

令和元年6月18日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10149

研究課題名(和文) 血中循環腫瘍DNAを用いた個別化大腸癌モニタリングシステムの構築

研究課題名(英文) Construction of personalized monitoring system for colorectal cancer using circulating tumor DNA

研究代表者

神山 博彦 (KAMIYAMA, HIROHIKO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00365595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌術後の患者の血中循環腫瘍DNAを用いて、術後の再発をモニタリングできるかどうかを調べた。大腸癌術後の10症例について、手術時と術後3ヵ月ごとに検体を採取した。手術時のステージは1:1:4:4(Ⅰ:Ⅱ:Ⅲ:Ⅳ)であった。このうち、ステージⅠの1例、ステージⅡの2例、ステージⅢの2例が再発した。切除検体の原発巣の遺伝子パネル検査により、癌の発症により後天的に生じたと考えられる特異的な遺伝子変異プロファイルを特定し、それを血中循環腫瘍DNAで検出できるかどうかを調べたところ、検出可能な症例があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中循環腫瘍DNAは、患者に特異的な遺伝子変異プロファイルを反映している。また、採血で検体を採取できるため簡便である。このため、汎用化された腫瘍マーカーよりも鋭敏に再発モニタリングが出来る可能性が期待されている。再発診断が現在のものよりも鋭敏になれば、化学療法の要否、化学療法の変更の時期決定、補助化学療法の要否などにおいて非常に重要な判断材料となり、患者の生命予後や医療経済に与える影響は大きいと考えられる。本研究では、大腸癌原発巣の遺伝子変異プロファイルを血中循環腫瘍DNAで検出できる可能性が示唆された。しかし、現行の再発モニタリングのモダリティを凌駕する精度には至っていないと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The circulating tumor DNAs in the patients who underwent surgery for colorectal cancer were investigated for possible applications of molecular monitoring of tumor recurrence. The plasma were collected in every 3 months, and compared to the gene profile of the primary tumor in 10 cases. The stages on the operation were 1:1:4:4 (I:II:III:IV). Of those, 1 in stage II, 2 in stage III, and 2 in stage IV recurred. The profiles of mutations, which were regarded as the acquired on the carcinogenesis, were obtained using multi-gene panel testing for the primary tumor, and those profiles could be detected in some cases.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 血中循環腫瘍DNA 再発 腫瘍マーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

理想的な腫瘍マーカーは体内に存在する癌細胞の量を鋭敏に示す必要がある。**CEA** や **CA19-9** といった大腸癌に関する既存の蛋白の汎用性腫瘍マーカーは便利だが、感度や鋭敏性には劣る。癌細胞に生じるゲノムの異常は患者ひとりひとりで異なっており、すべての患者に共通する異常は意外に少ない。癌細胞のゲノムの異常のうち染色体レベルの異常は癌細胞にしか起こりえず、同じ患者の癌細胞では基本的に保持されている。これらの異常は血中循環腫瘍 **DNA** を用いて検出することができる。血中循環腫瘍 **DNA** はアポトーシスや壊死により腫瘍細胞から血中に放出される約 **200** 塩基対程度のサイズの **DNA** 断片であり、腫瘍の遺伝子プロファイルを保持している。血中循環腫瘍 **DNA** を捕獲して抽出し、遺伝子プロファイルを検索することは、腫瘍そのものの遺伝子プロファイルを検索することに等しい。近年の研究では、血中循環腫瘍 **DNA** の存在が重要視され(**Dawson, N Engl J Med, 368:1199-209, 2013** など)、その臨床応用が期待されている。

