

機関番号：22701
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591499
 研究課題名（和文） 腫瘍に対する放射線治療効果を血漿中腫瘍細胞 DNA の経時的定量によって早期判定する
 研究課題名（英文） Quantification of cell-free DNA in the plasma during radiation therapy
 研究代表者
 大村 素子（OMURA MOTOKO）
 横浜市立大学・医学部・准教授
 研究者番号：70244506

研究成果の概要（和文）：

我々は「放射線照射によって腫瘍細胞が崩壊し、腫瘍細胞中の DNA が血漿中に流出、その後減少、消失する」という仮説を立て、放射線治療開始後の血漿中 cell-free DNA 変動の解析を行った。腫瘍モデル動物による実験では、照射後の腫瘍の大きさと血漿中 DNA の変化が連動していた。悪性腫瘍患者の血漿中には、腫瘍細胞に由来すると考えられる DNA が存在し、放射線治療開始前と比べて治療終了時には減少することを見出した。以上より血漿中 cell-free DNA の測定は、放射線治療患者の腫瘍体積を反映し、治療効果モニタリングに利用できる可能性があった。

研究成果の概要（英文）：

Cell-free plasma DNA is elevated in cancer patients and decreases in response to effective treatments. Consequently, these DNA have potential as new tumor markers. We investigated whether the plasma DNA concentrations in tumor-bearing mice and cancer patients are altered during the course of radiation therapy. The cell-free tumor specific DNA levels in the plasma of those mice were significantly associated with the tumor volume after radiation. The total cell-free plasma DNA levels in cancer patients showed dynamic changes associated with the progression of radiation therapy and decreased at end of the treatment. Additional analysis will be required to elucidate the potential clinical utility of dynamic changes in cell-free plasma DNA during radiation therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療血漿 DNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 概要：本研究は放射線治療を受ける悪性腫瘍患者において、放射線治療効果を治療開始早期に予測、診断する新たな判定法の確立を目標としている。担癌患者の血漿中には、腫瘍細胞に由来する DNA/RNA が、細胞外に遊出した cell free の状態で存在している。我々はこれまでに、放射線治療開始後、数日以内に、患者血漿中の腫瘍細胞由来 DNA が増加した後、漸減することを見出した。これは腫瘍細胞の崩壊、減少、消失に伴う変化と考えられた。そこで我々は、放射線感受性が高い腫瘍（放射線治療効果が高い腫瘍）ほど治療早期から腫瘍細胞が崩壊し、これに伴って、腫瘍細胞中の DNA が血漿中に流出、ついで早期に減少、消失していくのではないかとこの仮説を立てた。そして、この血漿中 DNA の治療開始早期における変動の解析によって、放射線治療の効果を早期に診断する方法を検討している。

(2) 研究の学術的背景：放射線治療は癌治療の一環として重要な位置を占めている。しかし、固形腫瘍の場合、同じ組織型の腫瘍であっても、個体によっては放射線抵抗性を示し、治療に難渋することがある。この場合、数週間にわたる放射線終了後に、追加化学療法や手術が行われることがあり、患者さんにとって大きな負担となる。従って、治療開始早期に個体の腫瘍の放射線感受性（放射線の効きやすさ）を正確に判定し、最適な治療方針を決定する事は臨床的に重要である。

治療効果判定には従来、画像診断や生検が行われている。しかし、治療中および治療直後の CT, MRI 画像所見は腫瘍の治療感受性を正確に反映しない。また生検は侵襲的であり、頻回には施行できないうえ、病変部が採取できない可能性がある。従って、治療中および治療直後の放射線感受性の判定は、従来の方法では限度があるため、新たな判定方法が望まれている。

(3) これまでの研究成果：悪性腫瘍患者の血漿中には腫瘍細胞から分泌される、あるいは、腫瘍細胞の崩壊に起因すると考えられる DNA/RNA が free の状態（細胞外に遊出した状態）で存在していることが明らかになった。我々は、先行研究において、以下の研究を行った。放射線治療を受ける悪性腫瘍患者について、放射線治療前、治療開始 3 日、以後 1 週間毎に、全治療期間（約 6-7 週間）に渡り、経時的に採血を行い、患者の血漿中 DNA を PCR 法を用いて定量した。増幅遺伝子はコン

