

結腸直腸癌患者の血漿中の cell-free DNA integrity を  
測定することによる免疫療法の有効性の予測

氏名 北原 正博

所属 山口大学大学院 医学系研究科

博士後期課程

応用分子生命科学系専攻

平成 29 年 1 月

## 目次

1. 要旨	3
2. 背景	4
3. 対象と方法	5
4. 結果	7
5. 考察	9
6. 結語	11
7. 表	12
8. 図	15
9. 参考文献	19

## 1. 要旨

我々は、切除不能再発進行結腸直腸癌患者に対して初回治療としてオキサリプラチンを含む化学療法と組み合わせた HLA\*2402 拘束性 CTL によって認識された 5 つの新規ペプチドを用いたがんワクチン療法の第 2 相臨床試験 (FXV study) を以前に報告し、この 5 つのペプチドカクテル療法の安全性と有望な可能性を実証した。この度の分析の目的は免疫化学療法における臨床的な利益を享受する可能性の高い患者を同定するための予測バイオマーカーを同定することである。血漿中を循環している cell-free DNA は癌治療における有効性を予測する分子バイオマーカーであることが報告されている。アポトーシスした正常細胞から放出される小さなサイズの DNA と異なり、ネクローシスした腫瘍細胞から放出される DNA のサイズは様々である。それら長い断片の DNA(400bp)と短い断片の DNA(100bp)の比である cell-free DNA integrity は結腸直腸癌の進行を検出するために臨床的に有効である。そこで我々は免疫化学療法を受ける 93 名の患者の治療前血漿を採取し、cell-free DNA および integrity を半定量リアルタイム PCR を用いて分析した。血漿中の cell-free DNA integrity が低い患者は無増悪生存期間が有意に良好であった ( $p=0.0027$ )。加えて、HLA-A \* 2402 適合群では、血漿中の cell-free DNA integrity が低い患者は、高い患者よりも有意に無増悪生存期間が延長していた ( $p=0.0015$ ) が、この差異は HLA-A \* 2402 不一致群では観察されなかった。結論として、血漿中の cell-free DNA integrity は進行再発結腸直腸癌患者における免疫療法の有用な予後予測バイオマーカーとなり得る。

## 2. 背景

結腸直腸癌は、先進国において3番目に一般的な癌であり、癌関連死亡の第2位の原因である<sup>1)</sup>。細胞傷害性薬物および新しい生物学的薬剤の利用にもかかわらず、転移性結腸直腸癌の予後は依然として不良である。多くの患者には緩和的な化学療法が行われているが、副作用のリスクは高い状態である。したがって、対象患者の慎重な選択と治療中のモニタリングは必須である<sup>2-6)</sup>。

転移性結腸直腸癌を克服するための新たな治療法を確立するために、我々は、腫瘍抗原に由来する3つのペプチドを含むカクテル療法 (ring finger protein 43 (RNF43)<sup>8)</sup>, 34-kDa translocase of the outer mitochondrial membrane (TOMM34)<sup>9)</sup>, IGF-II mRNA binding protein 3 (KOC1, also known as IMP-3)<sup>10)</sup>, and two peptides targeting vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1)<sup>11)</sup> and VEGFR2<sup>12)</sup>) の安全性を確認する第1相ワクチン試験<sup>7)</sup>を実施した。我々はさらに、標準化学療法とこれら5種類の新規治療用ペプチドとの併用療法の第2相試験を実施した<sup>13)</sup>。しかし、進行した病態の患者や免疫状態が非常に悪い患者が、臨床試験に登録されるため、治療の生存利益を評価することは困難である<sup>14)</sup>。したがって、治療に反応する可能性のある患者を適切に選択する予後予測バイオマーカーが必要とされている<sup>15)</sup>。

血中を循環する無細胞DNA (cell-free DNA; cfDNA) および長鎖 cfDNA / 短鎖 cfDNA の比として定義された cfDNA integrity は、結腸直腸癌および乳癌の診断的バイオマーカーとして有望なものであることが示されている<sup>16-19)</sup>。血中 cfDNA は、様々な腫瘍の悪性度を評価するための使いやすいツールとして、注目を集めている<sup>20-22)</sup>。CfDNA は、悪性腫瘍の強力な診断および予後マーカーとし



