

令和 3 年 6 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：2018～2020

課題番号：18K07760

研究課題名(和文)個別化放射線治療に向けたリキッドバイオプシーの応用

研究課題名(英文)Application of Liquid Biopsy for Personalized Radiation Therapy

研究代表者

染谷 正則 (Someya, Masanori)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60404711

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)：「個別化放射線治療」を実現させるために、リキッドバイオプシーを用い、血漿中に存在する腫瘍由来のエクソソームを調べ、癌の放射線感受性予測に応用した。腹部～骨盤部に放射線治療を施行した子宮頸癌、直腸癌、肛門癌、膵癌など合計で150名の患者より血液を採取し、リンパ球のDNA-PK活性測定、放射線誘発ガンマH2AXフォーカス測定を行い、血漿中のエクソソーム由来マイクロRNA発現解析を行った。血漿中のエクソソーム由来マイクロRNAが放射線治療効果予測に有用である事と、リンパ球DNA-PK活性が放射線治療による晩期有害事象予測に有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、癌に対する放射線治療の治療効果予測と、放射線治療後半年から数年の間に起こる晩期有害事象(副作用)の予測が、治療開始前の血液を調べる事で可能となる可能性を示す事ができた。これを進める事によって、個人毎のより最適な放射線治療スケジュールが決定でき、個別化放射線治療を実現する足掛かりとなり、将来的に癌治療の全体的な成績向上に寄与が期待できる成果を得る事ができた。

研究成果の概要(英文)：In order to realize "personalized radiotherapy", we used a technique called "liquid biopsy" to examine the nucleic acids and proteins of tumor-derived exosomes in plasma, and applied it to the prediction of radiosensitivity of cancer. Blood samples were collected from a total of 150 patients with cervical, rectal, anal and pancreatic cancers treated with abdominal to pelvic radiotherapy, and plasma and lymphocyte samples were isolated. DNA-PK activity of lymphocytes and radiation-induced gamma H2AX focus was measured, and exosomal microRNA expression analysis in plasma was performed. Based on the results of the treatment outcome and adverse event surveys for each cancer and the results of lymphocyte DNA-PK activity and radiation-induced gamma-H2AX focus measurements, we showed that exosomal microRNAs in plasma are useful for predicting the effects of radiotherapy and that lymphocyte DNA-PK activity may be useful for predicting late adverse events after radiotherapy.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線治療 治療効果予測 有害事象予測 リキッドバイオプシー マイクロRNA ガンマH2AXフォーカス DNA-PK活性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来、根治が困難であった局所進行悪性腫瘍に対して、放射線治療機器の技術的な進歩や化学療法
の進歩や同時併用などの投与方法の進歩により、近年は治療成績の向上が見られてきている。
しかし根治が困難な症例は未だ多く、さらなる治療成績向上を目的とした「個別化放射線治療」
の実践のためには、

- (A) 放射線抵抗性腫瘍に対し線量増加による局所制御の向上
 - (B) 遠隔転移の抑制、遠隔転移を起こしやすい症例を選別しての追加治療
 - (C) 正常組織の有害事象予測
- などの方策が必要と考えられる。

この課題に対して、近年は「リキッドバイオプシー」という手法が提唱されてきている。これは
血中に存在する腫瘍由来 DNA や、エクソソーム (細胞外小胞) 中にあるタンパクや核酸を調べ
る事で、腫瘍特異的な発現パターンを検出し、がんの特性を診断するものである。

現状では早期がんの検出に重点を置いて研究が進められているが、分泌されるエクソソームが
親腫瘍の性質を反映していると考えられる事から、エクソソーム内のタンパクや RNA を調べる
事で、

