

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17631

研究課題名（和文）食道癌におけるリキッドバイオプシーを用いた手術回避を目指した治療開発

研究課題名（英文）Monitoring tumor burden using cell free tumor DNA during neoadjuvant chemotherapy followed by esophagectomy in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

松田 諭（MATSUDA, SATORU）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30594725

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：食道癌において血中circulating tumor DNA(cfDNA)は術前化学療法に対する奏効を鋭敏に反映することが示され、また再発予測因子としても有用であることが示唆された。本研究において開発された手法は、原発巣と血液を照合して一致した遺伝子変異のみをctDNAと診断しており、腫瘍由来のctDNAを正確に反映する指標として有用であると考えられる。今後、食道癌治療において、ctDNAによる腫瘍モニタリングを用いた集学的治療の実現が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌におけるctDNAを用いた腫瘍モニタリング手法の有用性が示された。本手法により、食道癌治療経過における腫瘍量を鋭敏に把握することは、手術回避が可能な治療著効例の同定や、術後補助化学療法が必要な患者の選定に有用であると考えている。

研究成果の概要（英文）：In order to guide appropriate treatment strategy including adjuvant therapy and organ preservation approach, an accurate tumor monitoring modality which sensitively reflects tumor burden during neoadjuvant treatment is required for esophageal squamous cell carcinoma. In this study, we aimed to investigate the clinical utility of circulating tumor DNA (ctDNA) in plasma during neoadjuvant chemotherapy (NAC) followed by esophagectomy. The current study showed that ctDNA reflected response to NAC.

The ctDNA was shown to be a promising biomarker to monitor tumor burden during NAC followed by surgery in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). The validation with expanded cohort would facilitate the individualization of multidisciplinary treatment for ESCC based on the ctDNA.

研究分野：食道癌における集学的治療

キーワード：食道癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌に対しては、術前化学療法[シスプラチン+5FU(CF療法)]と手術を併用した集学的治療の開発が進み治療成績は向上している(Ando N et al. Ann Surg Oncol. 1;68-74,2012)。申請者はJapan clinical oncology group (JCOG)においてCF療法にドセタキセル療法を加えたDCF療法の有効性を検証するためのランダム化第3相試験を行っている(Nakamura K et al. Jpn J Clin Oncol.7:752-755,2013)。DCF療法は高いpCR率(20-30%)が見込まれる。pCR群の予後が大変良好であることは過去に報告されており、**pCRを術前に同定することができれば、侵襲の高い食道切除術を回避することが可能**である。しかし、現行のCT、内視鏡検査を用いた評価では微小残存腫瘍の有無の判断は困難である。

一方で、有効な治療であるものの、依然として同治療に抵抗性を有する患者は存在する。手術回避率を上げるためには、術前化学療法のさらなる奏効率向上が望まれている。本研究課題における**2つ目の問いは、「食道癌術前化学療法に対する薬剤耐性の機序」**である。申請者はこれまで、食道癌患者の炎症・凝固マーカーに着目し、術前治療の奏効ならびに予後予測因子の有用性を報告してきた。さらに、細胞老化、TGFに関する研究を通して、TGFによって癌細胞に引き起こされる細胞老化が薬剤耐性を誘導することを確認している。細胞老化は、細胞増殖が長期的に停止した細胞であり、細胞周期依存性に効果を発揮する既存の薬物は効果が乏しい。さらに申請者は、癌に細胞老化が生じた場合、そこから離脱し、増殖を再開する細胞があることを既に報告しており(Tajima K, Matsuda S, et al. Nat Commun.10:2854,2019)、薬物療法耐性の誘因となり得ると考えている。

## 2. 研究の目的

目的 : リキッドバイオプシーによるpCRの術前予測

食道癌に対する本邦の現在の標準治療は術前CF療法、欧米では化学放射線療法であり、今回対象としている術前DCF療法は、それらを凌駕する大変有望な新規治療である。pCR率が高いが、その術前予測は現状困難であり、それをリキッドバイオプシーをもちいて術前に行う試みは臨床的有用性が高い。またその方法として、施設で全例に行っている遺伝子パネル検査を用いて患者毎に追跡するDNA変異を設定し、血中cell free DNA(cfDNA)をdroplet digital PCR(ddPCR)を用いて検出する方法は、cfDNAを用いた次世代シーケンサーによる解析と比較して安価かつ感度も高いため、患者個別化医療として創造性も高いものと考えている。

