー：藤原忠美（名古屋大学医学部附属病院先端医療臨床研究支援センター））が整った。

### 膵癌患者の末梢血液、癌組織の解析による遺伝子発現解析診断技術基盤開発

膵癌患者(5 例)および対照健常者(7 例)の末梢血液について、全血液、および CD4+細胞、CD8+細胞、CD14+細胞、CD15+細胞の各分画を分離、それぞれ RNA を抽出、mRNA 発現について DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。階層クラスタリング解析で、全血液、および細胞分画では CD4+細胞と CD14+細胞が、膵癌、健常者それぞれを多数含む 2 つのクラスターが形成、両細胞分画の膵癌血液反応への関与が示唆された。

膵癌切除組織における炎症状態の解析について、外科的切除治療を受けた膵癌患者 20 例の膵癌組織について、炎症細胞集簇

の特徴を免疫染色にて検討した。膵癌局所には、CD33+好中球エラスターゼ陰性の単球/マクロファージ系細胞、CD4+細胞の著明な集簇を認めた。

これらの解析より、膵癌の存在による、全末梢血液細胞の遺伝子発現変化が生じ、末梢血液細胞分画および膵癌局所において CD4+細胞および単球/マクロファージ系細胞がともに膵癌に伴う炎症細胞の反応に重要な役割を担うことが示唆された。

### 消化器癌 RNA 測定診断薬の膵癌検出診断薬への改良技術開発

RNA 測定診断薬「消化器がん PCR アレイ血液検査」で膵癌 28 例、健常者 27 例の全血液遺伝子発現測定を実施した。膵癌の血液で有意に発現変動を示す遺伝子について、リアルタイム定量 PCR にて発現データを確認、得られた遺伝子発現データの生物統計解析により、膵癌に反応し、診断に有用と推定される 40 個までの遺伝子群セットを同定した。

体外診断用医薬品承認のため、血液からの RNA 抽出、発現解析における機器については、医療機器届出済みの PAX-gene 採血管から RNA を抽出するキアゲン社の自動分注装置ならびに自動抽出装置は医療機器を用いることとした。遺伝子発現測定のための機器については、384 個の遺伝子を同時測定可能な同社のリアルタイム PCR 機器を用いることとした（製造販売届出番号：13B3X10099000002）。

### 膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬開発検討会の実施

平成 26 年 11 月 18 日に、「膵臓癌診

断キットの研究開発に関する全体会議」を開催し、膵癌病態解析、膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬の品質技術についての報告討論、および体外診断薬と実施すべき臨床性能試験計画案についての医薬品・医療器総合機構の医療機器・体外診断用医薬品対面助言面談、臨床性能試験実施、承認申請の工程を策定した。工程に従い、医薬品・医療器総合機構の医療機器・体外診断用医薬品に関する対面助言準備面談を平成 27 年 3 月 19 日に実施予定である。また、医薬品開発業務受託機関を選定した。

#### D. 考察

膵癌の末梢血液細胞の遺伝子発現変化解析、膵癌局所の炎症状態の解析により、血液細胞に反映される膵癌に伴う炎症状態に CD4+細胞、単球/マクロファージが関与することが示唆された。膵癌の末梢血液細胞の遺伝子発現変化データの生物統計解析により、膵癌を判別しうる 40 個までの遺伝子群セットを同定した。これらより、膵癌に最も精度が高く反応が検出される遺伝子発現を測定し診断する「膵癌血液 mRNA 測定検査」診断薬開発の基盤が整った。また、開発する「膵癌血液 mRNA 測定検査」の体外診断用医薬品承認を目的とする臨床性能試験への準備が予定どおり進捗した。次年度では、「膵癌血液 mRNA 測定検査」診断薬の試験薬概要書の完成、臨床性能試験案策定、医薬品医療器総合機構の対面助言の実施、臨床性能試験実施準備を完了する予定である。

#### E. 結論

膵癌の末梢血液細胞の遺伝子発現変化解析、膵癌局所の炎症状態の解析により、膵癌に最も精度が高く反応が検出される遺伝子発現を測定し診断する「膵癌血液 mRNA 測定検査」診断薬開発の基盤が整った。開発中の「膵癌血液 mRNA 測定検査」の臨床性能試験への試験実施体制を整備した。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sato Y, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y. Histological characterization of biliary intraepithelial neoplasia with respect to pancreatic intraepithelial neoplasia. International Journal of Hepatology. Volume 2014 (2014), Article ID 678260, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/678260>
- 2) Kitagawa H, Tajima H, Nakagawara H, Makino I, Miyashita T, Shoji M, Nakanuma S, Hayashi H, Takamura H, Ohta T. En bloc vascular resection for the treatment of borderline resectable pancreatic head carcinoma. Molecular and Clinical Oncology, 2(3) : 369-374, 2014.
- 3) Kitagawa H, Tajima H, Nakagawara H, Makino I, Miyashita T, Terakawa H, Nakanuma S, Hayashi H, Takamura H, Ohta T. A modification of radical antegrade modular pancreateosplenectomy for adenocarcinoma of the left pancreas: Significance of En Bloc resection including



the anterior renal fascia. World J Surg  
38(9):2448-2454, 2014.

