

研究計画書

0. 題目

急性骨髄性白血病の化学療法前後における TIM-3 陽性細胞の推移と病態との関連に関する研究

1. 研究目的

初発急性骨髄性白血病患者における TIM-3 陽性細胞や残存微小病変の推移を化学療法の前後において観察し、病態の関連を検討する。

2. 研究の背景と意義

悪性腫瘍細胞の中にごく少数の腫瘍性幹細胞が存在し、自己複製と限定された分化を行いながら腫瘍細胞を供給する、という腫瘍性幹細胞の概念が提唱されてきた。その中でも、造血器腫瘍のひとつである急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) において、最初に白血病幹細胞が同定された。純化可能となった白血病幹細胞を直接対象として、白血病幹細胞の発症起源や腫瘍化に至る分子機構など白血病発症機構がより詳細に解析されており、現在までに白血病の発症・進展には、種々の遺伝子異常が蓄積し、分化の阻害、細胞生存の強化、自己複製能の獲得、増殖能の強化など複数のステップが必要であることが明らかとなった。

このような研究の中で、白血病幹細胞を正常造血幹細胞と区別する分子が探索され、白血病幹細胞にのみ発現する膜表面分子として T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) 分子が同定された。TIM-3 分子に対するモノクローナル抗体は、AML を含む骨髄系造血器腫瘍に対する治療効果が期待されており、TIM-3 分子の白血病幹細胞における役割は発現が報告されつつあるが、いまだ不明な点も多く、さらなる研究が必要とされている。

本研究課題では、AML に対する化学療法前後における TIM-3 陽性細胞の推移を観察することで TIM-3 の AML 治療標的分子としての可能性を検討する。また白血病の再発に關与するといわれている微小残存病変 (minimal residual disease: MRD) の検出系としての TIM-3 分子の有用性を評価・検討する。実際には、AML の診断時および化学療法治療前後の骨髄細胞、末梢血、リンパ節等に含まれる腫瘍細胞等を TIM-3 を含めたマルチカラー・フローサイトメトリーや分子生物学的手法により検出し、従来の MRD 検出方法などの診断方法と比較する。

- 1) TIM-3 as a novel therapeutic target for eradicating acute myelogenous leukemia stem cells. Kikushige Y, Miyamoto T. *Int J Hematol.* 2013 Dec;98(6):627-33.
- 2) TIM-3 as a therapeutic target for malignant stem cells in acute myelogenous leukemia. Kikushige Y, Akashi K. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Aug;1266:118-23.
- 3) TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K. *Cell Stem Cell.* 2010 Dec 3;7(6):708-17.

3. 被験者の選択あるいは対象

患者群：50 症例以内

適格基準：

- (1) 化学療法未治療の病理組織学的に急性骨髄性白血病と診断された患者
- (2) 本研究計画について十分に理解し、本人の自由意思による同意が文書で得られている患者
- (3) 同意取得時における年齢が満 16 歳以上の患者

除外基準：

- (1) 化学療法に対して再発あるいは不応の AML
- (2) AML 治療以外の化学療法による二次性 AML
- (3) 急性前骨髄性白血病
- (4) その他研究者が被験者として適当でないと判断した患者

中止基準：

- (1) 同意の撤回があった場合
- (2) 移植が実施された場合或いは死亡した場合
- (3) その他研究者が被験者として適当でないと判断した患者

対照群：10 例以内

本研究では、患者群内における化学療法の前後における変化を研究することが主要な目的であるが、実験系の対照として正常骨髄細胞を用いる場合がある。その際は、ヘルシンキ宣言に基いた指針を遵守して取得された検体のみをベンダー（Tissue solution 社、Allcells 社、Proteogenex 社）より購入して使用する。

