

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861010

研究課題名(和文) DNA修復蛋白の発現を利用した放射線治療効果の予測

研究課題名(英文) The prediction of results of radiotherapy with expression of proteins involved with DNA repair

研究代表者

長谷川 智一 (Hasegawa, Tomokazu)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80631168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の放射線治療において、Ku70の発現は臨床所見(グリソンスコア、D'amicoリスク分類)と相関がなく、独立した予測因子であった。PSA再発の予測因子として、グリソンスコア単独と比較してグリソンスコアとKu70発現を組み合わせると予測能が向上した。放射線治療とホルモン治療を併用した患者において、グリソンスコア7以下またはKu70低発現の患者ではPSA再発は一例も認めなかった。一方で、グリソンスコア8以上かつKu70高発現の患者では高いPSA再発率を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between the expression of proteins involved with NHEJ and results of radiotherapy for prostate cancers. One hundred patients were treated with radiotherapy between March 2001 and October 2010. Formalin-fixed, paraffin-embedded specimens from pretreatment needle biopsy were assessed for Ku70, Ku86 and XRCC4. The number of cells that stained positive for Ku70, Ku86 and XRCC4 were determined the percentages of cells that were positive for the expression of Ku70, Ku86 and XRCC4. Of the 100 patients, 23 experienced biochemical failure. On univariate analysis, irradiation method, radiation dose and the expression of Ku70 had the significance for biochemical failure. On multivariate analysis, irradiation method, gleason score and the expression of Ku70 were significant independent prognostic factors for biochemical recurrence. The higher expression of Ku70 indicated the significantly deteriorated PSA relapse in radiotherapy of prostate cancer.

研究分野：医歯学

キーワード：放射線治療 前立腺癌 DNA修復

## 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が照射されているが、同じ組織型の腫瘍でも、照射の効果が異なることをしばしば経験する。また、患者間で照射による副作用の程度が大きく異なる場合もしばしばみられ、それは、患者間での正常組織の放射線感受性が大きく異なることに起因する。従って、**癌細胞の放射線感受性及び患者の照射に対する耐容能力に応じた個別化した放射線治療が求められている。**

細胞の本質的放射線感受性に関しては、最近の基礎研究により、**X線による細胞死に最も関係するDNA二重鎖切断(DSB)の修復メカニズムが急速に解明されつつある。**DNA二重鎖切断は相同組換え修復と非相同末端結合修復の少なくとも2経路により再結合され、ほ乳類の細胞では、非相同末端結合修復が主たるDNA二本鎖切断修復経路である。**非相同末端結合修復の概略は、DNA-PK(DNA依存性プロテインキナーゼ)が、DNA二重鎖切断の断端に結合し、リガーゼIVと結合しているXRCC4蛋白をリン酸化し、リガーゼIVを安定化して、リガーゼIVがDNA切断を再結合するというものである。**

前立腺癌の治療方針は、T stage、グリソンスコア、PSA値によって決定される。これらの臨床所見は放射線治療後の前立腺癌の局所再発を予測するリスク因子としては十分ではない。放射線感受性に関する指標が局所再発の可能性を予測するうえで必要とされる。

## 2. 研究の目的

生検標本を用いて、DNA二重鎖切断修復に関わる蛋白の発現を免疫組織染色で検討し、前立腺癌の放射線治療成績との相関関係を解析する。これまでの我々の研究室の研究に

て、XRCC4を高発現している食道癌は、低発現に比べ、全生存率や局所制御率が有意に不良で、多変量解析にて、独立した予後因子であることを明らかにした(論文投稿中)。しかし、大腸癌で予後因子と報告されているKu70(Cancer 95; 1199-1205, 2002)が食道癌では予後因子ではなく、癌の種類により、予後因子となりうる蛋白が異なる可能性がある。そこで、大腸癌、食道癌、子宮頸部癌、前立腺癌など、癌ごとに、非相同末端結合修復に関する蛋白量を解析し、**臨床上、有用な放射線治療効果の予測法の確立を目指す。**

