

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：87208

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19832

研究課題名（和文）包括的遺伝子解析パネルを用いた血漿遊離DNAによる肺癌定位放射線治療後の再発診断

研究課題名（英文）Detection of recurrence after stereotactic radiotherapy for lung cancer by analyzing cell free DNA using comprehensive gene panel

研究代表者

寺嶋 広太郎（Terashima, Kotaro）

公益財団法人佐賀国際重粒子線がん治療財団九州国際重粒子線がん治療センター（臨床研究部）・臨床研究部・医師

研究者番号：40627676

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：肺癌に対する定位放射線治療後の再発診断において、血漿遊離DNA（cfDNA）の有用性を検討することを目的としたが、組織学的に再発が確定した症例がなかった。本研究は放射線治療前後での、血中に極微量存在する癌特異的なcfDNAに着目したものであり、実験系の確立のため局所進行膵癌に対する重粒子線治療前後でのcfDNAを抽出し、次世代シーケンサーによる癌特異的ゲノム異常の検出おこなった。このうち遺伝子Aについては、照射前にはcfDNA中に体細胞変異を同定できたが、24時間後には同定できなくなっており、照射による腫瘍の経時的変化と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療後は、腫瘍自体の変化に加え、照射による組織変化が、画像での再発診断を困難なものとしている。本研究では、血液中の遊離DNAを解析することで、再発診断のバイオマーカーとしての意義を検討することを目的とした。実験の系を確立するためにおこなった局所進行膵癌に対する重粒子線治療前後での解析では、十分なcfDNAが抽出でき、1回目の照射後に体細胞遺伝子変異の一つが同定できなくなっており、治療に伴う腫瘍の変化と考えられた。今後、症例を蓄積し、解析を継続することで、再発の早期、かつ正確な診断に繋がれば、癌患者のその後の治療方針、さらには予後に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to investigate the usefulness of cell free DNA (cfDNA) for the detection of recurrence after stereotactic radiotherapy for lung cancer, however there were no histologically confirmed cases of recurrence. Because this study was focused on very small amount of cancer-specific cfDNA in plasma before and after radiotherapy, in order to establish this experimental system, we extracted cfDNA from plasma of patients with locally advanced pancreatic cancer before and after carbon-ion radiotherapy, and detected cancer-specific genomic abnormalities using a next-generation sequencer. Among them, for gene A, somatic mutations was detected in cfDNA before irradiation, but was not after 24 hours, which was considered to be a change in the tumor due to irradiation.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：血漿遊離DNA 次世代シーケンサー 定位放射線治療 重粒子線治療 遺伝子パネル 局所進行膵癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### <非小細胞肺癌に対する体幹部定位放射線治療>

I 期非小細胞肺癌に対する定位放射線治療は広く行われているが、治療後の放射線肺臓炎・線維化の影響により画像検査での局所効果・再発の判断に難渋することがしばしばみられる。肺癌を含む多くのがん腫において、放射線治療後(定位放射線治療や重粒子線治療などの高精度放射線治療を含む)では治療自体による臨床所見や画像所見の修飾を伴うことで、再発診断を困難なものとしている。放射線治療後の正確な再発診断を行う手法の開発は、喫緊の課題である。

#### <バイオマーカーとしての血漿遊離 DNA>

血漿遊離 DNA (cfDNA: cell free DNA) は癌特異的な遺伝子異常を同定することで、治療のモニタリング、再発のバイオマーカーになることが期待されている。しかしながら、従来の digital PCR ベースの単一遺伝子解析では、様々な遺伝子異常を有する多数症例には対応出来ないという問題点がある。

多数の遺伝子変異・融合遺伝子の検出が可能な遺伝子パネルを用いて、次世代シーケンサーによる包括的遺伝子解析を行うことで、hotspot がない遺伝子異常も検出でき、1 症例から同時に複数の遺伝子異常を検出、幅広い症例に対応し、治療経過で新たに出現した遺伝子異常も検出できる、などの利点が期待される。

### 2. 研究の目的

I 期非小細胞肺癌に対し定位放射線治療を行う患者において cfDNA を採取し、パネルを用いた次世代シーケンサーによる包括的遺伝子解析を行い、臨床的に有用なバイオマーカーとしての意義について解析する。さらにその手法を応用し、様々ながん腫における cfDNA の放射線治療後(定位放射線治療や重粒子線治療などの高精度放射線治療を含む)のバイオマーカー意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

