

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4974091号
(P4974091)

(45) 発行日 平成24年7月11日(2012.7.11)

(24) 登録日 平成24年4月20日(2012.4.20)

| | | | |
|----------------|--------------|------------------|-----------------|
| (51) Int.Cl. | | F 1 | |
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A |
| C 1 2 M | 1/00 | (2006.01) | C 1 2 M 1/00 A |
| C 1 2 Q | 1/68 | (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A |
| G O 1 N | 33/53 | (2006.01) | C 1 2 N 15/00 F |
| G O 1 N | 37/00 | (2006.01) | G O 1 N 33/53 M |

請求項の数 2 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-522644 (P2009-522644)
 (86) (22) 出願日 平成20年7月7日(2008.7.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/062297
 (87) 国際公開番号 W02009/008412
 (87) 国際公開日 平成21年1月15日(2009.1.15)
 審査請求日 平成23年4月1日(2011.4.1)
 (31) 優先権主張番号 60/929,662
 (32) 優先日 平成19年7月6日(2007.7.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 301032942
 独立行政法人放射線医学総合研究所
 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
 (74) 代理人 100064414
 弁理士 磯野 道造
 (74) 代理人 100111545
 弁理士 多田 悦夫
 (72) 発明者 今井 高志
 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
 独立行政法人放射線医学総合研究所内
 (72) 発明者 岩川 真由美
 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
 独立行政法人放射線医学総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用DNAチップ、及びこれを用いた放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用DNAチップであって、
 合成されたDNAプローブを保持するための保持手段と、
 前記保持手段に保持された複数の遺伝子マーカーと、を有し、
 前記複数の遺伝子マーカーは、

(a) rs2276015にコードされる一方の対立遺伝子の塩基がGであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブと、rs2276015にコードされる他方の対立遺伝子の塩基がAであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブのセット、

(b) rs2742946にコードされる一方の対立遺伝子の塩基がCであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブと、rs2742946にコードされる他方の対立遺伝子の塩基がTであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブのセット、

(c) rs1376264にコードされる一方の対立遺伝子の塩基がCであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブと、rs1376264にコードされる他方の対立遺伝子の塩基がTであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブのセット、

(d) rs1126758にコードされる一方の対立遺伝子の塩基がCであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブと、rs1126758にコードされる他方の対立遺伝子の塩基がTであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブのセット、

(e) rs2267437にコードされる一方の対立遺伝子の塩基がCであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブと、rs2267437にコードされる他方の対立遺伝子の塩基がG

10

20

であるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブのセット、

を含んでいることを特徴とする放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用DNAチップ。

【請求項2】

請求項1に記載の放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用DNAチップを用いた放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測方法であって、

前記遺伝子マーカーと、測定対象から調製した、前記遺伝子マーカーとハイブリダイズするDNAを標識物質で標識した標識DNAと、をハイブリダイズさせる第1ステップと、

前記遺伝子マーカーとハイブリダイズさせた標識DNAの両対立遺伝子の塩基を特定する第2ステップと、

前記第2ステップで特定した標識DNAの両対立遺伝子の塩基の組み合わせが、rs2276015についてはGGである場合、rs2742946についてはTT又はCTである場合、rs1376264についてはCCである場合、rs1126758についてはTT又はCTである場合、及び、rs2267437についてはGGである場合

をリスク遺伝子型であると判定し、当該リスク遺伝子型の数が3つ以上である場合は放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応が発症し易いと予測し、当該リスク遺伝子型の数が2つ以下である場合は放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応が発症し難いと予測する第3ステップと、

を含むことを特徴とする放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用DNAチップ、及びこれを用いた放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測方法に関する。

【背景技術】

【0002】

前立腺がん(PCa)は、先進国の男性のがんによる死亡の主要な原因の一つである(非特許文献1)。

最近確立した照射量別療法による炭素イオン放射線治療(C-イオンRT)は、局所の再発なしに、最小の有害反応で、医学的に満足できる無再発率をもたらすことが示された(非特許文献2~5)。

【0003】

C-イオンRTのための適切な照射量を定めるために、フェーズI~IIとフェーズIIにおける臨床研究が日本の放射線医学総合研究所で行われた(非特許文献4~6)。これらの研究は、これが効果的で安全な治療法の選択肢になることを明らかにした。グレード3又はこれより大きい晩期有害反応も、直腸や泌尿生殖器系で観測されず、そして、グレード2の直腸の有害反応の発症率とグレード2の泌尿生殖器系の有害反応の発症率は、それぞれわずか1.0%と6.0%であった(非特許文献4)。

【0004】

これらの患者の中には元々放射線治療(RT)に感受性が高い患者が含まれていたかもしれないので、患者の遺伝要因を調査することは、個々の放射線感受性予測に重要な知見をもたらす。

【0005】

これは、たとえRTへの副作用がC-イオンRTを経験した少数の患者だけに起こったものであったとしても、C-イオンRTだけでなく、従来の光子RTについても同様に副作用の危険性を予測することができる方法の開発を容易にすると考えられる。

【0006】

10

20

30

40

50

いくつかの報告によると、RTで治療されたがん患者の正常組織の有害反応の多様性は、いくつかの異なった遺伝子多型の組み合わせによる効果から生じることが示されている（非特許文献7、8）。

【0007】

これまで、RT後のPCA患者において有害反応が増加するリスクに関連している遺伝子マーカーについて報告している論文は僅かにある。

Cesarettiらは、ATMの配列変化が¹²⁵I近接照射治療後の副作用の予測マーカーとなることを示した（非特許文献9）。また、Petersらは、TGFβ1遺伝子の中の一塩基多型（以下、SNP又はSNPsという。）が不利なクオリティ・オブ・ライフへの発展の予測となったことを証明した（非特許文献10）。

10

【0008】

最近、Damarajuらは、大規模な候補遺伝子アプローチを行って24個のDNA修復遺伝子とステロイド代謝遺伝子の中の49個のSNPsを調べ、RT後におけるグレード2以上の晩期の膀胱又は直腸の有害反応のリスクが増加するLIG4遺伝子、ERCC2遺伝子、及びCYP2D6*4遺伝子の中のSNPsを特定した。しかし、ATM遺伝子やTGFβ1遺伝子にはそのようなSNPsはなかった（非特許文献11）。

これらの遺伝子マーカーの複合的な影響は、膀胱の放射線量、直腸の体積の30%までの放射線量、及び患者の年齢などの臨床要因とともに報告されている（非特許文献11）。

【0009】

また、C-イオンRT後の泌尿生殖器の晩期有害反応を調べる、118個の候補遺伝子については非特許文献12で報告されている。

20

【0010】

【非特許文献1】Jemal A, Seiegel R, Ward E, et al. "Cancer statistics, 2006." CA Cancer J Clin, 2006, 56, p106-130.

【非特許文献2】Orecchia R, Zurlo A, Loasses A, et al. "Particle beam therapy (hadrontherapy): Basis for interest and clinical experience." Eur J Cancer, 1998, 34, p459-468.

【非特許文献3】Nikoghosyan A, Schulz-Ertner D, Didinger B, et al. "Evaluation of therapeutic potential of heavy ion therapy for patients with locally advanced prostate cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 58, p89-97.

30

【非特許文献4】Tsuji H, Yanagi T, Ishikawa H, et al. "Hypofractionated radiotherapy with carbon ion beams for prostate cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 63, p1153-1160.

【非特許文献5】Ishikawa H, Tsuji H, Kamada T, et al. "Risk factors of late rectal bleeding after carbon ion therapy for prostate cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 66, p1084-1091.

