

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07696

研究課題名(和文) 癌放射線治療における稀で重篤な正常組織障害発症例のゲノムシーケンス解析

研究課題名(英文) Genome sequence analysis of cancer patients with rare and severe adverse effects following radiation therapy

研究代表者

今井 高志 (IMAI, Takashi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・QST病院 治療診断部・専門業務員

研究者番号：50183009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がんの放射線治療による正常組織障害発症には個人差があり、遺伝的な違いについて研究が進められている。これまでの研究では正常組織障害の有無による2群間での関連解析が行われてきた。一方で稀な単一遺伝病の中には放射線高感受性を示す場合があり、それらの原因遺伝子がDNA損傷修復に関わることも報告されていることから、本研究では稀で重篤な正常組織障害ではDNA損傷修復遺伝子に未知の変異がないか、患者のエクソームシーケンスデータを解析した。その結果25種類の関連遺伝子から機能に影響を与える延べ197個のバリエーションを検出したが、推定される影響は強くはなく、また重篤な正常組織障害に特異的ではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの放射線治療はがん組織に放射線を集中させることから、がん周辺の正常組織への影響が少ない。しかしながら同一条件の治療において、稀に放射線障害が生じることがある。この原因のひとつとして個人の遺伝子配列の違いがあると考えられ、私達を含め世界各国で研究が進められている。治療前に放射線による副作用のリスクが高い人を遺伝子検査により予測することができれば、さらに最適な治療法の選択が期待される。またこれまでの研究では既知の遺伝子バリエーションを用いた解析が行われていたが、重篤な放射線障害を示した症例のエクソームシーケンスによるバリエーションの探索は初めての試みである。

研究成果の概要(英文)：There are individual differences in the development of normal tissue injuries due to radiation therapy for cancer, but it has not yet been possible to predict the risk of normal tissue injuries for individual patients before treatment because there are multiple gene variants that determine the individual risk of radiation damage. On the other hand, there is a possibility that unknown mutations in the causative genes of single gene disorders, related to DNA damage repair have a strong effect on rare and severe normal tissue injury cases. We searched for variants of DNA damage repair genes from the patient's exome sequence data and detected a total of 197 variants in 25 selected genes but their estimated impacts on their protein function were not significant and were not specific to the severe normal tissue injury cases. Therefore, it is thought that the DNA damage repair genes alone are not the direct cause of severe radiation damage in the cancer patients that we so far collected.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 がん 放射線感受性 遺伝 バリエーション 正常組織障害 有害反応 副作用

1. 研究開始当初の背景

ヒトは遺伝学的に多様な集団であり、この違いが一人一人の個性として表現されることが DNA 配列レベルで解明されつつある。放射線感受性も遺伝学的な個人差があると予想され、放射線照射による正常組織障害を指標に遺伝子多型との関連解析が進められている。しかしながら正常組織障害発症集団に多型頻度の偏りがあることは統計学的に示されてきたが、個人ごとに放射線治療による正常組織障害リスクを予測するには至っていない(1 - 7)。

その理由として次のような点が考えられる。

- ・遺伝的放射線感受性は多因子の相互作用によって決まり、ひとつの因子の効果は小さいと考えられる。
- ・リスク遺伝子(アレル)だけでなく、プロテクティブに働いているアレルもあり、相互作用の解析が複雑である。
- ・放射線照射後の組織反応の解析においては、患者の腫瘍や照射体積、放射線量や併用療法など治療条件を考慮する必要があるが、標準治療として推奨される放射線治療法を受けた症例を対象としても統計学的に考慮しなければならない因子が多い。
- ・正常組織障害は、有害事象共通用語基準など国際的な定義を基に報告されてはいるが、多くの項目は定性的で施設間に判定の差が観られる。
- ・正常組織障害を避けるために様々な工学的工夫がなされた装置の開発が行われており、重篤な障害が発生する頻度は少ないため、統計学的に必要な組織障害発症例を収集するには、全体では数千例規模の放射線治療患者を登録する必要がある。

これらの問題を回避するために、2010 年国際コンソーシアム Radiogenomics を設立して情報を共有し共同研究を進めているが(8, 9) 申請者らの研究では、明らかに日本人特有の多型も関わっており、また各国間の治療法の違いや体格差などもあることから、欧米人を用いた研究との単純な比較解析は難しい。

