様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月　９ 日現在

機関番号：７２６０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０８６３５

研究課題名（和文）リキッドバイオプシーに基づく直腸癌術前放射線化学療法の効果予測法の開発

研究課題名（英文）Prediction of response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer using liquid biopsy

研究代表者
上野　雅資（UENO, Masashi）

公益財団法人がん研究会・有明病院　大腸外科・医員

研究者番号：９０５７４６３２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：進行直腸癌における術前治療の治療効果や再発の予測に血漿中腫瘍由来DNA(ctDNA)が有用であるかを検討するため、術前治療が行われた進行直腸癌計85例を対象とし、計222の経時的血漿サンプルを解析した。ctDNA陽性率は治療前57.6%、治療後22.3%と治療後に有意に低下した。多変量解析にてctDNAの減少率(80%以上)が治療効果の独立した予測因子であった。また、Cox比例ハザードモデルにて術後CEAと術後ctDNAがそれぞれ独立した無再発生存率の予測因子であった。以上の結果から、ctDNA解析は直腸癌の術前治療効果予測および再発の予測に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
直腸癌治療におけるctDNAの臨床的有用性については、化学療法の治療効果や再発、抗がん剤抵抗性のモニタリングに関する報告がなされているが、術前治療効果予測におけるctDNAの有用性に関する報告は少ない。本研究によりctDNAが術前治療の効果予測に有用であることが示唆された。今後さらにデータを蓄積し、将来的には内視鏡やMRIなど現存する診断モダリティとctDNA解析を組み合わせることで、より正確に術前治療の効果を診断できるようになり、直腸切除を回避できる症例の増加につながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the clinical utility of circulating tumor DNA (ctDNA) of patients with locally advanced rectal cancer (LARC) to predict response to preoperative therapy and postoperative recurrence. A serial ctDNA analysis of 222 plasma samples from 85 patients with LARC was performed using amplicon-based deep sequencing on a cell-free DNA panel covering 14 genes with over 240 hotspots. ctDNA was detected in 57.6% and 22.3% of samples at baseline and after preoperative treatment, respectively. Change in ctDNA was an independent predictor of complete response to preoperative therapy. In addition, postoperative ctDNA and carcinoembryonic antigen (CEA) were independent prognostic markers for risk of recurrence after surgery. Serial ctDNA analysis may offer clinically useful predictive and prognostic markers for response to preoperative therapy and postoperative recurrence in patients with LARC.

研究分野：大腸外科

キーワード：直腸癌　術前放射線化学療法　リキッドバイオプシー

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

下部進行直腸癌は、術後再発率が約30%と高く、局所再発すれば疼痛や出血だけではなく、排便障害や永久人工肛門等により患者の生活の質(QOL)は著しく低下する。この局所再発抑制目的に術前化学放射線療法(chemoradiation therapy; CRT)が標準治療として行われている。術前CRTの効果は症例により様々であるが、手術を施行した症例のうち、約10～15%でがん細胞が完全に消失する病理学的完全奏効(pathological complete response; pCR)が得られる。このような症例では良好な長期成績を示すことが報告されている。また、術前 CRT 後に臨床的完全奏効(clinical complete response; cCR)が得られ切除せずに経過観察した症例と、術前CRT後に切除しpCRであった症例の長期予後を比較し、全生存率は経過観察群で有意に高く、無再発率は経過観察群で高い傾向にあることも報告されている。これらを背景に、最近では術前CRT後にすぐに手術を行わず、慎重に経過観察するwatch and wait(WW) approachが行われている。このアプローチでは、CRT後の治療評価は非常に重要である。しかし、内視鏡やMRIなど現存する診断モダリティではpCRを正確に予測することは困難であり、WW症例の約30%は局所再増大をきたす。術前CRTの効果を高精度に予測できれば、効果不良予測群には不必要な術前CRTの省略や、より強力な術前全身化学療法と組み合わせるなどの戦略が可能となり、効果良好予測群には高確率で根治切除が省略可能になると考えられる。

血中循環腫瘍DNA(circulating tumor DNA; ctDNA)は癌細胞のアポトーシスやネクローシスにより末梢血中に放出される断片化した DNA であり、癌ゲノム情報や病態の把握を可能にするバイオマーカーとして重要性が明らかになってきている。直腸癌治療における ctDNA の臨床有用性については、化学療法の治療効果や再発、抗がん剤抵抗性のモニタリングに関する報告がなされている。しかしながら、術前治療効果予測におけるctDNAの有用性に関する報告はない。

２．研究の目的

本研究の目的は、直腸癌において高頻度で変異する14遺伝子の変異を検索するcfDNAパネルを用いてターゲット次世代シーケンサーによるctDNA解析を行い、直腸癌の術前治療効果、さらには術後再発との関連性を明らかにすることである。

３．研究の方法

(1) 術前治療を施行した85例を対象とし、2つのグループに分類した。Responder群は切除術施行しpCRであった症例、あるいは術前治療後にcCRが得られ、12ヶ月以上WWを行いCRを維持している症例を示す。Non-responder群は切除術を施行しnon pCRであった症例を示す。

(2) 血液サンプルは術前治療開始前(baseline)、術前治療後(手術直前、腫瘍切除12時間以内)(post-treatment)、術後12週(post-operation)時点で採血を行い、血漿を抽出した。この血漿から MagMAX cfDNA isolation Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて ctDNA を抽出し、Oncomine Colon cfDNA Assay(Thermo Fisher Scientific)を用いてライブラリを作成した。Ion Chef™ SystemとIon 530™ Kit-Chefによりライブラリを増幅させ、Ion 530™ chipsとIon S5 systemでctDNA解析を行なった。cfDNAパネルは大腸癌において高頻度に変異を認める14遺伝子(*TP53*、*KRAS*、*APC*、*PIK3CA*、*FBXW7*、*NRAS*、*GNAS*、*SMAD4*、*MAP2K1*、*ERBB2*、*BRAF*、*AKT1*、*CTNNB1*、*EGFR*)の240を超えるホットスポット上の変異を検出するパネルであり、各アレルの総コピー数

のうち、変異アレルのコピー数の割合である変異アレル割合(mutant allele fraction; MAF)を算出した。ctDNA レベルは検出された MAF の平均値と定義した。

4．研究成果

(1) 術前治療を施行した 85 例、222 サンプルを amplicon に基づく deep sequencing により解析した(図 1)。年齢の中央値は 60 歳、男性 65 例/女性 20 例、clinical stage II:27 例/III:58 例、Responder:21 例/Non-responder:64 例であった。

ctDNA 解析により、術前治療前(baseline):49 例/術前治療後(post-treatment):19 例で血漿中体細胞変異(変異アレル)を認めた。術前治療前は、遺伝子別では *TP53*:24 例/*KRAS*:22 例/*APC*:14 例で変異を認め、その他の遺伝子変異の検出頻度は 10%未満であった(図 1、図 2)。術前治療後は *TP53* と *APC* の変異を最も多く認めた(図 1、図 2)。術前治療前(baseline)に変異が検出された症例数は Responder 群と Non-responder 群で有意差は認めなかった(P>0.9999)(図 1、図 2)。

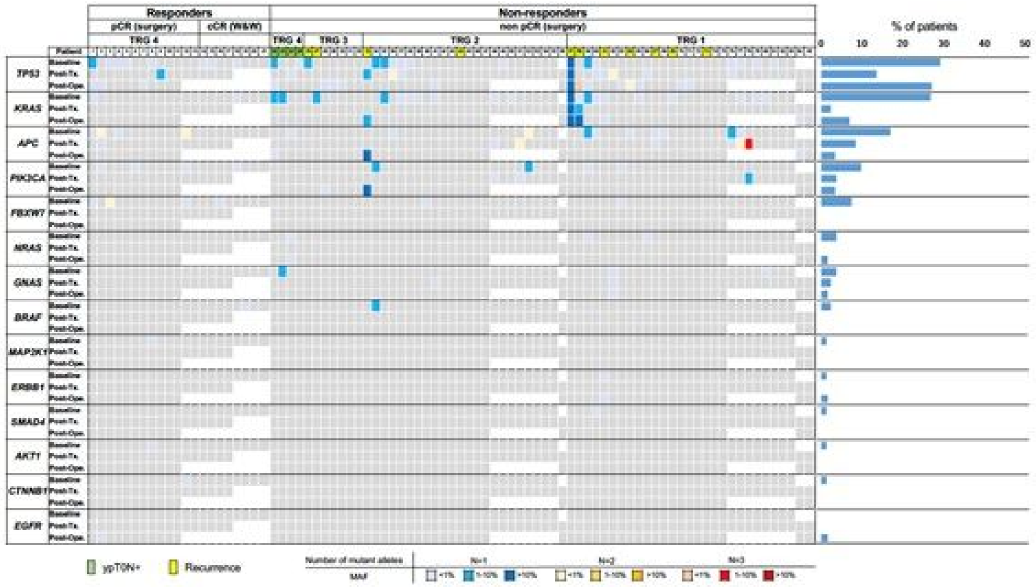


図 1 85 例の血漿中体細胞変異の検出状況

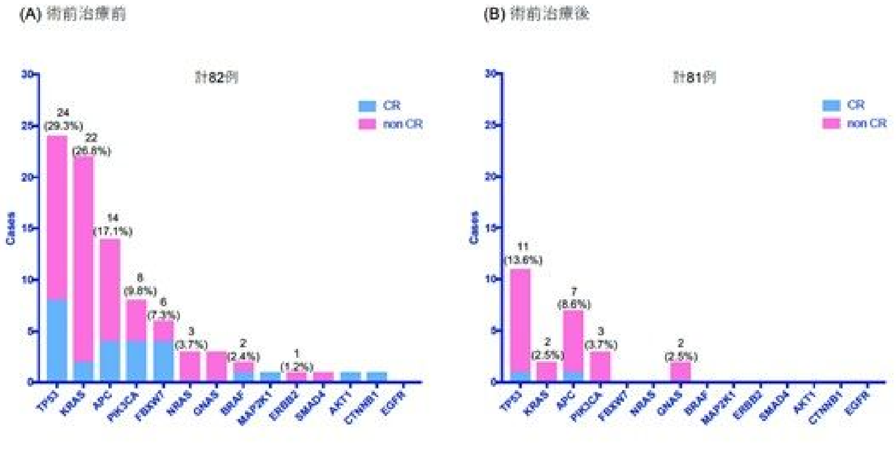


図 2 術前治療前後で変異遺伝子を認めた症例数(遺伝子別)

(2) 術前治療前後での MAF の変化を検討するため、術前治療前あるいは術前治療後に変異が検出された Responder:12 例/Non-responder:39 例を用いた。術前治療後の MAF(中央値 0%、 範囲

0-52.91%)は術前治療前の MAF(中央値 0.49%、範囲 0-29.48%)に比べて有意に低下していた(P=0.0003)。術前治療効果に関連する因子の検討では、多変量解析において ctDNA 減少率は術前治療後の Responder に関する独立した因子であることが示唆された(P=0.0276)(表 1)。

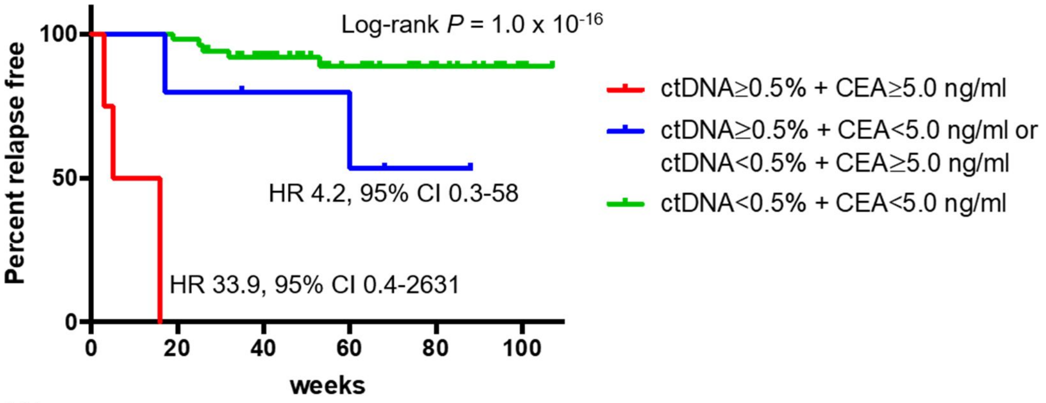
表 1 術前治療効果に関するロジスティック回帰分析

変数	単変量解析		多変量解析	
	OR (95%CI)	*P* 値	OR (95%CI)	*P* 値
性別:男性 vs 女性	1.7 (0.4-12)	0.5099		
治療前 CEA:<5.0 ng/ml vs ≥5.0 ng/ml	1.1 (0.3-3.9)	0.9381		
腫瘍肛門縁距離:≥4 cm vs <4 cm	2.0 (0.4-14)	0.4072		
臨床的壁深達度:cT3 vs cT4	0.8 (0.2-4.1)	0.7441		
臨床的リンパ節転移:陰性 vs 陽性	1.3 (0.3-5.0)	0.7353		
放射線治療と伴う術前治療:Yes vs No	2.9 (0.8-12.3)	0.1178	2.3 (0.6-10.4)	0.2396
ctDNA 減少率:≥80% vs <80%	8.5 (1.4-163)	0.0150	7.4 (1.2-144)	0.0276

(3) 術前治療後に根治術を施行した 59 例を用いて術後の ctDNA 解析を行った。術後 12 週の時点では、21 例で血漿中体細胞変異を認めた。遺伝子別では *TP53*:16 例/*KRAS*:4 例で変異を認め、その他の遺伝子は 5%未満であった。術後因子を用いた Cox 比例ハザード多変量解析では、術後 CEA および術後 ctDNA レベルは術後再発に関する独立した因子であることが示唆された(CEA, P=0.0105; ctDNA, P=0.0127)(表 2)。Kaplan-Meier 法によると、術後 CEA 高値群と術後 ctDNA レベル高値群は有意に術後無再発期間が短かった(CEA, Log-rank P=$7.5x10^{-7}$; ctDNA, Log-rank P=$1.7x10^{-17}$)。さらに、術後 CEA 値と術後 ctDNA レベルを組み合わせて術後無再発期間との関連を検討すると、両者とも高値の場合は再発リスクが最も高かった (Log-rank P=$1.0x10^{-16}$)(図 3)。

変数	単変量解析		多変量解析	
	HR (95%CI)	*P* 値	HR (95%CI)	*P* 値
性別:男性 vs 女性	2.9 (0.5-53)	0.2457		
術後 CEA: ≥5.0 ng/ml vs <5.0 ng/ml	11 (3.0-36)	0.0006	6.9 (1.6-29)	0.0105
病理学的壁深達度:T3-4 vs T0-2	5.6 (1.4-37)	0.0112	1.1 (0.1-12.3)	0.9279
病理学的リンパ節転移:陽性 vs 陰性	2.7 (0.8-10)	0.1091	1.4 (0.3-6.7)	0.6332
脈管侵襲:陽性 vs 陰性	10 (2.6-67)	0.0005	5.3 (0.6-79)	0.1276
Tumor regression grade (Dworak): grade 1-2 vs grade 3-4	2.9 (0.8-19)	0.1272	2.0 (0.2-18.9)	0.524
放射線治療を伴う術前治療:Yes vs No	1.2 (0.3-3.3)	0.9946		
術後 ctDNA: ≥0.5% vs <0.5%	20 (5.6-72)	<0.0001	7.7 (1.6-42)	0.0127

表 2 術後再発に関する Cox 比例ハザード分析



Number at risk						
Double positive	4	2	2	2	2	2
Either positive	5	5	4	3	2	1
Double negative	50	49	38	24	13	3

図 3 術後 CEA/ctDNA レベルと無再発期間との関係

以上の結果、術前治療を施行する進行直腸癌において、ctDNA 解析が術前治療効果および術後再発の予測に有用である可能性が示唆された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計7件（うち査読付論文　7件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Murahashi S, Akiyoshi T, Sano T, Fukunaga Y, Noda T, Ueno M, Zembutsu H.	４．巻 123
２．論文標題 Serial circulating tumour DNA analysis for locally advanced rectal cancer treated with preoperative therapy: prediction of pathological response and postoperative recurrence	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Br J Cancer	６．最初と最後の頁 803-810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-020-0941-4	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 －

１．著者名 Nakanishi R, Akiyoshi T, Toda S, Murakami Y, Taguchi S, Oba K, Hanaoka Y, Nagasaki T, Yamaguchi T, Konishi T, Matoba S, Ueno M, Fukunaga Y, Kuroyanagi H	４．巻 27
２．論文標題 Radiomics Approach Outperforms Diameter Criteria for Predicting Pathological Lateral Lymph Node Metastasis After Neoadjuvant (Chemo)Radiotherapy in Advanced Low Rectal Cancer	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Ann Surg Oncol	６．最初と最後の頁 4273-4283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-08974-w	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 －

１．著者名 Akiyoshi T, Gotoh O, Tanaka N, Kiyotani K, Yamamoto N, Ueno M, Fukunaga Y, Mori S.	４．巻 70
２．論文標題 T-cell complexity and density are associated with sensitivity to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Cancer Immunol Immunother	６．最初と最後の頁 509-518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02705-6	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 －

１．著者名 Akiyoshi T, Tanaka N, Kiyotani K, Gotoh O, Yamamoto N, Oba K, Fukunaga Y, Ueno M, Mori S	４．巻 106
２．論文標題 Immunogenomic profiles associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Br J Surg	６．最初と最後の頁 1381-1392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bjs.11179	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 －

