

平成30年6月28日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19856

研究課題名(和文)放射線治療と血漿中腫瘍由来DNAを組み合わせた新規癌診断法の確立

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)

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：60644979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究により放射線治療後、比較的早期(1-3days)に血中のcfDNA増加が生じること、増加するcfDNAは癌由来のDNAを含んでいること、放射線治療後の断片化したcfDNAでもdigital PCR解析、シーケンサー解析は可能であることが明らかとなった。cfDNA診断は国内でも2017年より保険承認がされており、今後盛んに行われていく。一方で多くの癌治療に併用される放射線治療が、このcfDNA動態にどのような影響を与えるかについて詳細に調べた最初の報告であり、意義の大きい報告であると考え。

研究成果の概要(英文)：We investigated the plasma levels of tumor-specific cell-free DNA (cfDNA) in 17 stage I-II (early) and IV (advanced) non-small cell lung cancer (NSCLC) patients who underwent radiotherapy. Digital polymerase chain reaction (PCR) and targeted sequencing showed that total and tumor-specific cfDNA levels increased in response to radiotherapy in both early- and advanced-stage NSCLC patients. We detected high copy numbers of epidermal growth factor receptor mutations (L858R and T790M) in the cfDNA samples from stage IV NSCLC patients who underwent stereotactic body radiation therapy to treat brain metastasis related to tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment failure. In conclusion, our study demonstrates that radiotherapy increases tumoral cfDNA levels in the plasma and shows potential to serve as an indicator for diagnosing drug-resistant tumor-related gene mutations in early-stage NSCLC patients or those undergoing molecular targeted therapy.

研究分野：放射線生物学

キーワード：cell free DNA radiation EGFR digital PCR sequence

1. 研究開始当初の背景

Cell free DNA (cfDNA)は癌細胞より血中に流出した DNA であり、これを用いることで生検と同程度に癌の診断、薬剤感受性予測に有効であることが知られている。一方で cfDNA の解析において、特に早期癌での感度、特異度が問題となっている。

我々は放射線治療が癌組織特異的に作用し、細胞死を誘導することに着目し、放射線治療が血中の癌由来 cfDNA を増加させ、遺伝子診断を行うことが可能ではないかという臨床仮説を立てた。

2. 研究の目的

放射線治療による血中 cfDNA 動態への影響を調べ、次世代シーケンサーによる遺伝子解析が可能かどうかを検証する。

3. 研究の方法

はじめに我々は当院にて前向き観察研究である「放射線治療後に生じる cfDNA 増加を利用した遺伝子診断法の確立」の研究計画を作成し、院内 IRB 承認の元、17 人の放射線治療対象患者より放射線治療前後の血漿検体を得た。今年度研究では新たに臨床試験を確立し、検体回収を行う予定であったが、本研究には放射線治療開始後より毎日の採血が含まれており、最初の IRB 申請は通過できたが、2 回目の試験申請時にはこの採血が軽微な侵襲とみなされず、新規の検体回収が困難であったため、1 回目の臨床試験検体のみを用いて解析を行った。

解析は大別して以下の 3 種類の解析を行った。

Promega maxwell を用いた cfDNA の単離、total cfDNA 量の測定

シールドチップ法を用いた digital PCR による cfDNA、癌由来の変異 DNA の絶対定量

次世代シーケンサーを用いた cfDNA の解析

4. 研究成果

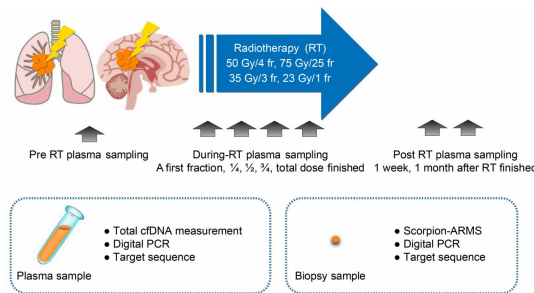


図 1. 研究概要

肺非小細胞癌患者に対する定位照射対象例に対し、放射線治療前～放射線治療中(day1, day2, day3, 終了時、終了後に採血を行い、解析を行った。

Tables⁺

Table 1. Clinical characteristics of NSCLC patients⁺

Case ⁺	Age/ Gender ⁺	TNM ⁺	Stage ⁺	Biopsy ⁺	Histology ⁺	EGFR mutation ⁺	Radiation dose ⁺
Case 1 ⁺	70/F ⁺	T1bN0M0 ⁺	IA ⁺	- ⁺	ad ⁺	N.D. ⁺	75Gy/25fr ⁺
Case 2 ⁺	90/M ⁺	T2aN0M0 ⁺	IB ⁺	+ ⁺	ad ⁺	L858R ⁺	75Gy/25fr ⁺
Case 3 ⁺	84/M ⁺	T1aN0M0 ⁺	IA ⁺	- ⁺	ad ⁺	N.D. ⁺	75Gy/25fr ⁺
Case 4 ⁺	84/F ⁺	T2aN0M0 ⁺	IB ⁺	+ ⁺	ad ⁺	N.D. ⁺	75Gy/25fr ⁺
Case 5 ⁺	73/F ⁺	T1aN0M0 ⁺	IA ⁺	- ⁺	ad ⁺	Wild ⁺	50Gy/4fr ⁺
Case 6 ⁺	91/F ⁺	T1aN0M0 ⁺	IA ⁺	- ⁺	ad ⁺	N.D. ⁺	50Gy/4fr ⁺
Case 7 ⁺	85/M ⁺	T2aN0M0 ⁺	IB ⁺	+ ⁺	ad ⁺	N.D. ⁺	50Gy/4fr ⁺
Case 8 ⁺	73/F ⁺	T2aN0M0 ⁺	IB ⁺	+ ⁺	NSCLC ⁺	N.D. ⁺	50Gy/4fr ⁺
Case 9 ⁺	67/M ⁺	T1aN0M0 ⁺	IV ⁺	- ⁺	ad ⁺	N.D. ⁺	50Gy/4fr ⁺
Case 10 ⁺	83/M ⁺	T1aN0M0 ⁺	IA ⁺	+ ⁺	ad ⁺	N.D. ⁺	50Gy/4fr ⁺
Case 11 ⁺	85/F ⁺	T1aN0M0 ⁺	IA ⁺	- ⁺	ad ⁺	N.D. ⁺	45Gy/4fr ⁺
Case 12 ⁺	63/F ⁺	T2bN0M01b (BRA) ⁺	IV ⁺	+ ⁺	ad ⁺ adsq ⁺	exon 19 del. ⁺	35Gy/3fr ⁺
Case 13 ⁺	40/M ⁺	T4NXM1b (PUL, OSS, BRA) ⁺	IV ⁺	+ ⁺	ad ⁺	exon 19 del. ⁺	35Gy/3fr ⁺
Case 14 ⁺	52/M ⁺	T1aN3M1 (BRA, PUL) ⁺	IV ⁺	+ ⁺	ad ⁺	T790M ⁺	23Gy/1fr ⁺
Case 15 ⁺	71/M ⁺	T3NXM1b (PUL, BRA, OSS, HEP, SPL) ⁺	IV ⁺	+ ⁺	ad ⁺	L858R ⁺	23Gy/1fr ⁺
Case 16 ⁺	45/M ⁺	T2aN3M1b (OSS, BRA, HEP) ⁺	IV ⁺	+ ⁺	ad ⁺	L858R ⁺	23Gy/1fr ⁺
Case 17 ⁺	84/F ⁺	T3N2M1b (BRA) ⁺	IV ⁺	+ ⁺	NSCLC ⁺	exon 19 del. ⁺	23Gy/1fr ⁺

Note: ad, adenocarcinoma; adsq, adenosquamous; Stage, cancer stages I-IV; fr, fraction; N.D., not determined; NSCLC, non-small cell lung cancer; TNM, classification system of malignant tumors.⁺

Metastasis site⁺

PUL, lung; BRA, brain; HEP, liver; OSS, bone; SPL, spleen.⁺

Table 1. 登録患者内約

17 例の定位照射例、11 例の肺定位、6 例の脳定位症例が登録された。

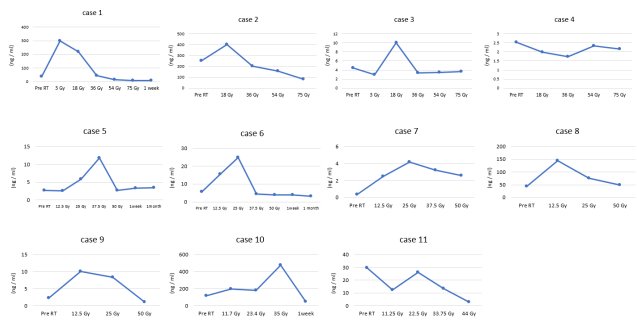


図 2. 放射線治療後の cfDNA の推移
放射線治療後、比較的早期である day1-3 までに cfDNA の一過的な増加が見られた。

Table 2. Comparison of allele frequencies of EGFR mutations in cfDNA samples of NSCLC

patients as determined by digital PCR and targeted sequencing. ^{a, b}

Case No ^c	EGFR mutation ^c	Allele frequency in pre-RT by digital PCR (copy/mL) ^a	Allele frequency during RT by digital PCR (copy/mL) ^a	Allele frequency in pre-RT by targeted sequencing ^b	Allele frequency during RT by targeted sequencing ^b
case 1 ^d	- ^a	- ^a	- ^a	N.D. ^a	7.8% (G719C) ^a
case 2 ^d	L858R ^a	N.D. (0) ^a	0.9% (10562) ^a	N.D. ^a	0.5% ^a
case 12 ^d	exon 19 del. ^a	0.2% (20866) ^a	0.4% (139579) ^a	N.D. ^a	N.D. ^a
case 15 ^d	L858R ^a	44194 (0.5%) ^a	2.3%(363269) ^a	0.3% ^a	1.5% ^a
	T790M ^a	N.D. (0) ^a	0.4% (40824) ^a	N.D. ^a	0.3% ^a
case 16 ^d	L858R ^a	(N.D.) ^a	0.2% ^a	N.D. ^a	2.8% ^a
	L747S ^a	- ^a	- ^a	N.D. ^a	2.3% ^a
case 17 ^d	exon 19 del. ^a	N.D. (64282) ^a	6.4% (2122718) ^a	0.3% ^a	7.3% ^a

