

**進行期子宮頸部扁平上皮癌の
放射線治療予後に関する
アポリポ蛋白C-II**

**関西医科大学 医学部 放射線学科
准教授 播磨 洋子**

研究背景

- 局所進行期子宮頸癌において放射線治療は重要な役割を果たしているが、Ⅲ期の5年生存率は約45%、Ⅳ期は約20%と不良で、機器や抗癌剤の進歩にもかかわらず治癒率に著しい向上が見られない。
- 個々の症例で放射線治療効果は明らかに異なるので、局所進行期子宮頸癌の5年生存率を向上させるには放射線抵抗性に関与する遺伝子、分子を追求し、治療戦略を立てる以外に方法はない。

本研究の大きな目的

- このように、我々は従来から**癌組織**を用いて進行期子宮頸癌の放射線治療後の予後予測因子を検討してきた。
- 本研究では採取が簡便であり、侵襲が少ない**血清**を用いて予後予測因子を検討することを考えた。すなわち、初診時血清で予後を予測できるか否かを検討した。

子宮頸癌の放射線治療予後予測因子としてのバイオマーカー研究の流れ

- 1. 予備実験**: 放射線治療前の進行期子宮頸癌患者血清を用いてプロテインチップで検討した結果、予後不良群は良好群に比べて8,981m/z peakの発現が減少した(2006年-2007年)。
- 2. PMF解析**: 8,981m/z peak に相当する蛋白がアポリポ蛋白C-II (ApoC-II) であることを同定した(2008年)。
- 3. 再現性評価**: 37検体におけるプロテインチップとApoC-IIポリクロナール抗体免疫比濁法で得られた結果の相関関係を検討した。その後、ApoC-IIのモノクロナール抗体Elisa-Kitを作成した(2009年)。
- 4. 検証実験**: 65例の進行期子宮頸癌患者を対象に、ApoC-II Elisa-Kitが放射線治療後の予後に関与するかを検証した(2010年)。

【予備実験】

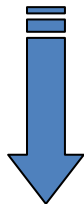
対象

	予後良好群 (無再発生存)	予後不良群 (癌死)
First Screening (2006, n=6)	Stage IIB 1 IIIB 2	Stage IIIB 2 IVA 1
Second Screening (2007, n=12)	Stage IIIB 8	Stage IIIB 3 IVA 1

Stage IIB 1例、
Stage IIIB 15例、
Stage IVA 2例。
全ての症例に対して同一の
放射線治療を施行した。

バイオマーカー検索の対象と方法

First Screening Experiment
(2006)



Second Screening Experiment
(2007)

Samples for First Screening

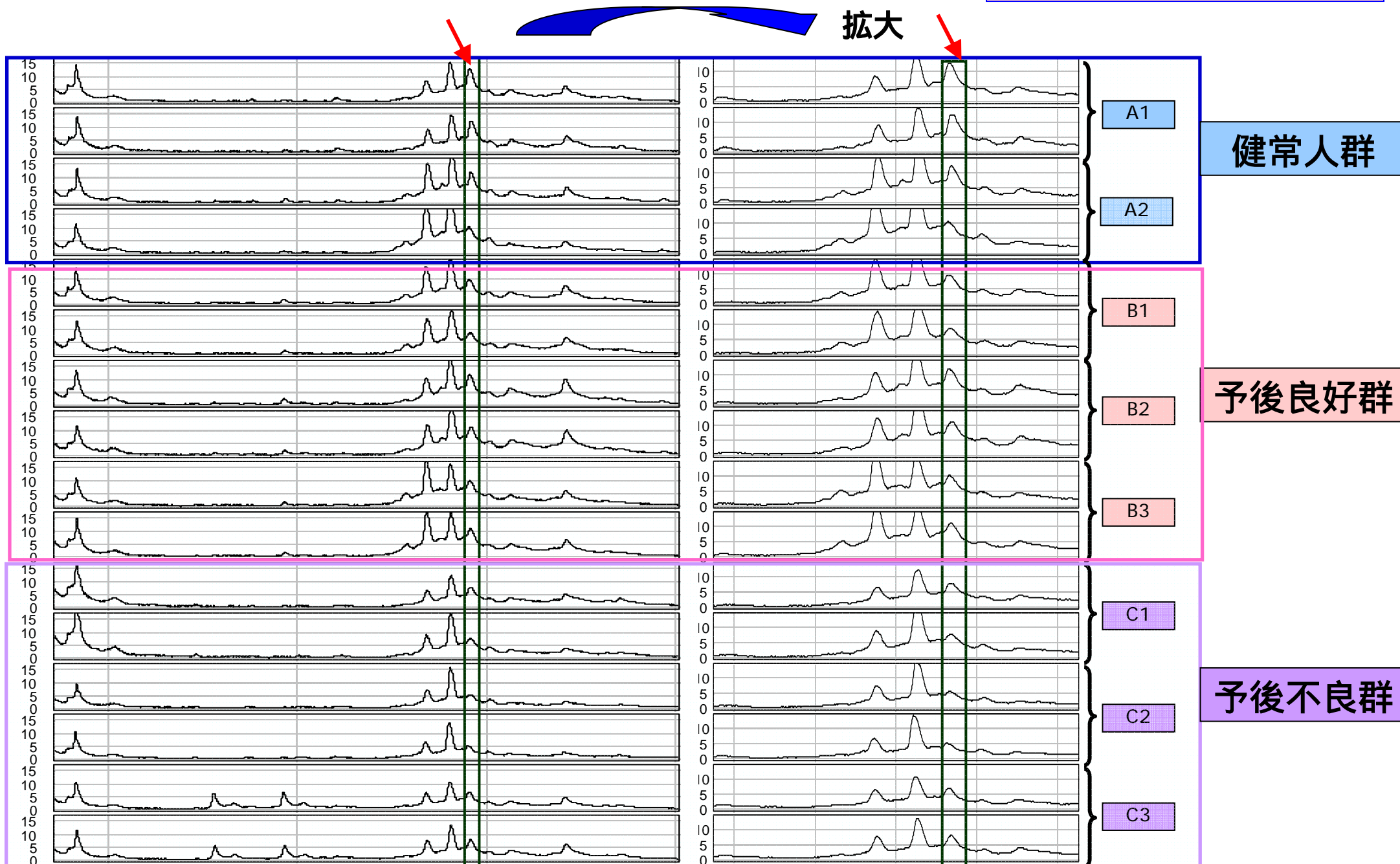
サンプル群	n
健常者群	2
予後良好群	3
予後不良群	3

Samples for Second Screening

サンプル群	n
健常者群	4
予後良好群	8
予後不良群	4

Peak No.4 : 陽イオン交換チップ pH7, Fr.organic, SPA-Low

First Screening (2006)

