

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591852

研究課題名(和文) 乳がん放射線治療に伴うBOOP発症に関わる遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of SNPs associated with radiation induced BOOP

研究代表者

磯村 実 (Isomura, Minoru)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：40272497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、乳がん放射線治療における有害事象として照射後に起きるBOOP(閉塞性細気管支炎性器質化肺炎)発症に関連するSNPの同定を目指した。乳がん術後放射線治療を受けた患者1225名のうち16名(発生頻度1.4%)がBOOPを発症した。次に、解析の対象とする遺伝子を絞り込むために、有害事象として放射線性皮膚炎を示した患者を用いたゲノムワイドSNP解析を行った。約100万箇所のSNPのタイピングを行った。その結果、p値が $10^{-5}$ 以下を示すSNPが8個、 $1 \times 10^{-4}$ 以下のSNPが29個同定することができた。これらのSNPがBOOPをはじめとする放射線治療の有害事象と関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Objective of this study is to identify genes and/or genetic polymorphism associated with the BOOP (bronchiolitis obliterans organizing pneumonia) that occurs after radiation therapy of the breast cancer, and aims to elucidate the mechanism of BOOP as an adverse effect of irradiation therapy. Medical histories of 1,225 patients who received radiation therapy of breast cancer, were investigated. Among them, 16 patients (1.6%) developed BOOP. To narrow down candidate genes for BOOP, genome wide association study was performed using patient's DNA who developed dermatitis after radiation therapy. Approximately 1 million SNP were genotyped. As a result, 8 SNPs and 29 SNPs showed strong association with radiation dermatitis with p value less than  $1 \times 10^{-5}$  or  $1 \times 10^{-4}$ , respectively. These results suggested that these SNP was related to adverse effects of radiation therapy, including BOOP.

研究分野：放射線科学

科研費の分科・細目：放射線治療学

キーワード：遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

癌の治療において、放射線療法は外科的療法と化学療法と並ぶ三つの大きな柱の一つとなっている。現在では放射線治療技術の高度化が進み、治療対象となる癌組織に対し高精度に照射を行うことが可能となり、非浸潤的な治療法として、がん治療における需要は増加の一途をたどっている。

放射線による治療が効果的であるがんの一つに乳がんがある。乳がんの罹患率は年々増加してきており現在では女性のがんの一位を占めるようになってきている。近年手術療法において乳房温存術が選択される割合が増加している。この乳房温存術後に放射線治療(BCT)を行うことにより、乳房内再発率が低下することが種々のランダム化比較試験やそれらのメタ解析において示されている。また、乳房切除術後の放射線治療(PMRT)においても、胸壁再発や遠隔転移を押さえることにより生存率の向上に寄与することが示されている。このように乳がんの治療において放射線治療の果たす役割は益々大きくなってきており、より効果的かつ有害事象のない放射線治療法の開発が望まれている。

臨床上問題となる有害事象として、我々は照射後に発症する肺臓に注目している。ここで問題とする肺炎とは、照射部位とは一致せず、時には照射とは対側の肺に生ずるBOOP(Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia: 閉塞性細気管支炎性器質化肺炎)である。乳がん術後照射後一年以内に約1~2%の患者に認められる。主な症状としては咳嗽・発熱・倦怠感であり、抗生剤による治療により多くの症例は治癒するが、ステロイドが必要な症例もある。しかも発症から治癒までの数ヶ月間は咳嗽や倦怠感が強く、QOLの低下は著しい。またホルモン治療の中断を余儀なくされるケースもあり、乳がん治療への影響は大きい。このように照射後のBOOPは、低毒性を目指す放射線治療において見逃すことができない有害事象である。しかし、放射線照射後のBOOP発症に関連する因子は同定されておらず、発症の予測はできないのが現状である。

これまでに我々は、患者個人の遺伝的因子すなわちSNPの違いと、放射線による有害事象発症とが関連していることが明らかとしてきた。このことから、放射線照射後のBOOPについても、発症者と非発症者患者についてSNP解析を行うことにより、発症に関連する遺伝的因子の同定が可能であり、更にはBOOP発症の予測が可能になると着想し、本研究を計画するに至った。

癌研究会有明病院において、2005年3

月から2009年9月までに乳がん術後放射線治療を受けた患者1,225名のうち、BOOPを発症した患者16名(発生頻度1.4%)について調査をすすめている。しかしBOOP発症者に特徴的な臨床的背景の発見にはいたっていない。

