

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11391

研究課題名(和文) DNA修復酵素遺伝子多型解析による頭頸部癌治療の効果予測

研究課題名(英文) DNA-repair gene polymorphisms predict clinical outcome among patients with head and neck cancer

研究代表者

平川 仁(Hirakawa, Hitoshi)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50437993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復酵素遺伝子多型(ERCC1、XRCC1)を頭頸部癌(中下咽頭、喉頭癌)疾患患者の治療前の末梢血から採取し、予後予測因子となりうるかを検討した。

225例から血液が採取され遺伝子多型を測ることができた。また患者の臨床データと掛け合わせることができた。

化学放射線治療を行った患者においてERCC1 8092 (C/A+A/A) ゲノムタイプは ERCC1 8092 C/C タイプに比べ成績が悪く(hazard ratio, 3.56; 95% confidence interval, 1.22-7.39; p = 0.02) 予後予測となる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA修復酵素遺伝子多型(ERCC1、XRCC1)は地域差、民族差があり、他民族や、他国のそれを参考にすることができない。われわれは沖縄県におけるDNA修復酵素遺伝子多型を調べることにより、頭頸部癌多発地域である本県において独自の研究を行った。侵襲の少ない末梢血からの採血でDNA修復酵素遺伝子多型を検討することにより頭頸部癌の治療選択(手術か化学放射線治療か)ができる可能性を見出した。

今後さらに症例を集積し同研究を発展させていく必要があると考えた。

研究成果の概要(英文)：Purpose: To evaluate the prognostic significance of DNA excision repair gene polymorphisms, excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) and X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (XRCC1) polymorphisms were investigated in Japanese patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Methods: A total of 225 consecutive patients with HNSCC who underwent surgery or chemoradiotherapy/radiotherapy (CRT/RT) were recruited.

Results: Multivariate analysis showed that carriers with the ERCC1 8092 (C/A+A/A) genotype (hazard ratio, 3.56; 95% confidence interval, 1.22-7.39; p = 0.02) had significantly worse survival than those with ERCC1 8092 C/C who received CRT/RT. Conversely, the XRCC1 Arg399Gln polymorphism did not influence survival in patients who received CRT/RT as well as surgery.

The ERCC1 C8092A polymorphism might be an independent predictor of response to CRT and survival outcome in patients with HNSCC.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：DNA修復酵素遺伝子多型 頭頸部癌 手術 化学放射線療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌治療において、機能温存治療を優先した化学放射線治療が増加傾向にある。しかし効果を示さない場合は、手術を行うが、その際の salvage surgery は合併症が多く、予後も大幅に低下する。

治療前に化学放射線療法の効果を予測できるバイオマーカーの開発が重要であるが、現状では明確なものは存在しない。

様々な癌腫の治療において根治治療に先行する化学療法の効果が生体予後を反映するといわれている。頭頸部癌でも機能温存を目的とした導入化学療法による振り分け(chemoselection)が行われている。化学療法が奏功する例では疾患予後が良好で放射線治療の効果も期待できる。一方化学療法の効果がない例では、放射線感受性も悪く、疾患予後も悪いとされている。申請者は副鼻腔癌および口腔癌で同様に導入化学療法の奏功が最も強力な予後良好の予測因子であることを報告した。しかし chemoselection は、抗がん剤を実際に投与してみなければ化学療法および放射線療法の効果、生命予後も予測できないことを示している。このことから治療前に低侵襲かつ容易に化学療法効果、放射線療法効果、生命予後を予測するバイオマーカーを見出すことは極めて重要である。

2. 研究の目的

頭頸部癌多発地域とされる沖縄県において、機能温存治療の効果および予後予測バイオマーカーの開発を目的とする。

DNA 修復酵素遺伝子多型は頭頸部癌化学療法の民族、地域差を考慮したバイオマーカーとなりうる可能性がありこれを明確にする。

3. 研究の方法

中下咽頭喉頭癌患者の治療前の末梢血を採取し ERCC1 及び XRCC1 の遺伝子多型を PCR で判定し、癌のステージ、亜部位、根治治療の方法、術後病理所見などの臨床的データで調整し、バイオマーカーとなりうるかを検討する。

血液サンプル採取, DNA 抽出

DNA 抽出は血液サンプルの Buffy Coat から Promega 社の Maxwell 16 を用いて行い、DNA 量を吸光度にて測定・記録し保存する。DNA 修復酵素の遺伝子多型の頻度については対象症例による検討が必要である。癌の既往がなく同意が得られた耳鼻咽喉科手術例から年齢、性別をマッチさせ全血 DNA を抽出する。

ERCC1 の遺伝子多型

PCR-RFLP 法で判定する。具体的には

フォワードプライマー :5-TGAGCCAATTCAGCCACTAGAG-3', リバースプライマー :5'-CTTTAGTTCTCAGTTTCCCG-3' とし、PCR は初期熱変性 95 5 分、熱変性、アニーリング、伸長反応を 95 30 秒、55 30 秒、72 30 秒で 30cycles、最終伸長反応 72 7 分とする。得られた PCR 産物を制限酵素 MBO (TaKaRa, Shiga, Japan) で 37 90 分 65 25 分処理、2% Agarose gel で電気泳動し遺伝子多型を判定する。

XRCC1 の遺伝子多型

PCR-RFLP 法で判定する。具体的にはフォワードプライマー: 5'-CCCCAAGTACAGCCAGGTC-3'

リバースプライマー: 5'-TGTCCTGCTCCTCTCAGTAG-3' とし、PCR は初期熱変性 95 5 分、熱変性、アニーリング、伸長反応を 95 30 秒、55 30 秒、72 30 秒で 30cycles、最終伸長反応 72 7 分とする。PCR 産物を制限酵素 MSPI (Fermentas, Hanover, MD) で 37 90 分、65 25 分処理、2% Agarose gel で電気泳動し遺伝子多型を判定する。

臨床パラメータの集積

患者情報(性別、年齢、基礎疾患、生活習慣、BMI など)、画像情報(内視鏡、CT、PET-CT)、治療方法(導入化学療法、化学放射線療法、手術、術後照射など)、術後病理組織(切除断端、節外浸潤、神経脈管、リンパ管浸潤の有無) 予後情報は既にファイルする。

