

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20809

研究課題名（和文）大腸癌における低侵襲で経時的測定可能な新規バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of a new minimally invasive and continuously measurable biomarker in colorectal cancer

研究代表者

中村 有貴（NAKAMURA, Yuki）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30909528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：大腸癌周術期に血液と尿の採取を行い、cell free DNA (cfDNA) を抽出し、デジタルPCR法を用いて、血中および尿中のKRAS変異ctDNAを測定した。当科で大腸癌手術を行った78例を対象として測定したところ、術前のKRAS変異ctDNAの検出率は血中で20.0%、尿中で12.8%と術前は血中で高かったが、術後の経時的な測定においては、術後翌日以降、尿中でより高い検出率を示した。また、尿中ctDNAの周術期における経時的な変化はいくつかにパターン化できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、大腸癌周術期に血中および尿中のKRAS変異ctDNAの測定を行い、尿中においてもctDNAの経時的な変化を捉えることが出来た。尿中ctDNAの測定は非常に低侵襲に可能であり、経時的な測定に適していると考えられる。本研究におけるこれまでの結果から、尿中ctDNAは大腸癌周術期において鋭敏に測定可能であることから、バイオマーカーとして有用となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Blood and urine samples were collected in the perioperative period of colorectal cancer. Cell free DNA (cfDNA) in blood and urine was extracted, and KRAS mutated ctDNA was measured by digital droplet PCR. In 78 patients who underwent colorectal cancer surgery at our department, the preoperative detection rate of KRAS mutated ctDNA was 20.0% in blood and 12.8% in urine, which was higher in blood, but when measured over time after surgery, the detection rate was higher in urine after the day of surgery. In addition, the changes in urinary ctDNA over time during the perioperative period could be classified into several categories.

研究分野：大腸癌

キーワード：リキッドバイオプシー circulating tumor DNA 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

血液などの液性検体を用いたリキッドバイオプシーの研究が近年全世界で盛んに行われ、血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) や血中遊離 DNA (cell freeDNA, cfDNA) を用いた解析は、大腸癌においても応用されている。

われわれはこれまで大腸癌における ctDNA 測定の早期診断マーカーとしての有用性および術前 ctDNA status と再発予後との関連についての研究に取り組み、術前の血中 KRAS 変異 ctDNA の検出は再発・予後に関するリスク因子であることを報告してきた (Sci Rep. 2021)。しかし、今日の大腸癌診療においては、術前化学放射線療法や術前化学療法など症例に応じた集学的な治療が行われているため、術前のみでの ctDNA の評価では不十分であり、術前治療の効果予測や術後の再発・予後との関連を評価するためには、術前治療の介入前から周術期にかけて経時的に連続性をもって評価する必要があると考えた。

ctDNA を術前化学放射線療法の効果予測および再発・予後予測に応用した報告は散見され、術前化学放射線療法導入前・終了後の 2 点の評価において ctDNA 量の著明な減少を認めた症例や術前化学放射線療法終了後に ctDNA が検出されなかった症例において、再発リスクが低いことが明らかになっているが、術前化学放射線療法継続の妥当性や至適手術時期を検討するためには、より頻回に評価することが望ましいといえる。

その一方で、複数回の血液採取は患者にとっては大きな負担となる可能性がある。そのため、低侵襲で鋭敏かつ確度の高いバイオマーカーの開発が必要と考え、本研究では、われわれがこれまで取り組んできた血中 ctDNA の測定に加えて、より低侵襲で経時的に測定を可能とする尿中 ctDNA 測定の有用性を検討することとした。

2. 研究の目的

大腸癌において、術前化学放射線療法や化学療法の効果予測、術後再発・予後予測にリキッドバイオプシーを用いた研究はこれまでもいくつか報告されているが、術前治療中および周術期に経時的かつ連続的に ctDNA を測定する意義については未だ明らかでなく、短期間に連続的に ctDNA を測定することによる術前治療の効果予測や術後再発・予後予測における有用性については不明である。

