

切除不能・再発結腸/直腸がん初回化学療法例に対する
5-fluorouracil(5-FU)/leovorinate calcium(I-LV) + oxaliplatin (L-OHP) +
bevacizumab(BEV)併用療法 対 5FU/I-LV + irinotecan(CPT-11) + BEV 併用
療法のランダム化比較第 III 相試験 (WJOG 4407G) における
治療感受性・予後予測因子の探索的研究
実施計画書

【WJOG 理事長】

中西 洋一

九州大学病院

〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1

TEL 092-642-1151 FAX:092-642-5389

【研究実施責任者・TR 委員長】

西尾 和人

近畿大学医学部附属病院ゲノム生物学教室

〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野台 377-2

TEL:072-366-0221 FAX : 072-360-5000

E-mail : knishio@med.kindai.ac.jp

【研究事務局】

鶴谷 純司

近畿大学医学部附属病院腫瘍内科学講座

〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野台 377-2

TEL:072-366-0221 FAX: 072-360-5000

E-mail: tsurutani_j@dotd.med.kindai.ac.jp

2008年 9月 5日 第1案

2008年12月 3日 第2案

2009年 4月 6日 WJOGプロトコル審査委員会承認

2009年 4月25日 WJOG理事会承認 (Ver.1.00)

2009年 6月 1日 WJOG理事長名変更 (Ver.1.01)

2012年 4月 7日 WJOG 理事会承認 (Ver.1.02)

目次

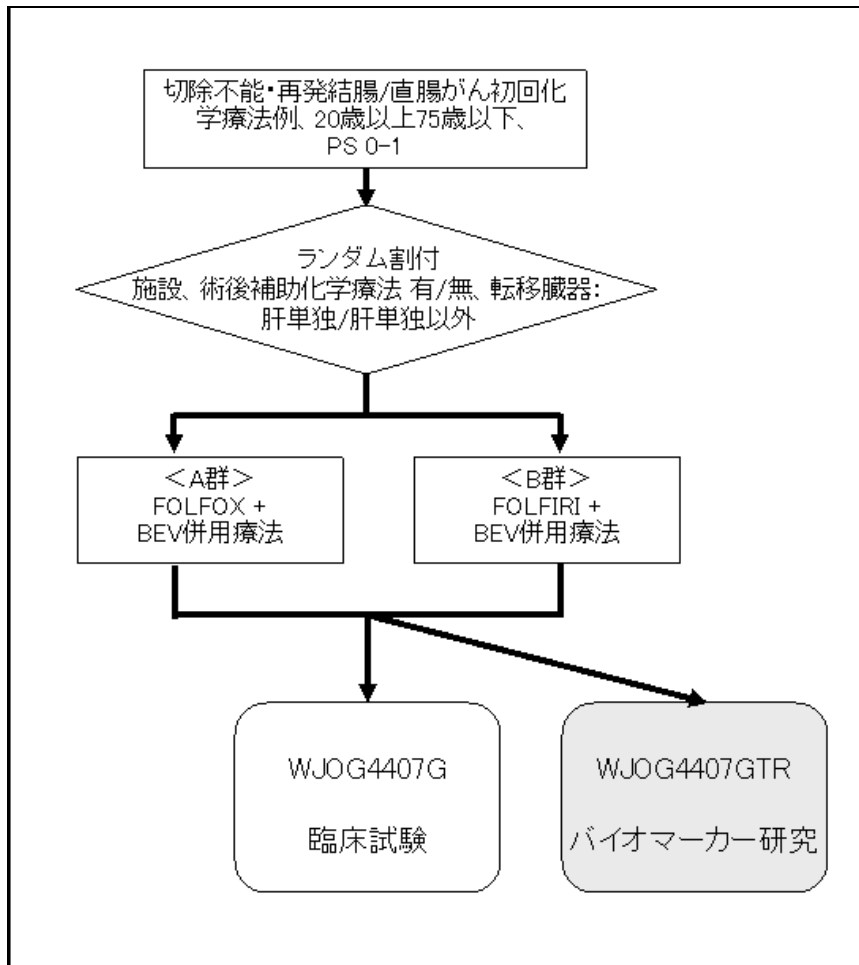
0.本研究の概要	4
0.1. 研究のシェーマ	4
0.2. 目的	4
0.3. 対象症例	4
0.4. 検体	5
0.5. 測定法	5
0.6. 症例集積期間	5
0.7. 予測される成果	5
0.8. 予測される患者に対する危険・不利益	5
1.背景	6
2.目的	7
3.対象	7
4.除外基準	7
5.登録の手順	8
6.検体の取り扱い	9
6.1. 検体の種類・量	9
6.2. 検体採取の時期	9
6.3. 検体の処理	10
6.4. 検体送付	11
6.5. 検体等の保存および廃棄	11
7.1. 癌の免疫組織学的検討	13
7.2. MassArray による抗癌剤代謝関連遺伝子発現（癌組織における各種 mRNA の定量）	13
7.3. 血管新生関連因子の multiplex ELISA（血漿中のサイトカイン測定）	14
7.4. Scorpion ARMS 法による腫瘍組織における K-Ras 遺伝子変異の測定	14
7.5. 糖鎖の解析	14
7.6. CGH 法	14
8. 統計学的事項	15
8.1. 解析対象集団	15
8.2. 解析計画	16
8.2.1. 各種パラメーター間の相関	16
8.2.2. 予後因子の探索的解析	16
9.本研究の流れ	17
10. 目標症例数と期間	17

11. 予測される成果および予測される患者に対する危険、不利益	17
12. 倫理的配慮	17
12.1 インフォームド・コンセント	18
12.1.1. 検体提供者の同意	18
12.1.2. 同意説明文書・同意書による検体提供者への説明事項	18
12.2. 解析結果の開示	18
13. データ収集	18
14. 研究組織	19
15. プロトコール作成	20
16. 研究結果の発表	20
17.本研究で用いる測定系に関して	21
18. 参考文献	23
別紙 1	25
別紙 2	26

附 1	患者説明・同意書
附 2	検査室への申込用紙
附 3	病理部門への申込用紙
附 4	検体送付票
附 5	登録確認通知票
附 6	担当医手順書
附 7	検体提出依頼書

0. 本研究の概要

0.1. 研究のシェーマ



0.2. 目的

切除不能・再発結腸/直腸がん初回化学療法例に対する FOLFOX + bevacizumab 併用療法 対 FOLFIRI + BEV 併用療法のランダム化比較第 III 相試験 (WJOG 4407G) のバイオマーカー研究として、各種の臨床病理学的因子の治療感受性・予後予測因子としての意義を評価する。