【非特許文献6】Akakura K, Tsujii H, Morita S, et al. "Phase I/II clinical trials of carbon ion therapy for prostate cancer." Prostate, 2004, 58, p252-258.

【非特許文献7】Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J. "Dose variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis Where and how to look for it?" Radiother Oncol, 2002, 64, p131-140.

40

【非特許文献8】Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, et al. "Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes." Radiother Oncol, 2003, 69, p127-135.

【非特許文献9】Cesaretti JA, Stock RG, Lehrer S, et al. "ATM sequence variants are predictive of adverse radiotherapy response among patients treated for prostate cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 61, p196-202.

【非特許文献10】Peters CA, Stock RG, Cesaretti JA, et al. "TGFβ1 Single nucleotide polymorphisms are associated with adverse quality of life in prostate cancer

50

er patients treated with radiotherapy.” Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008, 70, p752-759.

【非特許文献 1 1】Damaraju S, Murray D, Dufour J, et al. “Association of DNA repair and steroid metabolism gene polymorphisms with clinical late toxicity in patients treated with conformal radiotherapy for prostate cancer.” Clin Cancer Res, 2006, 12, p2545-2554.

【非特許文献 1 2】Suga T, Ishikawa A, Kohda M, et al. “Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients.” Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 69, p685-693.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

非特許文献 1 ~ 1 2 に報告された多型が全ての P C a 患者の R T の副作用のリスクに関連していたかどうかは不明である。

そのため、C - イオン R T 後における泌尿器の晩期有害反応の発症を予測する手段及び方法がなかった。

【0012】

本発明は前記した問題に鑑みてなされたものであり、C - イオン R T 後における泌尿器の晩期有害反応の発症を予測するための D N A チップ、及びこれを用いた放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、前記した課題を解決するため、C - イオン R T 後の泌尿生殖器の晩期有害反応について 1 1 8 個の候補遺伝子 (Suga T, Ishikawa A, Kohda M, et al. “Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients.” Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 69, p685-693.) 上の S N P s と放射線感受性の関係について鋭意研究した結果、本発明を完成するに至った。

【0014】

[1] 前記課題を解決した本発明に係る放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用 D N A チップは、合成された D N A プローブを保持するための保持手段と、前記保持手段に保持された複数の遺伝子マーカーと、を有し、前記複数の遺伝子マーカーは、(a) rs2276015 にコードされる一方の対立遺伝子の塩基が G である D N A プローブ又はこれの相補鎖 D N A プローブと、rs2276015 にコードされる他方の対立遺伝子の塩基が A である D N A プローブ又はこれの相補鎖 D N A プローブのセット、(b) rs2742946 にコードされる一方の対立遺伝子の塩基が C である D N A プローブ又はこれの相補鎖 D N A プローブと、rs2742946 にコードされる他方の対立遺伝子の塩基が T である D N A プローブ又はこれの相補鎖 D N A プローブのセット、(c) rs1376264 にコードされる一方の対立遺伝子の塩基が C である D N A プローブ又はこれの相補鎖 D N A プローブと、rs1376264 にコードされる他方の対立遺伝子の塩基が T である D N A プローブ又はこれの相補鎖 D N A プローブのセット、(d) rs1126758 にコードされる一方の対立遺伝子の塩基が C である D N A プローブ又はこれの相補鎖 D N A プローブと、rs1126758 にコードされる他方の対立遺伝子の塩基が T である D N A プローブ又はこれの相補鎖 D N A プローブのセット、(e) rs2267437 にコードされる一方の対立遺伝子の塩基が C である D N A プローブ又はこれの相補鎖 D N A プローブと、rs2267437 にコードされる他方の対立遺伝子の塩基が G である D N A プローブ又はこれの相補鎖 D N A プローブのセット、を含んでいることを特徴としている。

【0015】

[2] また、本発明に係る放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測方法は、前記 [1] に記載の放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用 D N A チ

10

20

30

40

50

チップを用いた放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測方法であって、前記遺伝子マーカーと、測定対象から調製した、前記遺伝子マーカーとハイブリダイズするDNAを標識物質で標識した標識DNAと、をハイブリダイズさせる第1ステップと、前記遺伝子マーカーとハイブリダイズさせた標識DNAの両対立遺伝子の塩基を特定する第2ステップと、前記第2ステップで特定した標識DNAの両対立遺伝子の塩基の組み合わせが、rs2276015についてはGGである場合、rs2742946についてはTT又はCTである場合、rs1376264についてはCCである場合、rs1126758についてはTT又はCTである場合、及び、rs2267437についてはGGである場合をリスク遺伝子型であると判定し、当該リスク遺伝子型の数が3つ以上である場合は放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応が発症し易いと予測し、当該リスク遺伝子型の数が2つ以下である場合は放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応が発症し難いと予測する第3ステップと、を含むことを特徴としている。

10

【発明の効果】**【0016】**

本発明に係る放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用DNAチップによれば、5つのリスク遺伝子マーカーを含んでいるので、放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応となり易いリスク遺伝子型を3つ以上有するか否か、的確且つ容易に判断することができる。そのため、放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応となるか否かを予測することが可能となる。

【0017】

20

本発明に係る放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測方法によれば、本発明に係る放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用DNAチップを用いているので、放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応となり易いリスク遺伝子型を3つ以上有するか否か、的確且つ容易に判断することができる。そのため、放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応となるか否かを予測することができる。

【図面の簡単な説明】**【0018】**

【図1】実線で示すトレーニングセット(n=132人)と、破線で示すテストセット(n=65人)における5つの遺伝子マーカー(SART1、ID3、EPDR1、PAH、及びXRCC6)の組み合わせにおけるROC(receiver operating characteristic)を示すグラフである

30

【図2】リスク遺伝子型数別の度数分布を示すヒストグラムである。

【発明を実施するための最良の形態】**【0019】**

なお、本発明におけるDNAの取り扱いやその他の必要な操作について、発明を実施するための最良の形態および実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いることができる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いることができる。また、当業者であれば本明細書の記載および前記した標準的なプロトコール集などの記載から容易に本発明を再現することができる。

40

【0020】

以下、本発明に係る放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用DNAチップ、及びこれを用いた放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測方法について詳細に説明する。

【0021】

50

まず、本発明に係る放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測用DNAチップ（以下、単に「DNAチップ」という。）について説明する。

ここで、泌尿器の有害反応としては、例えば、排尿障害を挙げることができる。

【0022】

本発明に係るDNAチップは、放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症を予測するためのものである。放射線治療としては、炭素イオン放射線治療（C-イオンRT）などの重粒子線放射線治療を挙げることができる。なお、放射線治療はこれに限定されるものではなく、例えば光子線や電子線を用いた放射線治療（以下、単に「光子RT」ということがある。）なども挙げることができる。

放射線治療の放射線量としては、例えば、66.0 Gy Eなどとすることができ、患者には必要に応じて複数回に分けて（例えば、5週間以内に20画分）照射することができる。

10

【0023】

本発明に係るDNAチップは、DNAプローブを保持するための保持手段と、この保持手段に保持された複数の遺伝子マーカートを有している。

ここで、保持手段としては、DNAプローブを固定することができるものであればよく、例えばガラス基板やプラスチック基板などを挙げることができる。

【0024】

そして、複数の遺伝子マーカータは、以下の(a)～(e)に示されるDNAプローブのセットを挙げることができる。なお、これらのDNAプローブのセットをDNAチップに保持させる場合、以下のrs SNP IDにコードされた塩基を含む20～80 basesのDNA鎖（ポリヌクレオチド）とするとよい。これらのDNAプローブは、フォトリソグラフィと固相反応化学技術を用いた所謂Affimatrix社型式、又は予め調製されたDNA断片を10 μLから数百 μLの大きさで予め決められた位置に定量的にスポッターで打ち付ける所謂Stanford型式で保持手段に保持させることもできる。

