

[第八回千葉医学会奨励賞]

重粒子線治療後に誘発された海綿状血管腫症例および 骨肉腫症例の変異様式解明と新規原因遺伝子の探索

足立明彦¹⁾ 堀口健太郎¹⁾ 樋口佳則¹⁾ 松谷智郎¹⁾
原彩佳¹⁾ 久保田真彰¹⁾ 菊地浩¹⁾ 岩立康男¹⁾
神戸美千代²⁾ 長谷川安都佐³⁾ 小藤昌志³⁾ 伊原史英⁴⁾
大熊雄介⁴⁾ 堅田浩司⁴⁾ 花澤豊行⁴⁾ 岡本美孝⁴⁾

要 旨

【目的・背景】重粒子線治療は本邦が実運用に成功した技術である。我々は重粒子線治療後に誘発された二次性腫瘍の初の臨床2症例を経験し一昨年および昨年、国際学会にて発表した。本研究では、その臨床検体を用いた解析から染色体構造の変化を捉え得たので報告する。

【症例報告】症例1: 外耳道癌に対する重粒子線照射の4年後、片麻痺・失語・てんかん発作で発症した側頭葉病変で、摘出した腫瘍の病理は原疾患(扁平上皮がん)と全く異なる、海綿状血管腫であった。周囲脳には硝子化など放射線誘発性変化を伴っており、これら複数所見より重粒子線により発生した腫瘍であることが示された。

症例2: 上顎洞未分化癌への重粒子線照射の13年後、歯痛・頬腫脹・てんかん発作で発症した、眼窩から中頭蓋窩(側頭葉先端)まで広がる腫瘍で、生検により重粒子線による二次性の骨肉腫と病理診断された。腫瘍は広範に浸潤しており、耳鼻咽喉科および脳外科による合同手術を行った。

【結果】G-band染色ならびに腫瘍CGH+SNPアレイによる分析を行ったところ、欠失・逆位・転座を含む複数の染色体構造異常を見出すことができた。

【考察・今後の計画】以上より、X線・ガンマ線照射後に報告のある誘発腫瘍が、重粒子線治療後にも起こりうることを証明した。また、重粒子線誘発腫瘍においてgeneticな変化が起きている可能性を示した。但し同一腫瘍検体内に複数の個別の変異が含まれていることから、構造変化を伴わず現時点で検出できていない共通する遺伝子異常が存在している可能性も示唆され、今後は塩基配列決定などにて、詳細な変異部位、更には腫瘍関連遺伝子の同定を目指す。

¹⁾ 千葉大学大学院医学研究院脳神経外科学

²⁾ 千葉大学大学院医学研究院診断病理学

³⁾ 放射線医学総合研究所重粒子医科学センター

⁴⁾ 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学

Akihiko Adachi¹⁾, Kentaro Horiguchi¹⁾, Yoshinori Higuchi¹⁾, Tomoo Matsutani¹⁾, Ayaka Hara¹⁾, Masaaki Kubota¹⁾, Hiroshi Kikuchi¹⁾, Yasuo Iwadata¹⁾, Michiyo Kambe²⁾, Azusa Hasegawa³⁾, Masashi Koto³⁾, Fumie Ihara⁴⁾, Yusuke Okuma⁴⁾, Koji Katada⁴⁾, Toyoyuki Hanazawa⁴⁾ and Yoshitaka Okamoto⁴⁾. Elucidation on mutation patterns in cases of cavernous hemangioma and osteosarcoma induced by heavy particle radiotherapy and investigation into a disease-causing gene.

¹⁾ Department of Neurological Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.

²⁾ Department of Diagnostic Pathology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.

³⁾ Heavy Charged Particle Center, National Institute of Radiological Sciences, Chiba 263-8555.

⁴⁾ Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.

Phone: 043-226-2158. Fax: 043-226-2159. E-mail: adachi-cib@umin.ac.jp

Key words: 重粒子線, 二次性腫瘍, がん関連遺伝子, 臨床検体

略語一覧: FISH: fluorescence in situ hybridization, 放医研: 放射線医学総合研究所, FBS: Fetal Bovine Serum, IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium, CT: Computed Tomography, MRI: Magnetic Resonance Imaging

