

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591615

研究課題名（和文） 中咽頭癌の放射線治療効果予測における低酸素状態に関連する遺伝子群の意義

研究課題名（英文） Significance of hypoxia-related genes to predict the tumor response to radiotherapy in patients with oropharyngeal cancer

研究代表者

小川 和彦 (OGAWA KAZUHIKO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40253984

研究成果の概要（和文）：

本研究は、中咽頭癌の放射線治療効果予測における低酸素状態に関連する遺伝子群の意義について明らかにすることを目的としている。現在、生検時(放射線治療前)に採取した腫瘍組織において、低酸素状態に関連する遺伝子群（特に HIF-1 α , CA9, DEC-1, GLUT-1, VEGF, NF- κ B, bFGF 等）につき、real-time PCR による遺伝子発現状況および免疫組織学的染色を行っており、それらの結果と実際の放射線治療効果との相関を明らかにするための検討を行っている。

研究成果の概要（英文）：

This study is aimed to elucidate the significance of hypoxia-related genes to predict the tumor response to radiotherapy in patients with oropharyngeal cancer. We are currently conducting the analyses using real-time PCR and immunohistochemical study, and investigating whether hypoxia-related genes can predict the tumor response to radiotherapy in patients with oropharyngeal cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：放射線治療生物学

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌において放射線治療は一定の役割を担っており、特に形態、機能の温存しながらの治療が可能であるという点が優れている。特に中咽頭癌は嚥下、発声等の機能温存を目指した根治的放射線治療が以前から行なわれてきた。しかしながら、その治療効果については

個々の症例によって異なるのが現状である。中咽頭癌においては、一般的な臨床的予後因子(TNM 分類、腫瘍形態等)が反映されない放射線抵抗性の腫瘍も存在し、治療施行後に放射線抵抗性腫瘍であることが臨床的に明らかになる場合もある。従って個々の腫瘍に対して放射線治療に感受性があるかどうかをあらかじめ予測することはより至適な治療を行うために非常に

重要なことであると考えられる。しかしながら、現時点では通常の検査法でそれらの感受性を予測することは困難であり、レスポンドーを選定できる客観的手法の確立が望まれる。

酸素は放射線治療効果を規定する強力な因子であり、低酸素細胞は通常の細胞よりも放射線治療効果が著しく落ちることが指摘されている。中咽頭癌においても低酸素状態が放射線感受性を規定するとの報告が散見されている。しかしながら、それらの研究は基礎的研究段階で止まっており、実際の治療展開を睨んで具体化した客観的研究はほとんど無いのが現状である。本研究は、臨床検体、臨床経過を用いることにより、低酸素状態に関連する遺伝子群のなかで放射線感受性を規定する因子を明らかにすることを目的としている。さらに、将来的には臨床実地活用できることを目標にしており、具体的で実際的である。

また、最近様々な固形癌で癌幹細胞の存在が明らかとなり、癌幹細胞が放射線抵抗性を促進し、さらには低酸素状態と関連していることもわかってきた (Bao *et al*, *Nature*, 2006; Blazek *et al*. *Int J Radit Oncol Biol Phys*, 2007)。CD133等の癌幹細胞を規定する因子である表面抗原の発現程度と低酸素状態に関連する遺伝子群との関連についての検討も必要であると考えられる。

2. 研究の目的

中咽頭癌の放射線治療効果予測における低酸素状態に関連する遺伝子群の意義について明らかにし、レスポンドー選択のための分子遺伝学的指標を確立することを目的とする。具体的には、生検時（放射線治療前）に採取した腫瘍組織において、低酸素状態に関連する遺伝子群につき PCR による遺伝子発現状況および免疫組織学的染色等の検討を行う。それらの結果と実際の放射線治療効果との相関を調べることにより、低酸素状態に関連する遺伝子群のなかで放射線感受性を規定する因子を明らかにする。さらには、レスポンドー選択のための分子遺伝学的指標を確立することを目標としている。

中咽頭癌の治療については標準化の努力が続けられているが、放射線療法や化学療法の使用法については経験的なものに拠っているのが現状である。最近の報告では、低酸素状態に関連する遺伝子の発現と放射線感受性との関連性についての基礎的検討の報告が散見されてきている。しかしながら、臨床症例における研究は非常に少ない。本研究はその点で独創的であり、今回の研究により放射線治療前にあらかじめ治療効果が予測できる手法が確立されれば、患者の腫瘍における放射線感受性の状態に応じて至適な治療法を立案することが可能になると考えられる。