申請者らは、これまでに膵臓癌の前駆病変である **IPMN** の細胞株を作成し、その遺伝的プロファイルを明らかにした(**Kamiyama H, Lab Invest.90:665-73, 2010**)。さらに、**24** 人の膵癌患者に対して全ゲノム解析を行ったところ、個々の遺伝子プロファイルには共通する変異は少なく、個人差が大きいことが明らかになった(**Kamiyama H, Science 321(5897):1801-6, 2008**)。また、癌の個別化治療への模索として患者の腫瘍から細胞株を作成するシステムを構築し、その細胞株で **3000** 以上の薬剤の感受性試験を行ったところ、癌細胞の薬剤感受性プロファイルも遺伝子プロファイルと同様に個人差が大きいことが明らかになった(**Kamiyama H, Clin Cancer Res.19(5):1139-46, 2013**)。

これらの観点から申請者らは血中循環腫瘍 **DNA** を用いることにより腫瘍マーカーを個別化することで、その精度を高めることができるという発想に至った。申請者の研究協力者である **James Eshleman** らのグループは、患者個人の癌細胞に生じた染色体異常をターゲットとして血中循環腫瘍 **DNA** を検出する手法を開発した (**Leary RJ, SciTransl Med. 2(20): 20ra14, 2010**)。血中循環腫瘍 **DNA** は、侵襲的であり時に不可能でもある生検とは異なり、採血により簡単に繰り返し採取することができるというのが最大の利点である。

血中循環腫瘍 **DNA** 量の測定により体内遺残腫瘍細胞量を把握するために、根治度 **A** の癌遺残のない手術が行われたステージ **・** 症例を検討する。術後遺残なしとされたこれらの症例の中にはその後に再発する症例としない症例が含まれている。すなわち、術後に体内遺残腫瘍細胞がある症例とない症例が含まれているため、腫瘍マーカーとしての有用性や鋭敏性を検討する意義は甚大である。

臨床応用が可能になれば、任意の時点で正確に病勢を把握することができ、そのデータを治療法選択の判断材料にすることが出来るという大きなメリットがある。癌が再発している状態あるいは癌が体内に遺残している状態と再発していない状態を正確に見極めることが出来れば、無駄な検査を省略することが出来る、治療方針の決定が明確になり治療内容にも無駄がなくなるなど医療費の削減効果が期待できる。さらに本研究の結果、新たな汎用性マーカーの発見も目指す。

2. 研究の目的

a)患者特異的なゲノム異常をターゲットとした血中循環腫瘍 **DNA** を検出し、鋭敏な腫瘍マーカーとなることを証明する。

現行の大腸癌切除後のサーベイランスと同じ間隔で血中循環腫瘍 **DNA** を検出することにより、既存の腫瘍マーカー (**CEA**・**CA19-9**) や **CT** 検査などに比べてより早く再発の兆候を捕らえられるかどうかを検討する。また、血中循環腫瘍 **DNA** の測定値が定量的にも病勢を正確に反映しているかどうかを検討する。根治度 **A** の手術が行われた (手術直後の時点で遺残なしと判断した) 症例で、その後に再発する場合、血中循環腫瘍 **DNA** が手術で一度陰転化したあとに再上昇するのか、それとも術後に陰転化することなく再発するのか、あるいは術後に陰転化しない症例が再発するのか、といったことは非常に興味深く、その解明の意義は大きい。

b)補助化学療法の適応の再定義の可能性を検討する。

大腸癌治療ガイドラインでは、根治度 **A** の手術が行われた (手術直後の時点で遺残なしと判断した) ステージ **・** の症例を補助化学療法の適応としている。根治手術を行ってもなお体内に遺残する癌細胞を死滅させるために化学療法を行うというのがその論理的な根拠である。しかし、現在の適応基準は組織学的悪性度や脈管侵襲といった形態病理学的な診断に基づいたものであり、体内に遺残している癌細胞の有無を的確に判定しているものではないため、現在の適応症例の中には実際は補助化学療法の必要のない症例が含まれている。逆に現在適応外となっている症例の中に補助化学療法が必要な症例も含まれているはずである。補助化学療法を行っていたが再発した症例・再発しなかった症例、補助化学療法を行っていなかったが再発した症例の血中循環腫瘍 **DNA** の測定値の推移を検討することにより、補助化学療法の適応を真に必要な症例を選別し、不必要な症例は除外することができると考えられる。