0.3. 対象症例

WJOG4407G に登録され、かつ本研究 WJOG4407GTR に同意が得られた患者

*すでに 4407G に登録され、治療が開始された患者も登録可能である。この場合、末梢静脈採血検体の採取は行わない。組織検体の提供のみ行う。

0.4. 検体

1)末梢静脈血

末梢静脈血 7ml を採血し、その血漿を用いる。

治療前、治療 2 週後の 2 ポイントで採血する。

2)病理スライド

治療前に得られた病理スライド（腫瘍組織検体）を用いる。

手術検体もしくは内視鏡下生検組織を用いる。

臨床試験登録以前に採取された検体も使用可能とする。

0.5. 測定法

治療前の組織検体に対して、血管関連因子（CD34、VEGF-A、HIF1alpha、PDGFRbeta、Neuropilin ）の免疫染色を行う。抗 CD34 抗体にて染色した切片では癌組織での微小血管密度（microvascular density、MVD）を測定する。また Mass array にて薬剤感受性を規定していると予測される遺伝子の mRNA の発現を癌組織で測定する。腫瘍組織中の各種遺伝子のコピー数変化を Comparative Genomic Hybridization（CGH）法を用いて測定する。血漿中の血管新生因子と抑制因子を Multiplex ELISA、あるいは ELISA で定量する。以上の測定結果と化学療法の抗腫瘍効果および予後など臨床情報との関連を調べる。

0.6. 症例集積期間

WJOG4407G に準ずる。

0.7. 予測される成果

大腸癌の遺伝子変異や遺伝子発現や血管新生関連因子の蛋白発現と薬剤感受性・予後との関係が明らかになれば、大腸癌の個別化医療に寄与することが期待される。

0.8. 予測される患者に対する危険・不利益

本試験は手術標本及び内視鏡下生検組織、採血検体を解析の対象とするため、試験のために新たに発生する検体は採血(7ml)のみであり、身体的な危険・不利益は極めて小さい。また、1) 本試験計画書に基づいて本人への十分な説明・同意の下に行われること、2) 個人情報 は匿名化され厳重に管理されること 3) 研究対象は「子孫に受け継がれ得るヒトゲノム及び遺伝子の構造または機能」を対象としないこと、4) 正常組織のゲノムは解析対象としないことから、患者の人権・プライバシーに関する危険、不利益も極めて小さいと考えられる。

1.背景

Bevacizumab (BEV) は VEGF-A に対するヒト化モノクローナル抗体として開発され、VEGF-VEGFR 結合を阻害する薬剤である。腫瘍血管の血管内皮細胞は薬剤暴露により VEGFR シグナル伝達を遮断され、結果的に腫瘍血管は強力な血管新生阻害作用を受ける。BEV の有用性は切除不能・再発結腸直腸がんに対して確立しており、臨床の場に登場して数年経過している。BEV の薬理作用メカニズムは創薬の時点で明確であり、BEV を含めた血管新生阻害薬に対するバイオマーカー研究は精力的に早期の臨床開発段階から行われている。しかしながら臨床実地上有用な①再現性があり②簡便で③測定値に施設間格差がなく④非侵襲的なバイオマーカーは現時点では特定されていない(1)。同様に、FOLFOX および FOLFIRI レジメンの効果予測因子についても、臨床実地上有用と証明されているバイオマーカーは現時点で特定されていない。

トラスツマブに対する HER2 発現、抗 EGFR 抗体における K-Ras 変異、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に対する EGFR 遺伝子変異などの例からも、抗腫瘍薬の効果予測因子を特定し、治療対象の層別化を行うことは、医療経済面から有益であるのみならず、患者にとっても無効な薬剤投与による有害事象の出現および無効な薬剤による無駄な治療期間の回避などの有益性をもたらすことが広く理解されてきている。

一方、BEV の効果予測因子の同定作業が進んでいない原因として、BEV 本来の作用機序である腫瘍環境における「血管内皮細胞-血管新生」阻害に関する研究に重点が置かれ、腫瘍細胞側の因子、つまり「がん細胞側の低酸素あるいはストレスに関連した薬剤感受性因子」に対する研究アプローチが欠如していることも理由として挙げられる。正常組織であり遺伝子異常のない腫瘍血管内皮細胞をターゲットにしているにもかかわらず、BEV の上乘せ効果に個人差があることや、画像技術を用いた動物実験において、BEV の血管新生阻害効果と抗腫瘍効果が必ずしも相関しない事実などから、腫瘍側の何らかの因子が薬剤の効果を規定している可能性があり、これらが効果予測バイオマーカーになりうることを示唆している。そこで、本研究では大腸がん組織における血管新生関連因子をはじめとした多くの遺伝子の発現を複数の測定系を用いて網羅的に測定し、BEV を含んだ化学療法治療効果との関連を調べる。各々の測定系に関しては「17. 本研究で用いる測定系に関して」において解説する。

2.目的

- 1) 癌組織の微小血管密度、および血管関連因子（VEGF-A など）の発現と奏効率および無増悪生存期間ならびに全生存期間の関係を明らかにする。
- 2) 癌組織における各種遺伝子（8.2.参照）の発現や K-Ras 遺伝子変異と奏効率および無増悪生存期間ならびに全生存期間の関係を明らかにする。
- 3) 血漿における血管新生因子と阻害因子の発現と奏効率および無増悪生存期間ならびに全生存期間の関係を明らかにする。
- 4) 糖鎖解析結果と奏効率および無増悪生存期間ならびに全生存期間の関係を検討する。

3.対象

WJOG4407G 試験に登録され、WJOG4407GTR への同意が得られた症例。

*すでに 4407G に登録され、治療が開始された患者も登録可能である。この場合、末梢静脈血検体の採取は行わない。組織検体の提供のみ行う。

4.除外基準

特に設定しない。

5.登録の手順

<WJOG4407GTR 登録の手順の流れ>

- 1) 各施設は臨床試験 WJOG4407GTR の同意を得る。
- 2) 各施設は臨床試験「WJOG4407GTR 登録適格性票」を記載しデータセンターに FAX する。(下記の図参照)。
- 3) データセンターは適格性の判定後に、臨床試験 WJOG4407GTR に登録する。
- 4) データセンターは WJOG4407G と同一の WJOG4407GTR 検体番号を決定する。
- 5) データセンターは、「4407GTR 登録確認通知票」に当該症例の「検体番号」を記載し、返信 FAX する。
- 6) 参加施設は検体採取を行い、「検体番号+(pre or day15)」のみを記載したラベルを貼り、各施設で保管する。

WJOG4407GTR 登録適格性確認票

・ 初級不癒・再発腫瘍/食道がん初級化学療法に対する 5-fluorouracil (5-FU)/levofolinate (L-LV) + oxaliplatin (L-OXP) + bevacizumab (BEV) 併用療法 相 対 対 照 群 (OPT-1) での 5-FU 併用療法 (WJOG 4407G) における 治療効果・予後予測の探索的研究

