

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10000

研究課題名(和文) 臨床応用が可能な実用的な放射線感受性予測法の開発

研究課題名(英文) Development of methods predicting radiosensitivity that can be clinically applied

研究代表者

坂田 耕一 (Sakata, Koh-ichi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：10235153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：汎用性のある実用的な放射線感受性予測法を開発して、癌細胞の生物学的特性に応じた個別化した放射線治療を実現することを目的とした。具体的には、子宮頸癌と前立腺癌で、生検標本を用いて腫瘍細胞のDNA2重鎖切断修復に関与する蛋白発現と放射線治療成績の相関性を解析し、治療効果の予測因子となりうるかを検討した。子宮頸癌ではKu86やXRCC4の発現率が、放射線治療効果の予測因子であった。前立腺癌では、Ku70の前立腺癌細胞における発現は、臨床因子と独立した予後因子であり、実臨床で使用されている予後因子に加えると、放射線治療後の再発を高精度で予測できることを示した。

研究成果の概要(英文)：We developed a practical method for predicting radiosensitivity to realize individualized radiotherapy according to the biological characteristics of cancer cells. In uterine cervical cancer and prostate cancer, the correlation between expression proteins involved in repair of DNA double-strand breaks of tumor cells by biopsy specimens and radiotherapy results is analyzed, which is a predictive factor of therapeutic effect. In uterine cervical cancer, the expression rates of Ku 86 and XRCC 4 were predictors of the radiotherapeutic effect on cervical cancer. In prostate cancer, the expression of Ku70 in prostate cancer cells is a prognostic factor independent of clinical factors, and it has been shown that in addition to the prognostic factors presently used in clinical practice, recurrence after radiation treatment can be predicted with high accuracy.

研究分野：放射線腫瘍学、放射線生物学

キーワード：放射線感受性 予測法 免疫組織染色 DNA損傷修復関連蛋白

1. 研究開始当初の背景

現在は、放射線治療が施行される場合、腫瘍の大きさや組織型が同じであれば画一的な線量で治療されているが、より効果的に放射線治療を行うには、癌細胞の生物学的特性に応じた個別化した放射線治療が必要である。放射線治療効果の予測ができれば、放射線高感受性の患者には総線量低減を図ることで有害事象の軽減が可能となる。しかし、広く臨床に応用されるためには、非侵襲的であること、手技が簡便であること、結果を得るまでに時間を要さないこと、さらには cost benefit の点からも妥当性があることなどの条件を兼ね揃えた検査法であることが必要条件であるが、現在、これらを満たす放射線治療効果予測法が存在しない。

2. 研究の目的

これまで、我々の研究室では、生検組織の免疫組織染色に注目して研究を行ってきた。なぜなら、手技が簡便であること、結果を得るまでに時間を要さないこと、cost も他の方法に比べ安価であるからである。

放射線による細胞死では、DNA 損傷の一つである DNA 二重鎖切断が重要であり、その主な修復機構の一つに非相同末端結合がある。これに参与する蛋白として、XRCC4、DNA-PKcs、Ku70、Ku86、Ligase IV などがある。我々の研究室の現在までの成果として、食道癌、下咽頭癌患者の生検標本を用いて、DNA 2 重鎖切断修復能に参与する蛋白 (Ku70、Ku85、DNA-PKcs、XRCC4) の免疫組織染色を行い、その各サブユニットのうち一つでも発現が低い症例では、放射線感受性が高いことを発見した。

本研究の目的は、これらの研究成果を進展させ、広く臨床応用が可能な実用的な放射線感受性予測法を開発して、癌細胞の生物学的特性に応じた個別化した放射線治療を実現することである。具体的には、子宮頸癌と前立腺癌で、これらの蛋白発現の強度と放射線治療成績の相関性を解析し、治療効果の予測因子となりうるかを検討した。

3. 研究の方法

子宮頸癌と前立腺癌患者の生検サンプルを用いて、DNA 2 重鎖切断の非相同末端結合修復関連蛋白の抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、放射線治療成績との相関を検討した。

(子宮頸癌)