て関与しているが、その限界として、腫瘍由来および非腫瘍由来の cfDNA が存在することと関連している。CfDNA の由来に関しては、腫瘍自体の活性化、壊死、アポトーシス、有糸分裂、自己食、腫瘍細胞の破裂、または微小転移の循環など、多くの異なる仮説が報告されている<sup>23)</sup>。中でも、大部分の研究は、それがアポトーシスまたは壊死の結果として起こるとされている<sup>24)</sup>。これらの2つの現象は、DNA 断片の大きさによって区別することができるといわれている。すなわち、細胞のアポトーシスによるものは、200bp より短い DNA 断片として末梢循環へと放出されるが、腫瘍壊死によるものは、大きさが変化し 200 bp 以上の長い DNA 断片として放出される<sup>25)</sup>。したがって、高い cfDNA integrity は、腫瘍細胞崩壊が高度であることを示している。一方、結腸直腸癌には、APC、TP53、KRAS、BRAF などの主要な変異があり、腫瘍関連変異を発現する循環腫瘍 DNA のデータを示す方が良いかもしれないが、結腸直腸癌のすべてで検出される共通の遺伝子変異は存在しない<sup>26)</sup> ため、今回の研究では、cfDNA integrity を調べ、腫瘍由来の cfDNA の割合を決定した。この研究の目的は、cfDNA integrity が、転移性結腸直腸癌患者の免疫化学療法に対するバイオマーカーとなり得るかを検討するものである。

### 3. 対象と方法

#### 3-1. 研究デザイン

この研究の詳細なプロトコールは、以前に記載されている<sup>18)</sup> が、簡単に述べると、我々は HLA-A

\* 2402 拘束性 CTL によって認識される5つのペプチド(RNF43、TOMM34、KOC1 (IMP-3)、VEGFR1、

および VEGFR2) を用いた非ランダム化 HLA-A 状態を二重盲検とした第 2 相試験を実施した。この研究で使用されたペプチドは HLA-A\* 2402 拘束性であったが、全ての登録患者にペプチドカクテルおよびオキサリプラチンを含む有化学療法と同じレジメンを投与した。2009 年 1 月から 2012 年 11 月の間に、96 人の切除不能進行結腸直腸癌患者が初回化学療法と組み合わせてペプチドカクテル治療を受け、治療前血漿が評価可能であった 93 人を対象とした。この研究は、ヒトを対象とした試験に関するヘルシンキ宣言に基づいて行われ、山口大学機関倫理審査委員会 (H20-102) の承認を得て、UMIN 臨床試験登録簿 (UMIN000001791) に登録された。

### 3-2. 患者と血漿

治療前血漿サンプルは、第 2 相試験で治療された結腸直腸癌患者 93 名 (HLA-A2402 適合、n = 49、および HLA 非適合、n = 44) から cfDNA 分析が可能であった。各患者からの末梢血を EDTA チューブに集め、血液サンプルを 4°C 下に 15 分間 400g で遠心分離し、次いで、血漿を採取し、使用するまで -80°C で保存した。

### 3-3. DNA integrity 解析

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて 500  $\mu$ l の血漿から DNA を精製した。PicoGreen dsDNA 定量キット (Molecular Probes, Inc., Eugene, US) を使用して DNA 濃度を測定した。DNA integrity は、LightCycler (Roche, Penzberg, DE) を用いた半定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて、すべての正常細胞および腫瘍細胞に存在する可能性のある  $\beta$ -アクチン遺伝子の PCR 産物として 400-bp の 100-bp に対する相対存在量を測定した。100bp