ところで申請者らはこれまでに乳がん、子宮頸がん、前立腺がんなど全体で 2900 例あまりの日本人放射線治療症例を収集しているが、診療情報の解析では、このうち 36 例において皮膚や腸管の障害で有害事象共通用語基準のグレード 3 または 4 が記録されている。これらの症例をひとつの群として統計学的に解析することは難しいが、この僅か 1.2% の患者が非常に重篤な組織障害を示したということは、これらの症例では、多因子というよりも強い遺伝因子の関わりがあると想定することもできる。

遺伝病の中には、毛細血管拡張性小脳運動失調症(AT)、ファンコーニ貧血(FA)、ウェルナー症候群(WRN)、遺伝性乳がん・卵巣がん(HBOC)など、その原因遺伝子が DNA 損傷修復に関わっている単一遺伝子疾患が知られている。これらは劣性遺伝病であり家系情報がないと保因者であることは判定が難しい。しかしながら、例えば毛細血管拡張性小脳運動失調症の保因者(ヘテロ接合体)に由来する細胞の *in vitro* での放射線感受性はホモ接合体由来の細胞と健常者由来の細胞の中間的な放射線感受性を示すという報告があり、また、がんの発症リスクも高いことが知られている。これら疾患の保因者数は、100-500 人に 1 人くらいと推定されている。そこで、「がん放射線治療患者の中に DNA 損傷修復遺伝子を原因とする遺伝病の保因者が含まれていて、放射線治療に対して強い反応を示した可能性はないだろうか？」という疑問が生じた。

2. 研究の目的

「稀で重篤な放射線正常組織障害発症例では DNA 損傷修復に関わる単一遺伝子疾患の原因遺伝子の変異が強い効果を示す」と仮定し、これまでに収集した癌放射線治療症例のうち特に重篤な障害を発症した症例についてエクソームシーケンスを行う。毛細血管拡張性小脳運動失調症や遺伝性乳がん・卵巣がん症候群などの原因遺伝子について変異を検索し、この仮説が妥当か検討する

3. 研究の方法

乳がん、頭頸部がん、肺がん放射線治療患者のうち同一の施設において同一のプロトコールにより治療が為され放射線障害(有害反応、乳がん:皮膚、頭頸部がん:皮膚、肺がん:肺炎)のグレードが 0 の症例が有る中で、グレード 2 - 4 の有害反応を示した症例を選択した(グレード 2 は障害が長期に続くなど、他の症例とは異なるコメントの有る症例を対象とした)。抽出 DNA(2) の DNA 濃度を QUBIT による蛍光測定法で求めた。またアガロースゲル電気泳動法により DNA 分解の程度を測定し、次世代シーケンス法での解析に適したサンプルを選択した。次世代シーケンスは SURESELECT HUMAN V6 (Agilent 社) キットを用いシーケンスプラットフォーム

フォームは NoVaSeq6000 (MACROGEN JAPAN に委託) を用いた。シーケンスデータは UCSC hg38 をレファレンスとしてマップし、バリエーションの抽出を行った。

4. 研究成果

研究の対象とした放射線治療を受けたがん患者の DNA サンプルについて、次世代シーケンス法に適した DNA 濃度、品質が保たれているかアガロースゲル電気泳動法を用いて調べたところ、殆どの試料において 20Kb 以上の高分子 DNA は残っておらず、低分子 DNA に分解されスミア状になっていた。これまでのプロジェクトでは MassARRAY 法によるタイピングであったため約 150bp 程度の PCR 増幅が可能であれば、抽出後数年が経過しても問題なく解析が可能であったが、次世代シーケンス法に要求される高分子 DNA を保った試料は少なかった。量的に少ない試料については遠心濃縮法や QIAGEN DNA 抽出カラム、Magnet beads を用いた DNA 抽出法により再精製・少量の抽出液による回収によって濃縮を行った。最終的に次世代ゲノムシーケンスが可能な品質と量が有りシーケンス解析ができたのは 23 例であった。

