

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07027

研究課題名(和文)口腔癌 liquid biopsy における exosomal RNA の有用性

研究課題名(英文)Utility of exosomal RNA in liquid biopsy for oral cancer

研究代表者

浜川 知大 (HAMAKAWA, Tomohiro)

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60723848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：4種類の口腔扁平上皮癌細胞を用いて次世代シーケンス解析を行い、HSC2、KT-T、KT-N細胞でPIK3CA H1047Rの変異を認め、KT-N細胞でHRAS Q61Rの遺伝子変異を認めた。SNPジェノタイピング解析でこれらの細胞および細胞由来exosomal RNAから同様の遺伝子変異を検出でき、腫瘍移植ヌードマウスの血清から抽出したexosomal RNAからも同様の結果を確認した。また、デジタルPCR法でも同様の遺伝子変異を検出することができた。口腔扁平上皮癌患者の腫瘍組織を用いて同様の解析を行うも、PIK3CAやHRASなどOncogenicな遺伝子変異を認める症例はほとんどなかった。

研究成果の概要(英文)：I performed next-generation sequence analysis using four kinds of oral squamous cell carcinoma cells and found the somatic mutation of HRAS Q61R in KT-N cells, the mutation of PIK3CA H1047R in HSC2, KT-T, KT-N cells. I could detect similar somatic mutations in exosomal RNA derived from these cells by SNP genotyping assay and confirmed similar results from the exosomal RNA which I extracted from the serum of the tumor bearing nude mouse. In addition, even the digital PCR method was able to detect similar somatic mutations. As for the case to accept the Oncogenic somatic mutations including PIK3CA and HRAS, it was rare though I performed similar analysis using a tumor tissue of the oral squamous cell carcinoma patient.

研究分野：口腔癌

キーワード：Exosome RNA 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の治療成績を飛躍的に向上させるためには二つの戦略が挙げられる。一つは、二次予防すなわち口腔癌の早期発見を徹底することである。もう一つは、進行口腔癌(再発、転移癌を含む)に対する新規治療法の開発である。

最近、口腔を含む頭頸部扁平上皮癌のエキソーム解析により口腔癌の悪性形質を支持する遺伝子変異が明らかにされた。これら遺伝子変異を利用した合成致死を誘導する薬剤や直接標的とする創薬は進行口腔癌の治療成績を向上させるだろう。ここで、重要となるのは進行口腔癌に対してどの分子標的薬を選択して治療に用いるかである。それは、おそらく個々の症例の腫瘍遺伝子変異に依るところになると考えられる。これまでに、われわれは口腔癌患者の血液あるいは唾液中に含まれる特有の microRNA、蛋白質、代謝産物などを網羅的に解析により同定してきた。しかしながら、これらは口腔癌の早期発見や治療後のモニタリングには有用となるものの、治療すなわち分子標的薬の選択に何らかの示唆を与えるものではない。

一方、1996年に腫瘍由来血中遊離 DNA (cell-free circulating tumor DNA: ctDNA) の存在が初めて報告され、その翌年には母体の血漿から胎児の DNA の検出が可能であることが明らかにされた。1999年には、肝癌を含めた種々の癌腫と関連する DNA メチル化マーカーが ctDNA から検出され、癌のバイオマーカーとしての有用性が実証された。次いで、2009年にはデジタル PCR により腫瘍特有の突然変異、すなわち上皮成長因子受容体 (EGFR) の変異が ctDNA から検出された。これは、肺癌の EGFR 変異の状態からゲフィチニブに対する感受性を判定できることから癌診療に大きなインパクトを与える研究成果となった。したがって、ctDNA の検出は口腔癌の存在を示すものとなるし、ctDNA のシーケンシングは各症例の腫瘍遺伝子変異の把握を可能にする。

よって、上述の二つの戦略を遂行する上で不可欠となるのが ctDNA を検査対象とした liquid biopsy である。これまでに、われわれも口腔扁平上皮癌患者の ctDNA から腫瘍遺伝子変異の検出を試みたが検体の絶対量と検出感度の点から極めて困難であることが判明した。

そこで、本研究では血清由来 exosomal RNA の口腔癌 liquid biopsy における有用性を検証することとした。Exosomal RNA を用いた腫瘍遺伝子変異の検出は、口腔癌の早期発見および個々の患者にとって最善と推定される分子標的薬の選択を可能とするはずである。

2. 研究の目的

Liquid biopsy とは液体生検とも言われるがごとく、血漿中の遊離 DNA の塩基配列を

決定し腫瘍遺伝子変異を検索する技術のことであり、種々の癌腫においてその有用性が明らかにされている。本研究では、口腔癌診療における liquid biopsy の検出対象として exosomal RNA の有用性を明らかにすることを目的とする。すなわち、口腔癌患者の血清より exosomal RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子変異解析を行う。そして、原発腫瘍組織由来 genomic DNA から検出される腫瘍特異的な遺伝子変異との合致率を評価する。また、口腔癌患者の治療前後や再発時の採血より時系列で血清 exosomal RNA をサンプリングし、シーケンシングを行うことにより経時的な腫瘍特異的な遺伝子変異の変化を検出する。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞

口腔扁平上皮癌患者由来血清 exosomal RNA の有用性の検討に先立ち、口腔扁平上皮癌細胞における exosomal RNA の有用性について検討を行うため、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である GFP-SAS 細胞、HSC2 細胞と、下顎歯肉癌患者から初代培養して樹立した原発組織由来の KT-T 細胞、転移リンパ節組織由来の KT-N 細胞の 4 種類を研究に使用した。

(2) 次世代シーケンス解析による遺伝子変異解析

前述の 4 種類の細胞から genomic DNA を抽出し、HaloPlex Cancer Panel (アジレント) を用いてターゲットエンリッチアンプリコンライブラリーを作製した。デスクトップ型次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ) にてディープシーケンシングを行い、得られたシーケンスデータを変異解析ソフトウェア SureCall (アジレント) を用いて変異を検出した。

(3) TaqMan® SNP ジェノタイピング解析による遺伝子変異解析

TaqMan® RNA-to-cDNA™ 1-Step Kit および TaqMan® SNP Genotyping Assays (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて PIK3CA (H1047R) と HRAS (Q61R) の変異の検出を行った。

(4) 腫瘍移植ヌードマウスの血清 exosomal RNA における遺伝子変異解析

ヌードマウスの背部皮下に KT-T 細胞、KT-N 細胞を移植して腫瘍形成させ、腫瘍増大後のマウス血清から exosomal RNA を抽出し、ジェノタイピング解析によって同様の遺伝子変異解析を行った。

(5) デジタル PCR 法による遺伝子変異の検出

QuantStudio™ Digital PCR system および QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ (サーモフ

イッシャーサイエンティフィック) と PIK3CA (H1047R)、HRAS (Q61R) に特異的な TaqMan プロープライマーを使用してデジタル PCR 法にて遺伝子変異の検出を行った。

4. 研究成果

GFP-SAS、HSC2、KT-T、KT-N の 4 種類の細胞から抽出した genomic DNA (225 ng) をもとに次世代シーケンシングを行った結果、HSC2、KT-T、KT-N の 3 種類の細胞には PIK3CA (H1047R) の遺伝子変異を認め、KT-N 細胞では HRAS (Q61R) の遺伝子変異も認めた。

GFP-SAS

Gene	Pos	Function Class	Codon	AA
FGFR3	1807894	SILENT	acG/acA	T539
RET	43613843	SILENT	ctG/ctT	L769
WT1	32417945	SILENT	cgA/cgG	R140
FANCA	89849480	MISSENSE	Ggc/Agc	G501S
TP53	7574021	NONSENSE	Gag/Tag	E204*

HSC2

Gene	Pos	Function Class	Codon	AA
PIK3CA	178952085	MISSENSE	cAt/cGt	H1047R
RET	43613843	SILENT	ctG/ctT	L769
WT1	32417945	SILENT	cgA/cgG	R140
WT1	32456298	SILENT	aaC/aaT	N198
FANCA	89849480	MISSENSE	Ggc/Agc	G501S

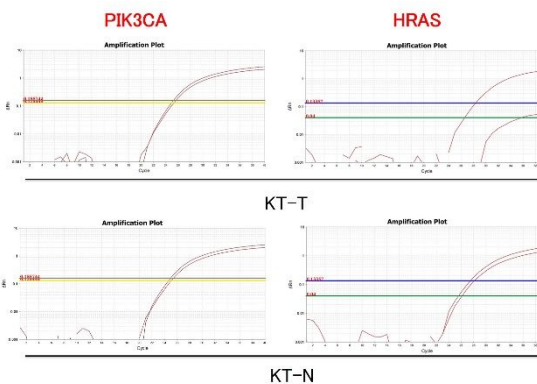
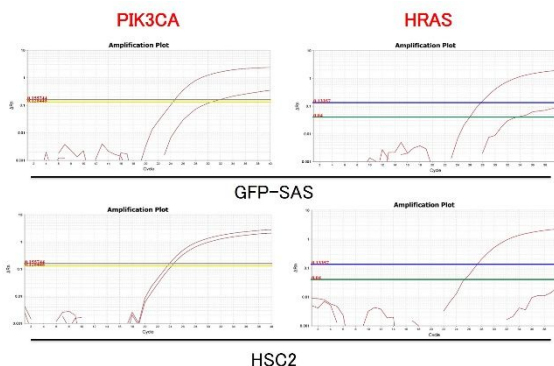
KT-T

Gene	Pos	Function Class	Codon	AA
PIK3CA	178952085	MISSENSE	cAt/cGt	H1047R
FGFR3	1807894	SILENT	acG/acA	T539
PIK3R1	67588148	MISSENSE	atG/atA	M26I
RET	43609098	SILENT	tgC/tgT	C618
RET	43613843	SILENT	ctG/ctT	L769
WT1	32417945	SILENT	cgA/cgG	R140
WT1	32456562	SILENT	ccC/ccT	P110
FANCA	89849480	MISSENSE	Ggc/Agc	G501S
TP53	7577120	MISSENSE	cGt/cCt	R141P
TP53	7578526	MISSENSE	tGc/tCc	C135S