【FAX送付先】
WJOG データセンター FAX:06-6633-7405 / TEL:06-6633-7400
受付時間:月曜日～金曜日 9:00～17:00(ただし、土曜・日曜・祝日および12/29～1/3を除く)
 【プロトコルに関する問い合わせ先】
 近畿大学医学部附属病院 腫瘍内科 鶴谷 純司 TEL:072-366-0221(PHS8202)

下記本枠内にご記入の上、FAXにて上記センターへ送信してください。

医療機関名			
科名		担当医師名	
WJOG4407G 試験登録	<input type="checkbox"/> 同時登録		
WJOG4407G 症例登録番号	<input type="checkbox"/> 登録済み	→ 下記に症例登録番号をご記入下さい。	
文書同意取得日	(西暦) 年 月 日		
電話連絡	<input type="checkbox"/> 不要 <input type="checkbox"/> 要 ⇒ 下記に電話番号をご記入下さい。 電話番号() () () () () () 【連絡希望時間: 月 日 時 分】		

登録結果は、受付完了後 FAXにてお知らせ致します

データセンター記入欄		
登録可否	FAX 番号	登録者
<input type="checkbox"/> 可 <input type="checkbox"/> 否	() () () () () ()	
登録日	20 年 月 日	

【症例登録の連絡先と受付時間】

WJOG データセンター

TEL:06-6633-7400

FAX:06-6633-7405

E-mail: datacenter@wjog.jp

受付時間：月～金、9～17時（12月29日～1月3日除く）

【プロトコルおよび検体に関する問い合わせ先】

研究事務局：鶴谷 純司（近畿大学附属病院 腫瘍内科）

TEL:072-366-0221

FAX:072-360-5000

E-mail: tsurutani_j@dotd.med.kindai.ac.jp

6.検体の取り扱い

6.1. 検体の種類・量

1) 末梢静脈血

末梢静脈血 7ml を採血し、血漿を分離して測定に用いる。

2) 病理スライド

治療前に得られる内視鏡下生検組織あるいは手術検体の腫瘍組織検体を用いる。

パラフィン包埋標本より、5 μ m に薄切し、スライドグラスに固定した標本を 15 枚用いる。

病理スライドに対して免疫染色あるいは RNA、DNA を抽出して測定に用いる。

6.2. 検体採取の時期

1) 末梢静脈血

治療前、治療 2 週後の 2 ポイントで採血する。

<治療前> 同意取得後から治療開始直前までに採血する。

<治療 2 週後> day15 の薬剤投与前に採血する（ただし、祝祭日などによる 1 日間の短縮、4 日間の延期までは可）。

2) 病理スライド

腫瘍組織は治療前に採取されたものを用いる。

臨床試験登録以前に採取された検体も使用可能とする。

6.3. 検体の処理

WJOGデータセンターは、WJOG4407GTRバイオマーカー研究に登録受付が可能となった施設に対して、予め専用採血管、エッペンチューブ、スライドグラスケース、検体ラベルを送付する。

1) 末梢静脈血

送付された 7mL 採血管（VP-NA070K）で一回に 1 本採血する。

検査室への申込用紙：別添資料 2を必要に応じて使用する。

<血漿分離手順>

- ① 送付された 7mL 採血管を 3 回転倒混和する。
- ② 採血後 1 時間以内に各施設において 1200g（回転半径 12cm、回転数 3,000rpm）で 10 分間遠心する。
- ③ 血漿を 0.8~1.0 mL ずつ 4 本の送付されたエッペンチューブに小分ける。
- ④ チューブに「検体番号+（pre あるいは day15）」を記載する。

例：[4407G-xxx-pre], [4407G-xxx-day15]

血漿サンプルは pre あるいは day15 の記載を忘れないようにすること。

- ⑤ -20 度または -80 度のフリーザーに凍結保存する。

遠心は可能な限り上記の条件で行う。参加施設での保存は 6 ヶ月までとし、その期間を超える場合はサンプル送付先に送付する。

本試験には HCV 感染者が登録される可能性がある。血液検体の取り扱いについては、各医療施設内の院内感染症対策基準に従い、原則的にスタンダードプリコーションに基づいて業務を行う。

2) 病理スライド

組織診断に使用されたサンプルを用いる。病理部門への申込用紙：別添資料 3を必要に応じて使用する。施設にて保管されているパラフィン包埋サンプルを、5 ミクロンの切片で切り出し、15 枚を室温で保管する。尚、15 枚に満たない場合はその枚数を記載する。

検体	採取容器	処理方法	保存容器	保存条件
血漿	7ml 真空採血管（紫色）	遠心・分注4本	1.5mlエッペンチューブ	-20~-80度
病理組織		5ミクロンスライド 15枚	スライド	室温

6.4. 検体送付

施設で3例登録毎（半年経過しても3例に達しない場合は、1例目登録から半年後）にWJOGデータセンターより提出依頼のFAXがある。その際、WJOG登録の連絡責任医師宛てに検体送付用の発砲スチロールが送付されるので、検体送付票（別添資料4）をつけて近畿大学医学部ゲノム生物学教室に送付する。

但し、施設の検体保管の都合により、1症例ごとに送付してもかまわないが、上記時期以外での発送の場合には、個別に対応する。検体には事前にWJOGデータセンターより送付される検体ラベルを必ず添付し、これに検体番号を記載すること。

1) 血漿

ドライアイスで充填し、密封したWJOGデータセンターより手配された専用発砲スチロール箱に入れて、クール宅急便で送付する。

凍結した血漿検体の「融解」は厳禁である。

平日着になるように発送する（注：休日着になると検体が融解して測定不能となる）。

2) パラフィンスライド

通常の（室温）宅急便で割れ物として送付する。その際、標本が破損しないようにスライドグラスケースに入れること。

- 移送にかかる諸費用（新たに購入したスライドケースを含む）は、WJOGの負担とする。（その際、領収書を必ず取り、WJOG検体送付費精算書により清算すること）

送付先

検体保存責任者
近畿大学医学部ゲノム生物学教室 西尾和人
knishio@med.kindai.ac.jp
〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2
TEL / FAX : 072-367-6369

6.5. 検体等の保存および廃棄

検体保存場所は、近畿大学医学部ゲノム生物学教室内の研究室とする。検体保存責任者は近畿大学医学部ゲノム生物学西尾和人とする。血漿は - 80 度ディープフリーザーに保存する。近畿大学医学部ゲノム生物学教室内の同じ研究室に手術標本パラフィンスライドを保存する。保管場所のセキュリティは研究棟の入り口、常時ロックされた研究室のドア、ディープフリーザーの鍵で2重ないし3重に保護する。

