

令和 元年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06902

研究課題名（和文）食道癌化学療法の早期効果予測マーカー開発による個別化化学療法の確立

研究課題名（英文）Prediction of susceptibility to anticancer agents by measuring the integrity of cell-free DNA circulating in the blood in patients with esophageal cancer

研究代表者

北原 正博（KITAHARA, Masahiro）

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：20610893

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000 円

研究成果の概要（和文）：2017年10月から2018年12月までに術前補助化学療法として5-FUとcisplatinによる薬物治療が開始された15人の切除可能進行食道癌患者の、初回化学療法前と、投与後3日目、投与後7日目の血液検体を用いて半定量real time PCRによりcfDNA integrityを測定した。化学療法により長鎖cell-free DNA量、短鎖cell-free DNA量に有意差を認めなかったが、integrityの低下を認めた。一方、組織学的治療効果とintegrityの変化を検討したが、有意な結果を得られなかった。プライマーの設定の更なる検討を行う必要が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌患者における術前化学療法の際には個別化したオーダーメイド治療を行う必要があるが、依然、化学療法の効果を十分に予測できるシステムは確立されておらず、効果予測マーカーの開発が切望される。特に治療開始前後の早い段階での効果予測マーカーを確立すれば、副作用や医療経済的な観点からも有用と思われる。今回治療介入後早期の血液検体においてcell-free DNA integrityに着目し病理組織学的効果との関連を検討したが有意な関連は認められなかった。しかしながら化学療法治療後早期に低下を認め他の治療効果予測マーカーと比較し、より鋭敏に治療反応する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The circulating cell-free DNA (cfDNA) in plasma is a candidate molecular biomarker for malignant tumors. Unlike uniformly trucked DNA release from apoptotic cells, DNA released from dead cancer cells varies in size. Plasma DNA integrity, the ratio of longer fragments to shorter DNA fragment, maybe clinically useful for detecting esophageal cancer progression. We included 15 patients with advanced esophageal cancer who had been treated with 5-FU and cisplatin as neoadjuvant chemotherapy between October 2017 and December 2018. The cfDNA integrity was measured by semi-quantitative real time PCR using blood samples before the chemotherapy, on the third day and on the seventh day after chemotherapy. There was no significant difference in the amount of long-fragment cfDNA or short-fragment cfDNA by chemotherapy, but a decrease in integrity was observed. On the other hand, changes in histologic treatment effects and integrity were examined but no significant results were obtained.

研究分野：医学

キーワード：食道癌 化学療法 cell free DNA バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

食道癌は世界でも頻度の高い癌であり、中高年の男性に多く発生する。その死亡率は高く、本邦男性のがん死亡率第6位であり、高齢社会である我が国では今後も増加が予測される癌腫である。手術可能な臨床病期、早期食道癌に対しては JCOG9907 の結果より術前 F P 療法 (cisplatin+5FU) による術前化学療法を行うことにより術後補助療法と比較して完遂率も高く、無再発生存期間、全生存期間とも術後補助化学療法より良好であることが証明された。しかしながら、一定数の患者は FP 療法による改善効果を認めるものの特に 早期食道癌ではその改善効果は乏しく、現在 DCF 療法 (docetaxel+FP) や術前化学放射線療法が施行されてきている。良好な治療成績が報告されているものの高率に有害事象も認め、治療関連死も確認されている。個別化したオーダーメイド治療を行う必要があるが、依然、化学療法の効果を十分に予測できるシステムは確立されておらず、効果予測マーカーの開発が切望される。特に治療開始前後の早い段階での効果予測マーカーを確立すれば、副作用や医療経済的な観点からも有用と思われる。

2．研究の目的

われわれは、癌患者で増加している末梢血中の cfDNA に着目し、下記の報告をしている。

【HCV 関連肝細胞癌】

(1) HCV 陽性肝細胞癌の遠隔転移規定因子としての cfDNA の測定意義 (Tokuhiisa Y, et al. Br J Cancer 2007)

(2) HCV 末梢血中の cfDNA をソースとしたメチル化 CCND2 が肝細胞癌治療切除後の予後予測因子となる (Tsutsui M, et al. Clinica Chimica Acta 2010)

【食道癌】

(3) cfDNA が良性疾患と比較し、有意に増加している (Tomochika S, et al. Experimental and therapeutic medicine 2010)

いずれも、治療開始前の cfDNA による診断が可能であった。癌特異性をもたせるためにメチル化遺伝子の解析等が有用だが、BIS 処理などの煩雑なステップや全ての症例に共通なメチル化異常はないため、より多くの症例において活用できる方策として integrity に着目した。

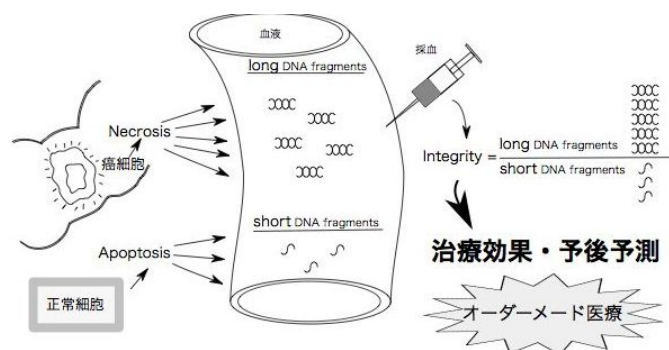
cfDNA において、短鎖と長鎖の比である integrity は、腫瘍のバイオマーカーとしての有用性が報告されている。正常細胞の apoptosis による cfDNA は、200bp 以下の短鎖であるのに対し、癌細胞由来の necrosis による cfDNA はそれよりも長鎖であることが知られている。

大腸癌では、integrity が腫瘍の同定に有効であることが報告されている (Umetani N, et al. Clin Chem. 2006)。また、直腸癌の術前化学放射線療法において、化学放射線療法後の integrity が病理的奏効率のマーカーとなることが報告されている (Marco A, et al. Ann Surg Oncol. 2011)。われわれも末梢血中の cfDNA integrity に着目し下記の報告をしている。

(4) 免疫療法効果予測バイオマーカーとしての血中 cell-free DNA integrity (Kitahara M, et al. Cancer Sci 2016)

本研究の目的は、食道癌における化学療法ではいまだ報告のない integrity を用いた予後・治療効果予測システムを構築し、オーダーメイド医療に役立てることを目指す (図1)。

図1 研究の概要図



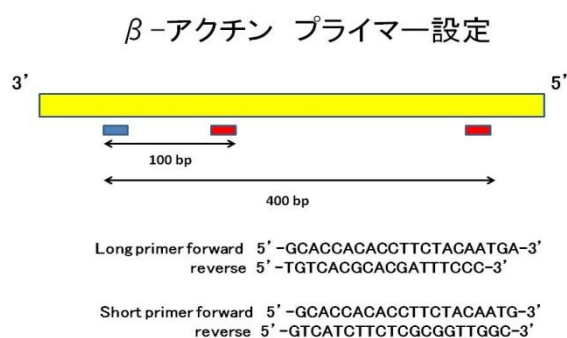
3. 研究の方法

食道癌化学療法患者において、まず、integrityを計測するのに十分なcfDNAを採取できるサンプリング条件の設定から開始する。cfDNAが安定して抽出できるようになれば、integrity測定方法を確認する。安定したintegrityの計測が可能となり、条件設定が完了したところで、症例の集積を開始する。症例の集積と同時にintegrityと治療効果の関連性を検討していく。

4. 研究成果

(1)DNAの抽出方法は10mlの全血を30分間室温でインキュベートし、遠心分離機で3000rpm、10分間円心分離し、血清を得た。QIAmp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)を用い、血清からcfDNAの抽出を行った。プライマーはターゲット遺伝子をハウスキーピング遺伝子である β -actinとした。長鎖・短鎖ともに同一のforward primerを設定し、それぞれ100bp、400bp程度となるようにreverse primerを設定した(図2)。

図2 プライマーの設定



(2)測定方法が確立した後に、2017年10月から2018年12月までに術前補助化学療法として5-FUとcisplatinによる薬物治療が開始された15人の切除可能進行食道癌患者の、初回化学療法前と、投与後3日目、投与後7日目の血液検体を用いて半定量real time PCRによりcfDNA integrityを測定した。

化学療法により長鎖cell-free DNA量、短鎖cell-free DNA量に有意差を認めなかったが、integrityの低下を認めた(図3)。一方、組織学的治療効果とintegrityの変化を検討したが、症例数が少ないこともあり、有意な結果を得られなかった(図4)。プライマーの設定の更なる検討を行う必要が示唆された。

図3 化学療法に伴う integrity の変化

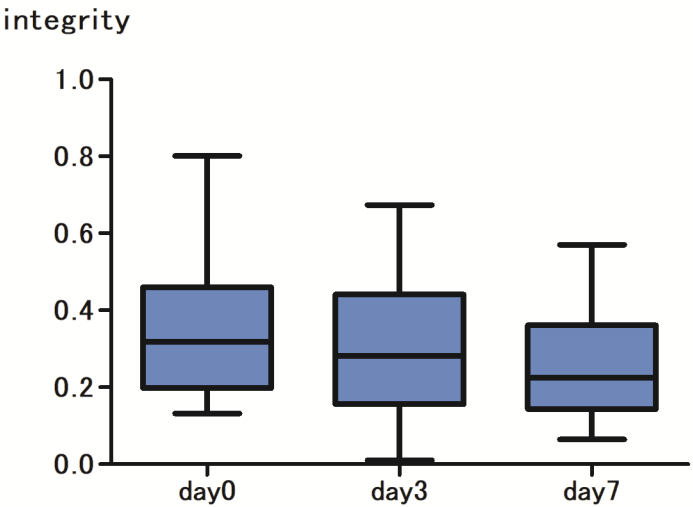
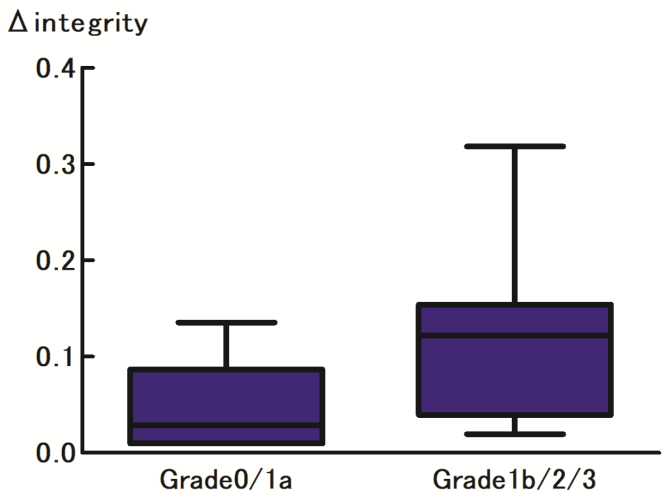


図4 化学療法に伴う integrity の変化率と病理組織学的治療効果



integrity と食道癌の腫瘍径・深達度、分化度、臨床病期といった臨床病理学的因子との間に有意な相関を認めなかった。Integrity が特異的な役割を担う結果は得られなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。