一方で、その意義については検討が必要であるが、大腸癌において、尿中に ctDNA が検出されることが報告されている。尿中 ctDNA は非常に低侵襲で経時的に測定可能であることから、本研究では、侵襲性と oncological な観点の両面から尿中の ctDNA の測定に着目した。

少数例での検討ではあるが、化学療法導入後の尿中 ctDNA status の変化がその後の治療効果予測に有用であるとする報告もあり、大腸癌においても、術前治療から周術期に尿中 ctDNA を測定し、その変化を捉えることにより、尿中 ctDNA が血中 ctDNA を凌駕する低侵襲で有用なバイオマーカーになりうる可能性があると考えた。

そこで本研究では、大腸癌の術前治療および周術期に経時的に血中 ctDNA の測定を行うとともに、尿中 ctDNA を測定し、大腸癌集学的治療における有用なバイオマーカーを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

術前化学放射線療法が望ましいと判断された症例 (深達度 T3 以深またはリンパ節転移が疑われる局所進行下部直腸癌など) においては、当科のプロトコール (45Gy/25 回の放射線療法および放射線療法実施日にカペシタピン 1,650mg/m²/day の内服) に従い術前化学放射線療法を実施する際、術前化学放射線療法導入前と全コース終了時、周術期に血液 10mL を採取する。また、術前化学放射線療法導入前と、各コース終了時、周術期に尿 100mL を採取する。

術前化学療法が望ましいと判断された症例 (大腸癌肝転移症例のうち、同時性もしくは異時性に当科で手術を行う予定の症例など) においては、当科のプロトコールに従い術前化学療法 (CAPOX+Bmab 療法または FOLFOX+Pmab 療法など) を実施する際、化学療法導入前と全コース終了時、周術期に血液 10mL を採取する。また、化学療法導入前と各コース終了時、周術期に尿 100mL を採取する。

術前治療を行わない症例においては、周術期に経時的に血液 10mL と尿 100mL を採取する。なお、周術期における検体採取は、血液は術前、術後 1 日目、14 日目以降に行い、尿は術前、術後 1 日目、2 日目、7 日目、14 日目以降に行う。

得られた検体から QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) 等を使用し ctDNA を抽出し、Droplet digital PCR を用いて、これまでの当科での研究において術前での測定意義が明らかになった KRAS などの遺伝子を対象として、ctDNA における遺伝子変異の有無および Mutant allele frequency (MAF) を評価し、その経時的な変化を評価する。

上記で得られた血中および尿中 ctDNA の測定結果と、臨床病理学的因子との関連や再発予後との関連について検討する。

以上により、大腸癌集学的治療において、より低侵襲で連続的な測定が可能な尿中 ctDNA 測

定の有用性を検証する。

4. 研究成果

当科で大腸癌手術を行った78例(表1;患者背景)を対象として、大腸癌周術期に血液と尿の採取を行い、血中および尿中のKRAS変異ctDNAを測定した。

血中KRAS変異ctDNAの検出率は、術前20.0%であった。術後1日は7.9%、術後14日目以降は6.0%で血中ctDNAが検出され、術後に検出率の低下を示した。

一方で、尿中KRAS変異ctDNAの検出率は、術前12.8%であり、術前は血中ctDNAと比べて検出率が低かったが、術後1日目は49.4%、術後2日目は50.6%、術後7日目は27.6%、術後14日目以降は30.0%で検出され、尿中ctDNAは血中ctDNAよりも術後の検出率が高い傾向にあった(図1;血中および尿中ctDNA陽性症例割合)。

また、尿中ctDNAと臨床病理学的因子との関連においては、尿中ctDNAは年齢、性別、腫瘍位置、腫瘍進行度等に関わらず測定可能であった。

さらに、尿中ctDNAは腎機能に関わらず、測定できることが明らかになった。

また、周術期における尿中ctDNAの経時的变化を折れ線グラフ化し複数にパターン化できたが、観察期間が短いため、現時点では、尿中ctDNAの経時的变化と再発および予後との関連については評価出来ない。

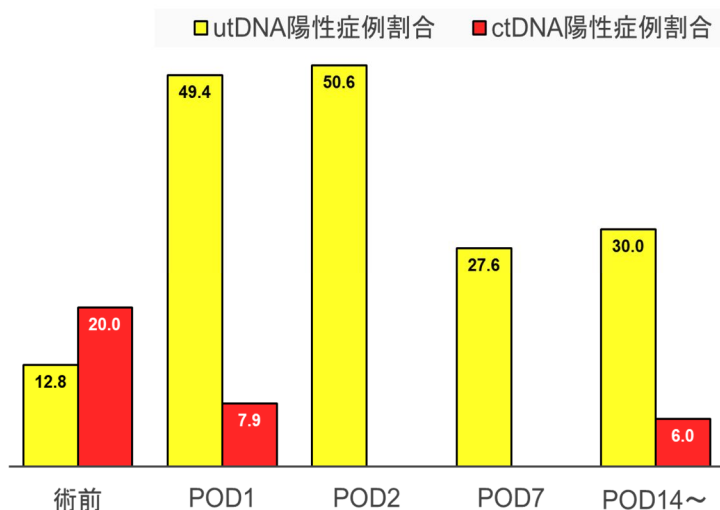
同様に術前治療症例においても、術前治療期間における尿中ctDNAの経時的变化を捉えることが出来たが(図2;術前化学放射線療法施行症例における尿中ctDNAの測定結果例)術後の再発・予後を含めたその意義については、引き続き経過をみたくて評価する必要がある。

しかしながら、本研究におけるこれまでの結果から、尿中ctDNAは低侵襲かつ経時的に測定することが可能であり、大腸癌集学的治療における有用なバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

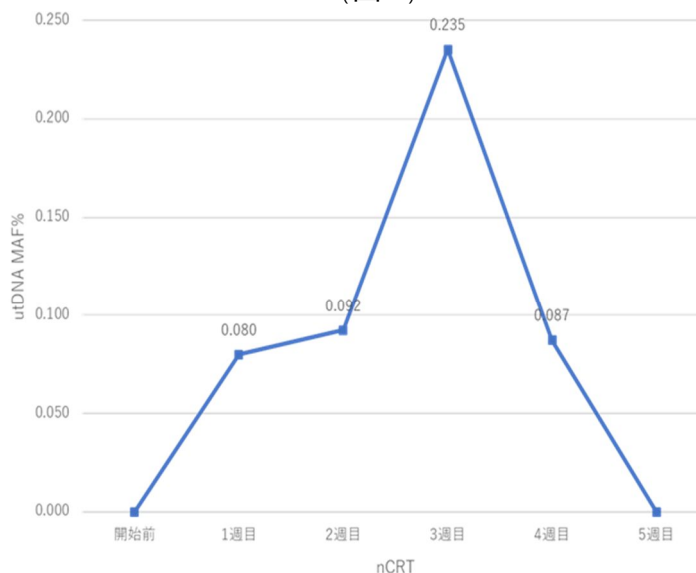
(表1)

Characteristics (n=78)	
Age, years [range]	71 [37-91]
Sex	
Male	45 (57.7%)
Female	33 (42.3%)
Cancer Location	
Right side	26 (33.3%)
Left side	52 (66.7%)
Differentiation	
tub1	48 (61.5%)
others	30 (38.5%)
Stage	
≤I	22 (28.2%)
II	19 (24.4%)
III	23 (29.5%)
IV	14 (17.9%)

(図1)



(図2)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹本典生、北畑裕司、中村有貴ほか
2. 発表標題 大腸癌周術期における尿中腫瘍由来DNA(urinary tumor DNA:utDNA) の測定意義
3. 学会等名 第7回 Liquid Biopsy 研究会
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
---------	---------