1．著者名 Tominaga T, Akiyoshi T, Yamamoto N, Oba K, Nagasaki T, Yamaguchi T, Konishi T, Fukunaga Y, Ueno M	4．巻 166
2．論文標題 Prognostic value of metastatic lymph node regression grade after neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Surgery	6．最初と最後の頁 1061-1067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.surg.2019.06.009	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 －

1．著者名 Suzuki S, Akiyoshi T, Oba K, Otsuka F, Tominaga T, Nagasaki T, Fukunaga Y, Ueno M	4．巻 27
2．論文標題 Comprehensive Comparative Analysis of Prognostic Value of Systemic Inflammatory Biomarkers for Patients with Stage II/III Colon Cancer	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Ann Surg Oncol	6．最初と最後の頁 844-852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-019-07904-9	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 －

1．著者名 Akiyoshi T, Toda S, Tominaga T, Oba K, Tomizawa K, Hanaoka Y, Nagasaki T, Konishi T, Matoba S, Fukunaga Y, Ueno M, Kuroyanagi H	4．巻 3
2．論文標題 Prognostic impact of residual lateral lymph node metastasis after neoadjuvant (chemo)radiotherapy in patients with advanced low rectal cancer	5．発行年 2019年
3．雑誌名 BJS Open	6．最初と最後の頁 822-829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bjs5.50194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計8件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 村橋 賢，秋吉 高志，向井 俊貴，山口 智弘，長嵜 寿矢，小西 毅，長山 聡，上野 雅資，福長 洋介
2．発表標題 術前治療を施行した進行直腸癌症例を用いたcirculating tumor DNAと術後再発の関連解析
3．学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4．発表年 2020年

１．発表者名 秋吉 高志，村橋 賢，向井 俊貴，長嵜 寿也，山口 智弘，小西 毅，長山 聡，上野 雅資，福長 洋介
２．発表標題 当院における進行直腸癌に対するwatch and waitの治療成績
３．学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
４．発表年 2020年

１．発表者名 秋吉 高志，森 誠一，清谷 一馬，向井 俊貴，長嵜 寿也，山口 智弘，小西 毅，長山 聡，福長 洋介，上野 雅資
２．発表標題 Immunogenomic profiles associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with advanced low rectal cancer
３．学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
４．発表年 2020年

１．発表者名 村橋賢、秋吉高志、前佛均、長嵜寿矢、小西毅、長山聡、福長洋介、上野雅資
２．発表標題 術前治療を施行した進行直腸癌症例を用いたctDNAの経時的変化と治療効果の関連解析
３．学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
４．発表年 2019年

１．発表者名 村橋賢、秋吉高志、前佛均、向井俊貴、山口智弘、長嵜寿矢、小西毅、長山聡、福長洋介、上野雅資
２．発表標題 術前治療を施行した進行直腸癌症例を用いたcirculating tumor DNAの経時的変化と病理学的完全奏効の関連解析
３．学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
４．発表年 2019年

１．発表者名 村橋賢、秋吉高志、前佛均、上野雅資、福長洋介、佐野武、野田哲生
２．発表標題 術前治療を施行した局所進行直腸癌を用いた定量的ctDNA解析と治療効果予測
３．学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会
４．発表年 2019年

１．発表者名 村橋賢、秋吉高志、前佛均、長嵜寿矢、小西毅、藤本佳也、長山聡、福長洋介、上野雅資
２．発表標題 術前治療を施行した進行直腸癌症例を用いたcell free DNAの経時的変化と臨床病理学的因子の関連解析
３．学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
４．発表年 2018年

１．発表者名 村橋賢、秋吉高志、前佛均、長嵜寿矢、小西毅、藤本佳也、長山聡、福長洋介、上野雅資
２．発表標題 術前治療を施行した進行直腸癌症例を用いたcell free DNAの経時的変化と臨床病理学的因子の関連解析
３．学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
４．発表年 2018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
研究分担者	秋吉　高志 (AKIYOSHI Takashi) (50625598)	公益財団法人がん研究会・有明病院　大腸外科・副部長 (72602)	

６．研究組織（つづき）

	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
研究分担者	前佛　均 (ZEMBUTSU Hitoshi) (90372820)	公益財団法人がん研究会・がんプレシジョン医療研究センター　リキッドバイオプシー診断開発プロジェクト・プロジェクトリーダー（部長クラス） (72602)	

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