トロール遺伝子 b-actin を用いた。これまでに、15 例の解析を終了し、1) 治療前の患者血漿中 DNA および RNA 値は正常コントロール群より高値を示す。2) 8 割の患者で、血漿中 DNA が放射線治療開始後 2 週間までにピークをもって上昇し、その後、治療終了まで漸減していく、あるいは初期のピークを伴わず減少していくことを見出した。これは放射線治療初期の急激な腫瘍細胞崩壊とその後の治療による腫瘍の縮小を反映するものと考えられた。我々は、この治療早期の血漿 DNA 変動パターンをより詳細に解析することで、最終的な腫瘍の放射線治療効果を予測できないかと考えた。このためには、この治療開始早期におきる血漿 DNA の変化について、さらに詳しい検討を要すると考えた。次に動物モデルを用いた検討を行った。ヒト腫瘍細胞を移植したマウス血漿中にヒト特異的 DNA (= 腫瘍細胞由来 DNA) が存在しており、PCR 法による定量が可能であることを確認した。従って上記の臨床研究で確認された放射線照射中の血漿 DNA の動態は、腫瘍モデルマウスでも解析可能であると考えた。

2. 研究の目的

(1) いままでの報告では悪性腫瘍患者の血漿中 cell-free DNA 量は、正常コントロール群より高く、新しい腫瘍マーカーとして期待されている。また手術や化学療法後に低下、消失することから治療効果のモニタリングとしても注目されている。放射線治療に関しては、EBvirus 感染による上咽頭癌において、放射線照射開始 1 週間以内に血液中の EBvirus DNA が急上昇し、その後、徐々に低下することが示されている (Lo et al. Cancer Res. 60, 2000)。これは放射線治療初期の急激な腫瘍細胞崩壊とその後の治療による腫瘍の縮小を反映するものと考えられ、我々の上記の研究結果と一致している。しかし、本研究のように放射線治療の治療効果モニタリングとして、血漿 DNA を利用した報告は他にはない。

これまでに、血漿 cell-free DNA の由来や治療中の変化が、どのような腫瘍の病態変化を反映するのかが明らかになっていない。今回の検討では、動物モデルを用いるために、線量、腫瘍の大きさ、放射線感受性の異なる細胞腫の使用など、条件を変化させ、かつその治療後の変化を経時的に詳細に検討することが可能となる。

(2) 血漿中に腫瘍細胞特異的 DNA (メチル化遺伝子や変異遺伝子) が存在することはすでに発表されている (J Natl Cancer Inst. 2004

Jan 21;96(2):152-6, Clin Cancer Res. 2005 Jun 1;11(11):4037)。臨床サンプルで報告されている血漿中 DNA には腫瘍細胞由来 DNA と腫瘍細胞以外の DNA が混在している。腫瘍細胞特異的 DNA は、解析が煩雑で、遺伝子異常は個々の腫瘍において異なるため、臨床研究ではコントロール遺伝子の血漿中 DNA 総量を測定し、腫瘍マーカーとしての有用性を報告している例が多い。今回の研究で動物モデルを用いる有利な点は、血漿中の腫瘍細胞特異的 DNA (ヒト由来 DNA) と、腫瘍細胞以外の DNA (マウス由来 DNA) を特異的プライマーとプローブを用いて PCR 反応させることで、それぞれを分けて解析できることである。この腫瘍細胞以外の DNA が照射とともにどのように変動するか、同時に解析する。さらに、腫瘍を持たないコントロールマウスにも、腫瘍マウスと同じ範囲の照射を行った場合、血漿中に正常細胞由来のマウス DNA が遊出し、それが照射とともに変化するかどうか調べる。これによって、放射線照射によって変動するのは、腫瘍細胞由来 DNA のみか、正常組織由来 DNA を含めたものか検討することができる。そして、臨床にこのモニタリング方法を応用する場合、血漿中 DNA を腫瘍細胞由来 DNA として代用できるかどうか、その妥当性を推察することができる。

