

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861191

研究課題名(和文)大腸癌化学療法の効果予測マーカー、新規予後予測マーカーの開発

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 colorectal cancer

研究代表者

徳久 善弘 (TOKUHISA, Yoshihiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30379961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：2009年9月から2012年11月に初回化学療法が開始された88人の進行再発切除不能大腸癌の患者の血漿検体を用いて半定量real time PCRを用いてcfDNA integrityを測定した。無増悪生存期間中央値は236日、全生存期間中央値は581日であった。cell-free DNA integrity低値群は高値群と比較し有意に無増悪生存期間の延長を認めた(254日 vs 184日, HR 1.93 (95% CI 1.06-;3.52), p=0.03)。血漿中cell-free DNA integrityは進行再発大腸癌に対する化学療法の予後予測因子となりうる事が示唆された。

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 truncated DNA released from apoptotic cells, DNA released from dead cancer cells varies in size. Plasma DNA integrity, the ratio of longer fragments to shorter DNA fragment, may be clinically useful for detecting colorectal cancer progression. Patients and Methods: Plasma samples from 88 patients receiving chemotherapy (5-FU+Oxaliplatin) for advanced/metastatic colorectal cancer were assessed before chemotherapy. The cfDNA levels were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction. Results: Cell-free DNA integrity additionally demonstrated a positive correlation to progression-free survival (184 days vs 254 days, HR of 1.93, P = 0.03). Conclusion: cfDNA integrity measurement holds important clinical information and could become a useful tool for prediction of outcome from chemotherapy in metastatic colorectal cancer

研究分野：消化器外科

キーワード：cell-free DNA integrity 大腸癌 化学療法

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌の罹患率および死亡率は増加しており、男性では癌死亡者数の3位、女性では1位となっているが、近年、分子標的薬やプロドラッグの開発などにより大腸癌に対する化学療法を中心とした治療成績の向上は著しい。また同時に遺伝子解析技術の向上・効率化が進み、大腸癌ではk-ras mutationの有無でセツキシマブの投与選択を行ったり、イリノテカンにおけるUGT1A1多型による下痢の副作用予測をもとに投与量の調節を行ったりと、実臨床でより個別化したオーダーメイド治療が行われるようになってきた。しかし依然、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。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 (Tokuhisa 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)。

本研究では、多岐に渡る大腸癌における転移巣に対す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。

### 2. 研究の目的

近年、大腸癌は増加傾向にあり化学療法により転移巣を制御することで、予後の延長が期待できる。本研究の目的は、末梢血液中を循環しているcell-free DNA(cfDNA)、その中でも、正常細胞に由来する短鎖cfDNAと癌細胞に由来する長鎖cfDNAの比であるintegrityを定量評価することにより、大腸癌の予後予測と、転移巣に対する化学療法の効果予測を治療開始前と開始後早期に高精度に行うことである。

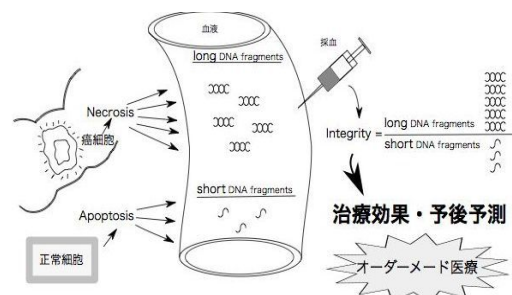


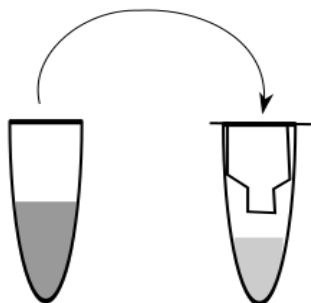
図1 研究の概要図

### 3. 研究の方法

大腸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測定方法を確立する。

cfDNAの抽出  
QIAmp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)