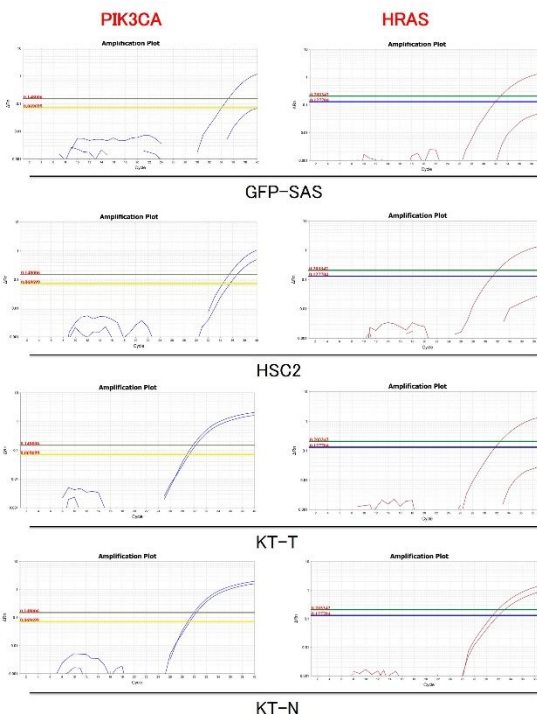
KT-N

Gene	Pos	Function Class	Codon	AA
PIK3CA	178952085	MISSENSE	cAt/cGt	H1047R
FGFR3	1807894	SILENT	acG/acA	T539
PIK3R1	67588148	MISSENSE	atG/atA	M26I
RET	43609098	SILENT	tgC/tgT	C618
RET	43613843	SILENT	ctG/ctT	L769
HRAS	533874	MISSENSE	cAg/cGg	Q61R
WT1	32417945	SILENT	cgA/cgG	R140
WT1	32456562	SILENT	ccC/ccT	P110
FANCA	89849480	MISSENSE	Ggc/Agc	G501S
TP53	7577120	MISSENSE	cGt/cCt	R141P
TP53	7578188	NONSENSE	Gag/Tag	E182*

次世代シーケンス解析の結果を確認すべく、細胞由来の mRNA をもとに TaqMan® SNP ジェノタイピング解析を行ったところ、前述の結果と同様に HSC2、KT-T、KT-N の 3 種類の細胞で PIK3CA (H1047R) の遺伝子変異を認め、KT-N 細胞のみで HRAS (Q61R) の遺伝子変異を認めた。



これら細胞の培養上清からエクソソームを回収し、exosomal RNA をもとに同様のジェノタイピング解析を行った結果、同様に HSC2、KT-T、KT-N の 3 種類の細胞で PIK3CA (H1047R) の遺伝子変異を認め、KT-N 細胞のみで HRAS (Q61R) の遺伝子変異を認めた。



次に、ヌードマウスの背部皮下に KT-T 細胞、KT-N 腫瘍を移植して腫瘍を形成させ、腫瘍増大後のマウスの血清から exosomal RNA を回収して遺伝子変異解析を行った結果、培養上清の結果と同様に、KT-T 細胞からは PIK3CA (H1047R) の変異を検出し、KT-N 細胞からは PIK3CA (H1047R) および HRAS (Q61R) の変異を検出した。

マウスの血清から得られた exosomal RNA 用いて遺伝子変異の検出は可能であったが、患者血清を用いて遺伝子変異を検出するにはリアルタイム定量化 PCR 法では検出感度に問題があり、デジタル PCR 法を用いてこれらの遺伝子変異の検出が可能かどうかを検討した。その結果、GFP-SAS 細胞由来の

exosomal RNA からは PIK3CA および HRAS の遺伝子変異は認めず、KT-T 細胞由来の exosomal RNA からは PIK3CA、KT-N 細胞由来の exosomal RNA からは PIK3CA および HRAS の遺伝子変異を認めた。

今回は口腔扁平上皮癌患者の腫瘍組織から genomic DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子変異の解析を行った。TP-53 の遺伝子変異を複数例で認めたが、PIK3CA や HRAS の遺伝子変異といった Oncogenic な遺伝子変異を認める症例はほとんどなかったため、血清 exosomal RNA からの遺伝子変異の検出についての検討は行うことができなかった。

以上の成果より、口腔扁平上皮癌細胞由来の exosomal RNA から遺伝子変異の検出は可能であり、liquid biopsy におけるバイオマーカーとしての有用性が示唆された。今後は患者由来血清 exosomal RNA からの遺伝子変異検出についてさらなる検討をすすめていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜川 知大 (HAMAKAWA Tomohiro)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60723848

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者