

臨床研究課題名：

「大腸癌肝転移における
LIN28B-CLDN1-NOTCH3 axis の機能解析」

実施計画書

試験責任医師

千葉大学大学院医学研究院 臓器制御外科 教授 大塚将之

〒260-0856 千葉市中央区亥鼻 1-8-1

TEL：043-222-7171（内線 5282）

FAX：043-226-2552

E-mail：otsuka-m@faculty.chiba-u.jp

緊急連絡先：043-222-7171 (PHS 72229) <mailto:sukantakoh@hotmail.com>

試験分担医師

千葉大学大学院医学研究院 臓器制御外科学

教授 大塚将之

助教 酒井望

臨床研究実施予定期間

令和4年承認後～令和6年3月31日まで

実施計画書作成・改訂日

2022年5月12日 計画書案 第1版作成

1. 研究の背景

大腸癌は我が国において罹患率、死亡数ともに上位を占め、全世界的にも同様の傾向を示している。検診による早期発見や分子標的薬などの新規薬剤の開発により、その予後は改善されているものの、診断時遠隔転移を有する stageIV 症例の 5 年生存率は 14% と依然低い¹。一方で、大腸癌遠隔転移の半数以上を占める肝転移は、近年では切除可能であれば肝切除後 5 年生存率は 60% を超える²とする報告もあり、大腸がん治療ガイドラインにおいても肝転移の切除が推奨されている。しかし、肝転移切除後の 70% 以上に再発が認められ³、その結果、大腸癌患者の死亡原因の半数以上が肝転移に起因する⁴。また、上述のように、臨床研究においては、大腸癌肝転移の有効性は示唆されているものの、その分子学的な検討は十分に行われていない。そこで、大腸癌における肝転移メカニズムの詳細な機能解析および解明は、大腸癌に特徴的な転移形式の根本的な理解を可能とし、再発転移の制御のための新規薬剤の開発や集学的治療の最適なプロトコルの構築に繋がるため、治療成績向上を図る上で最重要課題である。

近年、癌における転移のメカニズムが様々な観点から検討され、転移進展の過程で癌細胞が細胞接着に関わる蛋白の発現を維持し、細胞同士の接着がある程度保持した状態で癌細胞塊(クラスター)として血行性に移動することで転移を促進する可能性が示唆されている⁵。我々は現在米国コロンビア大学の Rustgi laboratory との共同研究にて大腸癌肝転移の研究を行っている。Rustgi laboratory では RNA 結合蛋白の一つ、LIN28B が大腸癌発癌遺伝子であることを同定し、さらに遺伝子改変大腸癌モデルマウスを用いた CLIP-seq を介して LIN28B の潜在的な結合ターゲット RNA として、細胞接着に関わる複数の遺伝子を同定した^{6,7}。さらに、その中の一つである Cludin1 (CLDN1) という遺伝子の mRNA に LIN28B が結合することで、その遺伝子発現を上昇させることを示し、この LIN28B-CLDN1 axis が大腸癌肝転移マウスモデルにおいて肝転移を促進することを見出した。このマウスモデルの肝転移細胞を用いた RNA シークエンスにおいては、この axis の下流因子候補として NOTCH3 を同定している。そこで今回、我々の研究室が所有する大腸癌肝転移切除検体及び対応する原発巣切除検体(先端応用外科にて切除施行)を用い、LIN28B、CLDN1 そして NOTCH3 蛋白のヒト大腸癌及び対応する肝転移組織中での発現を、免疫染色法により調べることで、それら発現の相関関係、あるいは臨床病理学的因子との関連等を解析し、LIN28B-CLDN1-NOTCH3 axis の大腸癌転移進展における意義を解明し、大腸癌発癌遺伝子である LIN28B 発現下の大腸癌における NOTCH signal inhibitor の転移制御治療への可能性を検討する。

2. 研究の目的および意義

本研究では、遺伝子改変大腸癌マウスモデル及び大腸癌肝転移マウスモデルによる研究から同定された、転移関連因子 LIN28B、CLDN1 および NOTCH3 蛋白のヒト大腸癌及び対応する大腸癌肝転移組織内の発現の多寡を調べることで、大腸癌の転移や癌進展度診断に深く関わる蛋白の意義を研究し、大腸癌転移メカニズムを解明することで、転移制御に繋が

る治療法を見出すことを目的とした。

3. 研究対象者の選定

(1) 選択基準：

- ① 千葉大学医学部附属病院にて 2005 年 1 月から 2014 年 12 月までに大腸癌肝転移に対して外科手術が行われ、手術時に病理用パラフィンブロックが作成されて保管されている患者のうち、同院にて大腸癌原発巣に対しても外科手術が行われ病理用パラフィンブロックが作成、保管されている患者が対象。
- ② 年齢 20 歳以上、性別は問わない

(2) 除外基準：

- ① 研究責任医師が不適切と判断した症例

目標症例数

2005 年 1 月から 2014 年 12 月までに千葉大学医学部附属病院にて大腸癌肝転移に対して手術を行い、病理用パラフィンブロックが作成されて保管されている患者はおおよそ 90 例である。これらの中から上記基準に合致していない症例、および、十分な診療情報が残っていない症例があると考えられることから、目標症例数は 70 例と設定する。

4. 研究の方法および研究の科学的合理性の根拠

本研究は、共同研究先である米国コロンビア大学の Rustgi laboratory において基礎研究(細胞実験、動物実験)で得られた大腸癌肝転移の新たなメカニズムに対する知見が、臨床的に応用可能であるかヒト検体を用いて確認することを目的としている。前述の通り、Rustgi laboratory にて基礎研究レベルでの多くのデータが既に集められており、ヒト臨床検体での検討にてこの知見をさらに裏付ける結果を得られる可能性は高いものと考えている。

千葉大学医学部附属病院にて所有する手術検体を使用し、対象患者の薄切標本を用いて免疫染色を行い、大腸癌肝転移および癌進展機序との関連、患者予後との比較検討を行う。本研究は千葉大学大学院医学研究院臓器制御外科学研究室において行い、その解析結果は個人が特定できる情報を削除した結果のみを共同研究先と共有することになる。

本研究は retrospective study であり、本研究の対象となる患者に対しては本研究を実施する旨を記載した文書を当科外来に掲示し、患者の求めに応じてその詳細を説明する。

当科では将来予定されうる臨床研究に対する参加のお願いに関する包括的な同意書に関してすべての患者に対して術前に説明して患者の自由意志による同意を得ている。

観察研究デザイン

[A. データ取得の向き]

- ・後ろ向き（単施設）

〔B1. 横断的研究〕

- ・症例集積研究（ケースシリーズ）

方法

1. 同定された分子（LIN28B、CLDN1 及び NOTCH3）の免疫染色による組織中発現解析
2. 臨床データ解析（被験者登録）

- 千葉大学医学部附属病院における手術例の中から、対象となる症例を選択する。
- 本研究は、通常診療において過去に治療された診療情報を用いる研究であり、同意を取得することが困難であるため、別途情報公開資料を千葉大学臓器制御外科学ホームページに掲載し、広く研究についての情報を周知する。詳細はインフォームド・コンセントの項を参照のこと
- 利用するデータは、個人情報から氏名・生年月日・診断名・手術日・病理結果などの個人が特定できる情報を削除し、研究用 ID を付けて管理し、氏名と研究用 ID の対応表を作成する。
- 対応表については千葉大学臓器制御外科学医局（施錠されている）内の診療情報端末にパスワードを設定し保存する。パスワードについては研究責任者が十分に注意して管理する。
- 匿名化された情報をもとに解析を行う。
- これらの試料は臓器制御外科学医局内（施錠されている）に置かれたコンピューター内にパスワードをかけて保存する。パスワードについては研究責任者が十分に注意して管理する。

観察・検査・調査・報告項目とスケジュール

- (1) 患者背景：性別、年齢（治療開始時）、合併症、既往歴
- (2) 血液生化学検査：総ビリルビン値、間接ビリルビン値、血清腫瘍マーカー値（CEA, CA19-9）、血算、AST、ALT、アルブミン値
- (3) 画像診断情報：初診時、原発巣切除後、肝転移同定後 MDCT, MRI
- (4) 初回術後治療情報：術後補助化学療法の有無、開始時 Performance status、治療内容及び投与量、毒性、完遂の有無、治療期間、肝転移再発までの期間
- (5) 病理組織結果：原発巣及び肝転移巣の病理組織学的診断、分化度、病理所見、他の遠隔転移の有無、進行度（大腸癌取り扱い規約 第 9 版および UICC 第 8 版）
- (6) 肝転移術後化学療法：施行の有無、開始時 Performance status、治療内容、投与量、完遂の有無

- (7) 予後データ：全生存期間、無再発生存期間、再発部位、再発診断方法、2 次治療の有無、治療法

解析の概要

- ・主要評価項目、副次的評価項目の定義

主要評価項目

全生存期間

副次的評価項目

無再発生存期間、CEA 値推移、病理学的診断、リンパ節転移率、遠隔転移率、肝転移後初回再発部位

- ・主な解析方法

各因子による層別化を行い、全生存期間、無再発生存期間は Kaplan-Meier 法により評価し、群間の比較には Log-rank test を用いる。また、単変量、多変量解析を行い、予後予測因子について検討を行う。群間の比較には Student t test および χ^2 二乗テストを用いる。

5. 研究実施期間

- 1) 被験者登録期間：2022 年承認後より 2022 年 10 月
- 2) 被験者観察期間：後ろ向き研究であり、観察期間無し
- 3) 研究実施期間：2022 年承認後より 2024 年 3 月

6. 予期される利益と不利益

利益：本研究は介入を伴わない後ろ向き研究であり、被験者が直接受けることができる利益はない。

不利益：本研究は介入を伴わない後ろ向き研究であり、診療情報を用いる研究のため試料採取に伴う不利益は生じない。

7. インフォームド・コンセントを受ける手続き

患者の保護

本研究に関するすべての研究者はヘルシンキ宣言（日本医師会：<http://www.med.or.jp/wma/>）および「人を対象とした生命科学・医学系研究に関する倫理指針」（http://www/mext.go.jp/b_menu/houdou/26/12/_icsFiles/afieldfile/2014/12/22/1354186_1.pdf）

に従って本研究を実施する。

インフォームド・コンセント

本研究は、通常診療において過去に治療された診療情報を用いる研究であり、多くの対象者が亡くなっていることから同意を取得することが困難であるため、別途、千葉大学大学院医学研究院 臓器制御外科学 ホームページ(<http://www.ho.chiba-u.ac.jp/5/>)に情報公開用試料を掲載し、広く研究についての情報を周知する。ホームページを見た被験者から本研究への参加を希望しない旨の申し出があった場合には、直ちに当該被験者の試料および診療情報を解析対象から除外し、本研究に使用しないこととする。

8. 研究対象者に緊急かつ明白な危機が生じている状況における研究の取り扱い

本研究には該当しない。

9. 健康被害発生時の対処方法

本研究は retrospective study であり、手術時および周術期に採取された検体より病理用に作成され、保管されているパラフィンブロックを使用する予定であるため、本研究によって患者個人への健康被害が生じる可能性はないと考えられる。

10. 個人情報等の保護方法

本研究に関わる関係者は患者の個人情報保護について遵守される法令、条例などを遵守する。対象症例の診療情報については対応表による匿名化を行う。対応表については千葉大学臓器制御外科学医局（施錠されている）内の診療情報端末にパスワードを設定し保存する。パスワードについては研究責任者が十分に注意して管理し、研究分担者以外の外部者には閲覧を許可しない。

