

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：82685

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861145

研究課題名(和文)放射線治療後の血漿中腫瘍由来DNA増加を利用した癌診断・薬剤感受性解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a cancer diagnosis method using DNA increase derived from plasma tumor after the radiation therapy

研究代表者

影山 俊一郎 (Kageyama, Shun-ichiro)

東京都立駒込病院(臨床研究室)・その他部局等・その他

研究者番号：60644979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では癌組織に対する放射線照射により血中の腫瘍由来DNAを2倍～30倍程度に増加させること可能であった。また、増加させるために必要な放射線線量は必要な線量はおよそ18 Gy/6fr～12.5Gy/1fr程度、必要とされる時間は照射後24時間～72時間程度であることが明らかとなった。この条件は日常診療で行われる緩和的放射線治療を行う際に照射部位のgenotypeが非侵襲的に考察可能となることを示しており、その後の治療法選択の有力なオプションとなり得る。

研究成果の概要(英文)：It was possible in this study to increase DNA derived from blood tumor to 2 times - around 30 times by the radiation exposure for the cancer tissue.

Our result indicate that cfDNA analysis after palliative radiation therapy could provide genotype informatin in radiotherapy treated cite tumor.

Cf DNA analysis after radiotherapy would be potential option in future cancer therapy.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 cfDNA 遺伝子診断

## 1. 研究当初の背景

- (1) 研究立案時(2012年) cell free DNA (cfDNA)の解析は digital PCR を用いた解析がほとんどでシーケンスベースの結果は報告されていなかった。また、シーケンス解析を行うためには 500ng の DNA が必要とされていた。
- (2) 臨床検体の集積が終了し、解析を開始した 2015 年 7 月時点では断片化 DNA の解析には最低 10ng の DNA があれば target sequence が可能であり、cfDNA を用いたシーケンス解析の結果も報告され始めた。一方で I 期、II 期の早期、治療中の IV 期では cfDNA 量が少なく、依然としてシーケンス解析が困難である。

## 2. 研究の目的

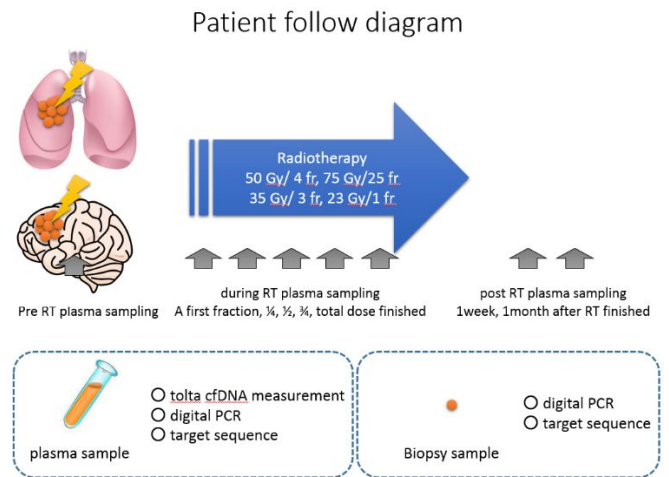
- (1) 本研究では放射線治療が腫瘍組織にアポトーシスを誘導し、血漿中の cfDNA を増加させることを証明する。
- (2) 放射線が血漿中に腫瘍由来の cfDNA を増加させるのに必要な放射線量、照射後の経過時間を明らかにする
- (3) 放射線照射により増加した cfDNA を用いて癌診断、薬剤感受性・抵抗性のための遺伝子診断を行う

## 3. 研究の方法

2013 年 7 月から 2015 年 7 月までに原発性非小細胞肺癌と診断され放射線治療単独での治療方針となり、本試験に同意された症例を対象とした。

放射線治療前の患者血漿を標準とし、放射線治療後に照射開始後 1 日後から照射終了 1 週間後にかけて継続的に採血を行

い、血漿中の遊離 DNA を回収し、DNA 総量、癌由来の変異 DNA を digital PCR, 次世代シーケンサーを用いて解析した(下概念図)。



## 4. 研究成果

- (1) 2013 年 7 月から 2015 年までの登録症例として臨床病期 I-II 期肺非小細胞癌への根治的放射線治療症例 (SBRT: Stereotactic Body Radiation Therapy) 11 例、脳転移に対する脳定位照射症例 6 例が登録された (table 1.)。それぞれの症例に対して放射線治療を行い、治療前から治療後にかけての採血検体を回収した。

