

論文の内容の要旨

論文題目 子宮頸癌根治的放射線治療の long non-coding RNA 発現を含めた
臨床予後解析

氏 名 小林 伶子

【背景】

子宮頸癌に対する根治的放射線治療は、画像誘導小線源治療（image-guided brachytherapy (IGBT)）などの放射線治療技術の進歩と、化学放射線療法（chemoradiation therapy (CRT)）の導入により、劇的に変化した。IGBT は、腔内照射時に取得した 3 次元画像上に腫瘍・正常臓器の輪郭形成を行い、腫瘍の形状に合わせた線量投与や腫瘍への線量増加を可能にし、局所制御の向上を導いた。一方、CRT は、放射線単独治療と CRT とを比較したランダム化比較試験およびメタアナリシスでその優勢が証明され、局所進行癌の標準治療となった。

こうした背景から 2 つの課題を設定した。1 つは、再発部位の詳細な解析である。IGBT などの放射線治療技術の進歩は、将来、照射範囲・線量の点でさらなる高精度化・個別化をもたらすと予測されるが、それには現行の治療での再発リスク部位の把握が必要である。従来主要な遠隔再発部位とされていた傍大動脈リンパ節（para-aortic lymph node (PALN)）領域を初期治療の段階から含める拡大予防照射や、近年報告のあるリンパ節転移への追加照射などの、範囲や線量の拡大の妥当性についても議論する。もう 1 つは、分子レベルの予後因子の探索である。CRT の放射線単独治療への上乗せ効果は、進行例では小さい。従って、CRT が奏功するかの見極めや正確な予後の推測が重要となる。そこで近年注目されている non-coding RNA (ncRNA) のうち、long non-coding RNA (lncRNA) に着目した。ncRNA は、ゲノム領域から転写されるがタンパク質に翻訳されない RNA で、細胞の様々な現象に関わっている。その中のひとつである lncRNA は未解明部分が多く、子宮頸癌の予後との関連についての報告も存在しなかった。予後因子となる lncRNA が発見できれば、将来の核酸医薬の開発に貢献できるかもしれない。

【方法】

2001～2013 年に東京大学医学部附属病院放射線科で子宮頸癌に対して根治的放射線治療を受けた連続症例のうち、病理学的診断があり、国際臨床進行期分類（International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)）IB～IVA 期（PALN 転移陽性症例も含む）で、外照射と腔内照射を受けた 125 例の再発様式・部位を解析した。lncRNA 発現解析では、病理検体を用

いるため、このうち、扁平上皮癌で、治療前の原発巣生検組織がホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE)) サンプルとして保存されている症例 (PALN 転移陽性症例は除外) とした。該当した 90 例のサンプルの腫瘍含有率を病理学専門医が評価し、75 サンプルが適切なサンプルと判定され、解析の対象となった。

骨盤内リンパ節領域を評価する上で、総腸骨、外腸骨、内腸骨、閉鎖、仙骨前領域を定義し、外腸骨領域を内側、中間、外側の 3 つに、閉鎖領域を頭側、尾側の 2 つに分類した。

放射線治療は、全骨盤への外照射と腔内照射により行われた。局所進行期、巨大腫瘍、リンパ節転移のいずれかに該当する症例では CRT が施行された。

lncRNA 発現量解析では、RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE を用いて FFPE サンプルから total RNA を抽出し、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) を用いて逆転写反応により相補的 DNA を得たのち、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) を用いて定量ポリメラーゼ連鎖反応を行った。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロールとして使い、75 サンプルのうちの特定の 1 サンプルをコントロールとした相対定量を行った。XIST、Tsix、TERC、DHFR upstream transcripts、Air の 5 種類の lncRNA について発現量を解析し、それぞれ発現量相対値の中央値あるいはその付近の値により高発現群と低発現群の 2 群に分け、発現量と予後の解析を行った。

【結果】

初期効果および再発様式

観察期間中央値は 51.8 ヶ月 (生存例に限ると 64.1 ヶ月) であった。125 例中 111 例 (89%) で完全奏功 (complete response (CR)) が得られ、14 例 (11%) は CR に至らなかった (non-CR)。CR の 111 例のうち、35 例 (32%) が経過観察中に再発し、再発までのインターバル中央値は 9.3 ヶ月であった。初回再発部位は、照射野内 9 例、照射野外 19 例、照射野内外 7 例であった。

再発部位の詳細

14 例の non-CR 症例では、8 例が照射野内、特に局所病変の残存 (±遠隔転移出現)、6 例では照射野内病変は消退したが遠隔転移が出現していた。また、CR 症例と比べ、骨盤内リンパ節転移、PALN 転移、最大腫瘍径、治療前ヘモグロビン値において、不良因子が有意に多かった。