## 2. 学会発表

- 1) 酒井佳夫、金子周一、和田隆志. 消化器癌における末梢血液細胞の遺伝子発現変化に反映される生体のがん反応解析と癌診断法開発. 一般演題「最新検査・毒性検査・その他」第61回日本臨床検査医学会学術集会. 平成26年11月25日 福岡国際会議場、福岡.
- 2) 北川裕久、田島秀浩、中川原寿俊、牧野勇、宮下知治、寺川裕史、正司政寿、中沼伸一、林 泰寛、高村博之、太田哲生. 切除可能膵頭部癌に対するリンパ行性進展・局所進展からみた治療アルゴリズム(シボシウム). 第45回日本膵臓学会大会. 平成26年7月11日. 北九州市.
- 3) 佐藤保則、原田憲一、佐々木素子、中沼安二. BillIN と PanIN の分子病理学的異常に関する比較検討. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日～30日.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

「遺伝子発現プロファイルによる消化器癌、胃癌、大腸癌、膵臓がんおよび胆道癌の検出」(特許第 4953334 号)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特記事項なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

膵癌の病態解析と膵癌高精度判定血液RNA測定診断薬の開発

担当責任者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

酒井 佳夫 金沢大学医薬保健研究域医学系 准教授

**研究要旨：**本研究は、血液において消化器癌の有無により発現が変動する遺伝子群のメッセンジャーRNAを測定し消化器癌を診断する既開発済の「消化器がんマイクロアレイ血液検査」を、膵癌を高精度に診断する「膵癌血液mRNA測定検査」に改良、実用化を目的とする。本業務項目では、膵癌の病態解析、膵癌高精度判定血液mRNA測定診断薬への改良開発を実施する。「膵癌血液mRNA測定検査」の開発から、医薬品・医療機器総合機構の体外診断用医薬品相談、臨床性能試験実施、体外診断用医薬品承認申請までの全体プロジェクト進捗において、プロジェクトマネジメント、およびデータマネジメント、モニタリングを含む業務について、名古屋大学医学部附属病院の先端医療・臨床研究支援センターが運営する中部先端医療開発円環コンソーシアムの支援が承認された。「膵癌血液mRNA測定検査」の開発のための膵癌病態解析について、切除膵癌組織の炎症状態、膵癌末梢血液細胞の遺伝子発現変化の特徴を解析し、CD4+細胞、単球/マクロファージ系細胞の膵癌組織および末梢血液における重要な役割が明らかとなった。膵癌における末梢血液細胞の遺伝子発現変化について生物統計学解析により、血液において膵癌発生に反応し診断に有用と推定される40個までの遺伝子群を同定した。血液からのmRNA抽出、遺伝子発現解析による体外診断薬「膵癌血液mRNA測定検査」の体外診断用医薬品承認のため、医療機器届出を実施した血液抽出機器、医療機器製造販売承認されているリアルタイムPCR機器を用いる発現解析システムを整備した。

