

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16923

研究課題名（和文）頭頸部扁平上皮癌の腫瘍内不均一性の解明

研究課題名（英文）Intratumor heterogeneity of head and neck cancer

研究代表者

内 龍太郎 (Ryutaro, Uchi)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：80780840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：鼻副鼻腔乳頭腫は良性腫瘍であるが、一定の頻度で悪性腫瘍（乳頭腫由来癌）が合併することが知られている。乳頭腫由来癌症例の標本から乳頭腫部分と癌部分を分離しアンプリコンシーケンスを用いた遺伝子変異解析を行った。癌部分的な特異的な変異遺伝子としてMLLT10およびFLT4が同定された。また同一標本内で乳頭腫と癌部での変異の不均一性が確認され、乳頭腫の状態でも変異の蓄積が癌と同程度に起こっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

良性腫瘍である鼻副鼻腔乳頭腫が癌化するさい、良性腫瘍の段階で多くの遺伝子変異を起こすことが明らかになりました。良性腫瘍を手術で切除した際に今後の癌化するかどうかを予測するシステムの構築につながる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：Although nasal sinus papilloma is a benign tumor, it is associated with a certain frequency of malignancy (papilloma-derived cancer) known. We isolated the papilloma and cancerous parts from specimens of papilloma-derived cancer cases and used amplicon sequencing. Gene mutation analysis was performed. MSLT10 and FLT4 were identified as partially cancer-specific mutant genes. Heterogeneity of mutations between papilloma and carcinoma in the same sample was confirmed. Our results suggest that the accumulation of mutations may occur in the papilloma state to the same extent as in the cancer state.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：癌ゲノム 頭頸部癌 腫瘍内不均一性 鼻副鼻腔癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの普及により、ゲノムの網羅的な変異解析が可能となった。頭頸部扁平上皮癌においても国際的なプロジェクトにより大規模ゲノム解析が行われ、そのゲノム異常と腫瘍間の多様性が明らかになってきている。さらに癌におけるゲノム異常について腫瘍間の多様性のみならず腫瘍内の多様性が存在することが注目されている。

ひとつの腫瘍内に複数の形態、組織学的に異なる細胞集団が構成されていることは古くから知られていたが、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子解析が行われるようになり、ゲノムレベルでも広範な腫瘍内不均一性が存在することが複数の癌種でも確認されるようになった。

癌ゲノムにおける腫瘍内不均一性の解明方法のひとつとして、ある腫瘍内における複数箇所組織より網羅的なゲノム解析を行う方法がある。また腫瘍内不均一性の解析することにより癌細胞が祖先細胞から異常を蓄積していくゲノムのクローン進化についても明らかになる。この方法で本研究代表者は過去に大腸がんの進化過程と不均一性を解析した(Uchi et al. PLOS Genetics 2016)。

大腸癌において腺腫から癌化する過程におけるゲノム異常の蓄積が有名であるが、これまで頭頸部扁平上皮癌においてこのような良性腫瘍からゲノム異常が蓄積することによる癌化については明らかとなっていない。

頭頸部領域の良性腫瘍として頻度の高いものに鼻副鼻腔乳頭腫がある。一定の頻度で悪性腫瘍(乳頭腫由来癌)が合併することが知られている。乳頭腫由来癌は通常の鼻副鼻腔癌に比べて予後が悪い可能性も指摘されている。しかし鼻副鼻腔乳頭腫由来癌がどのように乳頭腫から癌化するか、その分子生物学的なメカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

鼻副鼻腔乳頭腫由来癌は鼻副鼻腔乳頭腫から発生した扁平上皮癌である。鼻副鼻腔乳頭腫由来癌の組織内には浸潤癌の組織像を示す部分と、乳頭腫の組織像を示す部分がある。これらの一腫瘍内の異なる形態部位におけるゲノム異常を解析・比較することで、鼻副鼻腔乳頭腫由来癌の腫瘍内不均一性を明らかにする。また乳頭腫から癌への進化へ寄与するゲノム異常を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)対象

2000年～2018年に九州大学病院耳鼻咽喉科で診断された乳頭腫由来癌8症例を対象とした。手術によって得られたFFPE標本からレーザーマイクロダイセクション法を用いて乳頭腫部分と癌部分に分離した。分離した組織からDNA抽出を行いDNAの濃度や断片化について評価を行ったところ、4症例6サンプルよりシーケンスが可能なDNAが得られた。

(2)シーケンス

ライブラリー調整およびシーケンスはセルイノベーター(福岡)に依頼した。DNAはIon AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panelを用いて409遺伝子の全exonについてtarget sequenceを行った。4症例の中で癌成分3標本、乳頭腫成分3標本について遺伝子変異結果が得られた。

(3)遺伝子変異解析

得られたシーケンスはSNPEff ver4.1を用いて変異コールを行い、その中でinsertion, deletionおよびCancer Gene Censusに登録されているnon-synonymous SNVを変異遺伝子とした。dbSNP150に登録されている、Common SNP(変異率>1%)に関しては除外した。全6サンプルで同じpositionに同じ形式の変異を認めた場合は、シーケンスエラーと考え除外した。

4. 研究の成果

(1)遺伝子変異数

得られた変異を表2に示す。それぞれの平均変異数は14個/サンプルであり、Indelは平均9.3個、ナンセンス変異は3.2個であった。COSMICに登録されたミスセンス変異は1個(CDKN2A)のみであった。

癌成分(Ca)と乳頭腫成分(IP)で遺伝子変異数に統計学的な差は認めなかった。

	total	indel	nonsense	missense
16Ca	9	7	2	0
16IP	16	10	6	0
17Ca	14	13	1	0
17IP	12	11	1	0
7Ca	25	15	9	1
10IP	8	8	0	0

(2)複数サンプルで変異を認めた癌関連遺伝子

同定された変異の中で NCBI のデータベースである cancer gene census に登録されている遺伝子を癌関連遺伝子とし、6 サンプルの中で 2 サンプル以上に変異している遺伝子を抽出した。癌部分で特異的な遺伝子変異として MLLT10 および FLT4 を認めたが、これらの遺伝子変異の意義は不明である。

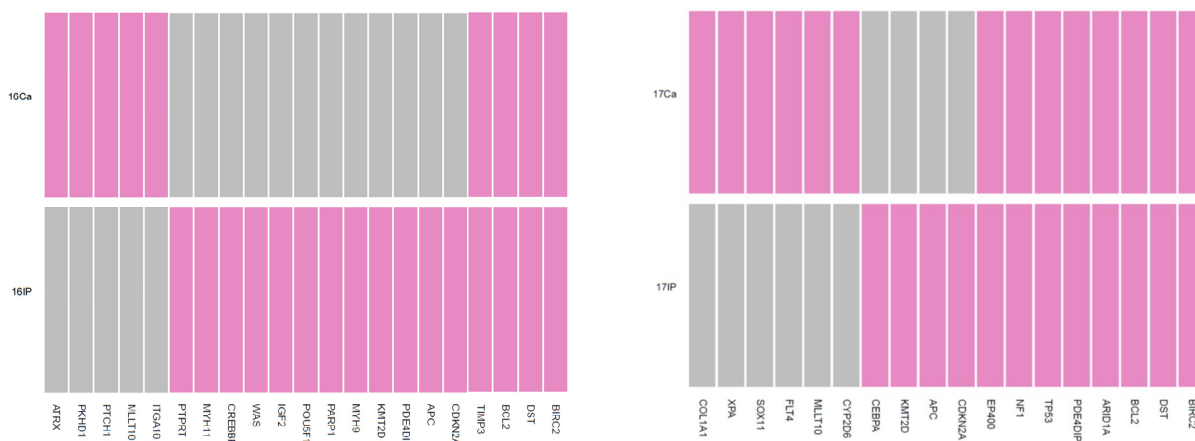


これまで乳頭腫由来癌の他の報告で挙げられている EGFR、KRAS の変異は本研究では検出されなかった。

(3)同一症例内の遺伝子変異比較

同一症例において癌部と乳頭腫部の結果が得られた 2 症例について、Ca と IP の比較を行った。Case16 においては Ca と IP で共通する変異が少なく、また IP 固有の変異も多く蓄積されていた。古い段階で遺伝的分岐を起こしていることおよび、IP の段階でも遺伝子変異の蓄積が癌部と同様に起こっていることが示唆された。

一方で Case17 は Ca と IP で共通する変異多数あり、遺伝的に近いと考えられた。



本研究のみからは、乳頭腫から癌化へ進化する際にカギとなる遺伝子変異は同定されなかったが、良性腫瘍である乳頭腫の段階から多くの遺伝子変異を蓄積していること、またその速度は癌部と大きく変わらない可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----