

日本医療研究開発機構委託研究開発費 革新的がん医療実用化研究事業

「中枢神経系原発悪性リンパ腫に対するテモゾロミドを用いた標準治療確立に関する研究」

科学研究費補助金(基盤研究C)

「中枢神経系悪性リンパ腫臨床試験における網羅的遺伝子解析による予後及び予測因子解析」

国立がん研究センター研究開発費 2023-J-03

「成人固形がんに対する標準治療確立のための基盤研究」班

JCOG1114CA1

JCOG1114C「初発中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する照射前大量メトトレキサート療法＋放射線治療と照射前大量メトトレキサート療法＋テモゾロミド併用放射線治療＋テモゾロミド維持療法とのランダム化比較試験」の附随研究

臨床検体の解析による PCNSL 予後予測バイオマーカー

および治療反応性規定因子の探索的研究に関する研究計画書 ver. 1.2

Comprehensive analysis of prognostic and predictive biomarkers
in primary central nervous system lymphoma treated with
high-dose methotrexate and radiation therapy with or without temozolomide.

グループ代表者:成田 善孝

国立がん研究センター中央病院 脳脊髄腫瘍科

研究代表者 :永根 基雄

杏林大学医学部 脳神経外科

〒181-8611 東京都三鷹市新川 6-20-2

研究事務局 :佐々木 重嘉

杏林大学医学部 脳神経外科

〒181-8611 東京都三鷹市新川 6-20-2

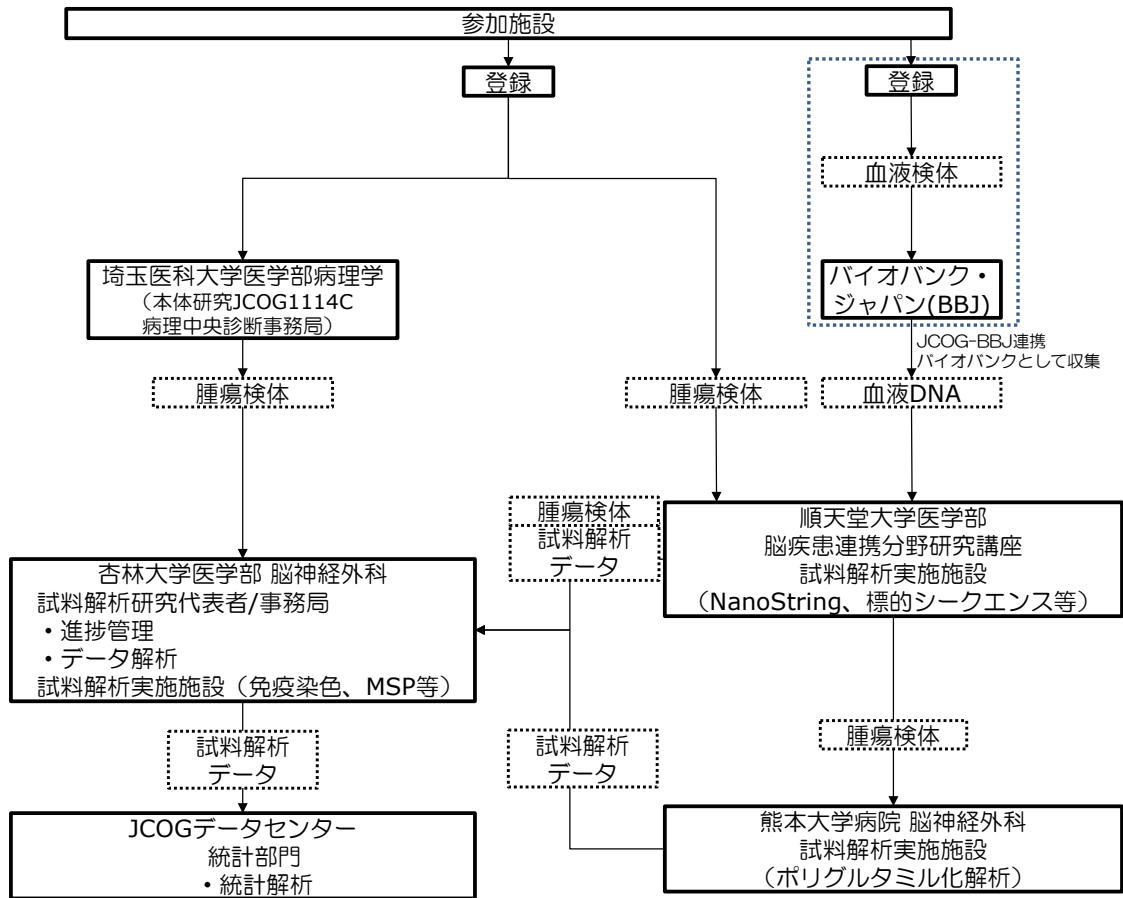
2021年2月19日 JCOG プロトコール審査委員会審査承認

2021年11月10日 ver. 1.1 改訂 JCOG 効果・安全性評価委員会承認 11月10日発効

2024年1月17日 ver. 1.2 改訂 JCOG 効果・安全性評価委員会承認 1月19日発効

0. 概要

0.1. シェーマ



0.2. 目的

JCOG1114C「初発中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する照射前大量メトトレキサート療法＋放射線治療と照射前大量メトトレキサート療法＋テモゾロミド併用放射線治療＋テモゾロミド維持療法とのランダム化比較試験」の登録患者(のうち本附随研究の適格規準をすべて満たした患者)において、以下を探索的に検討する。

- 目的 1: 中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)の予後予測バイオマーカーの探索
