

## 研究計画書

研究課題名 肝細胞癌における癌関連遺伝子の網羅的検索と発現機能解析

### 研究組織

研究責任者 名古屋大学医学部附属病院消化器外科二・教授・小寺 泰弘  
研究分担者 名古屋大学医学部附属病院消化器外科二・講師・山田 豪  
研究分担者 名古屋大学医学部附属病院消化器外科二・助教・林 真路  
研究分担者 名古屋大学医学部附属病院消化器外科二・助教・高見 秀樹  
研究分担者 名古屋大学医学部附属病院消化器外科二・助教・園原 史訓

### 研究等の概要

肝細胞癌は、有効な全身治療法が確立されておらず、いまだ予後不良である。本研究では、肝細胞癌に対する新規の診断および治療標的となりうる分子を同定する（参考文献 1-4）ために、癌関連遺伝子の網羅的検索を行い、候補遺伝子の発現・機能解析を目的とする。

### 研究の対象

同意取得時に 20 歳以上であり、肝腫瘍（肝細胞癌、胆管細胞癌、転移性肝腫瘍等）と診断され、肝切除術を施行予定の患者のうち、研究内容を理解し、文書による同意が得られた患者を対象とする。同意を取得した患者に加え、1998 年 1 月から本研究が倫理委員会の承認を得るまでの期間に手術を行い、試料（血液、病理材料）や診療情報が保管されている患者も対象とする。

### 採取する試料および診療情報等

人体から得られる試料としては、血液材料と手術により切除された病理材料を用いる。また、対象患者のカルテから病理検査や血液検査結果や、手術内容や術後予後などの診療経過を転記する。試料及び診療情報は、新規収集に加え 1998 年 1 月からの既存試料・診療情報同様に利用する。

### 研究方法

手術時に摘出された標本から腫瘍部組織と非腫瘍部組織を採取し、これを用いた網羅的遺伝子発現解析を行う。それにより抽出された候補遺伝子において、以下の検体を用いて発現解析および機能解析を行う。

- ・ 治療前後の血清
- ・ 新鮮切除標本から採取した腫瘍部、非腫瘍部組織
- ・ ホルマリン固定パラフィン包埋切片（病理部保存の検体）

上記は適切に保存し、全て連結可能な匿名化を行う。

研究対象となる遺伝子がどの程度発現しているかを、mRNA 発現量を調べる定量的 PCR 法や、発現の調節機序を調べる DNA メチル化解析、最終産物である蛋白発現量は ELISA 法や免疫染色によって解析する。発現状態が臨床像にどのような影響を及ぼしているかは、以下の統計的手法によって解析する。生存期間への遺伝子発現の影響度合いは、Kaplan-Meier 法および Cox 回帰分析（比例ハザードモデル）による変量解析で評価する。診療データから得られた各臨床病理学的因子と対象遺伝子発現度との相関性の強さは主に  $\chi^2$  検定によって検討する。これら過程により、その発現度が肝細胞癌の発癌や進展に関連していると考えられた遺伝子に対しては、肝細胞癌細胞株を用いた機能解析を行う。機能解析は、主に SiRNA 法によるノックダウンによって腫瘍細胞の浸潤、遊走、増殖能への影響を評価する。具体的には、浸潤能は Matrigel Invasion Chambers (BD Biosciences) を用いた Cell invasion assay、遊走能は Wound - healing assay、増殖能は Cell proliferation assay によって評価し、ノックダウン前後で比較することで腫瘍細胞への影響を調べる。