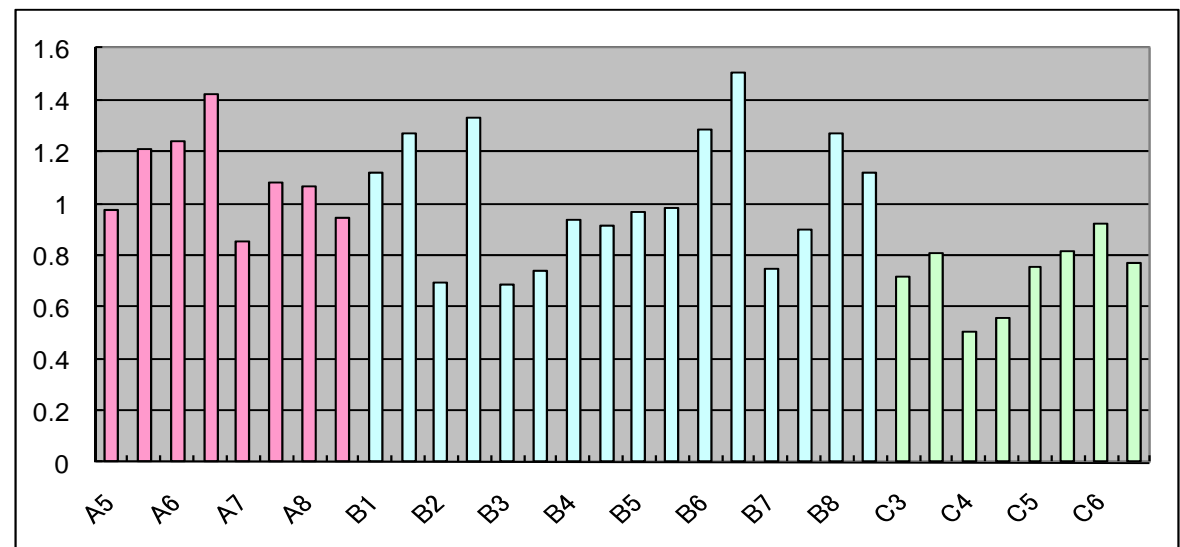
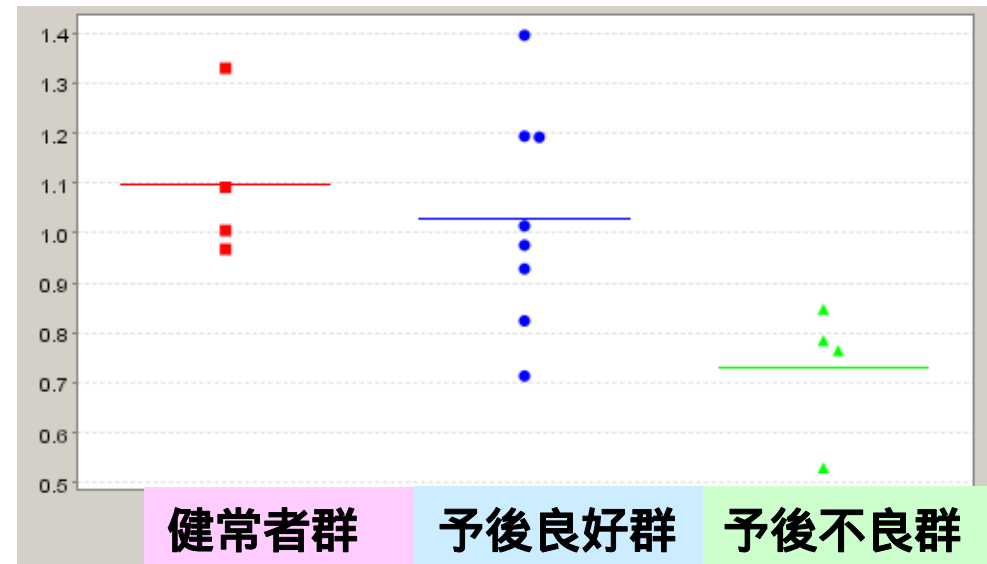


タテ軸: Peak Intensity (μA) ヨコ軸: m/z (Da)

Peak No.4 : m/z 陽イオン交換チップ (pH 7) SPA

Second Screening (2007)

P-value		
健常者群 (A) vs 予後良好群(B) vs 予後不良群 (C)		
0.04521		
A vs B	A vs C	B vs C
0.61038	0.020921	0.04154



3 peaks (No.4, 11, 12) が2回のscreeningで重なった.

Candidate Peaks in the First Screening Experiment			Candidate Peaks in the Second Screening Experiment						
Peak No.	Assay Condition	EAM	Peak No.	Assay Condition	EAM	P-value			
						A vs B vs C	A vs B	A vs C	B vs C
1	IMAC, Fr.pH9	SPA-Low	1	IMAC, Fr.pH9	SPA-Low	0.88819	0.86513	0.56370	0.73410
2	IMAC, Fr.pH9	SPA-Low	2	IMAC, Fr.pH9	SPA-Low	0.28206	0.12637	0.24821	0.73410
3	IMAC, Fr.pH9	SPA-Low	3	IMAC, Fr.pH9	SPA-Low	0.90550	0.86513	1.00000	0.61038
4	CM10 (pH7), Fr.organic	SPA-Low	4	CM10 (pH4), Fr.organic	CHCA	0.04521	0.61038	0.02092	0.04154
5	CM10 (pH7), Fr.pH9	SPA-High							
6	CM10 (pH4), Fr.organic	SPA-High	6	IMAC, Fr.organic	SPA-High	0.66676	0.49691	0.38648	0.61038
7	CM10 (pH4), Fr.pH4	SPA-High							
8	IMAC, Fr.pH9	SPA-High	8	IMAC, Fr.pH9	SPA-High	0.50053	0.17423	0.77283	0.61038
9	CM10 (pH4), Fr.pH9	SPA-High							
10	CM10 (pH7), Fr.pH9	SPA-High							
11	IMAC, Fr.pH4	SPA-High	11	IMAC, Fr.pH4	SPA-High	0.04817	0.01742	0.08326	0.49691
12	IMAC, Fr.pH4	SPA-High	12	IMAC, Fr.pH4	SPA-High	0.04817	0.01742	0.08326	0.49691

CM10 : Weak Cation Exchange ProteinChip
 H50 : Reversed Phase/Hydrophobic ProteinChip
 IMAC : Metal Affinity Capture ProteinChip with Cu²⁺
 EAM : Energy Absorbing Molecule
 SPA : Sinapinic acid
 CHCA : Alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid

3 peaks (No.4, 11, 12) の有意差検定

Peak	A vs. B vs. C	A vs. B	A vs. C	B vs. C
No.4	0.045	0.610	0.021	0.042
No.11	0.011	0.007	0.021	0.308
No.12	0.011	0.007	0.021	0.308