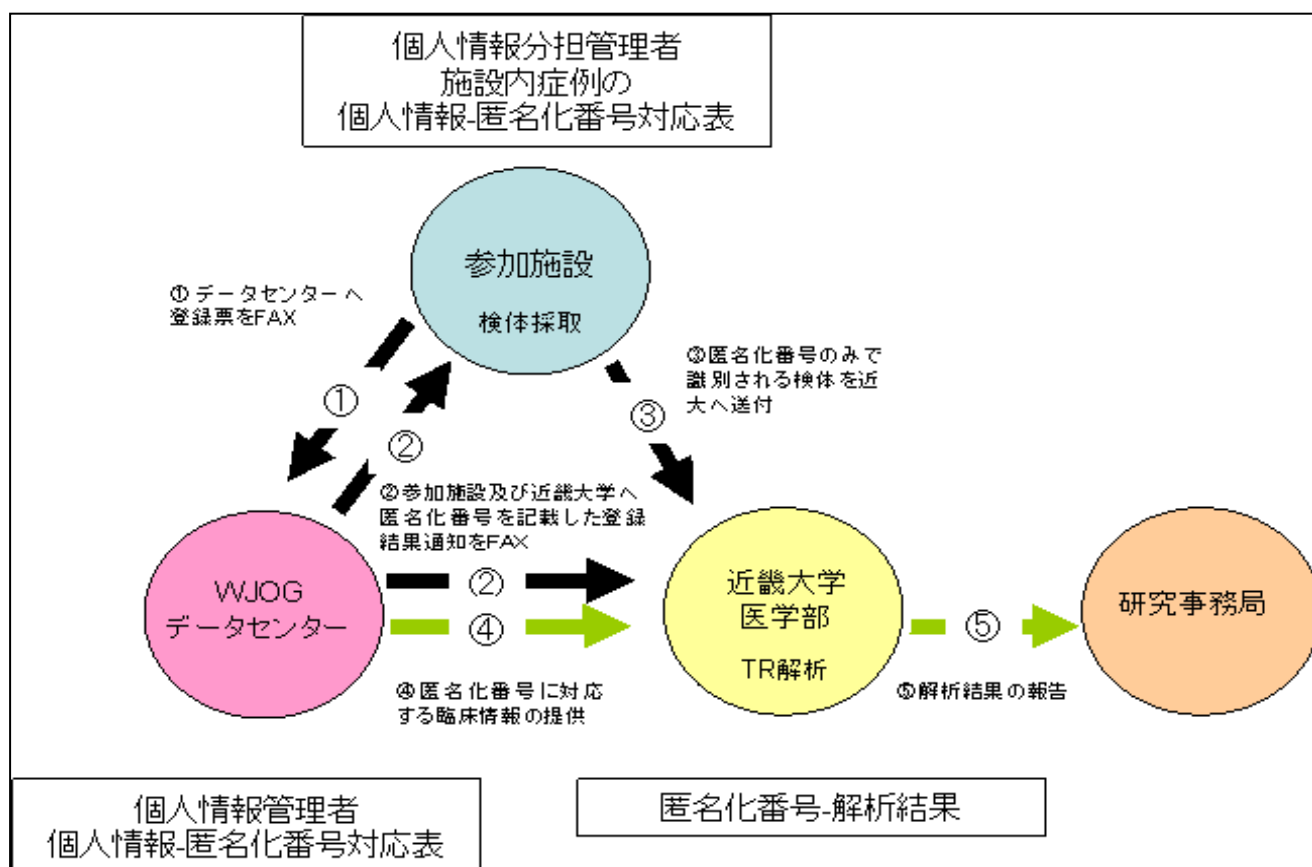
保存期間はWJOG4407G試験の最終解析より3年とする。保存期間を過ぎた検体は、特に理由のない限り廃棄される。また、試料の破棄は、試料等提供患者より同意の撤回があった場合、匿名化番号がラベルやコンピューターの異常などにより認識できなくなった場合、試料の取り

違いや混入が起きるか、またはそれが強く疑われる場合、その他研究者が廃棄の必要性を認めた場合などに行われるが、その際には匿名化番号などを削除した上で廃棄する。試料等提供者より同意の撤回の申し出があった場合は、各施設に試料等が保管されている場合には当該施設の担当者に連絡し廃棄する。近畿大学に保管されている場合には研究事務局へ連絡し廃棄する。

6.6 個人識別情報の管理

「臨床研究に関する倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号）」を遵守し、個人情報を厳重に管理する。WJOG データセンターは、各施設よりの症例登録に際し、4407G 登録番号と同一の番号を付与し、当該登録施設に FAX で通知する。当該施設研究責任者もしくはその代理は、4407G 登録番号とともに標本を 4407GTR 検体保存責任者に送付する。検体保存責任者に送付されるものは、標本、4407G 登録番号および血液検体にあつては採血時点情報（Pre, day15）のみとする。

4407G 登録番号と施設 ID との対応表は、WJOG データセンター長が責任を持って厳重に管理する。また、本研究の発表・報告に際して、検体提供者の氏名をはじめ個人を特定されるような情報は一切公表しない。



7.研究方法

7.1. 癌の免疫組織学的検討

以下の検査はパソロジー研究所にて行うこととする。抗癌剤治療前に採取された原発巣のパラフィン包埋切片を用いて、免疫組織学的に詳細な検討を行う。各種蛋白に対する抗体により免疫染色を行ない、蛋白の発現量と局在について半定量的に評価を行なう。対象となる蛋白はCD34、VEGF-A、HIF-1 α 、IL-8、PDGFR- β 、Neuropilin などである。免疫染色はパラフィンブロックから新たにカットされたプレパラートを用いる。プレパラートは室温にて1時間もしくは4度オーバーナイトで、各社が推奨する濃度にて一次抗体とインキュベーションを行う。染色ごとにポジティブコントロール、ネガティブコントロールを用いる。二次抗体でインキュベーションし、洗浄後に ChemMate ENVISION (DAKO)を用いて発色する。全視野中の10%以上の細胞群で発現の最も強い部分を評価の対象とし、染色濃度を0(発現なし)、1(弱い)、2(中等度)、3(強い)と4段階で数値化する。陽性細胞の占居率を数値化し(10-50%=1、50-100%=2)、染色濃度との積をスコアとする。また、腫瘍内と周囲の微小血管濃度(microvascular density, MVD)を半定量的に測定する。腫瘍内の血管内皮細胞を抗CD34抗体(Novo Castra)で染色し、200倍率の顕微鏡下でもっとも血管密度の多いと思われる一視野領域(約0.25 mm²)の血管数を計測し数値化する。これらのスコアリングはパソロジー研究所と富山大学医学部付属病院病理部の担当者2名が行うこととする。両者は4407G試験ならびに、本研究の結果に関する情報を事前に認知しないこととする。スコアの一致しないものに関しては、平均値を採用することとする。