導入化学療法の効果判定

導入化学療法による内視鏡的縮小割合、RECIST 基準による評価、手術を実施した場合には、病理組織学的効果判定を実施する。

(化学)放射線療法の効果判定

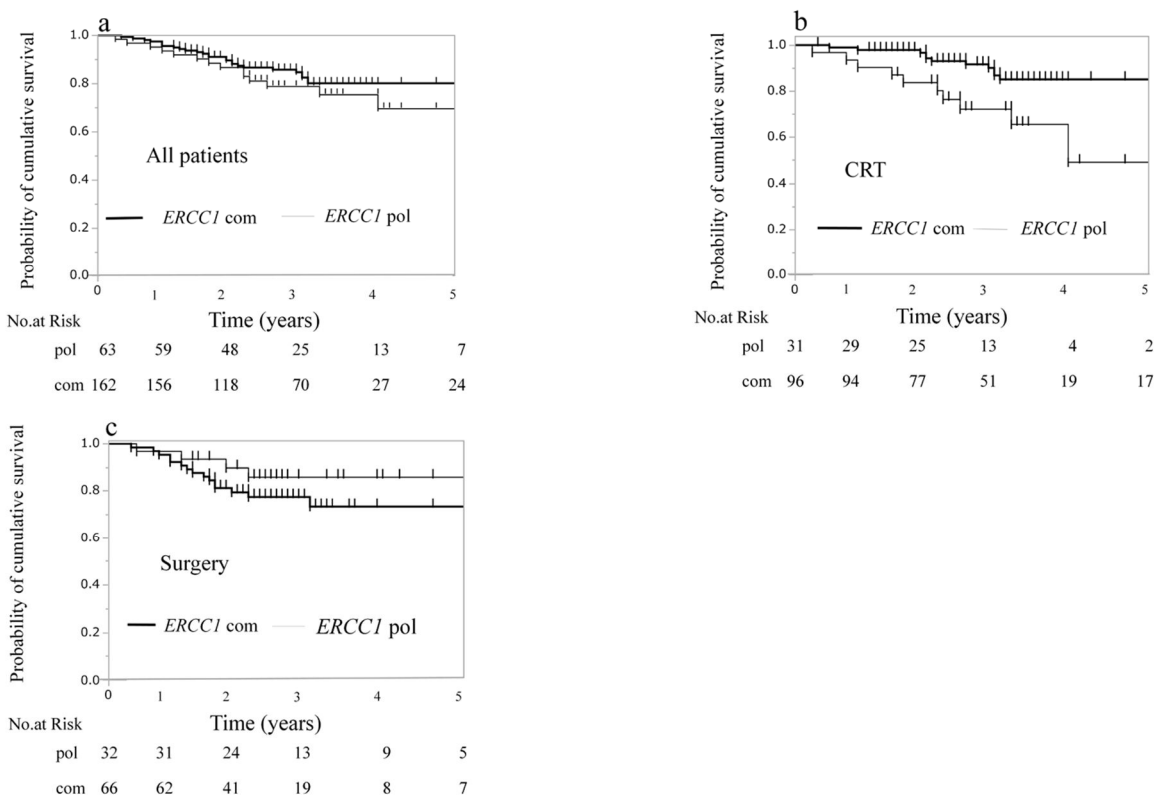
5年粗、無再発生存率、5年局所領域制御率で判定する。

4. 研究成果

225人の患者が検討された。観察機関中央値は48か月であった。225人中、下咽頭癌86人(38.2%)、中咽頭癌67人(29.8%)、喉頭癌72人(46.7%)であった。根治手術は98人(43.6%)、放射線治療127人(56.4%)に施行された。ERCC1 C8092Aのアレル頻度はC/C (common homozygote), C/A (heterozygote), A/A (polymorphic homozygote) がそれぞれ162(72%), 54(24%), 9(4%)であった。XRCC1 Arg399Glnアレル頻度はArg/Arg (common homozygote), Arg/Gln (heterozygote), Gln/Gln (polymorphic homozygote) がそれぞれ102(45.3%), 102(45.3%), 21(9.3%)であった。

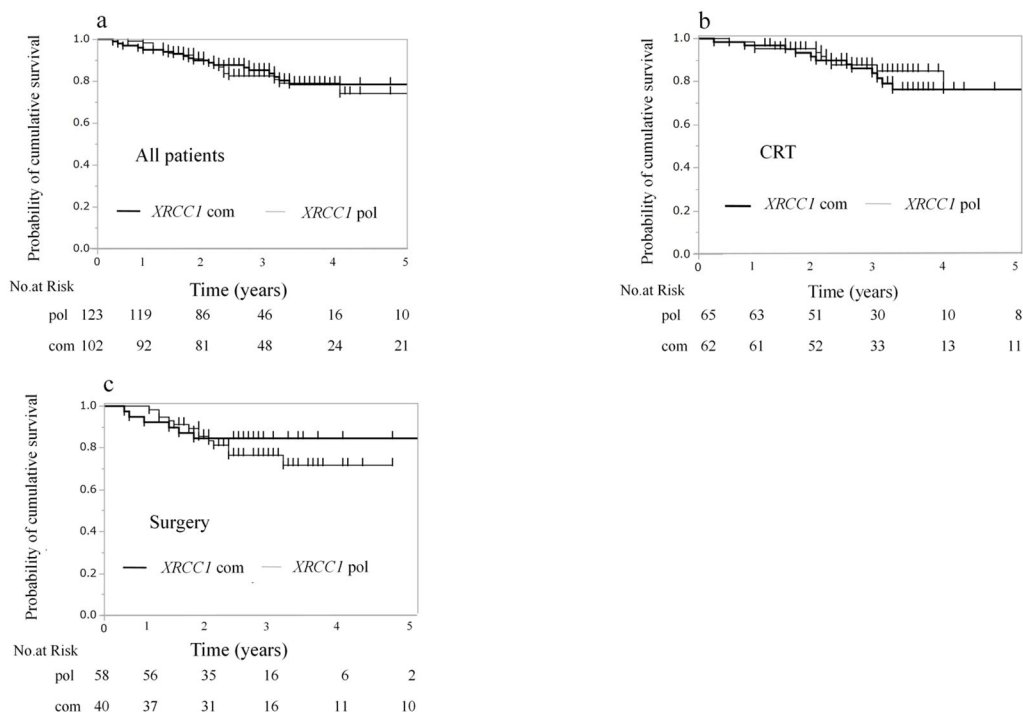
Gene variant	Common homozygote		Heterozygote		Polymorphic homozygote	
	N	%	N	%	N	%
<i>ERCC1</i> C8092A						
Hypopharyngeal cancer	62	72.1	19	22.1	5	5.8
Oropharyngeal cancer	45	67.2	20	29.9	2	3.0
Laryngeal cancer	55	76.4	15	20.8	2	2.8
<i>XRCC1</i> Arg399Gln						
Hypopharyngeal cancer	44	51.1	38	44.1	4	4.7
Oropharyngeal cancer	28	41.8	29	43.3	10	14.9
Laryngeal cancer	30	41.7	35	48.6	7	9.7