I. 緒 言

重粒子線治療は本邦が放射線医学総合研究所(放医研)を中心に, 世界に先駆け実運用に成功した技術であり, 2015年までに世界で約1万9千名の患者が重粒子線治療を受け(図1), うち約1万6千名が国内での加療である[1]が, これまでその副作用として二次性腫瘍の臨床報告は無かった(図2)。我々は重粒子線治療後に誘発された二次性腫瘍の初の臨床2症例を経験し一昨年[2]および昨年[3], 国際学会にて発表した。本研究では, その臨床検体を用いた解析から染色体構造の変化を捉え得たので報告する。

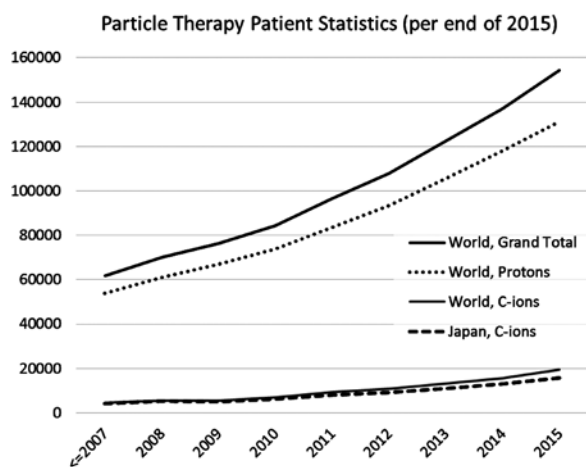


図1

2015年までで累積過去15万4,203人が粒子線治療を, 1万9千376人(うち1万5千897人が国内)が重粒子線治療を受けている (<https://www.ptcog.ch/index.php/patient-statistics> のデータより作図)。

2014年以前の放射線誘発腫瘍の報告

	X線	γ線	粒子線
マウス	○	○	○
ヒト	○	○	×

図2

これまで粒子線誘発腫瘍の臨床報告は無かった。

II. 対 象

【症例1】

外耳道癌(図3a)に対する重粒子線照射(図3b)の4年後, 片麻痺・失語・てんかん発作で発症した側頭葉病変(図3c, d, e, f)。摘出した腫瘍の病理は原疾患(扁平上皮がん)と全く異なる, 海綿状血管腫であった。周囲脳には硝子化など放射線誘発性変化を伴っており, これら複数所見より重粒子線により発生した腫瘍であることが示された(図4)。

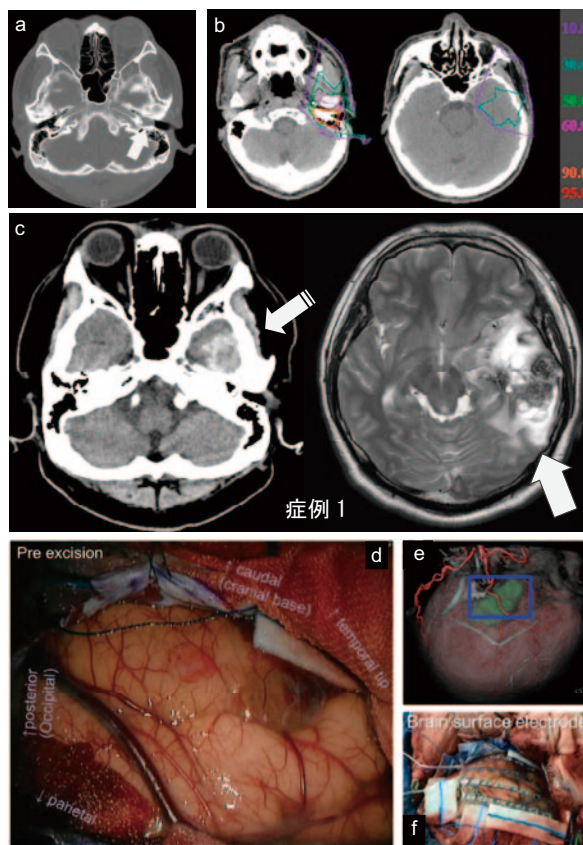


図3

症例1

- a: 原疾患の外耳道癌。
- b: 重粒子線照射計画。
- c, e: 頭蓋内海綿状血管腫。CT(c左)およびMRI(c右)並びに3D-CTA(e)画像。
- d, f: 術中所見。dはeの枠内に相当。

