

(垣内、他により報告されている方法と類似の方法)²が中村教授と共同研究者の鎌谷教授により考案された。このシステムは非小細胞肺癌患者における間質性肺炎・急性肺障害の発症予測に使用できる可能性を秘めていると考えられる。

具体的には、最も関連性の高い SNPs を両教授が選定し、ILD の発症状況を基にすでに解析済みの 50 症例の患者を区別することが可能なスコアリングシステムが作成された。また 7 例の ILD 症例を含む 51 例の患者から追加のサンプルが収集された。このように、合計 27 例の間質性肺炎・急性肺障害の発症患者と 74 例の非発症患者より得たサンプルをこの研究段階で解析した。これら 101 症例のサンプル解析の結果、約 1152 の SNPs が間質性肺炎・急性肺障害と関連している可能性が示唆された。しかし 1152 の SNPs を選択するために用いられた最初の 50 症例を解析から除くと、Bonferroni 法による補正後、いずれの SNPs でも p 値が 0.05 未満で関連性を示すエビデンスは得られなかった。そのため、スコアリングシステムの信頼性を確保するには、できる限りこのシステムの最適化を進め、スコアリングシステムの作成には用いられなかったより多くの患者の解析を実施する必要がある。

本研究の第 2 段階はコホート内ケース・コントロール試験 (試験コード: V-15-33) の一部として 2004 年 12 月後半に開始した。アストラゼネカ社はイレッサ投与患者 (ILD 発症症例とその 4 倍の数の ILD 非発症のコントロール症例) のサンプルを入手し、中村教授の研究室に送っている。

本研究の別の側面として、この試験からのデータを鎌谷教授の考案による逐次計画 (John Whitehead により報告されている計画と類似した計画)³に従い、解析を実施していることが挙げられる。この解析では、ILD 発症例 5 症例と 20 症例のコントロールから成る各サンプルブロックを、本研究の第 1 段階で同定された約 1000 の SNPs につき盲検状態で遺伝子タイピングを実施している。次いで、本研究の第 1 段階で確認されたスコアリングシステムの ILD 発症予測能力を、この「サンプルブロック」を用いて検定する。最初の「サンプルブロック」解析が不成功に終わった場合は、次の「サンプルブロック」で解析を実施し、順次このようなサイクルを繰り返す。最初の「サンプルブロック」解析は 2004 年 12 月 31 日に終了し、このスコアリングシステムでは ILD 発症の予測は出来ないとの結果が得られた。そのため、収集した全てのサンプルブロック (全 6 ブロック) につきこの順次解析を継続する予定である。本第 2 段階の研究終了は、2005 年半ば以降になると予想される。

本研究のさらにもうひとつの側面は、本研究の第 1 段階で ILD 発症との関連性が示唆された候補遺伝子につき、その遺伝子の機能解析を予定している。本件は、コホート内ケース・コントロール試験 (試験コード: V-15-33) の探索的目的の一つとして組み込んでおり、その実施を中村祐輔教授グループに依頼している。具体的には、肺由来細胞の初代培養物中で候補遺伝子を過剰発現させるために、候補遺伝子の cDNA を含むベクターを作成する。次いで、候補遺伝子を過剰発現している肺細胞に対するイレッサの毒性上の特性を *in vitro* で確認する。この検討で、イレッサに関連した肺細胞の機能変化に候補遺伝子の介在が認められる場合、ILD の病因に対し候補遺伝子が関与している事を示唆する知見が得られるかもしれない。

イレッサ以外の治療薬を投与され、ILD を発症した非小細胞肺癌患者においても、本研究により同定された候補遺伝子の検討を予定している。検討準備等の理由により、これらの患者からの遺伝子サンプルの収集は、本剤投与患者よりも遅れて開始された。そのため、本研究用として多くのサンプルを収集することは困難である。しかし ILD の病因自体に関与する遺伝子 (治療薬からは独立した遺伝子) と本剤投与患者のみに発症した ILD に関与する遺伝子を区別することは極めて重要であると考えられる。

² Hum Mol Genet, 2004, Dec 15;13 (24): 3092-43

³ John Whitehead The Design and Analysis of Sequential Clinical Trials, 2nd Edition, Wiley

(2) 上記(1)以外で、遺伝子変異やプロテオミクスと間質性肺炎等の副作用との関係を調査した文献、学会発表等をすべて集め、各論文等の概要を研究デザインとともに示した上で、これまでに得られている知見をまとめること。なお、回答には、自社が実施した試験及び調査の結果についても含めるとともに、文献等の検索が終了し次第、そのリスト及び対象文献等を回答に先立って提出すること。また、現在進行中又は計画中の臨床試験又は調査の内容およびその検討結果が提示できる時期についても説明すること。