- 目的 2: メトトレキサート(methotrexate: MTX)感受性規定因子の検討
- 目的 3: テモゾロミド(TMZ)感受性規定因子の検討

0.3. 対象

JCOG1114C「初発中枢神経系原発悪性リンパ腫に対する照射前大量メトトレキサート療法＋放射線治療と照射前大量メトトレキサート療法＋テモゾロミド併用放射線治療＋テモゾロミド維持療法とのランダム化比較試験」に一次登録された患者のうち、試料の外部提供に関する IRB (施設倫理審査委員会: Institutional Review Board) 承認に基づく研究機関の長の研究実施許可が得られ、以下の選択規準を満たす患者を対象とする。

対象患者の選択規準

以下のすべてを満たす患者を本附随研究の登録適格例とする。

- 1) JCOG1114C に一次登録されている。
- 2) 以下の①、②のいずれかまたは両方の提出が可能である。①、②の両方が提出できることが望ましい。
 - ① 手術摘出または生検の凍結組織 (推奨)
 - ② 手術摘出標本または生検のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 薄切標本
- 3) 以下のいずれかを満たす。

- ① 本附随研究への参加について患者本人から文書で同意が得られている。
ただし、患者本人が意識障害、認知機能障害や失語などのために説明内容の理解・同意が困難である場合には、代諾者からの文書での同意を許容する。また、説明内容の理解・同意が可能であっても神経症状によって患者本人の署名が困難である場合は、患者本人の同意確認の署名を代筆者が行ってもよい。代諾者および代筆者は、配偶者もしくは二親等以内の親族とする。
- ② 本附随研究参加時に、参加施設が導入している将来的に他の試料解析研究に利用される可能性についての包括的同意が得られている。ただし、その場合は、倫理審査委員会の承認を得て、研究を行う機関の長の許可を受けた場合に限り、既存試料を利用することができる。
- ③ 既に死亡している、あるいは追跡不能となって説明ができないなど、同意を得ることができない場合は、倫理審査委員会の承認を得て、研究を行う機関の長の許可を受けたときに限り、既存試料を利用することができる。

0.4. 方法

1) 医療機関の承認

JCOG1114C 参加施設において、施設倫理審査委員会等の審査にて本プロトコールについて研究機関の長の承認を得る。

2) 同意取得

本附随研究についての説明を行い、十分に考える時間を与え、患者が研究の内容をよく理解したことを確認した上で、研究参加について同意するか否かを確認する。患者本人が研究参加に同意した場合、付表の同意書または医療機関で定められた書式の本附随研究の同意書を用い、患者本人による署名を得る。

