

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07684

研究課題名（和文）臨床応用を考慮した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 a practical radiosensitivity prediction method for clinical applications

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：乳癌と子宮頸癌で、生検標本や手術標本を用いて、様々な蛋白発現と放射線治療成績の相関性を解析した。子宮頸癌の放射線治療は腫瘍細胞のPD-L1発現を増加させ、放射線治療後の腫瘍細胞のPD-L1の発現と全生存期間に強い相関関係が認められた。これは、照射による免疫学的な変化が放射線治療効果に影響していることを示唆している。早期乳癌術後照射症例において、腫瘍細胞でのXRCC4発現率が乳房内再発と有意な相関を認めた。再発の種類別では、True Recurrenceで、XRCC4発現との相関が存在した。True Recurrenceは腫瘍細胞の低放射線感受性に起因している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸癌の放射線治療は、各種腫瘍免疫関連蛋白の発現に影響を与えており、それらの蛋白発現と予後に有意な相関を認めた。また、放射線治療後の腫瘍細胞に発現するPD-L1と全生存期間の強い相関関係は、放射線治療によって引き起こされる免疫学的な変化が子宮頸癌の治療効果に影響していることを示唆する。早期乳癌術後照射症例において、XRCC4が高発現の乳癌については、線量増加によって照射野内乳房内再発を低減できる可能性が示唆する結果が得られた。

これらの結果は、汎用性のある実用的な放射線感受性予測法の開発や癌細胞の生物学的特性に応じた個別化した放射線治療の実現に、貢献する結果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using biopsy and surgical specimens of breast and cervical cancers, we analyzed the correlation between various protein expressions and radiotherapy outcomes. Radiotherapy of cervical cancer increased the expression of PD-L1 in tumor cells, and there was a strong correlation between the expression of PD-L1 in tumor cells after radiotherapy and overall survival. This suggests that irradiation-induced immunological changes may affect the radiotherapy effect. In patients with early-stage breast cancer treated with postoperative radiotherapy, XRCC4 expression rates in tumor cells were significantly correlated with intra-breast recurrence. By type of recurrence, there was a correlation with XRCC4 expression in True recurrence. True recurrence may be due to the low radiosensitivity of tumor cells.

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 予測方法 免疫組織染色 腫瘍免疫

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 も他の方法に比べて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。これに関与する蛋白として、XRCC4、DNA-PKcs、Ku70、Ku86、LigaseIV 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 二重鎖切断修復能に関与する蛋白(Ku70、Ku86、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。

また、ヒトパピローマウイルス(HPV)陽性中咽頭癌は陰性癌と比較して放射線治療に対する反応が良好である。我々は、これには腫瘍免疫が関与している可能性を示唆する結果を得ている。

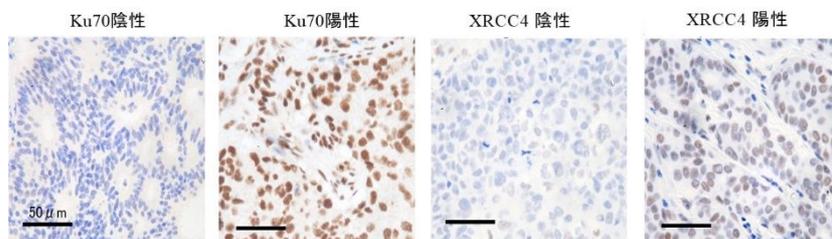
本研究の目的は、これらの研究成果を進展させ、広く臨床応用が可能な実用的な放射線感受性予測法を開発して、癌細胞の生物学的特性に応じた個別化した放射線治療を実現することである。具体的には、乳癌とヒトパピローマウイルス(HPV)関連癌である子宮頸癌で、様々な蛋白発現の強度と放射線治療成績の相関性を解析し、治療効果の予測因子となりうるかを検討した。

3. 研究の方法

(乳癌)

乳癌患者の手術サンプルを用いて、DNA2 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。具体的には、放射線治療を施行した乳房温存手術+術後放射線治療後の照射野内再発である同側性乳房腫瘍再発と乳癌細胞のDNA2 重鎖切断修復メカニズムである非相同末端結合修復蛋白の発現を調べた。また、同側性乳房腫瘍再発の2つのタイプ、すなわち、残存腫瘍細胞の再増殖が考えられる True recurrence と新たな原発腫瘍の発生が考えられる New primary の間で、腫瘍細胞の非相同末端結合修復関連タンパク質の発現に差がみられるかも検討した。