【回答】

現在、間質性肺炎等の副作用と遺伝子変異やプロテオミクスとの関係を調査した文献、学会発表は以下のとおり。

1. Identification of SNPs associated with adverse effects of Gefitinib M Isomura, M Fukuoka, S Sone, M Matsuura, T Noda, T Muto, Y Miki. Poster presented at ASCO 2004
2. Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with adverse effects of gefitinib ('Iressa'). M Isomura, M Fukuoka, S Sone, M Matsuura, T Noda, T Muto, Y Miki. Abstract at 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG), Toronto, 27-30 Oct 2004
3. Understanding the mechanisms of drug-associated interstitial lung disease. T Higenbottam, K Kuwano, B Nemery and Y Fujita. British Journal of Cancer (2004) 91(Suppl 2), S31 - S37
4. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusati G, Iacobuzio-Donahue C, Baker SD, Ashfaq R, Takimoto C, Forastiere A, Hidalgo M. Cancer Res. 2004 Dec 15;64(24):9139-43.

現在までのところ、ゲフィチニブ投与患者における有害事象と遺伝子変異との関係については、若干の文献と学会発表が公表されている。特に、磯村他により抄録が2点発表されており、ここではゲフィチニブを投与された NSCLC 患者における有害事象と SNPs の遺伝子的関連性について述べられている。この研究グループは、イレッサ投与患者 42 例において、下痢、ドライスキン、及び消化器系有害事象につき、2727 の SNPs を解析している（総試験回数は 30,000 回以上）。有害事象は 7 日ごとに NCI-CTC グレードにより評価された。さらに、末梢血中のゲフィチニブ濃度を投与開始後 29 日目に測定している。この治療期間中、42 例中 23 例で下痢が認められた。遺伝子タイピング解析で SLC22A4 遺伝子に存在する 7 つの SNPs と下痢の間に、強い関連性が認められた ($p=0.00025$ 、多重性を補正前の Fisher's exact 検定)。

またアストラゼネカ社が現在実施中のケースコントロール試験（試験コード V-15-33）の一部としてプロテオミクスにより間質性肺炎・急性肺障害（ILD）に関し探索的検討を実施している。この試験の科学的背景は、Dr Higenbottam、Dr Kuwano、Dr Nemery 及び Dr Fujita による公表文献中に記載されている。具体的には、ILD 非発症患者と比較し ILD 発症患者に有意に認められる蛋白質の検出を目的として、プロテオミクス解析を実施している。即ち、この試験では、ILD 発症患者と非 ILD 発症患者間における蛋白質質量を指標に有意差があるかどうかを検討する。現在東京医科大学の臨床プロテオームセンターで試験法の最適化を実施中で、臨床組織サンプルのプロテオミクス解析とデータ解析を実施する。このような大規模のプロテオミクス試験は極めて新しい試みであるため、試験結果が完全に出るのが何時になるかを予測するのは難しい。

Amador ら (2004) は、遺伝子転写効率に影響を与える EGFR 遺伝子のイントロン 1 における CA 単一配列反復数 (CA-SSR) と EGFR 阻害剤の効果間の関連性を検討するための研究を実施し

ている。この研究では、第Ⅱ相臨床試験でゲフィチニブ 500 mg の投与を受けた進行大腸癌患者 19 例から皮膚生検で得られた組織より DNA が抽出された。これらの症例では、皮膚毒性を NCI-CTC のグレードに従い毎週 1 度評価した。その結果 CA ジヌクレオチドの発現頻度の低い症例で皮膚毒性が認められた。これに基づき、著者らは EGFR 遺伝子のイントロン 1 における多型のバリエーションが EGFR 阻害剤の効果と関連性があるかもしれないとの結論を導いている。

今後ゲフィチニブの臨床試験から対象患者の EGFR 変異に関するデータが得られるに従い、EGFR 遺伝子変異と ILD リスク間の関連性のより詳細な検討が可能になると考えられる。しかし、生検組織サンプルを採取し、かつ ILD を発症した症例の数が少ないため、意味のある結果を出すのに必要とされる数の組織サンプルを何時までに収集できるか予測することは困難である。

(3) 上記(1)及び(2)を踏まえ、現時点で遺伝子診断等の形で臨床応用する必要性及び妥当性について見解及びその根拠を示すこと。回答にあたっては、感度/特異度のみでなく、陽性反応的中度/陰性反応的中度の観点から議論を行うこと。

