

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791307

研究課題名(和文) 頭頸部悪性黒色腫に対する重粒子線治療における患者検体遺伝子解析による予後予測

研究課題名(英文) Prognostic prediction using gene analysis of patient samples for patients with malignant melanoma of the head and neck treated with carbon ion therapy

研究代表者

出水 祐介 (Demizu, Yusuke)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50452496

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)：頭頸部悪性黒色腫患者の血液検体を重粒子線治療前に採取し、その遺伝子解析結果と予後データの相関関係を分析することにより、治療前に予後を予測するモデルを作成した。患者51名、健常者5名の検体のDNAマイクロアレイ解析にて遺伝子発現データを取得し、主成分分析にて遺伝子発現量の主成分得点を算出した。重粒子線治療後の予後データと主成分得点との相関関係をスピアマンの順位相関係数にて検定し、一部の患者データを用いて遺伝子発現量と予後との関連性を構築した。これを残りの患者データを用いて検証し、有効であることを確認した。このモデルを臨床応用できれば、治療成績の向上だけでなく、重粒子線の有効活用にもつながる。

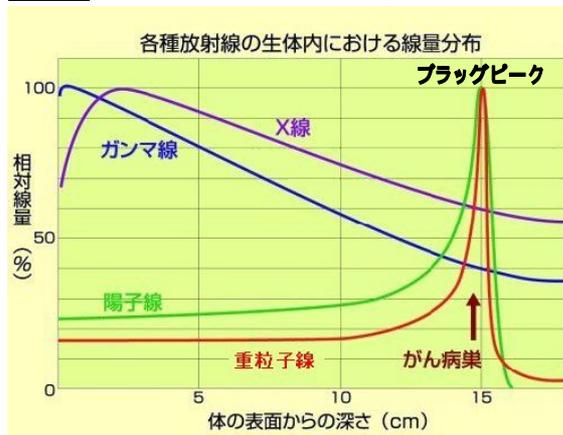
研究成果の概要(英文)：We developed a model which predicts prognosis before treatment by analyzing correlations between gene expressions of patient blood sample and prognostic data. Gene expressions were obtained by DNA microarray analysis of samples from 51 patients and 5 healthy volunteers, then Principal Component Scores (PCs) of gene expressions were calculated using Principal Component Analysis. Correlations between prognostic data after carbon ion therapy and PCs were tested using Spearman's rank correlation coefficient and developed a relationship between gene expressions and prognosis by a part of patient data. After that, we evaluated the model by the rest of patient data and confirmed its usefulness. If we can use this model in clinical practice, it will lead to not only improvement of treatment results but also effective use of carbon ion facilities.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：粒子線治療 悪性黒色腫 遺伝子解析 予後予測

## 1. 研究開始当初の背景

荷電粒子線は**ブラッグピーク**（下図参照）というX線にはない物理特性を持ち、**がん病巣への高度な線量集中を可能にしているため、がん周囲の重要臓器への不必要な照射を避けられる**。がんそのものへの投与線量を**増加できる**。高い**がん制御率と少ない副作用を両立できる**。現在臨床応用されている粒子線は陽子線と重粒子線（炭素イオン線）であるが、生物学的効果に関しては、陽子線はX線とほぼ同等、**重粒子線はより優れた生物効果を持つとされている**。特に、**脳や神経などの重要臓器が密集している頭頸部領域での重粒子線治療の有用性は高く、有効な治療法がほとんどないとされる粘膜悪性黒色腫に対して5年局所制御率84%**（Yanagi et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2009）という**良好な治療成績が報告されている**。また、**副作用に関してもX線治療に比して低率・低重症度であると報告されている**。



以上のように“究極のがん治療”とも言われる重粒子線治療であるが、健康保険の適応となっておらず（先進医療）照射に関わる費用（約300万円）は全額自己負担である。また、日本国内に3施設（放射線医学総合研究所、兵庫県立粒子線医療センター、群馬大学）しかなく、治療可能患者数が限られているため、受けたくても受けられない患者が多数存在する。それに関わらず、他の治療法と同じく、ある患者に有効かどうかは「やってみないと分からない」のが現状である。研究代表者は兵庫県立粒子線医療センターに所属する臨床医（放射線腫瘍医）として、「**遺伝子解析を行うことで、ある患者に対して重粒子線治療が有効かどうか事前に分かれば、患者個人にとって大きな福音であることは言うまでもなく、医療経済的にも限られた医療資源の有効活用につながる**」と考え、本研究の着想に至った。対象は、**難治性がんの代表であり、重粒子線治療が他の治療法よりも有効とされている頭頸部粘膜悪性黒色腫患者とした**。

