

# 研究計画書

平成 22 年 11 月 18 日 (提出)

申請者 (実施責任者)

所属 埼玉医科大学総合医療センター 消化管・一般外科

氏名 石田 秀行

## 1. 課題名

消化器腫瘍の発生・進展に関わる因子の探索的研究

## 2. 実施責任者

埼玉医科大学総合医療センター 消化管一般外科 教授 石田 秀行

## 3. 実施分担者

埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	准教授	芳賀 紀裕
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	講師	石橋敬一郎
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	講師	隈元 謙介
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	岡田 典倫
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	傍島 潤
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	桑原 公亀
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	大澤 智徳
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	石畝 亨
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	幡野 哲
埼玉医科大学総合医療センター	消化管・一般外科	助教	天野 邦彦
埼玉医科大学総合医療センター	病理部	講師	東 守洋
埼玉医科大学先端医療開発センター		センター長	西山 正彦
埼玉医科大学国際医療センター	ゲノム医学センター	所長	岡崎 康司
埼玉医科大学国際医療センター	病理診断科	教授	清水 道生

## 4. 個人情報管理者

埼玉医科大学総合医療センター 病理部 教授 田丸 淳一

## 5. 研究期間

承認日から 5 年間

## 6. 研究の目的と概要

食道・胃・小腸・大腸などの消化器腫瘍は、予後良好な症例から早期に転移する予後不良症例までさまざまである。これまでその発生進展に関わる遺伝子候補が多々研究されてきたが、今なお明らかにされていない遺伝子が関与していることは確実と考えられる。そこで、消化器腫瘍（食道・胃・小腸・大腸）の原発巣・転移巣および正常組織における遺伝子発現・変異比較により、腫瘍の発生・進展・無限増殖に関わる遺伝子を探索する。さらに、ゲノム DNA の多型解析により、消化器腫瘍発生・進展の感受性遺伝子、化学療法の感受性遺伝子についても検索し、分子情報にもとづく悪性度診断・オーダーメイド治療・分子標的治療の可能性を開くことを目的とする。

## 7. 対象

埼玉医科大学総合医療センター消化管・一般外科で治療（外科治療，内視鏡的治療，化学療法など）を受けた消化器腫瘍患者で，本研究内容を文書（別紙参照）で説明を受け，十分に理解した上，自らの意思で研究への協力を決定し，文書で承諾した者を対象とする（本研究の承認前にすでに試料の保管と研究利用についての同意が得られ，実際に試料が保管されている場合も含む）。これらの対象患者から得られた A 群試料のうち，凍結保存された検体の利用は約 2000 検体，ホルマリンブロックからの検体も約 1000 検体の予定である。疾患（臓器）別の症例数では，食道腫瘍 100 例，胃腫瘍 300 例，小腸・大腸腫瘍 500 例程度の予定である。

## 8. 方法

### (1) 検体の採取・保管

対象となる検体には，手術前後や治療経過中の血液，手術後のドレーン排液，胸水や腹水，消化器腫瘍の診断もしくは治療のために切除され，凍結保存された組織の一部（腫瘍組織および一部の正常組織を含む），切除後に病理診断のために保存された標本など。採取された検体は，埼玉医科大学総合医療センター消化管・一般外科で連結匿名化したうえで，消化管・一般外科の研究室で保管される。匿名化作業は本研究に直接関与しない助教が行い，その管理は総合医療センターの個人情報管理責任者のもとで厳重に管理する。

### (2) DNA, RNA, 蛋白の抽出とその用途について

埼玉医科大学総合医療センター消化管・一般外科あるいは共同研究施設において，上記試料（A 群試料）より DNA, RNA, 蛋白を抽出し，各々凍結保存する。

- ① 末梢血より得られる白血球成分よりゲノム DNA を抽出し，このゲノム DNA を用いて癌関連遺伝子や抗癌剤耐性関連遺伝子を含む様々な遺伝子の塩基配列を調べる。癌化に伴う遺伝子変異の検出や個々人が生まれながらに有する一塩基多型 SNP (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) を検索することにより，疾患との関連性を解明や治療効果の予測に役立つと考えられる<sup>1)</sup>。<sup>2)</sup> 具体的な例として，切除不能進行・再発大腸癌に対する FOLFOX 療法の場合，抗癌剤耐性関連遺伝子の候補に，抗癌剤である 5FU の代謝関連酵素である thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidine phosphorylase (TP) や，オキサリプラチンに関連する分子として DNA 除去修復酵素である excision repair cross-complementing 1