4. 研究の方法

- (1) 患者に別添説明文書に基づき説明を行った上で、本研究への参加について、文書にて同意を得る。
- (2) 同意が得られた患者を被験者として登録し、登録時に下記の臨床情報をカルテより取得する。研究期間中は、項目③及び④の情報を継続して取得する。
 - ① 年齢
 - ② 性別
 - ③ 診療情報（血算値、血液生化学値（TP, Alb, T-Bil, D-Bil, AST, ALT, ALP, LDH, ChE, γ -GTP, AMY, アンモニア, UA, 血糖, BUN, CRE, CK, Na, K, Ca, Cl, TCh, TG, HDL, LDL, IP, Fe, UIBC, 蛋白分画, CRP))
 - ④ 疾患に関する情報（治療歴、予後（生存、病態）、形態学、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH)、イミュノフェノタイプ、遺伝子変異、Wilms' Tumor 1 (WT1))
- (3) 九州大学病院または協力病院にて試料（骨髄、血液）を化学療法前後及び経過観察中に採取する。化学療法前の試料は、患者の同意の下で、同意日以前に採取された保存検体の残余検体を用いる。また、化学療法の実施中ならびに実施後の試料は、同意日以降の日常診療における採取の残余検体を用いる。用いる量は、検体毎に含まれる細胞濃度が大きく異なる可能性があるが、おおよそ 1-2 mL である。
- (4) 血清或いは血漿を分離する。単核細胞は比重遠心法で分離する。

- (5) 血清或いは血漿は凍結保存する。細胞は、保存液に懸濁し凍結保存する。凍結保存場所は、九州大学大学院医学研究院病態修復内科学分野が管理する冷凍庫とする。
- (6) 分離した単核細胞を用いて以下の各種検査を行う。対照に用いる正常骨髄細胞は、単核球として販売されているため、本ステップ以下より同様に検査を進め、実験の対照とする。必要に応じて、試料を検査会社（SRL、LSI メディエンス、BML）や共同研究先である協和発酵キリン株式会社に輸送し検査を行う。委託先の監督は、検査の契約を締結している委託元（九州大学）が監督する。具体的な検査項目は以下の通り：
- (6-1) 単核細胞を蛍光色素標識の抗体で染色し、マルチカラー・フローサイトメトリーにて各種分子（造血器腫瘍関連分子、白血病幹細胞関連分子、免疫関連分子）の発現を検査する。
 - (6-2) DNA を分離し、AML に関連する遺伝子の量及び変異を PCR 又は次世代シーケンサを用いて検査する。
 - (6-3) RNA を分離し、AML に関連するキメラ遺伝子、WT1、TIM-3、Galectin-9、CEACAM-1、造血器腫瘍関連遺伝子の発現異常を PCR 等を用いて検査する。
- (7) 上記（6）の検査を治療前及び治療後実施し、MRD を追跡する。試料採取は、日常診療において採取した試料の残余を用いる。採取時点は、治療前、治療中及び治療後に及び、標準的な場合には5～6時点とする。
- (8) 上記の検査以外に、必要に応じて以下のような検査をする場合がある。
- (8-1) AML 細胞に対する薬剤や免疫細胞の反応を *in vitro* や *in vivo* で検査する。
 - (8-2) 血清・血漿・細胞中のたんぱく質等の物質の量を検査する。
 - (8-3) 血液・骨髄液を用いた外来生物（ウイルス等）の検査
- (9) 試料・情報（研究に用いられる情報に係る資料を含む。）の保管・廃棄は項目 14 記載に従う。
- (10) 研究の進捗状況は、1年に一度、研究機関の長に報告する。

5. 研究の実施場所および期間

本研究は、試料及びカルテ情報の収集は九州大学病院及び協力病院にて行われる。試料及びカルテ情報は、九州大学医学研究院病態修復内科学分野の研究室に集約される。九州大学医学研究院病態修復内科学分野の研究室は、これらのカルテ情報を連結可能匿名化した後に、試料を用いた実験を行う。匿名化されたカルテ情報ならびに実験データ（電子媒体及び紙媒体を含む）は、九州大学医学研究院病態修復内科学分野の研究室ならびに共同研究先の協和発酵キリン株式会社の研究所にて解析・保管される。匿名化の対応表は、九州大学医学研究院病態修復内科学分野のみで保管する。