2000 年から 2011 年までに当院で子宮頸癌に対して術前放射線治療を施行した症例中、扁平上皮癌と診断された 119 例を対象とした。年齢中央値は 46 歳、FIGO 分類の Stage I 期は 46 例、II 期は 73 例で生存症例の観察期間中央値は 79 ヶ月であった。標本の腫瘍組織の中で最も強く染色される領域について、DNA 2 重鎖切断の非相同末端結合修復に参与する蛋白の発現率を算出した。術前放射線

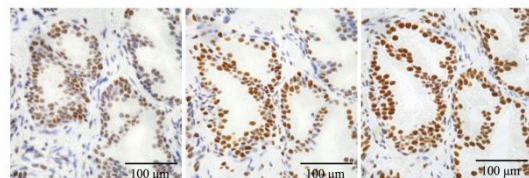
治療を施行された子宮頸癌患者の生検標本における DNA 二重鎖切断修復蛋白の発現と、1) 手術標本における術前放射線治療の病理学的効果、及び、2) 生存率などの治療成績との関係を解析した。

放射線治療は、外照射(全骨盤照射)が 114 例で施行され、投与線量中央値が 40Gy (23.4-50Gy)で、腔内照射使用は、7 例(外照射と併用 2 例、単独 5 例)で施行された。化学療法は、60 例でプラチナ製剤を放射線治療に同時併用された。広汎子宮全摘術が、放射線治療後 22 日(中央値)に施行された。

(前立腺癌)

当院にて、2007 年 8 月から 2010 年 10 月までの期間に強度変調放射線治療 (IMRT) を受けた前立腺癌患者の 58 例を探索群として解析し、2001 年 3 月から 2007 年 5 月までの期間に 3 次元放射線治療を受けた前立腺癌患者 42 例を検証群として解析した。放射線治療前の生検病理標本 (ホルマリン固定) を用いて、DNA2 重鎖切断の修復に参与する蛋白 (Ku70、Ku86、XRCC4) の抗体を用いて免疫組織染色を施行し、それぞれの蛋白の発現と再発率の相関関係について統計解析を行った。

前立腺癌細胞の免疫組織染色



Ku70 Ku86 XRCC4

4. 研究成果

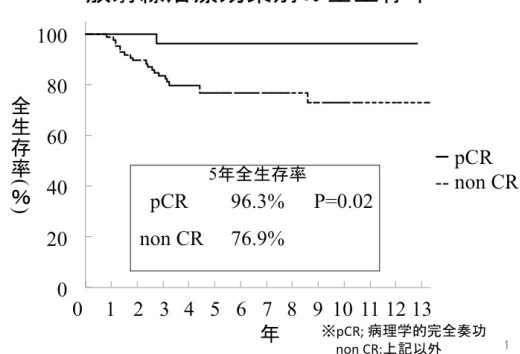
(子宮頸癌)

結果

生検検体での Ku86 と XRCC4 発現と放射線治療効果について ROC 曲線をもとに、Ku86 発現率のカットオフを 90%、XRCC4 発現率のカットオフ 82% に設定した。

Ku86 と XRCC4 発現率が両方ともカットオフ値以下であれば病理学的完全奏功率 (pCR) は 47.4%、それ以外では病理学的完全奏功率 (pCR) 率 21.3% であり、Ku86 と XRCC4 が両方とも低発現であれば有意に pCR 率が有意に高い結果であった。

放射線治療効果別の全生存率



pCR をエンドポイントとしてロジスティック回帰分析を行ったところ、ステージやリンパ節転移有無や化学療法の併用などの因子は有意差はなく、Ku86 と XRCC4 が両方とも低発現であることが多変量解析でも唯一の予測因子であった。病理学的完全奏功 (pCR) に至った群は全生存率が有意に良好であった。