7.2. MassArrayによる抗癌剤代謝関連遺伝子発現(癌組織における各種 mRNA の定量)

近畿大学で保管されたパラフィン切片5枚を三菱化学メディエンス先端技術研究所に送付、三菱化学メディエンスはパラフィン切片から核酸を抽出し、MassArrayによる遺伝子発現の定量的測定を行う。治療前の原発腫瘍組織のがん細胞における抗癌剤感受性関連遺伝子および血管新生関連遺伝子発現の定量を、MassARRAY(SEQUENOM,INC)を用いて行なう。MassARRAY(QRT-PCR multiplex)の原理は卓上のMALDI-TOF MSであり、具体的にはマルチプレックス競合PCRベースの産物をマトリックス支援イオン化—飛行時間型質量分析計により定量化し遺伝子発現量を測定する。オキサリプラチン、イリノテカンの薬剤代謝に関連していると考えられる遺伝子を設定し測定する。腫瘍組織のパラフィンスライド(5ミクロン厚)5枚から測定する。

オキサリプラチン関連: ERCC1、ERCC6、XPD、RRM1、Rad51、XRCC3、XRCC1、GST π 、GST α 、 γ GCS、Methalothionein、HMG1,2、OGG1、CSA、CSB、BRCA1、TFIIH、MGMT、

イリノテカン関連: carboxylesterase、UGT1A1、Topo I、TOPOII α 、 β 、ABCG2/BCRP

5FU 関連: DHFR、UPP1、TS、MTHFR、FPGS、PRPS1、UMPS、NP、ECGF1、DPD、TK1、UCK2、

血管新生関連因子: VEGF-A isoform: VEGF121,165, BV8、HIF1 α 、 β

7.3. 血管新生関連因子の multiplex ELISA（血漿中のサイトカイン測定）

測定は近畿大学医学部ゲノム生物学教室研究室の責任下において実施する。患者血漿中の血管新生関連因子（サイトカイン）の定量測定を multiple x ELISA を用いて行なう（測定レンジが multiplex に適さない場合は ELISA を用いる）。患者の血漿中の各種サイトカイン量を定量する。測定は治療前と治療後 1～2 週の約 1mL の血漿を対象に、BIORAD 社の Bioplex suspension array system を用いて行う。測定予定項目を以下に列挙する。

IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2 α 、IL-2R α 、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、basic FGF、CTACK、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、GRO- α 、HGF、ICAM1、IFN- α 2、IFN- γ 、IP-10、KC、LIF、MCP-1、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-2、 β -NGF、PDGF-BB、RANTES、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、VCAM-1、VEGF

7.4. Scorpion ARMS 法による腫瘍組織における K-Ras 遺伝子変異の測定

測定は近畿大学医学部ゲノム生物学教室研究室内で実施する。

採取された腫瘍組織の K-Ras 遺伝子変異を Scorpions ARMS 法によって検出する。Scorpion ARMS 法は、mutation プライマーを用いることで高精度に遺伝子変異を測定する realtime RT-PCR ベースの検出法であり、腫瘍組織の遺伝子変異を検出することが可能である。1000 個の正常細胞に 1 個の癌細胞が混じる希釈率でも遺伝子変異は容易に定性的に検出できる。腫瘍組織標本の薄切スライドから腫瘍組織の DNA を抽出する。抽出した腫瘍組織の DNA から Scorpion ARMS 法を用いて K-Ras 遺伝子変異（codon 12, 13）を検出し、さらに腫瘍組織由来の DNA を用いてダイレクトシーケンスにより点突然変異を確認する。

7.5. 糖鎖の解析

採取された血漿から「マルチプルアフィニティ除去システム」により分画した糖タンパク質試料から糖鎖を遊離させ、(糖) ペプチド断片を作成、糖鎖を遊離させる。調製された糖鎖を精製、ビーズ上に固相化、糖鎖を誘導体（ラベル体）し、遊離・回収する。測定は近畿大学医学部ゲノム生物学教室研究室および三菱安全科学研究所鹿島研究所の両施設で独立して行う。測定は質量分析器（Bruker Daltonics 社製 Autoflex III smartbeam TOF/TOF）を使用して行う。

7.6. CGH 法

Comparative Genomic Hybridization (CGH)法は、全染色体を対象にしてゲノム DNA の過剰、欠失、増幅などのコピー数異常を短時間で検出する方法である。染色体コピー数変化の検出が可能であるため、従来の染色体分析法では詳細な解析が困難であった固形腫瘍のゲノム異常解析法として、現在、広く利用されている。染色体レベルの物理サイズで起きたコピー数の減少(loss)、

過剰(gain)、増幅(amplification)を決定することができるが、本技術によりコピー数の変化を伴わない均衡型染色体転座を検出することは不可能である。新しい増幅領域の探索には非常に優れた方法であり、増幅の標的となる癌関連遺伝子の同定は積極的に取り組まれている。パラフィン切片より抽出したゲノムDNAを用い、市販の正常組織由来DNAと競合させることにより測定を近畿大学にておこなう。得られた結果はPCR法で確認する。

8. 統計学的事項

8.1. 解析対象集団

本試験における解析対象集団の定義は、WJOG4407G ランダム化比較第Ⅲ相試験に準じ、表 8.1 の通りとする。

以下に示した基準にて取り扱いが特定できない症例が認められた場合には、データ固定前にデータセンターと試験実施責任者が協議を行い、取り扱いを決定する。

表 8.1 解析対象集団の定義

解析対象集団	定義
登録例	本試験に登録されランダム割付されたすべての症例。
最大の解析対象集団 (Full Analysis Set, FAS)	登録例のうち割付けされた治療が1度でも投与されたすべての症例。ただし登録後に WJOG4407G 第Ⅲ相試験の適格性基準を満たしていないと判明した症例は除外する。
試験実施計画書適合症例 (Per Protocol Set, PPS)	FAS のうち、以下の基準を満たす症例を除いた症例とする。 1. 観測不備などにより有効性が評価できない症例。 2. 投与量、投与スケジュール、併用療法などにおいて試験実施計画書の規定から重大な逸脱・違反をした症例。
安全性解析対象集団	登録例のうち割付けされた治療が1度でも投与された症例。

8.2. 解析計画

以下の計画に従い、本試験で得られた症例データの統計解析を行う。なお、詳細は別途作成する統計解析計画書にて定める。

8.2.1. 各種パラメーター間の相関

解析対象を、各種測定パラメーター（臨床病理学的パラメーターおよびバイオマーカー）が測定されている全症例とする。併せて、この症例のうち、WJOG4407G 試験実施計画書に定義された PPS に該当する症例を対象とした解析も行う。

