

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08072

研究課題名(和文)放射線治療における免疫応答性に関わる体細胞変異のトランスレーショナルリサーチ

研究課題名(英文)The translational research of somatic mutations related to immune responsiveness in radiation therapy

研究代表者

村田 和俊(Murata, Kazutoshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・QST病院 治療診断部・医長

研究者番号：60644557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：根治的放射線治療子宮頸がん患者98人を対象として臨床転帰に関連する腫瘍変異プロファイルを解析した。再発変異は、PIK3CA(35.7%)、ARID1A(25.5%)、NOTCH1(19.4%)、FGFR3(16.3%)、FBXW7(19.4%)、TP53(13.3%)、EP300(12.2%)、FGFR4(10.2%)で観察された。FGFRファミリー遺伝子における変異の有病率は、子宮頸がんのPIK3CAとARID1A有病率とほぼ同じであった。FGFR遺伝子変異陽性患者の5年無増悪生存率は、FGFR遺伝子変異陰性患者よりも有意に不良であった(43.9%対68.5%; $P = 0.010$)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FGFR遺伝子変異は、根治的放射線治療を受けた子宮頸がん患者の無増悪生存割合の悪化と関連していた。FGFR遺伝子ファミリーの変異を持つ患者グループは慎重な経過観察が必要である。FGFRを標的とした治療と放射線治療を組み合わせた今後の研究が正当化される。また、単施設の遡及的解析による結果のため、結果の検証のためには前向き研究におけるさらなる検証が必要である。

研究成果の概要(英文)：Tumor mutation profiles associated with clinical outcome were analysed in 98 patients with radical radiotherapy cervical cancer. Recurrent mutations were observed in PIK3CA (35.7%), ARID1A (25.5%), NOTCH1 (19.4%), FGFR3 (16.3%), FBXW7 (19.4%), TP53 (13.3%), EP300 (12.2%) and FGFR4 (10.2%) FGFR family genes. The prevalence of mutations in the FGFR family genes was similar to the prevalence of PIK3CA and ARID1A in cervical cancer; 5-year progression-free survival in patients positive for FGFR mutations was significantly worse than in patients negative for FGFR mutations (43.9% vs 68.5%; $P = 0.010$).

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：子宮頸癌 放射線治療 体細胞変異 抗腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、化学放射線治療は進行した子宮頸癌の標準治療として確立した方法である。我々は、画像誘導小線源治療の導入により、今まで局所制御が困難であった進行期子宮頸癌の局所制御率を約 90%まで改善させたことを報告した。しかし、それでも放射線治療は局所治療であり、3 期を超えるような進行期の子宮頸癌では転移が出現し、全生存率は約 70%まで低下してしまう。この結果は診断時に潜在的に存在する腫瘍に対する「全身治療」の強化が必要であることを示している。

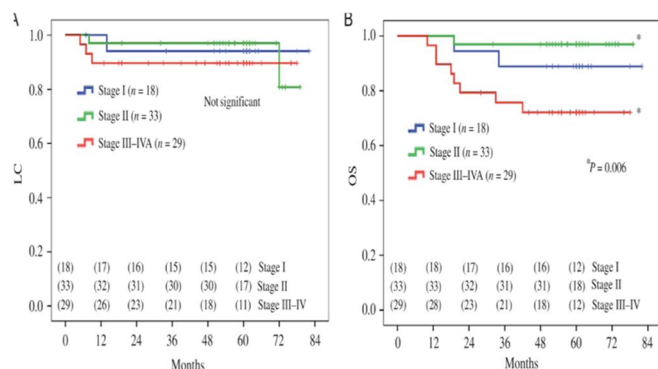


図1.当施設で子宮頸癌患者に対して行った根治的放射線治療成績の報告。左が局所制御率、右が全生存率を示している。Stage 以上（Stage I以上）の進行子宮頸癌では5年局所制御率89%と良好だが、5年生存率は72%と低下する。この差は遠隔転移による原病死が原因であり、診断時に潜在的に存在する腫瘍に対する「全身治療」の強化が必要であることを示している。