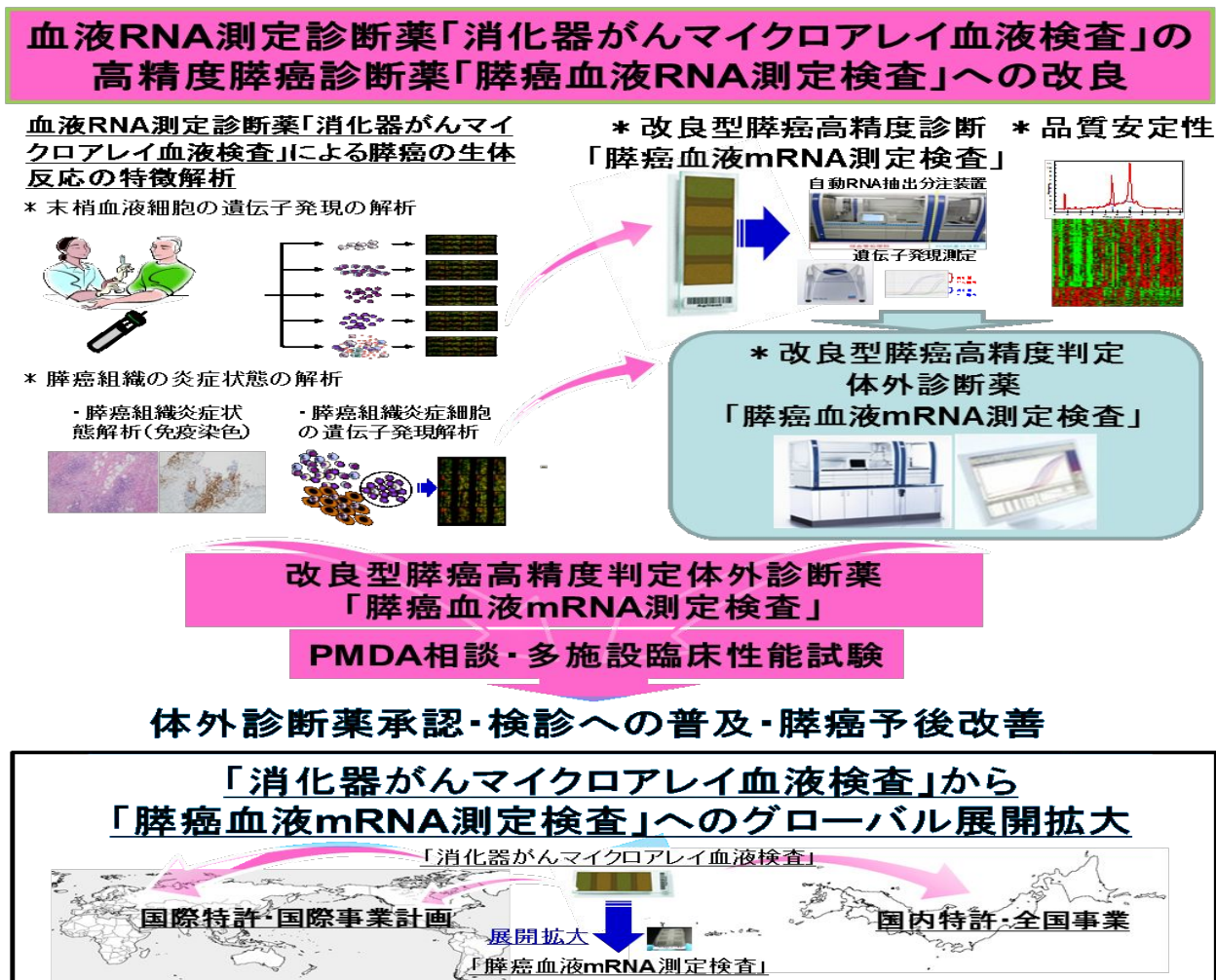
#### A. 研究目的

膵癌は、我が国で約2万9千人が年間死亡し、部位別癌死亡数の第5位を占める重要な悪性腫瘍である。膵癌の5年生存率は約10%と極めて予後不良であり、その原因には、多くが進行状態で診断される、外科的根治術以外に予後を著しく改善する治療法がない、ことがある。有症状を契機に診断される膵癌は殆どが進行状態である。膵

癌特異的なリスク因子もなく、ハイリスク対象の囲い込みも困難である。そのため、簡便で普及性のある膵癌診断法の開発が極めて重要である。

これまでに我々は、癌局所炎症細胞の遺伝子発現プロファイルにみられる生体反応が、末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイルにも反映されていることを発見した(Cancer Res 2008)。多施設臨床研究にて

図1



消化器癌患者の血液中の RNA 発現を網羅的に解析し、消化器癌患者の末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイルの特徴が健常者と異なることを見出した(BBRC 2010)。この研究をもとに、世界で初めて消化器癌の有無により変動する血液中の遺伝子群を同定し、血液を検体とする消化器癌の有無を判別する遺伝子群として特許を取得（特許番号 4953334 号(2011年)）、8カ国において PCT 出願している。この技術は、大学発ベンチャー企業による RNA 測定診断薬「消化器がんマイクロアレイ血液検査」の作製、事業化に至り、現在までに 230 施設以上で 4,300 例を超える健康診断を実施、無症状の膵癌 4 例を診断した。この血液診断法の

開発により、公益財団法人発明協会の平成 25 年度発明賞を受賞、また、この産業技術にて H25 年の中日産業技術賞を得た。本研究では、膵癌組織の炎症細胞、末梢血液細胞の遺伝子発現解析を行い、膵癌の生体反応の特徴を解析し、開発済の RNA 測定診断薬「消化器がんマイクロアレイ血液検査」を、膵癌を高精度に診断する「膵癌血液 mRNA 測定検査」に改良、実用化を目標とする（図 1）。

本業務項目「膵癌の病態解析と膵癌高精度判定血液 RNA 測定診断薬の開発」では、a. プロジェクトの総合推進、b. 膵癌患者の末梢血液、癌組織の解析による遺伝子発現解析診断技術基盤開発、c. 消化器癌 RNA 測

定診断薬の膵癌検出診断薬への改良技術開発、d.膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬開発検討会を実施し、研究目標を達成する。

## B. 研究方法

### a . プロジェクトの総合推進

膵癌の血液、癌組織の病態解析による、血液遺伝子発現解析診断技術基盤開発、消化器癌 RNA 測定診断薬の膵癌検出診断薬への改良技術開発、膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬開発検討会の実施、の業務計画のプロジェクトマネジメントを実施する。膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬策定後の体外診断薬用医薬品承認への、臨床性能試験、医薬品・医療機器総合機構との体外診断用医薬品相談、承認申請までの目標への進捗を管理する。

b . 膵癌患者の末梢血液、癌組織の解析による遺伝子発現解析診断技術基盤開発

膵癌患者の血液細胞、膵癌組織における炎症状態、遺伝子発現解析を実施し、膵癌患者の血液で発現が変動する遺伝子の生物学的意義を解析する。血液細胞について、DNA マイクロアレイによる解析、Flow Cytometry による血液細胞分画解析を実施する。膵癌組織について、免疫染色等により、膵癌局所炎症状態の特徴解析を実施する。

c . 消化器癌 RNA 測定診断薬の膵癌検出診断薬への改良技術開発

膵癌の血液細胞および膵癌局所における生体反応の解析、得られた遺伝子発現変動と膵癌の有無についての生物統計解析によ

り、「消化器がんマイクロアレイ血液検査」を、膵癌を高精度に判定する診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」へ改良開発する。高精度膵癌診断「膵癌血液 mRNA 測定検査」診断薬の安定性、品質開発は、大学発ベンチャー企業（株）キュービクスが実施する。

d . 膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬開発検討会の実施

膵癌病態解析、膵癌高精度判定体外診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」の品質技術開発についての統合的検討会議を実施する。（倫理面への配慮）

