

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 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591467

研究課題名（和文） 核内 γ H2AX 発現に基づく食道癌化学放射線療法の新たな感受性予測研究課題名（英文） A new method to predict sensitivity to cancer chemoradiotherapy based on nuclear γ H2AX expression

研究代表者

木村 祐輔 (KIMURA YUUSUKE)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：30364368

研究成果の概要（和文）：食道癌治療において放射線治療や化学療法は大きな役割を担っているが、各症例・各薬剤でその効果・有害事象は大きく異なっている。本研究では放射線治療、化学療法が治療の重要な役割を占める食道癌を対象に、化学放射線療法（Chemo Radio therapy；CRT）施行時の腫瘍細胞核内における DNA の二本鎖切断（Double-strand breaks：DSBs）状況を、ヒストン蛋白の一種である γ H2AX を指標として経時的・定量的に解析し、得られたデータと臨床効果との関連を検証することを目的とした。2010 年～2012 年にわたり、食道癌術前化学放射線療法施行例 10 例から、食道癌切除標本を採取し得た。現在、 γ H2AX 染色を施行終了し、臨床学的効果判定および組織学的効果判定との関連を検討中であり、本年度中に解析終了予定である。

研究成果の概要（英文）：

Radiotherapy and chemotherapy play the main roles in the treatment of esophageal cancer, but the effects and adverse events markedly vary among patients. In this study, the time-course of nuclear DNA double-strand breaks (DSBs) in tumor cells was quantitatively analyzed during chemoradiotherapy using a histone protein, γ H2AX, as an index in patients with esophageal cancer responding to radiotherapy and chemotherapy to investigate its association with the clinical effect. Esophageal cancer specimens were collected from 10 patients treated with preoperative chemoradiotherapy between 2010 and 2012. Staining and quantitative analysis of γ H2AX have now been completed, and the association of the analytical results with the judgments of the clinical and histological effects is being investigated. The analysis will be completed this year.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌・ γ H2AX・化学放射線療法・感受性予測

1. 研究開始当初の背景

食道癌の治療成績は、表在癌の発見頻度の増加や手術手技の進歩により向上してきた。しかしいまだに食道癌症例の多くは予後不良な進行癌が多くを占めており、その治療成績の向上は大きな課題となっている。本邦における食道癌手術例の5年生存率は、系統的3領域郭清の確立により50%を越えるまでになってきたが、微小転移の遺残などによる再発をコントロールするためには、化学療法や放射線療法などの集学的治療が不可欠である。日本臨床腫瘍グループ(JCOG)で行われた多施設共同研究9907の結果から、現在我が国では臨床病期II, III食道癌においては、シスプラチン(CDDP)と5-FUを用いた術前補助化学療法施行後の食道切除術が標準治療となりつつある。現在は、より一層の治療成績向上に向けて、術前治療に放射線治療を追加した新たな補助療法の開発が多方面から検討されている。

一方、食道癌が化学療法や放射線療法に反応しやすい特徴を有していることから、局所進行癌のみならず、臨床病期I~IIIまでの切除可能症例においても、CRTが従来の手術成績に匹敵するとの報告もなされ、外科治療が高度侵襲手術の一つであることと相まって治療選択肢として考慮される機会が増加している。しかしながら、CRTには副作用が少なからず認められ、時に重症化する場合もあり、また心肺機能を中心としての晩期毒性の報告も少なくない。治療成績では臨床病期II/III症例において約6割にCRが得られるとの報告もあるが、病変遺残例やCR後の局所再発例では追加治療が必要となる。このような場合には、外科治療が唯一の根治的治療であるが、CRT施行後には術後合併症発生割合が有意に増加することが指摘されており、その適応判断は慎重になされなければならない。以上のように食道癌治療においては、

モダリティーの異なる手術、化学療法、放射線療法それぞれが極めて重要であるが、いずれの治療法とも生体に対する侵襲性が決して低くはない。このため効果の少ない治療法を早期に回避し、他の治療法への移行を判断する際に、新たな治療効果予測法の確立は、食道癌の治療戦略上重要なポイントとなる。