I 期非小細胞肺癌に対し定位放射線治療を行う患者において、治療前から定期的な採血を行い、cfDNA を抽出。

多数の遺伝子変異・融合遺伝子を高精度に検出可能なパネルを用いて次世代シーケンサーによる包括的遺伝子解析を行う。

異常遺伝子のアレル頻度の経時的変化と臨床経過との相関からバイオマーカーとしての意義について解析する。

### 4. 研究成果

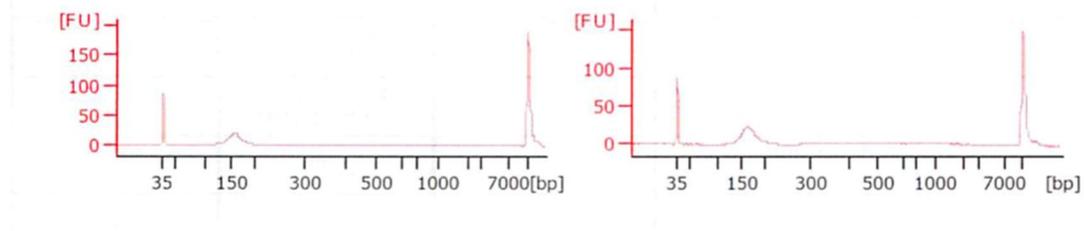
組織学的に確定診断が得られている I 期非小細胞肺癌に対し、定位放射線治療を施行した症例を対象として、治療前、治療終了時、定期観察時に合わせて、血清の採取、保存を行ったが、観察時点で登録症例に局所再発を生じた症例はなかった。

研究代表者の異動に伴い、適応症例を拡大する目的で、非小細胞肺癌や局所進行膵癌に対して重粒子線治療を行う症例も対象とする方針とした。非小細胞肺癌においては X 線定位放射線治療と重粒子線治療を行った症例を含めても、観察期間に登録症例において組織学的に証明された再発例は認めなかった。

本研究では放射線治療前・後の cfDNA に着目したのだが、血中に極微量存在する癌特異的な cfDNA については、I 期非小細胞肺癌よりも元々の腫瘍量が多い局所進行膵癌の方がより多量に存在することが想定された。そのため、今回の cfDNA に着目した実験系の確立には局所進行膵癌が適していると判断した。さらに重粒子線治療後も定位放射線治療と同様に治療後の画像所見の修飾によって局所効果の評価、再発の診断に苦慮することが多く、本研究の目的を達成する上でより良いという結論に至った。

IRB 通過後、研究手法を確立するために局所進行膵癌患者に対する重粒子線治療開始前・後に採血を行い、cfDNA を抽出、癌特異的なゲノム異常を検出した。

具体的には、照射直前および 1 回目照射 24 時間後に採血を行い、血液検体 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit(QIAGEN 社)を用いて cfDNA の抽出を行った。Qubit および BioAnalyzer による品質評価を行った。照射直前および 1 回目照射 24 時間後いずれの採血においても、150-200bp にピークを有する良好な品質の cfDNA を検出できた(下図)。



