

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16448

研究課題名(和文) cfDNA自然史と抗腫瘍免疫への影響の解明

研究課題名(英文) Elucidating the natural history of cfDNA and its impact on anti-tumor immunity

研究代表者

中島 千穂 (Nakashima, Chiho)

佐賀大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40858502

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)：担癌患者では末梢血中に循環血漿DNA(cfDNA)が高い濃度で検出されることから、これらがDAMPsとして働き全身炎症の原因となっていることが想定された。そのため、進行期肺癌患者33例のcfDNAサイズと濃度について、白血球数・CRP・好中球/リンパ球比率、免疫チェックポイント阻害薬の効果、免疫関連有害事象の有無との関連を後方視的に検討したが、有意な相関関係は見いだされなかった。腫瘍局所の解析に立ち戻る必要があり、現在Boston Gene tumor portrait、またCancer Pathway Indexを用いて微小免疫環境と腫瘍遺伝子異常との関係を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

担癌状態で生じる高炎症状態は必ずしも循環血漿DNA濃度の増加とは相関していなかった。また、循環血漿DNA濃度の多寡で免疫チェックポイント阻害薬の効果を予測することは困難であった。腫瘍局所での炎症状態について検討する必要があると考えられ、現在、免疫微小環境解析を用いた検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：Since circulating plasma DNA (cfDNA) was detected at high concentrations in the peripheral blood of patients with carcinoma, it was assumed that these DNAs may act as DAMPs and contribute to systemic inflammation. Therefore, we retrospectively examined the association of cfDNA size and concentration with white blood cell count, CRP, neutrophil/lymphocyte ratio, immune checkpoint inhibitor efficacy, and presence of immune-related adverse events in 33 patients with advanced-stage lung cancer, but no significant correlation was found. We need to go back to local tumor analysis. We currently examine the relationship between the microenvironment and tumor gene abnormalities using the Boston Gene tumor portrait and the Cancer Pathway Index.

研究分野：Non-small cell lung cancer

キーワード：cfDNA 非小細胞肺癌 免疫チェックポイント阻害薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

担がん状態においては、腫瘍進展に比例して末梢血中の circulating free DNA (cfDNA) 量、及び cfDNA 中の循環腫瘍 DNA ; circulating tumor DNA (ctDNA) が増加することを報告してきた (Nakashima C et al, Oncotarget. 2018, Sueoka-Aragane N et al, PLoS One. 2014)。しかしその生成機序、組織から循環血漿中への DNA 放出メカニズム、病態生理学的意義をはじめ、cfDNA の自然史には未解明な点が多い。ctDNA の割合は 0.01%から 90%以上と幅があることから、cfDNA の起源は腫瘍細胞の壊死・アポトーシスだけではなく、腫瘍間質や免疫細胞など非腫瘍細胞による分泌機序も推定されている(Kustanovich A et al, Cancer Biol Ther. 2019)。我々は、進行非小細胞肺癌患者の末梢血 cfDNA 中には、従来から cfDNA として定義されるシングルヌクレオソーム単位の 170bp 前後の short fragment に加え、5Kb 前後の long fragment が存在することを発見し報告した (Nakashima C et al, Oncotarget. 2018) (図 1)。これは免疫原性の低い細胞死であるアポトーシスとは起源を異にした cfDNA 断片の存在を示唆するものである。

組織傷害時に発生する DNA それ自体や付随するヒストン、high-mobility group box 1 (HMGB1) は、自然免疫を惹起する damage-associated molecular patterns(DAMPs)として知られている。過剰量の自己核酸や、核膜/細胞膜破綻に伴う核酸流出は cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)や stimulator of interferon gene (STING) を介して DAMPs と認識され、病原体感染と同様に炎症応答を誘導する(Ishikawa H et al, Nature. 2009)。腫瘍局所における STING agonist を介した抗腫瘍免疫活性化は盛んに報告がなされ新たな創薬 target として期待が持たれている。しかし、循環血漿中に DAMPs たり得る大量の cfDNA が持続的に流れるという進行がんの特徴的な状況は、腫瘍進展と腫瘍免疫にどのように影響するかは未解明であった。

### 2. 研究の目的

進行担がん患者で観察される循環血漿中の cfDNA 濃度上昇そのものが抗腫瘍免疫に与える影響を明らかにし、免疫チェックポイント阻害薬の効果予測・有害事象予測因子となりうるか検討すること。

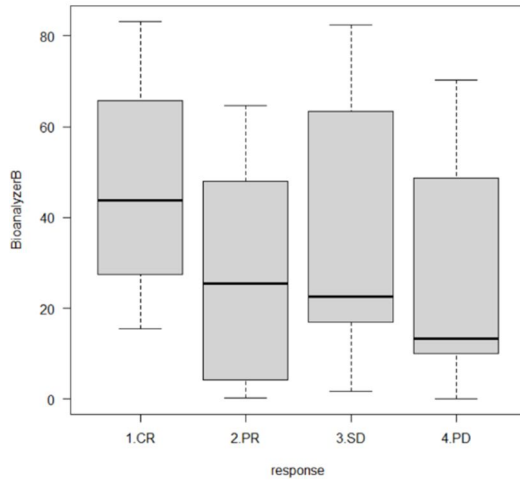
### 3. 研究の方法

進行肺癌患者血漿中の cfDNA 濃度と臨床状況に関するカルテ調査として、cfDNA の量・質と抗腫瘍免疫の関係性をスクリーニングするため以下を行い関連解析を行った。cfDNA 濃度測定 (Quantus ONE dye dsDNA kit) ; 当院バイオバンクにて cfDNA の保管する免疫チェックポイント阻害薬を使用した進行肺癌患者 33 例を対象とした。cfDNA サイズ分布測定 (Bioanalyzer high sensitivity kit) 後方視的カルテ調査 ; 免疫チェックポイント阻害薬の治療効果、PD-L1 発現状況、治療開始前の WBC (好中球リンパ球比 ; NLR) ・CRP ・ALB ・Performance status