得られた配列から、毛細血管拡張性小脳運動失調症関連遺伝子 (ATM、CHK1、MRE11)、ファンコーニ貧血 (FANCA、FANCB、FANCC、FANCD2、FANCE、FANCF、FANCI、FANCL、FANCM、FANCO (RAD51C)、FANCR (RAD51、RAD51B)、FANCU (XRCC2))、ウエルナー症候群 (WRN)、遺伝性乳がん・卵巣がん症候群関連遺伝子 (BRCA1、BRCA 2、BRIP1、CHEK2、RAD51D)、Li-Fraumeni 症候群 (TP53、TP53BP1)、また以前私たちの国際共同研究により複数の民族で放射線障害リスクと関連があった XRCC1 遺伝子等のバリエーションに特に注目した (6) (表 1)。

表 1 解析した遺伝子

遺伝病		シーケンス解析対象遺伝子
毛細血管拡張性小脳運動失調症	AT	ATM, CHK1, MRE11
ファンコーニ貧血	FANCA	FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCI, FANCL, FANCM, FANCO (RAD51C), FANCR (RAD51, RAD51B), FANCU (XRCC2)
ウエルナー症候群	WS	WRN
遺伝性乳がん・卵巣がん症候群	HBOC	BRCA1, BRCA 2, BRIP1, CHEK2, RAD51D
Li-Fraumeni 症候群	LFS	P53, TP53BP1
その他	-	XRCC1

抽出されたこれらの遺伝子のバリエーションのうち遺伝子 5' 上流、3' 下流の modifier、たんぱく質コーディング領域の missense 変異に注目した。今回の解析では CHEK2、FANCB、FANCE、RAD51D、XRCC2 遺伝子ではバリエーションは検出されなかった。5' 上流、3' 下流域では ATM、FANCF、RAD51C、TP53BP1 遺伝子においてバリエーションが検出された。たんぱく質コーディング領域では、ATM、BRCA2、BRIP1、CHEK1、FANCA、TP53、TP53BP1、XRCC1 遺伝子においてヘテロ接合だけではなくホモ接合での missense 変異が検出されたが、それらは重篤な放射線正常組織障害発症例、軽度の放射線正常組織障害発症例共に検出された。また、米国 National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine によって提供される ClinVar データベースによると本研究で検出したバリエーションの機能予測効果はあまり高くなく、集団における頻度も日本人集団 (東北大学メディカル・メガバンク機構によって提供されている 14K 日本人全ゲノムリファレンスパネル) を含め稀ではなかった。

したがって本研究計画で最初に立てた、単一遺伝病の原因遺伝子として報告されている DNA 損傷修復遺伝子のバリエーションが、稀に観られる重篤な放射線正常組織障害を発症するがん放射線治療患者においては特異的である、という仮説を支持するデータは得られなかった。

放射線を受けた場合の障害に強い影響を与える遺伝子バリエーションが無いとすると Radiogenomics コンソーシアムによる数千例の放射線治療患者を対象とした大規模なゲノムシーケンスプロジェクトが有効なアプローチとして考えられる (10)。Radiogenomics コンソーシアムでは放射線障害を組織ごとのグレード評価から、どの部位の障害であっても互いに評価できるような共通のグレーディングシステムを作成し、解析対象となる症例数を大きくする試みも行っておりその成果が期待される。一方、放射線治療法による正常組織障害の発症は改良されてきているが、国・地域によって治療法の導入状況は異なっており、治療法の異なる患者集団を同時に解析する上での補正法の開発は未だ課題として残っている。また遺伝子バリエーションには民族差があっていくつかの疾病の関連解析では民族間で異なる結果が報告されることもあるが、Radiogenomics コンソーシアムでは民族間で共通の頻度をもつ遺伝子バリエーションを対象としており人類として共通の放射線障害予測遺伝子バリエーションの検出が期待される (11)。