病理学的完全奏功予測に対するロジスティック回帰分析

因子	β	オッズ比	95% 信頼区間	P 値
低Ku86 かつ低XRCC4	1.226	3.408	1.114-10.428	0.03
Stage (I vs. II)	0.634	1.885	0.665-5.348	0.23
骨盤内リンパ節転移	0.618	1.854	0.631-5.445	0.26
同時化学放射線治療	0.548	1.729	0.628-4.759	0.29
外照射線量 (<40Gy vs. >=40Gy)	0.125	1.133	0.355-3.612	0.83
照射後から手術までの期間 (<22 日 vs. >=22 日)	0.099	1.105	0.380-3.208	0.86

考察

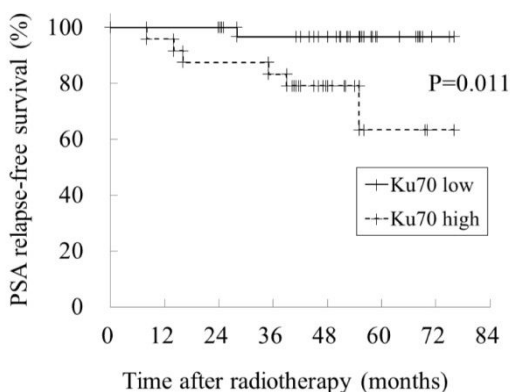
DNA 二重鎖切断修復機構に関わる Ku86 や XRCC4 が低発現では放射線治療による腫瘍細胞の修復力が低く放射線感受性が高い可能性がある。放射線感受性が生検検体により事前に予測することができれば、高感受性の腫瘍に対しては総線量低減を図ることで直腸炎や膀胱炎といった有害事象低減につながる可能性がある。逆に低感受性であれば線量増加、手術と放射線治療を組み合わせる集学的治療を積極的に勧めることで予後の改善に寄与できる可能性がある。

(前立腺癌)

結果

Ku70 の発現は様々な臨床所見(放射線治療前の PSA 値、グリソンスコア、D'Amico リスク分類)と相関がなく、独立した予測因子であった。放射線治療後の再発の予測能は、グリソンスコア単独と比較して、グリソンスコ

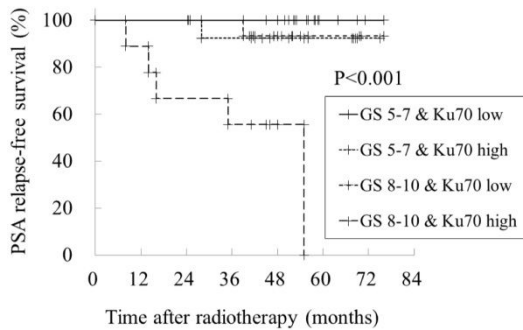
Ku70発現とPSA無再発生存率



アに Ku70 発現を組み合わせると有意に、著明に上昇した。放射線治療とホルモン治療を併用した患者において、グリソンスコア 7 以下または Ku70 低発現の患者では再発は一例も認めなかった。一方で、グリソンスコア 8 以上かつ Ku70 高発現の患者では高い再発率

を示した。検証群でも同様の結果を得た。

Ku70発現、グリソンスコア (GS)とPSA無再発生存率



76Gy の放射線治療とホルモン療法はグリソンスコア 7 以下または Ku70 低発現の患者においては効果的な治療方法であるが、グリソンスコア 8 以上かつ Ku70 高発現の患者においては十分ではなく、他の治療アプローチを必要とすることを示唆した。

考察及び結語

前立腺癌の治療方針(手術、放射線治療、ホルモン療法、及び、それらの組み合わせ)は、T stage、病理組織の悪性度分類であるグリソンスコア、腫瘍マーカーである PSA 値によって決定されている。現在のこの方法では放射線治療後の前立腺癌の局所再発の予測の精度が十分ではない。そこで、放射線治療後の局所再発の可能予測能の向上に寄与する、新たな生物学的指標が必要である。本研究では、X 線による DNA2 重鎖切断の修復に関与する蛋白である Ku70 の前立腺癌細胞における発現は、臨床因子と独立した予後因子であり、実臨床で使用されている予後因子に加えると、放射線治療後の再発を高精度で予測できるを示した。DNA2 重鎖切断の修復蛋白である Ku70 の発現が生物学的指標となりうると考えられる。