乳がんの免疫組織染色



ROC曲線により、Ku70のカットオフ値を94%、XRCC4のカットオフ値を74%と設定した。

1995年2月から2006年3月までに当院で、術後放射線治療を施行された560例の乳癌患者を対象とした。同側性乳房腫瘍再発は、40例でみられた。

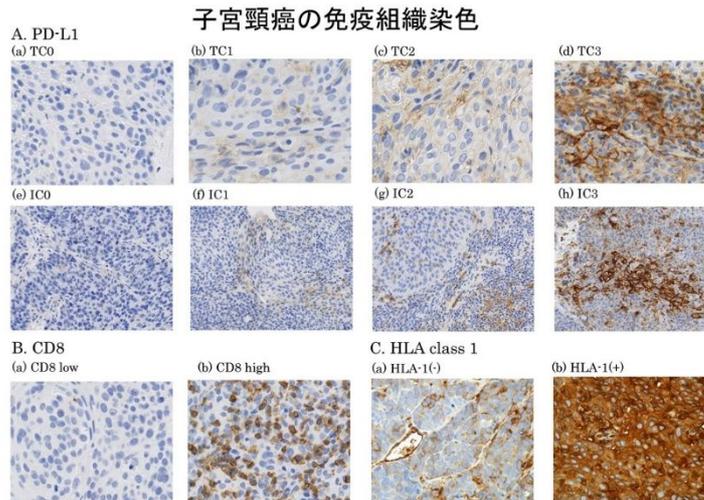
傾向スコアマッチング法を用いて、同側性乳房腫瘍再発を有する患者1名と同側性乳房腫瘍再発を有さない患者2名の計40組の組み合わせ(120名)を選択した。手術標本を用いて、NHEJに関連するタンパク質の免疫組織化学的検査を行った。

(子宮頸癌)

子宮頸がんの放射線治療による、腫瘍組織の PD-L1、PD-1 およびヒト白血球抗原クラス I (HLA-1) の発現の変化、ならびに腫瘍組織への細胞障害性 T リンパ球 (CD8+ T リンパ球) および FoxP3+ T リンパ球の浸潤の変化、およびこれらのパラメータと放射線治療成績の関連を検討した。FoxP3+ は、制御性 T リンパ球のマーカーである。

具体的には、術前化学放射線療法を施行された子宮頸がん患者 104 人を対象に、放射線治療前の生検とそれに対応する放射線治療後の切除組織の免疫組織化学的解析を行った。陽性検体と陰性検体を区別するために、様々なタンパク質の発現をスコア化した。

また、PD-L1 に関しては、腫瘍細胞の発現 (TC) と免疫細胞の発現 (IC) に分けて、解析した。

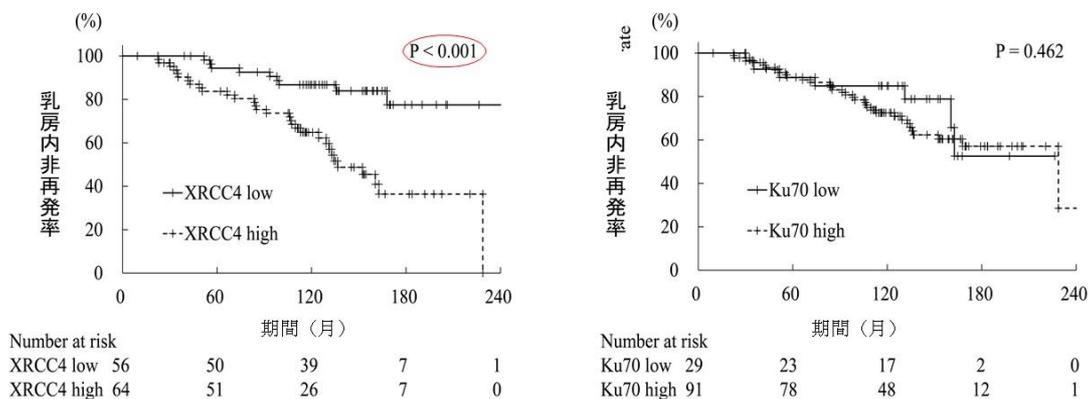


4. 研究成果

(乳癌)

同側性乳房腫瘍再発は、40 例にみられた。True recurrence は 22 例、New primary は、18 例であった。15 年全生存率は、New primary 患者では 85.9%、True recurrence 患者では 95.5% であったが、同側性乳房腫瘍再発を発症していない患者では 96.5% であった。腫瘍細胞に XRCC4 が高発現している患者は、XRCC4 が低発現している患者に比べて同側性乳房腫瘍再発の発現率が有意に高かった ($P < 0.001$)。