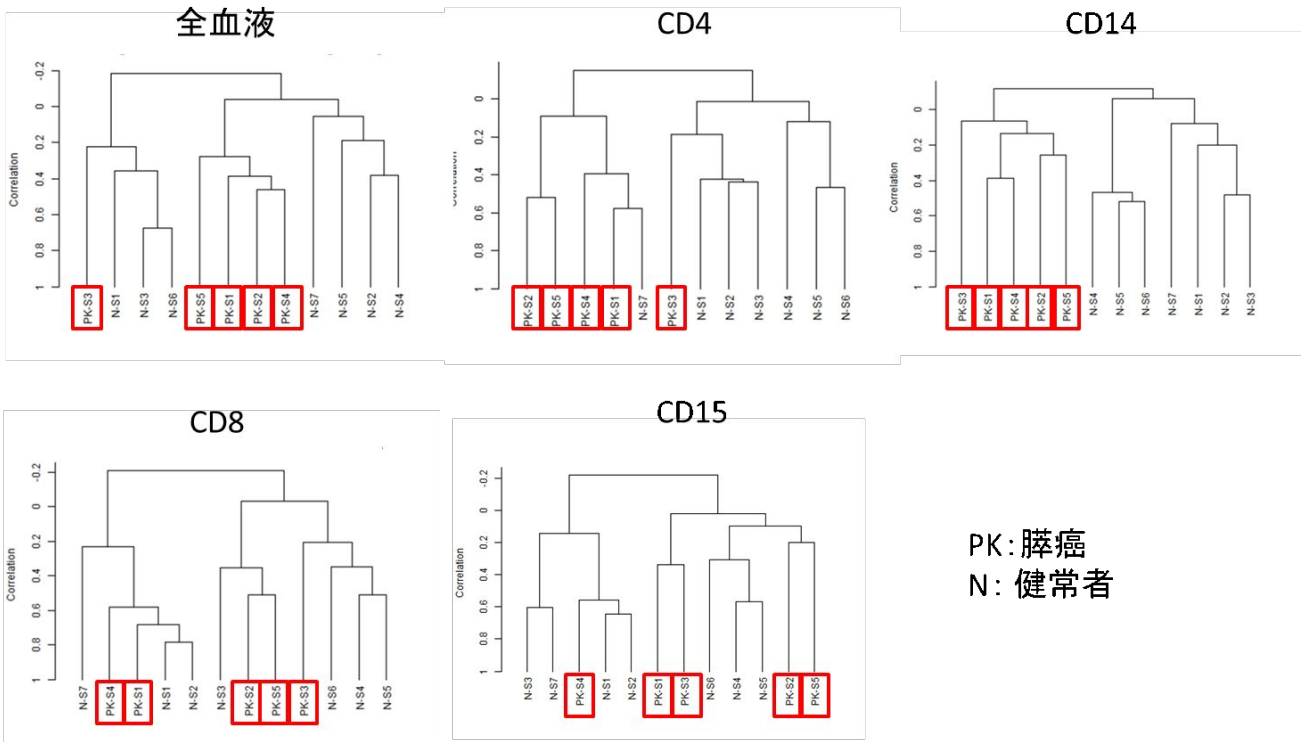
膵癌の病態解析についての研究課題「膵胆道癌に対する生体の癌局所と全身応答の解明」は、学内倫理審査委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### a . プロジェクトの総合推進

膵癌病態解析と、血液において膵癌で影響される遺伝子群の発現変動測定による体外診断薬開発から臨床性能試験実施への医薬品・医療機器総合機構との体外診断用医薬品相談、承認申請への全体の進捗管理、プロジェクト推進を円滑に行うため、名古屋大学医学部附属病院の先端医療・臨床研究支援センターが運営する中部先端医療開発円環コンソーシアムによる支援を平成 26 年 10 月 30 日の同理事会において承認された。中部先端医療開発円環コンソーシアムの支援によるプロジェクト全体の進捗推進体制（プロジェクトマネージャー：藤原忠美（名古屋大学医学部附属病院先端医療臨床研究支援センター））が整った。

## 図2 血液細胞の遺伝子発現解析(階層クラスタリング解析)



### b. 膵癌患者の末梢血液、癌組織の解析による遺伝子発現解析診断技術基盤開発

膵癌患者(5例)および対照健常者(7例)の末梢血液について、全血液、およびCD4+細胞、CD8+細胞、CD14+細胞、CD15+細胞の各分画を分離、それぞれRNAを抽出、mRNA発現についてDNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。階層クラスタリング解析で、全血液、および細胞分画ではCD4+細胞とCD14+細胞が、膵癌、健常者それぞれを多数含む2つのクラスターが形成(図2)、両細胞分画の膵癌血液反応への関与が示唆された。