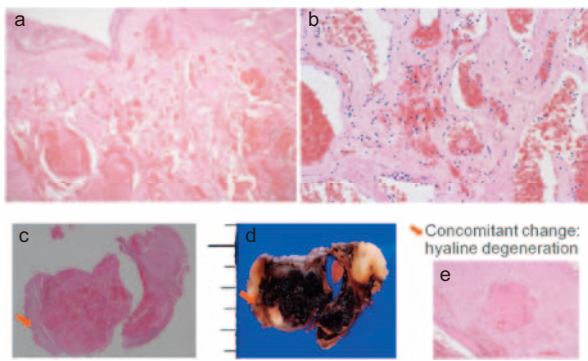


図4

症例1: 放射線誘発性海綿状血管腫 (Radiation-induced Cavernous hemangioma (RICH)) 組織標本。

- a: 顕微鏡低倍率像。
- b: 顕微鏡高倍率像。
- c: ルーペ像。
- d: 肉眼所見。
- e: 周囲正常脳に見られる付随所見 (硝子化などの放射線誘発性変化)。

【症例2】

上顎洞未分化癌への重粒子線照射 (図5a) の13年後、歯痛・頬腫脹・てんかん発作で発症した眼窩から中頭蓋窩 (側頭葉先端) まで拡がる腫瘍 (図5b) で、生検により重粒子線による二次性の骨肉腫と病理診断された (図6a) 腫瘍は広範に浸潤しており、耳鼻咽喉・頭頸部外科および脳神経外科による合同手術を行った。

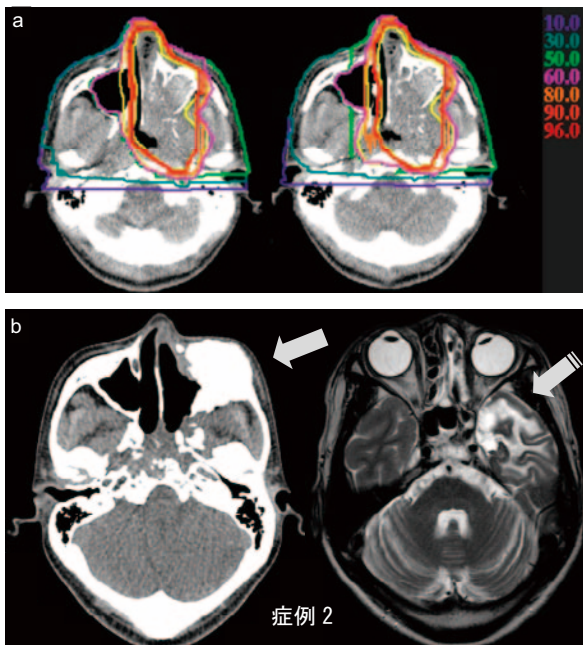


図5

症例2: 骨肉腫。CT (左) およびMRI (右) 画像。

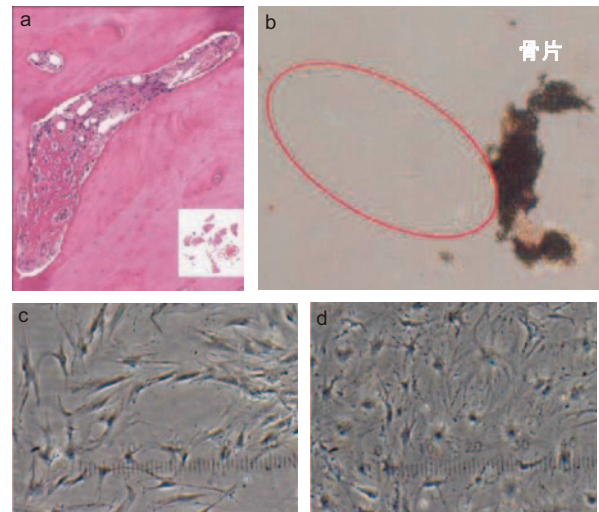


図6

症例2: 骨肉腫。

- a: 歯尖部からの生検標本。
- b: 骨肉腫片直接培養群。約1週間で右図のように骨片から細胞がoutgrowth。
- c: その後2週間で80%コンフルエント (2) に達した。
- d: 0.2%TypeII コラゲナーゼで骨片を処理し培養を行った群でも骨肉腫細胞を継代できた。

Ⅲ. 結 果

我々は、まず症例2の摘出骨肉腫組織より今後の解析材料の確保のため初代継代培養を行い、次に、G-band 染色並びにCancer CGH+SNP Array による染色体異常の検出実験を行った。