7 節で示した各種測定パラメーター（臨床病理学的パラメーターおよびバイオマーカー）間の相関を Spearman の順位相関係数を用いて推定する。

8.2.2. 予後因子の探索的解析

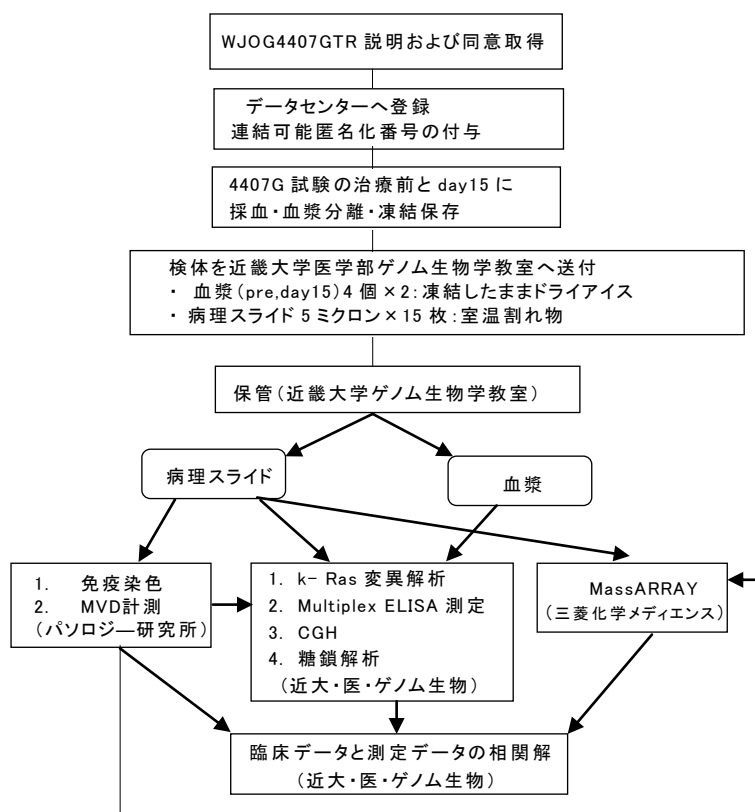
解析対象を、各種パラメーターが測定されている症例のうち、WJOG4407G 試験実施計画書に定義された PPS に該当する症例とする。

臨床病理学的パラメーターおよびバイオマーカーのサブグループにおける無増悪生存曲線ならびに全生存曲線の推定を Kaplan-Meier 法を用いて行う。Log-rank 検定を用いて治療群間の比較を行うが、検定の有意水準は定めない。

個々の臨床病理学的パラメーターおよびバイオマーカー、治療、これらの交互作用項を説明変数に含む Cox 比例ハザードモデルを用いて、臨床病理学的パラメーターおよびバイオマーカーの無増悪生存期間ならびに全生存曲線に与える影響を評価する。また、これらの変数による治療の効果の指標の修飾を評価する。臨床病理学的パラメーターおよびバイオマーカーと奏功率との関連は、ロジスティックモデルを用いて同様に評価する。

バイオマーカーに関する解析は発展途上であり、現時点で決定版となる解析手法は存在しない。したがって、ここに示した解析の他に、新しく提案された解析手法を用いた解析を実施することもあり得る。

9. 本研究の流れ



10. 目標症例数と期間

探索的な研究であるため、目標症例数の設定は行わない。解析の精度を高めるために、可能な限り多くの症例集積を目標とする。症例集積期間は WJOG4407G 試験に準ずる。

11. 予測される成果および予測される患者に対する危険、不利益

<予測される成果>

大腸癌において本治療法の効果を予測するタンパク質、遺伝子などのバイオマーカーが同定されれば、臨床的にも診断法の開発から薬剤感受性予測・予後予測研究につながり、将来のがん治療に向け大きな貢献が期待される。

<予測される患者に対する危険・不利益>

本試験は内視鏡下生検組織、手術標本及び採血検体を解析の対象とするため、試験のために新たに発生する検体による身体的な危険・不利益は極めて小さい。また、1) 本試験計画書に基づいて本人への十分な説明・同意の下に行われること、2) 個人情報には匿名化され厳重に管理されること 3) 研究対象は「子孫に受け継がれ得るヒトゲノム及び遺伝子の構造または機能」を対象としていないことから、患者の人権・プライバシーに関する危険、不利益も極めて小さいと考えられる。

12. 倫理的配慮

12.1 インフォームド・コンセント

12.1.1. 検体提供者の同意

担当医は、登録前に同意説明文書・同意書に基づき、事前に本研究の意義、目的、方法、予測される結果や不利益について検体提供者に説明し、文書により自由意思による検体提供者の同意を得る。担当医並びに検体提供者は、同意書に署名及び日付（説明日、同意取得日）を記載する。同意説明文書・同意書（写）を検体提供者に渡すとともに、原本をカルテ内に保管する。

ただし、当該同意を受けることができない場合には、本研究の実施について試料等の利用目的を含む情報を公開し(<http://www.wjog.org/>)、本研究の対象となる者（被験者）が当該試料等の利用を拒否できる機会を保障することにより、当該試料等を利用することができるものとする。

12.1.2. 同意説明文書・同意書による検体提供者への説明事項

同意取得に際し、下記説明事項を同意説明文書・同意書を用いて説明する。

- ・ 研究への参加が任意であること。拒否により不利益を被らないこと。
- ・ 研究への参加の同意をいつでも撤回できること。同意を撤回した場合でも治療上の不利益を被らないこと。
- ・ 同意が撤回された場合には、検体などが廃棄されること。ただし、既に研究結果が公表されているときは、解析結果の破棄は行われなないこともあること。
- ・ 検体提供者として選ばれた理由。
- ・ 研究の目的と方法。
- ・ 予測される研究結果、および検体提供者に対して予測される不利益。
- ・ 研究計画および研究方法が開示できること。
- ・ 提供を受ける資料等の種類および個人情報の保護に関する事項。
- ・ 試料等および遺伝情報が共同研究機関へ提供されること。
- ・ 遺伝子発現解析結果の開示は行わないこと。
- ・ 研究から生じる知的財産権は、被験者には帰属しないこと。

12.2. 解析結果の開示

本研究は大腸癌における分子生物医学的な探索的研究であり得られた情報は再現性を臨床試験付随研究で証明する必要があり精度や確実性の点で提供者に還元する情報としては未成熟である。従って提供者に解析結果は開示しない。また遺伝子カウンセリングの対象ともならない。