- (a) 放射線治療が奏効しやすいグループを同定する
- (b) 早期に遠隔転移を起こしやすいグループを同定する

など、治療方針決定を含めた臨床応用が可能と考えられ、エクソソームを解析する研究に着手す
る事とした。

2. 研究の目的

従来、放射線治療での根治が困難とされてきた局所進行悪性腫瘍に対し、末梢血リンパ細胞や血
中の腫瘍由来エクソソーム (細胞外小胞) に存在する、miRNA (マイクロ RNA) の発現パターンを
調べ、放射線治療効果を予測する。また DNA 修復能の指標とされる末梢血リンパ細胞の放射線誘
発ガンマ H2AX フォーカスを測定する事で有害事象の起こりやすさを予測する。これらの組み合
わせにより、個々の患者毎の特性に合わせて線量分割や照射体積を調整し、治療効果向上と有害
事象軽減による「個別化放射線治療」を目指した。

3. 研究の方法

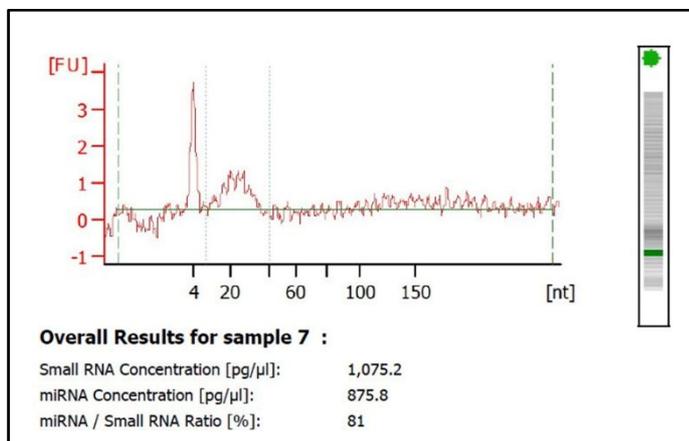
腹部～骨盤部に放射線治療を施行した子宮頸癌、直腸癌、肛門癌、膀胱癌など、合計で 150 名の患
者より血液を採取し、血漿およびリンパ球などの試料の分離採取を行った。血漿からエクソソーム
内包マイクロ RNA 発現解析に必要なサンプルの分離調整を行ない、また、リンパ球の DNA-PK
活性測定、放射線誘発ガンマ H2AX フォーカス測定を行った。

< 子宮頸がん患者におけるエクソソーム由来の miRNA 解析による治療効果予測 >

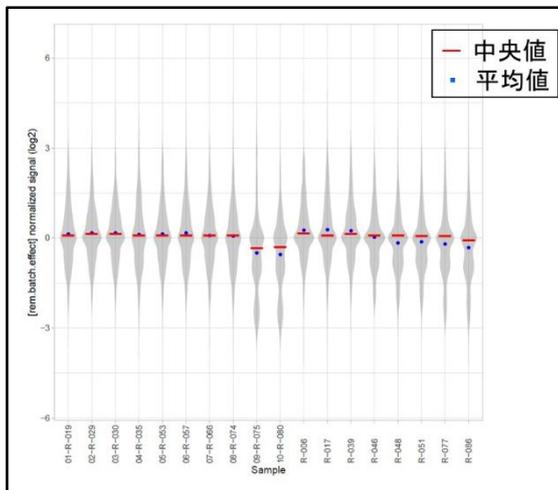
2014 年～2019 年にかけて根治的放射線治療を行った子宮頸癌患者で、放射線治療前の採血を施
行した 72 例を対象とし、その中で / 期の進行症例で 2 年以上の無再発生存、または局所再
発・遠隔転移などが確認された代表的な各 9 例ずつを選びだし、血漿中
のエクソソームに内包されるマイクロ RNA を抽出、次世代シーケンサー
による RNA-Seq 解析を行い、再発
に関連するマイクロ RNA 抽出を行
った。

具体的には Qiagen 社の exoRNeasy
Serum/Plasma Midi Kit を用いてエ
クソソーム由来マイクロ RNA を抽
出し、バイオアナライザーで目的
のマイクロ RNA 分画が取れている事
を確認した。

(右図は代表的なサンプル例)



次にQiagen社のQIAseq miRNA Library Kitによる次世代シーケンス解析とFastQCのチェックを行い、データ整形の後に、マイクロRNAのアノテーション付与を行った。計18例のデータが揃った所で、各サンプルでの遺伝子変動が少ない30%程度の範囲を比較し、発現量を補正するTMM法を用いて、RNA-seqにおけるリードカウントデータの正規化を行った。(右図)