10% FBS添加IMDM培地を用い、骨片直接培養群では、約1週間で右図のように骨片から細胞がoutgrowth (図6b) し、その後2週間で80%コンフルエントに達した (図6c)。また0.2%TypeII コラゲナーゼで骨片を4℃一晩処理し培養を行った群でも骨肉腫細胞を継代でき (図6d)、現在、-80℃及び液体窒素液相に保存している。

G-band 染色ならびに腫瘍CGH+SNPアレイ (図7) による分析では、正常骨部分の培養細胞から染色体構造以上は検出されなかったのに対し、骨肉腫部位の培養細胞からは46, XY, t(3;4)(q21;q35)を始め5パターンの欠失・逆位・転座を含む複数の染色体構造異常を見出すことができた (図7a~e)。

なお症例1の海面状血管腫症例では摘出組織の細胞培養を行っていないため、今後、凍結標

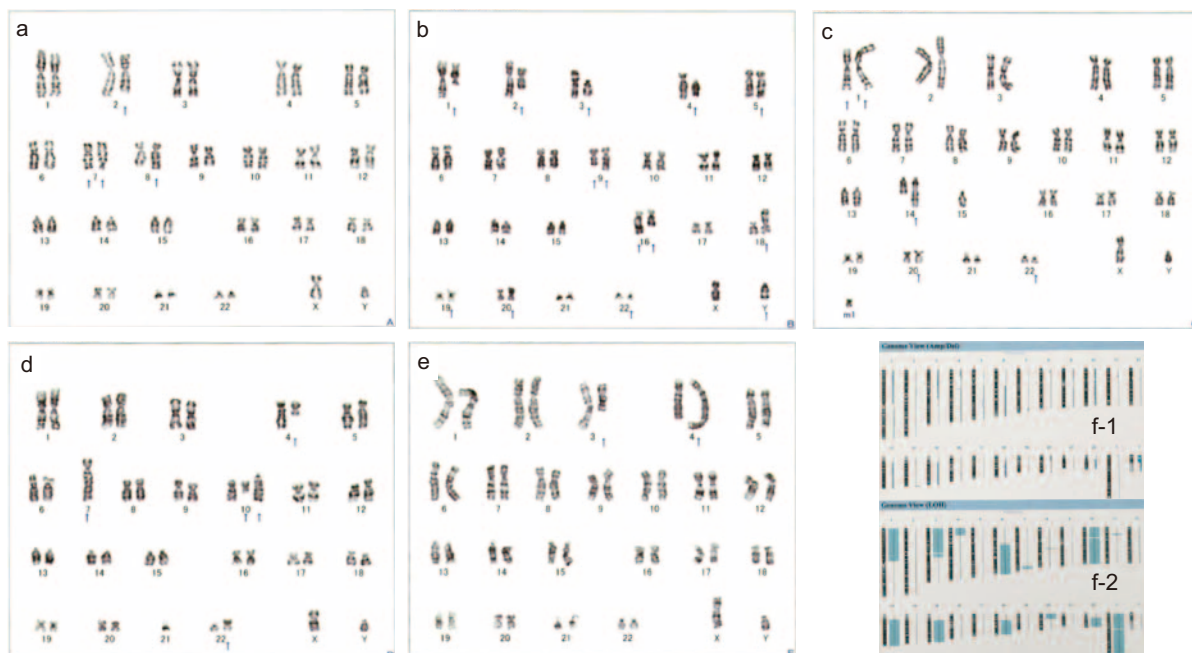


図7

重粒子線誘発骨肉腫（症例2）の培養細胞からは5種類の染色体異常が検出された（小矢印）。総分析細胞数20（a: 5細胞, b: 3細胞, c: 2細胞, d: 1細胞, e: 1細胞, 他abnormal cell: 8細胞）。

a: 46, XY, t (2;8) (q33;q24), der (7) (pter→q11.2::7?), inv (7) (p11.2q36)

b: 46, X, der (Y) (Ypter→Yq11.2::9?::9q22→9qter), t (1;16) (q12;q22), der (2) t (2;20) (p21;p13) t (2;9) (q31;?), t (3;18) (p11;p11.2), der (4) t (4;16) (p11;q24) del (4) (q?), inv (5) (q22q31), der (9) t (Y;9) (q11.2;q21), der (9) (9?::9p13→9q22::2q31→2qter), der (16) t (4;16), t (19;22) (p13;q11.2), der (20) t (2;20)

c: 46, XY, del (1) (p?), der (1) ?t (1;15) (p34;q15), add (14) (q22), -15, add (20) (q11.2) add (22) (q11.2), +mar1

d: 45, XY, t (4;7) (q12;q32), -7, add (10) (q11.2), -21, der (22) t (21;22) (q21;p11.2), +der (?) t (?;10) (?;?) t (7;10) (?;?)