## 2. 研究の目的

本研究ではSNP(一塩基多型)解析を行い、BOOP発症に関連する遺伝子や遺伝子多型を同定し、BOOP発症メカニズムの解明を目指す

## 3. 研究の方法

### (1) BOOP発症者と非発症者からのDNAサンプルの収集

#### 研究対象

本研究では、癌研究会有明病院放射線治療部にて放射線治療を行う患者を対象として症例の収集を行う。対象とする患者は、以下のクライテリアを満たした患者とした。

当院にて手術を施行(BCTとPMRTのいずれも対象とする)

過去に胸部への照射歴がない

照射後1年以内に肺や心臓への手術がない

#### BOOP発症症例のピックアップ

放射線治療後のBOOP発症については以下の基準を用いて診断した。

照射後12ヶ月以内の発症

全身または呼吸器症状が2週間以上継続

照射野外の浸潤影が存在する

その他の要因がない

照射後のBOOP発症の割合は1~3%との報告がある。加えて、症例の臨床情報や治療情報の収集を行う。収集した情報は匿名化を行い、癌研究所内のデータベースに移動し、以後の解析に用いた。

#### 非発症症例のピックアップ

また、対照とするBOOP非発症者サンプルの収集を行った。収集に当たっては非発症者の中からランダムにピックアップする。加えて、症例の臨床情報や治療情報の収集を行う。収集した情報は匿名化を行い、癌研究所内のデータベースに移動し、以後の解析に用いた。

#### BOOP発症症例、非発症症例からのゲノムDNA収集

ピックアップされたBOOP発症患者、非発

症患者について、研究についての十分な説明を行った。その上で文書による同意が得られた患者より、末梢血を採取する。癌研有明病院にて血液サンプルの匿名化を行った後、DNAの抽出を行った。DNAの抽出にはQiagenのDNA抽出キットを用いた。抽出されたDNAサンプルは匿名化された状態で、癌研究所に移動し、保管した。なお、サンプルや臨床情報の匿名化にあたっては、癌研有明病院にて既に運用中であるSCTS21システムを用いた。

## (2) SNP ジェノタイピング

解析の対象とする遺伝子としてKEGGデータベースにおいてDNA repairに関連する5個のパスウェイ(hsa03420, hsa03410, hsa03430, hsa03440, hsa04115)に含まれる遺伝子316個を選び、それぞれの遺伝子についてHapMapのデータをもとに、tagSNPの抽出を行った。また、ゲノム全体のSNPジェノタイプを行うためにAffymetrix社製のSNP6.0チップを用いた。

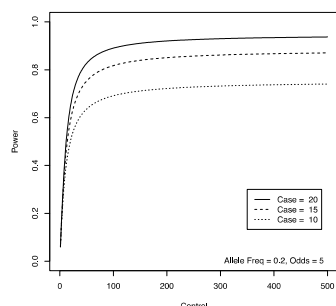
## (3) SNP 統計解析

解析方法については、ロジスティック回帰を基本としたAICによるモデル選択を採用することとした。多数の遺伝子多型と患者由来因子の相互作用を解析するには計算量の点で問題が残ったため、MDR法あるいはGMDR法を用いて相互作用のスクリーニングを行った。

## 4. 研究成果

本研究を開始するに先立ち、高い検出力を得るために必要なサンプル数の推定を行った。この推定では、原因となる遺伝子変異が持つオッズ比を5または10と仮定した。これは放射線性皮膚炎関連SNPや抗がん剤の有害事象に関連する遺伝子変異でのオッズ比を基にしている。発症症例数が10、15、20症例の場合、非発症症例を1~500まで変化させた場合の検出力を下図に示す。

### オッズ比5と仮定

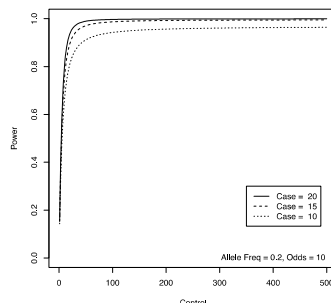


発症者  
20名

非発症者  
100名

が解析に必要

### オッズ比10と仮定



発症者  
10名

非発症者  
100名

が解析に必要

これらの検討により、発症症例が20症例と非発症症例100例を用いたアソシエーション解析を行うことにより、検出力0.8以上を得ることができていることを確認した。

研究ではまず2005年3月から2009年9月まで、がん研有明病院にて乳がん術後放射線治療を受けた患者1225名について、BOOPの発症について調査を行った。その結果、発症した患者は16名(発生頻度1.4%)であった。また、非発症サンプルとして、放射線治療終了後2年を経過しても肺臓炎を発症しない症例から、発症群と年齢がマッチする症例を抽出した。