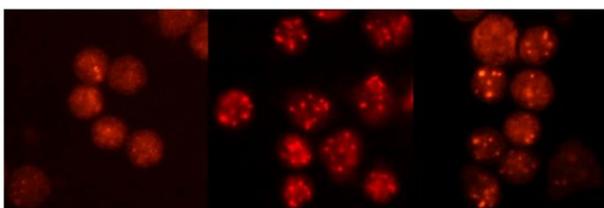
その結果、検出・同定されたマイクロRNAは2212種類であった。

<末梢血リンパ細胞のDNA-PK活性測定および放射線誘発ガンマH2AXフォーカスの測定による有害事象予測>

2014年～2019年にかけて放射線治療を行った子宮頸癌、直腸癌、肛門癌、膀胱癌の患者で、放射線治療前の採血を行った100例を対象に末梢血リンパ球のDNA-PK活性測定および放射線誘発ガンマH2AXフォーカス測定を行った。DNA-PK活性測定は末梢血からリンフォブレップを用いてリンパ細胞を分離し、細胞内にあるDNA損傷修復タンパクであるDNA-PK(DNA依存性プレロテインキナーゼ)のリン酸化活性をラジオアイソトープの $^{32}\text{-P}$ -ATPを用いて定量化した(この方法の詳細については2006年のCarcinogenesis誌にて報告)。

同じ末梢血サンプルを用い、X線照射装置で1Gyを照射し、30分後と4時間後にパラホルムアルデヒド固定、その後蛍光抗体を用いたガンマH2AXタンパク染色を行い、蛍光顕微鏡下で細胞内に生じた放射線誘発フォーカスを観察、計測した。(右図)

放射線誘発 γ H2AXフォーカスの測定



非照射 1Gy照射30分 1Gy照射4時間

1サンプルあたり100個のリンパ細胞内のフォーカス数を計測し、非照射、1Gy照射後30分、4時間でのフォーカス数の変化を計測した。

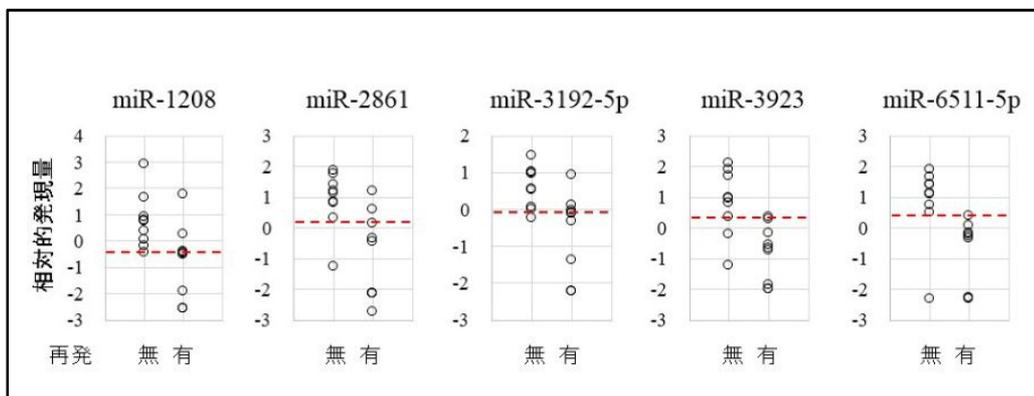
これらDNA-PK活性の測定と、放射線誘発ガンマH2AXフォーカスの変化、特に照射30分後のピークから4時間までの減少率をDNA損傷修復率として、放射線治療後の有害事象発生との関連を調べた。