### 4. 研究成果

進行期肺癌患者(免疫チェックポイント阻害薬使用歴あり)33 例における cfDNA 濃度中央値は 0.175ng/ $\mu$ l (Quantus 足底)であった。これらの症例において 170bp 前後の Short fragment cfDNA と 5Kbp 前後の Long fragment cfDNA 濃度の測定を実施、Short/Long fragment 濃度は相関係数 0.589, P 値 = 0.00234 で相関を認めた。Short/Long fragment 濃度と CRP や好中球/リンパ球比率について相関関係を検討したが、有意な相関関係は認められなかった。

特に着目していた腫瘍由来と目される Long fragment cfDNA と免疫チェックポイント阻害薬の治療効果の関係については、CR > PR > SD > PD で Long fragment cfDNA 濃度は下がっていく傾向を認め、Long fragment cfDNA の濃度が高い方がよい治療効果が得られる印象であったが、有意差は検出されなかった (下図)。



以上のことより循環血漿 DNA 濃度情報から全身炎症や免疫チェックポイント阻害薬の効果予測を行うことは難しいことが判明し、腫瘍局所環境について、腫瘍自体と免疫環境の両者を検討する必要があると考えられた。現在、腫瘍局所の免疫微小環境の解析を Boston Gene tumor portrait にて解析中、また包括的がんゲノムプロファイリング検査結果を利用して、腫瘍細胞が持つ遺伝子変異情報を基に、活性化しているシグナリング経路を同定する Cancer Pathway Index(CPI)を開発しており、これを用いた炎症性シグナリングの活性化と循環血漿 DNA の関係について今後検討を進めて行く予定である。

Cancer Pathway Index(CPI)は、包括的がんゲノムプロファイリング検査を用いて得られた腫瘍細胞の 200 遺伝子に関する変異情報を 23 のシグナリングパスウェイに割り振り自動的にスコア化するシステムであり、当院にて包括的がんゲノムプロファイリングを実施した 90 症例により性能評価を実施している。有意にスコア上昇を認めたパスウェイ提示率は 86%であり、炎症性シグナリング経路の活性化と腫瘍循環 DNA のサイズ・濃度について現在検討中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Akiko Matsumoto, Chiho Nakashima, Shinya Kimura, Eizaburo Sueoka, Naoko Aragane	4. 巻 21
2. 論文標題 ALDH2 polymorphism rs671 is a predictor of PD-1/PD-L1 inhibitor efficacy against thoracic malignancies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 584-595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-021-08329-y.	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 -

1. 著者名 Tezuka Toshiaki, Okuzumi Shinichi, Nakashima Chiho, Ide Toshihiro, Imai Shungo, Mitsuboshi Satoru, Kuwahara Yuki, Takizawa Tsubasa, Seki Morinobu, Minematsu Naoto, Aragane Naoko, Nakahara Jin, Hori Satoko, Nakane Shunya, Suzuki Shigeaki	4. 巻 270
2. 論文標題 Dysautonomia associated with immune checkpoint inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 3413 ~ 3423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00415-023-11667-5	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 -

1. 著者名 Chiho Nakashima, Yuki Kuwahara, Syo Kitamura, Keita Kai, Masafumi Hiratsuka, Kokoro Kajiwara, Natsuko Komiya, Shinsuke Ogusu, Shinya Kimura, Naoko Sueoka-Aragane	4. 巻 14
2. 論文標題 Advanced non-small cell lung cancer patient with a complete response and allergic immune-related adverse events by combined immunotherapy, including anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies: A case report	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Current Problems in Cancer: Case Reports	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cpcr.2024.100298	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 -

1. 著者名 Abe Tomonori, Nakashima Chiho, Sato Akemi, Harada Yohei, Sueoka Eisaburo, Kimura Shinya, Kawaguchi Atsushi, Sueoka-Aragane Naoko	4. 巻 15
2. 論文標題 Origin of circulating free DNA in patients with lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0235611 ~ 0235611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0235611	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nakashima C, Shiotsu Y, Kosakai Y, Harada Y, Katsuya H, Nishi M, Sato A, Nakamura H, Sueoka-Aragae N
2. 発表標題 Cancer Pathway Index, A new analytical method for cancer genome profiling test
3. 学会等名 The 82nd Annual meeting of the Japanese cancer association (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nakashima C, Shiotsu Y, Harada Y, Katsuya H, Okuma E, Nishi M, Sato A, Nakamura H, Sueoka-Aragane N.
2. 発表標題 Heat Map Analysis, A New Integrated Pathway Scoring System for Cancer Genome Profiling
3. 学会等名 American Association for Cancer Research annual meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島千穂、瀬戸香織、荒金尚子
2. 発表標題 当院における胸部悪性腫瘍に対するがんゲノム検査の現状 Current status of cancer genomic medicine at Saga university hospital
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023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
---------	---------