

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5月16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：21592193
 研究課題名（和文） p53 コドン 72 遺伝子多型と腫瘍の生物学的活性に基づく化学放射線療法
 の予後診断
 研究課題名（英文） p53 and PET-related parameters as a prognostic factor of head and
 neck carcinoma treated by chemoradiation
 研究代表者
 猪原 秀典（INOHARA HIDENORI）
 大阪大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：00273657

研究成果の概要（和文）：化学放射線同時併用療法で加療する頭頸部進行癌の未治療新鮮例について、*p53* コドン 72 遺伝子多型、*p53* 遺伝子変異、高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の感染、治療前原発巣の SUVmax、SUVmean、metabolic tumor volume（MTV）が予後因子となるか否か前向きに検討した。その結果、下咽頭癌において MTV が独立した予後因子であることが明らかとなった。即ち、下咽頭癌においては原発巣の MTV が高い群は低い群と比べ有意に粗生存率、喉頭温存率が不良であった。

研究成果の概要（英文）：Prognostic significance of *p53* codon72 polymorphism, *p53* mutations, human papillomavirus, and pretreatment PET parameters, in addition to clinical factors, were prospectively addressed in patients with locoregionally advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by concurrent chemoradiotherapy. Pretreatment PET parameters include SUVmax, SUVmean, and metabolic tumor volume of a primary tumor. Multivariate analysis revealed that MTV is only an independent prognostic factor. Overall survival as well as laryngectomy survival were significantly better in patients with low MTV tumor than in those with high MTV tumor.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌、化学放射線同時併用療法、*p53* コドン 72 遺伝子多型、*p53* 遺伝子変異、ヒトパピローマウイルス、SUVmax、SUVmean、metabolic tumor volume

1. 研究開始当初の背景

(1) *p53* 遺伝子変異と HPV

頭頸部扁平上皮癌の発生には喫煙、飲酒、HPV 感染が関与している。*p53* の機能は、①

p53 の突然変異、② *p53* の loss of heterozygosity、③ HPV の転写産物 E6 との相互作用、により不活化される。これらは頭頸部扁平上皮癌で最も一般的に認められる分子レベルでの変異である。*p53* 遺伝子変異は

予後不良因子と考えられているが、一方で HPV 感染は明らかな予後良好因子として確立されている。*p53* 遺伝子変異と HPV の感染には負の相関があることから、頭頸部扁平上皮癌において *p53* 遺伝子変異と予後の相関について検討する場合、HPV 感染の有無についても併せて検討する必要があるが、従来の報告にはそのようなものは無い。

(2) *p53* コドン 72 遺伝子多型

p53 遺伝子のコドン 72 では一塩基の変異によりアミノ酸がアルギニン (Arg) あるいはプロリン (Pro) となる遺伝子多型が認められ、結果的に Arg/Arg、Pro/Pro のホモ接合体、あるいは Arg/Pro のヘテロ接合体の個体が生じる。*p53* はその多型に応じて、アポトーシスや転写活性などの生物学的機能に変化が認められる。また、*p53* コドン 72 の遺伝子多型は種々の癌の発癌リスクに関与しているだけでなく、治療への反応性、予後へも関与していることが示唆されている。頭頸部扁平上皮癌に対する化学放射線同時併用療法において、*p53* コドン 72 遺伝子多型が治療への反応性や予後と相関するか否かは未だ検討されていない。

(3) PET パラメーター

我々は下咽頭癌において化学放射線同時併用療法前の原発巣の SUVmax は予後因子とならないが、化学放射線同時併用療法後の SUVmax は予後因子となることを報告したが、同様の報告は他にも多く見られる。しかし、重要なのは治療後ではなく治療前に予後を予測することであり、これが可能であれば一次治療を化学放射線同時併用療法と手術+術後(化学)放射線療法に振り分ける個別化治療が可能となる。また、SUV は体重など様々な因子により影響を強く受けるため、普遍的な因子とはなり難い。一方、腫瘍体積 (gross tumor volume, GTV) が放射線感受性と負の相関を示すことは古典的事実であるが、頭頸部領域においては喉頭を含む解剖学的特性により GTV の再現性は非常に低い。そこで、PET により測定可能な代謝活性が高い部分の腫瘍体積 (metabolic tumor volume, MTV) が放射線感受性と負の相関を示し、予後因子となる可能性について期待がもたれる。

2. 研究の目的

低用量のシスプラチンとドセタキセルの 2 剤を毎週投与する化学放射線同時併用療法

の第 II 相臨床試験で加療する頭頸部扁平上皮癌について、*p53* コドン 72 遺伝子多型、*p53* 遺伝子変異、HPV 感染、治療前原発巣の SUVmax、SUVmean、MTV が予後因子となるか否か前向きに検討する。

3. 研究の方法

(1) *p53* コドン 72 遺伝子多型の解析

① 原発巣の生検組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本から腫瘍 DNA を抽出する。尚、今回は末梢血リンパ球からの正常 DNA 抽出は行わなかった。
② exon4 に特異的な primer を用いて PCR 後に direct sequencing を行い、Arg/Arg、Arg/Pro、Pro/Pro の何れの遺伝子型であるか決定する

(2) *p53* 遺伝子変異の検出

① 原発巣の生検組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本から腫瘍 DNA を抽出する
② exon4 から exon8 に対してそれぞれ特異的な primer を用いて PCR を行う。
③ PCR 産物を direct sequencing して変異の有無を決定し、disruptive 変異と non-disruptive 変異に分類する。