## 3. 研究の方法

免疫組織染色～前立腺癌で放射線治療前における、放射線治療前に採取された生検組織を用いて、DNA二重鎖切断の非相同末端結合修復に関する蛋白であるXRCC4、DNA-PKcs、Ku70、Ku86について免疫染色を施行した。標本の腫瘍組織の中で最も強く染色される領域について、蛋白の発現率を算出した。各生存曲線の算出はカプランマイヤー法を用い、生存曲線の比較にはログランク法を用いた。コックス比例ハザードモデルを用いた全生存率における単変量、多変量解析を行い、予後因子を検討した。

我々は2007年8月から2010年10月までの期間にIMRTによる放射線治療を受けた前立腺癌患者の58例について探索群として解析し、2001年3月から2007年5月までの期間に3DCRTによる放射線治療を受けた前立腺癌患者42例について検証群として解析した。病理標本を用いて非相同末端結合修復に関する蛋白について免疫組織染色を施行した。

## 4. 研究成果

[治療成績]

PSA再発は探索群58人のうち7人、検証群42人のうち16人で見られた。再発までの中央期

間は39か月(8-115か月)であった。再発のない患者のうち、探索群の観察中央期間は52か月(25-58か月)、検証群は88か月(32-120か月)であった。

#### [生検標本における非相同末端結合修復関連蛋白の発現]

腫瘍細胞の核を Ku70, Ku86, XRCC4 で染色した。Ku70, Ku86, XRCC4 の陽性率はそれぞれ 66.4%(0-100%)、62.8%(0-100%)、91.2%(3.4-100%)であった。Ku70 と Ku86 ( $r=0.317$ ,  $P=0.0013$ ), Ku70 と XRCC4 ( $r=0.421$ ,  $P<0.001$ ), Ku86 と XRCC4 ( $r=0.239$ ,  $P=0.0167$ )、それぞれについて弱い相関関係を認めた。

各々の患者につき8-14本の生検標本があり、そのうち2つについて選択し検証した。2つの標本の陽性率の差は平均5.2%であった。

#### [PSA再発と様々なパラメータの関係]

非相同末端結合修復関連蛋白の発現のカットオフ値を決定するために、カプランマイヤー法とログランク検定による最小P値法を用いた。それにより Ku70 発現のカットオフ値は68.4%となった。探索群において、単変量解析ではグリソンスコア、Ku70、Ku86 発現が PSA 再発の独立した予測因子であり、多変量解析では、グリソンスコアと Ku70 発現が予測因子であった。

統計的に独立性と一般化を示すために、同じカットオフ値を検証群に用いた。この解析では、Ku70発現とアジュバントホルモンの有無がPSA再発の予測因子であった。多変量解析では、Ku70発現が独立した再発予測因子であり、一方、グリソンスコアとアジュバントホルモン療法は傾向を認めた。

#### [Ku70発現と臨床パラメータ]

Ku70発現はグリソンスコアやD'amicoリスク分類といった様々な臨床パラメータと

は相関を示さなかった。Ku70発現は独立した予測因子といえる。

#### [探索群におけるPSA再発とグリソンスコア、Ku70発現の関係]

グリソンスコアが8以上の患者は、7以下に比べて有意にPSA再発率が高かった ( $P=0.009$ )。加えて、Ku70高発現の患者はKu70低発現に比べて有意にPSA再発率が高かった ( $P=0.011$ )。グリソンスコアとKu70発現を組み合わせるとPSA再発を予測するとき、グリソンスコア8以上かつKu70高発現の患者群が、その他の3群と比べて有意にPSA再発率が高かった ( $P<0.001$ )。

#### [アジュバントホルモン療法の影響]

放射線治療単独群では、グリソンスコア8以上かつKu70高発現の患者群はその他の3群と比べて高いPSA再発率を示したけれども、おそらく患者数が少ないため有意差は認めなかった ( $P=0.109$ )。放射線治療とホルモン療法を施行した患者では、グリソンスコア7以下またはKu70低発現の患者においてはPSA再発を一例も認めなかった。しかしながら、グリソンスコア8以上かつKu70高発現の患者は有意に高いPSA再発率を示した ( $P=0.031$ )。グリソンスコア8以上かつKu70高発現の患者においては、放射線治療単独とホルモン療法を加えた群ではPSA再発率に有意な差は認めなかった ( $P=0.556$ )。