研究の実施期間は、許可日～平成 30 年 3 月 31 日である。

6. 予期される利益と不利益

利益：

本研究により被験者が直接受ける利益はない。

不利益：

本研究では、日常診療において採取する血液・骨髄の残余を使用するため、特に不利益は被らない。

7. 評価項目

- Primary : 急性骨髄性白血病における治療前後の TIM-3 陽性細胞の推移と予後との相関
- Secondary : MRD 検出の既存手法であるキメラ遺伝子 PCR 及び WT1 PCR と新規の TIM-3 を含めたフローサイトメトリー法の相関
- Exploratory : TIM-3 陽性細胞と、各種分子（造血器腫瘍関連分子、白血病幹細胞関連分子、免疫関連分子）の相関
各種 MRD 検出法の感度の比較
血液・生化学・疾患分類による層別化による比較
免疫細胞の推移とその表面マーカーの解析
AML 関連遺伝子の変異による MRD の検出
AML 関連遺伝子の変異と TIM-3 の相関の解析
血清・血漿中の因子（Galectin-9 等タンパク質、核酸、脂質など）と TIM-3 の相関の解析

8. 統計的事項

(1) 目標症例数とその設定根拠

患者 50 例

【設定根拠】

目標症例数の設定根拠の前提となる TIM-3 に関する臨床データが報告されていないことから、仮説の証明に必要な症例数を正確に予測することが困難である。そこで、過去に報告された観察研究の論文情報などを基に解析可能であることが期待され、且つ、1年間を目処に同意取得可能と考えられる被験者数である 50 例を目標症例として設定した。

(2) 統計解析方法

・本研究は探索的な研究であり、得られたデータは個体毎に推移を観察し、また平均及び標準偏差を算出し、各値の相関や傾向を検討する。事前に統計解析手法の定義は困難だが、以下の解析が考えられる：2 群間の平均値の比較が可能である場合には t 検定を用いる。共変量の調整のため共分散分析を行う。2 群間の割合の比較には Pearson の χ^2 乗検定を用いる。共変量の調整のために Logistic 回帰分析を行う。生存曲線の推定には Kaplan-Meier 法を用いる。生存時間の信頼区間の計算には Greenwood の公式を適用する。2 群間の生存曲線の比較には主として Logrank 検定を用いる。共変量の調整のために Cox の比例ハザードモデルによる評価も行う。

9. 倫理的事項：同意書に関すること

研究分担者は、本研究に先立ち、被験者として適切と思われる者に対し、本研究について、別添説明文書を用いて十分な説明をする。その際、質問する機会と研究に参加するかどうかを判断するのに、十分な時間を与える。説明文書を用いた説明の後、本研究への参加についての判断は被験者本人の自由意思による。参加の有無により被験者の診断や治療について利益又は不利益になるようなことはなく、また、一旦同意した後に、同意を取り消

すことも可能であり、同意を取り消したことにより、被験者に不利益になることもない旨、被験者に十分説明した上で、同意を取得する。

被験者本人の自由意思による同意が得られたときは、同意書に被験者の署名及び同意日を得る。説明を行った医師は、同意書に署名し、説明日を記入する。

AMLは16歳以上20歳未満の患者に対しても20歳以上と同様の治療が施されるため、代諾者からのインフォームド・コンセントを得ることも想定する。代諾者は原則として、親権者又は未成年後見人とする。被験者は16歳以上の未成年者であるため、被験者本人にも本研究について、別添説明文書を用いて十分な説明をする。その際、質問する機会と研究に参加するか否かを判断するのに、十分な時間を与える。説明文書を用いた説明の後、本研究への参加についての判断は代諾者の自由意思による。参加の有無により被験者の診断や治療について利益又は不利益になるようなことはなく、また、一旦同意した後に、同意を取り消すことも可能であり、同意を取り消したことにより、被験者に不利益になることもない旨、代諾者に十分説明した上で、同意を取得する。

代諾者の自由意思による同意が得られたときは、同意書に代諾者の署名及び同意日を得る。説明を行った医師は、同意書に署名し、説明日を記入する。

対照群については、販売元にて同意取得済みの検体を購入して用いるため、本研究用の同意書は用意しない。

10. 健康被害発生時の対処方法

本研究は、被験者に介入を行う研究ではないため、研究による健康被害の発生は原則としてないものと考えており、特別な補償は設けない。

被験者は、日常診療において侵襲性のある骨髄及び血液の採取を行うが、本研究ではその残余を利用するため、侵襲性は追加されない。

11. 個人情報の保護方法

氏名や診断名の個人情報が記録されるが、個人情報の取り扱いには十分注意し、情報の紛失や被験者個人が特定されることを防ぐため、以下に記載している措置を徹底する。

採取した試料及び診療情報は、九州大学大学院医学研究院病態修復内科学分野において、個人情報（患者氏名、カルテ番号、住所、電話番号など）を消去し、代替する登録番号にて連結可能匿名化する。登録番号と被験者個人を連結する対応表は、同分野内の外部と接続できないパソコンで管理し、対応表のファイルにはパスワードを設定する。このパソコンを設置する部屋の鍵は研究責任者のみが保有しており、入退室を管理する。したがって、第三者が同分野の職員やデータベースへの不正アクセスを介さずに、直接被験者を識別できる情報を閲覧することはできない。

個人情報管理責任者は、九州大学大学院医学研究院病態修復内科学分野・教授・赤司浩一である。

共同研究先である協力病院から試料等が九州大学病院に送付される際には、各共同研究施設において個人情報保護のための匿名化を行った後に、匿名化された試料等が九州大学病院に輸送される。各施設では連結可能匿名化を行い、登録番号と被験者個人を連結する対応表は、同分野内の外部と接続できないパソコンで管理し、対応表のファイルにはパスワードを設定する。各施設の個人情報管理責任者は以下の通り：

浜の町病院・血液内科・血液病センター部長・衛藤徹也、北九州市立医療センタ

前向き観察研究用
一・内科・副院長・大野裕樹、九州医療センター・血液内科・高瀬謙、久留米大学病院・血液・腫瘍内科・主任教授・長藤宏司、原三信病院・血液内科部長・上村智彦、九州病院・血液・腫瘍内科・部長・牟田毅、同部長・小川亮介、福岡赤十字病院・血液・腫瘍内科部長・谷本一樹、福岡東医療センター・血液・腫瘍内科・内科医長・黒岩三佳、九州がんセンター・血液内科・部長・安部康信、千早病院・内科第二部長・原田直樹)

同じく共同研究先の協和発酵キリン株式会社においては、匿名化された情報及び試料のみが送付されるため、個人情報送付されない。

1 2. 研究費とその由来

協和発酵キリン株式会社からの共同研究費

課題名：急性骨髄性白血病の化学療法前後における TIM-3 陽性細胞の推移と病態との相関に関する研究

研究期間：研究機関の長の許可～平成 30 年 3 月 31 日

1 3. 研究の資金源等、研究機関の研究に係る利益相反及び個人の収益等、研究者等の研究に係る利益相反に関する状況

本研究のために実施される研究の費用は、協和発酵キリン株式会社より提供される。

研究責任者の赤司浩一は、九州大学の許可を得て、同社とのコンサルテーション契約を締結している。

本研究は、臨床研究に係る利益相反マネジメント委員会で審議され、利益相反状態が存在することによって、被験者に不利益が及ぶおそれはないと判断されている。

1 4. 試料・情報の保管・廃棄及び試料等の二次利用について

本研究において採取した試料は、九州大学大学院医学研究院病態修復内科学分野において即時に研究に使用或いは凍結され研究使用まで保存される。研究使用後の試料については、再利用不可能な形で廃棄する。

試料は、検査機関（SRL、LSI メディエンス、BML を予定）及び共同研究先（協和発酵キリン株式会社ほか）に輸送され研究に用いられることがあるが、その場合は匿名化された情報が利用される。検査期間または共同研究先に輸送された試料は、研究に使用されたのち速やかに適切に廃棄する。

匿名化されたデータ・情報は、共同研究先の協和発酵キリン株式会社と共有され、原則研究担当者のみがアクセスできる形で管理される。匿名化されたデータ・情報は、論文や学会において発表されることがある。

匿名化されたデータ・情報の保存期間は論文発表後 10 年間とし、試料等の保存期間は論文発表後 5 年間とする。

研究期間終了までに、本研究において採取した試料は、九州大学大学院医学研究院病態修復内科学分野において、同分野教授 赤司浩一の責任の下、適切に再利用不可能な形で廃棄する。