c)体内遺残癌細胞の有無を判断できるかどうかを明らかにする。

最終的には、本研究の手法で血中循環腫瘍 **DNA** が検出されない状態が、真に体内に遺残する癌細胞がない状態を示しているかどうか、あるいは再発の心配のない状態を示しているかどうかを明らかにしたい。再発とは手術後の体内遺残癌細胞が発育して顕在化したものである。体

内に遺残している微小な癌がないことを完全に証明する他の方法はない。したがって、血中循環腫瘍 DNA が検出されず臨床上の再発もないことが手術後 5 年間続けば、体内遺残癌細胞がないことが証明されたと解釈できると考えている。

3 . 研究の方法

大腸癌患者の再発サーベイランス中に 3 ヶ月ごとに血漿を採取した。手術時の原発巣に対して DNA シーケンシングを行い、癌の発症によって後天的に生じたと考えられる遺伝子異常に基づいた特異的な塩基配列を推定した。術後サーベイランス中の血漿の中の血中循環腫瘍 DNA でそれらを検出できるかどうかを調べた。また、原発巣に対しては遺伝子パネル検査を行い、癌の発症により後天的に生じたと考えられる特異的な遺伝子変異プロファイルを特定した。それを血中循環腫瘍 DNA で検出できるかどうかを調べた。

4 . 研究成果

大腸癌術後の患者の血中循環腫瘍 DNA を用いて、術後の再発をモニタリングできるかどうかを調べた。大腸癌術後の 10 症例について、手術時と術後 3 ヶ月ごとに検体を採取した。手術時のステージは 1:1:4:4 (: : :)であった。このうち、ステージ の 1 例、ステージ の 2 例、ステージ の 2 例が再発した。切除検体の原発巣の DNA シーケンシングにより、癌の発症によって後天的に生じたと考えられる遺伝子異常に基づいた特異的な塩基配列を推定し、それを血中循環腫瘍 DNA で検出できるかどうかを調べたが、どの症例においても検出できなかった。切除検体の原発巣の遺伝子パネル検査により、癌の発症により後天的に生じたと考えられる特異的な遺伝子変異プロファイルを特定し、それを血中循環腫瘍 DNA で検出できるかどうかを調べたところ、検出可能な症例があった。

血中循環腫瘍 DNA は、患者に特異的な遺伝子変異プロファイルを反映している。また、採血で検体を採取できるため簡便である。このため、汎用化された腫瘍マーカーよりも鋭敏に再発モニタリングが出来る可能性が期待されている。再発診断が現在のものよりも鋭敏になれば、化学療法の要否、化学療法の変更の時期決定、補助化学療法の要否などにおいて非常に重要な判断材料となり、患者の生命予後や医療経済に与える影響は大きいと考えられる。本研究では、大腸癌原発巣の遺伝子変異プロファイルを血中循環腫瘍 DNA で検出できる可能性が示唆された。しかし、現行の再発モニタリングのモダリティを凌駕する精度には至っていないと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