近年、放射線治療のみならず、がんの進行・再発・治癒（治療）に宿主の免疫が積極的に関与していることが示されている。Galonらは、大腸直腸がんの手術患者において、腫瘍に浸潤するT細胞（CD3+細胞、CD8+細胞など）の数が予後予測因子であることを報告している（文献1）。従来、「がんは免疫を凌駕して成立するものであるから、成立したがんへの免疫はなりたない」との考えがあったが、がんの成立後も宿主の免疫による防御が働くこと、予後への寄与が大きいことが証明されたのである。さらに、化学療法や放射線治療により宿主の免疫が活性化することや、薬剤や放射線の治療効果にはこれらの免疫反応が大きく貢献していることも報告もされている（文献2）。X線などの放射線は、そのDNA障害作用により抗腫瘍効果を発揮し、よって照射された局所にのみ効果を及ぼすと考えられてきた。しかし申請者らは、放射線誘発のDNA二本鎖切断が細胞膜表面上のPD-L1発現を高める事や（文献3、図2）、放射線照射による腫瘍縮小効果・延命効果には宿主の免疫（CD8+細胞）が必須であること、さらに免疫チェックポイント阻害抗体抗CTLA-4抗体の投与により放射線治療効果が増強されることを見出した（文献4）。さらにLeeらはマウスにおいて、放射線照射がCD8+細胞を活性化させる事を示し、Takeshimaらもマウス実験において癌細胞へ特異的に発現させた抗原に対して教育したTh1細胞投与と放射線治療を併用すると腫瘍の縮小効果が高まることを報告した（文献5、6）。これらは、放射線治療により活性化されたがん特異的な抗原に対する抗腫瘍免疫が治療効果に影響することを示している。

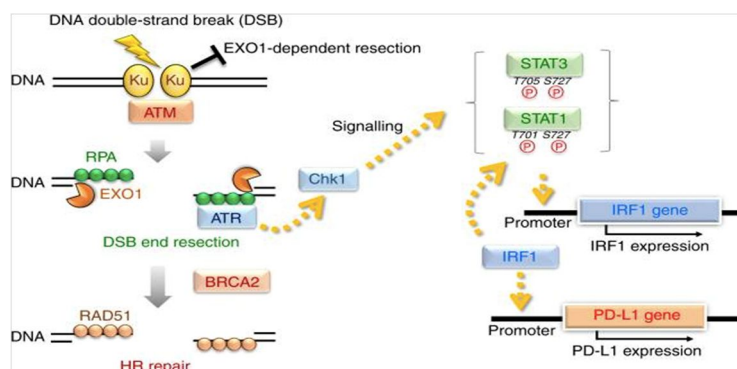


図2.放射線照射によりがん細胞膜表面上のPD-L1発現が高まり、その発現上昇には、放射線誘発DNA二本鎖切断により活性化されるATM/ATR/Chk1が必要であることを示した。

2. 研究の目的

子宮頸癌の抗腫瘍免疫感受性を明らかにすることを目的に、我々は、FFPE試料からの免疫染色による病理組織学的手法による、免疫学的特性（免疫Signature）の検討を開始している。しかし免疫染色では対象分子毎に検出用抗体を準備する必要があること、病理組織学者による検鏡が必要なことより、検討できるタンパクの種類に限界がある。一方でFFPE試料から抽出したDNAを用いて変異解析を行うことで、解析対象分子は数十種類から数百種類以上に飛躍的に増加し、子宮頸癌放射線治療応答性に関与する免疫signatureと、それに影響を与える体細胞変異との関連をはるかに高次的に解明することができると考えられる。本研究課題は、放射線治療時

の免疫応答性に関与する体細胞変異を明らかにし、「全身治療」を強化した免疫療法併用放射線治療を開発するためのトランスレーショナル研究を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 患者抽出と治療方法

2006年から2013年に群馬大学医学部附属病院で根治的放射線治療を受けた子宮頸がん患者を以下の条件で遡及的に抽出した。(I) 進行期分類であるFIGO分類(2008年版)でStage IB1-IVAである。(II) 病理組織診断で、扁平上皮癌、腺癌、腺扁平上皮癌のいずれかの病理組織診断が確定している。(III) 放射線治療前に子宮頸癌に対する治療の既往がない。(IV) ホルモン固定およびパラフィン包埋(FFPE)生検標本が保管されており、使用することができる。(V) カルテから患者背景や照射線量、治療期間などの必要な医療情報を参照することができる。(VI) 放射線治療開始前と治療終了後の画像データが存在する。

患者は、外部照射と高線量率小線源治療を併用して治療された。外部照射は骨盤全体に50Gyを25回に分けて照射し、最後の20Gyには、幅3cmの中央遮蔽が使用された。