A:健常者群、B:予後良好群、C:予後不良群

➤ Peak No.4は予後良好群と予後不良群間に有意差を認めた。

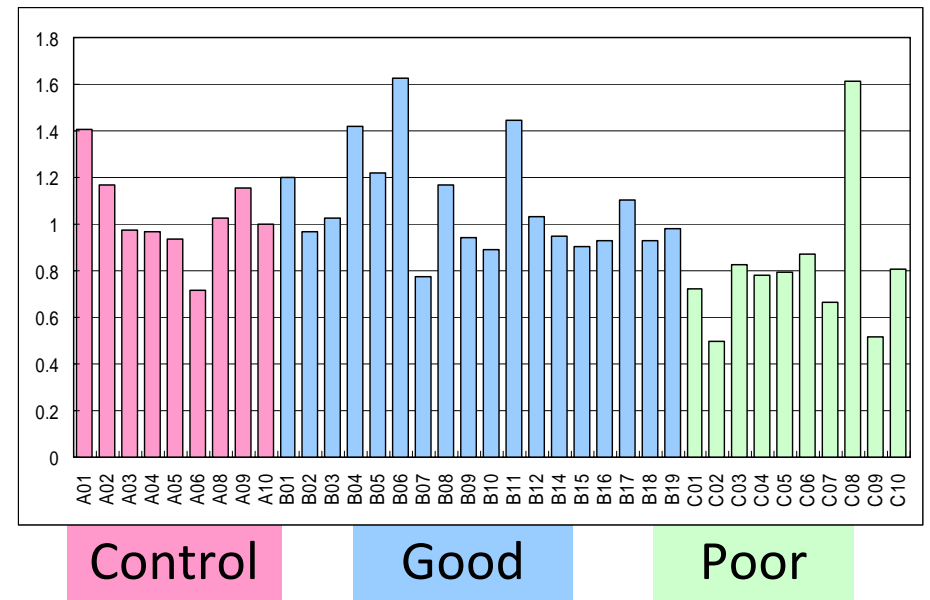
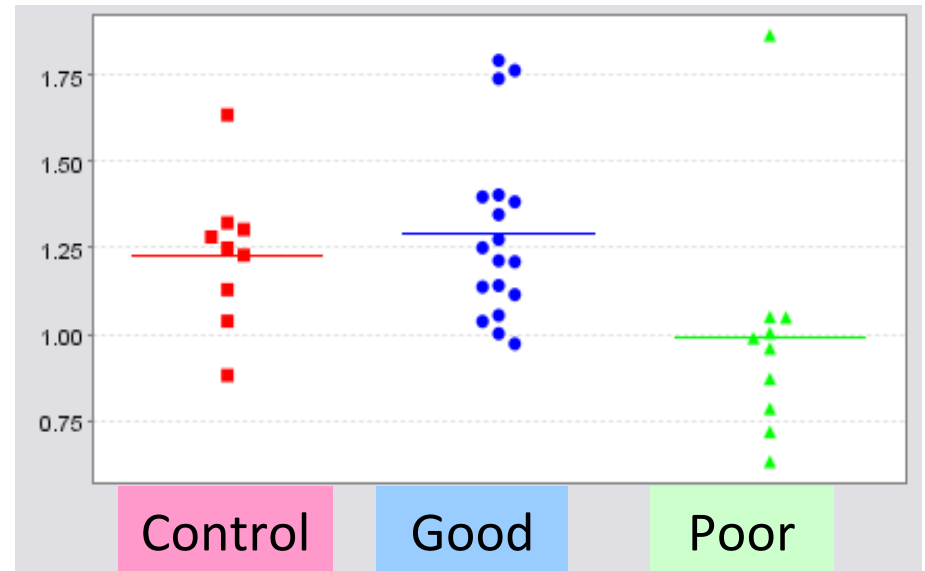
【再現性評価とPMF解析】

再現性評価の方法

- 37検体(健常者群9例、予後良好群18例、予後不良群10例)でNo.4 peakをプロテインチップで検証
- ペプチドフィンガープリンティング(PMF) 解析によりNo.4 peak にある蛋白Xを同定
- 37検体で同定した蛋白Xをポリクロナール抗体免疫比濁法で検証
- 37検体におけるプロテインチップと免疫比濁法で得られた結果の相関関係を検証

37検体におけるプロテインチップシステムを用いたNo.4 peakの検証

P-value		
A (Control) vs B (Good) vs C (Poor)		
0.00349		
A vs B	A vs C	B vs C
0.79705	0.01431	0.00111



Search Results using PMF Analysis

ProFound - Search Result Summary

Apolipoprotein C-II

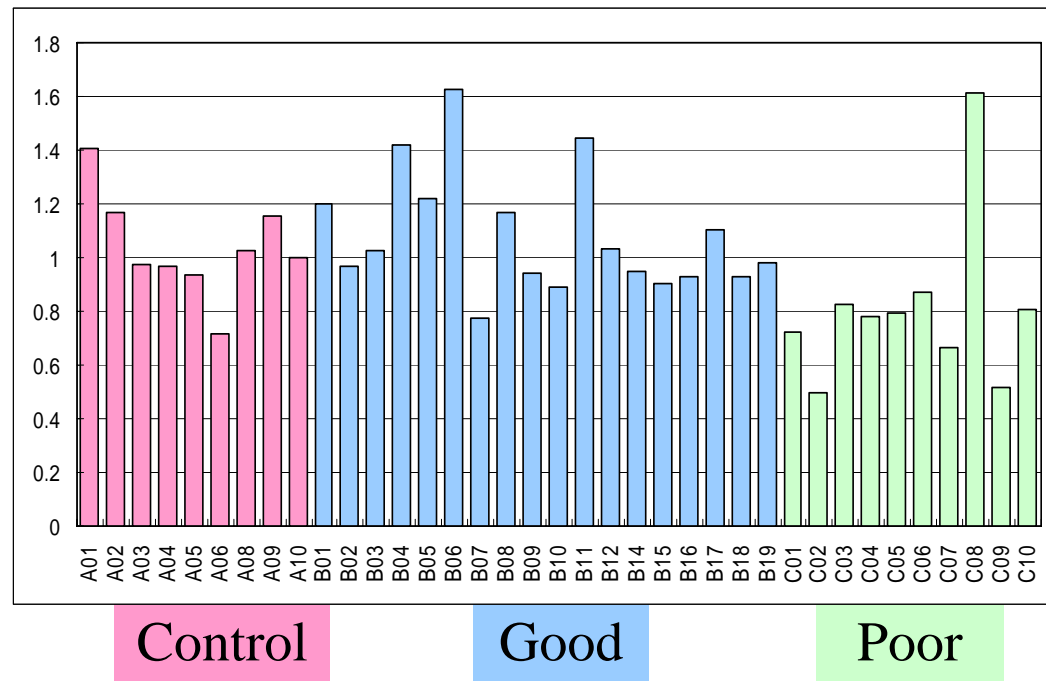
Protein Candidates							
Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	R
+1	1.0e+000	2.38	gi 14277770 pdb 1I5J A Chain A, Nmr Structure Of Human Apolipoprotein C-Ii In The Presence Of Sds	87	4.6	8.90	⊙
+2	1.2e-011	-	gi 50258196 gb EAL20890.1 hypothetical protein CNBE2510 [Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A]	19	7.1	48.13	⊙
3	4.3e-012	-	gi 30263284 ref NP_845661.1 ybaK/ebsC family protein [Bacillus anthracis str. Ames]	34	9.1	17.57	⊙
4	3.5e-012	-	gi 56475739 ref YP_157328.1 conserved hypothetical protein, related to eukaryotic diacylglycerol kinase [Azoarcus sp. EbN1]	21	9.7	35.59	⊙
5	2.6e-012	-	gi 17082477 gb AAK73121.2 AF391808_31 RIRE gag/pol protein [Zea mays]	24	10.0	33.72	⊙
6	2.1e-012	-	gi 401238 sp P31252 UBE13_WHEAT Ubiquitin-activating enzyme E1 3	10	5.3	118.03	⊙
+7	1.6e-012	-	gi 44413 emb CAA35710.1 unnamed protein product [Mycobacterium leprae]	44	6.8	17.20	⊙
8	3.4e-013	-	gi 37520720 ref NP_924097.1 hypothetical protein glr1151 [Gloeobacter violaceus PCC 7421]	13	5.4	44.37	⊙
9	2.8e-013	-	gi 15641797 ref NP_231429.1 hypothetical protein VC1794 [Vibrio cholerae O1 biovar eltor str. N16961]	39	5.4	21.87	⊙
10	2.6e-013	-	gi 4105133 gb AAD02268.1 putative vetispiradiene synthase 3 [Solanum tuberosum]	11	5.1	64.63	⊙