(3) 一方、悪性腫瘍患者の血漿中 cell-free DNA は健常者と比較して量が多いだけでなく、integrity が高いという報告がなされている。Integrity とは完全、無傷であるという意味であるが、ここでは、分解された DNA が、より長い断片として保たれているということを示す。正常組織における細胞死は主としてアポトーシスによるもので、この過程で DNA は規則な短い DNA 断片 (180bp) に分断される。一方、腫瘍組織の細胞死は主に壊死 (necrosis) によるものである。この場合、DNA は腫瘍細胞に含まれる数種類の DNA 分解酵素の作用により、不規則に、かつ不完全に分解される。この結果、DNA は様々な長さの DNA 断片になる。cell-free DNA integrity は長い DNA (300~400-bp) 断片と DNA 総量の比率として表される。悪性腫瘍患者の血漿中 cell-free DNA integrity が、健常者対照群と比較して上昇しているという報告がある。このことは、上記のように、腫瘍組織の細胞死がおもに壊死 (necrosis) であり、長い DNA 断片が生じることと合致しており、悪性腫瘍患者血漿中の cell-free DNA が腫瘍組織由来であることを裏付ける。

(4) 本研究の結果、血漿中 DNA 値の定量が、個々の腫瘍の放射線感受性を、放射線治療開

始早期より予測する有効な手段となると予想される。この研究結果を応用することで、治療の継続、あるいは追加治療や手術の導入などの治療方針の変更を科学的根拠に基づいて行うことができる。さらに、1 から数回目の治療後に腫瘍の放射線への反応を確認し、最終線量を決定するという、個々の腫瘍の反応にあわせた線量や照射法の決定の可能性も生まれてくる。これは癌治療の個別化による治療成績の向上をもたらす、意義のない放射線被曝の回避につながる。また、一連の放射線照射による腫瘍崩壊の病態、ダイナミズムを明らかにすることにより、新たな治療法の開発の可能性に貢献する。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍モデルマウスの作成と放射線照射、DNA 抽出、腫瘍の放射線感受性評価

① 腫瘍モデルマウスの作成: SQ5 細胞 (ヒト肺扁平上皮癌) および A549 細胞 (ヒト肺腺癌細胞) を用いた。細胞数 $2.5 \times 10^6 / 100 \mu$ l PBS を 7 週齢の免疫不全雌マウスの下腿に皮下注射し、移植 10 日後、腫瘍が直径 8-10mm 前後に成長した時点で照射を行った。

② 実験方法

②-1 放射線照射: 日本動物高度医療センター、夏堀雅宏・連携研究者の協力を仰ぎ、同施設の 4MV リニアックを用いて照射を行った。マウスの腹腔内に麻酔薬を注入し、照射台に固定した。マルチリーフコリメーターを絞り、下腿の正常組織のブロックを適切に行い、腫瘍のみに放射線が照射されるように工夫した。線量は 0Gy (コントロール)、15Gy、22.5Gy とし、一回照射を行った。

②-2 経時的採血: マウスの尾静脈より少量の血液 (40μ l) を抗凝固剤 (EDTA) を塗布したヘマトクリット採血管を使い採取した。採血は照射前 (day 0) および照射後 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 日に施行した。採血後、遠心分離により血漿を得た。

②-3 血漿中 cell-free DNA の抽出: 40μ l の血液を 100μ l PBS で希釈し、二回遠心後 100μ l 血漿液を得た。QIAamp DNA Blood Micro Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し最終溶出量を 20μ l/BE buffer とした。

②-4 血漿中 cell-free DNA の PCR による定量: 機器は ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems)、増幅酵素は TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) を用いた。反応液量は 25μ l とした。

Primer/probe sets: 腫瘍細胞由来 DNA (=ヒト特異的 DNA) の増幅にはヒト特異的 β -actin genomic DNA を、カスタム合成した primer/probe セットを、非腫瘍細胞由来 DNA (=宿主正常細胞由来、マウス特異的 DNA) には

TaqMan Gene Expression Assay mouse β -actin Mm00607939_s1 (Applied-Biosystems)を用いた。両者の間に交差反応がないことを確認した。使用した血漿量から血漿量 1ml あたりの DNA 量を算出した。PCR は一サンプルについて 3 回施行し、その平均値を採用した。

③ 統計学的解析

有意差検定は Mann-Whitney U test および Kruskal-Wallis test、相関係数: Pearson および Spearman test を用いた。照射効果は照射後、経時的に腫瘍径を計測することによって判定した。

