

研究課題名：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

課題番号：H25-がん臨床-一般-010

研究代表者：近畿大学医学部内科学腫瘍内科部門 教授 中川 和彦

1. 本年度の研究成果

臨床試験について

本臨床試験プロトコルは 2008 年 10 月より登録を開始、2013 年 8 月の時点において全 13 参加施設にて 7 例の割り付け前中止例を含んだ 121 例の症例登録がなされた。DNA 発現解析に基づく原発巣の推定結果に基づいた治療（推定された癌腫の標準的治療）を行う A 群と推定結果にかかわらずこれまでの原発不明癌に頻用されているカルボプラチンとパクリタキセル併用療法を施行する B 群での患者背景については性別や PS など偏りがなく割り付けられた。本試験において DNA 発現解析により原発巣を推定することができた症例は割り付け前に中止となった症例 7 例を除いたすべての症例、114 例であった。推定された原発巣の内訳は、胃がん 25 例、膵癌 24 例、リンパ腫 22 例、胆嚢癌 5 例、膀胱癌 6 例、子宮頸癌 6 例、頭頸部癌 4 例、卵巣癌 4 例、大腸癌 4 例であった。A 群における治療内容としては原発巣の推定結果を反映し、ゲムシタビン単剤が 9 例、CHOP 療法が 5 例、シスプラチンと S-1 の併用療法、シスプラチンとゲムシタビンの併用療法がそれぞれ 4 例であった。

本臨床試験は 120 例の症例登録を予定し、開始された。平成 25 年 9 月 9 日に班会議を施行、本試験の今後の進め方についての議論がなされた。原発不明癌は予後不良な疾患であり、進行が速い癌腫であるため、登録後に PS 不良となり治療が開始できなかった症例や DNA 発現解析を行っている最中に原発が判明するケースなどがあり、治療開始前に中止になる症例が多いことがあらかじめ想定されていたが、実際には両群で合わせて 24 例もの症例が治療前中止となっていた。そのため治療開始例が 120 例になるまで試験を継続するか、あるいは本試験は無作為化第 II 相試験であるため結論を導き出す試験の性格でないことや症例登録のスピードを考慮するとこの時点で試験を中止し、解析を行う、そして第 III 相試験に進むといった意見交換がなされた。結論としては、本試験の統計担当の先生のご意見も踏まえ、治療開始例が 120 例になるまで登録を継続し、その間に第 III 相試験をどうするかを継続審議として合意された。

CUP に特徴的な分子の生物学的意義の検討

i. アッセイの方法

CUP 特異的に高発現している遺伝子より実際に CUP の生物学的挙動を規定している遺伝子を特定する。方法としては①候補遺伝子を 1 個ずつ細胞株に強発現させることにより、細胞に転移能を付与した遺伝子を選別する、②候補遺伝子を RNAi によりノックダウンすることにより、転移能を消失させた遺伝子を選別する、の 2 通りが考えられたが、複数の遺伝子が CUP に関与している可能性があること、またほとんどの候補遺伝子が多くのがん細胞株に比較的高発現している、などの理由により②の方法を選んだ。

ii. 細胞株の選択

CUP 由来の細胞株が存在しないため、既存の転移性がん細胞株より、潜在的に転移能を有する細胞株を選んだ。転移能を評価する方法として、一定数の培養細胞が単位時間あたり多孔性フィルターの内側にどれくらい移動するかという cell migration assay を行った。種々の細胞株をスクリーニングした結果、肺がん由来の A549 細胞およびメラノーマ由来の A375 細胞に高い細胞遊走性が認められた。

iii. 候補遺伝子の選別

CUP 特異的に高発現している 44 の遺伝子から、①他のがん種に高発現がみられない遺伝子、②CUP の全 117 症例のうち、50%以上に高発現がみられる遺伝子、③A549 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 個に絞り込んだ。

iv. 候補遺伝子のノックダウンによるスクリーニング

siRNA による発現抑制により、A549 の細胞遊走性を低下させる遺伝子のスクリーニングを試みた。この結果、6 遺伝子 (PRG1, GRN, TIMP1, SERF2, OAZ1, MIF) のノックダウンが cell migration の低下を誘導することがわかった。