NOTE:

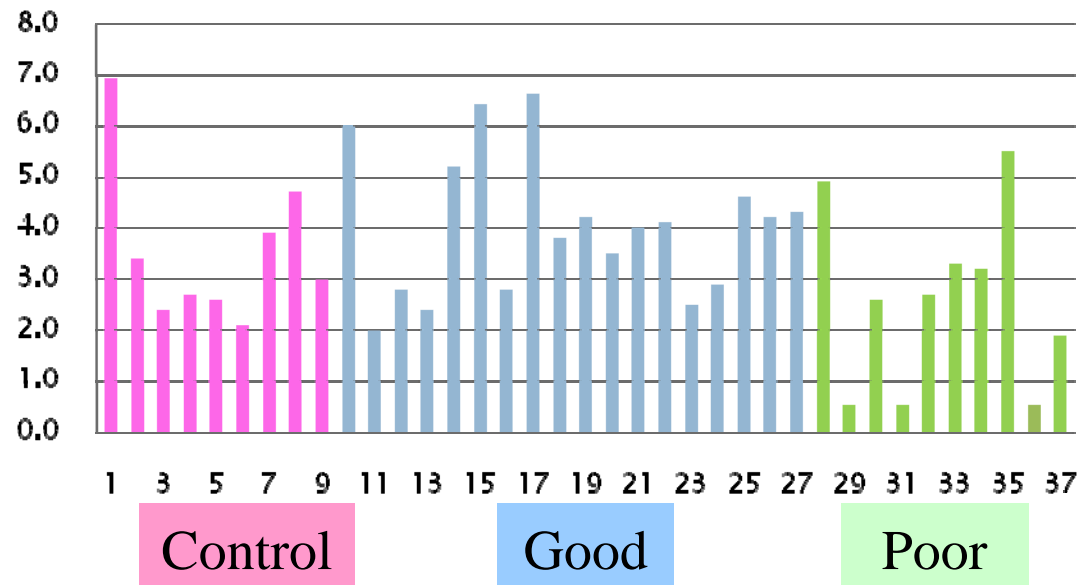
1. To search again using [unmatched masses](#), click the symbol ⊙.
2. Highly similar protein sequences were given the same rank (click "+" to expand/contract).

37検体におけるプロテインチップとApoC-II免疫比濁法の比較

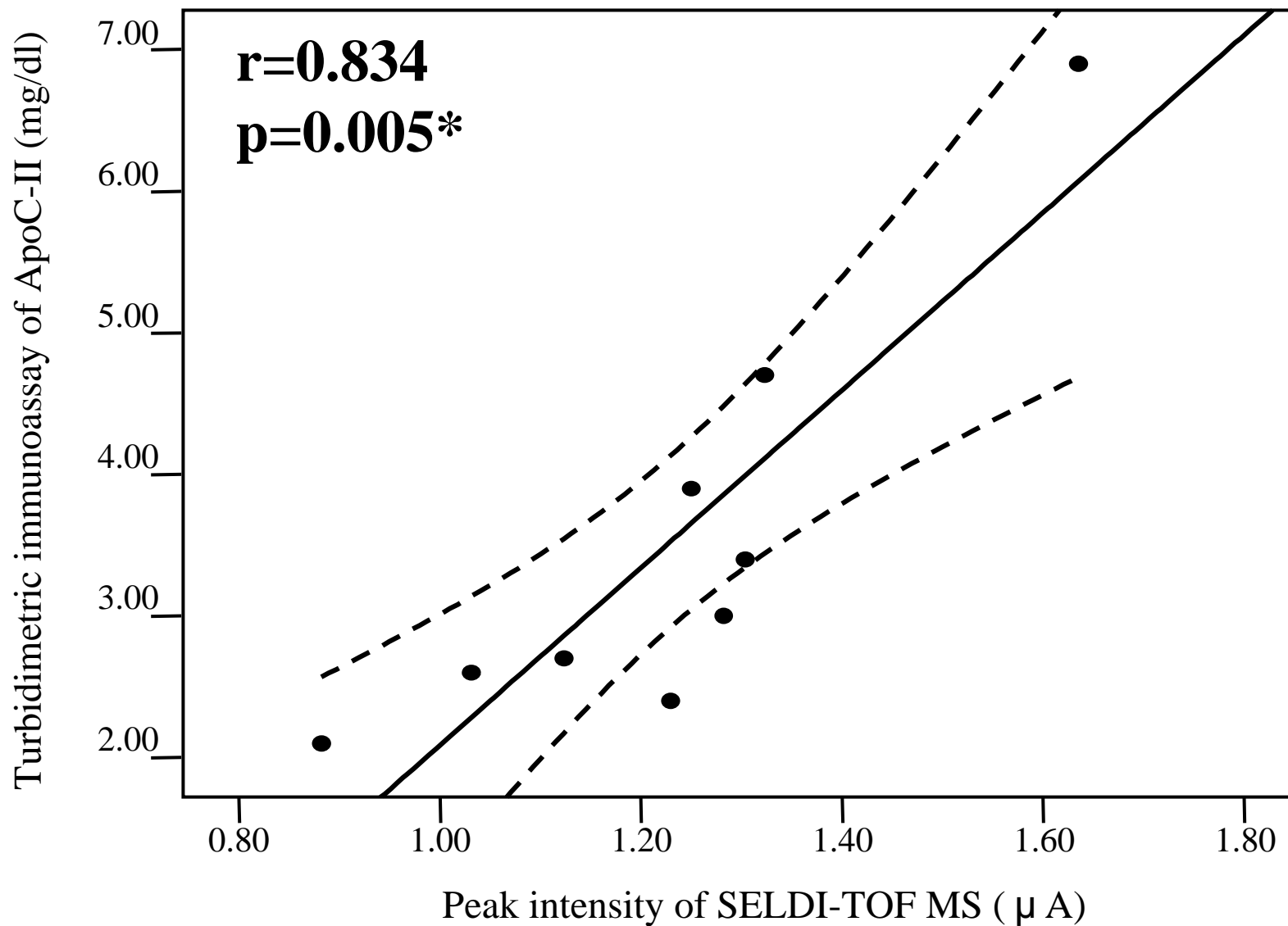
プロテインチップ
Peak No.4



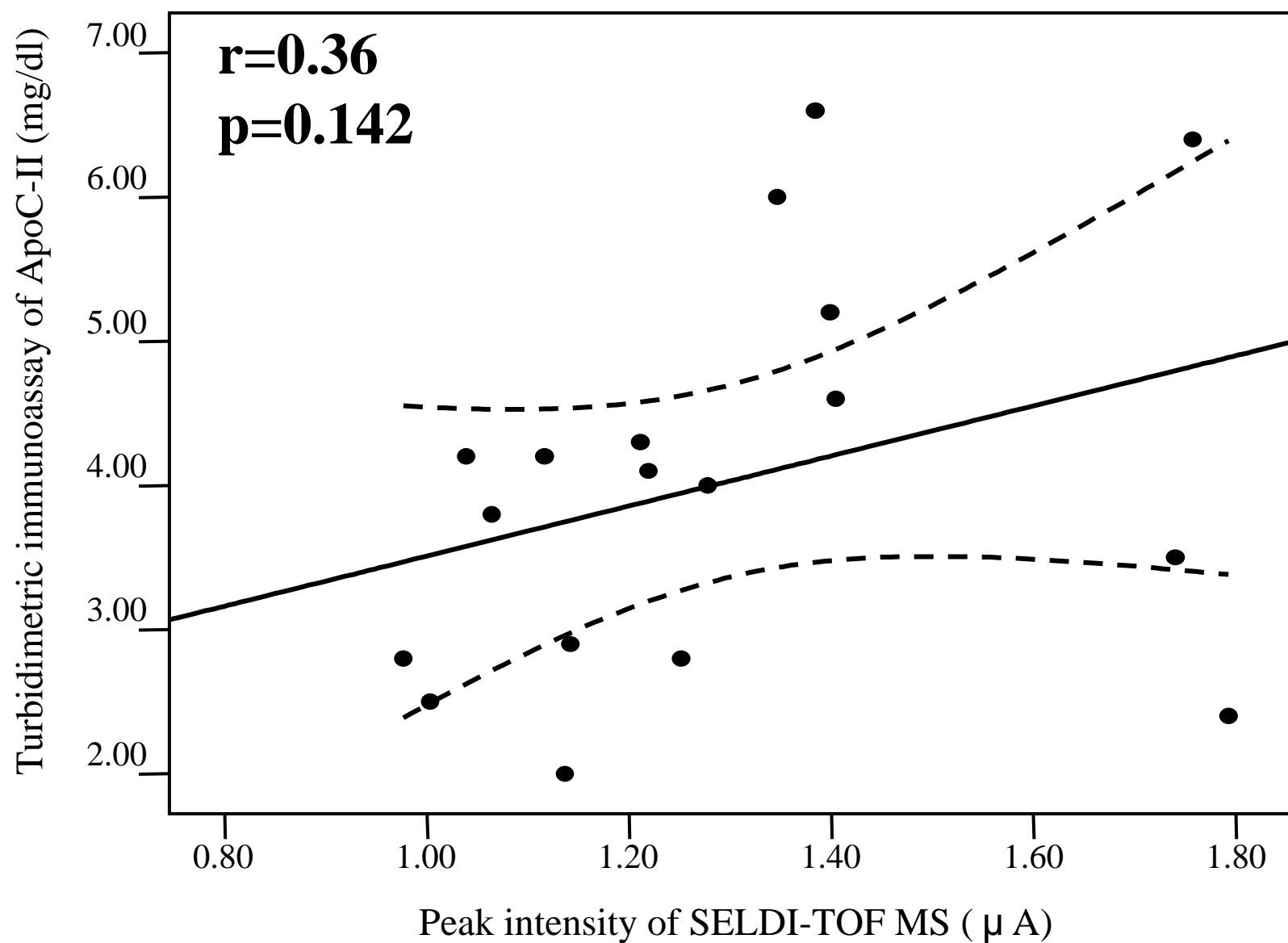
ApoC-II
免疫比濁法



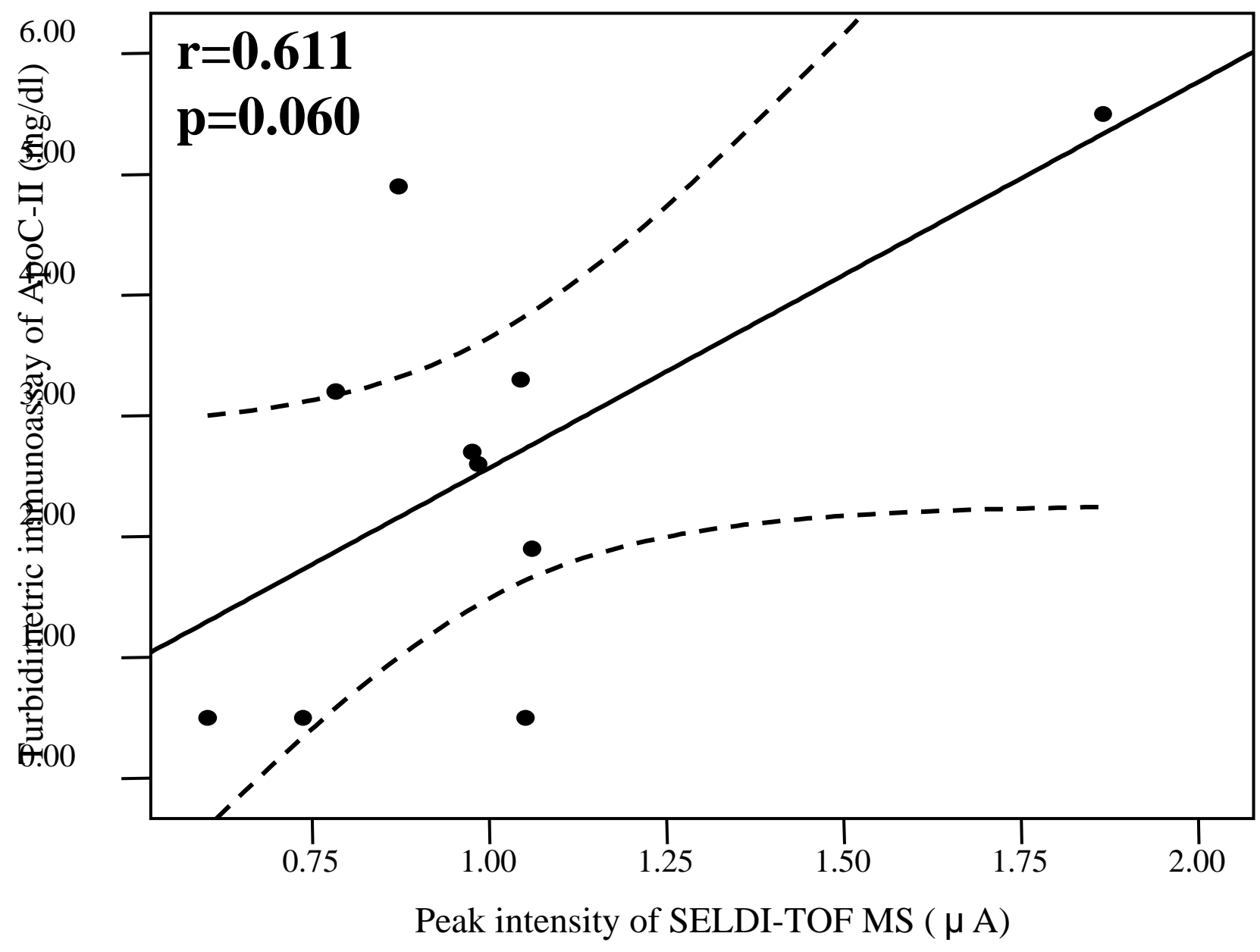
健常者における ApoC-II Peak Intensity と免疫比濁法値の相関関係



予後良好群におけるApoC-II Peak Intensityと免疫比濁法値の相関関係

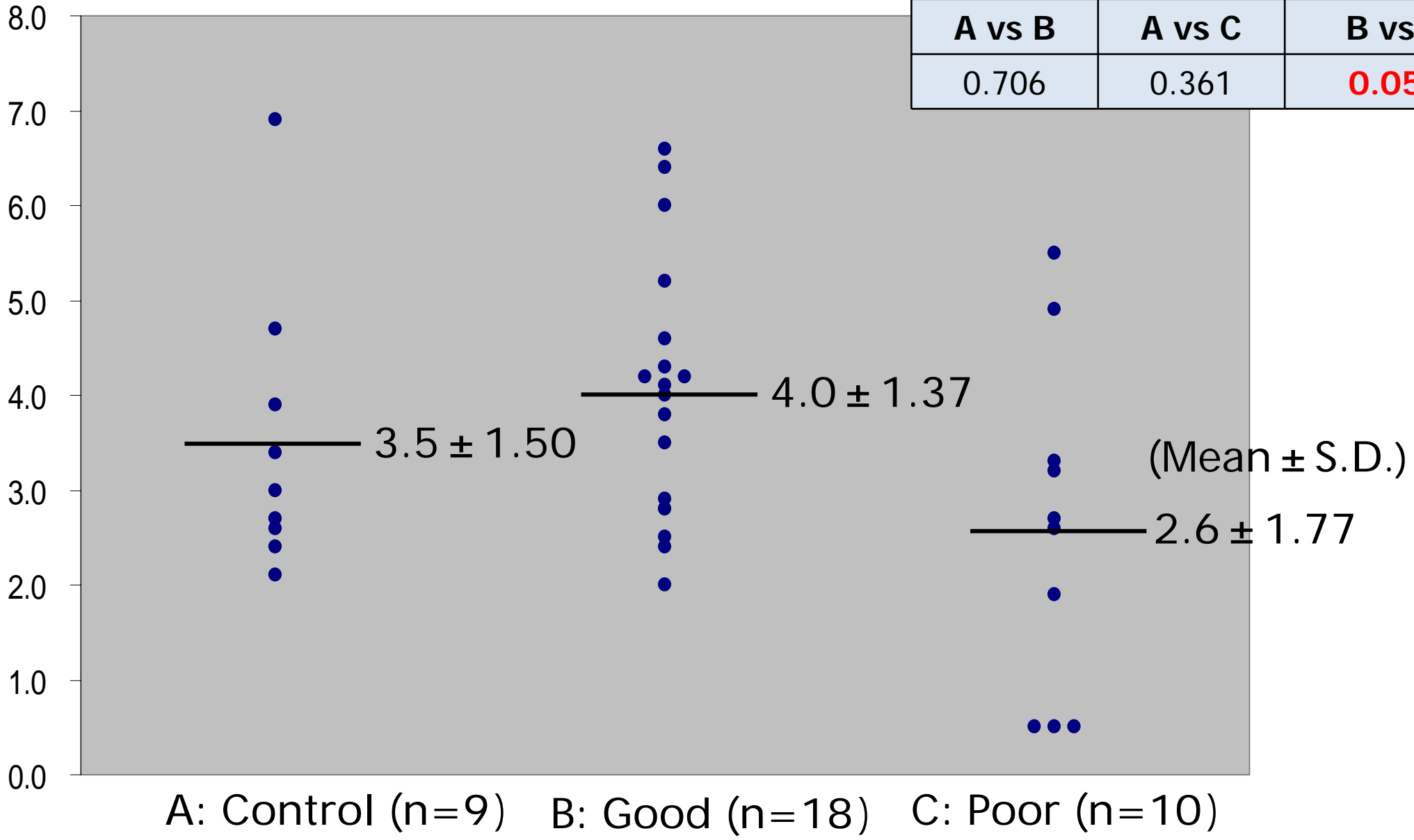


予後不良群におけるApoC-II Peak Intensity と免疫比濁法値の相関関係



37例における各群のApoC-II免疫比濁法の比較

P-value (Tukey-Kramer)		
A (Control) vs B (Good) vs C (Poor)		
0.064		
A vs B	A vs C	B vs C
0.706	0.361	0.051



再現性評価のまとめ

- PMF解析によりNo.4 peak にあるApolipoprotein C-IIを同定した.
- 37検体(健常者群9例、予後良好群18例、予後不良群10例)でNo.4 peakをプロテインチップで検討し、予後不良群において健常人($P=0.014$)、予後良好群($P=0.001$)よりも有意に発現が低かった.
- 37検体で同定したApoC-IIをポリクロナール抗体である免疫比濁法で検証し、予後不良群は予後良好群よりも発現が低い傾向にあったが、有意差はなかった($P=0.051$).
- そこで我々はNo.4 peakに特化したモノクロナール抗体 ApoC-II Elisa-Kitを作成した.

【検証実験】

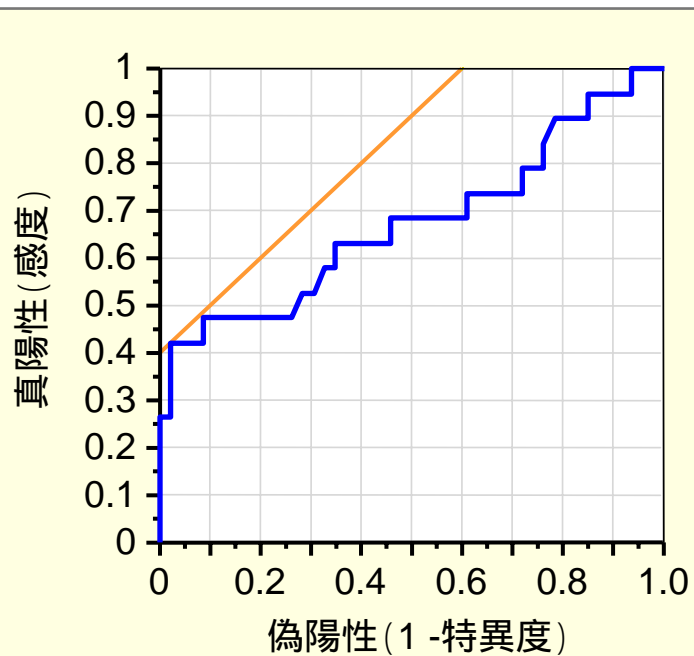
- 子宮頸部扁平上皮癌において治療前のSCC抗原はルーチンとして検査されるのが一般的であるが、治療後の生存率への関与は一定ではない。
- MMP1 (Matrix metalloproteinase 1) は子宮頸癌の進行・浸潤に関与すると報告されている。
- 本研究の目的は血清のSCC、MMP1、ApoC-IIの放射線治療後の生存率への関与を評価することで、我々が作成したApoC-II Elisa-Kitが放射線治療後の生存率に関与するか、否かを検討する。

対象

- 2003年1月から2009年10月までに放射線治療を施行した65例の子宮頸部扁平上皮癌を対象として、治療開始直前の血清を測定
- 年齢の平均61歳、腫瘍径の平均5.9cm
- 全症例の平均生存期間は22.6ヶ月
- 病期はI期3例、II期11例、III期43例、IV期8例

病期	良好群 (n=35)	不良群 (n=30)
I	2	1
II	9	2
III	22	21
IV	2	6

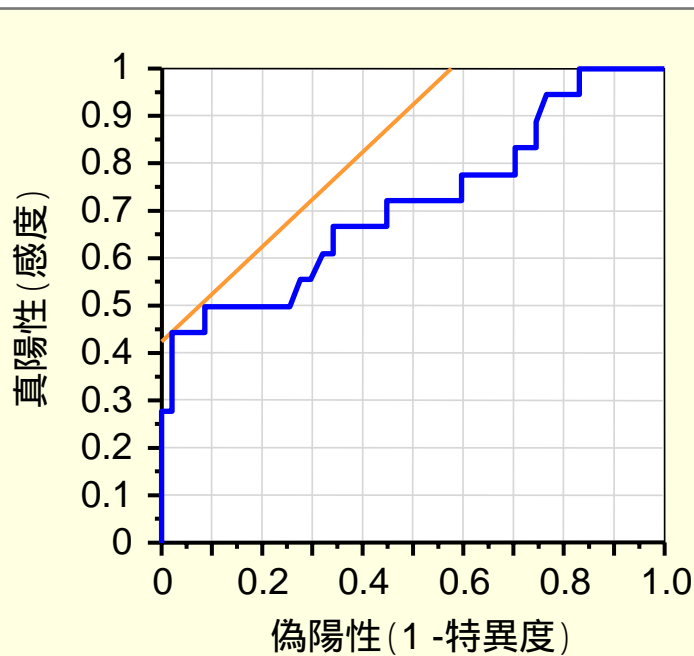
子宮頸癌の放射線治療予後予測因子としてのApoC-IIの特異度と感度



全生存率

Specificity: 97.8%

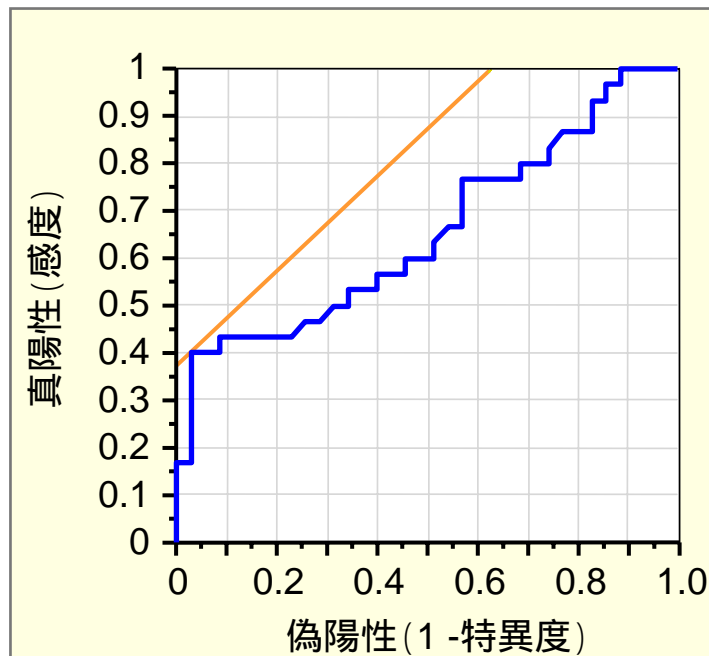
Sensitivity: 42.1%



原病生存率

Specificity: 97.9%

Sensitivity: 44.4%



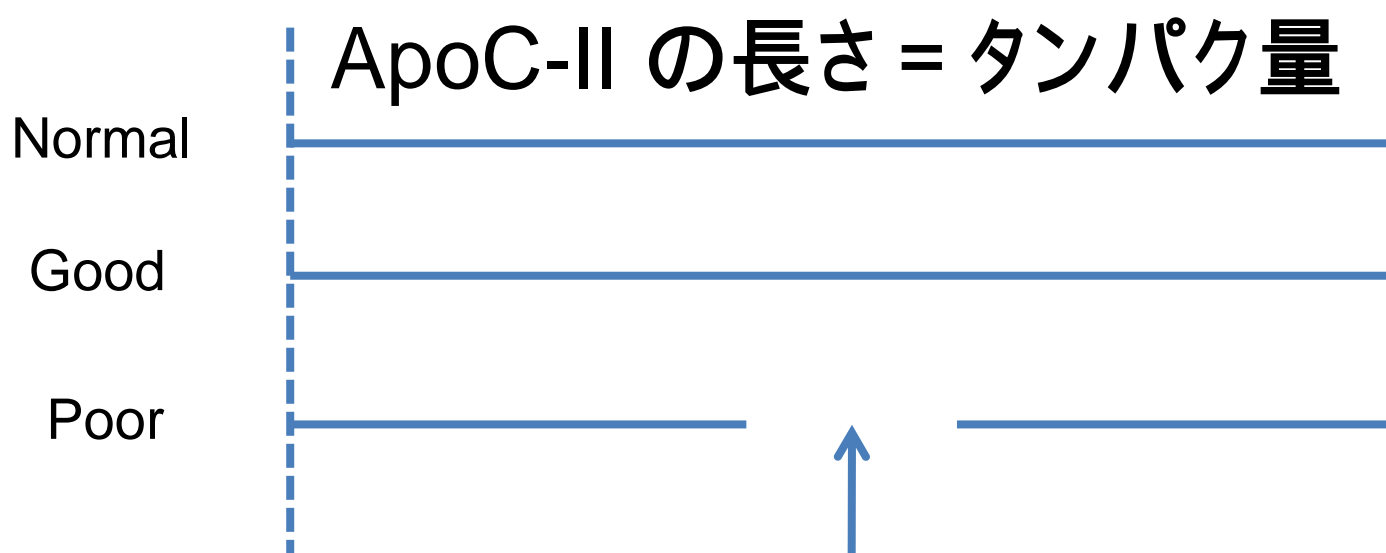
無再発生存率

Specificity: 97.1%

Sensitivity: 40%

考案

何故、予後不良群のApoC-IIは低値なのか？ 仮説



ApoC-IIはMMPのsubstrateで、MMPにより切断される。

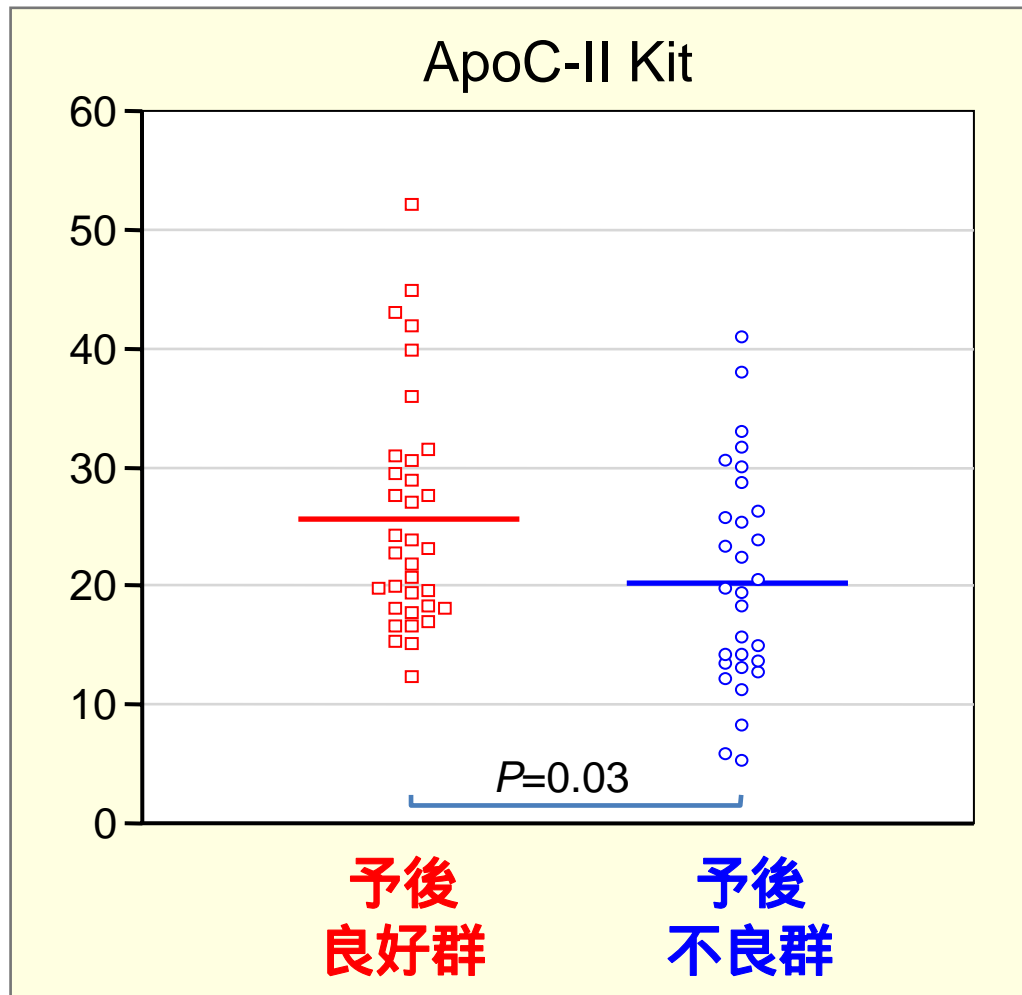
(Kim SY, Biochem Biophys Res Com 2006)

MMPが予後不良群に多く発現する。

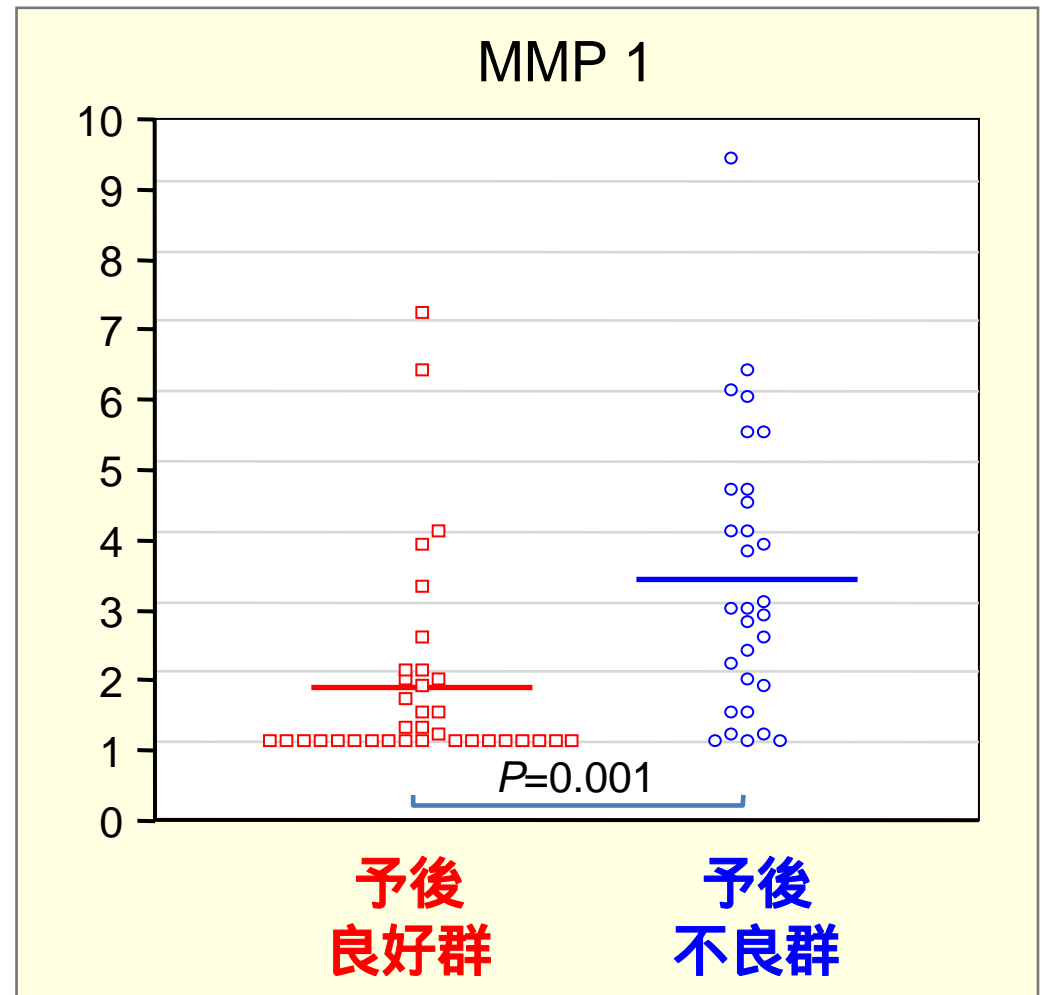
MMPがApoC-IIを切る。

したがってApoC-IIのタンパク量が少なくなると仮説した。

ApoC-IIとMMP1の発現量



Student t-test



Welch t-test

予後不良群のApoC-IIは低発現、MMP1は高発現した。

検証実験のまとめ

- 予後不良群のApoC-II Elisa-Kit発現量は良好群に比べて有意に低値 ($p=0.03$) で、MMP1は高値 ($p=0.001$) であった。
- 原病生存率に関与したのは単変量解析ではApoC-II ($p=0.01$)、MMP1 ($p=0.02$) であった。
- 多変量解析ではApoC-II($p=0.02$)に有意差を認めしたが、MMP1、SCCには有意差を認めなかった。
- 子宮頸癌の放射線治療後原病生存率におけるApoC-IIの特異度は97.9%、感度は44.4%であり、スクリーニングテストに適している。

本研究の結語

- 我々が作成したApoC-II Elisa-Kitは子宮頸癌の放射線治療予後予測バイオマーカーを測定する有用なツールである。

進行期子宮頸部扁平上皮癌の従来の バイオマーカーSCCとその問題点

子宮頸部扁平上皮癌において既に実用化されているものとして、治療前のSCC抗原があり、ルーチンとして検査されるのが一般的であるが、

治療後の生存率への関与は一定ではない。

ApoC-IIとSCCの比較

- 治療前のSCC抗原は、子宮頸癌の放射線治療後の一時的な治療効果を反映するが、生存率へのSCC抗原の関与は一定ではない。我々の検討でもSCCは生存率に関与していなかった。
- 一方、ApoC-IIは放射線治療後の原病生存率に関与し、予後予測因子として有用なバイオマーカーの可能性がある。

想定される用途

- 子宮頸部扁平上皮癌患者で放射線治療の対象となる症例を判別する。
- 子宮頸癌以外に扁平上皮癌が多い頭頸部癌患者で放射線治療の対象となる症例を判別できることも期待される。
- 他の部位の放射線治療の対象となる症例の治療効果判別に展開することも可能と思われ、市場性は十分にあると考えられる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：扁平上皮がんに対する放射線治療後における予後の予測方法および予後予測用キット
- 特開2009-75092
- 出願人：関西医科大学 発明者：播磨洋子

お問い合わせ先

関西医科大学 知的財産アドバイザー 三島 健

T E L 06 - 6993 - 9628 F A X 06 - 6992 - 1409

e-mail mishimak@takii.ac.jp