9 例の CR 後照射野内再発例では、全例で局所再発であった。興味深いことに、骨盤内リンパ節単独の再発はみられなかった。

19 例の CR 後照射野外再発例では、最多部位が肺で (11 例 (58%))、孤立性 PALN 転移が出現した症例は 2 例であった。

125 例全体 (41 例が骨盤内リンパ節陽性) の骨盤内リンパ節転移に着目した。治療前、転移

の頻度が最も高かった領域は閉鎖領域頭側であった。残存／増悪／初回再発としての骨盤内リンパ節転移を来したのは 7 例（5.6%）で、重要なことに、この 7 例すべてにおいて、骨盤内リンパ節転移は孤立性病変ではなく、同時性他病変が存在していた。また、これらの骨盤内リンパ節転移も閉鎖領域頭側（7 例中 6 例）に最も多かった。

孤立性 PALN 転移に着目すると、治療前 PALN 転移陰性 108 例では、残存／増悪／初回再発としての孤立性 PALN 転移が認められたのは 4 例（3.7%）であった。

予後因子としての lncRNA の探索

XIST の発現が有意に予後と相関していた。XIST 発現量を高発現群（45 例）と低発現群（30 例）に分けると、5 年全生存率（overall survival (OS)）は、高発現群 83.2%、低発現群 50.1%（ $P=0.0050$ ）であった。多変量解析でも XIST 発現量が有意に OS と相関している可能性があった（ $P=0.045$ 、ハザード比：2.59、95% 信頼区間：1.02～7.13）。

【考察】

再発様式・部位の解析では、non-CR 例の半数以上、照射野内再発例の全例が、原発巣に残存／初回再発を来していた。日本では欧米に比べ A 点への処方線量が低く設定されているが、IGBT が進歩すれば、腫瘍の形状・縮小率に合わせた個別化した治療と線量増加が可能となる。欧米では IGBT での線量効果関係が示され、局所進行例や外照射への反応不良例では線量効果曲線が右にシフトするとされている。日本でもこのような症例には IGBT を用いた原発巣の線量増加が必要と考えられる。

また、治療前に骨盤内リンパ節転移が存在していても、その制御は良好であることが分かった。41 例の骨盤内リンパ節転移陽性症例を含めた全 125 例中、残存／増悪／初回再発としての骨盤内リンパ節転移が認められたのは 7 例（5.6%）のみで、しかもこれら全例において同時性他病変が存在していた。骨盤内リンパ節転移の制御は、多くの場合現行の線量で良好であること、それでも制御不能のケースは存在するが、そのようなケースでは追加照射よりも全身化学療法の強化が妥当であることが見いだされた。さらに、残存／増悪／初回再発としての骨盤内リンパ節転移は、閉鎖領域頭側に多かった。リンパ節領域を高リスク領域と低リスク領域に分けた線量調整も検討されるべきかもしれない。

さらに、従来主要な再発部位とされていた PALN 転移に着目すると、残存／増悪／初回再発部位としての孤立性 PALN 転移の頻度は、CRT 導入前に考えられていたものより少なく、治療前 PALN 転移陰性症例では 3.7% であった。PALN 拡大予防照射の利益は限定的といえる。CRT が普及し、化学療法がこの領域の微小転移を制御しているためと考えられ、照射野外の最多再発部位は肺へと変化していた。

照射野外再発が照射野内再発を上回っていたこと、照射野外再発症例の大部分で照射野内が長期間制御されていたことから、遠隔転移を抑えることが予後改善のための重要な課題となる。高

リスク症例では地固め化学療法の利益を得る症例が存在するかもしれない。

予後因子としての lncRNA の探索では、XIST 発現量が OS と相関しており、PALN 転移陰性子宮頸癌放射線治療後の予後因子となる可能性が見いだされた。XIST は、女性の体細胞において、男性との遺伝子量補償のために備わっている X 染色体不活性化に関与する lncRNA で、2 本の X 染色体のうち 1 本から発現するとその染色体を取り巻き不活性化に導く。この X 染色体不活性化により、X 染色体上の多くの遺伝子が抑制される。XIST 低発現では、X 染色体不活性化機構の破綻と、X 染色体上の癌関連遺伝子や治療感受性／抵抗性関連遺伝子の異常高発現が引き起こされ、治療抵抗性であったというメカニズムが考えられる。その詳細は不明であり、XIST 低発現を引き起こす原因も不明であるが、このような研究が、子宮頸癌の治療戦略に変化をもたらすことになるかもしれない。