Note: del., deletion; N.D., not determined; RT, radiotherapy.^{a, b}

Table 2. digital PCR, 次世代シーケンサーによる cfDNA 解析結果
cfDNA に対し、digital PCR 解析、次世代シーケンサー解析を行い、その結果を比較した。

< 結果・考察 >

まず、今回の研究に臨床病期 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、解析を行った。まず、放射線直後の血液中の cfDNA の詳細なモニタリングの結果、11 / 17 症例で放射線治療後に cfDNA 増加が起こっていることが明らかとなった (図 2)。興味深いことに、放射線治療後の cell free DNA 増加は放射線治療開始後 1 日 ~ 3 日という比較的早い時期に確認された。一般に放射線治療後の細胞死は増殖死により引き起こされること、放射線治療後の腫瘍縮小が照射終了後、4 週程度で確認されることから、放射線治療による癌細胞死の結果生じる cfDNA 増加も照射終了後に引き起こされると予測していた。この乖離の原因として、放射線照射後に一過的にある程度のアポトーシスが誘導されることは実験的にも知られており、放射線照射後、一定量のアポトーシス

による cfDNA 増加と考えた。一方増殖死は一過的に生じるわけではなく、比較的ゆっくりと生じる現象であるため、半減期の短い cfDNA を検出することが困難であったため、照射終了前後に cfDNA 増加が確認されなかったと推測した。

次に放射線治療後の cfDNA 増加が癌組織由来であることを確認した。今回の対象は肺非小細胞癌であり、EGFR 変異陽性例が多く含まれている。この EGFR 変異を指標とし、digital PCR または target sequence 解析を行うことで cfDNA 上昇が腫瘍由来であることを検証した。その結果、放射線治療前後で変異 EGFR が 2-10 倍程度増加しており、放射線により血中に腫瘍由来の DNA を一過的に増加されることが可能であることが示された。また、放射線治療後の DNA は断片化がすすんでいることが知られているため、シーケンス解析が困難になることも予測されたが、今回の結果から、digital PCR, target sequence に耐え得ることが明らかとなった。

以上まとめると

- 放射線治療後、比較的早期(1-3days)に血中の cfDNA 増加が生じる
- cfDNA は癌由来の DNA から生じていること
- 放射線治療後の cfDNA 増加を利用した digital PCR 解析、シーケンサー解析は可能である
- 放射線治療後の cfDNA 増加は 15~30Gy 程度の線量後でも生じる

ことが明らかとなった。

今回 cfDNA 増加をきたした 15~30Gy という線量は、根治的放射線治療だけでなく、緩和的な放射線治療中でも cfDNA 増加が起こりえることが示唆される結果であり、脳定位照射や緩和照射後に照射部位の genotype を検証することが可能であることを示した結果であり、興味深いデータであると考えられる。

cfDNA 診断は国内でも 2017 年より保険承認がされており、今後盛んに行われていく。一方でその診断を行うために化学療法や放射線治療が cfDNA にどのような影響を与えるを知る必要がある。特に多くの癌治療に併用される放射線治療が、この cfDNA 動態にどのような影響を与えるかについて詳細に調べた最初の報告であり、意義の大きい報告である。

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 4件)

1. Radiotherapy increases plasma levels of tumoral cell-free DNA in non-small cell lung cancer patients.

Kageyama SI, Nihei K, Karasawa K, Sawada T, Koizumi F, Yamaguchi S, Kato S, Hojo H, Motegi A, Tsuchihara K, Akimoto T.

Oncotarget.2018 Apr 10;9(27):19368-19378

2. A case report of using nivolumab for a malignant melanoma patient with rheumatoid arthritis

Kageyama S, S Yamaguchi Shin I Yoshiyuki S Tsuyoshi S Akaike K Miura S Kato

International Cancer Conference Journal October 2016, Volume 5, Issue 4, pp 192-196

3. Immune Checkpoint for a Kidney Cancer and Other Cancers

Kageyama S, Yamaguchi S, Miura K, Kato S. Gan To Kagaku Ryoho. 2016 Jun;43(6):672-7.

4. Pharmacological Treatment for Bone Metastasis

Yamaguchi S, **Kageyama S**, Miura K, Kato S. Gan To Kagaku Ryoho. 2015

Nov;42(11):1342-5.

〔学会発表〕(計 2件)

(学会発表)

第23回癌治療増感研究会 2017年7月
(研究奨励賞受賞)

第27回放射線腫瘍学会 2017年11月

〔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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 影山俊一郎 (Shun-ichiro Kageyama)

国立がん研究センター東病院・放射線治療科・医員

研究者番号: 60644979

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()