臨床背景との関連では、年齢との相関を認め、50歳以上で発症頻度が有意に高かった。喫煙歴、各種治療の有無(化学療法、分子標的薬治療、ホルモン療法)とBOOP発症頻度との間には有意差を認めなかった。

次に、解析の対象とする遺伝子を絞り込むために、有害事象として放射線性皮膚炎を示した患者を用いたゲノムワイドSNP解析を行った。Affymetrix社製SNP6.0チップを用いて約100万箇所のSNPのタイピングを行い有害事象の有無との相関をロジスティック回帰法を用いて検討した。その結果、 $p < 1 \times 10^{-5}$ を示すSNPが8個、 $1 \times 10^{-4} < p < 1 \times 10^{-5}$ のSNPが29個、 $1 \times 10^{-3} < p < 1 \times 10^{-4}$ のSNPを490個同定することができた。 $p < 1 \times 10^{-4}$ 以下のSNPを下に示す。

SNP rs ID	Chr	Position	p-value	Gene symble
rs4949310	1	31,079,073	4.2241E-05	LAPTM5
rs3923872	1	31,082,304	4.2241E-05	LAPTM5
rs4551635	1	31,084,005	4.2241E-05	LAPTM5
rs4845351	1	151,763,335	2.67853E-05	S100A7
rs4669564	2	10,339,793	7.37736E-07	HPCAL1
rs12468708	2	58,740,543	9.09421E-05	FLJ30838
rs4832135	2	85,187,487	4.74329E-05	TCF7L1
rs2583554	2	85,210,844	5.37459E-05	TCF7L1

rs6543512	2	239,712,005	4.40839E-05	HDAC4
rs3791542	2	239,768,892	8.56155E-05	HDAC4
rs6437511	3	105,544,612	2.95413E-05	MIR548A3
rs6448334	4	24,752,329	5.66982E-06	SEPSECS
rs1553153	4	24,758,063	5.66982E-06	SEPSECS
rs6838393	4	24,783,349	5.66982E-06	LOC285540
rs4459977	4	24,794,657	5.66982E-06	LOC285540
rs10517063	4	24,824,186	1.95683E-06	PI4K2B
rs12649921	4	24,895,011	1.68143E-06	ZCCHC4
rs3109908	4	55,318,559	4.29502E-05	KIT
rs10213491	4	55,318,816	3.90031E-05	KIT
rs419783	4	108,195,469	8.35104E-05	DKK2
rs1400923	4	138,128,655	4.3315E-05	PABPC4L
rs9312579	4	176,430,714	4.29071E-05	ADAM29
rs11746672	5	177,833,371	5.59883E-05	COL23A1
rs2095771	6	46,012,610	7.04817E-06	CLIC5
rs3777585	6	46,026,947	1.90674E-05	CLIC5
rs2354951	7	11,535,194	3.21274E-05	THSD7A
rs4444157	12	7,914,482	6.80794E-05	SLC2A14
rs7485706	12	118,340,898	9.40577E-05	CCDC60
rs10849660	12	118,341,796	9.40577E-05	CCDC60
rs2896439	14	101,876,044	8.46091E-05	ZNF839
rs1036460	15	32,790,690	5.89039E-05	GOLGA8B
rs11632450	15	32,793,952	5.89039E-05	GOLGA8B
rs11854975	15	73,150,929	1.02677E-05	C15orf39
rs4886655	15	73,172,621	1.02677E-05	C15orf39
rs8064939	17	11,179,760	2.38355E-05	SHISA6
rs6071174	20	36,769,955	1.88907E-05	SLC32A1
rs17333626	X	95,667,758	4.22985E-05	LOC643486

これらの SNP が有害事象と関連することが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

American Society of Human Genetics  
Annual meeting、2013 年 10 月 22 日～26 日、  
Boston、磯村 実

American Society of Human Genetics  
Annual meeting、2012 年 11 月 6 日～10 日、  
San Francisco、磯村 実

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

磯村 実 (ISOMURA, Minoru)  
島根大学・医学部 講師  
研究者番号：4 0 2 7 2 4 9 7

### (2) 研究分担者

宮田 敏 (MIYATA Satoshi)  
東北大学・医学部 講師  
研究者番号：6 0 3 6 0 3 4 3