

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16824

研究課題名（和文）Clonal hematopoiesis による腫瘍微小環境の変化と放射線抵抗性

研究課題名（英文）The relationships of tumor micro environment and radiation resistance with clonal hematopoiesis

研究代表者

立川 章太郎（Tatekawa, Shotaro）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：40816550

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：今回の研究ではclonal hematopoiesis(CH)と放射線治療抵抗性のメカニズムの解明を目標とし、頭頸部癌患者67例のシーケンス解析の結果、無再発生存率・局所再発率ともにCHの存在がリスク因子となることが多変量解析で示された。また、末梢血単核球の遺伝子発現比較のために、CHの有無でRNA-seqを行ったところ、CH有り群において炎症や免疫の主なメディエーターである遺伝子群の発現が高く、またGSEA解析においてはIFN- γ の産生が亢進しており、CHの存在が慢性炎症の誘導に関わっている可能性が考えられた。これらの結果を元に、CHのモデルマウスを作成し、追加解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで放射線治療抵抗性へのアプローチとしては低酸素イメージングや線量増加などの報告が多いが、CHに伴う炎症の惹起や腫瘍微小環境の変化に着目した研究は皆無であった。本研究はその点において独自性があり、化学放射線治療を受ける頭頸部癌患者においてCHの有無が局所再発率に関与していることが判明した。今後、CHによる腫瘍微小環境の変化が放射線治療抵抗性へ関与していることをコンディショナルノックアウトマウスを用いて解析予定だが、それらが解明できれば抗炎症作用をもつ薬剤の投与や血管新生阻害剤、マクロファージの遊走を阻害する薬剤など、CHを有する患者における新たな治療戦略の設計が可能となる。

研究成果の概要（英文）：The current study aimed to elucidate the mechanism of clonal hematopoiesis (CH) and radiotherapy resistance. Sequence analysis of 67 patients with head and neck cancer showed that the presence of CH was a risk factor for both recurrence-free survival and local recurrence rate, as indicated by multivariate analysis including age and stage of disease. In addition, RNA-seq was performed in peripheral blood mononuclear cells with and without CH to compare gene expression, and the expression of genes that are major mediators of inflammation and immunity was higher in patients with CH. The possibility that the presence of CH may be involved in the induction of chronic inflammation was considered. Based on these results, we have created a mouse model of CH and are conducting additional analyses.

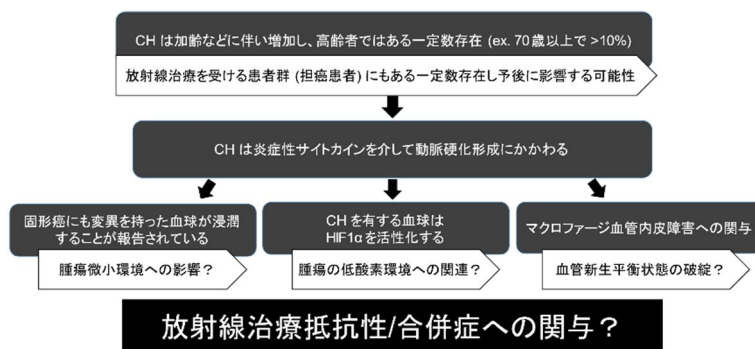
研究分野：放射線治療学

キーワード：放射線治療学 放射線治療抵抗性 腫瘍微小環境 DNA変異解析 clonal hematopoiesis

1. 研究開始当初の背景

Clonal Hematopoiesis (CH) とは血液学的異常が無い人に血液細胞の体細胞クローンの増殖を認めることと定義され、一般的に加齢とともに頻度が増加することが知られている。近年、CH がアテローム性心血管疾患のリスクとなることが判明し、さらに CH を有するマクロファージが血管内皮の活性化を介して局所の炎症に関連することが報告されている。さらに、担癌患者における報告でも、CH の変異アリル頻度の増加は原疾患による死亡と関連していたことから何らかの治療抵抗性に関わっている可能性が示唆される結果であった。以上より、CH が局所の炎症を惹起し腫瘍環境の変化に関わっている可能性を申請者は考えた。一方、慢性炎症や血管新生を始めとする腫瘍微小環境の放射線治療抵抗性へ果たす役割は大きい。しかし、腫瘍微小環境が感受性に直接影響する放射線治療と、CH との関連については未だ不明である。それを解明し、放射線治療抵抗性に対する新たな治療標的を模索するのが本研究の目的である。