4. 研究成果

<子宮頸がん患者におけるエクソソーム由来のマイクロRNA解析による治療効果予測>

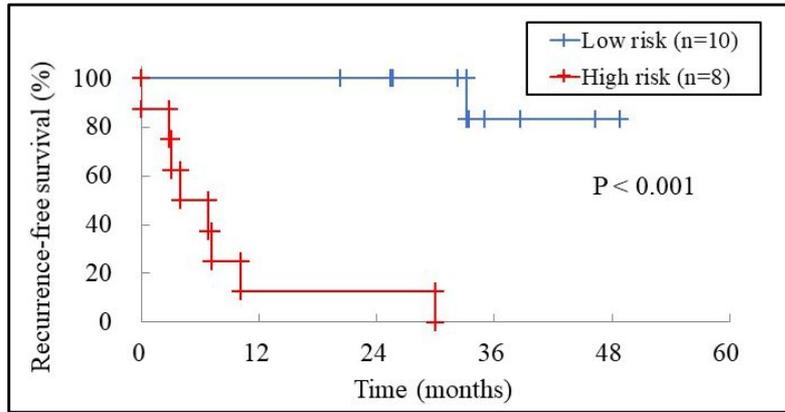
無再発および再発群の2群間で発現量に差があるマイクロRNAを抽出した所、t検定において発現量に有意差が見られたマイクロRNAは74種類見つかった。

その中でROC解析を行い、特に再発リスクとの関与が高かった代表的な5つのマイクロRNAをピックアップした。(下図)



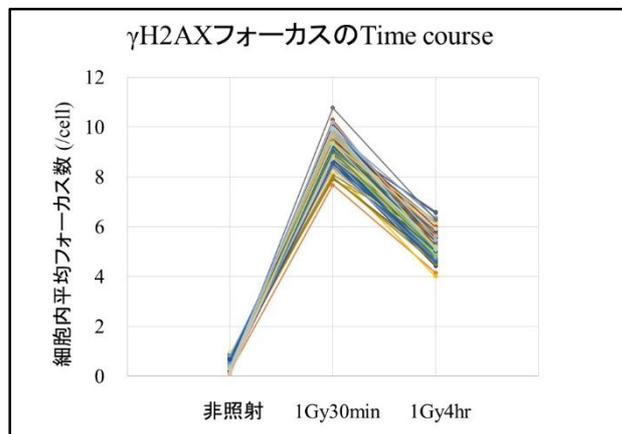
上記の5つのマイクロRNAの発現量からカットオフ値を決めてスコア化し、合計スコアが3点

以上の症例を「高リスク群」、2点以下の症例を「低リスク群」とした。2群に分けた無再発生存曲線を描くと、高リスク群と低リスク群で再発率に明らかな有意差が付く事が示された。(下図)

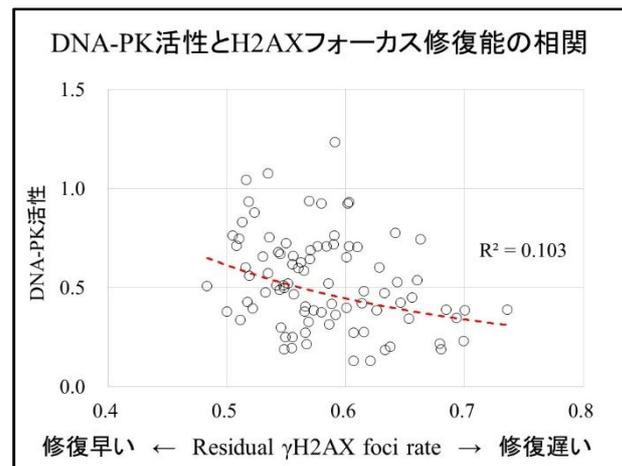


<末梢血リンパ細胞の DNA-PK 活性測定および放射線誘発ガンマ H2AX フォーカスの測定による有害事象予測>

放射線誘発ガンマ H2AX フォーカスの測定は 114 例を対象に行った。1Gy 照射後 30 分と 4 時間での平均フォーカス数の比を取ると、0.48 ~ 0.74 までの範囲になり、個人によってばらつきがあり、すなわち DNA 損傷修復能力に個人差がある事が推測された。(右図)