e: 46, XY, t (3;4) (q21;q35)

f: 腫瘍CGH+SNPアレイ (f-1: Amp/Del, f-2: LOH)

本ないしパラフィンブロックより直接、DNA抽出し解析予定である。

Ⅲ. 考 察

重粒子線照射後の二次性腫瘍発生に関しては、過去にはマウスを用いた報告があるのみ[4]であったが、基礎研究で示されているような二重鎖切断による転座や欠失[5]が臨床症例においても生じていることを筆者らはG-band染色及び腫瘍CGH+SNPアレイにて証明した。

症例1の海綿状血管腫は放射線治療の後に比較的高率に発生することが知られているが、一般人口における有病率も0.5%と低くない。年間出血率は約3%と高く、出血を繰り返して病変サイズ

が増大するなど進行すると痙攣や呼吸循環障害を呈することも多い。家族例でこそ3種類の関連遺伝子が同定されたが、半数以上を占める孤発例での体細胞変異の原因遺伝子は未だ不明である[6]。従って、孤発性海綿状血管腫での体細胞変異遺伝子およびその翻訳タンパクの血管腫形成における役割解明は、外科手術以外の治療戦略への足掛りとなる。

症例2の骨肉腫に関しては広範切除と化学療法との組み合わせによる治療法の発展により5年生存率は改善傾向であるが、若年者に多い腫瘍であること・転移を来しやすいこと、などから依然その予後に与える影響は大きく、また放射線被曝がrisk factorとなることは以前から知られており、同様に、病理検体の検索にて、発生機構の解明や

治療へと結びつく変化を捉えたい。

粒子線治療装置の導入が本邦で相次いでいることを鑑みると、本研究において報告者らの経験した症例の摘出手術時の検体を用いて染色体分析および変異遺伝子検索を行い、治療現場にて起きた Tumorigenesis の機序を明らかにすることは、より安全な治療戦略立案という面からも、また、各腫瘍の基礎研究の面からも有用と考えられた。

IV. 今後の計画

以上より、筆者らはX線・ガンマ線照射後に報告のある誘発腫瘍が、重粒子線治療後にも起こりうることを証明した。したがって粒子線治療後に出現する病変として、放射線壊死や血管障害[7]の他に、誘発腫瘍発生にも留意する必要がある。

また、今回の結果より二次性腫瘍において genetic な変化が起きていることが示された。但し同一腫瘍検体内に複数の個別の変異様式を持つ細胞が含まれていることや、一細胞内でも Chromothripsis 様の複数箇所の変異を起していることから、今回明らかとなった染色体構造変化が単に二次性のもので、Tumorigenesis の原因としては構造変化を伴わず現時点で検出できていない共通の遺伝子異常が存在している可能性も強く示唆される。一方で、これら複数細胞・複数変異が共働して腫瘍発生をきたしている可能性も否定できず、いずれにせよ、今後は塩基配列決定などにて、詳細な変異部位、更には腫瘍関連遺伝子の同定を目指す。

ここ数年でRETやALK融合遺伝子のような分子標的薬に繋がる変異発見が相次いでいる[8,9]が、これらに至る手法は膨大な患者数の次世代シーケンシングを行うなど高コストなものが多かった[10,11]。

我々は重粒子線治療副作用としての発癌および二重鎖切断に基づく染色体構造異常という稀有(重粒子線治療を受けた1万9千人中2人)であるが決定的、といえる事象を捉えることに成功しており、これらが二次性変化でなく本質的なものであれば結果、低コストで新たな発癌に関わる因子同定に至ることができる可能性を考えている。

更には今後、同様症例の増加が予想されるため、

本手法にて新規がん関連遺伝子が検出できれば、新たなツールとして学術的に貢献しえ、gene huntingの一手法として確立してゆきたい。

V. おわりに

重粒子線治療は2015年に一部新聞で、日本放射線腫瘍学会の調査結果を引用し、前立腺癌や、ある種の肝臓癌で優位性データを示せなかったことがセンセーショナルに報じられたが、同記事でも『小児癌・骨軟部腫瘍・頭頸部癌・原発性肝癌・原発性肺癌の5種類は有効性と安全性が認められ、他に治療法がない』と記載され、今後も1例1例の患者を丁寧に見てゆく必要がある。