2. 研究の目的【研究の目的】

(1) 本研究の第一段階では基礎的検討として、食道癌細胞株を用い放射線を照射してDNAに損傷を与え、DNA傷害作用の中でも特に重篤な傷害とされるDNA二本鎖切断(DSBs; double strand breaks)状況を解析する。DNAの損傷状況は、DSBsの修復指標とされる γ H2AXの発現により確認する(文献4,5)。更に放射線照射線量と γ H2AX発現状況の相関を解析し、 γ H2AXがDSBs程度を反映することを確認する。

(2) 次に、実際の食道癌にたいする化学放射線療法施行症例において、治療経過中に行う内視鏡検査の際に採取する生検標本を用いて、細胞核内の γ H2AX発現状況を確認する。

(3) 最終的には、(2)で得られたデータと実際の臨床効果を比較し、治療早期の腫瘍細胞内の γ H2AX発現状況が化学放射線療法の治療効果の予測因子となりうるか検証する。

3. 研究の方法

(1) 食道癌細胞株を用いた放射線照射による γ H2AX発現効果の検証

当科で現有する食道癌細胞株TE1, 2, 3, 4の4株を対象として、放射線を照射(0, 1, 2, 4Gy)に対するDNA二本鎖切断状況を、 γ H2AXをindicatorとして定量的に解析し、細胞株

による発現量の相違、および照射線量と γ H2AX 発現程度の相関について解析する。

(2) 臨床検体を用いた γ H2AX 発現と臨床効果の検証

当科では、年間約 70 例の食道癌患者の治療にあたっており、そのうち局所進行食道癌症例を中心に約 15 例に対し根治的 CRT を行ってきた。本研究においては、これら CRT 患者群から腫瘍組織を採取し、 γ H2AX の発現量を定量する。得られたデータと最終的に確認された臨床効果との相関を解析する。

〈対象〉

本研究における対象症例は、局所進行食道癌にて、根治的放射線療法（照射線量 50Gy 以上、併用化学療法として CDDP および 5-FU）を施行する症例を対象と設定した。平成 23 及び 24 年の 2 年間に登録目標症例 20 例とする。

〈検体採取〉

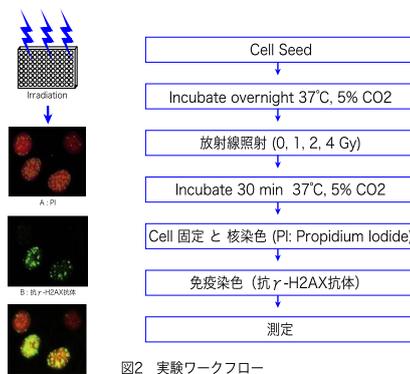
CRT 治療前、治療開始後 10Gy の照射終了時、治療終了 4 週間経過時の計 3 ポイントに内視鏡下に腫瘍組織を採取する（図 3）。この中で最も重要なポイントは治療効果予測につながる治療開始早期の 10Gy 終了時点である。治療後半期は放射線性の食道炎が生じており、内視鏡検査は困難なことが多いため、検体採取ポイントには加えない。採取した検体は、凍結切片作成用包埋剤（Tissue-Tek）を用い、液体窒素により凍結し-80℃のフリーザーに保存する。

〈 γ H2AX 定量〉

10 μ m の凍結切片を作成し、抗 γ H2AX 抗体を用いた ABC 法により免疫染色を行う。

得られたサンプルにおける γ H2AX 発現量はフローサイトメトリーを用い定量的に測定する。

〈 γ H2AX 発現と臨床効果の比較〉



腫瘍縮小効果判定は Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST criteria) に従う。得られた効果判定と各ポイントにおける γ H2AX 発現量との相関を統計学的に解析する。

CRT 施行後に手術治療 (Salvage surgery) を施行した症例においては、組織学的治療効果判定との相関も合わせて解析する。

特に、治療開始早期の生検検体における γ H2AX 発現量と治療効果との間に、有意な相関が認められるか否かが検証の最重要ポイントとなる。

4. 研究成果

2010 年～2012 年にわたり、食道癌術前化学放射線療法施行例 10 例から、食道癌切除標本を採取し得た。現在、 γ H2AX 染色を施行終了し、 γ H2AX 発現量の定量化を施行中である。今後、臨床学的効果判定および組織学的効果判定との関連を検討中であり、本年度中に解析終了予定である。