匿名化された情報をもとに解析を行う。匿名化された試料は臓器制御外科学医局内（施錠されている）に置かれたコンピューター内にパスワードをかけて保存する。パスワードについては研究責任者が十分に注意して管理し、研究分担者のみ閲覧、解析が可能とする。研究者が研究で得られた情報を公表する際には患者が特定できないよう、十分配慮する。

被験者から本研究への参加を希望しない旨の申し出があった場合には、直ちに当該被験者の試料および診療情報を解析対象から除外し、本研究に使用しないこととする。

11. 研究資金および利益相反

本研究に関するすべての研究者はヘルシンキ宣言および「人を対象とした生命科学・医学系研究に関する倫理指針」に従って本研究を実施する

「起こりえる利益の衝突（利益相反）」が存在しないことを確認するために、各研究者は誓約書を提出する。

本研究は文科省科学研究費よりの研究補助金を用いる。

12. 試料・情報の2次利用および他研究機関への提供の可能性

本研究に用いた試料については他研究機関へ提供することは無い。また、本研究で得られた試料は将来計画される同様の研究にとっても貴重なものになるため、将来の医学研究のためにも使用する可能性があるが、その場合は改めてその研究について倫理審査委員会の承認を受けた上で使用する。

13. 研究組織

研究組織と役割分担

研究代表者

Columbia University Herbert Irving Comprehensive Cancer Center
Director: Anil K. Rustgi 本研究の管理と遂行の総責任

共同研究機関と研究責任者

千葉大学大学院医学研究院 臓器制御外科学 (TEL: 043-222-7171 (5282))

教授 大塚 将之 本研究の管理と遂行の総責任

助教 酒井 望 本研究の標本管理、免疫染色、患者データ収集、統計処理

14. 記録等の保管

(1) 試験等に係る文書、試料等の保管

試験等の実施に係わる必須文書は千葉大学臓器制御外科学医局(施設されている)内の移動できないコンピューター内および診療端末内(対応表)にパスワードによる保護をかけた上で保管する。パスワードについては研究代表者が責任を持って管理する。これらの試料の保管期間は10年間とし、その後は廃棄する。

15. 研究成果の発表方法

本研究によって得られた成果は国内および国際関連学会において発表を行い、また、専門英文誌に論文として投稿する。この際、個人情報 that 特定できる情報は一切含めない。

16. 研究対象者等の経済的負担又は謝礼

本研究はこれまでに得られた診療情報を活用する研究であり、被験者への経済的負担は発生しない。また、本研究に参加することでの謝礼も行わない。

17. 参考資料・文献リスト

1. Vogel, J.D. *et al.* The American Society of Colon and Rectal Surgeons Clinical Practice Guidelines for the Management of Colon Cancer. *Dis Colon Rectum* **65**, 148–177 (2022).
2. Charnsangavej, C. *et al.* Selection of patients for resection of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol* **13**, 1261–1268 (2006).
3. Kanemitsu, Y. *et al.* Hepatectomy Followed by mFOLFOX6 Versus Hepatectomy Alone for Liver-Only Metastatic Colorectal Cancer (JCOG0603): A Phase II or III Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol* **39**, 3789–3799 (2021).
4. Kemeny, N. The management of resectable and unresectable liver metastases from colorectal cancer. *Curr Opin Oncol* **22**, 364–373 (2010).
5. Dongre, A. & Weinberg, R.A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 69–84 (2019).
6. King, C.E. *et al.* LIN28B promotes colon cancer progression and metastasis. *Cancer Res* **71**, 4260–4268 (2011).
7. Madison, B.B. *et al.* LIN28B promotes growth and tumorigenesis of the intestinal epithelium via Let-7. *Genes Dev* **27**, 2233–2245 (2013).