および 400bp の両方の PCR 断片は forward プライマー : 5'-GCACCACACCTTCTACAATGA-3' とし、 reverse プライマーはそれぞれ 5'-GTCATCTTCTCGCGGTTGGC-3' and 5'-TGTCACGCACGATTTCCC-3' とした。PCR 条件は、95°C で 3 分間の変性、続いて 95°C で 30 秒間の変性、57°C (100bp) または 56°C (400bp) での 30 秒間のアニーリング、および伸長 72°C、10 秒間 (100bp) または 15 秒間 (400bp) とした。各反応の閾値 (Ct) 値は、Light cycler ソフトウェアパッケージによって計算され、100bp の  $\Delta Ct$  値から 400bp の  $\Delta Ct$  値を差し引いて  $\Delta \Delta Ct$  値を得て、integrity は  $(-\Delta \Delta Ct \times \text{LN } 2)$  の指数として計算した。

### 3-4. 統計分析

Kaplan-Meier 法により、全生存期間 (OS) および無増悪生存期間 (PFS) を分析し、初回ワクチン接種から患者死亡日までの日数で生存を測定した。P 値は対数ランク検定を用いて評価した。Cox の比例ハザードモデルおよびロジスティック回帰モデルを使用して、治療効果のハザード比 (HR) を推定した。全ての統計分析は、SPSS Statistics 20.0 (SPSS, Chicago, US) を用いて行った。p < 0.05 を統計的に有意であるとした。

## 4. 結果

### 4-1. 患者背景

患者の臨床的特徴を表 1 に示す。ベースライン特性のいずれも、HLA 適合群と HLA 非適合群の間に有意差はなかった。

#### 4-2. cfDNA および cfDNA integrity

93名の患者の治療前の cfDNA および cfDNA integrity を表2に示す。

#### 4-3. cfDNA レベルと治療反応

患者を中央値で分け cfDNA 高値群と低値群の2群とした。HLA 適合群と HLA 非適合群の奏効率はそれぞれ 63.2%と 61.3%であった ( $p = 0.910$ )。

HLA 適合群では、完全奏効、部分奏効、および安定の割合は、それぞれ 2.0% (1/49)、61.2% (30/49)、および 32.6% (16/49) であり、HLA 非適合群ではそれぞれ 0% (0/44)、61.3% (27/44)、および 38.6% (17/44) であった。

cfDNA レベルによって奏効率に有意差はなかった。同様に、cfDNA レベルによって cfDNA integrity の値に有意差はなかった。

#### 4-4. cfDNA レベルと生存率

cfDNA レベルがによって PFS (図 1A) および OS (図 1B) に有意差はなかった。

#### 4-5. cfDNA integrity と生存率

次に、我々は cfDNA integrity の値の中央値によって患者を2つの群に分類した。cfDNA integrity の低い群が、オキサリプラチンを含むペプチドカクテル療法において、PFS を延長する予後マーカーであることを見出した (図 2A,  $p = 0.027$ )。対照的に、OS は cfDNA integrity が高い群 ( $cf = 0.756$ , 図 2B) でやや良い傾向があったが、有意差は認めなかった。

驚くべきことに、HLA-A \* 2402 適合群では、低い cfDNA integrity 値を有する患者は、高い値を



有する患者よりも有意に良好な PFS を有した ( $p = 0.0015$ ; 図 3A)。対照的に、HLA-A \* 2402-不一致群では、cfDNA integrity 値によって患者間に差はなかった (図 3B)。したがって、cfDNA integrity は、ペプチドワクチン治療における PFS の予測的なバイオマーカーであり得る。

Cox 回帰モデルの多変量解析では、cfDNA integrity が、HLA-A \* 2402 適合群における PFS の最も重要な予測因子であることを示した [ $p = 0.0037$ ; HR = 2.66; 95%信頼区間 (CI) = 1.34~5.44、表 3]。対照的に、HLA-A \* 2402 摘豪軍 (図 4A) および HLA-A \* 2402 非適合群 (図 4B) の両方において、cfDNA integrity 値によって OS に有意差はなかった。