20

【0025】

(a) rs2276015にコードされる一方の対立遺伝子の塩基がGであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブと、rs2276015にコードされる他方の対立遺伝子の塩基がAであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブのセット

(b) rs2742946にコードされる一方の対立遺伝子の塩基がCであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブと、rs2742946にコードされる他方の対立遺伝子の塩基がTであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブのセット

30

(c) rs1376264にコードされる一方の対立遺伝子の塩基がCであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブと、rs1376264にコードされる他方の対立遺伝子の塩基がTであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブのセット

(d) rs1126758にコードされる一方の対立遺伝子の塩基がCであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブと、rs1126758にコードされる他方の対立遺伝子の塩基がTであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブのセット

(e) rs2267437にコードされる一方の対立遺伝子の塩基がCであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブと、rs2267437にコードされる他方の対立遺伝子の塩基がGであるDNAプローブ又はこれの相補鎖DNAプローブのセット

40

【0026】

ここで、rs2276015はSART1遺伝子（11番染色体）の中又はその周辺領域に位置するSNPであり、rs2742946はID3遺伝子（1番染色体）の中又はその周辺領域に位置するSNPであり、rs1376264はEPRD1遺伝子（7番染色体）の中又はその周辺領域に位置するSNPであり、rs1126758はPAH遺伝子（12番染色体）の中又はその周辺領域に位置するSNPであり、rs2267437はXRCC6遺伝子（22番染色体）の中又はその周辺領域に位置するSNPである。

【0027】

(a)～(e)に規定したDNAプローブのセットは、放射線治療後における泌尿器の

50

晩期有害反応の発症のリスクを予測するため全てを含んでいることを要する。(a)~(e)に規定したDNAプローブのセットが4つ以下であると、統計学的に不確実性が大きくなるので好ましくない。

【0028】

(a)~(e)に規定したDNAプローブのセットは、C-イオンRT後の泌尿生殖器の晩期有害反応を発症した患者を118個の候補遺伝子(Suga T, Ishikawa A, Kohda M, et al. "Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 69, p685-693.)から探究したものである。118個の候補遺伝子は主に、インビトロにおける放射線感受性のある非常に可変的なヒト細胞株(Ishikawa K, Koyama-Saegusa K, Otsuka Y, et al. "Gene expression profile changes correlating with radioresistance in human cell lines." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 65, p234-245.; Ban S, Ishikawa K, Kawai S, et al. "Potential in a single cancer cell to produce heterogeneous morphology, radiosensitivity and gene expression." *J Radiat Res (Tokyo)*, 2005, 46, p43-50.)と、異なる放射線感受性を持つマウス株とについての本発明者らの以前の包括的な遺伝子発現解析を通して特定された(Iwakawa M, Noda S, Ohta T, et al. "Different radiation susceptibility among five strains of mice detected by a skin reaction." *J Radiat Res (Tokyo)*, 2003, 44, p7-13.; Ohta T, Iwakawa M, Oohira C, et al. "Fractionated irradiation augments inter-strain variation of skin reactions among three strains of mice." *J Radiat Res (Tokyo)*, 2004, 45, p515-519.; Iwakawa M, Noda S, Ohta T, et al. "Strain dependent differences in a histological study of CD44 and collagen fibers with an expression analysis of inflammatory response-related genes in irradiated murine lung." *J Radiat Res (Tokyo)*, 2004, 45, p423-433.; Noda S, Iwakawa M, Ohta T, et al. "Inter-strain variance in late phase of erythematous reaction or leg contracture after local irradiation among three strains of mice." *Cancer Detect Prev*, 2005, 29, p376-382.)。

【0029】

候補遺伝子は、放射線感受性についての他の論文からも採用された(Sugaらの補足表を参照(Suga T, Ishikawa A, Kohda M, et al. "Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 69, p685-693.))。

【0030】

これらの候補遺伝子を対象とした評価は、例えば、C-イオンRTを受けたPCa患者達を、SNPの遺伝子型と泌尿器の有害反応との関係、及び泌尿器の有害反応のリスクへの遺伝的変異の複合的な影響の確認を行うためのトレーニングセット(グループ)と、トレーニングセットで得られた結果を確認するためのテストセット(グループ)に分け、さらにこれらからコントロール(グレード0(泌尿器の晩期有害反応を発症せず))とケース(グレード1(泌尿器の晩期有害反応を軽く発症した)以上)のグループに分類して行うことができる。なお、トレーニングセットとテストセットの比率は例えば2:1などとする事ができる。

【0031】

SNPの遺伝子型と泌尿器の有害反応発症との関係は、例えばフィッシャーの直接確率検定を使用することで評価することができる。フィッシャーの直接確率検定によれば有害反応発症者と未発症者の間で遺伝子型頻度に統計学的有意な関連があるかどうか検定することができる。なお、SNPの遺伝子型と泌尿器の有害反応発症との関係の評価は、フィッシャーの直接確率検定に限定されるものではない。例えば、サンプル数が十分に大きいときにはカイ二乗検定なども適用することができる。

【0032】

また、泌尿器の有害反応のリスクへの遺伝的変異の複合的な影響を確認し、SNPの遺

10

20

30

40

50

伝子型と泌尿器の有害反応との関係性を評価するために、AUC - ROC (ROC 曲線の下
の面積) 曲線解析を適用した。これによればマーカーの感度と偽陽性率を同時に評価でき
るので好ましい。なお、泌尿器の有害反応のリスクへの遺伝的変異の複合的な影響の確認
は、AUC - ROC 曲線解析に限定されるものではない。

【0033】

これまでに泌尿器の有害反応の予測方法は存在していないので、本発明においては、A
UC - ROC 曲線解析における AUC が 0.5 より大きい値を示す SNP (又は SNP の
組み合わせ)、より好ましくは 0.77 以上の SNP (又は SNP の組み合わせ) を「リ
スク遺伝子型」と定義している。なお、AUC が 0.5 ということは、有害反応の発症予
測率が 50% であるということを示す。

10

【0034】

また、リスク遺伝子型の解析はどのような遺伝子タイピングシステムを用いてもよい。
例えば、MassARRAY システムを用いた遺伝子タイピングにより行うことができる。MassARR
AY システムを用いた遺伝子タイピングの手順は、例えば、Suga T, Ishikawa A, Kohda M,
et al. "Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin
reactions after radiotherapy in breast cancer patients." Int J Radiat Oncol Bi
ol Phys, 2007, 69, p685-693. に記載されている。

【0035】

そして、統計的有意性と排尿障害のグレードの間関係と PCa 患者の SNPs のタイ
ピング結果は、例えば、フィッシャーの直接確率検定 (Fisher's exact test) で評価す
ることができる。

20

また、統計的な分析は、例えば、SNP Analyzer ソフトウェア (バージョン 6.0、
<http://www.dynacom.co.jp/e/products/package/snalyze/index.html>; Dynacom、千葉
県、日本国) を使用することで行うことができる。

【0036】

次に、本発明に係る放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症予測方法 (以下
、単に「発症予測方法」という。) について説明する。

【0037】

本発明に係る発症予測方法は、本発明に係る DNA チップを用いた発症予測方法である
。本発明に係る発症予測方法は、以下の第 1 ステップから第 3 ステップを含んでいる。

30

【0038】

第 1 ステップは、本発明に係る DNA チップに保持された複数の遺伝子マーカー (即ち
、前記した (a) ~ (e) に示した DNA プローブのセット) と、測定対象から調製した
、前記遺伝子マーカーとハイブリダイズする DNA (ポリヌクレオチド) を標識物質で標
識した標識 DNA と、をハイブリダイズさせるステップである。