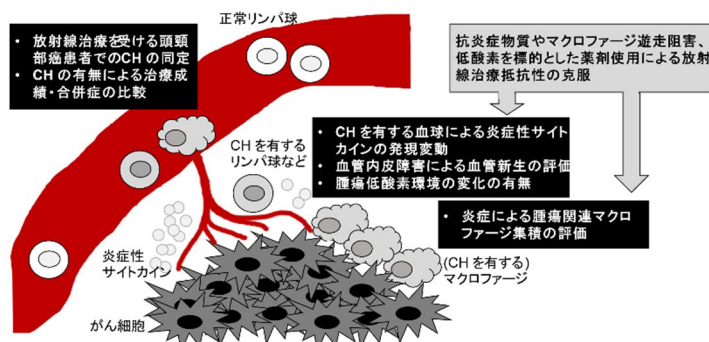
Clonal Hematopoiesis と放射線治療抵抗性の関連(仮説)



2. 研究の目的

本研究では CH によって生じる腫瘍微小環境の変化と放射線治療抵抗性との関連の解明のため、主に頭頸部癌に対する根治的(化学)放射線治療を受ける患者を対象として解析を行う。放射線治療抵抗性へのアプローチとしては低酸素イメージングや線量増加などの報告が多いが、CH に伴う炎症の惹起や腫瘍微小環境の変化に着目した研究は皆無である。本研究はその点において独自性があり、CH の有無が放射線治療の奏効率や急性期・晩期を含む合併症にどのように関わっているかを解明する。CH による腫瘍微小環境の変化が放射線治療抵抗性へ関与していることがわかれば、それに対する治療、例えば抗炎症作用をもつ薬剤の投与や血管新生阻害剤、マクロファージの遊走を阻害する薬剤など、CH を有する患者における新たな治療戦略の設計が可能となる。

本研究の目的



3. 研究の方法

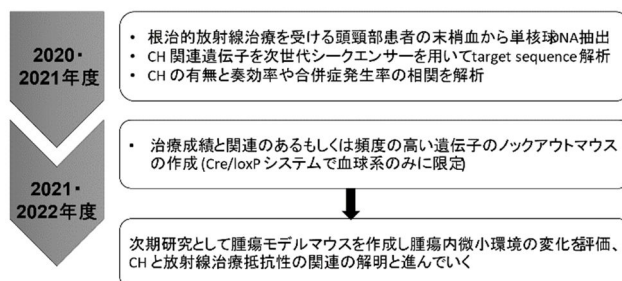
(1)臨床検体を用いる DNA 変異解析

同意を得られた根治的(化学)放射線治療を受ける頭頸部癌患者の末梢血から DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて target sequence を行う。CH の定義はいくつかあるが一般的なものとして allele frequency 2%以上があるため、シーケンスカバレッジを x500 に設定する。遺伝子変異解析した結果に基づき、CH 患者群と non-CH 患者群とで治療成績 (奏効率や局所再発率など) や合併症発生率を比較し、CH と治療成績との関連を解明する。また、CH の中で放射線治療抵抗性と最も関連が強い遺伝子変異を同定する。

(2)遺伝子ノックアウトマウスの作成

放射線治療成績や合併症と関連のある変異の同定後は、その遺伝子のノックアウトマウスを作成して腫瘍微小環境への影響を in vivo で解析をするための準備を行う。ノックアウトマウス作成には CRISPR/Cas9 を用いることとし、非血液細胞への遺伝子変異導入の影響も考えられるため Cre/loxP システムを用いて血液細胞のみに遺伝子変異導入を行うこと