## 5. 考察

宿主免疫系の維持は、能動的特異的免疫療法にとって必須である。したがって、免疫療法の臨床反応を予測するためのバイオマーカーの探索が重要である<sup>27)</sup>。我々は、切除不能進行大腸癌に対するオキサリプラチンを含む化学療法と組み合わせたペプチドカクテルワクチンの以前の第 2 相試験の臨床情報と患者サンプルに基づいて、免疫化学療法の有効性について予測可能なバイオマーカーを探索した<sup>7,13,15)</sup>。

我々の知る限りでは、本研究は、cfDNA integrity が免疫化学療法の有効性を予測するバイオマーカーである可能性を報告する最初の研究である (図 2 および図 3)。本研究では、PFS は、cfDNA integrity 高値群と比較し、低値群の患者において良好であった ( $p = 0.0027$ 、図 2A)。そして、この有意性は、HLA-A \* 2402 適合群 ( $p = 0.0015$ 、図 3A) ではより明確に観察され、HLA-A \* 2402

不一致群 ( $p = 0.4542$ 、図 3B) では観察されなかった。これらの結果は、cfDNA integrity が化学療法ではなく、ペプチドワクチン療法の予測バイオマーカーであることを示した。

アポトーシスまたは壊死に至った腫瘍細胞の免疫強度は、抗腫瘍免疫の観点から様々な議論が行われている<sup>28,29</sup>。腫瘍微小環境において、壊死<sup>30</sup>は、調節性 T 細胞、骨髄由来抑制細胞および間葉間質細胞の誘導を介して強い免疫抑制を引き起こす損傷関連パターン分子の放出をもたらすことが報告されている<sup>31</sup>。血漿中 cfDNA integrity は、ペプチドワクチンによる免疫療法の効力を予測するために、腫瘍の壊死量および腫瘍部位の免疫抑制微小環境を、遠隔的に検出するための liquid biopsy と言える。cfDNA integrity 高値は、誘導性免疫抑制を促進し、免疫療法に対する耐性およびより短い PFS を導く高度の腫瘍崩壊および過剰な腫瘍壊死を示す<sup>32</sup>。さらに、cfDNA の半減期は末梢血において数分から数時間と報告されているため<sup>33-35</sup>、cfDNA integrity は、生体内で起こるプロセスをリアルタイムに測定することが出来る。

一方、OS に関しては cfDNA integrity の値による有意差は認められなかった (図 2B)。腫瘍の微小環境は、化学療法後に腫瘍内大量の壊死により変化し、損傷関連パターン分子<sup>31,32</sup> が放出されていることが推測された。よって差が生じなかったと推察された。癌に対する現在の治療戦略 (化学療法、放射線療法、およびホルモン療法) のほとんどは、腫瘍壊死による治療誘発性の損傷関連パターン分子の放出を促進する。そして調節性 T 細胞は、腫瘍微小環境におけるパターン認識受容体シグナル伝達によって強く影響され、骨髄由来抑制細胞と協調して免疫反応性を制限する。これら併用免疫化学療法の限界を克服するために、免疫抑制腫瘍微小環境を調節するためにいくつかの追加

の治療が必要とされ得る。シクロホスファミド<sup>36,37)</sup>、COX-2 阻害剤<sup>38)</sup>、メトホルミン<sup>39)</sup>、およびシメチジン<sup>40)</sup>などのいくつかの一般的に使用される薬物は、腫瘍微小環境における抑制性免疫状態を改変することが示されており、ペプチドワクチンによって誘導される免疫応答を増強する可能性がある。

## 6. 結語

血漿中の cfDNA integrity 値は、免疫療法の有用な治療効果予測バイオマーカーであり、免疫化学療法にいくつかの免疫調節剤の加えることは考慮されるべきである。



表 1. Patient characteristics

Characteristic	HLA-A*2402		p value
	Matched (n=49)	Unmatched (n=44)	
Age	64.1±1.5	63.4±1.2	NS
Sex			
Male	25	22	NS
Female	24	22	
Unresectable metastatic organ			
Liver	27	34	
Lung	18	12	
Peritoneum	5	4	NS
Lymph node	12	12	
Others	5	1	
Number of involved organs			
1	35	29	NS
2	9	10	
3	5	5	
Resection of primary lesion			
yes	40	41	NS
no	9	3	
Tumor marker			
CEA	1220±684	341±86	NS
CA19-9	3609±2157	4506±3457	

Date are expressed as mean ± standard error. HLA, human leukocyte antigen; NS, not significant. CEA, carcinoembryonic antigen; CA19-9, carbohydrate antigen.