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4件)

Someya M, Hasegawa T, Hori M, Matsumoto Y, Nakata K, Masumori N and Sakata K I. Local tumor control and DNA-PK activity of peripheral blood lymphocytes in prostate cancer patients receiving radiotherapy. J Radiat Res, 2017 Mar 1;58 (2):225-231. 査読有 DOI: 10.1093/jrr/rrw099

Hasegawa T, Someya M, Hori M, Matsumoto Y, Nakata K1, Nojima M, Kitagawa M, Tsuchiya T, Masumori N, Hasegawa T, Sakata KI. Expression of Ku70 predicts results of radiotherapy in prostate cancer. Strahlenther Onkol. 2017;193:29-37. 査読有 DOI: 10.1007/s00066-016-1023-7

Hori M, Someya M, Matsumoto Y, Nakata K, Kitagawa M, Hasegawa T, Tsuchiya T, Fukushima Y, Gocho T, Sato Y, Ohnuma H, Kato J, Sugita S, Hasegawa T, Sakata KI. Influence of XRCC4 expression in esophageal cancer cells on the response to radiotherapy. Med Mol Morphol, 2016; 50;1:25-33. 査読有 DOI: 10.1007/s00795-016-0144-5

TAKADA Y, Someya M, Matsumoto Y, Satoh M, Nakata K, Hori M, Saitoh M, Hirokawa N, Tateoka K, Teramoto M, Saitoh T, Hasegawa T, and SAKATA KI. Influence of Ku86 and XRCC4 expression in uterine cervical cancer on the response to preoperative radiotherapy. Med Mol Morphol, 2016;49;4:210-216. 査読有 DOI: 10.1007/s00795-016-0136-5

〔学会発表〕(計6件)

土屋高旭, 高田優, 染谷正則, 中田健生, 堀正和, 北川未央, 長谷川智一, 福島悠希, 廣橋良彦, 鳥越俊彦, 坂田耕一. 子宮頸癌における免疫関連蛋白の発現による予後予測. 日本放射線腫瘍学会第30回学術大会. 2017年11月18日. 「ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)」

北川未央, 三神俊彦, 土屋高旭, 長谷川智一, 堀正和, 中田健生, 染谷正則, 浅石和昭, 坂田耕一. 乳房温存術後照射後の乳房内再発における予後予測因子の検討. 本放射線腫瘍学会第30回学術大会. 2017年11月18日. 「ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)」

福島悠希, 染谷正則, 中田健生, 堀正和, 北川未央, 土屋高旭, 後町俊夫, 坂田耕一. 中咽頭癌腫瘍細胞におけるヒトパピロームウイルス感染とXRCC4の発現の関連性. 日本放射線腫瘍学会第29回学術大会. 2016年11月27日. 「国立京都国際会館(京都府・京都市)」

福島悠希, 染谷正則, 中田健生, 堀正和, 北川未央, 土屋高旭, 長谷川智一, 後町俊夫, 松本健一, 坂田耕一. 中咽頭癌の治療成績ならびにHPV感染と免疫染色の関連性. 第135回日本医学放射線学会 北日本地方会. 2016年10月28日. 「良陵会館(宮城県・仙台市)」

Sakata K, Hori M, Someya M, Nakata K, Hasegawa T, Matsumoto Y. XRCC4 Overexpression Predicts Poor Prognosis of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma Treated with Radiation Therapy. ICR R2015. 2015年5月25-29日. 「国立京都国際会館(京都府・京都市)」

坂田耕一, 林潤一, 染谷正則, 松本義久, 中田健生, 堀正和. 下咽頭癌におけるKuおよびXRCC4発現と放射線化学療法における治療成績の関係. 第74回日本医学放射線学会総会. 2015年4月18日. 「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 耕一 (SAKATA, Kohichi)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10235152

(2) 研究分担者

北川 未央 (KITAGAWA, Mio)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 30608922

土屋 高旭 (TSUCHIYA, Takaaki)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 90631169

福島 悠希 (FUKUSHIMA, Yuki)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 90631169

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者