

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15611

研究課題名（和文）オリゴメタスタシスの予後予測としてのcell free DNAの有効性検証の研究

研究課題名（英文）Usefulness of cell-free DNA in patients with oligometastatic cancer

研究代表者

中村 匡希（Nakamura, Masaki）

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：90804287

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）：大腸癌、直腸癌で少数個の転移に対して放射線治療を行った患者さんの放射線治療前の血液から腫瘍由来のDNAを検出し解析を行った。その結果として、腫瘍由来DNAが検出可能であること、また腫瘍由来DNAを検出することで治療後に再発しやすさが判別できる可能性が示唆された。今後さらなる検証を行う上での重要なデータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌、直腸癌で少数個の転移に対して放射線治療を行う患者さんの放射線治療前の血液検査で再発しやすさがわかれば、効果が乏しい患者さんへの不要な治療を事前に回避できる可能性がある。さらに再発しやすい患者さんには放射線治療ではなく抗がん剤治療を続けるなどの選択肢が提示できる可能性があり、治療を選択する上での指標となりうるという観点で、大きな意義を持つ研究である。

研究成果の概要（英文）：We detected and analyzed tumor-derived DNA from the blood of patients who had undergone radiotherapy for a small number of metastases in colorectal cancer before radiotherapy. As a result, it was suggested that the tumor-derived DNA could be detected, and that the tumor-derived DNA could be used to determine the likelihood of recurrence after treatment. We have obtained important data for further verification in the future.

研究分野：放射線科学

キーワード：オリゴメタスタシス 放射線治療 リキッドバイオプシー cfDNA

1. 研究開始当初の背景

癌治療の大原則として、癌が局所にとどまる例では切除ないし高線量の放射線治療で根治を目指し、遠隔転移が出現した場合には血液中ないし組織中に微細な癌細胞が存在する全身性の病期と判断し、全身化学療法が主軸となる。しかしながら、日常臨床では数個の遠隔転移を起こしながら新規の遠隔転移は生じることなく数年を経過する症例を経験することは少なくない。このように局所に癌がとどまっている病態と全身性の病態の間に、数個の遠隔転移のみに留まる病態というものが存在し得るのではないかというオリゴメタスタシスの概念は 1995 年に Hellman らによって提唱された。それまでは遠隔転移を有する状態は全身疾患と判断され、局所治療を行うことは予後延長への寄与は少ないとされてきた。しかし、近年は少数の遠隔転移巣に局所治療を加えることで長期の生命予後が得られた報告がみられ (Cancer, 1996; 77: 1254-62, Ann Thorac Surg, 2007; 84: 324-38)。特に大腸癌では切除可能な肝・肺転移において手術療法の有効性が示され、診療ガイドラインにも掲載されている。現在では保険適応としては原発巣が制御された 1~3 個の肺・肝転移や少数個のリンパ節転移例などに対して体幹部定位放射線治療が臨床で実施され、陽子線治療も少数個の肺、肝およびリンパ節転移例に対して先進医療として承認されている。この背景には、少数箇所の遠隔転移例に対する有効性の報告がある。

しかし、実臨床では画像評価、転移の個数といった情報より「おそらく数個の遠隔転移しか存在しない病態があるであろう」という仮説のもと治療を行ってしまっているのが現状である。手術を含めた局所治療後に再発なく根治状態を維持できる症例もあるが、局所治療後早期に他部位に再発・転移を来す症例にもしばしば遭遇し、治療前にその予後や効果を予測できる因子は明確ではない。そのため少数の遠隔転移巣を有する症例に根治的な局所治療を加えることで長期の生命予後が得られる病態を選別することが可能なバイオマーカーや因子を明らかにすることは学術的に大きな意義があるだけでなく、患者の生命予後にも影響するため臨床的にも重要な研究テーマであり、その成果の臨床的波及性は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では「癌の病態は限局期と全身性の単純な 2 元論で説明がつくものではなく、その中間に位置する遠隔転移を有しながらも血液中や組織中の新規微小病変が存在しない病態が存在するのではないか」の学術的問いに対して、cell free DNA の有用性および有効性を検証することで、癌治療へフィードバックすることを目的とした。