引用文献

1. Mayumi Iwakawa, Shihei Noda, Shigeru Yamada, Naohito Yamamoto, Yukimasa Miyazawa, Hideya Yamazaki, Yoshihiro Kawakami, Yoshifumi Matsui, Hirohiko Tsujii, Junetsu Mizoe, Eisei Oda, Yukihiro Fukunaga, Takashi Imai: Analysis of Non-genetic Risk Factors for Adverse Skin Reactions to Radiotherapy among 284 Breast Cancer Patients, *Breast Cancer*, 13(3): 300-307, 2006 (査読有)
2. Tomo Suga, Atsuko Ishikawa, Masakazu Kohda, Yoshimi Otsuka, Shigeru Yamada, Naohito Yamamoto, Yuta Shibamoto, Yoshihiro Ogawa, Kuninori Nomura, Keizen Sho, Motoko Omura, Kenji Sekiguchi, Yuzo Kikuchi, Yuichi Michikawa, Shuhei Noda, Masashi Sagara, Jun Ohashi, Shinji Yoshinaga, Junetsu Mizoe, Hirohiko Tsujii, Mayumi Iwakawa, Takashi Imai: Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients., *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 69(3), 685-693, 2007
3. Tomo Suga, Mayumi Iwakawa, Hiroshi Tsuji, Hitoshi Ishikawa, Eisei Oda, Shuhei Noda, Yoshimi Otsuka, Atsuko Ishikawa, Kenichi Ishikawa, Jun Shimazaki, Junetsu Mizoe, Hirohiko Tsujii, Takashi Imai: Influence of Multiple Genetic Polymorphisms on Genitourinary Morbidity After Carbon Ion Radiotherapy for Prostate Cancer, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 72(3): 808-813, 2008
4. Yuichi Michikawa, Tomo Suga, Atsuko Ishikawa, Hideki Hayashi, Akira Oka, Hidetoshi Inoko, Mayumi Iwakawa, Takashi Imai: Genome wide screen identifies microsatellite markers associated with acute adverse effects following radiotherapy in cancer patients, *BMC Medical Genetics*, 11: 123, 2010
5. Atsuko Ishikawa, Tomo Suga, Yoshimi Shoji, Shingo Kato, Tatsuya Ohno, Hitoshi Ishikawa, Shinji Yoshinaga, Kiyoshi Ohara, Hisanori Ariga, Kuninori Nomura, Yuta Shibamoto, Kenichi Ishikawa, Takashi Moritake, Yuichi Michikawa, Mayumi Iwakawa, Takashi Imai: Genetic Variants of NPAT-ATM and AURKA are Associated with an Early Adverse Reaction in the Gastrointestinal Tract of Patients with Cervical Cancer Treated with Pelvic Radiation Therapy, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 81(4): 1144-1151, 2011
6. Petra Seibold, Sabine Behrens, Peter Schmezer, Irmgard Helmbold, Gillian Barnett, Charlotte Coles, John Yarnold, Christopher J. Talbot, Takashi Imai, David Azria, C. Anne Koch, Alison M. Dunning, Neil Burnet, Judith M. Bliss, R. Paul Symonds, Tim Rattay, Tomo Suga, Sarah L. Kerns, Celine Bourgier, Katherine A. Vallis, Marie-Luise Sautter-Bihl, et al. XRCC1 polymorphism associated with late toxicity after radiation therapy in breast cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 92: 1084-1092, 2015.
7. Kamallesh Dattaram Mumbrekar, Satish Rao Bola Sadashiva, Shama Prasada Kabekoddu, Donald Jerard Fernandes, Bejadi Manjunath Vadhiraaja, Tomo Suga, Yoshimi Shoji, Fumiaki Nakayama, Takashi Imai, Kapaettu Satyamoorthy: Genetic Variants in CD44 and MAT1A Confer Susceptibility to Acute Skin Reaction in Breast Cancer Patients Undergoing Radiotherapy, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 97: 118-127, 2017.
8. Catharine West, Barry S. Rosenstein and On behalf of: Jan Alsner David Azria, Gillian Barnett, Adrian Begg, Søren Bentzen, Neil Burnet, Jenny Chang-Claude, Eric Chuang, Charlotte Coles, Kim De Ruyck, Dirk De Ruyscher, Alison Dunning, Rebecca Elliott, Laura Fachal, Janet Hall, Karin Haustermans, Carsten Herskind, Tobias Hoelscher, Takashi Imai, Mayumi Iwakawa, Don Jones, Cecilia Kulich on behalf of EQUAL-ESTRO, Jan-Hans Langendijk, Peter O'Neill, Mahmut Ozsahin, Matthew Parliament, Andrzej Polanski, Barry Rosenstein, Daniela Seminara, Paul Symonds, Chris Talbot, Hubert Thierens, Ana Vega, Catharine West, & John Yarnold: Establishment of a Radiogenomics Consortium, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 76(5): 1295-1296, 2010
9. Catharine West, Barry S. Rosenstein and On behalf of: Jan Alsner, David Azria, Gillian Barnett, Adrian Begg, Søren Bentzen, Neil Burnet, Jenny Chang-Claude, Eric Chuang, Charlotte Coles, Kim De Ruyck, Dirk De Ruyscher, Alison Dunning, Rebecca Elliott, Laura Fachal, Janet Hall, Karin Haustermans, Carsten Herskind, Tobias Hoelscher, Takashi Imai, Mayumi Iwakawa, Don Jones, Cecilia Kulich on behalf of EQUAL-ESTRO, Jan-Hans Langendijk, Peter O'Neill, Mahmut Ozsahin, Matthew Parliament, Andrzej Polanski, Barry Rosenstein, Daniela Seminara, Paul Symonds, Chris Talbot,