1. Akazawa Y, Hayashi T, Saito T, Niwa K, Kamiyama H, Sasahara N, Sakamoto K, Nagahara A, Yao T: Histological characteristics of eosinophilic myenteric ganglionitis: an under-recognised cause of chronic intestinal pseudo-obstruction. *VirchowsArchiv*474(3): 395-400, 2019 (査読有)
2. Hoizumi M, Sato T, Shimizu T, Kato S, Tsukiyama K, Narita T, Fujita H, Morii T, Sassa MH, Seino Y, Yamada Y. Inhibition of GIP signaling extends lifespan without caloric restriction. *BiochemBiophys Res Commun*513(4):974-982, 2019(査読有)
3. Okazawa Y, Mizukoshi K, Koyama Y, Okubo S, Komiyama H, Kojima Y, Goto M, Habu S, Hino O, Sakamoto K, Orimo A: High-sensitivity detection of micrometastases generated by GFP lentivirus-transduced organoids cultured from a patient-derived colon tumor. *Journal of Visualized Experiments* 136: e57374, 2018(査読有)
4. Sakamoto K, Takahashi M, Takahashi R, Kawano S, Kawai M, Sugimoto K, Kamiyama H, Kojima Y, Okuzawa A, Tomiki Y: Repeated laparoscopic resection of extra-regional lymph node metastasis after laparoscopic radical resection for rectal cancer. *J Minim Access Surg*, 14(2):146-148, 2018 (査読有)

5. Kageyama SI, Nihei K, Karasawa K, Sawada T, Koizumi F, Yamaguchi S, Kato S, Hojo H, Motegi A, Tsuchihara K, Akimoto T: Correction: Radiotherapy increases plasma levels of tumoral cell-free DNA in non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget*9(34): 23844, 2018(査読有) (査読有)
6. Kamiyama H, Niwa K, Ishiyama S, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Higashihara Y, Sakamoto K: Ascending Colon Cancer Associated with Dermatomyositis Which Was Cured after Colon Resection. *Case Rep Gastroenterol* 10(2):338-43, 2016 (査読有)
7. Kato S, Imai H, Gamoh M, Takahata T, Ohori H, Yasuda K, Niitani T, Murakawa Y, Amagai K, Isobe H, Shindo Y, Kuroki M, Sakamoto Y, Shimodaira H, Yoshioka T, Ishioka C: Intermittent Withdrawal of Oxaliplatin for Alleviating Neurotoxicity during Oxaliplatin-Based Chemotherapy for Japanese Patients with Inoperable or Metastatic Colorectal Cancer: A Phase 2 Multicenter Study. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*245(1): 21-28, 2018(査読有)
8. Shimada S, Akiyama Y, Mogushi K, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Nagasaki H, Fukamachi H, Yuasa Y, Tanaka S: Identification of selective inhibitors for diffuse-type gastric cancer cells by screening of annotated compounds in preclinical models. *British Journal of Cancer*118(7): 972-984, 2018(査読有)
9. Kageyama SI, Nihei K, Karasawa K, Sawada T, Koizumi F, Yamaguchi S, Kato S, Hojo H, Motegi A, Tsuchihara K, Akimoto T: Radiotherapy increases plasma levels of tumoral cell-free DNA in non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget*9(27): 9368-19378, 2018(査読有)
10. Borna NN, Kishita Y, Kohda M, Lim SC, Shimura M, Wu Y, Mogushi K, Yatsuka Y, Harashima H, Hisatomi Y, Fushimi T, Ichimoto K, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y: Mitochondrial ribosomal protein PTC3 mutations cause oxidative phosphorylation defects with Leigh syndrome. *Neurogenetics*20(1): 9-25, 2019(査読有)
11. Subat S, Mogushi K, Yasen M, Kohda T, Ishikawa Y, Tanaka H: Identification of genes and pathways, including the CXCL2 axis, altered by DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*145(3): 675-684, 2019(査読有))
12. Suehara Y, Akaike K, Mukaihara K, Kurisaki-Arakawa A, Kubota D, Okubo T, Mitomi H, Mitani K, Takahashi M, Toda-Ishii M, Kim Y, Tanabe Y, Takagi T, Hayashi T, Mogushi K, Kaneko K, Yao T, Saito T: KCTD12 is negatively regulated by Kit in gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget*9(43): 27016-27026, 2018(査読有)
13. Yamaguchi S, Takahashi S, Mogushi K, Izumi Y, Nozaki Y, Nomizu T, Kakugawa Y, Ishida T, Ohuchi N, Ishioka C, Kato S: Molecular and clinical features of the TP53 signature gene expression profile in early-stage breast cancer. *Oncotarget*. 9(18):14193-14206, 2018(査読有)
14. Iwata N, Ishikawa T, Okazaki S, Mogushi K, Baba H, Ishiguro M, Kobayashi H, Tanaka H, Kawano T, Sugihara K, Uetake H: Clinical significance of methylation and reduced expression of the quaking gene in colorectal cancer. *Anticancer Research* 37(2):489-498, 2017(査読有)
15. Kawai M, Kamiyama H, Hosoya M, Okubo H, Fujii T, Yokoyama N, Sato C, Ueyama T, Okuzawa A, Goto M, Kojima Y, Takahashi M, Sugimoto K, Ishiyama S, Munakata S, Ogura D, Niwa S, Tomiki Y, Ochiai T, Sakamoto K: Chromosome 17q deletion in the primary lesion of colorectal cancer has an impact on liver metastasis. *Oncology Letters* 12:4773-4778, 2016 (査読有)
16. Honjo K, Kure K, Ichikawa R, Ro H, Takahashi R, Niwa K, Ishiyama S, Sugimoto K, Kamiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Sakamoto K, Fukumura Y, Takashi Yao T: Two cases of rectal NETs resection combined with dissection of the circular muscle layer using the ESD technique *Case Rep Gastroenterol*, 10:693-700, 2016 (査読有)
17. Sugimoto K, Sakamoto K, Niwa K, Ishiyama S, Kamiyama H, Komiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y: Postoperative adjuvant chemotherapy improves survival in stage II colon cancer? A propensity score matching analysis. *Juntendo Medical Journal* 62(6): 463-471, 2016 (査読有)
18. Kamiyama H, Niwa K, Ishiyama S, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Higashihara Y, Sakamoto K: Ascending Colon Cancer Associated with Dermatomyositis Which Was Cured after Colon Resection. *Case Rep Gastroenterol*.10(2):338-43, 2016 (査読有)
19. Kamiyama H, Sakamoto K, China T, Aoki J, Niwa K, Ishiyama S, Takahashi M, Kojima Y,