リンパ節転移陽性の患者には、リンパ節へのブースト照射(6~10Gy)を行った。小線源治療は高リスク臨床標的体積(HR CTV) D90に24Gyを4回(1週間に1回)照射するブラキセラピーを行った。線量分布を最適化するために、非対称腫瘍などには組織内刺入針が使用された。ステージIII~IV、腫瘍径>4cm、非扁平上皮がん、またはリンパ節転移を有する患者には、外部照射と同時にシスプラチンベースの化学療法(週40mg/m²)を5サイクル行った。

(2) 組織サンプル採取、DNA調製、HPVタイピング、次世代シーケンサー

腫瘍組織は、放射線治療開始前にパンチ生検で採取した。2人の病理医で各標本の腫瘍と正常組織の比率(TN比)を決定し、TN比が20%以上のものはさらに以下のように分析した: QIAamp DNA FFPE Tissue kit(Qiagen, Hilden, Germany)を用いてDNAを抽出した。TaqMan RNase P Detection Reagents kit(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて、RNase P遺伝子の短いアンプリコン(87 bp)と長いアンプリコン(256 bp)を増幅するように設計された2つの異なるプライマーセットを用いた定量的PCRで測定されたDNA濃度を比較することにより、DNA断片化の程度を調べた[文献7]。遺伝子型6、11、16、18、30、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66を検出するHPVタイピングには、PapiPlex PCR法(GeneticLab Co., Ltd., Sapporo, Japan)を用いた。

半導体ベースの次世代シーケンサーについては、Ion AmpliSeq Library Kit 2.0(Thermo Fisher Scientific)およびIon AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel(Thermo Fisher Scientific)を用いてDNA(40 ng)からアンプリコンライブラリーを調製し、409個のがん関連遺伝子のエクソンの95.4%をカバーした。Ion Torrent シーケンサー(Thermo Fisher Scientific)を用いてライブラリー調製およびシーケンシングを行った[文献8,9]。個々のDNAサンプルのバーコード付きアンプリコンライブラリーは、Ion Xpress Barcode AdaptersおよびIon AmpliSeq Library Kit 2.0(Thermo Fisher Scientific)を用いて調製した。エマルジョンPCRの後、Ion PIチップあたり8-10サンプルとIon PI Hi-Q Chef KitおよびIon Protonシステム(Thermo Fisher Scientific)を用いてテンプレートを配列決定した。

(3) 体細胞突然変異の同定

TMAP アライナー(Torrent Mapping Alignment Program)を使用して、Genome Reference Consortium Human Build 37(hg19)に塩基コールをアライメントし、BAM(バイナリーフォーマット)ファイルを生成した。BAM形式のシーケンスデータは、Ion Reporter software 5.0(Thermo Fisher Scientific)を用いてさらに処理した。本研究のコホートには、マッチドコントロールDNAの供給源となる正常組織サンプル(例えば、正常子宮組織や末梢血リンパ球)がなかった。そのため、1000 Genome プロジェクトの1個体(すなわち、サンプルNA12878)[26]の高信頼バリエーションコールを含むIon Reporter ワークフローのDemo Ion AmpliSeq CCP normalパッケージを使用して、一塩基多型(SNPs)を除去した。以下の基準をカットオフ値として用いた: total coverage > 20; variant coverage > 10; variant frequency > 15%; minor allele frequency < 0.1%。ポードラインだが実用的と考えられる反復バリエーションは、目視で検査した。質の低いバリエーション(すなわち、Ion Reporterの塩基コールエラー確率P値が0.05未満)は除外された。同定されたすべての一塩基バリエーション、挿入、欠失は、オープンソースのIntegrative Genomics Viewerソフトウェア(Broad Institute, Cambridge, MA, USA)を用いて視覚的に検査し、可能性のある鎖特異的エラーをフィルタリングした。呼び出されたバリエーションからSNPsを除外するためにdbSNPデータベースを使用した。SIFT、Polyphen-2、Granthamスコアは、進化的保存性とタンパク質の構造と機能に対するアミノ酸置換の効果を推定するために使用した。リードオンターゲットが25.0未満、カバレッジ深度が100未満、変異の総数が100/MBを超えるサンプルは以降の解析から除外した。