- Hubert Thierens, Ana Vega, Catharine West, John Yarnold: Establishment of a radiogenomics consortium, *Radiother Oncol*, 94:117-118, 2010
10. Barry Rosenstein Radiogenomics: Identification of Genomic Predictors for Radiation Toxicity. *Semin Radiat Oncol*. 27: 300-309, 2017.
 11. Kerns SL, Fachal L, Dorling L, Barnett GC, Baran A, Peterson DR, Hollenberg M, Hao K, Narzo AD, Ahsen ME, Pandey G, Bentzen SM, Janelisins M, Elliott RM, Pharoah PDP, Burnet NG, Dearnaley DP, Gulliford SL, Hall E, Sydes MR, Aguado-Barrera ME, Gómez-Caamaño A, Carballo AM, Peleteiro P, Lobato-Busto R, Stock R, Stone NN, Ostrer H, Usmani N, Singhal S, Tsuji H, Imai T, Saito S, Eeles R, DeRuyck K, Parliament M, Dunning AM, Vega A, Rosenstein BS, West CML.: Radiogenomics Consortium Genome-Wide Association Study Meta-analysis of Late Toxicity after Prostate Cancer Radiotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2019 May 16. pii: djz075. doi: 10.1093/jnci/djz075

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 K. E. Applegate, W. Ruhm, A. Wojcik, M. Bourguignon, A. Brenner, K. Hamasaki, T. Imai, M. Imaizumi, T. Imaoka, S. Kakinuma, T. Kamada, N. Nishimura, N. Okonogi, K. Ozasa, C. E. Rube, A. Sadakane, R. Sakata, Y. Shimada, K. Yoshida & S. Bouffler	4. 巻 59
2. 論文標題 Individual response of humans to ionising radiation: governing factors and importance for radiological protection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiation and Environmental Biophysics	6. 最初と最後の頁 185-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00411-020-00837-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kerns S, Fachal L, Dorling L, Tsuji H, Imai T, Rosenstein B, West C et al.	4. 巻 112
2. 論文標題 Radiogenomics Consortium Genome-Wide Association Study Meta-Analysis of Late Toxicity After Prostate Cancer Radiotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JNCI: Journal of the National Cancer Institute	6. 最初と最後の頁 179 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnci/djz075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Katsutoshi, Shimokawa Takashi, Imai Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Difference in Acquired Radioresistance Induction Between Repeated Photon and Particle Irradiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2019.01213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相場 俊樹、篠藤 誠、今井 高志、瀧山 博年、山田 滋、柿沼 志津子
2. 発表標題 重粒子線治療前後血液試料を用いたがんの治療評価 に資するバイオマーカーの探索のパイロットスタディ
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相場 俊樹、辻 厚至、辻 比呂志、篠藤 誠、今井 高志
2. 発表標題 量研メディカルデータバンクとその臨床検体を活用した研究例と今後
3. 学会等名 第1回日本量子医科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下川 卓志, 佐藤 克俊, 今井 高志
2. 発表標題 Comparison of biological characteristics of regrown tumors after repetitive irradiation
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山 文明, 川野 光子, 三浦 太一, 藤田 真由美, 小池 幸子, 今留 香織, 石川 敦子, 安田 武嗣, 今村 亨, 今井 高志
2. 発表標題 FGF1/PPP-Cキメラタンパクによる膀胱癌重粒子線治療の有害事象の予防について
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会,
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

RadGenomics
<http://www.nirs.qst.go.jp/research/review/radgenomics/index.php>

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
研究協力者	臺野 和広 (DAINO Kazuhiro) (90543299)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 放射線影響研究部・併任 (82502)	
研究協力者	石川 敦子 (ISHIKAWA Atsuko) (30443063)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 放射線影響研究部・主任技術員 (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関