一方、既に死亡、あるいは追跡不能となって説明ができないなど、同意を得ることができない場合、どの研究対象者の試料・情報であるかが直ちに判別できないよう管理した上で、研究の実施について研究対象者に通知または公開し、インフォームド・コンセントを受けずに既存試料・情報を利用する。

また生体試料の収集に関して包括同意を取得している施設においては、事前に自施設で収集した血液や組織が使用可能な場合には、本附随研究の検体として使用可能とする。

3) JCOG Web System への試料登録、伝票印刷

各施設の担当医は、JCOG Web System で試料登録を行い伝票を印刷する。

4) 試料の採取および標本作成

用途	試料*	薄切条件、数量等	作業内容	送付先
遺伝子変異解析	腫瘍組織 - 凍結	3~7 mm 角×1 個	細切した試料をエッペンチューブなどのサンプルチューブに入れる。	順天堂大学医学部 脳疾患連携分野研究講座
	腫瘍組織 - FFPE	5 μm 厚×5-10 枚	未染プレパラートを作製する。	
(正常コントロール)	血液 - DNA	500 ng~1 μg	共通バンキングプロトコールに従って BBJ に保管されている DNA を使用する。	* 試料は、まず順天堂大学医学部 脳疾患連携分野研究講座に送付される。 順天堂大学医学部 脳疾患連携分野研究講座では、遺伝子変異解析、遺伝子発現解析が実施される。 MGMT プロモーター領域メチル化解析、免疫組織化学は杏林大学医学部 脳神経外科において、ポリグルタミル化解析は熊本大学病院 脳神経外科において実施される。
遺伝子発現解析	腫瘍組織 - 凍結	3~7 mm 角×1 個	細切した試料をエッペンチューブなどのサンプルチューブに入れる。	
	腫瘍組織 - FFPE	5 μm 厚×5-10 枚	未染プレパラートを作製する。	
MGMT プロモーター領域メチル化解析	腫瘍組織 - 凍結	3~7 mm 角×1 個	細切した試料をエッペンチューブなどのサンプルチューブに入れる。	* 本体研究 JCOG1114C にて病理中央診断用として収集・評価済みのものを本附随研究に用いる場合のみ、病理中央診断事務局を通じて杏林大学医学部 脳神経外科に送付される。
	腫瘍組織 - FFPE	5 μm 厚×5-10 枚	未染プレパラートを作製する。	
ポリグルタミル化解析	腫瘍組織 - FFPE	5 μm 厚×10 枚	未染プレパラートを作製する。	
免疫組織化学	腫瘍組織 - FFPE	5 μm 厚 3-5 枚	未染プレパラートを作製する。	

(1) 腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本

各施設の病理部門において以下を作製する。作製したパラフィン包埋薄切標本のみを研究事務局へ送付することし、原則としてパラフィンブロックの送付は行わない。本体研究 JCOG1114C にて病理中央診断用として収集・評価済みの FFPE 薄切標本を用いる場合や、薄切標本の作製が難しい場合は、研究事務局に相談すること。

① 未染標本: 5 μ m 厚、28 枚以上 (可能であれば 45 枚)

シランコーティング済みのスライドガラスを使用する。本体研究 JCOG1114C にて病理中央診断用として収集・評価済みの FFPE 薄切標本を用いる場合は、標本の作製数を調整する。また標本量が少なく、28 枚の作製が不可能な場合は、可能な範囲で作製する。

② 作製したプレパラートを順天堂大学医学部 脳疾患連携分野研究講座に送付する。**(2) 凍結腫瘍標本**

凍結腫瘍標本は、自施設が導入している包括的同意等により本体研究 JCOG1114C の登録前に①～②の手順で自施設内で保管済みの凍結腫瘍標本のみを用いることができる。新たな採取は行わない。

<本体研究 JCOG1114C の登録前に実施済みの内容>

① 腫瘍摘出後 3 時間以内に、約 3～7 mm 角 (米粒大) の腫瘍組織 3～5 片を採取し、それぞれ別々のサンプルチューブ (エッペンチューブなど、それに準じた容器で可) に入れる。試料からは可及的に付着血液を除くこと。もし 3～5 片の 3～7 mm 角の組織を採取できない場合は、採取できる量で可とする。また、定位生検での摘出標本も可である。液体窒素の使用の有無は問わない。

② 腫瘍片の入ったサンプルチューブをドライアイス (準備が出来ない場合は氷上で) の中に入れて手術室より各施設の -80°C deep freezer 内に運搬し保管する。

<本附随研究で実施する手順>

① JCOG1114CA1 登録後、BBJ-ID を凍結腫瘍標本が保存されているサンプルチューブに油性マジックで記載する (シール等を使用)。

② 術中所見で、可能な限り腫瘍辺縁ではなく、腫瘍内部から採取された標本を使用する。

③ サンプルチューブをドライアイスにて冷却し、順天堂大学医学部 脳疾患連携分野研究講座へ送付する。

(3) 血液検体

JCOG-BBJ 連携バイオバンク実施計画書に従って、採取され、BBJ に保管された DNA を利用する。本附随研究のために新たに採血しない。

5) 試料解析、データ解析**(1) 腫瘍組織における遺伝子変異解析**

順天堂大学医学部 脳疾患連携分野研究講座において、凍結腫瘍組織またはホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本から DNA を抽出した後に、IonAmpliseq Designer で作製した PCR パネルを用いて IonTorrent Proton による点突然変異の解析を行う。また IonTorrent による解析が困難な遺伝子は Sanger sequence 法、pyrosequence 法などにより個別に変異解析を行う。

遺伝子変異解析では、JCOG-BBJ 連携バイオバンクでバンクキングされている血球由来の DNA を対照として用いる (バンクキングされている血球 DNA のみ)。

(2) 腫瘍組織における発現解析

順天堂大学医学部 脳疾患連携分野研究講座において、凍結腫瘍組織またはホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本から RNA を抽出した後に 62 遺伝子を標的とした NanoString 法を用いた遺伝子発現解析を行う。

(3) MGMT プロモーター領域メチル化解析

杏林大学医学部 脳神経外科において、凍結腫瘍組織またはホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本から DNA を抽出後、MGMT プロモーター領域メチル化解析を実施する。

(4) ポリグルタミル化解析

熊本大学医学部 脳神経外科において、パラフィン薄切未染標本を用いて免疫組織化学による解析を行う。蛍光三重染色で組織の構築、腫瘍細胞の形態、腫瘍細胞におけるポリグルタミル化を評価の後、ポリグルタミル化のカットオフ値を設定し、陽性/陰性を判定する。

(5) 免疫組織化学染色

杏林大学医学部 脳神経外科において、パラフィン薄切未染標本を用いて免疫組織化学による解析を行う。HE 標本で組織の構築、腫瘍細胞の形態を観察後、各タンパク発現のカットオフ値を設定し、陽性/陰性を判定する。

6) 統計解析

JCOG データセンターの統計解析責任者は、本附随研究の研究事務局から受領した試料解析結果と、JCOG 運営事務局のバイオバンク調整事務局を経由して JCOG データセンターのデータマネジメント部門から受領した臨床データを統合する。この統合したデータセットを用いて、腫瘍組織における遺伝子変異や発現、MGMT プロモーター領域メチル化の有無、タンパクレベルの発現/ポリグルタミル化の有無と PCNSL の全生存期間、無増悪生存期間、奏効割合(奏効率)等との関連を探索するための統計解析を行う。

0.5. 研究期間

研究期間は、研究許可日～2024年03月までとする。

<ver. 1.2 での追記事項>

研究期間を3.5年延長し、2027年09月までとする。

0.6. 問い合わせ先

研究事務局: 佐々木 重嘉

杏林大学医学部 脳神経外科

〒181-8611 東京都三鷹市新川 6-20-2