(ERCC1), ERCC2 などが挙げられる。これまで我々が検索してきた遺伝子多型については別表 1 に示すとおりである。これら遺伝子の遺伝子多型と FOLFOX の効果もしくは有害事象に関連があるという報告は我々を含めて海外からもあり、このような遺伝子情報を検索することにより、今後臨床情報に有用になる情報が得られることを目的に施行する。現時点では、抗癌剤耐性関連遺伝子や癌関連遺伝子に関して、診断や治療に役立つ候補遺伝子は少なく、今後こうした遺伝子を探索するとともに発見された場合、新たな検索項目に随時加えながら検索する予定である。

【表 1 FOLFOX 療法と関連のある遺伝子とその遺伝子多型】

遺伝子名	遺伝子多型
TS	5'-UTR polymorphism 3'-UTR polymorphism
MTHFR	SNP C677T SNP A1298C
ERCC1	codon 118 C→T
ERCC2	codon 751 A→C
GSTP1	codon 105 A→G

- ② 末梢血より得られる血清あるいは血漿成分を用いることにより、血中のタンパク量や腫瘍マーカーのような血中に遊離する腫瘍抗原の検出が可能である。測定法には、標的タンパクの抗体を用いた ELISA 法が一般的である。こうした検索により癌特異的な分子マーカーの検出や治療の標的やモニタリング、または過剰に発現している場合には治療の標的になりうる分子を見出すのみ有用であると考えられる<sup>3)</sup>。
- ③ 末梢血以外の、腹水や胸水の試料も基本的には試料内に含まれる標的タンパクの同定もしくは定量に用いる予定である。このような試料中に含まれる癌細胞成分を検出することも癌の早期発見や治療効果判定に有用であり、試料より DNA もしくは RNA を抽出し PCR 法により検出する。
- ④ 手術や生検により得られる組織試料の用途は多岐にわたる。組織からは、DNA, RNA, 蛋白の抽出が可能である。
- i) DNA については、癌組織で正常組織に比較して様々な遺伝子の突然変異が起きていないかどうか検索する<sup>4)</sup>。このような遺伝子異常は、癌化に関与している可能性があり臨床研究を計画するにあたり非常に有用である。
- ii) RNA の解析には、大別してメッセンジャー RNA (mRNA) とマイクロ RNA (miRNA) を用いる。実際に標的遺伝子の mRNA 発現が亢進しているか減弱しているかリアルタイム PCR 法や従来の PCR 法により検討する。疾患に関与する遺伝子群を網羅的解析するにあたり、国内外で広く施行されている mRNA<sup>5),6)</sup> や近年報告されている miRNA<sup>7)</sup> を用いたマイクロアレイ法も施行する。mRNA のマイクロアレイに関しては、Affymatrix 社の GeneChip™ Human Genome U133 Plus 2.0 Array を使用し、ヒトの 38500 遺伝子の発現を網羅的解析する予定である。miRNA に関しては、東レの miRNA Oligo

chip で約 900 種の miRNA の発現を網羅的に解析する予定である。

iii) 組織より抽出された蛋白は、遺伝子発現の最終産物としてその遺伝子機能を反映する。組織より得られる蛋白の発現は、Western blot 法によりその発現も検討する。

⑤通常の病理組織診断時に作製されるパラフィン包埋切片を用いた、検索分子の抗体による免疫学的組織染色法により、組織のタンパク発現を検索する<sup>8)</sup>。

⑥パラフィン包埋状態の病理標本から laser captured microdissection (LCM)法<sup>9)10)</sup>により DNA や RNA を抽出することも可能であり、検体試料が十分量採取できない場合や検体が凍結保存されていない場合に行う。

### (3) データ解析

上記方法による遺伝子発現解析・ゲノム解析結果の相互関係、および対象とした症例の臨床的病理学的所見との関連性を検討する。たとえば癌化に関わる遺伝子、原発巣と転移巣の発現解析の比較から転移にかかわる遺伝子、抗癌剤の感受性に関連する遺伝子、予後良好例と不良例の比較から悪性度にかかわる遺伝子候補を同定するとともに、多型解析により腫瘍の発生・進展の疾患感受性遺伝子や化学療法の影響性遺伝子候補を同定し、インビトロの細胞株における過去のデータとも比較する。