膵癌切除組織における炎症状態の解析について、外科的切除治療を受けた膵癌患者20例の膵癌組織について、炎症細胞集簇の特徴を免疫染色にて検討した。膵癌局所には、CD33+好中球エラスターゼ陰性の単球/マクロファージ系細胞、CD4+細胞の著

明な集簇を認めた(表1、図3)。

これらの解析より、膵癌の存在による、全末梢血液細胞の遺伝子発現変化が生じ、末梢血液細胞分画および膵癌局所においてCD4+細胞および単球/マクロファージ系細胞がともに膵癌に伴う炎症細胞の反応に重要な役割を担うことが示唆された。

### c. 消化器癌RNA測定診断薬の膵癌検出診断薬への改良技術開発

RNA測定診断薬「消化器がんPCRアレイ血液検査」で膵癌28例、健常者27例の全血液遺伝子発現測定を実施した。膵癌の血液で有意に発現変動を示す遺伝子について、リアルタイム定量PCRにて発現データを確認、得られた遺伝子発現データの生物統計解析により、膵癌に反応し、診断に有用と推定される40個までの遺伝子群セットを同定した。

体外診断用医薬品承認のため、血液から

表1

膵癌組織における炎症細胞浸潤の特徴					
年齢	性別	ステージ	腫瘍サイズ	浸潤細胞数(強拡大観察)	
				CD4	CD33
71	F		25	>100	>100
57	M		25	58	33
61	F		15	48	>100
54	F		55	>100	>100
70	F		33	46	>100
66	M		25	26	>100
60	F		18	>100	>100
78	M		37	>100	>100
77	M		30	55	>100
57	M		55	71	>100
65	M		43	>100	>100
68	F		25	>100	>100
62	M		22	>100	>100
65	M		25	>100	>100
59	F		18	>100	>100
66	M		10	>100	>100
70	M		5	>100	>100
57	F		18	>100	>100
63	M		25	>100	>100
64	F		21	>100	>100

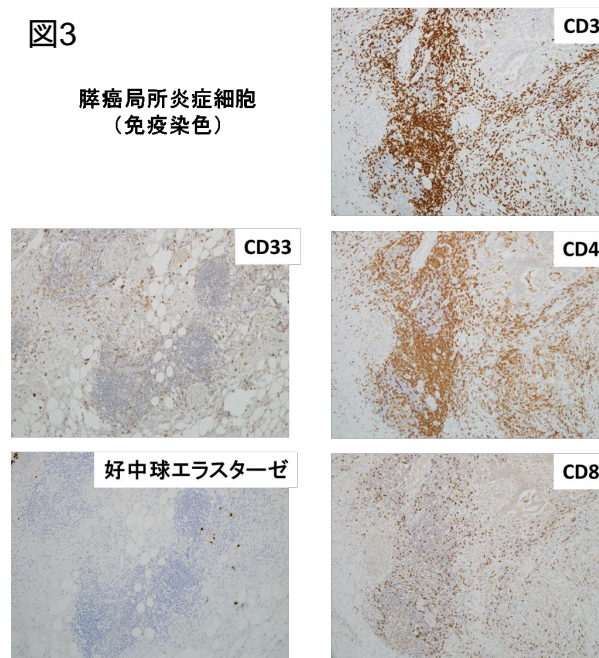
の RNA 抽出、発現解析における機器については、医療機器届出済みの PAX ジーン採血管から RNA を抽出するキアゲン社の自動分注装置ならびに自動抽出装置は医療機器を用いることとした。遺伝子発現測定のための機器については、384 個の遺伝子を同時測定可能な同社のリアルタイム PCR 機器を用いることとした（製造販売届出番号：13B3X10099000002）。

d. 膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬開発検討会の実施

平成 26 年 11 月 18 日に、「膵臓癌診断キットの研究開発に関する全体会議」を開催し、膵癌病態解析、膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬の品質技術についての報告討論および膵癌を高精度に判定する診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」の開発完了およびその後の臨床性能試験実施への工程案を策定した。

D. 考察

図3



膵癌の末梢血液細胞の遺伝子発現変化解析、膵癌局所の炎症状態の解析により、血液細胞に反映される膵癌に伴う炎症状態に CD4+細胞、単球/マクロファージが関与することが示唆された。膵癌の末梢血液細胞の遺伝子発現変化データの生物統計解析により、膵癌を判別しうる 40 個までの遺伝子群セットを同定した。これらより、膵癌に最も精度が高く反応が検出される遺伝子発現を測定し診断する「膵癌血液 mRNA 測定検査」診断薬開発の基盤が整った。次年度では、「膵癌血液 mRNA 測定検査」診断薬の試験薬概要書を完成し、臨床性能試験案策定、医薬品医療機器総合機構の対面助言の実施、臨床性能試験実施準備を完了する予定である。

E. 結論

膵癌の末梢血液細胞の遺伝子発現変化解析、膵癌局所の炎症状態の解析により、血液細胞に反映される膵癌に伴う炎症状態に CD4+細胞、単球/マクロファージが関与す

ることが示唆された。膵癌の末梢血液細胞の遺伝子発現変化データの生物統計解析により、膵癌を判別しうる 40 個までの遺伝子群セットを同定した。これらより、膵癌に最も精度が高く反応が検出される遺伝子発現を測定し診断する「膵癌血液 mRNA 測定検査」診断薬開発の基盤が整った。次年度では、「膵癌血液 mRNA 測定検査」診断薬の試験薬概要書を完成し、臨床性能試験案策定、医薬品医療機器総合機構の対面助言の実施、臨床性能試験実施準備を完了する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sato Y, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y. Histological characterization of biliary intraepithelial neoplasia with respect to pancreatic intraepithelial neoplasia. International Journal of Hepatology. Volume 2014 (2014), Article ID 678260, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/678260>
- 2) Kitagawa H, Tajima H, Nakagawara H, Makino I, Miyashita T, Shoji M, Nakanuma S, Hayashi H, Takamura H, Ohta T. En bloc vascular resection for the treatment of borderline resectable pancreatic head carcinoma. Molecular and Clinical Oncology, 2(3) : 369-374, 2014.
- 3) Kitagawa H, Tajima H, Nakagawara H, Makino I, Miyashita T, Terakawa H, Nakanuma S, Hayashi H, Takamura H, Ohta T. A modification of radical antegrade modular pancreatosplenectomy for

adenocarcinoma of the left pancreas: Significance of En Bloc resection including the anterior renal fascia. World J Surg 38(9):2448-2454, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) 酒井佳夫、金子周一、和田隆志. 消化器癌における末梢血液細胞の遺伝子発現変化に反映される生体のがん反応解析と癌診断法開発. 一般演題「最新検査・毒性検査・その他」第61回日本臨床検査医学会学術集会. 平成26年11月25日 福岡国際会議場、福岡.
- 2) 北川裕久、田島秀浩、中川原寿俊、牧野 勇、宮下知治、寺川裕史、正司政寿、中沼伸一、林 泰寛、高村博之、太田哲生. 切除可能膵頭部癌に対するリンパ行性進展・局所進展からみた治療アルゴリズム(シンポジウム). 第45回日本膵臓学会大会. 平成26年7月11日. 北九州市.
- 3) 佐藤保則、原田憲一、佐々木素子、中沼安二. BilIN と PanIN の分子病理学的異常に関する比較検討. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日～30日.

## G. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

「遺伝子発現プロファイルによる消化器癌、胃癌、大腸癌、膵臓がんおよび胆道癌の検出」(特許第 4953334 号)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特記事項なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

膵癌高精度判定血液RNA測定診断薬の臨床性能試験

担当責任者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

**研究要旨：**本研究は、血液において消化器癌の有無により発現が変動する遺伝子群のメッセンジャーRNAを測定し消化器癌を診断する既開発済の「消化器がんマイクロアレイ血液検査」を、膵癌を高精度に診断する「膵癌血液 mRNA 測定検査」に改良し、実用化することを目的とする。本業務項目では、「膵癌血液 mRNA 測定検査」の臨床性能試験案策定、医薬品・医療機器総合機構の体外診断用医薬品対面助言の実施、臨床性能試験実施、体外診断用医薬品承認申請を実施する。診断薬の開発、実用化工程のジェネラルプロジェクトマネジメントについて、中部先端医療開発円環コンソーシアムの支援が承認された。平成26年11月18日に開催した「膵臓癌診断キットの研究開発に関する全体会議」において、RNA測定診断薬「消化器がんマイクロアレイ血液検査」から膵癌高精度判定血液RNA測定診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」への改良開発進捗を確認した。体外診断薬臨床性能試験計画案についての医薬品・医療器総合機構の体外診断用医薬品対面助言、臨床性能試験実施、承認申請の工程を策定した。