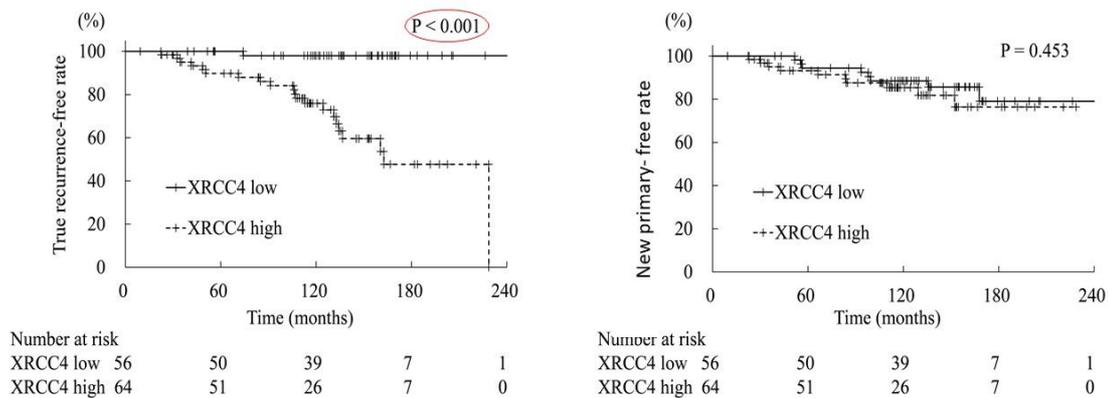
XRCC4の乳癌細胞での発現と照射野内乳房内再発



- XRCC4発現群で乳房内再発率と有意に相関した。
- Ku70では明らかな有意差は見られなかった。

また、同側性乳房腫瘍再発を True recurrence と New primary に分類すると、True recurrence の頻度は、XRCC4 発現が高い患者では、XRCC4 発現が低い患者よりも有意に高かった ($P < 0.001$)。腫瘍細胞による XRCC4 発現は New primary の発生とは有意に関連していなかった。

XRCC4発現とTrue RecurrenceおよびNew primary再発率

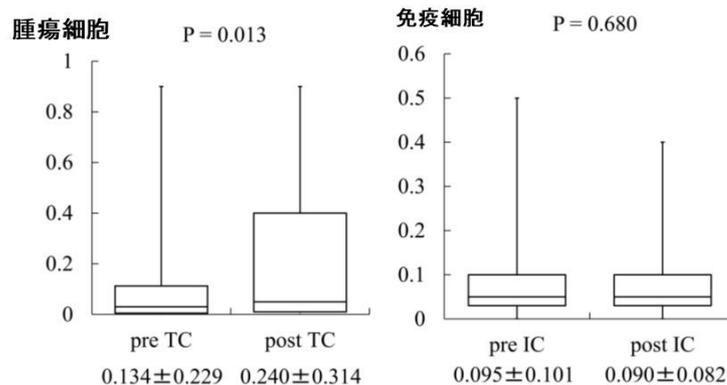


XRCC4発現群では有意にTrue Recurrence再発率と相関を認めましたが、New Primary再発においてはXRCC4の発現に明らかな有意差は認められなかった。

(子宮頸癌)

腫瘍細胞のPD-L1発現 (PD-L1 TC) は化学放射線療法後に有意に増加した ($p = 0.043$)。腫瘍組織への細胞障害性 (CD8+) T細胞浸潤 ($p = 0.002$) およびFoxP3+T細胞の浸潤 ($p = 0.003$) は化学放射線療法後に有意に減少した。リンパ球のPD-1の発現、免疫細胞のPD-L1発現 (PD-L1 IC) または腫瘍細胞のHLA-1の発現は化学放射線療法後に変化しなかった。

放射線治療前後のPD-L1発現の変化



- 放射線治療前後で免疫細胞のPD-L1発現には変化を認めなかったが、腫瘍細胞のPD-L1発現は放射線治療後に高発現であった。
- これは、放射線による腫瘍細胞の障害がPD-L1発現を誘導したと考えた。

化学放射線療法前に得られた生検標本では、CD8+T細胞 ($p = 0.001$) およびFoxP3+T細胞 ($p = 0.003$) の浸潤の増加が、全生存期間の改善の有意な予測因子であった。化学放射線療法後に得られた手術標本では、PD-L1 TCの増加が唯一の全生存期間改善の有意な予測因子であった ($p < 0.001$)。