Table.1 Clinical characteristics of patients

case	age	gender	TNM	cStage	biopsy	histology	EGFR mutation	Radiation
case 1	70F		T1bN0M0	IA	-	ad	N.D.	75Gy/25fr
case 2	90M		T2aN0M0	IB	+	ad	L858R	75Gy/25fr
case 3	84M		T1aN0M0	IA	-	ad	N.D.	75Gy/25fr
case 4	84F		T2aN0M0	IB	+	ad	N.D.	75Gy/25fr
case 5	73F		T1aN0M0	IA	-	ad	Wild	50Gy/4fr
case 6	91F		T1aN0M0	IA	-	ad	N.D.	50Gy/4fr
case 7	85M		T2aN0M0	IB	+	ad	N.D.	50Gy/4fr
case 8	73F		T2aN0M0	IB	+	NSCLC	N.D.	50Gy/4fr
case 9	67M		T1aN0M0	IV	-	ad	N.D.	50Gy/4fr
case 10	83M		T1aN0M0	IA	+	ad	N.D.	50Gy/4fr
case 11	85F		T1aN0M0	IA	-	ad	N.D.	45Gy/4fr
case 12	63F		T2bN0M1b (BRA)	IV	+	adsq	exon 19 del.	35Gy/3fr
case 13	40M		T4NxM1b(PUL, OSS, BRA)	IV	+	ad	exon19 del.	35Gy/3fr
case 14	52M		T1aN3M1(BRA, PUL)	IV	+	ad	T790M	23Gy/1fr
case 15	71M		T3NxM1b(PLU, BRA, OSS, HEP, SPL)	IV	+	ad	L858R	23Gy/1fr
case 16	45M		T2aN3M1b(OS, S, BRA, HEP)	IV	+	ad	L858R	23Gy/1fr
case 17	84F		T3N2M1b(BRA)	IV	+	NSCLC	exon 19 del.	23Gy/1fr

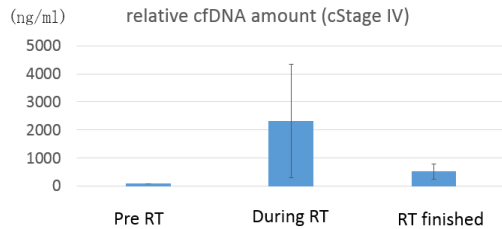
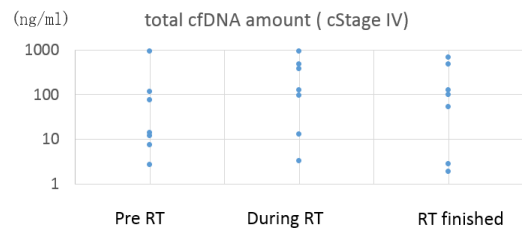
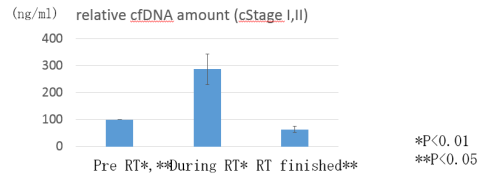
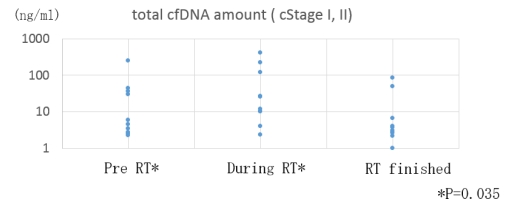
(2) 次に全 17 症例の血液検体から血漿を分離し、Maxwell® Rapid Sample Concentrator を用いて cfDNA を単離し、収量を測定した。このうち 12 症例で放射線治療後の cfDNA 増加を認めた(下図)。

Serial measurement of plasma cfDNA during pre-, during, and post-radiotherapy monitoring



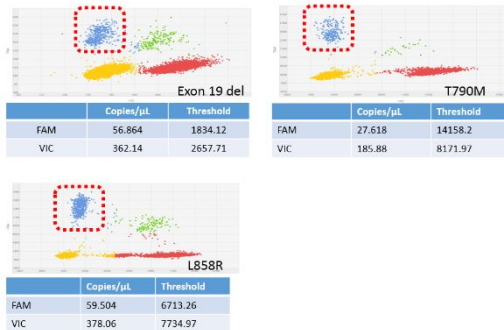
また、放射線治療前後で student-t 検定の結果、放射線治療により有意に血中の cfDNA を増加させることが可能であることが明らかとなった。

Comparison of total cfDNA amount with EGFR mutation and allele frequency.



(3) 次に放射線治療後の cfDNA を用いて癌特異的変異変異の検出を行った。Digital PCR により放射線治療前から治療後にかけて得られた cfDNA を用いて検出を行った。まずはじめに major mutation である exon 19 del., L858R, T790M 変異を測定できる probe 並びに実験系を positive control を用いて作成した(下図)。

## Detection of EGFR mutation



これを用いて臨床検体サンプルでの検出を行った結果、各検体で放射線治療後、total cfDNA の増加に一致して mutation の増加が確認された（下図、table 2.）。

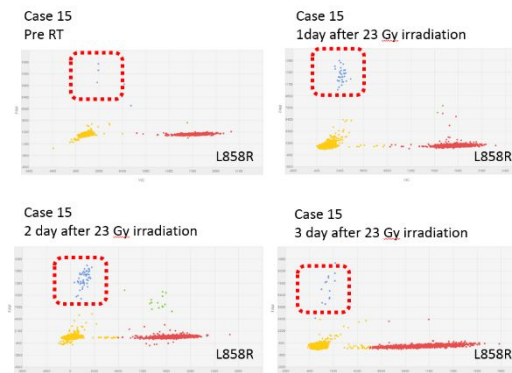


Table 2: Plasma level of mutant EGFR measured by digital PCR in four patients receiving radiotherapy.

Case No.	clinical diagnosis	copy number in pre RT (copy/ml)	copy number during RT (copy/ml)	alle frequency in pre RT	alle frequency during RT
case 2	L858R	0	10562	0	0.91
case 12	exon 19 del.	20866	139579	0.21	0.41
case 15	L858R	44194	363269	0.48	2.34
	T790M	0	40824	0	0.41
case 17	exon 19 del.	64282	2122718	0.55	6.38

## 【総括】

癌組織に対する放射線照射により血中の腫瘍由来 DNA を 2 倍 ~ 30 倍程度に増加させることが可能であった。また、増加させるために必要な放射線線量は必要な線量はおよそ 18 Gy/6fr ~ 12.5Gy/1fr 程度、必要とされる時間は照射後 24 時間 ~ 72 時間程度であることが明らかとなった。

これまで細胞レベルの研究では放射線照射後 24 時間 ~ 48 時間で癌細胞をアポトーシスへ誘導することが可能であることが報告されているが（1）、動物実験、実際の癌治療に用いられる放射線線量は異なり、放射線治療効果は動物実験、臨床上で大きく異なるとされていた（2）。

しかし、放射線照射直後の腫瘍組織サイズは炎症応答など様々な要因により修飾がかかるため、実際にどのような時系列で放射線照射が行われたあと、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するかについては不明であった。今回我々の研究で放射線照射後に引き起こされるアポトーシスは細胞レベルの知見と同様に照射後 24 時間 ~ 72 時間程度に生じることがあきらかとなった。これは放射線生物学において重要なデータとなる。

さらに必要な線量は日常診療で行われる緩和的放射線でも腫瘍由来 DNA を増加させることが可能であることを示しており、生検が困難な症例の生検代用として、緩和照射後の genotype 診断として今後有用となりえると考えられる。

本研究の当初予定として、cfDNA を用いたシーケンス解析、biopsy 検体との比較を予定したが時間の都合上施行できなかった。こ

れは本研究は前向き臨床研究として都立駒込病院で登録、IRB 承認の元で行ったため、プロトコール承認、IRB 通過、試験開始までに1年半を要したこと、登録集積に2年を要したことが原因であった。症例集積後の解析、結果は良好であり、今後はこれらの検体を用いたシーケンス解析を行い、放射線治療後の診断法として確立を行う。

< 引用文献 >

(1) Int J Mol Med. 2004 Jun;13(6):895-902

(2) J Dent Res. 2011 Mar; 90(3): 347-352

5. 主な発表論文等

Kageyama, S., Yamaguchi, S., Ito, S. et al.

Int Canc Conf J (2016).

doi:10.1007/s13691-016-0256-8

(学会発表)

第14回日本臨床腫瘍学会 2016年 7月

第53回がん治療学会 2015年 10月

第27回放射線腫瘍学会 2014年 12月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山俊一郎 (Shun-ichiro Kageyama)

都立がん・感染症センター駒込病院放射線診療科 非常勤医師

研究者番号: 60644979

(3) 研究協力者

唐澤克之 (Katsuyuki Karasawa)

都立がん・感染症センター駒込病院放射線診療科部長

研究者番号 80177617

二瓶圭二 (Keizi Nihei)

都立がん・感染症センター駒込病院放射線診療科医長

研究者番号: 30466205