4. 研究成果

(1) 患者コホート

182人の患者が適格基準を満たした。DNAが抽出されたTN比20%以上のFFPE標本は166人の患

者について入手可能であった。121 例の DNA サンプルが品質チェックに合格し、塩基配列決定に使用した。106 例の患者について変異データが得られたが、そのうち 8 例はシーケンシングデータの質が低かったため除外され、98 例が最終解析に組み入れられた。

(2) 臨床成績

98 例の臨床病理学的特徴を表 1 にまとめた。追跡期間中央値は、全患者で 60.7 カ月(範囲、5.7~115.4) 2019 年 8 月時点で生存している患者では 65.1 カ月(範囲、5.7~115.4)であり、2019 年 8 月時点で生存している患者のうち、95.7% (69 人中 66 人) が 36 カ月以上、82.6% (69 人中 57 人) が 60 カ月以上追跡された。

全患者の 5 年全生存率 (OS)、無増悪生存率 (PFS)、局所制御率 (LC)、無転移生存 DMFS はそれぞれ 69.9%、62.6%、78.6%、69.1%であった。5 年 OS、PFS、DMFS 率は III-IVA 期患者よりも IB-II 期患者で有意に高かった (OS、81.8%対 54.1%、 $P = 0.002$ 、PFS、72.6%対 49.4%、 $P = 0.010$ 、DMFS、79.7%対 54.6%、 $P = 0.007$ 、それぞれ)。5 年 LC も同様の傾向を示したが、統計学的有意差には達しなかった (それぞれ 84.8%対 70.4% ; $P = 0.072$)。最大腫瘍径 (MTD) > 60mm で層別化した場合、5 年 OS および DMFS 率は、患者において有意に低かった (OS、75.9%対 56.7%、 $P = 0.031$; および DMFS、75.1%対 55.9%、 $P = 0.031$) ; 5 年 PFS および LC も同様の傾向を示したが、統計学的有意差には達しなかった (67.0%対 53.1%、 $P = 0.090$; および LC、81.7%対 71.2%、 $P = 0.220$)。予想通り、傍大動脈リンパ節 (PALN) 陽性患者の 5 年 OS は、PALN 陰性患者のそれよりも有意に低かった (それぞれ 46.2%対 73.6% ; $P = 0.008$)。5 年 OS は、CCRT を受けた患者の方が受けなかった患者よりも有意に高かった (それぞれ 77.3% vs 57.0% ; $P = 0.032$)。

Characteristic	Total patients (n = 98)	FGFR wild-type (n = 74)	FGFR mutant (n = 24)
Follow-up period, months	60.7 (5-115)	60.9 (7-103)	55.5 (5-115)
Median age at diagnosis, years	59 (29-88)	61 (29-88)	56 (35-80)
Clinical stage (FIGO stage)			
IB	11 (11.2%)	8 (10.8%)	3 (12.5%)
II	45 (45.9%)	34 (46.0%)	11 (45.8%)
III	35 (35.7%)	26 (35.1%)	9 (37.5%)
IVA	7 (7.1%)	6 (8.1%)	1 (4.2%)
Tumor size at diagnosis (mm)			
≤40	17 (17.3%)	14 (18.9%)	3 (12.5%)
40-60	51 (52.0%)	39 (52.7%)	12 (50.0%)
>60	30 (30.7%)	21 (28.4%)	9 (37.5%)
Pelvic lymph node metastasis (PeLN)			
Negative	47 (48.0%)	40 (54.1%)	7 (29.2%)
Positive	51 (52.0%)	34 (45.9%)	17 (70.8%)
Para aortic lymph node metastasis (PALN)			
Negative	85 (86.7%)	63 (85.1%)	22 (91.7%)
Positive	13 (13.3%)	11 (14.9%)	2 (8.3%)
Histological type			
Squamous cell carcinoma	82 (83.7%)	59 (79.7%)	23 (95.8%)
Adenocarcinoma	12 (12.2%)	11 (14.9%)	1 (4.2%)
Adenosquamous carcinoma	4 (4.1%)	4 (5.4%)	0 (0%)
Concurrent chemotherapy			
Yes	63 (64.3%)	47 (63.5%)	16 (66.7%)
No	35 (35.7%)	27 (36.5%)	8 (33.3%)
HPV type ^a			
Clade 9	49 (50.0%)	36 (48.6%)	13 (54.2%)
Clade 7	13 (13.3%)	11 (14.9%)	2 (8.3%)
Others	7 (7.1%)	5 (6.7%)	2 (8.3%)
Multiple ^b	4 (4.1%)	3 (4.1%)	1 (4.2%)
Undetermined	25 (25.5%)	19 (25.7%)	6 (25.0%)