3. 研究の方法

【研究目的を達成するための具体的な研究計画・方法について】

まず、プロトコルに従って中咽頭癌症例の臨床検体を生検にて採取する（放射線治療前）。臨床検体を 50 例程度集積した頃から、採取した腫瘍組織において、低酸素状態に関連する遺伝子群につき real-time PCR による遺伝子発現状況および免疫組織学的染色等の検討を行う。それらの結果と実際の放射線治療効果との相関を調べることにより、低酸素状態に関連する遺伝子群のなかで放射線感受性を規定する因子を明らかにする。さらには、レスポンドー選択のための分子遺伝学的指標を確立することを目標とする。放射線治療、化学療法、分子遺伝学的検討においてはすべて琉球大学で施行する。

【平成 21 年度の計画】

(1) 検体収集 (小川、鈴木、玉城)

生検時に分子遺伝学的検討のための検体を採取する。他の頭頸部領域と比較して、中咽頭領域の検体採取は比較的容易である。採取した検体は即座に液体窒素により凍結させ、その後は超低温フリーザー (-80°C) へ移して RNA 抽出時まで保存を行う。収集を行う症例数としては、インフォームドコンセントの得られた中咽頭癌症例について今後の 3 年間で 30-40 症例程度を予定している (2008 年 9 月時点では、すでに 36 症例の検体集積が済んでいる)。

(2) 治療 (小川、鈴木、玉城)

未治療で遠隔転移の無い正常な骨髄機能、肝・腎機能を有した全身状態良好な中咽頭癌患者に対してインフォームドコンセントを得てから治療を行う。治療法はプロスペクティブスタディとして 2004 年に当大学の倫理審査委員会で承認済み。放射線治療はライナックによる X 線単独または電子線を併用して行う。プロトコルは放射線治療単独 (Stage I) または同時化学放射線療法 (Stage II-IVB) の 2 方法である。

T1N0M0 症例 (Stage I) 放射線治療単独

70 Gy/35 回 (全頸部には 40 Gy/20 回)

T2-4N0-3M0 症例 (Stage II-IVB) 化学放射線療法
放射線治療は 70 Gy / 35 回 (全頸部には 40 Gy/20 回)。化学療法は CDGP (90 mg/m², day 1), 5FU (800 mg/m², days 2-6) を放射線治療中に 2 コースを行う。

(3) 治療効果判定 (小川、鈴木、玉城)

CT, MRI, 臨床所見にて治療効果を判定する。

【平成 22 年度以降の計画】

(1) 検体収集、治療、効果判定

平成 21 年度と同様に引き続き検体収集、治療、効果判定を行う。

(2) 低酸素状況に関連する遺伝子群における Real-time PCR による mRNA 発現状況の検討 (小川、吉見、玉城)

チオシアン酸-フェノール-クロロホルム抽出法にてそれぞれの検体における RNA の抽出を行う。次に、各検体における RNA 8 μg より cDNA を合成する。その後、低酸素状態に関連する遺伝子群 (HIF-1α, CA9, DEC-1, GLUT-1, VEGF, NF-κB, bFGF 等) に

ついて real-time PCR を行って個々の遺伝子における発現状況を検討する。Real-time PCR による検討については、購入予定の MJ Mini Thermal Cycler (Bio Rad), CYBR green I (Bio Rad)により行う。

(3) 同定遺伝子における免疫組織学的染色による検討 (小川、吉見、玉城)

同定された遺伝子において免疫組織学的染色 (Streptavidin-biotin 法) を行い、上記の遺伝子群における蛋白発現の状況を検討する。

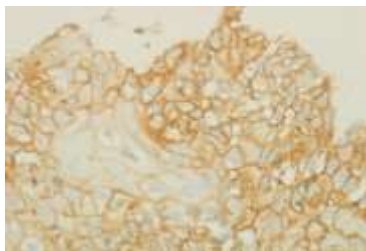
(4) CD133, Human papillomavirus (HPV)の発現状況と低酸素状況に関連する遺伝子群の発現状況との関連の検討 (小川、吉見、玉城)