13. データ収集

症例報告書（背景・前治療歴など）、匿名化対応表をデータセンターに保管する。

検体保管表（検体日時、採取条件、保存場所など保存時に記載）を近畿大学医学部ゲノム生物学教室に保管する。

14. 研究組織

WJOG 理事長

中西 洋一

九州大学病院

研究実施責任者

西尾 和人

近畿大学医学部附属病院 ゲノム生物学教室

〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野台 377-2

TEL:072-366-0221 FAX : 072-360-5000

E-mail : knishio@med.kindai.ac.jp

研究事務局（プロトコール内容に関する問い合わせ先）

鶴谷 純司

近畿大学医学部附属病院 腫瘍内科

〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野台 377-2

TEL:072-366-0221 FAX: 072-360-5000

E-mail: tsurutani_j@dotd.med.kindai.ac.jp

研究協力者

関島 勝 三菱化学メディエンス先端技術研究所センター

谷 洋一 パソロジー研究所

福岡 順也 富山大学附属病院 病理部

検体保存・解析責任者

西尾 和人 近畿大学医学部附属病院ゲノム生物学教室

統計解析責任者

千葉 康敬 近畿大学医学部 環境医学・行動科学

TR 委員会

役職	氏名	所属
委員長	西尾 和人	近畿大学医学部
副委員長	光富 徹哉	愛知県がんセンター中央病院
副委員長	高田 實	近畿大学医学部堺病院
副委員長	仁科 智裕	四国がんセンター
副委員長	遠藤 慎治	筑波大学医学部
委員	佐藤 太郎	大阪大学医学部附属病院
委員	田村 孝雄	近畿大学医学部奈良病院
委員	岡本 勇	近畿大学医学部
委員	鶴谷 純司	近畿大学医学部
委員	木村 達郎	大阪市立大学医学部
委員	堀尾 芳嗣	愛知県がんセンター中央病院
委員	平島 智徳	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター
委員	福岡 順也	富山大学附属病院
委員	久保 昭仁	愛知医科大学病院
委員	中川 和彦	近畿大学医学部
委員	荒尾 徳三	近畿大学医学部
委員	洪 秦浩	静岡県立静岡がんセンター
委員	瀬戸 貴司	九州がんセンター
委員	佐々木 治一郎	北里大学病院

15. プロトコール作成

近畿大学医学部附属病院 腫瘍内科

鶴谷 純司

16. 研究結果の発表

研究結果は研究責任者、研究事務局あるいは共同研究者が可及的速やかにその成果をまとめ、特許申請の可否を判断する。出願人、発明人は、事実即して決定するものとし、それを別途定める。また、成果はしかるべき英文誌および学会に発表する。共著者の選定はWJOG規定に準ずる。

17.本研究で用いる測定系に関して

1) 免疫組織学的バイオマーカー

腫瘍組織中の血管密度の測定 (MVD, micro vessel density) および VEGF-A の免疫染色は、血管新生を評価する上で最も重要視され、予後不良因子であることはコンセンサスとなっている。しかし、両マーカーは、BEV の効果を予測することができないという報告がされた (2)。この報告はレトロスペクティブ研究で、予後不良因子としてもネガティブであったことから、信頼できる研究結果とはいえない。本研究では、MVD、組織 VEGF-A の免疫染色を前向き試験で評価する。また、がん細胞の低酸素状態に対するレスポンスで最も重要な因子と考えられている HIF-1alpha、VEGF165 の受容体の 1 つであり血管新生に重要だと考えられている Neuropilin、VEGF-independent な血管新生因子としての IL-8、mature な血管に存在する PDGFR- β なども効果予測因子の可能性があると考えられるため免疫染色を用いて発現を調べる。

2) 血中サイトカイン・ケモカイン・増殖因子

血中の各種サイトカイン・ケモカイン・増殖因子は、VEGF、FGF、IL-8、IL-6、TNF-alpha などを中心に強力な血管新生因子の一つとして考えられている(3)。BEV の効果予測因子に関連した研究は、現在まで報告されているのは VEGF に対してのみであり、血中 VEGF は BEV 投与後に上昇するが、効果予測因子としては困難であると考えられている。BIORAD 社の Bioplex system は、一度に同じ条件で 30~50 のサイトカイン・ケモカインを評価することが可能で、バイオマーカー探索臨床試験での有用性は確立している (4)。血中 VEGF 以外の各種サイトカイン・ケモカイン・増殖因子は、エスケープ現象による薬剤感受性低下の原因になり得るため、BEV の効果予測因子としての可能性を検討する意義があると考えられる。

3) 血漿中蛋白の糖鎖解析

蛋白の糖鎖修飾は、翻訳後修飾の中で細胞生物学的に最も重要と考えられており、特定の糖鎖構造、糖鎖遺伝子の異常は癌の悪性度に関連し、さらに膜型受容体の糖鎖修飾はシグナルに大きく影響を与えることなどが知られている。Nishio らはチロシンキナーゼ受容体の糖鎖修飾変化がチロシンキナーゼ阻害剤の薬剤効果に影響を与えることを報告した (5)。また、最近開発された BlotGlycoABC (住友ベークライト社)を用いて、血漿中の N 型糖鎖を MALDI-TOF-MS で解析し、トラスツズマブの治療効果および無増悪期間を予測する 2534m/z 糖鎖バイオマーカーを同定した (投稿中)。個人の N 型糖鎖修飾バリエーションおよび糖鎖修飾能力は、抗体治療の効果に影響を与えうると考え、血漿中蛋白の N 型糖鎖解析を行う。また VEGF の糖鎖修飾タイプは、BEV との affinity を規定している可能性があり、可能であれば、BEV の感受性を規定し得る各個人の VEGF 糖鎖修飾タイプを MALDI-TOF-MS で解析し特定する。

4) 薬剤関連遺伝子の遺伝子発現

大腸癌細胞中の thymidine synthase (TS)と 5-FU に対する薬剤感受性の間に負の相関があることが知られており(6,7)、本研究においても大腸癌細胞中の TS の発現量と奏効率と無増悪生

存期間ならびに全生存期間の相関について検討する。同様に、5FUの代謝に関わる他の遺伝子発現を癌細胞で測定し、治療効果との相関を検討する。

オキサリプラチンはプラチナ製剤であり、プラチナ製剤の感受性予測因子として癌細胞での ERCC1、ERCC6、XPD、RRM1、Rad51、XRCC3、XRCC1、GST π 、GST α 、 γ GCS 発現が報告されているが(8-14)、大腸癌に対してオキサリプラチンを用いた前向き臨床試験で検討されているものはなく、FOLFOX レジメンに対してこれらの遺伝子発現量が効果予測因子としてどの程度インパクトを持つかは明らかになっていない。本研究ではこれらの発現量と FOLFOX+ベバシズマブに対する感受性の関連について検討を行う。

イリノテカンとはポイソメラーゼ I 阻害作用により抗腫瘍効果を発揮する。塩酸イリノテカンは carboxylesterase により、活性型の SN-38 へ変換される。また塩酸イリノテカン、SN-38 は ABCG2/BCRP などの薬剤排出蛋白により細胞外へ排出され、癌細胞におけるこの蛋白の発現量と薬剤感受性の間に逆相関が認められる。本研究では腫瘍細胞における carboxylesterase、トポイソメラーゼ I、ABCG2/BCRP の発現量と FOLFIRI 群での奏効率と無増悪生存期間ならびに全生存期間の相関について検討する。