Goto M, Tomiki Y, Horie S. Combined laparoscopic abdominoperineal resection and robotic-assisted prostatectomy for synchronous double cancer of the rectum and the prostate. Asian J Endosc Surg 9(2):142-5, 2016 (査読有)

20. Kamiyama H, Sakamoto K, Niwa K, Ishiyama S, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Nakamichi I, Oh S, Suzuki K: Unusual False-Positive Mesenteric Lymph Nodes Detected by PET/CT in a Metastatic Survey of Lung Cancer. Case Rep Gastroenterol, 10(2):275-82, 2016 (査読有)

〔学会発表〕(計 件)

1. Kazuhiro Sakamoto, Toshiaki Hagiwara, Hirokazu Matsuzawa, Shingo Kawano, Shinya Kawai, Koichiro Niwa, Shun Ishiyama, Kiichi Sugimoto, Hirohiko Kamiyama, Makoto Takahashi, Yutaka Kojima, Yuichi Tomiki, Tetsu Fukunaga, Yoshiaki Kajiyama, Seiji Kawasaki: Laparoscopic para-aortic lymph node resection for colorectal cancer. SAGES & CAGES 16TH WORLD CONGRESS OF ENDOSCOPIC SURGERY, Seattle, WA, USA, 2018
2. Shun Ishiyama, Kota Amemiya, Yuki Tsuchiya, Hirokazu Matsuzawa, Shingo Kawano, Masaya Kawai, Koichiro Niwa, Kiichi Sugimoto, Hirohiko Kamiyama, Makoto Takahashi, Hiroimitsu Komiyama, Yutaka Kojima, Atsushi Okuzawa, Yuichi Tomiki, Tetsu Fukunaga, Yoshiaki Kajiyama, Seiji Kawasaki, Kazuhiro Sakamoto: Complete mesocolic excision for transverse colon in our hospital. SAGES & CAGES 16TH WORLD CONGRESS OF ENDOSCOPIC SURGERY, Seattle, WA, USA, 2018
3. Yutaka Kojima, Kazuhiro Sakamoto, Yuichi Tomiki, Michitoshi Goto, Makoto Takahashi, Hirohiko Kamiyama, Kiichi Sugimoto, Shun Ishiyama, Koichiro Niwa, Masaya Kawai, Ryoichi Tsukamoto, Shunsuke Motegi, Yurika Makino, Toshiaki Hagiwara, Seiji Kawasaki, Yoshiaki Kajiyama, Tetsu Fukunaga: Experience of using a spray-type anti-adhesion barrier in laparoscopic surgery for colorectal carcinoma. SAGES & CAGES 16TH WORLD CONGRESS OF ENDOSCOPIC SURGERY, Seattle, WA, USA, 2018
4. Shingo Ito, Kazuhiro Sakamoto, Ryo Ohta, Yuki Tsuchiya, Hirokazu Matsuzawa, Ryoichi Tsukamoto, Shinya Munakata, Masaya Kawai, Koichiro Niwa, Shun Ishiyama, Kiichi Sugimoto, Hirohiko Kamiyama, Makoto Takahashi, Yutaka Kojima, Yuichi Tomiki: The feasibility of laparoscopic surgery for primary tumor resection in patients with metastatic colorectal cancer. SAGES & CAGES 16TH WORLD CONGRESS OF ENDOSCOPIC SURGERY, Seattle, WA, USA, 2018
5. K. Sakamoto, S. Kawano, M. Kawai, K. Niwa, S. Ishiyama, K. Sugimoto, H. Kamiyama, M. Takahashi, Y. Kojima, Y. Tomiki: Short-term outcomes of laparoscopic multivisceral resection for locally advanced colon cancer. ASCRS 2018 Annual Meeting, 2018
6. Hirokazu Matsuzawa, Kichi Sugimoto, Shun Ishiyama, Hirohiko Kamiyama, Makoto Takahashi, Yutaka Kojima, Yuichi Tomiki and Kazuhiro Sakamoto: The significance of plasma p14 gene dna methylation in colorectal cancer. The 29th ISUCRS Biennial Congress, 2018
7. H. Kamiyama, Y. Yoshida, H. Yoshida, C. Kosugi, K. Ishibashi, K. Ihara, M. Takahashi, H. Kuramochi, A. Fukazawa, H. Sonoda, K. Yoshimatsu, A. Matsuda, S. Yamaguchi, H. Ishida, S. Hasegawa, T. Yamada, K. Sakamoto, K. Koda: The Combination of TAS-102 and Bevacizumab as the third line chemotherapy for metastatic colorectal cancer (TAS-CC3 Study). ESMO 2018 Congress, 2018
8. 杉本 起一, 牧野 有里香, 青木 順, 岡澤 裕, 水越 幸輔, 河合 雅也, 宗像 慎也, 石山 隼, 神山 博彦, 高橋 玄, 小島 豊, 富木 裕一, 福永 哲, 梶山 美明, 坂本 一博: 大腸癌における血漿中遊離 DNA の CHFR 遺伝子メチル化測定の意義(英語)第 56 回日本癌治療学会学術集会 2018 年

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小見山博光
ローマ字氏名：**KOMIYAMA, HIROMITSU**
所属研究機関名：順天堂大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（**S**桁）：30348982

研究分担者氏名：加藤俊介
ローマ字氏名：**KATO, SHUNSUKE**
所属研究機関名：順天堂大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（**S**桁）：40312657

研究分担者氏名：茂櫛薫
ローマ字氏名：**MOGUSHI, KAORU**
所属研究機関名：順天堂大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（**S**桁）：60569292

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。