(2) 放射線治療をうける悪性腫瘍患者の血液サンプルの血漿中 cell-free DNA の解析
2010 年 4 月、当大学附属病院倫理委員会において本研究の実施について承認をえた。(研究名 血漿中 DNA 定量による悪性腫瘍の放射線治療効果予測、臨床検体を用いた検討) 対照は、遠隔転移がなく、放射線治療の照射部位に病変がすべて含まれる根治治療症例とした。患者さんにインフォームドコンセントを行い、血液検体を採取した。2010 年 8 月から 2011 年 4 月まで、頭頸部癌 17 名、子宮頸癌 4 名、計 21 名の患者さんのご同意が得られ、採血を行った。採血は放射線治療前、開始後 3 日、以後一週間に 1-2 回、放射線治療が終了するまで継続した。なるべく临床上必要な定期検査(通常は週に 1-2 回行われる)にあわせて採血を行った。しかしながら、現在までの臨床検体を用いた実験および動物実験の結果では照射後 12-72 時間後には血漿中 DNA の上昇が認められるため、照射開始後 24-72 時間後の採血にご協力いただいた。静脈より少量の血液を、抗凝固剤を含む採血管に採取した。一回の採血量は 1ml 程度で十分であった。遠心分離により血漿を得て、解析まで冷凍保存をした。DNA の抽出は血漿 400 μ l を用い、Promega 社 Maxwell 16 DNA 自動抽出装置と試薬 LEV blood DNA kit を用いた。定量的 PCR には蛍光標識 probe(applied biosystem 社)と primer を用い、ヒト特異的コントロール遺伝子 (beta-actin) を定量した。Parimer は二種類用意し、100bp と 400bp の二種類の DNA を定量した。
機器は Qiagen 社の Roter-geneQ、増幅酵素は QuantiTect Probe PCR Master Mix を使用した。使用した血漿量から血漿量 1ml あたりの

DNA 量を算出した。PCR は一サンプルについて 3 回施行し、その平均値を採用した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍モデルマウスの血漿中腫瘍特異的 cell-free DNA

① SQ5 および A549 細胞腫瘍マウスの腫瘍の成長は一時的に抑制され、再び増大傾向に転じた(図 1)。SQ5 細胞移植マウスでは、腫瘍細胞特異的 DNA は照射後 12-72 時間以内に一時的に上昇、その後、減少し、再び増加するパターンが認められた(図 2)。照射を行わなかった腫瘍マウスと比較して、照射したマウスの腫瘍細胞特異的 DNA の照射後の増加傾向は緩慢であった。0Gy, 15Gy, 22.5Gy の各線量において、放射線照射後の腫瘍体積および血漿中腫瘍特異的 DNA の経時変化が、連動していた(図 1, 図 2)。最終観察日(照射後 21 日目)の腫瘍体積、腫瘍が 500mm³になるまでに要する日数、腫瘍特異的 DNA 量は照射線量によって有意差があった。

SQ5 細胞移植マウスは個々のマウスにおいて、最終観察日の腫瘍特異的 DNA 量と、同時期の腫瘍体積および腫瘍体積が 500mm³になるまでに要する日数を比較したところ、それぞれ相関関係が認められた。腫瘍の大きさと血漿中 DNA の変化が連動しており、放射線照射による抗腫瘍効果を反映している可能性があった(図 3)。

一方、A549 細胞移植マウスは、最終観察日(照射後 21 日目)の腫瘍体積は線量によって有意差が認められた。しかし腫瘍細胞特異的 DNA は腫瘍が増大しても低いままでほとんど変化しなかった。SQ5 とは 20 倍の差がみとめられた。

② SQ5 細胞移植マウスには、照射直後数日以内に腫瘍特異的 DNA が急激に増加するピークがあり、最高で照射直前の DNA の 16 倍まで上昇した。照射直後に急速な腫瘍崩壊がおき、腫瘍細胞 DNA が血中に大量に逸脱するためと考えられた(図 4)。22.5Gy 照射群では 15Gy 照射群に比べて、腫瘍特異的 DNA 値の急激な上昇(ピーク)を示す例が多かった。ピークの値と最終観察日(day21)の腫瘍体積の間には、明らかな相関関係は認められなかった。以上に対し、非腫瘍細胞由来 DNA (=宿主正常細胞由来マウス特異的 DNA)はほとんど変動しなかった(図 4)。

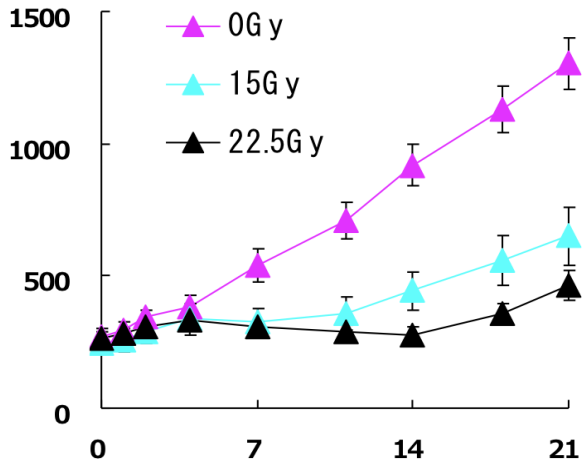


図1 SQ5 細胞移植マウスの照射後の日数(日)と腫瘍体積(mm³)の関係

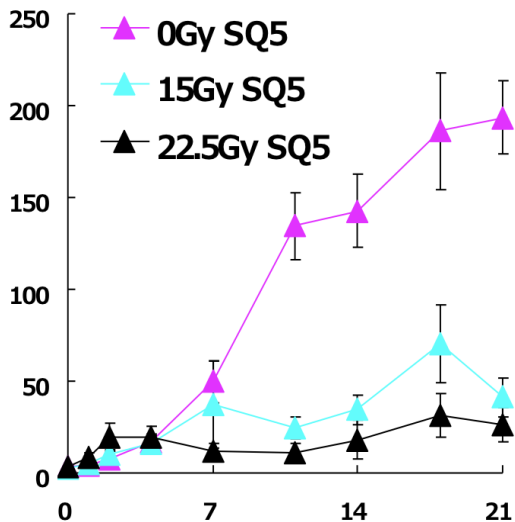


図2 SQ5 細胞移植マウスの照射後の日数(日)と腫瘍細胞特異的 DNA 量(pg/μl)の関係

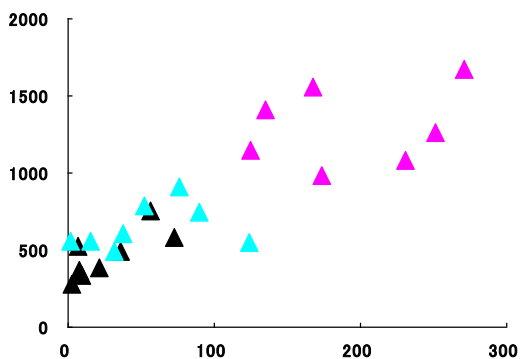


図3 個々のマウスの解析
SQ5 細胞移植マウスの照射後 21 日目の腫瘍細胞特異的 DNA 量(pg/μl)と腫瘍体積 (mm³) の関係
▲ (黒) 0Gy ▲ (水色) 15Gy ▲ (ピンク) 22.5Gy

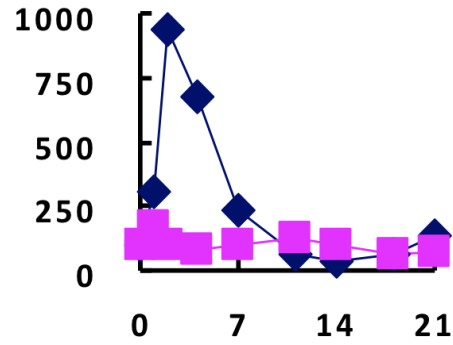


図4 22.5Gy 照射を行った SQ5 細胞移植マウスの照射後の日数(日)と腫瘍細胞特異的 DNA 量(pg/μl)の関係 ◆ 腫瘍細胞特異的 DNA ■ マウス特異的 DNA

③ まとめ

ヒト腫瘍モデルマウスにおいて、血漿中腫瘍特異的 cell-free DNA の経時的定量は、腫瘍モデルマウスの放射線照射後の腫瘍体積を反映し、放射線照射効果のモニタリングに利用できる可能性がある。