5) 癌細胞における K-Ras 遺伝子変異

大腸癌では K-Ras 遺伝子の点突然変異が約 40%認められ、予後不良因子となることが知られている。IFL+BEV 治療において、K-Ras 遺伝子変異の有無と効果との関係はないと報告されている(15)。しかし、FOLFOX 治療における効果予測因子としての可能性が示唆されており (personal communication)、効果予測因子としての可能性は検証に値する。

6) ゲノム DNA のコピー数異常

癌細胞における染色体レベルの物理サイズで起きたコピー数の増幅、欠失などは、多くの固形癌や白血病の本質的な病因になるばかりでなく、白血病や脳腫瘍の例のようにある特定部位のコピー数異常は腫瘍の悪性度や予後を規定することが知られている。「がん細胞側の低酸素あるいはストレスに関連した薬剤感受性因子」に対するアプローチとして、がん細胞のコピー数異常に伴う特定の遺伝子過剰発現や、特定のがん抑制遺伝子の欠失は、治療からの影響によるがん細胞の生存にとってクリティカルである可能性がある。一方、がん細胞のコピー数異常の検出方法は、定性的で、再現性があり、施設間差がなくバイオマーカーとしては最もふさわしい。

18. 参考文献

- 1) Sessa C, Guibal A, Del Conte G et al. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? *Nat Clin Pract Oncol*. 2008 Jul;5(7):378–91.
- 2) Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W. et.al Impact of vascular endothelial growth factor–A expression, thrombospondin–2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 10;24(2):217–27.
- 3) Angelo LS, Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res*. 2007 May 15;13(10):2825–30.
- 4) Kimura H, Kasahara K, Nishio K et al. Plasma MIP–1beta levels and skin toxicity in Japanese non–small cell lung cancer patients treated with the EGFR–targeted tyrosine kinase inhibitor, gefitinib. *Lung Cancer*. 2005 Dec;50(3):393–9.
- 5) Matsumoto K, Yokote H, Arao T. et al. N–Glycan fucosylation of epidermal growth factor receptor modulates receptor activity and sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci*. 2008 Aug;99(8):1611–7.
- 6) Soong R, Shah N, Salto–Tellez M, et al. Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5–fluorouracil–based chemotherapy. *Ann Oncol* 2008;19: 915–9.
- 7) Ciaparrone M, Quirino M, Schinzari G, et al. Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5–fluorouracil. *Oncology* 2006;70: 366–77.
- 8) Kim SR, Sai K, Tanaka–Kagawa T, et al. Haplotypes and a novel defective allele of CES2 found in a Japanese population. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2007;35: 1865–72.
- 9) Nakajima Y, Miyake S, Nagai K, Kawano T, Iwai T. CPT–11 may provide therapeutic efficacy for esophageal squamous cell cancer and the effects correlate with the level of DNA topoisomerase I protein. *Jpn J Cancer Res* 2001;92: 1335–41.
- 10) Olausson KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non–small–cell lung cancer and cisplatin–based adjuvant chemotherapy. *The New England journal of medicine* 2006;355: 983–91.
- 11) Lord RV, Brabender J, Gandara D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non–small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8: 2286–91.
- 12) Fujiwara Y, Sugimoto Y, Kasahara K, et al. Determinants of drug response in a cisplatin–resistant

human lung cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 1990;81: 527–35.

13) Giachino DF, Ghio P, Regazzoni S, et al. Prospective assessment of XPD Lys751Gln and XRCC1 Arg399Gln single nucleotide polymorphisms in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13: 2876–81.

14) Perego P, Zunino F, Carenini N, Giuliani F, Spinelli S, Howell SB. Sensitivity to cisplatin and platinum-containing compounds of *Schizosaccharomyces pombe* rad mutants. *Molecular pharmacology* 1998;54: 213–9.

15) Ince WL, Jubb AM, Holden SN, et al. Association of K-Ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;97: 981–9.

別紙 1

ELISA 測定項目: VEGF110、121

Multiplex 測定項目:

Cytokines Available in Bio-Plex Assays

Singleplex assays, preconfigured multiplex panels, and custom-mixed multiplex panels are available.

Assays	Human	Mouse	Rat
IL-1 α	●	●	●
IL-1 β	●	●	●
IL-1ra	●		
IL-2	●	●	●
IL-2R α	●		
IL-3	●	●	
IL-4	●	●	●
IL-5	●	●	
IL-6	●	●	●
IL-7	●		
IL-8	●		
IL-9	●	●	
IL-10	●	●	●
IL-12 (p40)	●	●	
IL-12 (p70)	●	●	
IL-13	●	●	
IL-15	●	●	
IL-16	●		
IL-17	●	●	
IL-18*	●	●	
Basic FGF	●	●	
CTACK	●		
Eotaxin	●	●	
G-CSF	●	●	
GM-CSF	●	●	●
GRO- α	●		

* IL-18 is not available as a singleplex assay, only as part of an assay panel.

Assays	Human	Mouse	Rat
HGF	●		
ICAM-1	●		
IFN- α 2	●		
IFN- γ	●	●	●
IP-10	●		
KC		●	
LIF	●	●	
MCP-1 (MCAF)	●	●	
MCP-3	●		
M-CSF	●	●	
MIF	●		
MIG	●	●	
MIP-1 α	●	●	
MIP-1 β	●	●	
MIP-2		●	
β -NGF	●		
PDGF-BB	●	●	
RANTES	●	●	
SCF	●		
SCGF- β	●		
SDF-1 α	●		
TNF- α	●	●	●
TNF- β	●		
TRAIL	●		
VCAM-1	●		
VEGF	●	●	

別紙 2

病理スライド		
測定方法	病理スライド (5 μm)	測定項目
1	免疫染色	3 枚 CD34, VEGF-A, HIF1alpha、Neuropilin など
2	Mass Array	5 枚 WJOG series 1 (Oxalipatin 関連) : ERCC1, ERCC6, XPD, RRM1, Rad51, XRCC3, XRCC1, GST π, GST α, γ-GCS Methalothionein, HMG1,2, OGG1, CSA, CSB, BRCA1, TFIIH, MGMT, DPD TK1 UCK2, VEGF-A isoform (VEGF 121/165), BV8, carboxylesterase, UGT1A1, Topoisomerase I, IIalpha, II beta, ABCG2, MDR-1, DHFR UPP1 TS MTHFR FPGS PRPS1 UMPS NP ECGF1
3	CGH	5 枚 Genome-Wide Human SNP Array 6.0
4	K-Ras 変異	2 枚 AMRS 法
合計	計 15 枚	

血液		
測定方法	血液	測定項目
1	Multiplex ELISA	BioRad Angio-1, 2, (cytokine, chemokine), bFGF/VEGF 等
2	糖鎖解析	7 ml x 2 (pre, day15) 3 ml X 2 (pre, day15)
合計	7 ml x 2	7 ml x 2 (pre, day15)