研究計画概要

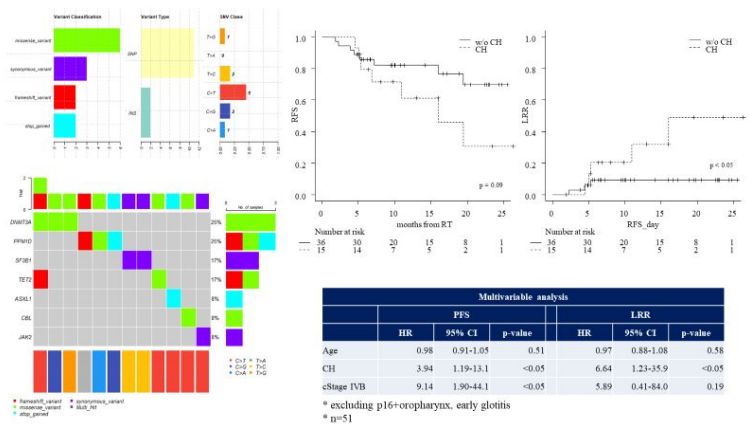


とする。

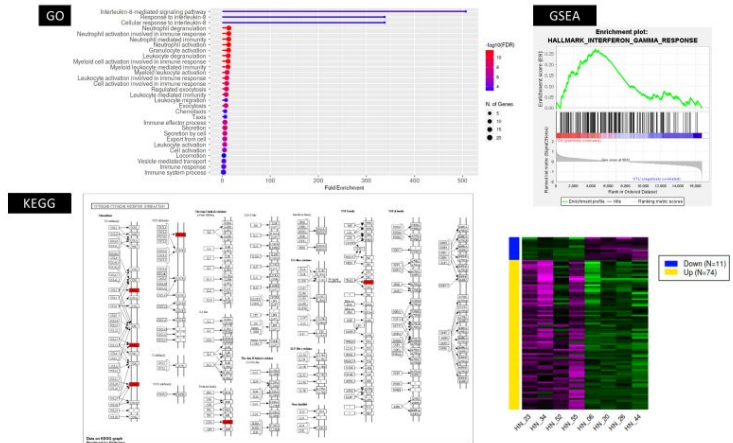
4. 研究成果

本研究は2020年度から開始しており、現時点で頭頸部癌患者67例のシーケンス解析が完了している。GATK Best Practices に沿った解析と QIAGEN 社の CLC Genomics Workbench の 2 種類の variant caller を用いて重複する変異を真の変異とし、かつ既報の一般的なハードフィルタリングに加えて ToMMo 4.7kJPN を用いてアレル変異 1%以上の変異を germline の変異として除外した。その結果、CH を有する患者割合は 3 割程度であり概ね既報通りであること、また変異遺伝子種類もこれまでの報告で頻度が高いものが抽出されていることを確認している。また、比較的予後良好な p16 陽性中咽頭癌患者・早期声帯癌患者を除いた群において無再発生存率・局所再発率ともに CH の存在がリスク因子となることが、多変量解析含めて示された。また、末梢血単核球の遺伝子発現比較のために、CH の有無で 4 検体ずつを用いて RNA-seq を行った。その結果、CH 有り群において炎症や免疫の主なメディエーターである CXCR1 の発現が高く、CH における慢性炎症の誘導に関わっている可能性が考えられた。これらの結果を元に、CH のモデルマウスとして最も用いられかつ今回の解析で原因遺伝子として最も多かった Tet2 の cKO マウスを作成し、CH により慢性炎症が誘導されるか、放射線治療抵抗性に繋がっているかを現在検討している段階である。