【0039】

測定対象から調製した DNA とは、例えば、測定対象である PCa 患者の全血や任意の
細胞株等から採取したゲノム DNA をいう。

例えば、全血からのゲノム DNA の抽出は、例えば、クラボウ社製の NA3000S な
どの自動核酸分離システムや、例えば、QIAamp DNA 血液キット (Qiagen 社、ヒルデン、ド
イツ国) などの市販の抽出キットを用いることで容易に行うことができる。

40

DNA 濃度の測定も PicoGreen 試薬などの市販の試薬を使用することで測定することが
できる。

【0040】

そして、遺伝子マーカーとハイブリダイズする DNA は、例えば、任意に設計したセン
スプライマー及びアンチセンスプライマーと、鋳型となる抽出したゲノム DNA とを用い
た PCR (polymerase chain reaction) 法などによって遺伝子マーカーと相補的な塩基
配列を有する DNA を選択的に増幅させることにより得ることができる。なお、かかる D
NA は、例えば 100 ~ 200 bases 程度とするとよい。遺伝子マーカーとのハイブリダ
イズを好適に行わせるためである。

50

なお、センスプライマー及びアンチセンスプライマーは必要に応じて作製することができる。

標識物質としては、DNAマイクロアレイシステムにて検出が容易な蛍光色素を用いることもできる。蛍光色素は、例えば、Cy3やCy5などの従来公知のものを用いることができる。また、例えば、標識物質としては放射性物質も用いることができる。さらに、例えば、ビオチン(biotin)を使って可視的に検出することもできる。

【0041】

このようにすると遺伝子マーカーとハイブリダイズする標識DNAを作製することができる。

かかる標識DNAは、前記したように遺伝子マーカーと相補的な塩基配列を有するため、遺伝子マーカーとハイブリダイズさせることができる。

遺伝子マーカーと標識DNAとのハイブリダイズは、これらの塩基の長さ(個数)やA T G Cの存在比率などによって変動するため適宜設定するのが好ましい。例えば、これらの塩基の長さが100~200basesの場合、1M NaClを含む溶液中で42~60の条件でハイブリダイズさせることができる。

【0042】

もちろん、この第1ステップにはハイブリダイズしなかったDNAやハイブリダイズの強度が十分でなかったDNAを常法により洗浄する工程が含まれることはいうまでもない。例えば、0.3M NaClを含む溶液中で室温~60の条件で洗浄することができる。

【0043】

第2ステップは、遺伝子マーカーとハイブリダイズさせた標識DNAの遺伝子型を判定するステップである。例えば、ビオチンで標識しておけば可視的に判定することができる。また、蛍光色素で標識しておけば従来公知のDNAアレイスキャナーによって測定することができる。

【0044】

第3ステップは、第2ステップで特定した標識DNAの両対立遺伝子の組み合わせがrs2276015についてはGGである場合、rs2742946についてはTT又はCTである場合、rs1376264についてはCCである場合、rs1126758についてはTT又はCTである場合、及び、rs2267437についてはGGである場合をリスク遺伝子型であると判定し、当該リスク遺伝子型を3つ以上持つ場合は放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応が発症し易いと予測し、当該リスク遺伝子型の数が2つ以下である場合は放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応が発症し難いと予測するステップである。

なお、リスク遺伝子型の組み合わせは、本発明者らの研究により明らかとなったものである。

【実施例】

【0045】

1. 方法と材料

この研究に含まれる197人の患者は、放射線医学総合研究所(千葉県、日本国)におけるPCaのためのC-イオンRTの臨床試験に参加者である。全ての患者と227人の健康なドナーは、この研究に参加するために書面によるインフォームド・コンセントを提供した。放射線医学総合研究所の倫理委員会はこの研究を承認した。全ての個人情報、放射線医学総合研究所の重粒子線治療のための研究センター病院の医療情報課によって管理されている。

【0046】

はじめの患者のグループ(n=132人)は、2002年1月から2006年3月の間に参加した。2つめの患者のグループ(n=65人)は2006年3月から2006年12月の間に参加した。

対象は、トレーニングセットとテストセットの2つのセットに、およそ2:1の割合で分けられた。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

トレーニングセットでは、109人の対象(82.6%)がグレード0の排尿障害と診断された。そして、23人の対象(17.4%)には、RTの3カ月後に、グレード1の排尿障害があった。

【 0 0 4 8 】

テストセットでは、56人の対象(86.2%)がグレード0の排尿障害があった。そして、9人の対象(13.8%)には、グレード1かグレード2の排尿障害があった。

【 0 0 4 9 】

患者の適格性、C-イオンRTとホルモンの処置を含む研究計画は、以前に詳細に説明されている(Tsuji H, Yanagi T, Ishikawa H, et al. "Hypofractionated radiotherapy with carbon ion beams for prostate cancer." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 63, p1153-1160.; Ishikawa H, Tsuji H, Kamada T, et al. "Risk factors of late rectal bleeding after carbon ion therapy for prostate cancer." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 66, p1084-1091.)。

10

【 0 0 5 0 】

患者の大部分がPhase IIの研究に登録されて66.0 Gy Eの放射線量を受けた。66.0 Gy Eの放射線量は、5週間以内に20画分に分けて供給された。ホルモン療法を除いて、PCaに関する前処置を患者は誰も受けていなかった。

【 0 0 5 1 】

泌尿器の晩期有害反応(排尿障害)は、Late Effects of Normal Tissue-Subjective, Objective, Management, and Analysis scoring systemを使用して判定した(LENT-SOMA tables. *Radiother Oncol*, 1995, 35, p17-60.)。主に"subjective(主観的)"カテゴリーと"management(管理)"カテゴリーを重要視した。

20

【 0 0 5 2 】

排尿障害のスコアリングは次の通りであった。グレード0は、RT前の状態と比較して主観的に認識ができない。グレード1は、 α_1 -ブロッカーの時々投与の有無に関わらず軽い(時折且つごく小さい)認識がある。グレード2は、 α_1 -ブロッカーの定期的な投与で、穏やかな(断続的且つ許容できる)認識がある。遅発性の反応のためのスコアはC-イオンRT後3ヶ月に観察された最も大きなグレードである。

【 0 0 5 3 】

2. 候補遺伝子及びSNPs

放射線感受性における多型を含む候補遺伝子を選ぶための本発明者らの概念、候補遺伝子のリスト、及びMassARRAYシステム(Sequenom社、サンディエゴ、カリフォルニア州)を用いた遺伝子タイピング手順は、以前詳述した(Suga T, Ishikawa A, Kohda M, et al. "Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 69, p685-693.)。

30

PCa患者に対するこの研究では、118の遺伝子座で450のSNPsが遺伝子解析にかけられた。

全血からのゲノムDNAの抽出は、自動核酸分離システム(NA3000S、クラボウ社、大阪府、日本国)かQIAamp DNA血液キット(Qiagen社、ヒルデン、ドイツ国)で行った。

40

DNA濃度は、PicoGreen試薬を使用して測定した(Singer VL, Jones LJ, Yue ST, et al. "Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation." *Anal Biochem*, 1997, 249, p228-238.)。

遺伝子タイピングのために使用されるプライマー配列は、必要に応じて作製した。

【 0 0 5 4 】

3. 統計学的解析

各多型について対立遺伝子頻度と遺伝子型頻度を計算した。そして、ハーディー・ワイ

50

ンベルグ平衡は、健康なドナーと全 P C a 患者グループそれぞれでカイ二乗検定を使って推定した。

【 0 0 5 5 】

排尿障害のグレードと P C a 患者の S N P s の各々の統計学的関連は、それぞれ両側フィッシャーの直接確率検定 (two-tailed Fisher's exact test) を使って推定した。

これらの統計的な分析は、S N P A l y z e ソフトウェア (バージョン 6 . 0、<http://www.dynacom.co.jp/e/products/package/snalyze/index.html>; Dynacom、千葉県、日本国) を使用して実行した。

【 0 0 5 6 】

排尿障害のリスクに関連している適切な S N P マーカーを選択するために、トレーニングセットを使用してマーカーの検出感度と特異性を A U C - R O C 曲線分析 (Hanley JA, McNeil BJ. "The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve." Radiology, 1982, 143, p29-36.) を使って推定した。

A U C - R O C 値に貢献するマーカーの選択手順は、以下の通りである：

(1) 有意な S N P s を K と仮定する。

(2) K 指標変数 x_k ($k = 1, \dots, K$) を定義する。

(3) x_k が $\{x_1, \dots, x_k\}$ の中の平均 A U C - R O C が最大となるように $P S_1 = x_k$ を設定する。

(4) $P S_1$ として選定される変数を除いて、 x_k ($k = 1, \dots, K - 1$) を再定義する。

(5) $P S_1 + x_k$ が $\{P S_1 + x_1, \dots, P S_1 + x_{k-1}\}$ の中の平均 A U C - R O C が最大となるように $P S_2 = P S_1 + x_k$ を設定する。

(6) x_k ($k = 1, \dots, K - 2$) を再定義する...同じ方法で繰り返す。

【 0 0 5 7 】

次に、排尿障害に対する感受性を予測するために選ばれたマーカーの能力は、テストセットを用いて A U C - R O C 曲線分析でさらに推定した。

【 0 0 5 8 】

4 . 結果

1 1 8 個の遺伝子座における合計 4 5 0 個の S N P s が P C a 患者の放射線感受性に差異を与える候補として選定され、さらなる遺伝子解析を行った。その結果、4 5 0 個の S N P s のうち 1 2 個は今回の P C a 患者グループにおいて多型ではなかった。さらに、2 7 個の S N P s は、対立遺伝子頻度が低かった (マイナーな対立遺伝子頻度 ($< 5\%$)) ため、今回の関連研究から除外した。また、9 個の S N P s は、健康な提供者のグループにおいてハーディー・ワインベルグ平衡から外れていた ($p < 0.001$) ので分析しなかった。また、2 9 個の S N P s は遺伝子型がそれぞれの隣接する S N P s のものと同じであったので、さらなる分析から除外した。

従って、1 0 9 個の遺伝子座の 3 7 3 個の S N P s をさらに分析した。

これらの S N P s の位置的特性を表 1 に示す。

【 0 0 5 9 】

10

20

30

【表 1】

| Position | <i>n</i> | (%) |
|-------------|----------|--------|
| 5'-Flanking | 87 | (23.3) |
| 5'-UTR | 4 | (1.1) |
| cSNP | 30 | (8.0) |
| sSNP | 23 | (6.2) |
| iSNP | 138 | (37.0) |
| 3'-UTR | 20 | (5.4) |
| 3'-Flanking | 71 | (19.0) |
| Total | 373 | (100) |

10

【 0 0 6 0 】

表 1 中の略語：SNP は一塩基多型 (single nucleotide polymorphism)、UTR は非翻訳領域 (untranslated region)、cSNP は非同義置換 SNP (nonsynonymous SNP)、sSNP は同義置換 SNP (synonymous SNP)、iSNP はイントロン SNP (intron SNP) を示す。

【 0 0 6 1 】

トレーニングセットにおけるケースの患者 (グレード 1 以上) とコントロールの患者 (グレード 0) の臨床的特徴を表 2 に示す。

20

【 0 0 6 2 】

【表 2】

| Characteristic | Grade 0 (<i>n</i> = 109) | Grade 1+ (<i>n</i> = 23) | <i>p</i> |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|
| Age during RT (y) | | | |
| Mean ± SD | 69 ± 5 | 68 ± 6 | |
| Range | 56-87 | 54-77 | 0.39 [†] |
| Smoking habit | | | |
| Yes | 17 (15.6) | 2 (8.7) | 0.60* |
| Quit | 36 (33.0) | 10 (43.5) | |
| Never | 56 (51.4) | 11 (47.8) | |
| Hormonal therapy | 72 (66.1) | 17 (73.9) | 0.63* |
| T stage [†] | | | 0.87* |
| T1 | 31 (28.4) | 6 (26.1) | |
| T2 | 35 (32.1) | 9 (39.1) | |
| T3 | 42 (38.5) | 8 (34.8) | |
| T4 | 1 (0.9) | 0 (0.0) | |
| Radiation dose (GyE) [†] | | | |
| 57.6 | 2 (1.8) | 1 (4.3) | 0.33* |
| 60.0 | 3 (2.8) | 0 (0.0) | |
| 63.0 | 3 (2.8) | 0 (0.0) | |
| 66.0 | 101 (92.7) | 21 (91.3) | |
| 72.0 | 0 (0.0) | 1 (4.3) | |