表 2. Results of Cell-free DNA levels before treatment

Marker	HLA-A*2402	
	Matched (n=49)	Unmatched (n=44)
Cell-free DNA amount (ng/ml plasma)	25.10±3.59	22.78±3.49
Integrity (400-bp /100-bp ratio)	0.37±0.03	0.28±0.02

Data are expressed as mean ± standard error. HLA, human leukocyte antigen

表 3. Univariate and Multivariate analysis of biomarkers for progression free survival using Cox regression model

Factor	Cut-off	Multivariate analysis					
		HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
CEA (ng/ml)	$\geq 2 \times$ ULN	1.21	0.63 to 2.23	0.5433			
CA19-9 (U/ml)	$\geq 2 \times$ ULN	0.95	0.51 to 1.85	0.8885			
CRP (mg/dl)	$\geq 1$	1.2	0.60 to 2.28	0.5799			
Number of involved organs	$\geq 2$	1.32	0.66 to 2.46	0.4064			
cfDNA	$\geq$ median	1.24	0.69 to 2.22	0.4644			
cfDNA integrity	$\geq$ median	2.73	1.42 to 5.48	0.0023	2.64	1.34 to 5.44	0.0045

CEA, carcinoembryonic antigen; CA19-9, carbohydrate antigen 19-9; CRP, C-reactive protein; ULN, upper normal of limit; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; cfDNA, cell free DNA.

Figure 1.

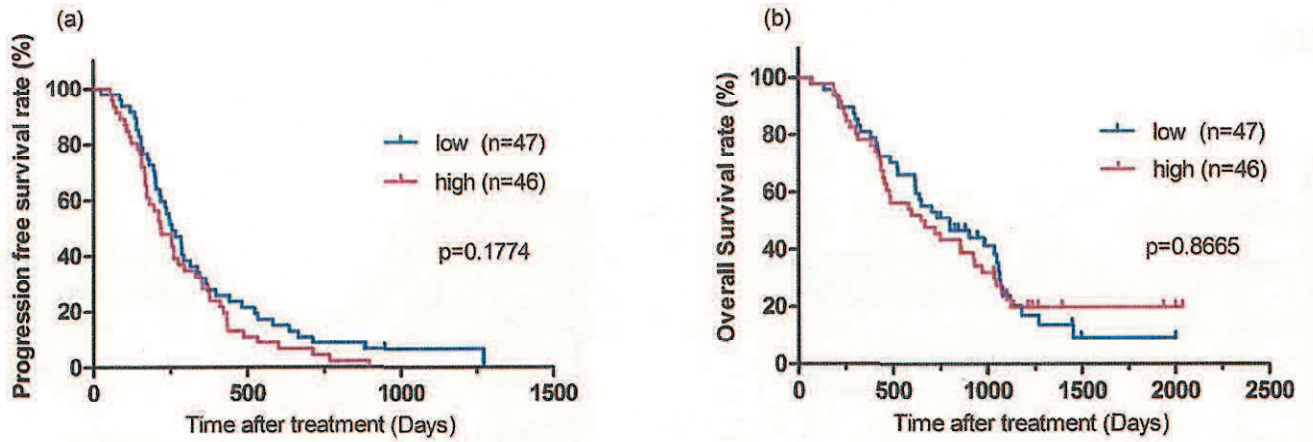


Figure 1. Kaplan-Meier survival plots of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in patients with a plasma cell-free DNA level higher or lower than the median. (a) PFS. (b) OS.

Figure 2.