頭頸部癌患者67例の解析結果



CH の有無による末梢血単核球の発現比較



これらの結果を元に、CH のモデルマウスとして最も用いられかつ今回の解析で原因遺伝子として最も多かった Tet2 の cKO マウスを作成し、CH により慢性炎症が誘導されるか、放射線治療抵抗性に繋がっているかを現在検討している段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Hayashi Kazuhiko, Suzuki Osamu, Shiomi Hiroya, Ono Hitoshi, Setoguchi Akira, Nakai Masataka, Nakanishi Erina, Tatekawa Shotaro, Ose Naoko, Hirata Takero, Tamari Keisuke, Seo Yuji, Funaki Soichiro, Isohashi Fumiaki, Shimizu Shinichi, Shintani Yasushi, Ogawa Kazuhiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Stereotactic ablative body radiotherapy with a central high dose using CyberKnife for metastatic lung tumors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-023-10635-6	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 -
1. 著者名 Chijimatsu Ryota, Kobayashi Shogo, Takeda Yu, Kitakaze Masatoshi, Tatekawa Shotaro et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Establishment of a reference single-cell RNA sequencing dataset for human pancreatic adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104659~104659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104659	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 -
1. 著者名 Tatekawa Shotaro, Hoshino Shigenori, Takemoto Norihiko, Oda Michio, Akino Yuichi, Iwahori Kota, Hirata Takero, Hayashi Kazuhiko, Tamari Keisuke, Seo Yuji, Isohashi Fumiaki, Shimizu Shinichi, Ogawa Kazuhiko	4. 巻 7
2. 論文標題 COVID-19 vaccine-induced Recurrence of the Radiation Recall Phenomenon in the Laryngeal Mucosa Due to a VEGF Inhibitor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advances in Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 101048~101048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.adro.2022.101048	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 -
1. 著者名 Katsuki Shohei, Takahashi Yutaka, Tamari Keisuke, Minami Kazumasa, Takenaka Wataru, Ibuki Yoriko, Yamamoto Junya, Tatekawa Shotaro, Hayashi Kazuhiko, Seo Yuji, Isohashi Fumiaki, Ogawa Kazuhiko, Koizumi Masahiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Radiation therapy enhances systemic antitumor efficacy in PD-L1 therapy regardless of sequence of radiation in murine osteosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0271205~0271205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0271205	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 -

1. 著者名 Tatekawa Shotaro, Tamari Keisuke, Chijimatsu Ryota, Konno Masamitsu, Motooka Daisuke, Mitsufuji Suguru, Akita Hirofumi, Kobayashi Shogo, Murakumo Yoshiki, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi, Ishii Hideshi, Ogawa Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 N(6)-methyladenosine methylation-regulated polo-like kinase 1 cell cycle homeostasis as a potential target of radiotherapy in pancreatic adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15196-5	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 -

1. 著者名 Yamamoto Junya, Takahashi Yutaka, Minami Kazumasa, Tamari Keisuke, Katsuki Shohei, Takenaka Wataru, Tatekawa Shotaro, Hayashi Kazuhiko, Seo Yuji, Isohashi Fumiaki, Ogawa Kazuhiko, Koizumi Masahiko	4. 巻 14
2. 論文標題 High Dose Local Photon Irradiation Is Crucial in Anti-CTLA-4 Antibody Therapy to Enhance the Abscopal Response in a Murine Pancreatic Carcinoma Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2087~2087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14092087	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 -

1. 著者名 Seo Yuji, Tamari Keisuke, Takahashi Yutaka, Minami Kazumasa, Tatekawa Shotaro, Isohashi Fumiaki, Suzuki Osamu, Akino Yuichi, Ogawa Kazuhiko	4. 巻 98
2. 論文標題 Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors sensitize cancer cells to hypofractionated radiotherapy through altered selection of DNA double-strand break repair pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 1222~1234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2022.2020357	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 Sato Hiromichi, Hara Tomoaki, Tatekawa Shotaro, Sasaki Kazuki, Kobayashi Shogo, Kitagawa Toru, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi, Ogawa Kazuhiko, Uchida Shizuka, Ishii Hideshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Emerging roles of long noncoding and circular RNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2022.1025923	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 -

1. 著者名 Yuji Seo , Keisuke Tamari , Yutaka Takahashi , Kazumasa Minami , Shotaro Tatekawa , Fumiaki Isohashi , Osamu Suzuki , Yuichi Akino , Kazuhiko Ogawa	4. 巻 none
2. 論文標題 Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors sensitize cancer cells to hypofractionated radiotherapy through altered selection of DNA double-strand break repair pathways.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International journal of radiation biology	6. 最初と最後の頁 1, 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2022.20	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 -