表 1 . 患者背景

(3) 子宮頸がんにおけるがん関連遺伝子体細胞変異の罹患率

各サンプルは、クオリティフィルタリング後に平均 1,330 万シーケンシングリードを受けた。平均カバレッジは 1 塩基あたり 739 リードであった。合計で、98 人の患者の 305 遺伝子に 1144 の非同義変異が同定された。

最も多く変異した 16 遺伝子を患者の臨床病理学的特徴とともに図 1 にまとめた。PIK3CA の変異は、調査された 409 遺伝子の中で最も多く、患者の 35.7% (35/98) に 40 の変異があった。PIK3CA 変異を有する 35 人の患者のうち、31 人は特徴付けられた活性化変異を有していた: E545K (n=17)、E542K (n=8)、E726K (n=4)、E542K と E726K (n=1)、E545K と E726K (n=1) であった。

その他の再発変異は、ARID1A (25.5%)、NOTCH1 (19.4%)、FBXW7 (19.4%)、EP300 (12.2%) で観察された。また、TP53 (13.3%)、RB1 (5.1%)、PTEN (4.1%)、ERBB2 (7.1%)、ERBB3 (2.0%)、KRAS (4.1%)、SMAD4 (1.0%) にも変異が認められた。これらの変異の頻度は、以前の報告 [文献 10, 11, 12, 13] でみられたものと同程度であった。

FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4 の変異は、それぞれ 3 人、3 人、21 人、11 人の患者に観察された。24 人の患者における 38 の変異のうち、細胞外 FGFR ドメインに位置し、構成的二量体化を引き起こす FGFR2 S252W 変異と FGFR3 S249C 変異はよく知られている。さらに、同定された FGFR 変異の 55.3% (38 個中 21 個) は、細胞内チロシキナーゼドメインに位置していた。

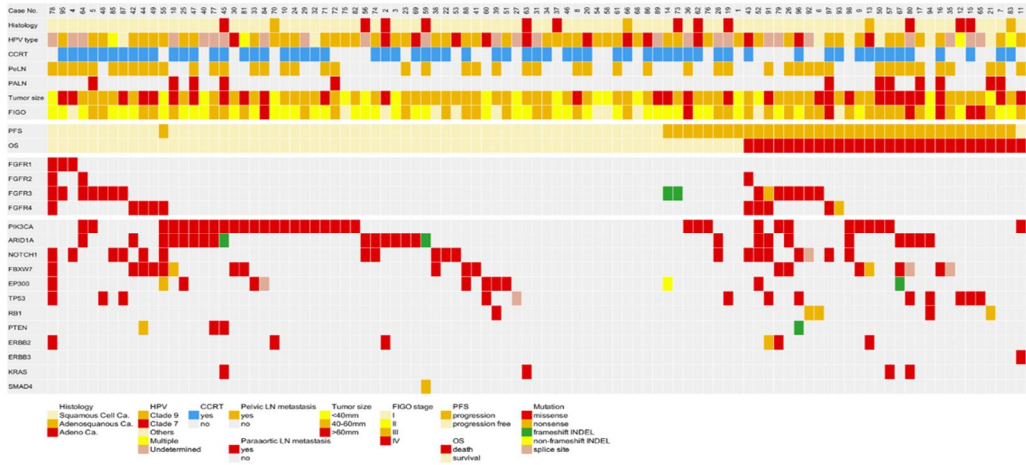


図1 . 子宮頸癌生検標本 98 例の体細胞変異の概要。臨床病理学的パラメータ、無増悪 / 進行状態、生存 / 死亡状態、および有意に変異した遺伝子は、変異のタイプに従って配色した。