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 11 件)

- ① Ishida K, Nishizuka S, Chiba T, Ikeda M, Kume K, Endo F, Katagiri H, Matsuo T, Noda H, Iwaya T, Yamada N, Fujiwara H, Takahashi M, Itabashi T, Uesugi N, Maesawa C, Tamura G, Sugai T, Otsuka K, Koeda K, Wakabayashi G. Molecular Marker Identification for Relapse Prediction in 5-FU-Based Adjuvant Chemotherapy in Gastric and Colorectal Cancers. PLoS ONE 7(8) e43236 2012. (査読有)
- ② 鴻巣正史, 木村祐輔, 岩谷 岳, 秋山有史, 藤原久貴, 遠藤史隆, 杉立 彰夫, 西塚 哲, 新田浩幸, 大塚幸喜, 柏葉匡寛, 肥田圭介, 佐々木章, 水野大, 若林 剛. 食道癌気道瘻に対する食道ステント挿入術の検討. 癌と化学療法 39 巻 12 号 p1849~1851 2012 年(査読有)
- ③ 鴻巣 正史, 木村 祐輔, 岩谷 岳, 秋山有二, 藤原 久貴, 西塚 哲, 新田 浩幸, 大塚幸喜, 肥田 圭介, 佐々木 章, 水野大, 若林 剛. 食道癌根治切除術後における SSI の検討. 日本外科感染症学会雑誌 9 巻 5 号 2012 年 (査読有)
- ④ 鴻巣 正史, 木村 祐輔, 岩谷 岳, 秋山有二, 藤原 久貴, 西塚 哲, 新田 浩幸,

大塚幸喜, 肥田 圭介, 佐々木 章, 水野 大, 若林 剛. 食道癌根治切除術後における SSI の検討. 日本外科感染症学会雑誌 9 巻 5 号 2012 年(査読有)

- ⑤ 鴻巣正史, 木村祐輔, 岩谷 岳, 秋山有史, 肥田圭介, 佐々木章, 水野 大, 上杉憲幸, 菅井 有, 若林 剛. 腹臥位胸腔鏡下食道切除術を施行した食道 gastrointestinal stromal tumor の 1 例. 岩手医学雑誌 64 巻 1 号 p51~56, 2012 年 (査読有)
- ⑥ Nishizuka S. Reverse-Phase Protein Lysate Microarray (RPA) for the Experimental Validation of Quantitative Protein Network Models. Methods Mol Biol. 65~77. 2011. (査読有)
- ⑦ 木村祐輔, 岩谷 岳, 野田芳範, 鴻巣正史, 西塚 哲, 肥田圭介, 大塚幸喜, 新田浩幸, 柏葉匡寛, 佐々木章, 水野 大, 若林 剛. 食道癌に対する外科治療の適応と限界. 外科治療 105 巻 4 号 383~390 ページ 2011 年(査読無)
- ⑧ 木村聡元, 岩谷 岳, 木村祐輔, 野田芳範, 御供真吾, 高橋正統, 肥田圭介, 佐々木 章, 上杉憲幸, 若林 剛. アカシア術後に発生した食道癌の 2 例. 岩手医学雑誌 63 巻 1 号 57~62 ページ 2011 年(査読有)
- ⑨ Sasaki A, Nitta H, Otsuka K, Kimura Y, Obuchi T, Wakabayashi G. Concomitant laparoscopic splenectomy and cholecystectomy. Surgical Laparoscopy, Endoscopy & Percutaneous Techniques 20(2) p66~68 2010. (査読有)
- ⑩ Takeshi Chiba, Yusuke Kimura, Hiroaki Takahashi, Tomohiko Tairabune, Yoshiaki Nagasawa, Kaoru Mori, Yuji Yonezawa, Atsuko Sugawara, Sachiko Kawaguchi, Hidenobu Kawamura, Satoshi Nishizuka, Kenzo Kudo, Kunihiro Fujiwara, Kenichiro Ikeda, Go Wakabayashi, Katsuo Takahashi. Influence of body fat in cancer patients on residual content of used fentanyl matrix patches. Palliat Care Research 5(2). 206-212, 2010. (査読有)
- ⑪ 杉立彰夫, 木村祐輔, 板橋哲也, 池田みゆき, 石田 和茂, 野田宏伸, 松尾鉄平, 西塚 哲, 大塚幸喜, 肥田圭介, 佐藤綾