1. 著者名 Kazuhiko Hayashi , Osamu Suzuki , Hiroya Shiomi , Masataka Nakai , Kei Fujiwara , Erina Nakanishi , Shotaro Tatekawa , Takero Hirata , Keisuke Tamari , Haruhiko Hirata , Soichiro Funaki , Yuji Seo , Yoshito Takeda , Fumiaki Isohashi , Yasushi Shintani , Kazuhiko Ogawa	4. 巻 42
2. 論文標題 Stereotactic Ablative Radiotherapy Using CyberKnife for Stage I Non-small-cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 321, 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15488	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 -

1. 著者名 Shotaro Tatekawa , Ken Ofusa , Ryota Chijimatsu , Andrea Vecchione , Keisuke Tamari , Kazuhiko Ogawa , Hideshi Ishii	4. 巻 13
2. 論文標題 Methylosystem for Cancer Sieging Strategy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5088, 5088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13205088	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 -

1. 著者名 Shotaro Tatekawa , Shigetoshi Shimamoto , Yoshiaki Miyata , Yutaro Yoshino , Takero Hirata , Keisuke Tamari , Yuji Seo , Fumiaki Isohashi , Yoshifumi Yamamoto , Atsuhiko Uno , Hidenori Inohara , Kazuhiko Ogawa	4. 巻 60
2. 論文標題 Monitoring expiratory carbon monoxide to study the effect of complete smoking cessation on definitive radiation therapy for early stage glottic carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta oncologica	6. 最初と最後の頁 582, 588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/0284186X.2020.1865563	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 立川章太郎， 玉利慶介， 千々松良太， 光藤傑， 秋田裕史， 小林省吾， 村雲芳樹， 土岐祐一郎， 江口英利， 小川和彦， 石井秀始
2. 発表標題 m6Aにより制御されるPLK1の細胞周期恒常性は膵癌において新規放射線治療の標的となる
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 純也， 高橋 豊， 皆巳 和賢， 玉利 慶介， 勝木 翔平， 武中 涉， 松谷 英樹， 立川 章太郎， 小川 和彦， 小泉 雅彦
2. 発表標題 抗CTLA-4抗体を使った免疫療法と放射線療法の併用治療は、膵管癌の局所のみならず遠隔巣においても抗腫瘍効果が得られる
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝木 翔平， 高橋 豊， 玉利 慶介， 皆巳 和賢， 武中 涉， 山本 純也， 松谷 英樹， 立川 章太郎， 小川 和彦， 小泉 雅彦
2. 発表標題 マウス骨肉腫モデルに対する抗PD-L1抗体治療において治療順番に関わらず放射線治療は全身性の抗腫瘍効果を引き起こす
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武中 涉， 高橋 豊， 皆巳 和賢， 玉利 慶介， 立川 章太郎， 勝木 翔平， 山本 純也， 松谷 英樹， 小泉 雅彦， 小川 和彦
2. 発表標題 抗CTLA-4抗体併用下での放射線治療の線量増加による全身性抗腫瘍効果の増強について
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松谷 英樹 , 玉利 慶介 , 立川 章太郎 , 皆巳 和賢 , 高橋 豊 , 武中 渉 , 勝木 翔平 , 山本 純也 , 小川 和彦 , 小泉 雅彦
2. 発表標題 p16-HNSCC患者の血漿中cell-free DNAを用いたdigital-PCRによるHPV-DNA検出
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立川 章太郎 , 元岡 大祐 , 玉利 慶介 , 皆巳 和賢 , 瀬尾 雄二 , 高橋 豊 , 今野 雅允 , 石井 秀始 , 猪原 秀典 , 小川 和彦
2. 発表標題 Alteration of tumor microenvironment and radioresistance induced by clonal hematopoiesis
3. 学会等名 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------