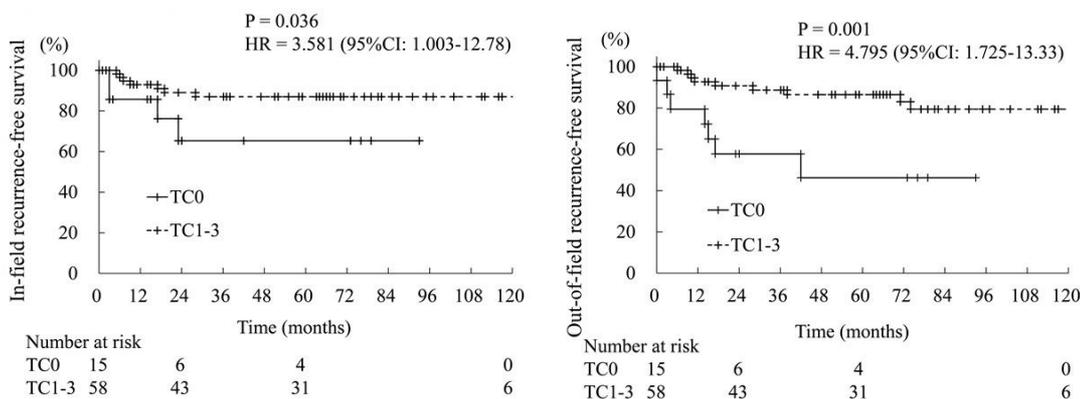
結果（多変量解析）

Parameter	before RT (n=108)			after RT (n=75)		
	Overall survival			Overall survival		
	Hazard ratio	95% CI	P value	Hazard ratio	95% CI	P value
Multivariate (Cox regression)						
Age (<50 vs ≥50)	2.249	0.733-6.894	0.156	1.586	0.523-4.808	0.415
FIGO stage (I vs II-IV)	0.279	0.082-0.943	0.040	0.809	0.241-2.713	0.732
Chemotherapy (Administered vs Not)	2.896	1.022-8.208	0.045	0.627	0.211-1.861	0.400
PD-L1 : 腫瘍細胞に発現 (陽性 vs 陰性)	1.788	0.702-4.559	0.223	0.201	0.071-0.575	0.003
PD-L1 : 免疫細胞に発現 (陽性 vs 陰性)	0.223	0.074-0.672	0.008	0.921	0.311-2.723	0.882
CD8 (positive vs negative)	0.276	0.083-0.921	0.036	0.315	0.040-2.502	0.275
HLA I (positive vs negative)	0.276	0.110-0.8.208	0.006	1.006	0.375-2.696	0.991

- 治療前の検体においては、免疫細胞に発現するPD-L1・CD8・HLA-1が全生存率との有意な相関を認めた。
- 治療後の検体においては、腫瘍細胞に発現するPD-L1が全生存率との有意な相関を認めた。

PD-L1 TCの増加は、照射野外再発率が有意に低いことと相関していた (p = 0.005)。

結果（再発形式の検討）



- 放射線治療後の腫瘍細胞に発現するPD-L1が陽性の症例は陰性の症例と比較して有意に照射野内再発及び照射野外再発のいずれも少なかった。

5. 考察 (乳癌)

腫瘍細胞による高 XRCC4 発現は、低 XRCC4 発現よりも同側性乳房腫瘍再発の頻度が有意に高かった。さらに、同側性乳房腫瘍再発を TR と NP に分類して、解析した。True recurrence は、XRCC4 発現が高い患者では、XRCC4 発現が低い患者よりも、頻度が有意に高かった。しかし、New primary では、腫瘍細胞の XRCC4 発現と有意な関連は、見られなかった。これらの結果より、True recurrence は、腫瘍細胞の放射線感受性が低いために起こり、XRCC4 の高発現に関連している可能性が考えられる。

(子宮頸癌)