Cell free DNA は、1948 年に Mandel と Metais によって健常人の血液から初めて同定され (CR Seances Soc Biol Fil, 1948; 142: 241-3)、1977 年には Leon らによって癌患者の血中で濃度が上昇することが報告された (Cancer Res, 1977; 37: 646-50)。現在では cell free DNA はアポトーシス細胞やネクローシス細胞などの様々な起源に由来すると考えられており、生理的状態や非癌性病態でも上昇することがあるが、多数の研究により担癌状態で血中の cell free DNA 濃度がより高くなることが示されている。現在、Cell free DNA 解析は抗癌剤治療の治療効果の評価 (Clin Cancer Res, 2012; 18: 1177-85) や術後の再発・転移の診断 (Br J Cancer, 2014; 111: 1482-9) などを目的に研究され有用性が示されている。しかし、cell free DNA を用いたオリゴメタスタシス症例やその病態の治療前評価に関する報告は認められない。本研究では PET-CT、MRI などの画像的評価に加え cell free DNA という生物学的マーカーをオリゴメタスタシス患者の病態評価や治療後の予後や治療効果の予測因子としての役割や有効性およびその定量的な評価方法を確立する。

3. 研究の方法

この研究では、2011 年 12 月から 2017 年 12 月の期間に国立がん研究センター病院で陽子線治療または定位放射線治療を転移性病変に対して施行されたオリゴ転移性結腸直腸患者を対象とした。患者情報と予後に関するデータは、診療記録から収集された。

血漿サンプルは、国立がん研究センターバイオバンクから入手した。末梢静脈血サンプルは、患者が転移性病変に対して放射線治療を受ける前に、EDTA を含むチューブに収集され、1,600 x g、4 で 10 分間の遠心分離により、直ちに血漿を分離するために処理され -80 で保存された。cfDNA を 4 ml の患者血漿から精製し、断片化した DNA をアダプターでライゲーションしてライブラリを作成。ライブラリの構築とシーケンスは、114 個の遺伝子のエキソンを検出できる SureSelect NCC oncopanel v.2 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を備えた Illumina Novaseq 6000 シーケンスプラットフォーム (Illumina, San Diego, CA, USA) を使用して実行した。サンプルあたり 40~45 Gb の FASTA データを取得し、FASTQ をヒトゲノム (hg19) にアラインメント

し、Sure call 4.1.1.5 (Agilent) を使用して点突然変異を特定した。次の遺伝子の潜在的な変異を評価した。TP53、APC、KRAS、PIK3CA、NF1、EGFR、SMAD4、BRAF、BRCA2、AR、PDGFRA、BRCA1、ERBB2、NRAS、FBXW7、FGFR2、KIT、および HRAS。変異は、変異対立遺伝子頻度がサンプルの最大対立遺伝子頻度の 50%未満の場合は「マルチクローン性」と定義し、頻度がこのしきい値を超えた場合は「クローン性」と定義した。

すべての統計分析は、R ソフトウェアバージョン 3.4.0 (The R Foundation、ウィーン、オーストリア) を使用して実行された。無増悪生存期間は、放射線療法の開始から、疾患の進行または何らかの原因による死亡の最も早いイベントが検出されるまでの時間として定義した。ハザード比 (HR) と 95%信頼区間 (CI) を評価した。 Kaplan-Meier 法を使用して生存曲線を作成し、ログランク検定とコックス比例ハザードモデルを使用して比較した。すべてのテストは両側で行われ、 $p < 0.05$ は統計的有意性を示していると見なした。

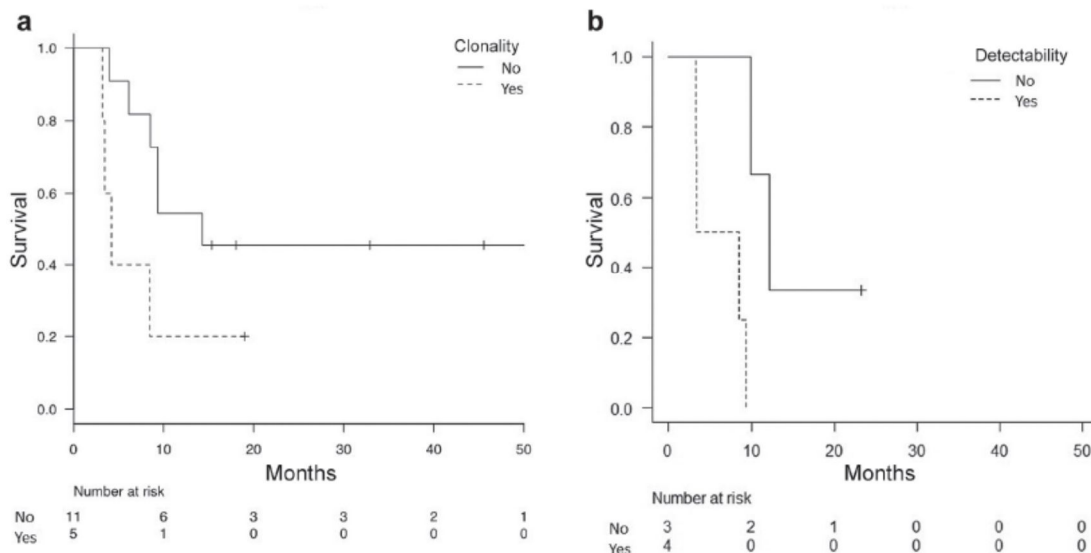
以上の研究は、国立がん研究センター東病院の研究倫理委員会による承認の上で行われた。