子, 高橋智輝, 若林 剛. シスプラチン剤形変更による抗癌効果. 癌と化学療法 37 巻 12 号 2274~2276 ページ 2010 年 (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

- ① 木村祐輔, 岩谷 岳, 秋山有史, 鴻巣正史, 遠藤史隆, 藤原久貴, 西塚 哲, 新田浩幸, 大塚幸喜, 柏葉匡寛, 肥田圭介, 佐々木章, 水野 大, 若林 剛. 食道癌根治化学放射線療法後の Salvage surgery の治療成績. 第 74 回日本臨床外科学会 2012 年 12 月 1 日、東京
- ② 木村祐輔, 岩谷 岳, 秋山有史, 鴻巣正史, 遠藤史隆, 藤原久貴, 西塚 哲, 新田浩幸, 大塚幸喜, 柏葉匡寛, 肥田圭介, 佐々木 章, 水野 大, 若林 剛. 食道癌に対する根治的放射線化学療法後の salvage lymphadenectomy. 第 65 回日本胸部外科学会 2012 年 10 月 18 日、福岡
- ③ 木村祐輔, 岩谷 岳, 秋山有史, 鴻巣正史, 肥田圭介, 新田浩幸, 大塚幸喜, 佐々木章, 水野 大, 若林 剛. 食道癌根治術における再建術の工夫と治療成績. 第 66 回 日本食道学会学術集会 2012 年 6 月 21 日、長野
- ④ 秋山有史, 木村祐輔, 岩谷 岳, 鴻巣正史, 藤原久貴, 肥田圭介, 西塚 哲, 佐々木 章, 水野 大, 若林 剛. 局所進行食道癌に対する DCF 療法の治療成績. 第 66 回 日本食道学会学術集会 2012 年 2012 年 6 月 21 日、長野
- ⑤ 鴻巣正史, 木村祐輔, 岩谷岳, 秋山有史, 藤原久貴, 新田浩幸, 大塚幸喜, 肥田圭介, 佐々木 章, 若林 剛. 食道内穿破を来した食道気管支嚢胞に対して待機的に胸腔鏡下食道切除術を施行した 1 例. 第 66 回 日本食道学会学術集会 2012 年 2012 年 6 月 21 日、長野
- ⑥ Koeda K, Fujiwara H, Watanabe Y, Nishinari Y, Nishizuka S, Kimura Y, Nitta H, Otsuka K, Mizuno M, Sasaki A, Wakabayashi G. EVALUATION OF BIWEEKLY IRINOTECAN PLUS CISPLATIN AS A SECOND-OR THIRD-LINE CHEMOTHERAPY IN ADVANCED OR RECURRENT GASTRIC CANCER: A RETROSPECTIVE ANALYSIS. 10th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society (ACOS) 2012. 6. 15. Seoul.