(4) FGFR 突然変異の状態と臨床転帰との関連性

FGFR 変異により層別化した患者特性を表 1 に示す。5 年 PFS は、FGFR 変異陽性患者 (n=24) の方が FGFR 変異陰性患者 (n=74) よりも有意に不良であった (それぞれ 43.9% 対 68.5%; $P=0.010$)。FGFR 遺伝子変異陽性患者の 5 年 OS、LC、DMFS 率は、FGFR 遺伝子変異陰性患者の 5 年 OS、LC、DMFS 率より悪い傾向にあったが、その差は有意ではなかった (OS、74.2% 対 56.5%、 $P=0.104$; LC、80.6% 対 71.7%、 $P=0.397$; DMFS、73.1% 対 56.7%、 $P=0.053$) (図 2)。多変量解析では、FGFR 遺伝子変異の有無および臨床病理学的因子 (FIGO 病期、MTD、PALN 病変、および CCRT) が変数として同定された。FGFR 遺伝子変異は、III-IVA 期および CCRT 期 (それぞれ、 $P=0.042$ および 0.009) とともに、5 年 PFS を低下させる有意な独立予測因子であった ($P=0.005$) (表 2)。ステージ III-IVA と CCRT もまた、5 年 OS 悪化の有意な独立予測因子であった (それぞれ $P=0.036$ と 0.002)。

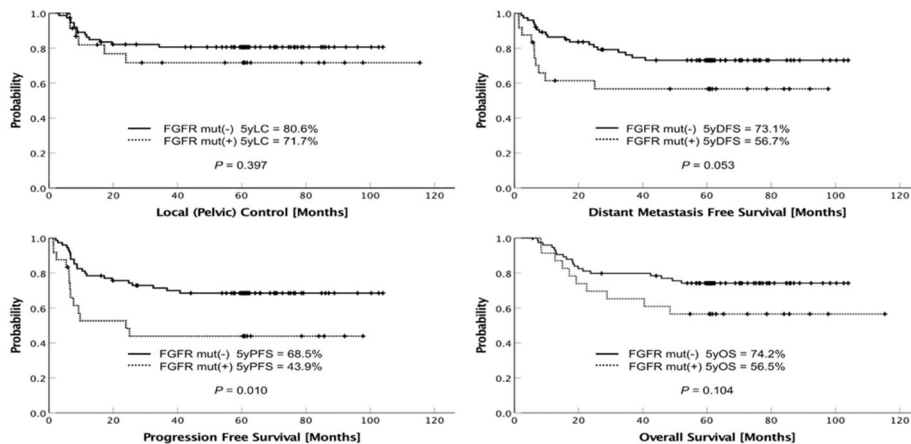


図2 .FGFR における突然変異の予後への影響。FGFR 変異に応じた局所(骨盤)コントロール(A)、遠隔転移のない生存期間(B)、無増悪生存期間(C) および全生存期間(D)を示す。実線: FGFR 変異陰性患者; 破線: FGFR 変異陽性患者。

- (文献 1) Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al., Science 2006;313:1960-4.
- (文献 2) Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G., Nat Rev Clin Oncol 2011;8:151-60.
- (文献 3) Sato H, Yoshimoto Y, et al., Nature Communications, 2017; 8: 1751.
- (文献 4) Yoshimoto Y, Suzuki Y, Mimura K, et al., PLoS One 2014;9:e92572.
- (文献 5) Lee Y, Auh SL, Wang Y, et al., Blood 2009;114:89-95.
- (文献 6) Takeshima T, Chamoto K, Wakita D, et al., Cancer Res 2010;70:2697-706.
- (文献 7) T. Nakagaki, et al., Tumour Biol. 40 (2018) (1010428318800180).
- (文献 8) R.R.Singh et al. J. Mol. Diagn. 15 (2013) 607-622.
- (文献 9) H.Ikeda, et al., Onco Targets Ther. 8 (2015) 2805-2815.
- (文献 10) A.I. Ojesina, et al., Nature 506 (2014) 371-375.
- (文献 11) Cancer Genome Atlas Research N, et al., Nature 543 (2017) 378-384.
- (文献 12) S. Scholl, et al., EBioMedicine 43 (2019) 253-260.
- (文献 13) J. Huang, et al., J. Med. Genet. 56 (2019) 186-194.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshimoto Yuya, Sasaki Yasushi, Murata Kazutoshi, Noda Shin-ei, Miyasaka Yuhei, Hamamoto Junko, Furuya Mio, Hirato Junko, Suzuki Yoshiyuki, Ohno Tatsuya, Tokino Takashi, Oike Takahiro, Nakano Takashi	4. 巻 159
2. 論文標題 Mutation profiling of uterine cervical cancer patients treated with definitive radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 546 ~ 553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygyno.2020.08.020	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0件

〔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	尾池 貴洋 (Oike Takahiro) (10643471)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	
研究分担者	吉本 由哉 (Yoshimoto Yuya) (80594390)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	

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
---------	---------