CD133 の mRNA と蛋白発現状況と低酸素状況に関連する遺伝子群の発現状況との関連を検討する。さらには HPV の発現状況との関連も検討する。

4. 研究成果

研究期間において、琉球大学の治療プロトコル (当大学の倫理審査委員会承認済み) に従って一定の治療を施行する症例においてプロスペクティブに検体採取を行っており、現在も検体採取を継続している。具体的には、生検時に検体採取を行い、採取した検体は即座に液体窒素により凍結保存を行っている。その後の治療は、Stage I 症例では放射線治療単独で 70 Gy / 35 回、Stage II-IV 症例では放射線治療 70 GY/35 回に化学療法 (Nedaplatin, 5FU)の併用を施行している。2011 年 12 月時点では 66 症例の集積が行われている。

中咽頭癌の検討を行う前に、食道癌で化学放射線療法を行った 25 症例について低酸素に関連する遺伝子群 (HIF-1 α , CA9, DEC-1, GLUT-1, VEGF, NF- κ B, bFGF)における免疫組織学的染色の検討を行った。食道癌においては、HIF-1 α 、GLUT-1 が局所制御率、生存率における有意な予後因子であることを明らかにした (Ogawa K, et al. Anticancer Res, 2011; Chiba I, Ogawa K, et al. Oncol Lett, 2011)。

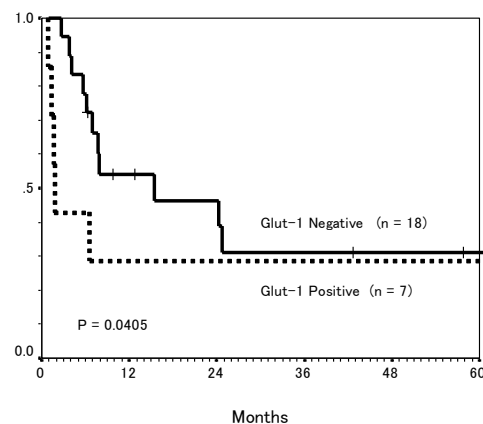
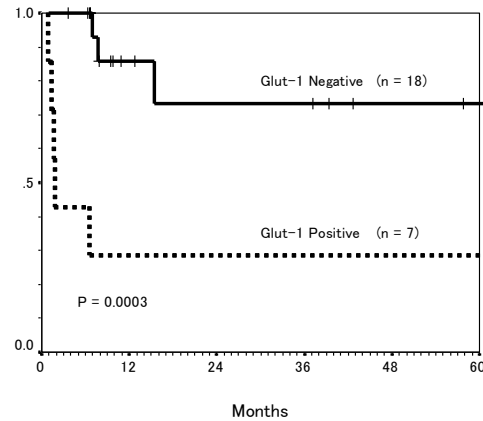


GLUT-1 positive



GLUT-1 negative

今後とも中咽頭癌症例で放射線治療を施行する症例の集積を重ねて、低酸素に関連する遺伝子群の検討を継続して行っていく予定である。そして、採取した検体を使用して、低酸素の関連する遺伝子群の臨床的意義を明らかにしていく予定である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ogawa K, Chiba I, Morioka T, Shimoji H, Tamaki W, Takamatsu R, Nishimaki T, Yoshimi N, Murayama S. Clinical significance of HIF-1 α expression in patients with esophageal cancer treated

with concurrent chemoradiotherapy.
Anticancer Res. 2011 Jun;31(6):2351-9.
査読有

- ② **Ogawa K**, Chiba I, Morioka T, Shimoji H, Iraha S, Takamatsu R, Nishimaki T, **Yoshimi N**, Murayama S. Clinical significance of GLUT-1 expression in patients with esophageal cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. Anticancer Res. 2011 Jan-Feb;2(1):21-28
査読有

[学会発表] (計 1件)

- ① 千葉至、小川和彦、森岡孝満、下地英明、砂川奈穂、伊良波史朗、西巻正、吉見直己、村山貞之。食道癌に対する化学放射線療法同時併用における GLUT-1 発現の臨床的意義。第 70 回日本医学放射線学会総会。2011 年 5 月 9 日-20 日 (WEB 開催)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 和彦 (OGAWA KAZUHIKO)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40253984

(2) 研究分担者

吉見 直己 (YOSHIMI NAOKI)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30166996

鈴木 幹男 (SUZUKI MIKIO)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00226557

飯田 行 (IIDA GYOU)
琉球大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60404517

(3) 連携研究者

()

研究者番号：