## 9. 人権への配慮と個人情報の保護

「ヘルシンキ宣言」、 「臨床研究に関する倫理指針」 および 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」 に従って人権擁護の配慮に努める。試料の保存は上記に記した通りで、連結可能匿名化を消化管・一般外科内で行う。匿名化は本研究に直接関与しない田島雄介 助教が行い、当院の個人情報保護責任者である 病理部 田丸 淳 教授のもとで厳重に管理される。

## 10. インフォームド・コンセントのための手続及び方法

研究実施責任者または研究実施分担者が、対象者または代諾者に説明文書「消化器腫瘍の発生・進展に関わる因子の探索的研究へのご協力をお願い」に基づき説明を行う。すなわち、研究の目的と意義、方法、研究実施場所、個人情報の保護、本研究への協力を行わなくても何ら診療上の不利益を受けないこと、何時でも協力を中止できることなどを文書で説明する。十分な理解が得られ、協力の意志を伝えられた対象者が「消化器腫瘍の発生・進展に関わる探索的研究に関する同意書」に署名することにより同意を得る。なお、本研究承認前に試料（A 群試料）を医学的研究に使用する同意を文書で得ている場合、本研究に際して改めて同意を得ることとする。

## 11. 試料等の保存方法及びその必要性

本研究期間においては、試料は研究実施担当者が研究実施機関である埼玉医科大学総合医療センター 消化管・一般外科の冷凍庫に保管する。将来の腫瘍の発生・進展に関わる遺伝子解析研究のための貴重な資源として、研究期間の終了後も提供者の同意が得られたものについては埼玉医科大

学総合医療センター 消化管・一般外科で保管する。将来試料を他の目的の研究に使用する場合は、新たにその研究計画書を倫理審査委員会において承認を受けた上で利用する。消化管・一般外科以外で遺伝子解析を含むすべての解析を行った検体については、解析終了後すみやかに総合医療センター 消化管・一般外科内の冷凍庫に再び保管する。研究期間終了時に研究の継続や検体の保管についてあらためて検討し、必要な場合には倫理委員会の審査を受ける。

## 2. 医学上の貢献の予測

本研究は、癌治療における早期診断に役立つ分子マーカー、再発転移や予後を予測する分子マーカー、治療の標的分子となりうる分子マーカー、抗癌剤治療の効果予測を可能にする分子マーカーの検索を目的とし、これらを遂行することにより癌診療の現場における個別化治療の実現と医療経済の効率化などに大きく寄与することが期待される。

## 参考文献

- 1). Erichsen HC, Chanock SJ. SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer* 90: 747-51, 2004
- 2). Hartman M, Loy EY, Ku CS, Chia KS. Molecular epidemiology and its current clinical use in cancer management. *Lancet Oncol* 11: 383-90, 2010
- 3). Cressey R, Pimpa S, Chewaskulyong B, Lertprasertsuke N, Saeteng S, Tayapiwatana C, Kasinrerak W. Simplified approaches for the development of anELISA to detect circulating autoantibodies to p53 in cancer patients. *BMC Biotechnol* 8: 16, 2008
- 4). Guo QM. DNA microarray and cancer. *Curr Opin Oncol* 15: 36-43, 2003
- 5). Clarke PA, te Poele R, Wooster R, Workman P. Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential. *Biochem Pharmacol* 62: 1311-36, 2001
- 6). Clarke PA, te Poele R, Workman P. Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents. *Eur J Cancer* 40: 2560-91, 2004
- 7). Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6: 857-66, 2006
- 8). Geller SA, Dhall D, Alsabeh R. Application of immunohistochemistry to liver and gastrointestinal neoplasms: liver, stomach, colon, and pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 132: 490-9, 2008
- 9). Hergenbahn M, Kenzelmann M, Gröne HJ. Laser-controlled microdissection of tissues opens a window of new opportunities. *Pathol Res Pract* 199: 419-23, 2003
- 10). Wang S, Wang L, Zhu T, Gao X, Li J, Wu Y, Zhu H. Improvement of tissue preparation for laser capture microdissection: application for cell type-specific miRNA expression profiling in colorectal tumors. *BMC Genomics* 11: 163, 2010