全血10mlから  
血清4-7mlを得る

図2 cfDNAの抽出方法

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・予後の関連性を検討していく。最終的にはintegrity による治療効果・予後予測システムを確立する。

#### 4. 研究成果

(1)DNA の抽出方法は 10ml の採血を行い室温で 30 分インキュベートした。次に 10 分間 3000rotation per minute で遠心し、血清分離してQ I A スピンカラムのスピンプロトコールでバッファー50µl に溶出した。安定して DNA を抽出することができたので、プライマーに アクチンを用いた。プライマーは、long DNA には 400bp, short DNA には 100bp と設定した。

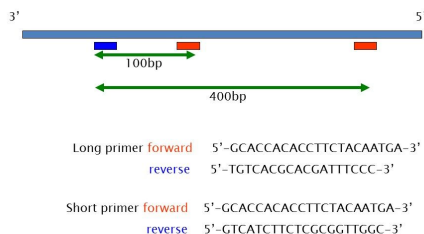


図3 プライマーの設定

cell-free DNA 値を Q-PCR(Quantitative polymerase chain reaction)にて測定した。

(2)測定方法が確立した後に、2009年9月から2012年11月に初回化学療法としてフツ化ピリミジン系薬剤とオキサリプラチンによる化学療法が開始された88人の進行再発切除不能大腸癌患者の、初回化学療法施行前と2コース終了後の血漿検体を用いて半定量real time PCRによりcfDNA integrityを測定した。

平均年齢は63.5歳で男性47例、女性41例であった。切除不能転移巣は肝58例(65.9%)、肺28例(31.8%)、リンパ節23例(26.1%)、腹膜播種8例(9.1%)、その他7例(8%)であった(図4)。

患者因子		
年齢	63.5±1.0	
性別		
男性	47	(53.4%)
女性	41	(46.6%)
切除不能転移巣		
肝臓	58	(65.9%)
肺	28	(31.8%)
腹膜	8	(9.1%)
リンパ節	23	(26.1%)
その他	7	(8.0%)
腫瘍マーカー		
CEA	856±386	
CA19-9	4258.5±2102.7	

図4 患者背景

最良治療効果判定ではCR1例、PR53例、SD33例、PD1例であった。無増悪生存期間中央値は236日、全生存期間中央値は581日であった。cell-free DNA integrity 低値群は高値群と比較し有意に無増悪生存期間の延長を認めた(254日 vs 184日, HR 1.93 (95% CI 1.06-3.52), p=0.03、図5)。

一方、化学療法2コース施行後のintegrityの高値群と低値群で比較すると、無増悪生存期間と全生存期間の両方ともに有意差を認めなかった(図6)。

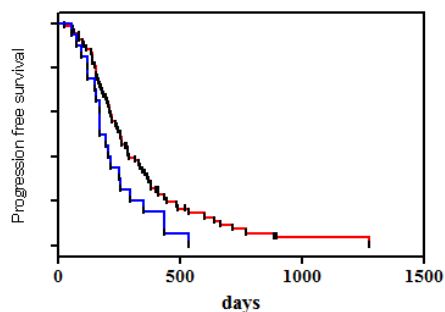


図5 無増悪生存期間

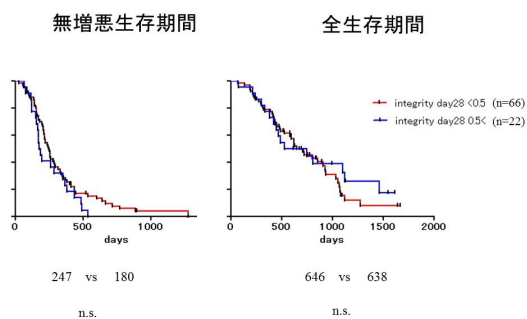


図6 化学療法2コース後

今回の研究により、血漿中 cell-free DNA integrity を測定することにより進行再発大腸癌に対する化学療法の予後予測因子となりうる事が示唆された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳久 善弘 (TOKUHISA, Yoshihiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30379961

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし