

令和元年6月21日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10556

研究課題名(和文) Liquid biopsyを用いた直腸癌術前化学療法の効果予測因子の同定

研究課題名(英文) Prognostic value of liquid biopsy in patients with rectal cancer treated with neoadjuvant chemotherapy

研究代表者

小泉 岐博 (Koizumi, Michihiro)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40328802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：直腸癌32例に対しFOLFOX療法による術前化学療法(Neoadjuvant chemotherapy: NAC)を行い、切除標本の組織学的奏効例(57%)と非奏効例(47%)の3年無再発生存率は96%、76%($p=0.006$)であった。

癌細胞由来のcirculating cell free DNA (ccfDNA)はccfDNAのlong/short fragment比(DNA integrity: DI)に反映され、NAC前後DI変化率が20%以上あるものは奏効例で91%、非奏効例で20%であった($p=0.013$)。DI変化率は組織学的効果を反映し、予後予測のバイオマーカーとなりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

直腸癌治療の中心は手術であるが、手術のみでは治療の限界があり、成績向上のためには化学療法の併用が期待されている。NACは忍容性の高い治療戦略であるが、無効例が存在することが問題である。NAC開始から早期のうちに無効例を抽出することができれば、NACによる不利益を受ける症例を減らすことができる。またこれらの症例を他の治療法に振り分けることが、直腸癌全体のさらなる予後改善に繋がる可能性がある。

さらに、ccfDNAをバイオマーカーとした化学療法の効果予測法は直腸癌のみならず、他の癌腫の化学療法効果予測にも応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Neoadjuvant chemotherapy (NAC) using FOLFOX regimen was given to 32 cases of rectal cancer patients. Three-year recurrence-free survival rates for responders (57%) and non-responders (47%) were 96% and 76% ($p = 0.006$), respectively.

Circulating cell free DNA (ccf DNA) derived from cancer cells is reflected in the long fragment / short fragment ratio (DNA integrity: DI) of ccf DNA. The changing rate of DI before NAC and after NAC is 20% or more was 91% in responders and 20% in non-responders ($p = 0.013$). DI change rate reflects histologic response and could be a prognostic marker.

研究分野：消化器外科学

キーワード：直腸癌 術前化学療法 リキッドバイオプシー バイオマーカー 効果予測 cell free DNA

1. 研究開始当初の背景

直腸癌は結腸癌に比べ術後の局所再発、遠隔転移の頻度が高い。局所進行直腸癌の根治治療のためには原発巣切除が不可欠とされているが、手術単独による予後改善は既に限界に達している。そこで、放射線治療、化学療法を手術に組み合わせた集学的治療にさらなる治療成績の改善が期待されている。

欧米では約 20 年前から術前の放射線治療が取り入れられており、局所再発率を低下させることが示されている。しかし、直腸癌の予後規定因子は遠隔転移であるため、局所治療である術前放射線治療は生存期間の改善には寄与しないことも明らかになっている。生存期間の改善には遠隔転移を制御するための全身化学療法を治療に組み入れることが不可欠であり、直腸癌の術前化学療法(Neoadjuvant chemotherapy: NAC)は理論的には局所コントロールと遠隔転移制御の両者に有効で将来有望な治療法である。現在、その有用性を検証する phase Ⅲ 臨床試験が進行中であるが、その効果予測法や予後予測法についての研究はなされていない。

血液などの体液サンプルを使って診断や治療効果予測を行うことを liquid biopsy と呼ぶ。我々は担癌患者の末梢血内 circulating cell free DNA (ccfDNA)をターゲットとして切除不能大腸癌患者の治療効果判定、予後予測について研究を行ってきた。今後、臨床的応用の可能性が高い NAC の効果予測法をこの手法を用いて確立することは意義が高いと考えられた。

2. 研究の目的

ccfDNA をバイオマーカーとした直腸癌に対する NAC の効果予測法を確立することが本研究の目的である。

これまでに抗癌剤効果予測法は腫瘍標本を用い、腫瘍内で発現している遺伝子、タンパクを利用した効果予測法、培養癌細胞を用いた抗癌剤感受性試験が多数報告されているが実用化には至っていない。これらの方法ではサンプリングは治療前の 1 回に限られているため得られる情報が限定的である。一方 ccfDNA は治療中に刻々と変化する癌の状態を低侵襲で頻回にモニタリング(multi-biopsy)することができる新たなバイオマーカーであることが特徴である。

我々は、これまでの効果予測法のように NAC を始める前に効果予測を行うのではなく、化学療法開始後におこる腫瘍細胞由来の ccfDNA の経時的な量的変化をでとらえることで NAC の効果予測の確立を目指す。