#### A. 研究目的

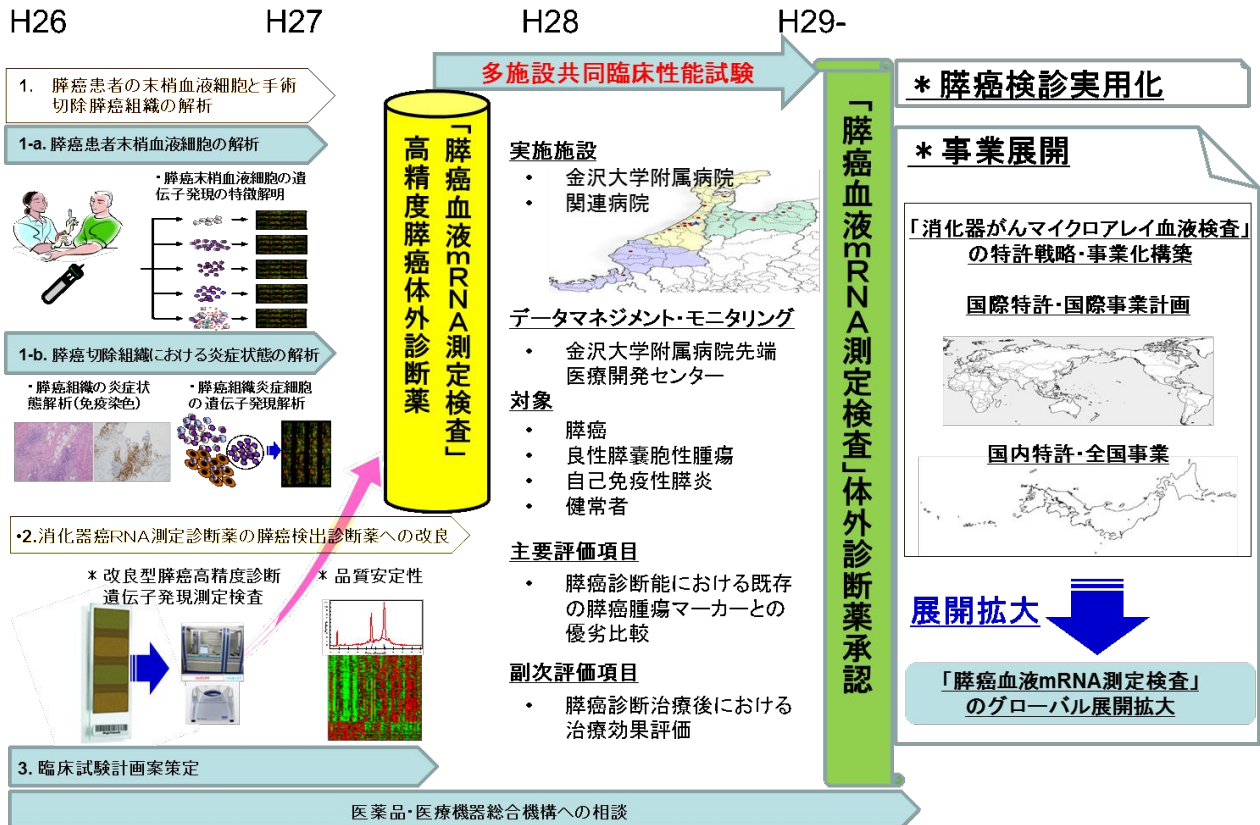
膵癌は、我が国で約2万9千人が年間死亡し、部位別癌死亡数の第5位を占める重要な悪性腫瘍である。膵癌の5年生存率は約10%と極めて予後不良であり、その原因には、多くが進行状態で診断される、外科的根治術以外に予後を著しく改善する治療法がない、ことがある。有症状を契機に診断される膵癌は殆どが進行状態である。膵癌特異的なリスク因子もなく、ハイリスク対象の囲い込みも困難である。そのため、簡便で普及性のある膵癌診断法の開発が極めて重要である。

これまでに我々は、癌局所炎症細胞の遺伝子発現プロファイルにみられる生体反応

が、末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイルにも反映されていることを発見した(Cancer Res 2008)。多施設臨床研究にて消化器癌患者の血液中のRNA発現を網羅的に解析し、消化器癌患者の末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイルの特徴が健常者と異なることを見出した(BBRC 2010)。この研究をもとに、世界で初めて消化器癌の有無により変動する血液中の遺伝子群を同定し、血液を検体とする消化器癌の有無を判別する遺伝子群として特許を取得（特許番号4953334号(2011年)）、8カ国においてPCT出願している。この技術は、大学発ベンチャー企業によるRNA測定診断薬「消化器がんマイクロアレイ血液検査」の作製、



# ロードマップ



事業化に至り、現在までに 230 施設以上で 4,300 例を超える健康診断を実施、無症状の膵癌 4 例を診断した。この血液診断法の開発により、公益財団法人発明協会の平成 25 年度発明賞を受賞、また、この産業技術にて H25 年の中日産業技術賞を得た。本研究では、膵癌組織の炎症細胞、末梢血液細胞の遺伝子発現解析を行い、膵癌の生体反応の特徴を解析し、開発済の RNA 測定診断薬「消化器がんマイクロアレイ血液検査」を、膵癌を高精度に診断する「膵癌血液 mRNA 測定検査」に改良、実用化を目標とする。

本業務項目では、改良開発する mRNA 測定体外診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」について、臨床性能試験案、試験薬概要書を策定し、医薬品・医療機器総合機構の体

外診断用医薬品対面助言を実施し、治験に準じた臨床性能試験により、体外診断用医薬品承認申請を行う。また、プロジェクトの総合推進、膵癌高精度判定血液 mRNA 測定診断薬開発検討会を実施する。

## B. 研究方法

改良開発する高精度膵癌体外診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」について、多施設臨床性能試験を計画する。膵癌、良性膵嚢胞性腫瘍、自己免疫性膵炎、健常者を対象とし、主要評価項目として、「膵癌血液 mRNA 測定検査」の感度、特異度を、副次評価項目として、「膵癌血液 mRNA 測定検査」と既存の膵癌腫瘍マーカーの性能を比較する臨床性能試験計画案を策定する。体外診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」およ

び臨床性能試験計画案について、医薬品・医療器総合機構の医療機器・体外診断用医薬品対面助言を実施し、試験を行う。データマネージャー、モニタリングを附属病院先端医療開発センターにより実施する。(株)キュービクスは、改良型高精度膵癌 RNA 測定診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」の体外診断用医薬品に必要な安定性や品質などを保証し、体外診断用医薬品の承認をめざす。これまでの臨床研究で既に整備されている金沢大学を含む北陸地方の関連施設による多施設共同臨床性能試験を実施する。

(倫理面への配慮)

臨床性能試験では、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に留意し、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律及び GCP、試験実施計画書を遵守して実施する計画書を作成する。被験者の登録及び症例報告書における被験者の特定は、被験者識別コードで行うとともに、試験の実施に係わる原資料の直接閲覧、医学雑誌への発表、規制当局等への資料提出等において、本試験に係わる者は被験者の秘密を保全する。実施前に、治験に準じ院内受託研究審査委員会に計画についての審査を受け、承認を得て実施する。