同様の結果を検証群でも認めた。

図1 Ku70とKu86の発現率の相関について

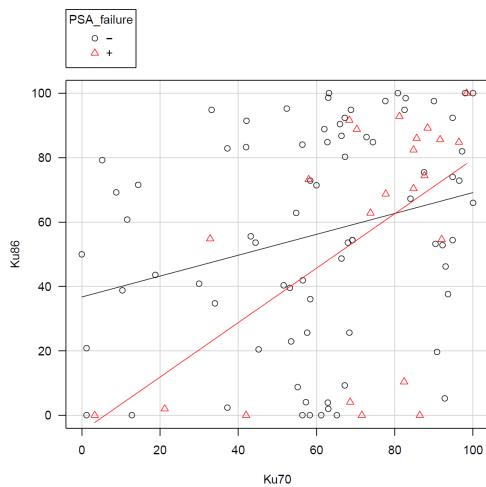
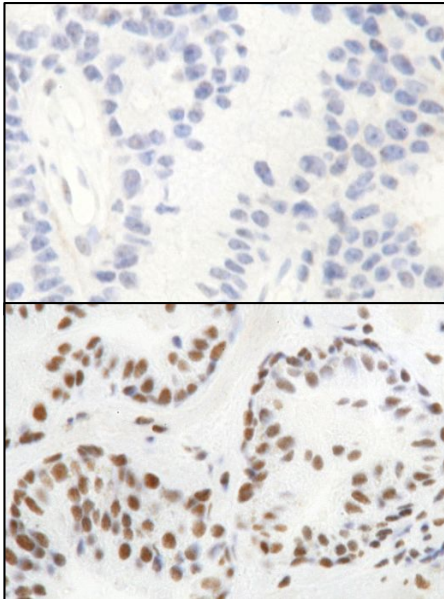


図2 Ku70 の前立腺癌組織における発現



上) Ku70 : 低発現

下) Ku70 : 高発現

図3 単変量解析と多変量解析の結果

Univariate analysis

variable	PSA failure		p value
	(-)	(+)	
Age			
<70	26	13	0.0563
≥70	51	10	
Radiation Dose			
76Gy	45	5	0.0037
<76Gy	32	18	
Clinical T stage			
T1c	48	9	0.0578
T2a-T4	29	14	
Gleason score			
≤6,7(3+4)	39	6	0.0552
≥8,7(4+3)	38	17	
D'amico risk			
High	38	12	0.8930
Intermediate	28	9	
Low	11	2	
AHT			
(-)	55	20	0.1740
(+)	22	3	
Ku70			
High	26	17	0.0014
Low	51	6	
Ku86			
High	41	16	0.2310
Low	36	7	
XRCC4			
High	40	7	0.0957
Low	37	16	

Multivariate analysis (Cox model)

variable	HR	95%CI	p value
Adjuvant hormone therapy	4.130	1.610-19.100	0.0270
Gleason(>4+3)	5.217	1.949-13.970	0.0010
Ku70(>68.4)	7.836	2.830-21.700	<0.0001

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 1 件)

Hasegawa T, Someya M, Hori M, Nakata K, Nojima M, Kitagawa M, Tsuchiya T, Tateoka K, Hasegawa T, Sakata K. The expression of Ku70 predicts results of radiotherapy in prostate cancer. Strahlenther Onkol, in press.

〔学会発表〕(計 1 件)

Hasegawa T, Someya M, Nakata K, Hori M, Takada Y, Kitagawa M, Fukushima Y, Gocho T, Sakata K. Analysis of Ku and XRCC4 expression in prostate cancer treated with radiotherapy. 日本放射線腫瘍学会第28回

学術大会、2015年11月20日、ペイシア文化ホール・前橋商工会議所会館（群馬県前橋市）

6．研究組織

(1)研究代表者

長谷川 智一（HASEGAWA, Tomokazu）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80631168