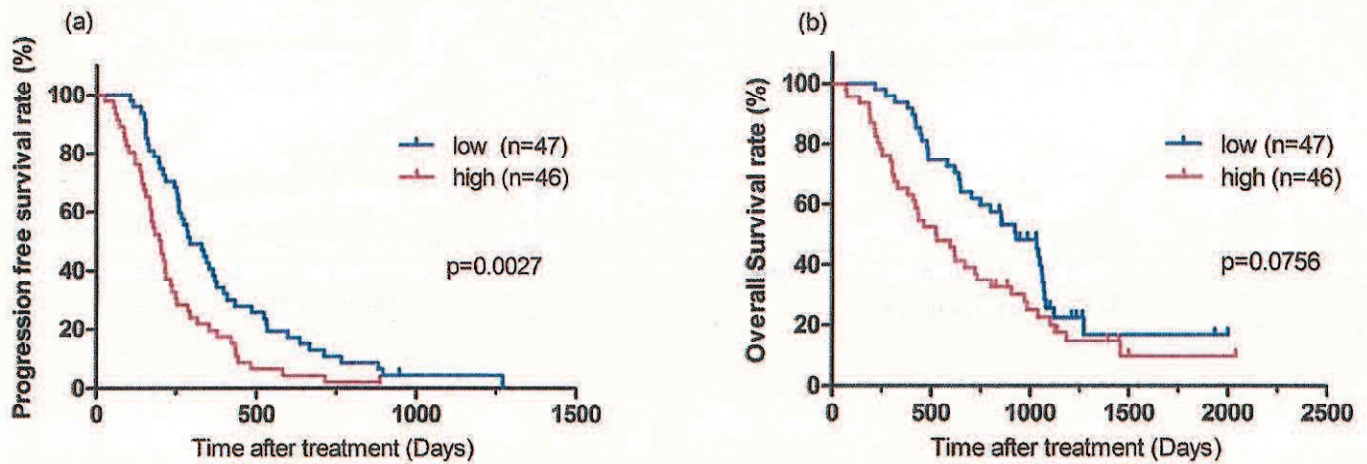


Figure 2. Kaplan-Meier survival plots of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in patients with a plasma cell-free DNA integrity value higher or lower than the median. (a) PFS. (b) OS. The log-rank test indicated that cell-free DNA integrity might be a predictive biomarker for PFS ( $p = 0.0027$ ).



图 3.

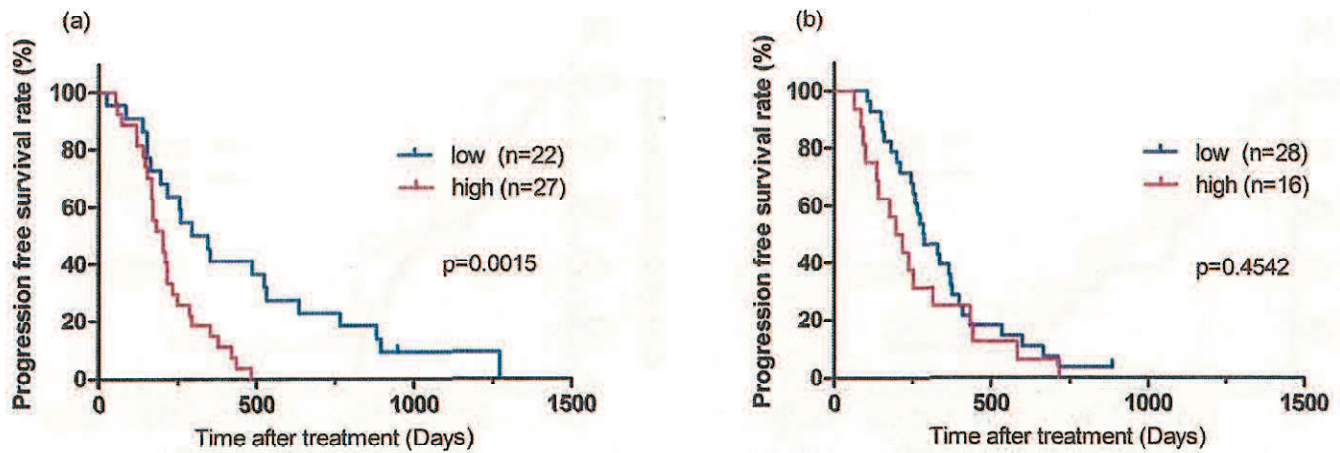


图 3. Kaplan-Meier survival plots of progression-free survival (PFS) in patients with a plasma cell-free DNA integrity value higher or lower than the median. (a) HLA-A\*2402-matched group. (b) HLA-A\*2402-unmatched group. In the HLA-A\*2402-matched group, cell-free DNA integrity might be a predictive biomarker for PFS ( $p = 0.0015$ ).

图 4.

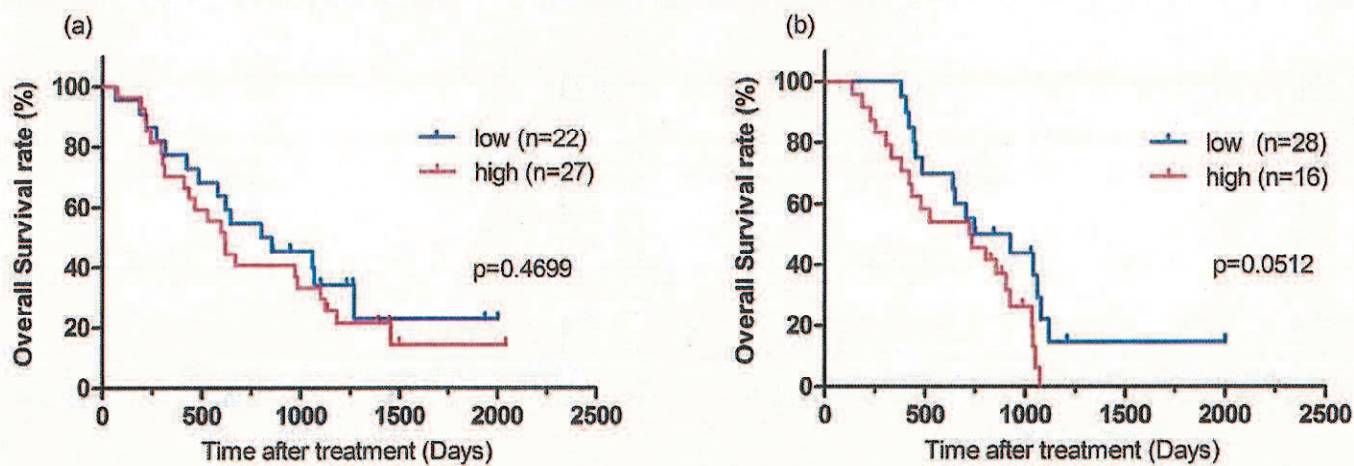


图 4. Kaplan-Meier survival plots of overall survival (OS) in patients with a plasma cell-free DNA integrity value higher or lower than the median. (a) HLA-A\*2402-matched group. (b) HLA-A\*2402-unmatched group.

## 9. 参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136: E359-86.
- [2] Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 2006-12.
- [3] Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 2013-9.
- [4] Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 4697-705.
- [5] Hegewisch-Becker S, Graeven U, Lerchenmuller CA, et al. Maintenance strategies after first-line oxaliplatin plus fluoropyrimidine plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer (AIO 0207): a randomised, non-inferiority, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2015; 16: 1355-69.



- [6] Tabernero J, Yoshino T, Cohn AL, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2015; 16: 499-508.
- [7] Hazama S, Nakamura Y, Takenouchi H, et al. A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer: safety, immunological response, and clinical outcome. *Journal of translational medicine*. 2014; 12: 63.
- [8] Yagyu R, Furukawa Y, Lin YM, Shimokawa T, Yamamura T, Nakamura Y. A novel oncoprotein RNF43 functions in an autocrine manner in colorectal cancer. *International journal of oncology*. 2004; 25: 1343-8.
- [9] Shimokawa T, Matsushima S, Tsunoda T, Tahara H, Nakamura Y, Furukawa Y. Identification of TOMM34, which shows elevated expression in the majority of human colon cancers, as a novel drug target. *International journal of oncology*. 2006; 29: 381-6.
- [10] Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, et al. Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene*. 2003; 22: 2192-205.