化学放射線治療は、子宮頸癌の腫瘍細胞の PD-L1 の発現を増加させ、腫瘍免疫学的微小環境の変化を誘導した。化学放射線治療は、子宮頸がんの治療成績に影響を及ぼす可能性のある免疫学的効果を有する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukushima Y, Someya M, Nakata K, Hori M, Kitagawa M, Hasegawa T, Tsuchiya T, Gocho T, Ikeda H, Hirohashi Y, Torigoe T, Sugita S, Hasegawa T, Himi T, Sakata K.	4. 巻 129
2. 論文標題 Influence of PD-L1 expression in immune cells on the response to radiation therapy in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiother Oncol.	6. 最初と最後の頁 409-414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radonc.2018.08.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitagawa M, Someya M, Hasegawa T, Mikami T, Asaishi K, Hasegawa T, Matsumoto Y, Kutomi G, Takemasa I, Sakata K.	4. 巻 195
2. 論文標題 Influence of XRCC4 expression by breast cancer cells on ipsilateral recurrence after breast-conserving therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Strahlenther Onkol.	6. 最初と最後の頁 648-658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00066-019-01468-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gocho T, Hori M, Fukushima Y, Someya M, Kitagawa M, Hasegawa T, Tsuchiya T, Hareyama M, Takagi M, Hashimoto K, Masumori N, Sakata K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Evaluation of the urethral / ratio and tissue repair half-time for iodine-125 prostate brachytherapy with or without supplemental external beam radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brachytherapy	6. 最初と最後の頁 290-297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brachy.2020.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchiya T, Someya M, Takada Y, Hasegawa T, Kitagawa M, Fukushima Y, Gocho T, Hori M, Nakata K, Hirohashi Y, Torigoe T, Saito T, Sakata KI.	4. 巻 -
2. 論文標題 Association between radiotherapy-induced alteration of programmed death ligand 1 and survival in patients with uterine cervical cancer undergoing preoperative radiotherapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Strahlenther Onkol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00066-019-01571-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa T, Someya M, Hori M, Tsuchiya T, Fukushima Y, Matsumoto Y, Sakata K.	4. 巻 34
2. 論文標題 Prediction of Results of Radiotherapy With Ku70 Expression and an Artificial Neural Network	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 2865-2872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Someya M, Tsuchiya T, Fukushima Y, Hasegawa T, Takada Y, Hori M, Miura K, Kitagawa M, Gocho T, Hirohashi Y, Torigoe T, Iwasaki M, Matsuura M, Saito T, Sakata K.	4. 巻 50
2. 論文標題 Association between cancer immunity and treatment results in uterine cervical cancer patients treated with radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1290-1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Someya M, Tsuchiya T, Fukushima Y, Hasegawa T, Hori M, Kitagawa M, Gocho T, Mafune S, Ikeuchi Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Iwasaki M, Matsuura M, Saito T, Matsumoto Y, Sakata K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Prediction of treatment response from the microenvironment of tumor immunity in cervical cancer patients treated with chemoradiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-021-00290-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 土屋高旭, 染谷正則, 高田優, 長谷川智一, 北川未央, 福島悠希, 後町俊夫, 堀正和, 中田健生, 廣橋良彦, 鳥越俊彦, 坂田耕一
2. 発表標題 子宮頸癌術前照射症例を用いた放射線治療による腫瘍免疫の変化と予後の関連の検討
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukushima Y, Someya M, Nakata K, Hori M, Kitagawa M, Hasegawa T, Tsuchiya T, Gocho T, Ikeda H, Hirohashi Y, Torigoe T, Sugita S, Hasegawa T, Himi T, Sakata K.
2. 発表標題 Influence of PD-L1 Expression in Immune Cells on the Response to Radiation Therapy in Patients with Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma.
3. 学会等名 2018 ASTRO(American Society for Radiation Oncology) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 染谷正則、長谷川智一、土屋高旭、北川未央、後町敏夫、福島悠希、堀正和、中田健生、坂田耕一
2. 発表標題 当院で腔内照射を施行した子宮頸癌の線量解析
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第31回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 染谷正則、長谷川智一、土屋高旭、福島悠希、北川未央、堀正和、坂田耕一
2. 発表標題 根治放射線治療を行った進行期子宮頸癌症例における腫瘍免疫と予後との関連
3. 学会等名 第79回日本医学放射線学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷正則、土屋高旭、福島悠希、廣橋良彦、鳥越俊彦、坂田耕一
2. 発表標題 HPV関連癌における腫瘍免疫と放射線治療効果との関係
3. 学会等名 第33回日本放射線腫瘍学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷正則、土屋高旭、福島悠希、廣橋良彦、鳥越俊彦、坂田耕一
2. 発表標題 HPV関連癌における腫瘍免疫と放射線治療効果との関係
3. 学会等名 第56回日本医学放射線学会秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北川 未央 (KITAGAWA Mio) (30608922)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	福島 悠希 (FUKUSHIMA Yuki) (60749787)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	長谷川 智一 (HASEGAWA Tomokazu) (80631168)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	土屋 高旭 (TSUCHIYA Takaaki) (90631169)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------