続いて、OncoPrint Lung cfDNA Assay (Thermo Fisher Scientific 社)を用いてターゲット領域を増幅し、次世代シーケンサー (Ion S5 XL System, Thermo Fisher Scientific) による DNA シーケンシングを実施した。リードデータから低品質のリードを除去し、リファレンス配列 (hg19) にマッピングを行った。ターゲット領域の平均深度は、照射始直前  $\times 230,000$ 、1 回目照射 24 時間後で  $300,000$ 、 $\times 500$  以上はともに 100% と、cfDNA におけるゲノム変異の検出を実施するに当たり、十分な深度のシーケンス結果を得た。その後、Ion Reporter を用いた変異検出を実施した。このうち遺伝子 A については、照射始直前には cfDNA 中に体細胞変異を同定できたが、1 回目照射 24 時間後には変異を同定できず、照射による腫瘍の経時的変化と考えられた。現在、さらなるデータ解析中である。今後症例を蓄積し、異常遺伝子のアレル頻度の経時的変化と臨床経過との相関からバイオマーカーとしての意義について解析する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirata H., Sugimachi K., Komatsu H., Ueda M., Masuda T., Uchi R., Sakimura S., Nambara S., Saito T., Shinden Y., Iguchi T., Eguchi H., Ito S., Terashima K., Sakamoto K., Hirakawa M., Honda H., Mimori K.	4. 巻 76
2. 論文標題 Decreased Expression of Fructose-1,6-bisphosphatase Associates with Glucose Metabolism and Tumor Progression in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3265 ~ 3276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-15-2601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinoto Makoto, Yamada Shigeru, Terashima Kotaro, Yasuda Shigeo, Shioyama Yoshiyuki, Honda Hiroshi, Kamada Tadashi, Tsujii Hirohiko, Saisho Hiromitsu	4. 巻 95
2. 論文標題 Carbon Ion Radiation Therapy With Concurrent Gemcitabine for Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics	6. 最初と最後の頁 498 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.12.362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Shigeru, Kamada Tadashi, Ebner Daniel K., Shinoto Makoto, Terashima Kotaro, Isozaki Yuka, Yasuda Shigeo, Makishima Hirokazu, Tsuji Hiroshi, Tsujii Hirohiko, Isozaki Tetsuro, Endo Satoshi, Takahashi Keiichi, Sekimoto Mitsugu, Saito Norio, Matsubara Hisahiro	4. 巻 96
2. 論文標題 Carbon-Ion Radiation Therapy for Pelvic Recurrence of Rectal Cancer	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics	6. 最初と最後の頁 93 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.04.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinoto Makoto, Terashima Kotaro, Suefuji Hiroaki, Matsunobu Akira, Toyama Shingo, Fukunishi Kaori, Shioyama Yoshiyuki	4. 巻 129
2. 論文標題 A single institutional experience of combined carbon-ion radiotherapy and chemotherapy for unresectable locally advanced pancreatic cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiotherapy and Oncology	6. 最初と最後の頁 333 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.radonc.2018.08.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyama Shingo, Shioyama Yoshiyuki, Suefuji Hiroaki, Shinoto Makoto, Matsumoto Keiji, Terashima Kotaro, Hidaka Masaaki, Eguchi Susumu, Abe Kuniko, Irie Hiroyuki, Eguchi Yuichiro	4. 巻 7
2. 論文標題 A case of the cirrhotic patient performed living donor liver transplantation after carbon-ion radiotherapy for hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Cancer Conference Journal	6. 最初と最後の頁 65 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13691-018-0322-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Satoshi Yoshidome, Hidetaka Arimura, Kotaro Terashima, Masakazu Hirakawa, Taka-aki Hirose, Junichi Fukunaga, Yasuhiko Nakamura, Hiroshi Honda	4. 巻 35
2. 論文標題 Automated and robust estimation framework for lung tumor location in kilovolt cone-beam computed tomography images for target-based patient positioning in lung stereotactic body radiotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医用画像情報学会雑誌	6. 最初と最後の頁 48 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.11318/mii.35.48	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kotaro Terashima, Masato Inamori, Akira Matsunobu, Hidenari Hirata, Sakamoto Katsumi, Kan Okabayashi, Furuya Akio, Hirakawa Masakazu
2. 発表標題 Curative intent radiotherapy for loco-regional recurrence of non-small-cell lung cancer after complete resection.
3. 学会等名 The 35th, Annual Meeting of the European Society for Radiotherapy & Oncology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 寺嶋 広太郎、平田 秀成、坂本 勝美、平川 雅和、日高 啓、岸原 文昭
2. 発表標題 The efficacy of palliative radiotherapy for gastric bleeding in patients with advanced gastric cancer
3. 学会等名 第29回日本放射線腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 K. Terashima H. Hirata H. Wakiyama R. Uchi T. Masuda K. Sakamoto M. Hirakawa K. Mimori H. Honda
2. 発表標題 Downregulation of MicroRNA-203 Associated With Radioresistance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells
3. 学会等名 59th Annual Meeting of American Society for Radiotherapy and Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺嶋 広太郎、篠藤 誠、末藤 大明、松延 亮、戸山 真吾、大嶋 かおり、塩山 善之
2. 発表標題 切除不能局所進行膵癌に対する重粒子線治療成績
3. 学会等名 第111回日本消化器学会九州支部会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kotaro Terashima, Keiji Matsumoto, Akira Matsunobu, Hiroaki Suefuji, Makoto Shinoto, Shingo Toyama, Yoshiyuki Shioyama
2. 発表標題 Carbon-ion Radiotherapy for Peripheral Lung Tumors in Patients with Severe Pulmonary Dysfunction
3. 学会等名 37th Annual Meeting of European Society of Radiotherapy and Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kotaro Terashima, Makoto Shinoto, Hiroaki Suefuji, Akira Matsunobu, Shingo Toyama, Kaori Fukunishi, Satoshi Nomoto, Yoshiyuki Shioyama
2. 発表標題 Carbon-ion radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: a single-institution retrospective study.
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----