

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年1月15日 (15.01.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/008412 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/062297
- (22) 国際出願日: 2008年7月7日 (07.07.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
60/929,662 2007年7月6日 (06.07.2007) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政
法人放射線医学総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE
OF RADIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒2638555
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 今井高志 (IMAI,

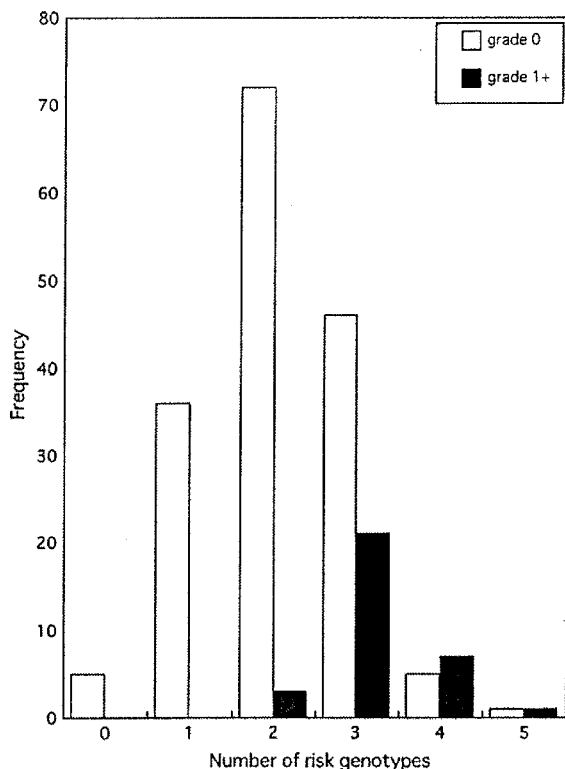
- Takashi) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川
四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究
所内 Chiba (JP). 岩川 真由美 (IWAKAWA, Mayumi)
[JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目
9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba
(JP). 小田 英世 (ODA, Eisei) [JP/JP]; 〒1030012 東京都
中央区日本橋堀留町2-8-4 日本橋コアビル1F
メディカル統計株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 磯野 道造 (ISONO, Michizo); 〒1020093 東京
都千代田区平河町2丁目7番4号 砂防会館別館内
磯野国際特許商標事務所気付 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM,

[続葉有]

(54) Title: DNA CHIP FOR PREDICTION OF OCCURRENCE OF LATE ADVERSE REACTION IN URINARY ORGAN AFTER RADIATION THERAPY, AND METHOD FOR PREDICTION OF OCCURRENCE OF LATE ADVERSE REACTION IN URINARY ORGAN AFTER RADIATION THERAPY USING THE SAME

(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

[図2]



(57) Abstract: Disclosed are a DNA chip and a prediction method for predicting the occurrence of a late adverse reaction in a urinary organ after C-ion RT. The DNA chip comprises a supporting means for supporting a DNA probe thereon; and two or more genetic markers supported on the supporting means. The prediction method comprises: a first step of hybridizing a genetic marker with labeled DNA prepared from a subject to be examined; a second step of identifying nucleotides of both alleles of the labeled DNA hybridized with the genetic marker; and a third step of determining the combination of the identified nucleotides of both alleles of the labeled DNA as being a risk genotype when the combination of the identified nucleotides corresponds to a specified combination, and predicting that the subject is predisposed to develop a late adverse reaction in a urinary organ after radiation therapy when the number of the risk genotypes is three or more and that the subject is not predisposed to develop a late adverse reaction in a urinary organ after radiation therapy when the number of the risk genotypes is two or less. The method enables to predict whether or not a subject is affected with a late adverse reaction in a urinary organ after radiation therapy.

[続葉有]

WO 2009/008412 A1



KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(57) 要約: C-イオンRT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DNAチップ及び予測方法を提供する。DNAチップは、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する。予測方法は、遺伝子マーカーと、測定対象から調製した標識DNAとをハイブリダイズさせる第1ステップと、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、特定した標識DNAの両対立遺伝子の塩基の組み合わせが特定の場合にリスク遺伝子型と判定し、当該リスク遺伝子型の数が3つ以上であれば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、2つ以下であれば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。本発明によれば、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。

明 細 書

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

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] 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、いくつかの異なる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)。

[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。

[0010] 非特許文献1:Jemal A, Siegel 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 the therapeutic potential of heavy ion therapy for patients with locally advanced prostate cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 58,p89-97.