5年粗生存曲線を示す。(a) 全患者においてERCC1 com groupは80.2%でERCC1 pol groupは69.6%であった。(ログランクテスト $p = 0.37$)、(b) CRT/RTを行った群ではERCC1 com groupは統計学的有意差をもってERCC1 pol groupより生存成績が良かった(85.1% vs. 49.2%, respectively; $p = 0.004$)、(c) 手術群では両者に差は認めなかった(73.5% vs. 85.9%, respectively; $p = 0.25$)。



XRCCの検討において5年粗生存曲線を示す。(a) 全患者においてXRCC1 com groupとERCC1

pol group に差は認めなかった (78.5% vs. 74.2%; $p = 0.74$) (b) CRT/RT を行った群でも ERCC1 com group と ERCC1 pol group は差を認めなかった (76.4% vs. 76.4%; $p = 0.61$), (c) 手術群でも両者に差は認めなかった (71.8% vs. 84.6%, respectively; $p = 0.39$).



単変量解析および多変量解析

化学放射線治療を行った患者において ERCC1 8092 (C/A + A/A) ゲノムタイプは ERCC1 8092 C/C タイプに比べ成績が悪く (hazard ratio, 3.56; 95% confidence interval, 1.22-7.39; $p = 0.02$) 予後予測となる可能性を見出した。一方 XRCC1 Arg399Gln ゲノムタイプは手術または化学放射線療法を受けた患者において有意差はなく予後予測因子にはなりえないと考えた。

Factor (category)	CS	HR (95% CI)	P-value
Univariate analysis			
XRCC1 (pol/com)	1.16	(0.48–2.87)	0.75
ERCC1 (pol/com)	3.57	(1.47–9.09)	0.01
Age (≥ 65 vs. < 65 years)	2.83	(1.15–7.94)	0.02
Smoking history (yes vs. no)	1.90	(0.44–8.16)	0.39
T classification (T3, 4 vs. T1, 2)	1.99	(0.78–4.81)	0.14
N classification (N2, 3 vs. N0, 1)	2.31	(1.01–5.65)	0.05
Clinical stage (III, IV vs. I, II)	3.70	(1.37–12.9)	0.01
NAC (yes vs. no)	1.66	(0.82–3.19)	0.15
Clinical residual neck disease (yes vs. no)	2.14	(1.11–4.03)	0.02
Multivariate analysis			
ERCC1 (pol/com)	3.56	(1.22–7.39)	0.02
Age (≥ 65 vs. < 65 years)	3.60	(1.29–10.1)	0.01
N classification (N2, 3 vs. N0, 1)	1.24	(0.41–3.77)	0.71
Clinical stage (3, 4 vs. 1, 2)	3.68	(1.06–12.0)	0.04
Clinical residual neck disease (yes vs. no)	2.10	(0.84–9.6)	0.08

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirakawa Hitoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Prognostic importance of pathological response to neoadjuvant chemotherapy followed by definitive surgery in advanced oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1038 1046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyx097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirakawa Hitoshi	4. 巻 277
2. 論文標題 ERCC1 C8092A polymorphism predicts fair survival outcome in Japanese patients with pharyngo-laryngeal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Archives of Oto-Rhino-Laryngology	6. 最初と最後の頁 601-610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00405-019-05731-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平川仁
2. 発表標題 DNA修復酵素遺伝子多型解析による頭頸部癌治療の効果予測
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池上 太郎 (Ikegami Taro) (00754409)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	PCR, 電気泳動

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山下 懐 (Yamashita Yukashi) (60569622)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	臨床症例リクルート