

自主臨床研究課題名

「肺腺がんにおける異性化酵素 Pin1 の研究」

研究組織

研究機関名：札幌医科大学フロンティア医学研究所分子医学部門

研究責任者：佐久間 裕司（同 准教授）

研究分担者：長谷川 匡（札幌医科大学病理診断学 教授）

渡邊 敦（札幌医科大学呼吸器外科 教授）

山田 玄（札幌医科大学呼吸器・アレルギー内科学講座 准教授）

電話番号：011-611-2111（内線 2610）

作成日

2015年7月23日 計画書案 第1版作成

研究実施計画書

課題名 肺腺がんにおける異性化酵素 Pin1 の研究

1. 研究の背景

日本人の肺腺がんの約半数に epidermal growth factor receptor (*EGFR*) 遺伝子の機能獲得性変異が確認される。*EGFR* 遺伝子変異陽性 (以下 *EGFR* mutant) 肺腺がんは恒常的に活性化した *EGFR* 依存性に生存・増殖しており、*EGFR* tyrosine kinase inhibitor (TKI) 治療に一旦は高感受性を示す。ただし治療効果は概ね 1 年前後であり、最終的にはほぼ全例が薬剤抵抗性を獲得することが知られている。その *EGFR* TKI 抵抗性のがん細胞の上皮間葉移行 (epithelial mesenchymal transition, EMT) が関与していることは我々を含めた複数の研究グループから報告されている。一方、プロリン異性化酵素 Pin1 は、リン酸化セリン (またはリン酸化トレオニン) -プロリンという特定の motif に結合し、*cis* 体から *trans* 体に変化させることでタンパクの機能変化を生じさせるユニークな酵素である。Pin1 は iPS 細胞、間葉系幹細胞など未熟な細胞の生存・増殖を促進することが知られており、今回の研究では、*EGFR* TKI 抵抗性を獲得した肺腺がん細胞の生存・増殖に Pin1 が関与するか否かを探索する。

2. 研究の目的

我々は現在、H1975 cell (代表的な *EGFR* mutant の肺腺がん細胞株の一つ) を使用し、その親株と *EGFR* TKI 抵抗株を比較検討しているが、現在までの *in vitro* の実験結果から薬剤抵抗株の生存・増殖に Pin1 が一定の役割を果たすことを確認している。そこで本研究では、本学附属病院呼吸器・アレルギー内科において *EGFR* TKI であるイレッサ投与を受けた *EGFR* mutant 肺腺がん患者のうち 治療開始前とイレッサ抵抗性獲得後の両方のがん組織 を検索可能な症例を対象に Pin1 発現量を免疫組織化学的に明らかにすることを目指す。

3. 研究対象者

本研究では、2004 年 1 月から 2014 年 12 月に当院で *EGFR* mutant 肺腺がんと診断され、その後イレッサ治療を受けた患者のうち イレッサ治療開始前と薬剤抵抗性獲得後の両方のがん組織 を検索可能な 2 症例である。

4. 研究方法

4-1: 対象となる患者個人の特定に至らないよう患者名・患者 ID を連結可能匿名化する。

4-2：研究代表者が肺がん組織のイレッサ治療開始前と抵抗性獲得後の病理組織標本を再評価し、各患者につき代表的切片（治療前後の各 1 枚、計 2 枚）を選択する。その後、同部のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから 3 μm 厚の未染標本を 6 枚作製し、HE (hematoxylin and eosin) 染色および Pin1, TTF-1 (thyroid transcription factor 1) (肺胞上皮への分化に必須の転写因子), cytokeratin 7 (上皮細胞に発現する中間径フィラメント), vimentin (間葉系細胞に発現する中間径フィラメント) の免疫組織化学染色を施行する。検索するがん細胞に EMT が生じているか否かも同時に探索するため TTF-1, cytokeratin, vimentin の発現も解析する。

4-3: がん細胞を密に含む領域を研究代表者が HE 標本上同定し、未染標本の同部から DNA を抽出する。EGFR 遺伝子変異の hot spot (exon 19-21) における変異の有無を loop-hybrid mobility shift assay (LH-MSA; 神奈川県立がんセンターで開発され、実際に使用されている高感度な PCR ベースの変異検出法) で検索する。

5. 情報公開文書

本研究は、2004 年 1 月から 2014 年 12 月に当院呼吸器外科（旧 第二外科）で手術された、または呼吸器・アレルギー内科（旧 第三内科）で生検され、現在、病理部で保存している肺がん組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを対象とする後ろ向き研究であるため、情報公開文書を作成し当院やホームページ上で公開し周知する。

6. 解析予定症例数

既述のように現在のところ対象となるのは 2 症例である。本研究では、培養細胞を用いた *in vitro* の実験結果から EGFR TKI 抵抗性に一定の役割を果たすと考えられる異性化酵素 Pin1 の発現量が、イレッサ治療を受ける前のがん組織と治療後のがん組織でどのように変化するのか（あるいは発現していないのか）を臨床検体で明らかにすることを目的としている。ごく少数の解析であるため統計学的解析を行う予定はない。

7. 研究予定期間

病院長承認日より 2017 年 3 月 31 日までに実験および論文報告を行う予定である。

8. 臨床研究審査について

この研究を行うにあたっては、「ヘルシンキ宣言（2013 年改定）」「疫学研究に関する倫理指針（平成 14 年 6 月 17 日施行）（平成 25 年 4 月 1 日一部改正）」を遵守する。またこの研究は、本院の臨床研究審査委員会で承認され、病院長の承認を受けた後に開始する。この研究の実施計画書、情報公開文書、研究責任者もしくは分担者に変更が生じた場合

は、本院の臨床研究審査委員会、病院長に届け出、承認を受ける。自主臨床研究実施状況報告書により年に1回、病院長に研究の進捗状況を報告する。

9. 個人情報の保護の方法

研究責任者と研究分担者が、提供された試料や診療情報から個人を特定できる情報（住所、氏名、生年月日など）を取り除き、新たに符号を付す。個人を特定できる情報と符号との関係に対応させた記録は厳重に保存管理する。治療選択上の必要が生じた場合は、遺伝子変異解析の結果を被験者または代諾者に説明することも可能とする。その場合には、研究責任者または研究分担者が符号化された情報を元に戻す操作を行う。

10. 患者の費用負担

この研究に参加することによる患者の費用負担は生じない。

11. 健康被害の補償

既に手術または生検で採取された肺がん組織を解析対象とする後ろ向き観察研究であり、健康被害は生じない。

12. 研究に関する資料の利用方法と廃棄方法およびその匿名化の方法

本研究で収集された診療情報や遺伝子変異解析情報および作製された免疫染色標本はフロンティア医学研究所分子医学部門で厳重に保存する。腫瘍組織を検索した患者の診療情報等は連結可能匿名化した状態で管理し研究に供する。また組織標本を破棄する必要がある際には、匿名のまま廃棄する。

13. 研究成果の公表

研究成果を公表する場合は、研究対象者を特定できないようにした上で、学会や学術雑誌等で公表する。

14. 研究資金および利益相反

フロンティア医学研究所分子医学部門の教育研究費や研究代表者の科学研究費補助金で研究を遂行する。この研究についての利益相反はない。