30

40

【 0 0 6 3 】

表 2 中の略語：RT は放射線治療 (radiotherapy)、SD は標準偏差 (standard devia

50

tion)、G y E は放射線量 (Gray equivalent) を示す。

排尿障害をもつ患者の分布は、グレード 0 の患者が 1 0 9 人、グレード 1 の患者が 2 3 人であった。

また、括弧内のデータはパーセンテージである。

* は、フィッシャーの直接確率検定で分析された 2 つのグループの間の統計的有意性を示す。

† は、対応のない t 検定である。

‡ は、数字を丸めたため、パーセンテージの合計が 1 0 0 % にはならない。

【 0 0 6 4 】

1 4 個の遺伝子座の S N P s は、対立遺伝子型又は遺伝子型 (優性のモデルであるか劣性のモデル (表 3)) によって排尿障害と関連していた。

【 0 0 6 5 】

【表 3】

| Gene | rsSNP ID | Chr | SNP | Allele | | | | Genotype | | Dominant model | | Recessive model | |
|----------|-----------|-----|-----|---------|-------|---------|------------------|----------|----------|----------------|------------------|-----------------|------------------|
| | | | | Grade 0 | | Grade 1 | | MM/Mm/mm | MM/Mm/mm | p | OR (95% CI) | p | OR (95% CI) |
| | | | | M/m | M/m | M/m | M/m | | | | | | |
| ALAD | rs1805312 | 9 | CG | 192/26 | 35/11 | 0.058 | 2.32 (1.05-5.12) | 83/26/0 | 14/7/2 | 0.029 | NC | 0.19 | 2.05 (0.79-5.28) |
| CD68 | rs2270341 | 17 | TA | 145/73 | 25/21 | 0.13 | 0.59 (0.31-1.14) | 46/53/10 | 8/9/6 | 0.035 | 3.49 (1.12-10.8) | 0.64 | 1.36 (0.53-3.49) |
| XRCC6 | rs2267437 | 22 | CG | 148/70 | 25/21 | 0.089 | 1.77 (0.93-3.38) | 48/52/9 | 8/9/6 | 0.025 | 3.92 (1.23-12.4) | 0.49 | 1.47 (0.57-3.76) |
| ID3 | rs2742946 | 1 | CT | 127/91 | 21/25 | 0.14 | 1.66 (0.87-3.14) | 48/52/9 | 2/17/4 | 0.76 | 1.13 (0.34-3.76) | 0.023 | 4.96 (1.10-22.3) |
| LIG1 | rs1171097 | 19 | CG | 178/40 | 31/15 | 0.044 | 2.15 (1.06-4.35) | 73/32/4 | 11/9/3 | 0.10 | 3.93 (0.81-18.9) | 0.098 | 2.21 (0.89-5.49) |
| LIG3 | rs3744357 | 17 | CT | 188/30 | 33/13 | 0.026 | 2.46 (1.16-5.21) | 80/28/1 | 12/9/2 | 0.078 | 10.2 (0.89-118.) | 0.078 | 2.52 (1.00-6.35) |
| MAP3K7 | rs1475489 | 6 | AT | 158/60 | 24/20 | 0.030 | 2.19 (1.13-4.26) | 56/46/7 | 6/12/4 | 0.089 | 3.23 (0.85-12.2) | 0.060 | 2.81 (1.02-7.74) |
| MGMT | rs1803965 | 10 | CT | 184/34 | 45/1 | 0.015 | 0.12 (0.01-0.90) | 79/26/4 | 22/1/0 | 1.0 | NC | 0.015 | 0.11 (0.01-0.92) |
| PAH | rs1126758 | 12 | CT | 205/13 | 39/7 | 0.058 | 2.83 (1.06-7.54) | 96/13/0 | 16/7/0 | NC | NC | 0.048 | 3.23 (1.11-9.32) |
| PER3 | rs228697 | 1 | CG | 204/14 | 38/8 | 0.034 | 3.06 (1.20-7.81) | 95/14/0 | 15/8/0 | NC | NC | 0.026 | 3.61 (1.29-10.0) |
| SART1 | rs2276015 | 11 | GA | 172/46 | 44/2 | 0.0056 | 0.17 (0.03-0.72) | 70/32/7 | 21/2/0 | 0.61 | NC | 0.012 | 0.17 (0.03-0.76) |
| SERPINA3 | rs2268337 | 14 | AG | 163/55 | 42/4 | 0.018 | 0.28 (0.09-0.82) | 61/41/7 | 19/4/0 | 0.61 | NC | 0.019 | 0.26 (0.08-0.83) |
| TCFBR1 | rs868 | 9 | AG | 201/17 | 46/0 | 0.050 | NC | 94/13/2 | 23/0/0 | 1.0 | NC | 0.072 | NC |
| EPDR1 | rs1376264 | 7 | CT | 168/50 | 42/4 | 0.028 | 0.32 (0.10-0.93) | 61/46/2 | 19/4/0 | 1.0 | NC | 0.019 | 0.26 (0.08-0.83) |

表 3 中の略号：SNP は一塩基多型 (single nucleotide polymorphism)、ID は識別表示 (identification)、Chr は染色体 (chromosome)、M はメジャーアレル (major allele)、m はマイナーアレル (minor allele)、NC は計算していない (計算を実行するにはサンプル数が不十分であることによる) ことを示す。また、p は p 値 (有意確率)、OR はオッズ比、CI は信頼区間を示す。

また、表 3 では、フィッシャーの直接確率検定で分析された 2 つのグループの間の統計的有意性を示している。

【 0 0 6 7 】

タイピングデータの集計結果によると、表 3 に示すように、rs2276015 (SART1) のメジャーアレル (対立遺伝子) とマイナーアレルはそれぞれ G と C であり、rs2742946 (ID3) のメジャーアレルとマイナーアレルはそれぞれ C と T であり、rs1376264 (EPDR1) メジャーアレルとマイナーアレルはそれぞれ C と T であり、rs1126758 (PAH) メジャーアレルとマイナーアレルはそれぞれ C と T であり、rs2267437 (XRCC6) メジャーアレルとマイナーアレルはそれぞれ C と G であることが分かった。

【 0 0 6 8 】

排尿障害の発症のリスクが高い患者とリスクのない患者とを区別できる SNP マーカーは、従前の AUC - ROC 曲線分析を使用した変数増減法によって分離した。そして、ROC 曲線の下を面積を最も増加させたマーカーを段階的に選択した。

この方法を用いて選択されたマーカーは、rs2276015 (SART1)、rs2742946 (ID3)、rs1376264 (EPDR1)、rs1126758 (PAH) と rs2267437 (XRCC6) の多型であった。

AUC - ROC 曲線は、これらの 5 つのマーカーを使用することで 0.86 に達した (表 4)。

【 0 0 6 9 】

【表 4】

| SNPs combination | AUC-ROC |
|---|---------|
| rs2276015 | 0.635 |
| rs2276015 + rs2742946 | 0.718 |
| rs2276015 + rs2742946 + rs1376264 | 0.776 |
| rs2276015 + rs2742946 + rs1376264 + rs1126758 | 0.825 |
| rs2276015 + rs2742946 + rs1376264 + rs1126758 + rs2267437 | 0.861 |

【 0 0 7 0 】

表 4 中の略号：SNP は一塩基多型 (single nucleotide polymorphism)、AUC - ROC は ROC 曲線の下を面積 (area under curve of receiver operating characteristic) を示す。

【 0 0 7 1 】

統計学的手法を用いた結果によると、表 3 及び表 4 から、両対立遺伝子の組み合わせが、rs2276015 (SART1) については GG である場合、rs2742946 (ID3) については TT 及び CT である場合、rs1376264 (EPDR1) については CC である場合、rs1126758 (PAH) については TT 及び CT である場合、及び rs2267437 (XRCC6) については GG である場合にリスク遺伝子型と判定できることが分かった。

【 0 0 7 2 】

排尿障害のリスクを予測するこれらの遺伝子マーカーの有効性をテストするために、これらの遺伝子マーカーをテストセットでさらに分析した。

表 5 は、テストセットにおける患者背景と患者の処置の詳細を示している。

【 0 0 7 3 】

【表 5】

| Characteristic | Grade 0 (n = 56) | Grade 1+ (n = 9) | p | |
|----------------------|------------------|------------------|-------------------|----|
| Age at RT (y) | | | | |
| Mean ± SD | 68 ± 6 | 68 ± 7 | | |
| Range | 51-80 | 52-79 | 0.99 [†] | |
| Smoking habit | | | | |
| Yes | 7 (12.5) | 0 (0.0) | 0.76* | 10 |
| Quit | 16 (28.6) | 3 (33.3) | | |
| Never | 31 (55.4) | 6 (66.7) | | |
| Unknown | 2 (3.6) | 0 (0.0) | | |
| Hormonal therapy | 47 (83.9) | 6 (66.7) | 0.35* | |
| T stage [‡] | | | 0.70* | |
| T1 | 9 (16.1) | 2 (22.2) | | |
| T2 | 31 (55.4) | 4 (44.4) | | |
| T3 | 16 (28.6) | 3 (33.3) | | |
| Radiation dose (GyE) | | | | |
| 57.6 | 15 (26.8) | 1 (11.1) | 0.25* | 20 |
| 63.0 | 37 (66.1) | 6 (66.7) | | |
| 66.0 | 4 (7.1) | 2 (22.2) | | |

【 0 0 7 4 】

表 5 中の略号については表 2 と同じである。

排尿障害をもつ患者の分布は、グレード 0 の患者が 5 6 人、グレード 1 の患者が 5 人、グレード 2 の患者が 4 人であった。

* は、フィッシャーの直接確率検定で分析された 2 つのグループの間の統計的有意性を示す。

† は、対応のない t 検定である。

‡ は、数字を丸めたため、パーセンテージの合計が 1 0 0 % にはならない。

【 0 0 7 5 】

テストセットはグレード 2 の排尿障害に伴う 4 個の対象を含んでいた。統計的有意差は、特徴のいずれにおいてもケースの患者とコントロールの患者の間で観測されなかった 5 つの選択されたマーカーからなるモデルの AUC - ROC 曲線値は 0 . 7 7 の値に達した。これらの 5 つのマーカーには排尿障害の増加するリスクとの有意な関係があったことを示している (図 1)。なお、図 1 は、実線で示すトレーニングセット (n = 1 3 2 人) と、破線で示すテストセット (n = 6 5 人) における 5 つの遺伝子マーカー (SART1、ID3、EPDR1、PAH、及びXRCC6) の組み合わせにおける ROC (receiver operating characteristic) を示すグラフである。同図中横軸は、1 - Specificity (特異度) を示し、縦軸は Sensitivity (感度) を示す。

【 0 0 7 6 】

また、リスク遺伝子型あたりの患者数を図 2 に示す。なお、図 2 は、リスク遺伝子型の度数分布を示すヒストグラムである。図 2 には、合計で 1 6 5 人の患者のグレード 0 の排尿障害 (白いバー) と、3 2 人のグレード 1 以上の排尿障害 (黒いバー) とが示されている。

排尿障害を伴う 3 2 人の患者のうちの 2 9 人 (9 0 . 6 %) には、3 つ以上のリスク遺伝子型があった。

しかしながら、排尿障害のない 5 2 人の患者 (3 1 . 5 %) にも、3 つ以上のリスク遺

50

伝子型があった。

【 0 0 7 7 】

5 . 考 察

本発明では、P C a患者のC - イオンR T後に排尿障害を発症するというリスクを階層化するのに使用できる5つの新しい遺伝子マーカーを特定することができた。これらの遺伝子マーカーは、主に本発明者らが以前行った包括的な遺伝子発現解析 (Suga T, Ishikawa A, Kohda M, et al. "Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 69, p685-693.、Ishikawa K, Koyama-Saegusa K, Otsuka Y, et al. "Gene expression profile changes correlating with radioresistance in human cell lines." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 65, p234-245.、Ban S, Ishikawa K, Kawai S, et al. "Potential in a single cancer cell to produce heterogeneous morphology, radiosensitivity and gene expression." *J Radiat Res (Tokyo)*, 2005, 46, p43-50.、Iwakawa M, Noda S, Ohta T, et al. "Different radiation susceptibility among five strains of mice detected by a skin reaction." *J Radiat Res (Tokyo)*, 2003, 44, p7-13.、Ohta T, Iwakawa M, Oohira C, et al. "Fractionated irradiation augments inter-strain variation of skin reactions among three strains of mice." *J Radiat Res (Tokyo)*, 2004, 45, p515-519.、Iwakawa M, Noda S, Ohta T, et al. "Strain dependent differences in a histological study of CD44 and collagen fibers with an expression analysis of inflammatory response-related genes in irradiated murine lung." *J Radiat Res (Tokyo)*, 2004, 45, p423-433.、Noda S, Iwakawa M, Ohta T, et al. "Inter-strain variance in late phase of erythematous reaction or leg contracture after local irradiation among three strains of mice." *Cancer Detect Prev*, 2005, 29, p376-382.) に基づいて選択された118個の候補遺伝子の中の450個のSNPsから選択された。

【 0 0 7 8 】

本発明では、高い識別力で、より良い検出感度とより良い特異性を得るためにAUC - ROC曲線を最大化することを指標としてリスクアレルの数を加算することによって予測スコアを計算した。排尿障害に対する感受性を予測するために選択された遺伝子マーカーの能力は、ケースの患者とコントロールの患者のテストセットにより確認された。

【 0 0 7 9 】

従って、これらの結果は、これらの複数の遺伝子座のこれらの遺伝的多型の組み合わせが、個人の複雑な放射線感受性を決定することを示唆している。

Andreassenらが複数のSNPを用いて乳房の線維症のリスクの評価のための簡単な推定モデルを確立しているが (Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, et al. "Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes." *Radiation Oncol*, 2003, 69, p127-135.)、本発明者らは排尿障害のリスクに関する評価のパラメータとしてリスクアレルの総数を使用した。

【 0 0 8 0 】

この研究に含まれる全てのP C a患者は、同じ病院でC - イオンR Tを受けている。排尿障害はR T後の遅発性の正常組織有害反応として起こる可能性がある。また、排尿障害は複雑な多因子性の症候であるかもしれない。

【 0 0 8 1 】

排尿障害は通常、慢性の尿道炎又は尿道狭窄症の結果として発症する。一つの病院から登録した一団の患者を分析することの1つの利点は、例えば、治療手順の差異や複数の機関における試験者の間の判定が異なる可能性などの非遺伝的なファクターが結果に関わらないことである (この考えは、本発明者らの以前の複数の機関からの乳がん患者の統計分析の間に起こったものである (Iwakawa M, Noda S, Yamada S, et al. "Analysis of non-genetic risk factors for adverse skin reactions to radiotherapy among 284 breast cancer patients." *Breast Cancer*, 2006, 13, p300-307.))。本発明におけるサ

ンプル数は少なかったが、これらの非遺伝的な臨床要因が統計学的に排尿障害発症に関わらなかったことを示した(表2及び表5参照)。

【0082】

最終的に選択されたSNPsは、SART1、ID3、EPDR1、PAH、及びXRCC6の遺伝子の中、又はこれらの遺伝子に隣接して存在していた。

これらのうちの3つ(SART1、ID3、及びXRCC6)は、核タンパク質をコードしている。

【0083】

SART1は、tri-snRNPのスプライシングの触媒として、また、腫瘍特異的免疫で機能する(Shichijo S, Nakao M, Imai Y, et al. "A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med*, 1998, 187, p277-288.; Kawamoto M, Shichijo S, Imai Y, et al. "Expression of the SART-1 tumor rejection antigen in breast cancer." *Int J Cancer*, 1999, 80, p64-67.; Makarova OV, Makarov EM, Luhrmann R. "The 65 and 110kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes." *EMBO J*, 2001, 20, p2553-2563.)。

10

【0084】

ID3 (inhibitor of DNA binding3) は、ある基本的なヘリックス - ループ - ヘリックス転写調節因子のDNA結合を抑制することによって細胞分化を負に調節する(Deed RW, Bianchi SM, Atherton GT, et al. "An immediate early human gene encodes an Id-like helix-loop-helix protein and is regulated by protein kinase C activation in diverse cell types." *Oncogene*, 1993, 8, p599-607.)。

20

【0085】

XRCC6 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6) はKU70としても知られていて、DNAヘリカーゼIIサブユニットとして機能し、DNA修復、アポトーシス、及び薬剤耐性に関係している(Reeves WH, Stoeber ZM. "Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen." *J Biol Chem*, 1989, 264, p5047-5052.; Chan JY, Lerman MI, Prabhakar BS, et al. "Cloning and characterization of a cDNA that encodes a 70-kDa novel human thyroid autoantigen." *J Biol Chem*, 1989, 264, p3651-3654.; Tuteja N, Tuteja R, Ochem A, et al. "Human DNA helicase II: A novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen." *EMBO J*, 1994, 13, p4991-5001.; Gu Y, Jin S, Gao Y, et al. "Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA endbinding activity, and inability to support V(D)J recombination." *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, p8076-8081.)。

30

【0086】

EPDR1は、推定II型膜貫通カルシウム依存性細胞接着分子である(Nimmrich I, Erdmann S, Melchers U, et al. "The novel ependymin related gene UCC1 is highly expressed in colorectal tumor cells." *Cancer Lett*, 2001, 165, p71-79.; Gregotio-King C C, McLeod JL, Collier FM, et al. "MERP1: a mammalian ependymin-related protein gene differentially expressed in hematopoietic cells." *Gene*, 2002, 286, p249-257.)。

40

【0087】

PAH (phenylalanine hydroxylase) は、フェニルアラニンをチロシンに変換するサイトゾルタンパク質をコードしている(Woo SL, Lidsky AS, Guttler F, et al. "Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria." *Nature*, 1983, 306, p151-155.)。