現時点でこそ粒子線治療後の二次性腫瘍発生率は15万4千分の2といえるが、将来、患者数の増加および加療後経過観察期間の長期化に伴い増加する可能性がある。従って臨床例で起きた機序の探索は、今後のためにも重要と考えられた。

謝 辞

本研究は千葉大国際交流事業・内藤記念科学振興財団・JSPS科研費JP17K16626の助成を受けたものです。

これらの研究費の獲得に際し御助言いただきました真菌医学研究センター 高橋弘喜先生、分子腫瘍学教室 金田篤志先生、遺伝子生化学教室 日和佐隆樹先生ならびに岩瀬克郎先生に感謝致します。今後の研究手法につきましては、全ゲノムSequenceや、cDNAライブラリー作成からの腫瘍形成アッセイなどを考慮中ですが、五里霧中であり、本稿を御覧下さった方でアドバイスなどございましたら是非ご連絡戴けると幸いです。

SUMMARY

We report the first two cases of a symptomatic secondary tumor developing after heavy ion particle therapy.

【CASE 1】 A 33-year-old man, who had undergone heavy-ion radiotherapy for squamous cell carcinoma of the outer ear 4 years previously, experienced headache, aphasia, and generalized seizures. Magnetic resonance imaging revealed intracranial lesion that was discontinuous with the auditory canal. The

resected lesion was found to be radiation-induced cavernous hemangioma.

【CASE 2】 A 35-year-old man, who had undergone heavy-ion radiotherapy for undifferentiated carcinoma of the maxillary sinus 13 years previously, experienced toothache, painful swelling in his cheek, and epilepsy. A computed tomography revealed an ossifying mass extending to the zygomatic arch, orbital cavity, and middle cranial fossa. The diagnosis of the biopsy was secondary osteosarcoma. The invasive nature of the lesion necessitated joint surgery performed by ENT surgeons and neurosurgeons. The G-banding and cancer array analyses results of the osteosarcoma cells showed multiple chromosomal abnormalities, including deletions, inversions, and translocations.

【Conclusion】 We revealed the mutation patterns of particle therapy-induced neoplasms using chromosome analysis.

【Future plan】 Currently, we are planning to investigate the detailed mutation signatures of particle therapy-induced neoplasms using DNA sequencing. These fundamental studies may elucidate novel genes involved in carcinogenesis.

文 献

- 1) Kamada T, Tsujii H, et al. Carbon ion radiotherapy in Japan: an assessment of 20 years of clinical experience. *The Lancet Oncology* 2015; 16: e93-100.
- 2) Adachi A, Iwadate Y, Ikegami S, Kambe M, Hasegawa A, Inaniwa T, Saeki N. Brain tumour induced by heavy particle radiotherapy: A case report. *Int J Mol Med* 2015; 36(Suppl 1): 69.
- 3) Adachi A, Hara A, Horiguchi K, Kubota M, Matsutani T, Kambe M, Hasegawa A, Inaniwa T, Hanazawa T, Okamoto Y, Iwadate Y. Tumour induced by heavy particle radiotherapy: The first report of two cases (intracranial cavernoma and malar osteosarcoma). *Int J Mol Med* 2016; 37(Suppl 1): 57.
- 4) Ando K, Koike S, Oohira C, Ogiu T, Yatagai F, Ando, Tumor Induction in Mice Locally Irradiated with Carbon Ions: A Retrospective Analysis. *J Radiat Res* 2005; 46: 185-90.
- 5) Ritter S, Durante M. Heavy-ion induced chromosomal aberrations: A review. *Mutat Res* 2010; 701: 38-46.
- 6) 藤村 幹, 富永悌二. 特集 脳卒中と遺伝子海綿状血管腫. *BRAIN and NERVE – 神経研究の進歩* 2008; 60: 1271-4.
- 7) 足立明彦, 小林英一, 渡邊義之, 米山サーネキー智子, 早坂典洋, 鈴木 誉, 岡本美孝, 佐伯直勝. Carotid Blowout Syndrome に対する血管内治療. *脳神経外科ジャーナル* 2011; 20: 597-603.
- 8) Soda M, Mano H, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448(7153): 561-6.
- 9) Kohno T, Shibata T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2012; 18: 375-7.
- 10) Lipson D, Stephens PJ, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med* 2012; 18: 382-4.
- 11) Banerji S, Meyerson M, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 2012; 486: 405-9.