上記の試料のうち、あらかじめ文書で同意を得られたものについては、将来別の医学研究に二次利用する目的で、使い切るまで保存する。二次利用する試料、情報等は将来新た

に計画・実施される医学研究が倫理審査委員会で承認された後に利用し、その計画に従って取扱う。

15. 研究組織

研究責任者：

九州大学大学院医学研究院病態修復内科学・教授・赤司浩一

研究分担者：

九州大学病院・血液・腫瘍内科・講師・宮本敏浩

九州大学大学院医学研究院応用病態修復学・助教・菊繁吉謙

共同研究者：

協力病院（役割：試料及び日常診療の情報の九州大学病院への提供）

浜の町病院・血液内科・血液病センター部長・衛藤徹也、北九州市立医療センター・内科・副院長・大野裕樹、九州医療センター・血液内科・高瀬謙、久留米大学病院・血液・腫瘍内科・主任教授・長藤宏司、原三信病院・血液内科部長・上村智彦、九州病院・血液・腫瘍内科・部長・牟田毅、同部長・小川亮介、福岡赤十字病院・血液・腫瘍内科部長・谷本一樹、福岡東医療センター・血液・腫瘍内科・内科医長・黒岩三佳、九州がんセンター・血液内科・部長・安部康信、千早病院・内科第二部長・原田直樹）

なお、協力病院からの試料及び日常診療の情報の提供は、各施設の倫理審査委員会の承認を得た上で開始する。

協和発酵キリン株式会社・研究開発本部（役割：本共同研究の立案、実施、解析を九州大学と共同して実施）

副本部長兼トランスレーショナルリサーチユニット長 岡崎寛

トランスレーショナルリサーチユニット 俵知紀、石田浩幸

がん R&D ユニット 佐藤崇、高柳晋一郎、雛健、前川淑美、秋山忠和、高橋健、臨床開発センター 篠田一人

研究事務局：

研究対象者等及びその関係者からの相談等への対応等については、以下の研究事務局の担当医に連絡のこと。

連絡先担当者：九州大学病院・血液腫瘍内科・講師・宮本敏浩

連絡先：092-642-5300（内科外来）（平日 8：30～17：00）

：092-642-5244（北 11 階無菌治療部）（夜間・休日）

E-mail; toshmiya@intmed1.med.kyushu-u.ac.jp

16. 研究に関する情報公開の方法と研究成果の発表方法

情報公開

本研究に関しては、成果の発表としてのみ情報公開される。本研究の成果は国際・国内学会発表及び論文発表を予定している。その際、個人を識別できる情報は一切含まない。

研究成果の発表

本研究から得られた成果は、九州大学大学院医学研究院病態修復内科学分野及び共同研究者に帰属する。研究成果の論文・学会発表は、共同研究者の間で承認を得たうえで実施

する。

データの帰属

本研究により収集した匿名化されたデータ・情報は、共同研究者である九州大学及び協和発酵キリン株式会社に帰属する。

17. その他

本研究は、ヘルシンキ宣言の精神、疫学研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省）及び臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省）が統合された「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成26年12月22日 文部科学省、厚生労働省）を遵守して実施するものとする。

研究実施医療機関の研究責任者等及び共同研究者は、本研究の実施に先立ち、それぞれの機関の研究倫理審査委員会において、本研究の実実施計画などについて倫理的、科学的及び医学的妥当性の観点から審査を受け実施の適否について承認を得る。

研究実施計画書の改訂が必要になった場合、改訂した研究実施計画書及びその改訂履歴（改訂内容とその理由）を作成する。改訂の際は、それぞれの機関の研究倫理審査委員会の審査・承認を得る。

本共同研究の成果については、九州大学及び協和発酵キリン株式会社の共同とし、その成果（知財、論文等）の割合は成果の貢献度に応じて両方で協議のうえ決定する。

【参考】「人を対象とする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

【参考】「観察的疫学研究報告の質改善（STROBE）のための声明：解説と詳細」:

<http://www.strobe-statement.org/fileadmin/Strobe/uploads/translations/STROBE-Exp-JAPANESE.pdf>