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.

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. “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.

非特許文献11: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12: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1～12に報告された多型が全てのPCa患者のRT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RT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RT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RT後の泌尿生殖器の晩期有害反応について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.)上のSNPs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DNAチップは、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、rs1126758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、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している。

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] 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。

[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。

[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] 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、66.0GyE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。

[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20～80bases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Affimetrix社型式、又は予め調製されたDNA断片を10 μ Lから数百 μ Lの大きさを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。

[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

(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、rs1126758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

[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

g 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などとすることができる。

[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の遺伝子型と泌尿器の有害反応との関係の評価するために、AUC-ROC(ROC曲線の下面積)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、AUC-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%であるということの意味する。

[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。MassARRAY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 Biol 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の関係と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。

また、統計的な分析は、例えば、SNPAlyzeソフトウェア(バージョン6.0、<http://www.dynacom.co.jp/e/products/package/snpanyze/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。

[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。

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DNAは、例えば100～200bases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。

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 TGC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°C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°C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。

- [0047] 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。
- [0048] 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。
- [0049] 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.)。
- [0050] 患者の大部分がPhase IIの研究に登録されて66.0GyEの放射線量を受けた。66.0GyE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。
- [0051] 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。
- [0052] 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。
- [0053] 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.)。

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。

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。

[0054] 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・ワインベルグ平衡は、健康なドナーと全PCa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。

[0055] 排尿障害のグレードとPCa患者のSNPs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、SNPAlyze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。

[0056] 排尿障害のリスクに関連している適切なSNPマーカースelectionするために、トレーニングセットを使用してマーカースelectionの検出感度と特異性をAUC-ROC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。

AUC-ROC値に貢献するマーカースelectionの手順は、以下の通りである:

- (1) 有意なSNPs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 $\{x_1, \dots, x_k\}$ 中の平均AUC-ROCが最大となるように $PS_1 = x_k$ を設定する。
- (4) PS_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) $PS_1 + x_k$ が $\{PS_1 + x_1, \dots, PS_1 + x_{k-1}\}$ 中の平均AUC-ROCが最大となるように $PS_2 = PS_1 + x_k$ 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。

[0057] 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AUC-ROC曲線分析でさらに推定した。

[0058] 4. 結果

118個の遺伝子座における合計450個のSNPsがPCa患者の放射線感受性に変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、450個のSNPsのうち12個は今回のPCa患者グループにおいて多型ではなかった。さらに、27個のSNPs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SNPsは、健康な提供者のグループにおいてハーディー・ワインベルク平衡から外れていた($p < 0.001$)ので分析しなかった。また、29個のSNPsは遺伝子型がそれぞれの隣接するSNPsのものと同一であったので、さらなる分析から除外した。

従って、109個の遺伝子座の373個のSNPsをさらに分析した。

これらのSNPsの位置的特性を表1に示す。

[0059] [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)

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] [表2]

Characteristic	Grade 0 (n = 109)	Grade 1+ (n = 23)	<i>p</i>
Age during RT (y)			
Mean \pm SD	69 \pm 5	68 \pm 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)	

[0063] 表2中の略語:RTは放射線治療 (radiotherapy)、SDは標準偏差 (standard deviation)、GyE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109人、グレード1の患者が23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100%にはならない。

[0064] 14個の遺伝子座のSNPs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。

[0065] [表3]

Gene	rsSNP ID	Chr	SNP	Allele		Genotype		Dominant model		Recessive model	
				Grade 0	Grade 1	Grade 0	Grade 1	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)
				M/m	M/m	MM/Mm/mm	MM/Mm/mm				
ALAD	rs1805312	9	CG	192/26	35/11	83/26/0	147/2	NC	0.029	0.19	2.05 (0.79-5.28)
CD68	rs2270341	17	TA	145/73	25/21	46/53/10	89/6	3.49 (1.12-10.8)	0.035	0.64	1.36 (0.53-3.49)
XRCC6	rs2267437	22	CG	148/70	25/21	48/52/9	89/6	3.92 (1.23-12.4)	0.025	0.49	1.47 (0.57-3.76)
ID3	rs2742946	1	CT	127/91	21/25	48/52/9	217/4	1.13 (0.34-3.76)	0.76	0.023	4.96 (1.10-22.3)
LIG1	rs1171097	19	CG	178/40	31/15	73/32/4	119/3	3.93 (0.81-18.9)	0.10	0.098	2.21 (0.89-5.49)
LIG3	rs3744357	17	CT	188/30	33/13	80/28/1	129/2	10.2 (0.89-118.)	0.078	0.078	2.52 (1.00-6.35)
MAP3K7	rs1475489	6	AT	158/60	24/20	56/46/7	612/4	3.23 (0.85-12.2)	0.089	0.060	2.81 (1.02-7.74)
MGMT	rs1803965	10	CT	184/34	45/1	79/26/4	221/0	NC	1.0	0.015	0.11 (0.01-0.92)
PAH	rs1126758	12	CT	205/13	39/7	96/13/0	167/0	NC	NC	0.048	3.23 (1.11-9.32)
PER3	rs228697	1	CG	204/14	38/8	95/14/0	158/0	NC	NC	0.026	3.61 (1.29-10.0)
SART1	rs2276015	11	GA	172/46	44/2	70/32/7	212/0	NC	0.61	0.012	0.17 (0.03-0.76)
SERPINA3	rs2268337	14	AG	163/55	42/4	61/41/7	19/4/0	NC	0.61	0.019	0.26 (0.08-0.83)
TGFBR1	rs868	9	AG	201/17	46/0	94/13/2	23/0/0	NC	1.0	0.072	NC
EPDR1	rs1376264	7	CT	168/50	42/4	61/46/2	19/4/0	NC	1.0	0.019	0.26 (0.08-0.83)

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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)。

[0069] [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

[0070] 表4中の略号:SNPは一塩基多型(single nucleotide polymorphism)、AUC-ROCはROC曲線の下での面積(area under curve of receiver operating characteristic)を示す。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] [表5]

Characteristic	Grade 0 (n = 56)	Grade 1+ (n = 9)	p
Age at RT (y)			
Mean \pm SD	68 \pm 6	68 \pm 7	
Range	51-80	52-79	0.99 [†]
Smoking habit			
Yes	7 (12.5)	0 (0.0)	0.76*
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*
63.0	37 (66.1)	6 (66.7)	
66.0	4 (7.1)	2 (22.2)	

[0074] 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56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100%にはならない。

[0075] 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0.77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=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。同図中横軸は、1-Specificity(特異度)を示し、縦軸はSensitivity(感度)を示す。

[0076] 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165人の患者のグレード0の排尿障害(白いバー)と、32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32人の患者のうちの29人(90.6%)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52人の患者(31.5%)にも、3つ以上のリスク遺伝子型があった。

[0077] 5. 考察

本発明では、PCa患者のC-イオンRT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, Otsuk

a 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。

[0078] 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。

[0079] 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." *Radiother 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。

[0080] この研究に含まれる全てのPCa患者は、同じ病院でC-イオンRTを受けている。排

尿障害はRT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。

[0081] 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 radiot herapy 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.)。

[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 R W, 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.)。

[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, Stoeberl 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.)。

[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.)。

[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。

[0089] 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。

- [0090] 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。

- [0091] 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。

- [0092] 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。

[0093] 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PCa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GG、rs2742946 (ID3)のTT及びCT、rs1376264 (EPDR1)のCC、rs1126758 (PAH)のTT及びCT、rs2267437 (XRCC6)のGGのうちの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DNA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。

産業上の利用可能性

[0094] 本発明は、rs2276015 (SART1)のGG、rs2742946 (ID3)のTT及びCT、rs1376264 (EPDR1)のCC、rs1126758 (PAH)のTT及びCT、rs2267437 (XRCC6)のGGのうちの

3つ以上を有するか否かを判定するためのDNAチップとすることができ、当該DNA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。

請求の範囲

- [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、rs1126758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、
- 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。
- [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、

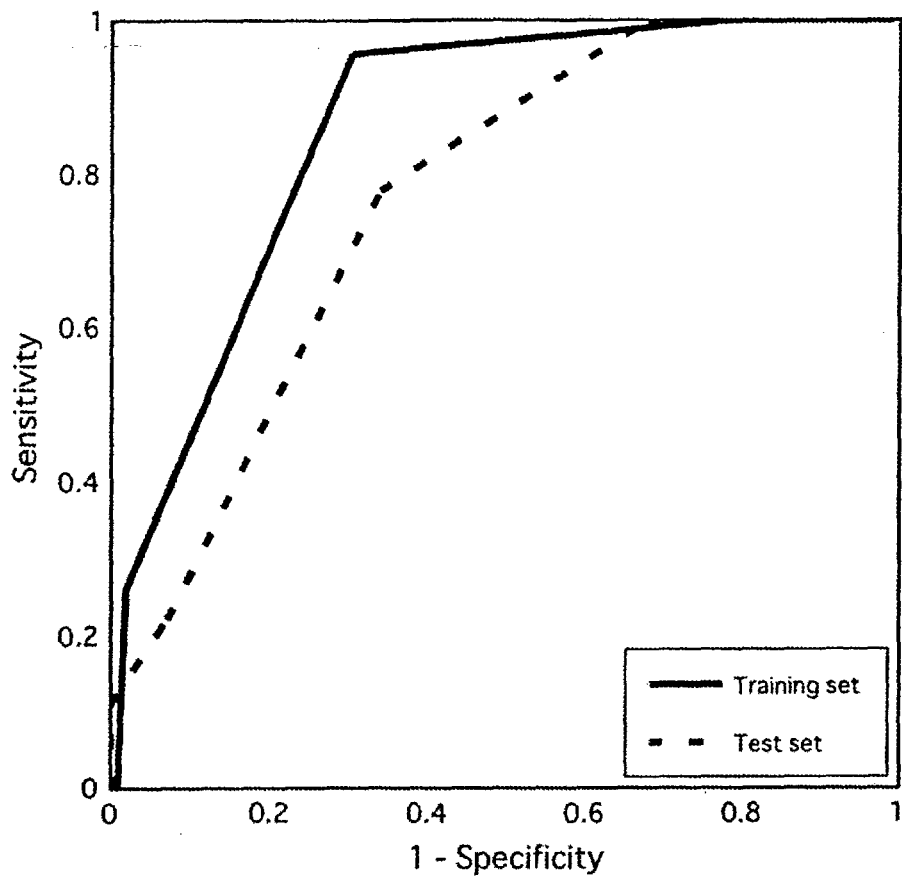
rs1126758についてはTT又はCTである場合、及び、

rs2267437についてはGGである場合

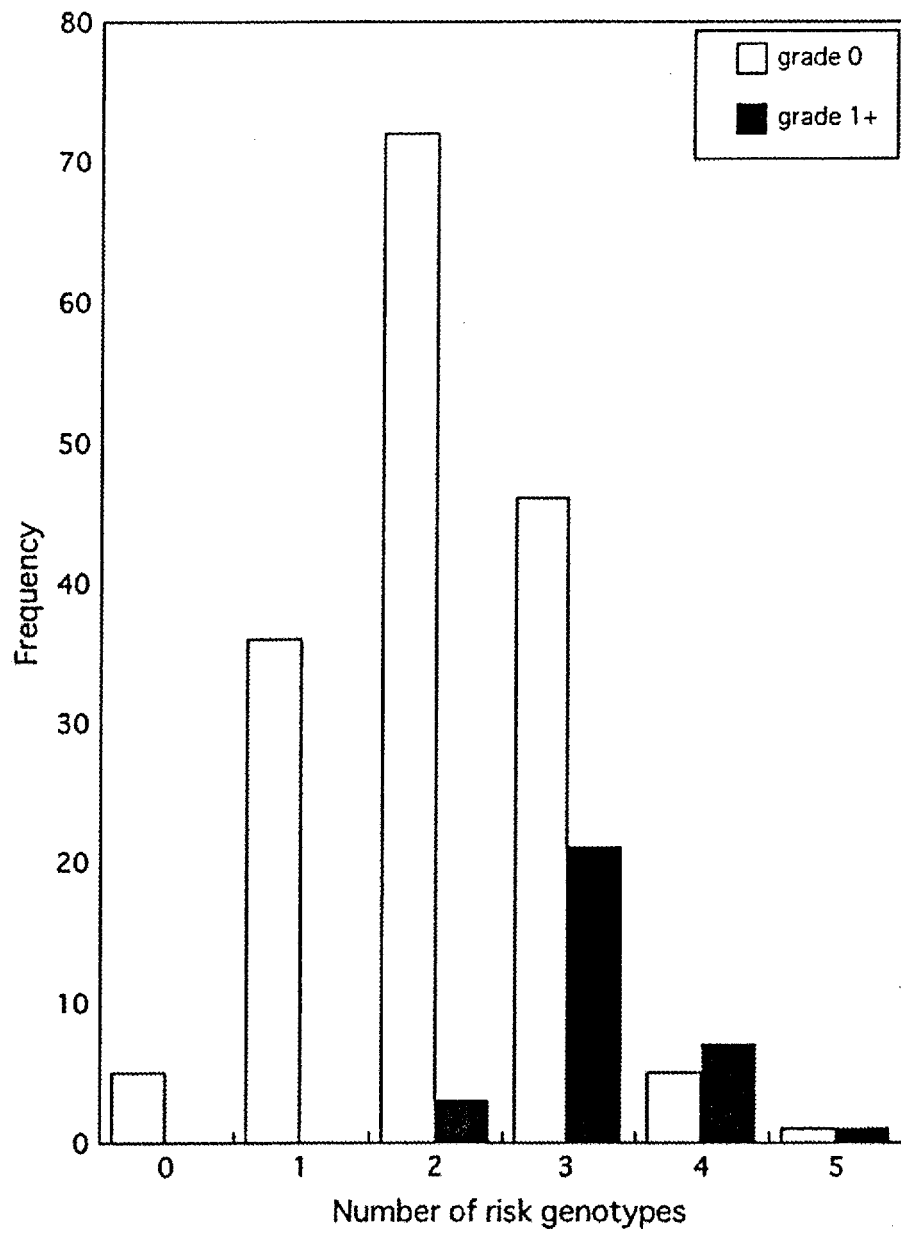
をリスク遺伝子型であると判定し、当該リスク遺伝子型の数が3つ以上である場合は放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応が発症し易いと予測し、当該リスク遺伝子型の数が2つ以下である場合は放射線治療後における泌尿器の晩期有害反応が発症し難いと予測する第3ステップと、

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。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062297

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i, C12M1/00(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMII), GeneCards

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shuhei NODA et al., "Zenritsusengan Hoshasen Chiryogo, Hinyokikei Yugai Jisho Hassho ni Kanren shita Idenshi Marker no Kensaku", The Japanese Cancer Association Gakujutsu Sokai Kiji (2005 Nen), Vol.64, pages 262 to 263, W-453	1, 2
A	Takashi IMAI, "Idenshi Tagata Marker o Mochiita Hoshasen Chiryogo Yugai Hanno Yosokuho", NIRS-M (2005 Nen), Vol.182, pages 81 to 93	1, 2
A	ISHIKAWA K. et al. 'Gene expression profile changes correlating with radioresistance in human cell lines.' Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. (2006) vol. 65, pages 234-245	1, 2

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 September, 2008 (03.09.08)

Date of mailing of the international search report
16 September, 2008 (16.09.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062297

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	APOSTOLOPOULOS J. et al. 'Identification and characterization of a novel family of mammalian ependymin-related proteins (MERPs) in hematopoietic, nonhematopoietic, and malignant tissues.' DNA Cell Biol. (2001) vol. 20, pages 625-635	1,2
A	JP 2007-116905 A (National Institute of Radiological Sciences), 17 May, 2007 (17.05.07), (Family: none)	1,2

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GeneCards

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	野田秀平 他 6 名「前立腺がん放射線治療後、泌尿器系有害事象発症に関連した遺伝子マーカーの検索」日本癌学会学術総会記事 (2005 年) 第 6 4 巻, 第 2 6 2 - 2 6 3 頁, W-4 5 3	1, 2
A	今井高志「遺伝子多型マーカーを用いた放射線治療後有害反応予測法」N I R S - M (2005 年) 第 1 8 2 号, 第 8 1 - 9 3 頁	1, 2
A	ISHIKAWA K. et al. 'Gene expression profile changes correlating with radioresistance in human cell lines.' Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. (2006) vol. 65, pages 234-245	1, 2

C 欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 03.09.2008	国際調査報告の発送日 16.09.2008
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 石丸 聡 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	APOSTOLOPOULOS J. et al. 'Identification and characterization of a novel family of mammalian ependymin-related proteins (MERPs) in hematopoietic, nonhematopoietic, and malignant tissues.' DNA Cell Biol. (2001) vol. 20, pages 625-635	1, 2
A	JP 2007-116905 A (独立行政法人放射線医学総合研究所) 2007.05.17, (ファミリーなし)	1, 2