## 2. 研究の目的

難治性がんの代表である頭頸部粘膜悪性黒色腫患者の血液検体を重粒子線治療の前

に採取し、その遺伝子解析結果と重粒子線治療の副作用や予後（再発の有無および生死）といった臨床データの相関関係を分析し、有意な遺伝子発現を同定することにより、治療前に予後（ここでは広い意味で治療の副作用も含む）を予測する方法の確立を目的とする。重粒子線治療が有用な患者を事前に知ることができれば、治療成績の向上につながるだけでなく、重粒子線という貴重な医療資源の有効活用にもつながる。

## 3. 研究の方法

### (1) 患者選択および同意書の取得

兵庫県立粒子線医療センター治療基準の適格基準を満たし、不適格条件に該当しない頭頸部粘膜悪性黒色腫で比較的長期（6ヶ月以上）の生存が期待できる患者（根治症例）を対象とする。

初診時または治療準備開始時に患者用説明文書を用いて説明し、同意を得られた患者から同意書を取得する。

### (2) 検体の採取

同意書を取得した患者から治療準備開始時の採血の際に10mLをPAXgene採血管（日本ベクトン・デッキンソン）にて採取する。

### (3) 副作用、再発の有無および生死の判定

兵庫県立粒子線医療センターにおける通常の診療に則って治療前・中・後の診察、各種検査（頭頸部内視鏡、頭頸部MRI、頭頸部CT、採血）を行う。

副作用はNational Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events ver. 4.0（NCI-CTCAE v. 4.0）に従って判定する（Grade 0-4）。

治療終了後は、通常の診療に則って経過観察を行い、局所再発や遠隔転移の有無および生死を判定する。

### (4) 検体のDNAマイクロアレイ解析

血液検体からのRNA回収：

血液検体からPAXgene Blood RNA Kit（日本ベクトン・デッキンソン）にてRNAを回収する。回収RNAは、アガロースゲル電気泳動にて確認する。

遺伝子発現解析用マイクロアレイチップ処理：

3' IVT Express Kit（Affymetrix社）によりサンプルを調整後、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0チップ（Affymetrix社）にハイブリダイゼーションして、遺伝子発現解析を行う。全サンプルを同一条件下で、アレイチップ上の全遺伝子（54675遺伝子）にRNAがハイブリダイズする49 Formatにより、ハイブリダイゼーション反応を行う。

### (5) 臨床データと遺伝子発現プロファイルの相関関係の検討

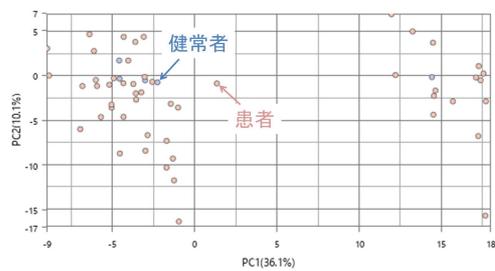
予後データの各項目について、一定量以上の発現増加または減少の見られた 50 遺伝子を抽出する。  
主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA) にて遺伝子発現量の主成分得点 (Principal Component Score: PCS) を算出する。  
予後データと PCS との相関関係を Spearman の順位相関係数にて検定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 解析対象

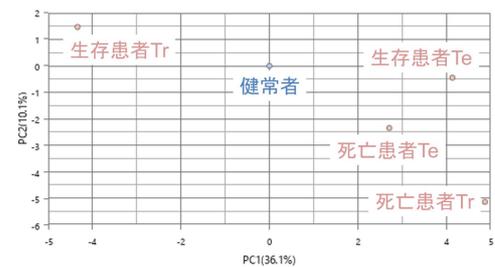
- 患者 51 名 (観察期間 2~67 ヶ月: 中央値 18 ヶ月)
- 健常者 5 名 (対照として使用)

##### (2) 生死における PCS の散布図



- 1.5 倍以上増加または 1.7 倍以上減少の発現変化が見られた 50 遺伝子で算出

##### (3) 生死における群ごとの PCS 平均値



- 健常者: 5 検体  
対照として用いているため原点に来る。
- 患者 Tr (Training set): 38 検体  
予後データと PCS との相関関係を算出するためのデータセット
- 患者 Te (Test set): 13 検体  
上記で算出された相関関係を検証するためのデータセット