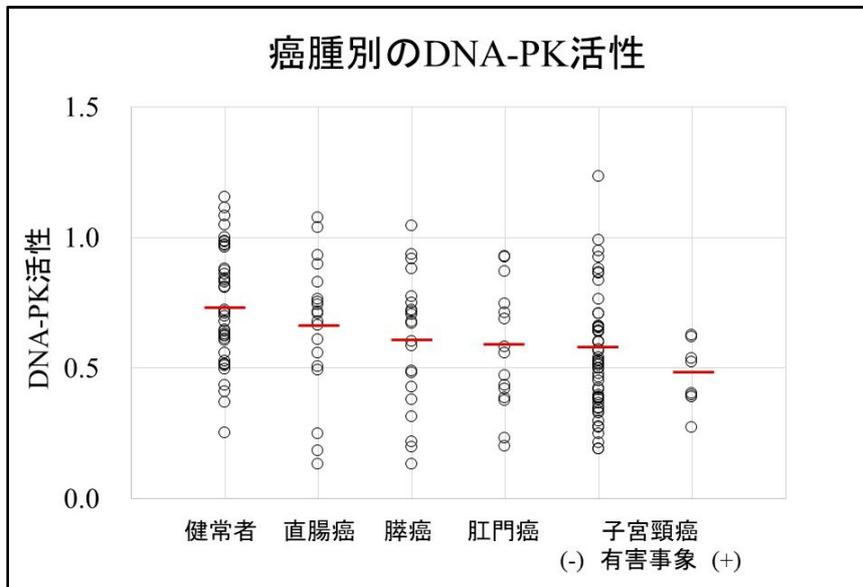
同じサンプルで DNA-PK 活性を測定し、相関関係を調べた所、弱い相関傾向(相関係数 $r=0.321$)ではあるが、DNA-PK 活性が高い症例において H2AX フォーカスの減少率が高く、逆に DNA-PK 活性が低い症例において H2AX フォーカスの減少率が低い傾向にある事が示された。(右図)



DNA-PK タンパクは非相同末端結合修復経路による DNA 二本鎖切断の損傷修復に関わる事が知られているが、この修復活性の高低がリンパ細胞において実際の DNA 二本鎖切断修復効率と相関関係にある事が証明できた。

次に癌腫毎に分けた DNA-PK 活性の違いを調べた。(次ページ図)

ここでの健常者データは、2006 年に健常ボランティアとして医療従事者 41 例より採血、測定したものを並べて図示したものであるが、健常者に比べて癌罹患患者の方が全体に DNA-PK 活性が低い傾向があると思われた。これは、DNA 損傷修復能力が低い事と、癌罹患リスクが高くなる事が関連している可能性がある事を示唆している。また、この中で放射線治療後 1 年以上経過観察した時点で、grade2 以上の晩期有害事象を起こしたのは 6 例と少ないが、その DNA-PK 活性の数値は有害事象を生じなかった症例と比べて低い傾向にあり、これは DNA 損傷修復能力の個人差と、放射線治療による晩期有害事象との関連性が示唆された。



上記の結果をまとめると、放射線治療効果予測に関して、治療前の5個の血漿中エクソソーム由来マイクロRNA発現を調べる事で、再発しやすい群を予測する事ができた。今後は残りの症例での解析を継続し、再現性のある結果が得られるか検討を続ける必要性がある。また、今回同定された5個のマイクロRNAがどのように再発および遠隔転移に関与しているかのメカニズムの解明はこれからの課題である。

放射線治療後の有害事象予測については、日常臨床のプロトコール通りに治療が行われた場合にはgrade2-3以上の有害事象発生率は一般的に数%未満であり、症例数を多く集めなければ十分な検出能力を持った予測法の確立は難しい事が課題である。

次期研究計画においては多施設から多くのサンプル収集と解析を進めていく事を検討している。これらの成果については現在論文作成準備中で、英文医学雑誌に投稿して結果を広く一般に周知していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Someya Masanori, Tsuchiya Takaaki, Fukushima Yuki, Hasegawa Tomokazu, Hori Masakazu, Kitagawa Mio, Gocho Toshio, Mafune Shoh, Ikeuchi Yutaro, Hirohashi Yoshihiko, Torigoe Toshihiko, Iwasaki Masahiro, Matsuura Motoki, Saito Tsuyoshi, Matsumoto Yoshihisa, Sakata Koh-ichi	4. 巻 Epub ahead of print
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 Epub ahead
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 -
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 KI.	4. 巻 50(11)
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 Jpn J Clin Oncol.	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 KI.	4. 巻 34(5)
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 Masanori, Hasegawa Tomokazu, Tsuchiya Takaaki, Kitagawa Mio, Gocho Toshio, Fukushima Yuuki, Hori Masakazu, Miura Katsutoshi, Takada Yu, Nakata Kensei, Sakata Koh-ichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Retrospective DVH analysis of point A based intracavitary brachytherapy for uterine cervical cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 265 ~ 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrz099	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 Tsuchiya T, Someya M, Takada Y, Hasegawa T, Kitagawa M, Fukushima Y, Gocho T, Horii M, Nakata K, Hirohashi Y, Torigoe T, Saito T, Sakata KI.	4. 巻 Epub ahead of print
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 Epub ahead
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 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, Horii M, Fukushima Y, Someya M, Kitagawa M, Hasegawa T, Tsuchiya T, Hareyama M, Takagi M, Hashimoto K, Masumori N, Sakata KI.	4. 巻 Epub ahead of print
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 Epub ahead
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 Kato J, Hida T, Horimoto K, Sato S, Kobayashi K, Sawada M, Fujioka M, Tsuchiya T, Someya M, Uhara H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Successful rechallenging with nivolumab therapy after radiotherapy in mucosal melanoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 e72-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14549.	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 Kato J, Hida T, Someya M, Sato S, Sawada M, Horimoto K, Fujioka M, Minowa T, Matsui Y, Tsuchiya T, Kitagawa M, Nakata K, Sakata KI, Torigoe T, Uhara H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Efficacy of combined radiotherapy and anti-programmed death 1 therapy in acral and mucosal melanoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 328-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14805.	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 Fukushima Yuki, Someya Masanori, Nakata Kensei, Hori Masakazu, Kitagawa Mio, Hasegawa Tomokazu, Tsuchiya Takaaki, Gocho Toshio, Ikeda Hikaru, Hirohashi Yoshihiko, Torigoe Toshihiko, Sugita Shintaro, Hasegawa Tadashi, Himi Tetsuo, Sakata Koh-ichi	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 Radiotherapy and Oncology	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 Usami Yoko, Hirokawa Naoki, Saitoh Masato, Okuda Hiroki, Someya Masanori, Hasegawa Tadashi, Takakuwa Yasunari, Sakata Koh-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Histopathological differences of experimental aneurysms treated with bare platinum, fibered, and bioactive coils	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13645706.2018.1499532	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 Kato Junji, Hida Tokimasa, Someya Masanori, Sato Sayuri, Sawada Masahide, Horimoto Kohei, Fujioka Mao, Minowa Tomoyuki, Matsui Yoshiyuki, Tsuchiya Takaaki, Kitagawa Mio, Nakata Kensei, Sakata Koh ichi, Torigoe Toshihiko, Uhara Hisashi	4. 巻 46
2. 論文標題 Efficacy of combined radiotherapy and anti programmed death 1 therapy in acral and mucosal melanoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 328 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14805	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

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

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63回日本放射線影響学会（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 長谷川智一 北川 未央 後町 敏夫 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32回日本放射線腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷 正則、土屋 高旭、坂田 耕一
2. 発表標題 子宮頸癌に対する根治的放射線治療の治療効果予測の試み
3. 学会等名 第13回Quantum Medicine研究会（招待講演）
4. 発表年 2020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 美央、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、長谷川 智一、土屋 高旭、北川 未央、後町 俊夫、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、福島 悠希、土屋 高旭、坂田 耕一
2. 発表標題 腫瘍免疫と放射線治療効果との関係
3. 学会等名 第12回Quantum Medicine研究会（招待講演）
4. 発表年 2019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	後町 俊夫 (GOCHO Toshio) (80723402)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	池内 佑太郎 (IKEUCHI Yutarou) (00827876)	札幌医科大学・医学部・研究員 (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