【0088】

現在のところ、XRCC6を除いて、放射線感受性と関連している遺伝子産物の機能はよく知られていない。また、本発明において特定されたSNPマーカーが単に代理マーカーとして働いている可能性もある。

50

【 0 0 8 9 】

しかしながら、この研究によって選択された遺伝子のうちの4つ(SART1、ID3、PAH、及びXRCC6)は、ヒト細胞株を用いたインビトロでの放射線感受性と関連した包括的遺伝子発現解析で特定されたものである(Ishikawa K, Koyama-Saegusa K, Otsuka Y, et al. "Gene expression profile changes correlating with radioresistance in human cell lines." Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 65, p234-245.)。そして、これらの遺伝子の転写は、放射線抵抗性細胞株で大きくなり、比較的、放射線感受性である細胞株において下がる傾向があった。これらの遺伝子の転写活性における変化が個々の放射線感受性の違いの原因になることが強く示唆されている。

【 0 0 9 0 】

ATM、TGFb1、LIG4、ERCC2、及びCYP2D6*4における遺伝的変異は、光子RTで処置されるPCa患者の泌尿器、膀胱、直腸、又は生殖器の有害反応発症のリスクに関係している(Cesaretti JA, Stock RG, Lehrer S, et al. "ATM sequence variants are predictive of adverse radiotherapy response among patients treated for prostate cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 61, p196-202.; Peters CA, Stock RG, Cesaretti JA, et al. "TGFB1 Single nucleotide polymorphisms are associated with adverse quality of life in prostate cancer patients treated with radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008, 70, p752-759.; Damaraju S, Murray D, Dufour J, et al. "Association of DNA repair and steroid metabolism gene polymorphisms with clinical late toxicity in patients treated with conformal radiotherapy for prostate cancer." Clin Cancer Res, 2006, 12, p2545-2554.)。

これらの遺伝子の中では、TGFb1の1つのSNPとATMの5つのSNPsが対象に含まれていた。しかし、TGFb1のrs1800469(C-509T)は排尿障害のリスクと関係していなかった($p = 0.67$)。

また、rs1800057、rs1801516、rs1801673、rs2234997、及びrs3218673の5つのATMのSNPsは、本発明においては多型ではなかった。

【 0 0 9 1 】

さらに、今回の研究で特定された遺伝的差異が、副作用の発症が線エネルギー付与の質的な違いに起因するものかどうかを研究するため、従来の光子RT又は従来の陽子線治療を受けたPCa患者でも見つかるかどうかを詳しく調べることは重要である。

【 0 0 9 2 】

なお、図2に示すように、排尿障害はケースの90%で予測することができたが、3つのリスク遺伝子型をカットオフ値として用いたとき、患者のおよそ30%に偽陽性の結果が出た。しかし、偽陽性の結果(すなわちRTの3ヵ月後に排尿障害のない患者)をもつ患者の間で、6人の患者(11.5%)は次の3ヶ月の間に排尿障害を発症していた。従って、3ヶ月で偽陽性の結果となっても、将来、泌尿器の有害反応を発症する可能性がないとは言い切れない。

別の可能性はまた、リスク遺伝子型をコードする患者が現在の分析で検出されなかったリスク遺伝子型を持っている可能性がある。

本発明では118個の候補遺伝子から排尿障害を増加させるリスクに関連している5つの多型マーカーを選ぶことができたが、排尿障害に関連しているより多くの遺伝的多型がヒトゲノムに存在する可能性がある。

より多くの候補遺伝子を解析するためにゲノム規模での関連研究を行う大規模な研究が必要である。また、RTを受けているPCa患者のより大きな集団を調査することが重要である。

【 0 0 9 3 】

6. 結論

本発明では、C-イオンRT後に排尿障害を発症するリスクを増加させるのに関連している新規なSNPsを特定して、5つのリスク遺伝子型を明らかにすることができた。より多くの患者がこれらの結果の正当性を立証するのに必要であるが、本発明者らの研究結

10

20

30

40

50

果は複数の遺伝子座が泌尿器の有害反応発症リスクの要因となる、という仮説を支持するものである。

副作用発症のリスクが予測できれば、患者の副作用についての理解がより深まり、安全な治療が受けられ、治療後も高いクオリティ・オブ・ライフを保つことに貢献すると考えられる。

本発明の結果は、3つ以上のリスク遺伝子型をもっているP C a患者が排尿障害の治療のための特定のケアを必要とすることを予測することができる。つまり、リスク遺伝子型であると結論付けられたrs2276015 (SART1)のG G、rs2742946 (ID3)のT T及びC T、rs1376264 (EPDR1)のC C、rs1126758 (PAH)のT T及びC T、rs2267437 (XRCC6)のG Gのうち3つ以上を測定対象が有するか否かを判定することのできるD N Aチップなどを開発することにより、前記した予測を的確且つ容易に行うことができると考えられる。

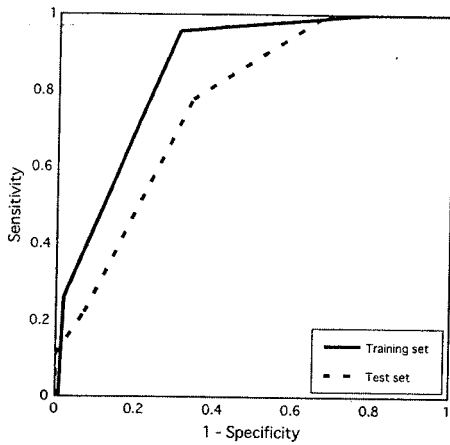
10

【産業上の利用可能性】

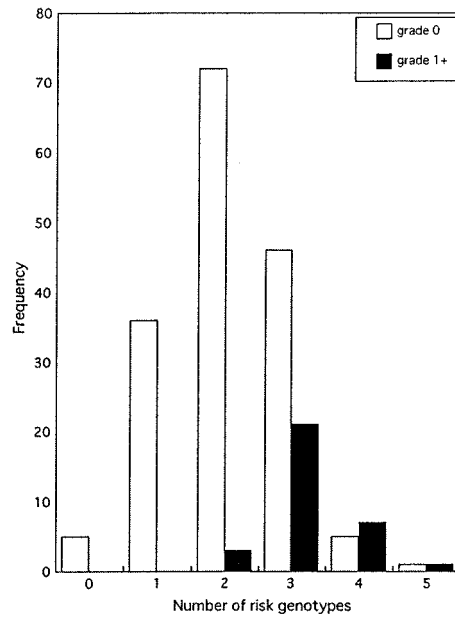
【0094】

本発明は、rs2276015 (SART1)のG G、rs2742946 (ID3)のT T及びC T、rs1376264 (EPDR1)のC C、rs1126758 (PAH)のT T及びC T、rs2267437 (XRCC6)のG Gのうち3つ以上を有するか否かを判定するためのD N Aチップとすることができ、当該D N Aチップを用いた遺伝子解析を行うことで放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応の発症を予測することが可能となる。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 37/00 1 0 2

(72)発明者 小田 英世
東京都中央区日本橋堀留町2 - 8 - 4 日本橋コアビル1F メディカル統計株式会社内

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., vol. 61, pages 196-202 (2005)
Radiother. Oncol., vol. 69, pages 127-135 (2003)
N I R S - M , 第 1 8 2 号 , 第 8 1 - 9 3 頁 (2 0 0 5 年)
日本癌学会総会記事, 第 6 4 巻 , 第 2 6 2 - 2 6 3 頁 , W - 4 5 3 (2 0 0 5 年)
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., vol. 65, pages 234-245 (2006)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/09
C12M 1/00
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 37/00
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq