

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K16883

研究課題名（和文）遺伝子変異および発現分子解析に基づく外耳道扁平上皮癌に対する治療戦略構築

研究課題名（英文）The management for external auditory canal squamous cell carcinoma based on genomic and proteomic analysis

研究代表者

森田 真也 (MORITA, SHINYA)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：80443951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：外耳道扁平上皮癌組織に対して次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析を行い、病期進行や予後などの臨床的側面との関連性を検討した。検出された遺伝子変異の頻度は、TP53が59.1%、CREBBPが9.1%であった。現在まで頭頸部扁平上皮癌で同定されている主要な癌関連遺伝子であるNOTCH1、FAT1、CDKN2A、PIK3CAなどの遺伝子変異は同定されなかった。TP53変異は、T分類と有意な相関関係を示した（ $p=0.027$ ）。Cox比例ハザードモデルによる多変量解析では、TP53変異が外耳道扁平上皮癌患者の生存率に関して独立した予後因子であることが示された（ $p=0.007$ ）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の進歩は著しく、発癌や癌の増殖・生存を制御する癌遺伝子および発現分子を同定し、それらに対する分子標的薬の開発が行われている。本研究から、TP53変異が、外耳道扁平上皮癌の進展度および生存率を予測するためのバイオマーカーとなりえることが示唆された。また、皮膚癌の約30%程度で同定されるCREBBP変異が同定されたことより、外耳道扁平上皮癌の遺伝子変異は皮膚癌に類似している可能性も示唆された。外耳道扁平上皮癌における遺伝子変異および発現分子の解析を報告した研究は少ないため、基礎的な研究に基づいた治療戦略の構築に向けて意義深いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study analyzed genetic mutations based on targeted next-generation sequencing in tissue samples to explore somatic gene mutations associated with the clinicopathological features in patients with external auditory canal squamous cell carcinoma. Gene alterations were most frequently observed in TP53 (59.1%), followed by CREBBP (9.1%). However, except for TP53, this analysis did not identify mutations in major cancer-related gene, such as NOTCH1, FAT1, CDKN2A and PIK3CA. TP53 mutations showed significant correlation with T classification ($p=0.027$). Multivariable analysis using the Cox proportional hazards model demonstrated that TP53 mutations were independent predictors of overall survival rates for EACSCC patients ($p=0.007$).

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

キーワード：外耳道癌 扁平上皮癌 遺伝子解析 次世代シーケンサー 予後

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外耳道扁平上皮癌は100万人に1人の発生頻度で、頭頸部扁平上皮癌全体の約0.2%のみと稀な悪性腫瘍である。その希少性のため evidence level の高い臨床的研究は少なく、治療方針の選択や予後規定因子などに関して世界的に統一された見解が得られていない。一般的には早期例においては手術または放射線照射による治療で根治が可能とされる。しかし、進行例については側頭骨の解剖学的構造から切除不能となる症例も多く、拡大手術は術中・術後の致死率および合併症が問題となり、放射線化学療法や分子標的薬による治療に関しては有効性が限定的で依然として予後不良な疾患である。

近年の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の進歩は著しく、発癌や癌の増殖・生存を制御する driver oncogene が次々に報告され、それぞれに対する治療法や生存率の検討および分子標的薬の開発が行われている。頭頸部扁平上皮癌においても、*TP53*、*NOTCH1*、*FAT1*、*CDKN2A*、*PIK3CA* などの遺伝子変異が多くの症例において同定されており、これらの発現異常は、腫瘍増殖・浸潤、病期の進行、再発増加、放射線治療や化学療法に対する低感受性など予後不良因子として関与し、それぞれの発現分子をターゲットにした分子標的薬の治療効果も確認されている。しかしながら、外耳道扁平上皮癌は外耳道内の皮膚に発生し、外耳炎などの慢性炎症および耳かきなどによる機械的刺激が要因になっているとされ、また、飲酒・喫煙などの影響が少ないことから、口腔や咽頭などの粘膜より発生する他の頭頸部扁平上皮癌とは異なる遺伝子変異および発現を示す可能性も予測される。現状では皮膚と粘膜の上皮から発生するこれらの癌は組織学的に類似するものとして治療されているものの、粘膜より発生する他の頭頸部扁平上皮癌と異なり外耳道扁平上皮癌における遺伝子変異および発現分子の解析について検討した報告は国内・国外とも無いため、基礎的研究に強く裏打ちされた治療法の確立など臨床的研究について限界が生じてしまう。したがって、外耳道扁平上皮癌組織の遺伝子変異および発現分子解析に基づき発癌・増殖・浸潤の機構を解明し、臨床的側面との関連性について検討を行うことで、外耳道癌に対する基礎的研究に基づく治療戦略の構築が必要である。

2. 研究の目的

外耳道扁平上皮癌組織に対して次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析を行い、遺伝子変異および発現異常と病期進行や予後などの臨床的側面との関連性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 対象

2016年4月から2021年1月までの期間に、当施設で根治治療を行った外耳道扁平上皮癌患者を対象とした。外耳道扁平上皮癌の組織サンプルは生検または手術時に原発巣から採取され、PAXgene Tissue System (PreAnalytiX, QIAGEN, Hilden, NRW, Germany) を使用して固定され、DNA 抽出までパラフィンに包埋した。

(2) 次世代シーケンサー

ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、腫瘍細胞の割合が高く、炎症細胞の割合が少ないものを組織サンプルとして用いた。腫瘍細胞が20%未満の場合には、マクロダイセクションを施行

して腫瘍細胞の割合が高い領域を組織サンプルとして用いた。GeneRead DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN、Hilden、NRW、Germany)にてDNA抽出を行い、抽出されたDNAの品質はGeneRead DNA Quantimize Kits (QIAGEN、Hilden、NRW、Germany)を用いて評価した。ライブラリーを作成し、160遺伝子のエクソン領域をターゲットシーケンスする GeneRead Human Comprehensive Cancer Panel (NGHS-501X®, QIAGEN、Hilden、NRW、Germany)を用いて、Miseq (Illumina、San Diego、CA、USA)にてシーケンスを行った。

(3) 免疫染色

パラフィン包埋された組織標本を4µm厚に切離したのち、キシレンとエタノール類を通して再水和化し脱パラフィン処理を行った。0.01Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)中で15分間、750Wマイクロウェーブを用いて抗原賦活した。0.1%過酸化水素水を加えて内因性過酸化水素活性を不活化し、10%ヤギ正常血清と30分間反応させてブロッキングした。一次抗体としてp53モノクローナル抗体(D0-7、Roche Diagnostics Ltd.、Tokyo、Japan)を用い、4で12時間反応させた。二次抗体としてヒストファイン SAB-PO(M)キット(Nichirei、Tokyo、Japan)を用い、ストレプトアビジン-ビオチン複合体と反応させて発色させた。また、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

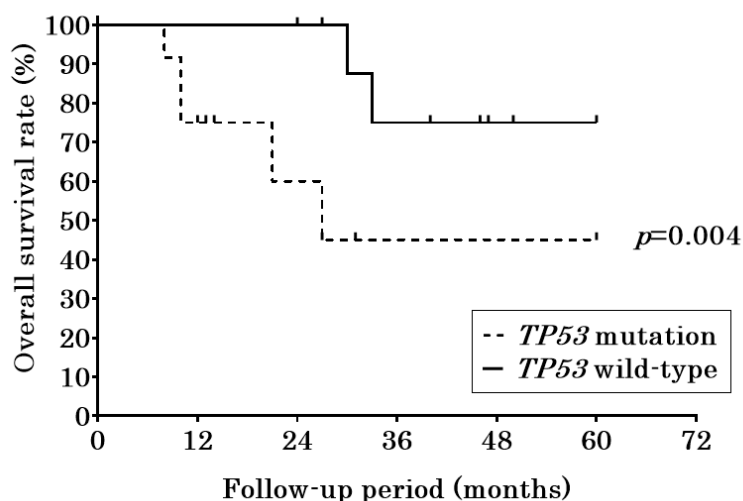
4. 研究成果

サンプルとして採取された外耳道扁平上皮癌組織32検体のうち、壊死組織や炎症・出血などの混入が多く、腫瘍組織由来のDNA量と品質が不十分と判断されたものは除外した。遺伝子解析に合格と判断された外耳道扁平上皮癌組織サンプルは22検体であった。

検出されたバリエーションをCOSMICおよびClinVarデータベースを用いて病原性を評価し、TP53(c.422G>A、c.916C>T、c.742C>T、c.527G>T、c.743G>A、c.752T>G、c.517G>T、c.586C>T、c.736A>G、c.451C>A、c.856G>A)とCREBBP(c.4337G>A)を同定した。遺伝子変異の頻度は、TP53が59.1%、CREBBPが9.1%であった。現在まで頭頸部扁平上皮癌で同定されている主要なoncogeneである、NOTCH1、FAT1、CDKN2A、PIK3CAなどの遺伝子変異は同定されなかった。TP53変異は、T分類と有意な相関関係を示した($p=0.027$)。年齢、性別、喫煙歴、飲酒歴、T分類、N分類、組織学的分化度などの因子と相関関係を示さなかった。

	n	TP53変異 (n, %)	p value
年齢			
≤ 65 歳	11	6 (54.5%)	>0.99
> 65 歳	11	6 (54.5%)	
性別			
女性	13	9 (69.2%)	0.19
男性	9	3 (33.3%)	
喫煙歴			
なし	9	6 (66.7%)	0.41
あり	13	6 (46.2%)	
飲酒歴			
なし	10	5 (50.0%)	>0.99
あり	12	7 (58.3%)	
T分類			
1-2	9	2 (22.2%)	0.027
3-4	13	10 (76.9%)	
N分類			
0	18	9 (50.0%)	0.59
1	4	3 (75.0%)	
分化度			
高分化	16	7 (43.8%)	0.16
中等度～低分化	6	5 (83.3%)	

TP53 変異型の外耳道扁平上皮癌患者と *TP53* 野生型の外耳道扁平上皮癌患者の 5 年全生存率は、それぞれ 45.0%と 75.0%だった。



Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析では、*TP53* 変異が外耳道扁平上皮癌患者の生存率に関して独立した予後因子であることが示された ($p=0.007$)。

	5年生存率(%)	単変量解析		多変量解析	
		ハザード比	p value	ハザード比	p value
年齢					
≤ 65 歳	65.6%	Ref.			
> 65 歳	53.3%	1.56	0.60		
性別					
女性	71.8%	Ref.			
男性	38.9%	1.97	0.37		
喫煙歴					
なし	62.2%	Ref.			
あり	56.3%	1.36	0.69		
飲酒歴					
なし	68.6%	Ref.			
あり	44.4%	1.67	0.51		
T分類					
1-2	100%	Ref.			
3-4	30.8%	1.54x10 ⁹	0.003	1.33	0.81
N分類					
0	71.3%	Ref.			
1	0%	4.61	0.064		
分化度					
高分化	65.6%	Ref.			
中等度～低分化	41.7%	2.63	0.23		
<i>TP53</i>					
野生型	75.0%	Ref.			
変異型	45.0%	5.30	0.046	20.2	0.007
治療法					
手術	100%	Ref.			
化学放射線療法	29.1%	5.66x10 ¹⁰	0.006	30.8	0.010

本研究から、*TP53* 変異が、外耳道扁平上皮癌の進展度および生存率を予測するためのバイオマーカーとなりえることが示唆された。また、皮膚癌の約 30%程度で同定される *CREBBP* 変異が同定されたことより、外耳道扁平上皮癌の遺伝子変異は粘膜から発生する頭頸部扁平上皮癌よりも皮膚癌に類似している可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morita S, Mizumachi T, Nakamaru Y, Sakashita T, Kano S, Hoshino K, Fukuda A, Fujiwara K, Homma A.	4. 巻 23
2. 論文標題 Comparison of the University of Pittsburgh staging system and the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer TNM classification for the prognostic evaluation of external auditory canal cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 1029-1037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-018-1314-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita S, Kano S, Hatanaka K, Hatanaka Y, Suzuki T, Fukuda A, Hoshino K, Fujiwara K, Nakamaru Y, Homma A	4. 巻 -
2. 論文標題 Association of gene mutations with clinicopathologic features in patients with external auditory canal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-022-02191-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shinya Morita
2. 発表標題 Comparison of the Pittsburgh staging system and the American Joint Committee on Cancer TNM classification for the prognostic evaluation of external auditory canal cancer
3. 学会等名 5th Congress of European ORL-HNS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Morita
2. 発表標題 Prognostic Evaluation of External Auditory Canal Cancer Using Two Different Staging Systems
3. 学会等名 18th ASEAN ORL-HNS CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田 真也、本間 明宏、中丸 裕爾、安川 真一郎、福田 篤、福田 諭
2. 発表標題 外耳道癌組織における免疫組織化学的手法に基づく発現分子解析
3. 学会等名 第118回 日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morita S, Nakamaru Y, Fukuda A, Homma A
2. 発表標題 Immunohistochemistry expression of p53, p16, cyclin D1, EGFR and Notch1 in patients with the temporal bone squamous cell carcinoma
3. 学会等名 4th Congress of European ORL-HNS (国際学会)
4. 発表年 2017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
---------	---------