目的 : 食道癌における多剤併用療法の耐性メカニズムの解明および新規治療開発(細胞老化仮説、ならびに薬剤耐性株を用いたドラッグスクリーニング)

薬物療法耐性に関する検討は過去に広く行われているが、新規治療であるDCF療法に対する機序の解明を目的とした研究は非常に少ない。方法として、原発巣のRNAシーケンズを用いた網羅的アプローチに加えて、申請者のこれまでの研究テーマである癌細胞における細胞老化が薬剤耐性に関与しているという仮説を検証する。申請者はすでに、TGF、低酸素が細胞老化を介して薬物療法抵抗性を示すということを確認している。さらには、薬剤耐性株樹立後に約1200の既存薬剤を用いたHigh throughput drug screening(Okazaki S et al. Oncotarget. 9:33832-43.2018, 慶應義塾大学病院 臨床研究推進センター)により新規有効薬剤を選別することを予定しており、創造性の高いアプローチとなると見込んでいる。また、申請者が所属する慶應義塾大

学病院は、「がんゲノム医療中核拠点病院」指定を受け、2018年より全固形癌患者を対象として遺伝子パネル検査を行っており、化学療法の奏効と治療前の遺伝子変異データを統合解析することも独自に可能である。(倫理委員会承認番号：20180015、課題名：次世代統合的病理・遺伝子診断システムの開発「網羅的遺伝子解析と形態学的病理診断を同時並行して実施し、次世代型の統合的ながんの診断システムを開発する研究」)

### 3. 研究の方法

目的 -1. 食道癌術前化学療法前の原発巣検体の DNA 変異に基づき ddPCR を用いて治療前後の cfDNA を定量する。

治療前の食道癌検体を用いた遺伝子パネル検査(慶應義塾大学病院として実施中のため本課題の資金は不要)にもとづき、cfDNA で追跡するターゲット変異を定める。術前治療前後の血清から cfDNA を抽出し、ddPCR を用いて cfDNA を定量評価する。

目的 -2. 病理学的奏効と cfDNA の変化の関連を検討する。

cfDNA の変化と術前治療の奏効ならびに、病理学的奏効との関連を検討することにより、cfDNA が術前に病理学的奏効を予測し得るかを明らかにする。食道癌組織検体、血清使用については、慶應義塾大学医学部倫理委員会承認を経て、すでに収集を開始している。

目的 -1. 術前化学療法前後の臨床検体、ならびに治療耐性株を用いた網羅的解析および High throughput drug screening システムを用いた新規治療薬剤の同定

術前化学療法前後の食道癌検体から RNA を抽出し、RNA sequence を用いて発現遺伝子の変化を捉える。Gene set enrichment analysis によって発現が変化した Gene set を特定し、メカニズムを同定する。あわせて、食道癌細胞株を用いて DCF 療法耐性株を樹立し、耐性獲得前後における RNA 発現変化を臨床検体と比較する。すべての食道癌患者に対して詳細な治療効果・予後を含む詳細な臨床データならびに遺伝子パネル検査を用いた遺伝子変異データが使用可能であり、臨床・ゲノムデータとの関連も検討する。さらに、耐性株に対するあらたな有効薬剤の直接的な同定手段として、DCF 療法耐性株に対して先述した High throughput drug screening system を用いて、抵抗株への新規治療薬剤を同定する。

目的 -2. 「低酸素、TGF によって誘導された Senescence が治療抵抗性を惹起している」という仮説にもとづいた薬剤抵抗性メカニズムの解明

申請者はすでに *in vitro* において、低酸素下において TGF が食道癌細胞株に細胞老化を惹起し、薬物療法抵抗性を獲得させること確認している。この結果を食道癌患者検体で証明するために、術前化学療法前後の患者検体を用いて、治療の奏効と細胞老化の指標(ガラクトシダーゼ、CDKN2A、P16)を TGF シグナル(リン酸化 SMAD2/3)と併せて評価することで関連を明らかにする。さらには、治療前後検体の RNA sequence を行うことで発現遺伝子の変化を捉え、細胞周期、DNA 修復等の細胞老化関連遺伝子発現の変化を検証する。

### 4. 研究成果

cfDNA 解析について、当初は研究計画に基づいて ddPCR の手法に取り組んだが、対象となる変異が多岐に渡り、ターゲットを絞った解析となってしまう ddPCR は適さないと判断した。そこで、次世代シーケンサーを用いた解析に変更し、研究を遂行した。さらに、当初 cfDNA と称していたターゲットは、腫瘍由来の遊離核酸に焦点を当てる意図から circulating tumor DNA

(ctDNA)と改称して研究を行った。

血中 ctDNA 評価のための次世代シーケンサーを用いた ctDNA パネルには、Roche diagnostics の AVENIO expanded kit を用いていた。本手法は、血液中の cfDNA を収集後、77 遺伝子をターゲットとしてシーケンスを行い、cfDNA 中の癌に由来する遺伝子変異の頻度を算出する手法である(Newman AM, et al. Nat Med 2014)。2019 年に慶應義塾大学医学部倫理委員会より承認を取得後、30 検体以上の解析を終えた。ctDNA 解析には、Chromal hematopoiesis(CH)による正常白血球等に存在する病的変異が混入することで、腫瘍による遺伝子変異との識別が困難である

図 1

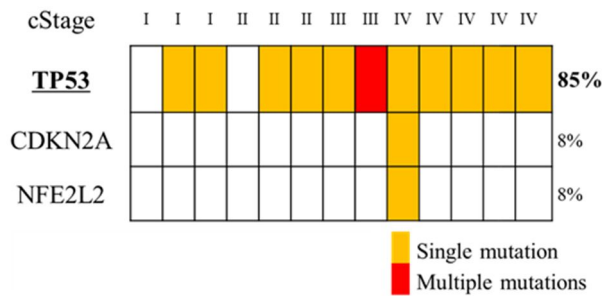
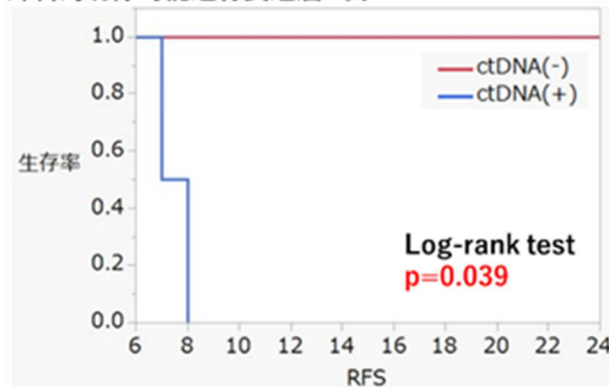


図 2

外科的切除可能進行食道癌 6例



という問題がある。その直接的な識別方法として、血中 cfDNA と腫瘍の遺伝子変異を独立して評価し、合致したものを ctDNA と定義する手法の開発を進めた。原発巣の変異プロファイル評価には、複数癌腫でドライバー遺伝子として報告されている 160 遺伝子対象とした PleSSision rapid パネルを用いており、既に ctDNA の解析が終了した 13 例の術前化学療法前の血液検体において、検出された ctDNA プロファイルは、図 1 の通りであった。いずれも、食道扁平上皮癌の原発巣に存在する変異として矛盾しない結果を得ることができた。また、ctDNA が腫瘍量を反映することを検証すべく、術後の ctDNA と早期再発の関係も検討した。結果として、術後 ctDNA 陽性は術後再発の鋭敏な予測因子である可能性が示唆された(図 2)。

細胞老化と薬剤耐性に関する検討に関しては、食道扁平上皮癌細胞株に対して、

DCF 療法を間欠的に継続し耐性株を樹立することに成功した。そして、既存の薬剤 1200 種類を含むパネルのうち 300 化合物を 2 種類の DCF 耐性株に対して、DCF とあわせてスクリーニングを行った結果、12 種類の薬剤が細胞株横断的に効果を示したことを確認することができた。

本研究において、ctDNA が食道扁平上皮癌において鋭敏に腫瘍量を反映することが示された。今後、病理学的奏効と ctDNA の変化について検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Matsuda Satoru, Kawakubo Hirofumi, Okamura Akihiko, Takahashi Keita, Toihata Tasuku, Takemura Ryo, Mayanagi Shuhei, Hirata Kenro, Irino Tomoyuki, Hamamoto Yasuo, Takeuchi Hiroya, Watanabe Masayuki, Kitagawa Yuko	4. 巻
2. 論文標題 Distribution of Residual Disease and Recurrence Patterns in Pathological Responders After Neoadjuvant Chemotherapy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SLA.0000000000004436	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本洋輔, 松田諭, 川久保博文, 四十物絵里子, 中村康平, 入野誠之, 福田和正, 中村理恵子, 西原広史, 北川雄光
2. 発表標題 食道癌集学的治療における血中cell free DNAを用いた腫瘍モニタリングの有用性
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------