- ⑦ 木村祐輔, 秋山有史, 鴻巣正史, 岩谷岳, 肥田圭介, 藤原久貴, 遠藤史隆, 西塚 哲, 新田浩幸, 大塚幸喜, 柏葉匡寛, 佐々木 章, 水野 大, 若林 剛. 高齢者食道癌における手術成績. 第 112 回日本外科学会 2012 年 4 月 13 日、千葉
- ⑧ 西塚 哲, 久米浩平, 池田みゆき, 遠藤史隆, 片桐弘勝, 小笠原聡, 木村祐輔, 大塚幸喜, 新田浩幸, 柏葉匡寛, 肥田圭介, 佐々木章, 水野 大, 若林 剛. コロニー形成法による薬剤抵抗性細胞集団の分子プロファイル. 第 112 回日本外科学会 2012 年 2012 年 4 月 13 日、千葉
- ⑨ 大塚幸喜, 板橋哲也, 加藤久仁之, 木村聡元, 箱崎将規, 藤澤健太郎, 秋山有史, 藤井大和, 吉田雅一, 藤井仁志, 八重樫瑞典, 細井信之, 西塚 哲, 木村祐輔, 新田浩幸, 肥田圭介, 水野 大, 佐々木章, 若林 剛, 腹腔鏡下大腸癌手術の標準化を目指した audio visual education. 第 112 回日本外科学会 2012 年 2012 年 4 月 13 日、千葉
- ⑩ 佐々木章, 大淵 徹, 馬場誠朗, 梅邑晃, 木村祐輔, 西塚 哲, 新田 浩幸, 大塚幸喜, 肥田圭介, 水野 大, 若林 剛. 高度肥満症に対する腹腔鏡下スリーブ状胃切除術の短期・中期成績. 第 112 回日本外科学会 2012 年 2012 年 4 月 13 日、千葉
- ⑪ 藤原久貴, 肥田圭介, 高橋正統, 千葉丈広, 西成 悠, 渡辺陽太郎, 木村祐輔, 大塚幸喜, 新田浩幸, 柏葉匡寛, 佐々木章, 水野 大, 若林 剛. 当科における腹腔鏡下胃全摘術の短期成績の検討. 第 112 回日本外科学会 2012 年 2012 年 4 月 13 日、千葉
- ⑫ 梅邑 晃, 須藤隆之, 御供真吾, 藤田倫寛, 武田大樹, 新田浩幸, 佐々木 章, 肥田圭介, 大塚幸喜, 木村祐輔, 若林 剛. 臍頭十二指腸切除術における no stent 法による臍空腸吻合施行症例の検討. 第 112 回日本外科学会 2012 年 2012 年 4 月 13 日、千葉
- ⑬ 高原武志, 新田浩幸, 長谷川康, 伊藤直子, 高橋正浩, 西塚 哲, 木村祐輔, 大塚幸喜, 肥田圭介, 佐々木 章, 水野大, 若林 剛. 当科における進行胆道癌の治療成績. 第 112 回日本外科学会 2012 年 2012 年 2012 年 4 月 12 日、千葉
- ⑭ 西塚 哲, 久米浩平, 池田みゆき, 遠藤史隆, 片桐弘勝, 小笠原 聡, 木村祐輔, 大塚幸喜, 新田浩幸, 柏 匡寛, 肥田圭介, 佐々木 章, 水野 大, 若林 剛. 薬剤抵抗性細胞集団の癌幹細胞マーカーによる分子プロファイル. 第 14 回 外科分子細胞治療研究会 2012 年 4 月 12 日、千葉
- ⑮ 板橋哲也, 大塚幸喜, 加藤久仁之, 木村聡元, 藤澤健太郎, 木村祐輔, 新田浩幸, 柏葉匡寛, 肥田圭介, 佐々木章, 若林 剛. 一時的な小腸人工肛門の検討. 第 112 回日本外科学会 2012 年 4 月 12 日、千葉
- ⑯ 鴻巣正史, 木村祐輔, 秋山有史, 岩谷岳, 西塚 哲, 新田浩幸, 大塚幸喜, 柏葉匡寛, 肥田圭介, 佐々木 章, 水野 大, 若林 剛. 食道癌気道瘻に対する食道ステント挿入術の検討 第 48 回 日本腹部救急医学会 2012 年 3 月 14 日、金沢

〔図書〕(計 1 件)

木村祐輔、若林 剛監修、佐々木章編集、医学書院、ステップアップ 内視鏡外科手術。東京 28 腹臥位胸腔鏡下食道切除術

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村祐輔 (KIMURA YUUSUKE)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：30364368

(2) 研究分担者

若林 剛 (WAKABAYASHI GOU)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：50175064

研究分担者

西塚 哲 (NISHIDUKA SATOSHI)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：50453311