(2) 臨床サンプルの血漿中 cell-free DNA

2011 年 4 月に 21 症例のサンプルの収集を終了し、11 月に DNA 抽出を終了した。症例 8 は収集後に対象外であることが判明し、症例 19 は途中で治療が中止されたため、解析対照から除外した。症例 10, 14 は 400bpDNA がほとんど増幅されなかった。DNA 量は個人によって差が大きいため、絶対値の比較ではなく治療前の DNA 量を 100%としたときの比として表示した。治療終了時の DNA 量が治療前と比較して低下したもの(100%>)であるものは 100bp 6/19 例(32%)、400bp11/17 例(65%)であり 400bp のほうが多く認められた。腫瘍の放射線治療効果の解析と比較しなければ明らかではないが、少なくとも 400bp のほうが腫瘍体積を反映している可能性が高かった。これは腫瘍組織の細胞死がおもに壊死(necrosis)であり、長い DNA 断片が生じることと合致していた。治療開始後に認められる一時的な DNA 上昇は 100bp16/19 例(84%)に 400bp11/17 例(82%)に認められた。ピーク時の平均 DNA 量(%)は、100bp では 179.8% 400bp では 177.9%、ピークを示す治療開始後の平均日数は 100bp では 9.7 日、400bp では 11.8 日であった。8 割の症例で照射開始後数日以内に、患者血漿中の血漿中 DNA が増加した後、漸減した。これは腫瘍細胞の崩壊、減少、消失に伴う変化と考えられた。今後、治療終了後一年後の治療効果を観察し、患者血漿中 cell-free DNA の変化、DNA integrity、

ピークの有無との比較を行う予定である。
結果は下記表参照。

番号	観察最終日の 100bp DNA(%)	100bpのpeak (%)	治療開始から peakまでの日数
1	70.5	291.6	3
2	62.6	139.6	17
3	79.1	148.8	7
4	302.1	269.0	27
5	157.8	165.8	9
6	84.7	125.3	6
7	131.7	123.6	5
8	NA	NA	NA
9	107.8	136.7	7
10	142.0	172.4	6
11	61.3	191.4	4
12	134.3	peakなし	peakなし
13	195.2	261.2	5
14	123.1	388.9	13
15	106.0	146.8	10
16	55.0	peakなし	peakなし
17	137.6	123.7	7
18	131.3	peakなし	peakなし
19	NA	NA	NA
20	131.4	175.4	7
21	141.1	128.3	15

番号	観察最終日の 400bp DNA(%)	400bpのpeak (%)	治療開始から peakまでの日数
1	60.9	182.9	10
2	68.5	148.8	7
3	151.7	201.9	4
4	170.9	255.3	41
5	60.6	158.4	34
6	82.3	114.9	6
7	59.4	109.6	8
8	NA	NA	NA
9	64.5	148.8	4
10	NA	NA	NA
11	72.7	329.6	4
12	101.1	210.8	7
13	97.1	127.7	20
14	NA	NA	NA
15	57.3	peakなし	peakなし
16	5.5	peakなし	peakなし
17	132.8	181.2	7
18	30.2	peakなし	peakなし
19	NA	NA	NA
20	268.2	221.8	7
21	54.5	103.7	5

治療開始時 (day=0) の DNA 量を 100%とした比で表示。peak は治療開始後もっとも高い DNA 量を示した時点。NA=not available

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy. Chao Cheng, Motoko Omura-Minamisawa, Yun Kang, Takamitsu Hara, Izumi Koike and Tomio Inoue. Cancer

Science 査読あり 100(2)2009 303-309 2009

[学会発表] (計 2 件)

①Tumor specific cell-free DNA in plasma of tumor bearing mice reflects antitumor effects of radiation. Chao Cheng, Motoko Omura, Masahiro Natsuhori, Yun Kang, Takamitsu Hara, Izumi Koike, Masaharu Hata, Tomio Inoue. American Society for Radiation Oncology 52th Annual Meeting. 2010 年 11 月 1 日、アメリカ、サンディエゴ
② 程 超, 大村 素子, 夏堀 雅宏, 康 芸, 原 孝光, 小池 泉, 幡多 政治, 井上 登美夫 腫瘍に対する放射線治療効果を血漿中腫瘍細胞DNAの経時的定量によって判定する 日本放射線腫瘍学会第22回学術大会、2009年9月16日~18日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 素子 (OMURA MOTOKO)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：70244506

(2) 研究分担者

幡多 政治 (HATA MASAHARU)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：60285145

小池 泉 (KOIKE IZUMI)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号：00295495

井上 登美夫 (INOUE TOMIO)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：80134295

市川 靖史 (ICHIKAWA YASUSHI)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70254208

光藤 健司 (MITUSDOU KENJI)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号：70303641

康 芸 (YUN KANG)
医学研究科・放射線医学・特任准教授
研究者番号：60332607

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

程 超 (Chao Cheng)
横浜市立大学・医学部・客員研究員

夏堀 雅宏 (Masahiro Natsuhori)
日本動物高度医療センター