(3) HPV の検出

① 原発巣の生検組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本から腫瘍 DNA を抽出する。
② HPV の E6-E7 遺伝子対して特異的な primer を用いて PCR を行う。
③ PCR 産物が認められ感染が確認された症例については、E2-E6 遺伝子に対する real-time PCR を行い、ウイルスが腫瘍細胞のゲノムに組み込まれているかどうか確認する。

(4) PET-CT による原発巣の生物学的活性の解析

治療前 PET-CT で原発巣の volume of interest (VOI) を設定し、SUV 閾値 = 2.5 として SUVmax、SUVmean、MTV を算出する。

(5) 統計学的解析

① cut-off 値の決定: SUVmax、SUVmean、MTV について receiver operating characteristic (ROC) 解析を行い、感度+特異度が最高値となるように cut-off 値を設定する。
② *p53* コドン 72 遺伝子多型、*p53* 遺伝子変異、HPV 感染、治療前原発巣の SUVmax、SUVmean、MTV、T 分類、N 分類、病期について Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行い、有用な予後因子を同定する。

③同定した有用な予後因子について粗生存率をKaplan-Meier法で解析し、有意差検定をLog rank検定により行う。喉頭癌あるいは下咽頭癌については喉頭温生存率についても検討する。

4. 研究成果

(1) p53遺伝子変異とHPV

HPV感染は中咽頭癌に特異的に認め、その殆どは16型であった。HPV感染例では非感染例に比べ、p53遺伝子変異は稀であり、disruptive変異は全く認めなかった。即ち、HPV感染とp53遺伝子変異、特にdisruptive変異には有意な負の相関を認めた。

(2) 多変量解析による予後因子の同定

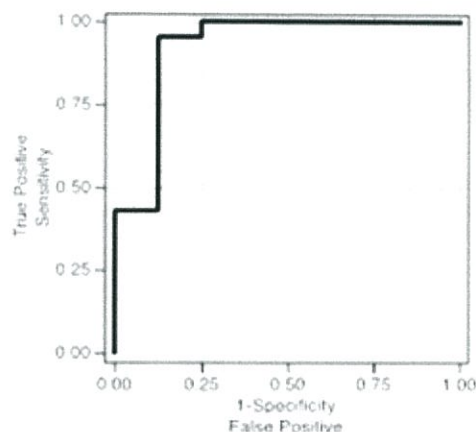
頭頸部癌は病因論上ヘテロな集団であり、部位別に検討を行う方が望ましい。また、化学放射線同時併用療法後の再発はほぼ全例が治療後3年以内に発生するため、生存率については生存例の観察期間の中央値が3年に達した時点で検討を行うことが望ましい。従って、本稿では中間解析の結果を示すことになる。

①中咽頭癌においては、FDGの生理的集積部位であることからPETパラメーターの有用性は低い、HPVが予後良好因子である可能性が示された。

②下咽頭癌においては、p53コドン72遺伝子多型、p53遺伝子変異、HPV感染、治療前原発巣のSUV_{max}/SUV_{mean}、T分類、N分類、病期は予後因子とならなかったが、MTVは極めて有用な独立した予後因子であった。以下、下咽頭癌におけるPETパラメーターの中間解析結果を示す。

(3) 下咽頭癌におけるMTVの有用性

①ROC解析によるcut off値の決定：下図に示す如く、化学放射線同時併用療法10週後におけるRECIST評価のCRを予測するROC解析を行ったところ、area under curve (AUC)=0.91でcut off値は31.7mlと決定された。同様にSUV_{max}、SUV_{mean}におけるAUC/cut off値はそれぞれ0.71/10.8、0.82/5.10とAUCはMTVにおいて有意に高値であった。



②局所一次治療効果の予測診断精度：clinical CRの診断能を表に示すが、MTVが最も有用であった。低MTV群では21例中20例がCRであるのに対し、高MTV群ではCRは8例中1例のみであった。

| | SUV _{max} | SUV _{mean} | MTV |
|---------|--------------------|---------------------|------|
| cut off | 10.8 | 5.10 | 31.7 |
| AUC | 0.71 | 0.82 | 0.91 |
| 感度 | 71% | 95% | 95% |
| 特異度 | 75% | 62% | 87% |
| 正確度 | 72% | 86% | 93% |
| 陽性的中率 | 88% | 86% | 95% |
| 陰性的中率 | 50% | 83% | 87% |

③粗生存率：多変量解析の結果、MTVが唯一の独立した予後因子であり、高MTV例は低MTV例に比べ死亡リスクが7.65倍であった。また、2年粗生存率は低MTV群では84%であり、高MTV群の0%に比べ有意に良好であった。

| 因子 | レベル | ハザード比 (95%信頼区間) | P値 |
|---------------------|-----------------|--------------------|------|
| cT | T1-2 vs. T3-4 | 0.99 (0.32-3.08) | 1.00 |
| SUV _{max} | ≤10.8 vs. >10.8 | 0.45 (0.07-1.79) | 0.27 |
| SUV _{mean} | ≤5.10 vs. >5.10 | 1.25 (0.51-3.36) | 0.62 |
| MTV | ≤31.7 vs. >31.7 | 7.65 (1.89-60.46) | 0.01 |

④喉頭温生存率：多変量解析の結果、MTVが唯一の独立した予後因子であり、高MTV例は低MTV例に比べ喉頭摘出あるいは死亡のリスクが4.65倍であった。また、2年粗生存率

は低 MTV 群では 85%であり、高 MTV 群の 0%に比べ有意に良好であった。同時にこれは低 MTV 群では生存例の全例で喉頭が温存されていることを意味する。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 猪原秀典、頭頸部診療癌における PET の有用性、第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会ランチョンセミナー1、2011.5.10、新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪原 秀典 (INOHARA HIDENORI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00273657