4. 研究成果

オリゴ転移性結腸直腸癌 20 人の患者からの 20 サンプルを分析した。

対象症例の年齢中央値は 72 歳であった (範囲: 54-85 歳)。12 人の患者 (60%) は男性であり、パフォーマンスステータスが 2 以上の患者はいなかった。転移性病変の部位は、肺 (35%)、肝臓 (55%)、および遠隔リンパ節 (10%) であった。13 人の患者 (65%) は単一の転移であった。15 人の患者 (75%) が陽子線治療 (60-80 Gy (RBE) / 10-33 分割) を受け、5 人 (25%) が定位放射線治療 (35-48 Gy / 4-5 分割) で治療されていた。

サンプルあたりの cfDNA の中央値は 42.1 ng (範囲: 25.3-100.8 ng) であった。次の変異が 16 サンプル (80%) で検出されました。TP53 (9/20: 45%)、APC (8/20: 40%)、KRAS (3/20: 15%)、PIK3CA (3/20: 15%)、NF1 (1/20: 5%)、BRCA1 (1/20: 5%)、ERBB2 (1/20: 5%)、FBXW7 (1/20: 5%)、KIT (2/20: 10%)、および HRAS (2/20: 10%)。最大対立遺伝子頻度 (MaxAF) は 0.6-7.8% (中央値 1.5%) で、クローン性およびマルチクローン性変異は、それぞれ 11 例および 5 例で確認された。生存している患者の生存期間中央値は、18 か月 (範囲: 3~71 か月) であった。再発は 13 例で観察され、PFS 期間の中央値は 10 か月であった (95%CI = 5 か月-NA)。MaxAF、cfDNA の検出、および変異遺伝子タイプは、PFS との相関は認められなかった。cfDNA が検出された 16 人の患者のうち、マルチクローン性変異を有する患者は、クローン性に比べて PFS が不良である傾向があった (14 か月対 4 か月、HR = 3.1 (95%CI = 0.8-11.3)、 $p = 0.07$ 、図 a)。cfDNA が検出されなかった 4 人の症例の内、3 人 (75%) は肺転移の症例であった。7 人の肺転移症例について cfDNA の検出と予後との関連を評価した結果、cfDNA が検出されなかった症例の PFS は、cfDNA が検出された患者の PFS よりも有意に良好であった ($p = 0.02$ 、図 b)。



以上の結果から、オリゴ転移性結腸直腸癌に対する放射線治療前の cfDNA 解析により治療後の再発の予測可能性が示唆された。より大規模な検証的臨床研究が必要ではあるが、本研究の結果はその基礎データとなると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 MASAKI NAKAMURA, SHUN-ICHIRO KAGEYAMA, MASAHIDE SEKI, AYAKO SUZUKI, MASAYUKI OKUMURA, HIDEHIRO HOJO, ATSUSHI MOTEGI and TETSUO AKIMOTO	4. 巻 41
2. 論文標題 Liquid Biopsy Cell-free DNA Biomarkers in Patients With Oligometastatic Colorectal Cancer Treated by Ablative Radiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ANTICANCER RESEARCH	6. 最初と最後の頁 829-834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14835	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 Nakamura M, Hashimoto N, Mayahara H, Uezono H, Harada A, Nishikawa R, Matsuo Y, Kawaguchi H, Nishimura H	4. 巻 13
2. 論文標題 Additional chemotherapy improved local control and overall survival after stereotactic body radiation therapy for patients with oligo-recurrence.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13014-018-1031-0.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村匡希、影山俊一郎、茂木厚、北條秀博、秋元哲夫
2. 発表標題 大腸・直腸癌オリゴメタスタシスの予後予測因子としてのcell free DNA解析
3. 学会等名 第49回放射線による制癌シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Nakamura, Shun-ichiro Kageyama, Atsushi Motegi, Hidehiro Hojo, Tetsuo Akimoto
2. 発表標題 Identification of Cell-Free DNA profile in oligometastatic colorectal cancer
3. 学会等名 ESTRO2020（国際学会）
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------