- [11] Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95: 11709-14.
- [12] Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993; 72: 835-46.
- [13] Hazama S, Nakamura Y, Tanaka H, et al. A phase II study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). *Journal of translational medicine*. 2014; 12: 108.
- [14] Nagorsen D, Thiel E. Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006; 12: 3064-9.
- [15] Hazama S, Takenouchi H, Tsunedomi R, et al. Predictive biomarkers for the outcome of vaccination of five therapeutic epitope peptides for colorectal cancer. *Anticancer research*. 2014; 34: 4201-5.
- [16] Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU

- repeats. *Clinical chemistry*. 2006; 52: 1062-9.
- [17] Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 4270-6.
- [18] Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology*. 2007; 39: 197-207.
- [19] Kamat AA, Sood AK, Dang D, Gershenson DM, Simpson JL, Bischoff FZ. Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1075: 230-4.
- [20] Marzese DM, Hirose H, Hoon DS. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert review of molecular diagnostics*. 2013; 13: 827-44.
- [21] Tokuhisa Y, Iizuka N, Sakaida I, et al. Circulating cell-free DNA as a predictive marker for distant metastasis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer*. 2007; 97: 1399-403.
- [22] Tomochika S, Iizuka N, Watanabe Y, et al. Increased serum cell-free DNA levels in relation to inflammation are predictive of distant metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Experimental and therapeutic medicine*. 2010; 1: 89-92.
- [23] Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or

- serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutation research*. 2007; 635: 105-17.
- [24] Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001; 313: 139-42.
- [25] Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*. 1998; 17: 89-97.
- [26] Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*. 2015; 349: 1483-9
- [27] Whiteside TL. Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis? *Frontiers in oncology*. 2013; 3: 107.
- [28] Schmidt SV, Seibert S, Walch-Ruckheim B, et al. RIPK3 expression in cervical cancer cells is required for PolyIC-induced necroptosis, IL-1alpha release, and efficient paracrine dendritic cell activation. *Oncotarget*. 2015; 6: 8635-47.
- [29] Imamura R, Wang Y, Kinoshita T, et al. Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010; 184: 5874-84.



- [30] Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010; 11: 700-14.
- [31] Lotfi R, Kaltenmeier C, Lotze MT, Bergmann C. Until Death Do Us Part: Necrosis and Oxidation Promote the Tumor Microenvironment. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. 2016; 43: 120-32.
- [32] Seifert L, Werba G, Tiwari S, et al. The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature*. 2016; 532: 245-9.
- [33] Fleischhacker M1, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1775: 181-232.
- [34] Diehl F1, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. 2008; 14: 985-90.
- [35] Yahya I. Elshimali, Husseina Khaddour, Marianna Sarkissyan, Yanyuan Wu, Jaydutt V. Vadgama. The Clinical Utilization of Circulating Cell Free DNA (CCFDNA) in Blood of Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2013; 14: 18925-18958
- [36] Noguchi M, Moriya F, Koga N, et al. A randomized phase II clinical trial of



personalized peptide vaccination with metronomic low-dose cyclophosphamide in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 2016; 65: 151-60.

[37] Kan S, Hazama S, Maeda K, et al. Suppressive effects of cyclophosphamide and gemcitabine on regulatory T-cell induction in vitro. *Anticancer research*. 2012; 32: 5363-9.

[38] Gobel C, Breitenbuecher F, Kalkavan H, et al. Functional expression cloning identifies COX-2 as a suppressor of antigen-specific cancer immunity. *Cell death & disease*. 2014; 5: e1568.

[39] Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udono H. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015; 112: 1809-14.

[40] Lefranc F, Yeaton P, Brotchi J, Kiss R. Cimetidine, an unexpected anti-tumor agent, and its potential for the treatment of glioblastoma (review). *International journal of oncology*. 2006; 28: 1021-30.