【回答】

これらのデータに基づき、アストラゼネカ社としては、ゲフィチニブの投与対象患者において有害事象の検討を目的とし遺伝子検査を現時点で臨床適用することは、妥当ではないと考える。上記に記載した全ての研究や試験はまだ探索的段階にあり、臨床上の評価はまだなされていない。中村教授の研究により、潜在的な予測バイオマーカーの評価・臨床導入にはどの程度厳密な方法が必要であるかが、明らかになってきている。例えば、中村教授により評価された SNPs の幾つかについては、ILD との関連性を示唆する結果が得られてはいるが、現時点では、これら SNPs のいずれも、ILD をプロスペクティブに予測はできなかった。そのためこれらの検査の陽性反応的中度や感度を評価することは、現在は不可能である。

アストラゼネカ社は、有害事象の発現メカニズムに関与している可能性のある遺伝子や、有害事象発現のリスクを持つ患者の予測バイオマーカーにつき、今後も探索・研究を継続実施する予定である。

4. EGFR 遺伝子変異の診断に関して、

(1) 本剤の使用に際して遺伝子診断を実際に行っている代表的な医療機関について、対象患者（腫瘍を摘出した患者のみ、又は、すべての患者に対し生検を実施等）、検査の対象としている遺伝子の部位、その他の検査方法の詳細と、検査結果の治療方針への反映状況について、把握している範囲で説明すること。

(2) 生検によりすべての患者の EGFR 遺伝子の変異を検査することとした場合の技術的問題点について、手技及び検査手法の観点から施設や医師が限定される可能性があるかどうかについても含め、説明すること。

(3) 遺伝子診断用の検査試薬・キットの開発を進めるに当たって、解決すべき問題点があれば説明すること。

(1) 本剤の使用に際して遺伝子診断を実際に行っている代表的な医療機関について、対象患者（腫瘍を摘出した患者のみ、又は、すべての患者に対し生検を実施等）、検査の対象としている遺伝子の部位、その他の検査方法の詳細と、検査結果の治療方針への反映状況について、把握している範囲で説明すること。

【回答】

愛知がんセンターが高度先進医療として、日常的に EGFR 遺伝子変異とその他の遺伝子(p53 遺伝子や K-ras 遺伝子など)などの遺伝子診断を行っていることを聞いております。従来の診断や治療のために取り出されたがん細胞から抽出した DNA を体外で調べているようです。

ゲフィチニブがよく効きそうか予測するために EGFR 遺伝子の変異を調べ、腫瘍に応じた治療法を考える上での参考にしているようです。また、2 つ以上の腫瘍がある場合、新たな腫瘍ができた場合など、それらが転移によるものか、もしくは二次がんなのかによって大きく治療方法が異なるため、EGFR 遺伝子変異とその他の遺伝子 (p53 遺伝子や K-ras 遺伝子など) などの遺伝子診断も行っているようです。

なお、EGFR 変異測定は、手術前説明の際に遺伝子検索が可能であることを紹介した際に希望される患者を対象とし（手術前は本剤の適応ではないのですが）、本剤の適応となる病変に対してイレッサ治療が選択肢の一つとなるとときに使用しているようです。変異検索のためのみに生検などは実施していないようです。

検査の対象としている遺伝子の部位は、DNA しか手に入らない場合、エクソン 19 の欠失、コドン 858 の変異（このふたつで 90% 以上の変異をカバー）を対象としており、愛知県がんセンターで開発した簡便法にて測定しているようです。RNA も手に入る場合、エクソン 18-21 の塩基配列決定を行っているようです。それ以外の方法は、現在行われていないようです。

検査結果の治療方針への反映は、変異があれば本剤の奏効は 90% 程度、変異がないときは 15% 程度であることを説明し、リスクや化学療法によって期待される奏効率などを説明して、十分な説明と同意のうえ治療を選択しているようです。

その他、現在把握している範囲で、SRL も含めて、施設ごとの状況を以下に示しておきます。

施設	測定目的	検体	測定方法	Mutation 検索範囲	その他の検索
愛知 CC	日常診療	手術組織、 生検組織	DNA: 簡便 法 RNA: タンク トシークエンス	エクソン 19 の欠失、コドン 858 の変異 from DNA エクソン 18、19、21 from RNA	
WJTOG0403	プロスペク ティブ研究	手術組織、 生検組織	DNA タンク トシークエンス	exon18,19,21	三菱安化研、 EGFR 他の領域、 EGFR 増幅 (FISH 法)、 RAS、AKT、 MAPK
WJTOG0203A	プロスペク ティブ研究	手術組織、 生検組織			海外のラボで測定
愛知 CC	レトロ調 査	手術検体	DNA タンク トシークエンス RNA タンク トシークエンス	エクソン 18-24	
近畿中央	レトロ調 査	手術組織、 生検組織	DNA タンク トシークエンス	エクソン 18、19、21	
東京医大	スポット	手術組織、 経気管支生検、 リンパ節生検	DNA タンク トシークエンス	エクソン 18、19、21	
土浦共同病院	スポット	胸水、 気管支洗浄液	PCR-SSCP 法	エクソン 19、21	
熊本大学	スポット	気管支洗浄液	DNA タンク トシークエンス	エクソン 18、19、21	
名古屋大学	スポット	手術組織、 生検組織	DNA タンク トシークエンス	エクソン 18、19、21	
岡山大学	スポット	手術組織	DNA タンク トシークエンス	エクソン 19、21	
北海道大	プロスペク ティブ研究	手術組織、 生検組織	DNA タンク トシークエンス	エクソン 18、19、21	
東北大	プロスペク ティブ研究	手術組織、 生検組織	DNA タンク トシークエンス	エクソン 18、19、21	
群馬大	プロスペク ティブ研究	手術組織、 生検組織	PCR-SSCP 法	エクソン 18、19、20、21	
京大	レトロ調 査				
大阪医療 センター	レトロ調 査	手術組織	DNA タンク トシークエンス	エクソン 18、19、21	by SRL
SRL		手術組織、 生検組織	DNA タンク トシークエンス	エクソン 18、19、21	
GLCSG	レトロ調 査				
埼玉医大	プロスペク ティブ研究	胸水、心嚢水、喀 痰、手術組織、 気管支肺胞洗浄液	高感度迅速 検出法		
慶応大	スポット	手術組織、 生検組織	DNA タンク トシークエンス	エクソン 18、19、21	

WJTOG: West Japan Thorathic Oncology Group
GLCSG: Gunma Lung Cancer Study Group

- (2) 生検によりすべての患者の EGFR 遺伝子の変異を検査することとした場合の技術的問題点について、手技及び検査手法の観点から施設や医師が限定される可能性があるかどうかについても含め、説明すること。

【回答】

現時点では研究レベルであり、可能な施設であれば手術時の切片、確定診断時の組織切片、気管支鏡による組織の採取、など様々な方法で腫瘍細胞を得ている。

検査は、まず腫瘍細胞を入手することから始まり、凍結組織標本もしくはホルマリン固定されたパラフィン包埋した腫瘍細胞を含んだ組織から、腫瘍組織を取り出す。この際、できる限り正常細胞を含まないように、腫瘍細胞を切り出すことが必要とされている。

その後、腫瘍細胞から DNA を抽出し、PCR 法で目的とするエクソン部分の EGFR 遺伝子を増幅するか、あるいは凍結組織から mRNA を抽出し、逆転写酵素を用い cDNA を合成し (reverse transcription) これを用いて PCR を行う (RT-PCR) し、EGFR 遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンシング法により遺伝子配列を決定する。変異の有無を検出できる感度として、弊社の研究所で検討した結果では、この方法では、腫瘍の DNA のうち変異が 10% を超える場合、蛍光法を用いて EGFR 遺伝子の変異の有無を検出することができる。

普及に向けての問題点として、これら腫瘍組織検体調整、PCR による遺伝子の入手、DNA 配列の手技は研究室レベルでしか行われておらず、多くの労力と費用を必要とすることである。

今後、腫瘍組織が簡便に入手できるような技術の確立、DNA 抽出から配列の決定、変異の有無の判定の感度や自動化の可能性、さらには、例えば DNA チップなどの技術で変異を簡便に検出することができるようになるか、このような技術的な課題を解決することが今後一般化していくためには必要になると考えられる。

この EGFR 遺伝子変異の解析には腫瘍のダイセクション、及び遺伝子配列解析の専門知識と装置が必要とされる。現在このような専門知識を持つのは、米国及び日本の少数の大学関連研究施設のみである。この検査法が広く使用されるようになるには、組織のダイセクションと配列解析技術が大幅に進歩し、手法が単純化され、解析時間が短縮されるのを待たなければならない。現在マサチューセッツ総合病院や Dana Faber Cancer Centres でも腫瘍サンプルの処理と配列確認に約 4 週間を必要としている。

以上のことから、生検によりすべての患者の EGFR 遺伝子変異を検査するには、検体入手の簡便化、検査方法の簡便化が必要であり、現行の手技を用いる場合は、実施可能な施設や医師が限定される可能性がある。