3. 研究の方法

T3 以深の遠隔転移のない直腸癌を対象とし、術前化学療法(NAC)として FOLFOX 療法 6 コースを施行した後、根治切除を行う。NAC 前後に CT・MRI、内視鏡、生検を行い、NAC 前、開始から 2 コース毎、NAC 終了時に末梢血中の ccfDNA サンプルを採取する。手術後は切除標本を用いて NAC の組織学的効果判定を行う。手術後は定期的にサーベイランスを行い Relapse-free survival および Overall survival を評価する。

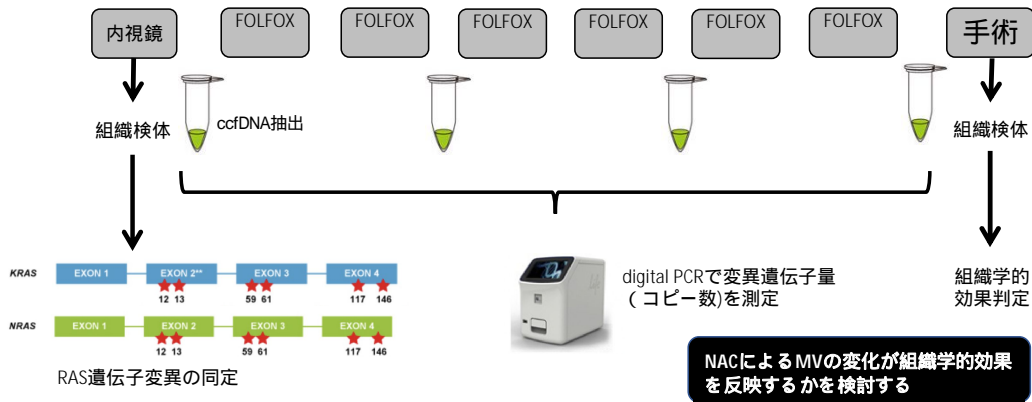
(1)腫瘍由来 ccfDNA 量の変化による NAC 効果判定

腫瘍由来の ccfDNA 量は分子生物学的腫瘍量(Molecular volume (MV))という。担癌患者の ccfDNA には癌細胞由来のものだけでなく正常細胞由来のものが含まれるが、癌細胞由来の ccfDNA は正常細胞由来の ccfDNA より不規則で長いフラグメントを含むことが知られており、腫瘍細胞由来の ccfDNA 量は long fragment /short fragment 比(DNA integrity: DI)に反映される。対象症例のサンプルから LINE-1 127bp(short fragment), 297bp(long fragment)を primer として real-time PCR でコピー数を測定し DI を算出する。NAC 前、後および NAC 中の DI の変化量、変化率と組織学的効果との関連を検討し、DI の効果予測因子としての可能性を評価する。

(2)腫瘍特異的変異遺伝子の ccfDNA による検出と NAC 効果判定

大腸癌症例の約半数は RAS 遺伝子に変異を認める。NAC 施行前に内視鏡にて生検した腫瘍組織から DNA を抽出し、ダイレクトシーケンシング法で RAS 変異の有無および変異遺伝子を同定する。

RAS 変異症例の個々の変異遺伝子を primer として digital PCR 法で ccfDNA 中の変異遺伝子を定量する。これが変異遺伝子をターゲットとした MV の指標となる。NAC 開始前の変異遺伝子量を基準にその変化量・変化率を算出し、NAC による MV の経時的変化を算出し、cctDNA 変異遺伝子減少が組織学的奏功を反映することを検証する。



いずれにおいても NAC 開始から 2, 4, 6 コース目のサンプルの中で、最も感度の高い時期を判定し、効果評価の至適時期を明らかにする。

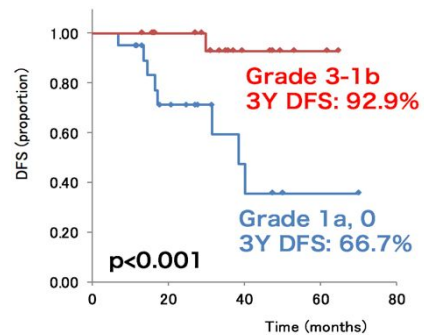
4. 研究成果

(1) NAC の安全性、有効性

phase II 臨床試験を行った。30 症例のうち 28 例(93%)はプロトコル治療が完遂され、各薬剤の相対容量強度は 95% 以上であった。Grade 3n の好中球減少症を 7 例(23%)に認めしたが、適切な休薬、減薬で対処可能であった。全例に予定した根治手術が施行され、すべて病理学的に根治切除であった。NAC における FOLFOX レジメンは安全性の高い治療レジメンであることを明らかにした。

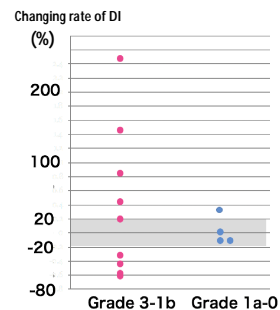
(2) 組織学的効果と予後

cStage III の 42 例の手術切除標本の組織学的効果判定において腫瘍細胞の完全消失(Grade 3)を 2 例(5%)に認めた。Grade 2/1b/1a/0: 11/9/18/2 例であった。観察期間中央値 36 ヶ月における 3DF は 77.5%。組織学的効果判定で奏功例(Grade 3-1b)/非奏功例(1a, 0)の 3 年 DFS はそれぞれ 92.9%/66.7.4%($p < 0.001$)であった。組織学的効が予後予測因子となることが示され、ccfDNA による組織学的効果の予測法を確立することは予後予測にも繋がること示された。



(3) 腫瘍由来 ccfDNA 量の変化による効果判定

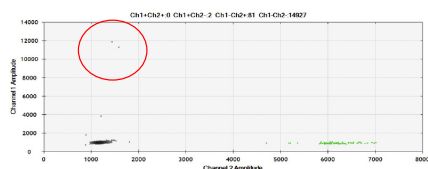
NAC 前後における総 ccfDNA 量、DI 値の変化と組織学的効果判定との関連は認めなかったが、NAC 前後で DI 変化率 20%以上の症例は Grade 3-1b/1a, 0 において 90.9%/20.0%($p = 0.013$)であった。DI 変化率が組織学的効果の予測因子となることが示唆されたが、NAC 開始 2 週目、4 週目における DI 変化率と組織学的効果との間の関連は示すことができず、治療早期における効果予測法には、より腫瘍細胞に特異的な手法が必要であると考えられた。また、奏功例の DI 変化が大きくプラスとマイナスに分かれる現象のメカニズムの解明は ccfDNA を化学療法の効果予測バイオマーカーとして発展させるために必要であると考えられた。



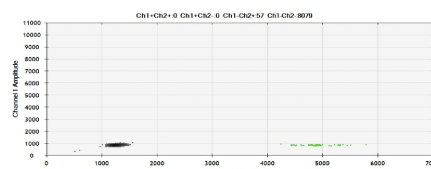
(4) 腫瘍特異的変異遺伝子の ccfDNA による検出と NAC 効果判定

NAC 施行前の腫瘍生検組織に 18 例に ras 変異を認めた。この中で NAC 前の末梢血内 ccfDNA で組織から検出された変異を検出したのは 9 例であった。組織学的に奏功した 3 例は全て NAC 終了時の ccfDNA で変異 ras 遺伝子は消失していた。また、非奏功例の 6 例中 3 例の変異 ras 遺伝子は NAC 終了時も ccfDNA で検出された。プレリミナルな結果ではあるが、DI の測定よりも腫瘍に特異性の高い検出法であり、MV 変化を鋭敏に検出できる可能性がある。

奏功例 KRAS 12S mutant
59yo, F, cT3N2M0 組織学的効果判定: Grade2

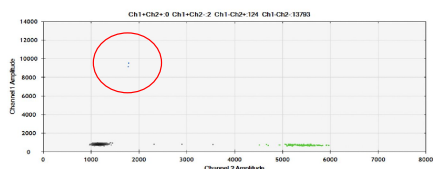


変異率:(2.4%)

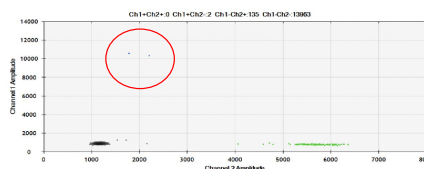


変異率:(-)

非奏功例 KRAS 12A mutant
59yo, F, cT3N2M0 組織学的効果判定: Grade1a



変異率:(1.6%)



変異率:(1.5%)

今後の課題は ras 野生型症例において ras 以外の変異遺伝子を同定し、ccfDNA バイオマーカーとすることである。我々はこれまでに大腸癌の 90%以上の症例で TP53, KRAS, APC, PIK3CA, BRAF, NRAS のいずれかに変異を生じていることを明らかにした(Furuki H, Koizumi M et al. Eur J Surg Oncol 2018)。これらの変異遺伝子をターゲットとし、カスタマイズしたシーケンスパネルを作成し、個々の症例の変異遺伝子を検出することで、効率よくかつ低コストでターゲットとする変異 cctDNA を同定し、ras 野生型症例にもこの効果予測方が利用可能と考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Yamada T, Masuda A, Koizumi M, Shinji S, Takahashi G, Iwai T, Takeda K, Ueda K, Yokoyama Y, Hara K, Hotta M, Matsumoto S, Yoshida H. Biopsy for the Management of Patients with Colorectal Cancer Digestion. 2019;99(1):39-45. doi: 10.1159/000494411
2. Koizumi M, Yamada T, Shinji S, Yokoyama Y, Takahashi G, Iwai T, Takeda K, Hara K, Ohta K, Uchida E, Yoshida H. Feasibility of neoadjuvant FOLFOX therapy without radiotherapy for baseline resectable Rectal Cancer. In Vivo 32 (4); 937-943, 2018. doi:10.21873/invivo.11332
3. Takahashi G, Yamada T, Iwai T, Takeda K, Koizumi M, Shinji S, Uchida E. Oncological assessment of stent placement for obstructive colorectal cancer from circulating cell-free DNA and circulating tumor DNA dynamics. Ann Surg Oncol 25 (3); 727-744, 2018. 10. doi: 1245/s10434-017-6300-x
4. Furuki H, Yamada T, Takahashi G, Iwai T, Koizumi M, Shinji S, Yokoyama Y, Takeda K, Taniyai N, Uchida E. Evaluation of liquid biopsies for detection of emerging mutated genes in metastatic colorectal cancer. Eur J Surg Oncol 44 (7); 975-982, 2018. doi: 10.1016/j.ejso.2018.01.224

〔学会発表〕(計 22 件)

1. Koizumi M, Yamada T, Shinji S, Yokoyama Y, Takahashi G, Hotta M, Takeda K, Iwai T, Hara K, Ueda K, Takeda K, Ohta K, Yoshida H. Distal intramural spread of rectal cancer following neoadjuvant chemotherapy without radiotherapy. 13th European Society of Coloproctology (Nice), 2018
2. Yamada T, Takahashi G, Takeda K, Iwai T, Koizumi M, Shinji S, Yokoyama Y, Hotta M, Hara K, Ueda K, Takeda K, Ohta K, Yoshida H. Emergence of KRAS mutation may play a major role in the secondary resistance to EGFR blockade. European Society for Medical Oncology Gastrointestinal Cancer (Barcelona), 2018
3. 小泉 岐博 山田 岳史 他 10 名, Clinical Stage II/III 直腸癌に対する neoadjuvant chemotherapy. 日本大腸肛門病学会(2018.11)
4. 武田 幸樹 山田 岳史 小泉 岐博 他 7 名, Liquid biopsy を用いた大腸癌関連遺伝子変異の同定 CTC と ccfDNA の有用性. 日本消化器外科学会総会 (2018.07)
5. Koizumi M, Yamada T, Shinji S, Yokoyama Y, Takahashi G, Takeda K, Hotta M, Iwai T, Hara K, Takeda K, Ohta K, Uchida E. The prognostic value of pathological response

in rectal cancer patients receiving neoadjuvant FOLF0X. 12th European Society of Coloproctology (Berlin), 2017

6. 小泉 岐博 山田岳史 他 10名, 直腸癌術前化学療法例における組織学的効果判定と予後の検討. 日本大腸肛門病学会学術集会 (2017.09)
7. 小泉 岐博 山田 岳史 他 8名, 局所進行直腸癌に対する集学的治療戦略 術前化学療法を行った直腸癌症例における循環血液中 cell-free DNA を用いた予後予測. 日本消化器外科学会総会 (2017.07)
8. 武田 幸樹 山田 岳史 小泉 岐博 他 7名, Circulating cell free DNA を用いた大腸癌化学療法の効果予測. 日本外科学会総会 (2017.04)
9. 山田岳史 高橋吾郎 岩井拓磨 武田幸樹 小泉岐博 他 7名, Circulating cell free DNA を用いた real-time な分子情報に基づく大腸癌化学療法. 日本大腸肛門病学会学術集会 (2016.11)
10. 小泉 岐博 山田 岳史 他 8名, 進行下部直腸癌に対する補助療法の選択 Circulating cell free DNA は直腸癌術前化学療法の効果を反映する. 日本臨床外科学会 (2016.10)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山田 岳史

ローマ字氏名：Yamada Takeshi

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8桁): 50307948

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。