#### C. 研究結果

平成 26 年 11 月 18 日に、「膵臓癌診断キットの研究開発に関する全体会議」において、RNA 測定診断薬「消化器がんマイクロアレイ血液検査」から膵癌高精度判定血液 RNA 測定診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」への改良開発、体外診断薬と実施すべ

き臨床性能試験計画案についての医薬品・医療器総合機構の医療機器・体外診断用医薬品対面助言面談、臨床性能試験実施、承認申請の工程を策定した。工程に従い、医薬品・医療器総合機構の医療機器・体外診断用医薬品に関する対面助言準備面談を平成 27 年 3 月 19 日に実施予定である。

体外診断薬の臨床性能試験実施、体外診断用医薬品承認のため必要な、プロジェクトマネジメント、生物統計、データマネジメントについて、名古屋大学医学部附属病院の先端医療・臨床研究支援センターが運営する中部先端医療開発円環コンソーシアムの支援が、同理事会にて承認された。また、医薬品開発業務受託機関を選定した。

#### D. 考察

開発する「膵癌血液 mRNA 測定検査」の体外診断用医薬品薬「承認を目的とする臨床性能試験への準備が予定どおり進捗した。

#### E. 結論

開発中の「膵癌血液 mRNA 測定検査」の臨床性能試験へのプロジェクトマネジメントを含め、試験実施体制を整備し、開発工程を策定した。次年度に、体外診断薬「膵癌血液 mRNA 測定検査」、臨床性能試験計画案について医薬品・医療器総合機構の対面助言を実施し、試験開始予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

本業務項目関連にはなし。

##### 2. 学会発表

1) 酒井佳夫、金子周一、和田隆志．消化

器癌における末梢血液細胞の遺伝子発現変化に反映される生体のがん反応解析と癌診断法開発. 一般演題「最新検査・毒性検査・その他」第61回日本臨床検査医学会学術集会. 平成26年11月25日 福岡国際会議場、福岡.

## G. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

「遺伝子発現プロファイルによる消化器癌、胃癌、大腸癌、膵臓がんおよび胆道癌の検出」(特許第 4953334 号)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特記事項なし

様式第 1 9

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「RNA測定による膵癌血液診断法の実用化研究」

機関名 国立大学法人金沢大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
消化器癌における末梢血液細胞の遺伝子発現変化に反映される生体のがん反応解析と癌診断法開発、口頭	酒井佳夫、金子周一、和田隆志	第61回日本臨床検査医学会学術集会、福岡国際会議場、福岡	2014年11月25日	国内
切除可能膵頭部癌に対するリンパ行性進展・局所進展からみた治療アルゴリズム、口頭（シンポジウム）	北川裕久、田島秀浩、中川原寿俊、牧野 勇、宮下知治、寺川裕史、正司政寿、中沼伸一、林 泰寛、高村博之、太田哲生	第45回日本膵臓学会大会、北九州市	2014年7月11日	国内
BillIN と PanIN の分子病理学的異常に関する比較検討、ポスター発表	佐藤保則、原田憲一、佐々木素子、中沼安二	第50回日本肝臓学会総会、東京	2014年5月29日 ～30日	国内
血小板の制御による膵癌転移治療の新戦略～癌転移に対する血小板の役割とその制御～、口頭（シンポジウム）	宮下知治、田島秀浩、中沼伸一、酒井清祥、木下 淳、牧野 勇、中村慶史、林 泰寛、尾山勝信、中川原寿俊、高村博之、二宮 致、北川裕久、伏田幸夫、太田哲生	第23回日本がん転移学会学術集会・総会、金沢市	2014年7月	国内
当科におけるUICC規約膵体部癌に対する治療成績、口頭（シンポジウム）	田島秀浩、北川裕久、太田哲生	第12回日本消化器外科学会大会、神戸市	2014年10月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Histological characterization of biliary intraepithelial neoplasia with respect to pancreatic intraepithelial neoplasia.	Sato Y, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y.	International Journal of Hepatology Volume 2014 (2014), Article ID 678260, 7 pages <a href="http://dx.doi.org/10.1155/2014/678260">http://dx.doi.org/10.1155/2014/678260</a>	April 10, 2014.	国外
En bloc vascular resection for the treatment of borderline resectable pancreatic head carcinoma.	Kitagawa H, Tajima H, Nakagawara H, Makino I, Miyashita T, Shoji M, Nakanuma S, Hayashi H, Takamura H, Ohta T.	Mol Clin Oncol. 2014 May;2(3):369-374. Epub 2014 Feb 27.	May, 2014.	国外
A modification of radical antegrade modular pancreatosplenectomy for adenocarcinoma of the left pancreas: Significance of En Bloc resection including the anterior renal fascia.	Kitagawa H, Tajima H, Nakagawara H, Makino I, Miyashita T, terakawa H, Nakanuma S, Hayashi H, Takamura H, Ohta T.	World J Surg. 2014 Sep;38(9):2448-54. doi: 10.1007/s00268-014-2572-5.	Sep., 2014	国外