v. in vivo による検証

上記 6 遺伝子をそれぞれノックダウンする sh_RNA を発現するウィルスベクターを構築し、A549 細胞および A375 細胞に導入後、安定的に sh_RNA を発現する細胞株を樹立した。現在、PRG1、GRN、MIF のノックダウン細胞をヌードマウスの足蹠に皮下注射しており、膝窩リンパ節への転移を評価し、これらの遺伝子が転移に関与しているかどうか検証する予定である。われわれは現在、MIF に対する新規の分子標的薬の候補として resveratrol の誘導体等阻害剤の開発を進めており (Invest New Drugs 30:1878, 2012)、CUP 特異的分子標的薬の開発をさらに展開していく。

新たな原発巣推定のための decision tree (決定木) の作成

現在、CUP の原発巣推定には東京大学生物統計学科に在籍した倉橋一成博士により作成されたアルゴリズムを用いているが、これまでの多くの症例において、肺癌特異的な遺伝子 (surfactant など) を高発現しているにもかかわらず、原発巣が“肺癌”と推定されなかったなどの問題点が指摘されている。この点も考慮しつつ、これまで 118 症例の予測結果をもとに、少数因子 (~20 遺伝子) による原発巣推定のための決定木の作成を試みた。

実際に、推定がん種として確立されている 18 のがん種のそれぞれから 1~2 遺伝子を選び、合計 23 の遺伝子で決定木を作成したところ、倉橋アルゴリズムによる推定結果の 85% が再現可能であった。今後次世代シーケンサーによる (各正常組織における特異的遺伝子の発現データベース (GTE x data) を参考にして、ブラッシュアップをはかり、新しい classifier を呈示し、次相臨床試験でのプラットフォームを呈示する。

3. 研究成果の意義及び今後の発展性

本臨床試験の意義として、原発不明癌という疾患カテゴリーの認知および原発不明癌の診断と治療に対する考え方を臨床試験を実施することで啓蒙を図ること、さらには DNA 発現解析により原発巣の推定を行うという分子生物学的な側面から実際には多くの癌腫で構成されるヘテロな集団とされる原発不明癌に対する個別化医療への発展を促進することであった。114 例の推定結果から判断できることは、予想どおり原発不明癌は多くの癌腫から構成されるヘテロな集団であること、本試験開始前に懸念された A 群における推定結果の多くが肺癌や卵巣癌となることで多くの症例の治療レジメンがカルボプラチンとパクリタキセル併用療法となり、結果、本試験の比較性が失われるのではないかとという点も危惧に終わった。もちろん本試験で採用した DNA 発現解析のがん種判別精度については、試験終了時に解析される臨床効果から判断されることになるわけであるが、今後の第 III 相試験実施の妥当性を示すことができた。

原発不明癌は臓器横断的診療体制を採る診療科 (腫瘍内科) でなければ適切な診断・治療ができない象徴的な疾患である。我国の中核病院に臓器横断的診療体制を推進し、それを担う腫瘍内科医を育成するためには、がん臨床医が興味を示す優れた臨床研究を実施すること必要である。さらには昨今の分子生物学に基づいた癌治療戦略とも合致しており、第 III 相試験の計画を行う予定である。

基礎的には、現在までに蓄積された microarray の CUP 検体の microarray data は貴重であり、基礎的な展開として次の 2 点が考察できる。

① 原発不明特異的遺伝子を標的とした分子標的薬の開発の為に、一部の候補遺伝子の生物学的妥当性を示すことができた。継続して検討することが重要である。

② より正確な原発特定アルゴリズム作成とともに、「CUP といえども、原発の正常組織の生物

学的性質が残っている」との仮説を呈示し、決定木を作製することができた。このことは、次相臨床試験に用いるより精度の高いプラットフォームを用いることを示唆する。さらに、同仮説に基づけば、次世代シーケンサーによる体細胞変異解析・コピー数解析による分子標的薬適応を判別するアルゴリズムを組み合わせることも可能である。

同時に EORTC における CUP プロジェクトとのデータベースの共有や共同研究依頼も来ている。今後、海外との共同研究もすすめ、さらに発展的に本研究を継続していく意義があることが示された。

4. 倫理面への配慮

本研究では、DNA 発現解析により原発巣の推定を行うために生検検査を行う必要がある。そのためその検査に伴う合併症に留意するとともに患者に対する試験同意に関する説明を十分に行うことに最大限配慮を行っている。

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、以下の事項を厳守している。

- ①研究実施計画書は、各施設の IRB 承認の得られた施設のみ症例登録を可能としている。
- ②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している。
- ③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、個人情報の保護を厳守している。
- ④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っている。
- ⑤本解析でおこなうマイクロアレイによる DNA 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して。

5. 発表論文

1. Okamoto I, Aoe K, Kato T, Hosomi Y, Yokoyama A, Imamura F, Kiura K, Hirashima T, Nishio M, Nogami N, Okamoto H, Saka H, Yamamoto N, Yoshizuka N, Sekiguchi R, Kiyosawa K, Nakagawa K, Tamura T. Pemetrexed and carboplatin followed by pemetrexed maintenance therapy in chemo-naïve patients with advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Invest New Drugs*. 2013 in press
2. Matsuoka H, Kurata T, Okamoto I, Kaneda H, Tanaka K, Nakagawa K. Clinical Response to Crizotinib Retreatment After Acquisition of Drug Resistance. *J Clin Oncol*. 31(19):e322-3, 2013
3. 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
4. Hayashi H, Tsurutani J, Satoh T, Masuda N, Okamoto W, Morinaga R, Terashima M, Miyazaki M, Okamoto I, Nishida Y, Tominaga S, Tokunaga 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):131-6, 2013
5. 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
6. 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); 573-83, 2013
7. Takeda M, Okamoto I, Nakagawa K.Clinical Impact of Continued Crizotinib Administration after Isolated Central Nervous System Progression in Patients with Lung Cancer Positive for ALK Rearrangement.J Thorac Oncol.8(5); 654-657,2013
 8. Kaneda H, Okamoto I, Nakagawa K.Rapid Response of Brain Metastasis to Crizotinib in a Patient with ALK Rearrangement-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer.J Thorac Oncol. 8(4); e32-33,2013
 9. Urata Y, Okamoto I, Takeda M, Hattori Y, Okuno K, Shimada T, Kurata T, Kaneda H, Miyazaki M, Terashima M, Tanaka K, Morita S, Nakagawa K, Negoro S, Satouchi M.Phase 2 study of S-1 and carboplatin plus bevacizumab followed by maintenance S-1 and bevacizumab for chemotherapy-naive patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer.Cancer.119(2);2275-81,2013
 10. 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)1326-31,2013
 11. Kurahashi I, Fujita Y, Arao 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
 12. Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, Hida T, Yamamoto N, Yoshioka H, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Takeuchi K, Shimada T, Tanaka T, Tamura T.CH5424802 (RO5424802) 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);590-8,2013

6. 研究組織

①研究者名	②分担する研究項目	③所属研究機関及び 現在の専門（研究実施場所）	④所属研究 機関にお ける職名
中川 和彦	原発不明がんの診断・効果的 治療の確立に関する研究	近畿大学医学部内科学 腫瘍内科部門・臨床腫瘍学 ・内科学	教授
倉田 宝保	臨床試験の実施、統括	関西医科大学内科学第一講座 ・臨床腫瘍学・内科学	教授
西尾 和人	原発不明がん遺伝子発現解 析の統括	近畿大学医学部ゲノム生物学教 室・分子生物学	教授
藤田 至彦	原発不明がん遺伝子発現解 析の実施	近畿大学医学部ゲノム生物学教 室・分子生物学	助教
坂井 和子	原発不明がん分子標的薬お よび診断薬の創生	近畿大学医学部ゲノム生物学教 室・分子生物学	助教