#### 研究実施場所

名古屋大学大学院医学系研究科 消化器外科学

#### 研究期間

実施承認日～2022年12月31日

#### 研究における医学倫理的配慮

##### (1) 研究の対象とする個人の人権の擁護

##### ① 診断治療方法の危険性又は重篤な副作用の有無

本研究は、通常診療に伴って得られる試料（血液検体、手術標本）を使用する研究であり、対象患者に対する危険性や副作用はない。

##### ② プライバシーの権利その他個人の人権を保障するための配慮

患者由来試料の扱い方については、個人情報保護法の下で手引書を作成して徹底した管理を実施する。患者資料は連結可能な匿名化を図り、外部から隔離された研究室内に設置された冷蔵庫あるいは冷凍庫に保存する。サンプルには、連結可能な匿名記号のみを記載し、試料の保管管理は研究分担者が行う。連結表および診療情報データベースは、それぞれ別々の施錠可能な医局内に固定されたパソコンに保存し、ファイルには常時パスワードロックを行う。

### ③個人情報の利用目的

診療データを含む個人情報はすべて匿名化され、遺伝子発現解析結果との相関性を調べるデータ解析にのみ使用する。

#### (2) 被験者に理解を求め同意を得る方法

##### ①研究についての説明内容

文書による説明を行い、記名捺印または署名された同意文書の写しを被験者に速やかに手渡す。同意文書の原本は、名古屋大学大学院医学系研究科 消化器外科学内の施錠可能な棚に保管場所を設け、研究分担者が適切に保管する。

既存試料、診療情報を用いる患者については、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針（平成15年7月30日（平成20年7月31日全部改正）」の「匿名化された人体から採取された試料等を用いる観察研究」にあたり、試料は全て連結不可能匿名化を行うため、被験者に不利益は生じないと考えられるため、改めて個別の同意取得は行わない。

#### (3) 研究によって生じる個人への不利益と医学上の利益又は貢献度の予測

##### ①個人の不利益

本研究は通常診療に伴う新規及び既存試料、診療情報を使用する研究であり、患者が診療ならびに治療を受ける上で如何なる不利益や影響は受けない。有害事象の発生は想定されないため、補償のための措置は行わない。

##### ②医学上の利益又は貢献度

期待される研究成果：新規肝細胞癌関連遺伝子の発見とその発現・機能の解明。  
被験者が得られると期待される利益について：肝細胞癌の新規診断法および治療法開発の礎となる。

#### (4) 研究情報の開示

患者本人および家族の希望により、研究計画と研究方法についての資料を入手または閲覧することができる。ただし他の患者さんの情報は含まない。

#### (5) 研究結果の公表

研究の成果は、学会や学術雑誌およびデータベース等で公に発表されることがあるが、患者本人や家族の氏名などが特定されることはない。

#### (6) 備考

経費については自己資金（獲得した研究助成金）によって負担する。

利益相反について申告すべき事項はない。

(7) 問い合わせ・苦情の受付先

○問い合わせ先

担当医師：山田 豪、林 真路、高見秀樹、園原史訓

(電話 052-744-2249、ファックス 052-744-2252)

○苦情の受付先

名古屋大学医学部経営企画課 臨床審査公正係：(052-744-2479)

参考文献

1. Kanda M, Nomoto S, Okamura Y, Hayashi M, Hishida M, Fujii T, Nishikawa Y, Sugimoto H, Takeda S, Nakao A. Promoter hypermethylation of fibulin 1 gene is associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog.* 2011 Aug;50(8):571-9.
2. Nomoto S, Kanda M, Okamura Y, Nishikawa Y, Qiyong L, Fujii T, Sugimoto H, Takeda S, Nakao A. Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1, EFEMP1, a novel tumor-suppressor gene detected in hepatocellular carcinoma using double combination array analysis. *Ann Surg Oncol.* 2010 Mar;17(3):923-32.
3. Kanda M, Nomoto S, Okamura Y, Nishikawa Y, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A. Detection of metallothionein 1G as a methylated tumor suppressor gene in human hepatocellular carcinoma using a novel method of double combination array analysis. *Int J Oncol.* 2009 Sep;35(3):477-83.
4. Kanda M, Nomoto S, Nishikawa Y, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A. Correlations of the expression of vascular endothelial growth factor B and its isoforms in hepatocellular carcinoma with clinico-pathological parameters. *J Surg Oncol.* 2008 Sep 1;98(3):190-6.