##### (4) 生死/再発と PCS との相関関係

生存・死亡 (局所再発あり)・死亡 (遠隔転移あり) における Spearman の順位相関係数を算出。  
生存 > 死亡 (局所再発あり) かつ 生存 > 死亡 (遠隔転移あり) を予後良好、これら以外を予後不良とし、Training set を判定。

	生存	死亡		予後予測
		局所再発あり	遠隔転移あり	
生存患者	0.70	0.12	0.18	良好
	0.69	0.21	0.34	良好
	0.67	0.07	0.12	良好
	0.66	0.06	0.14	良好
	0.62	0.22	0.23	良好
	0.61	0.31	0.29	良好
	0.60	0.22	0.35	良好
	0.56	0.13	0.24	良好
	0.52	0.36	0.36	良好
	0.50	0.35	0.43	良好
	0.48	0.30	0.31	良好
	0.46	0.33	0.34	良好
	0.38	0.38	0.18	良好
	0.35	0.19	0.00	良好
	0.33	0.24	0.28	良好
死亡患者	0.59	0.27	0.31	良好
	0.55	0.16	0.33	良好
	0.36	0.32	0.26	良好
	0.53	0.32	0.55	不良
	0.49	0.49	0.58	不良
	0.46	0.38	0.56	不良
	0.45	0.67	0.63	不良
	0.43	0.30	0.46	不良
	0.42	0.49	0.49	不良
	0.41	0.42	0.53	不良
	0.40	0.41	0.57	不良
	0.40	0.49	0.54	不良
	0.38	0.22	0.54	不良
	0.36	0.38	0.68	不良
	0.33	0.54	0.60	不良
0.32	0.44	0.54	不良	
0.30	0.12	0.37	不良	
0.29	0.50	0.25	不良	
0.27	0.38	0.35	不良	
0.23	0.38	0.32	不良	
0.17	0.47	0.69	不良	
0.06	0.57	0.45	不良	
0.04	0.35	0.55	不良	

同じ基準を用いて、Test set を判定したところ、生存患者の大部分が予後良好と判定され、死亡患者の大部分が予後不良と判定され、この予測モデルの有用性が示された。

	生存	死亡		予後予測
		局所再発あり	遠隔転移あり	
生存患者	0.55	0.14	0.21	良好
	0.55	0.19	0.38	良好
	0.39	0.15	0.24	良好
	0.22	0.17	0.05	良好
	0.31	0.18	0.48	不良
死亡患者	0.55	0.39	0.51	良好
	0.43	0.12	0.37	良好
	0.50	0.57	0.63	不良
	0.42	0.38	0.50	不良
	0.37	0.40	0.59	不良
	0.37	0.43	0.64	不良
	0.23	0.61	0.34	不良
0.21	0.56	0.28	不良	

(5)研究成果の意義

- 重粒子線治療前に血液検体を用いて頭頸部悪性黒色腫患者の予後を予測するモデルを作成した。
- このモデルを臨床応用できれば、重粒子線治療が有用な患者を事前に知ることができ、治療成績の向上につながるだけでなく、重粒子線という貴重な医療資源の有効活用にもつながると考える。

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0件)

[学会発表](計2件)

出水祐介、前田拓也、ノル・シャズリナ・スライマン、永野史子、寺嶋千貴、藤井收、金東村、山本道法、豊増泰、橋本直樹、脇隆博、丹羽康江、不破信和、沖本智昭、頭頸部悪性黒色腫患者におけるマイクロアレイを用いた重粒子線治療前予後予測モデルの検討、日本頭頸部癌学会、2016.6.10、さいたま市(埼玉県)【発表確定】

出水祐介、前田拓也、ノル・シャズリナ、永野史子、寺嶋千貴、藤井收、金東村、沖本智昭、頭頸部悪性黒色腫患者におけるマイクロアレイを用いた重粒子線治療前予後予測モデルの検討、日本医学放射線学会関西地方会、2016.2.20、大阪市(大阪府)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

出水 祐介(DEMIZU, Yusuke)  
神戸大学・大学院医学研究科・客員准教授  
研究者番号：50452496

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし