

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17632

研究課題名(和文) 口腔癌の放射線治療反応性に関連する遺伝子変異プロファイルの同定

研究課題名(英文) Identification of gene mutation profiles related to responses to radiation therapy for oral cancer

研究代表者

水上 達治 (Tatsuji, Mizukami)

富山大学・学術研究部医学系・講師

研究者番号：20746565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：術後放射線治療を行った口腔癌の手術検体を用いて治療成績と関連する遺伝子の解析を試みた。

DNA抽出にあたり、口腔癌の中でも発生母地によって抽出が可能な量に差があり、歯肉由来の検体ではDNAの回収が困難であることが判明した。次世代シーケンサーを用いて50種類のがん関連遺伝子のホットスポットについて変異の解析を行った。前処理の段階でDNAの変性が進んでいることが考えられたがシーケンスは可能であった。

結果として、検体ごとに変異総数の差異が大きなことが判明した。臨床情報との関連づけは今回の研究結果のみでは困難で、検体数の追加やDNA抽出の改善など、さらなる解析が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術後放射線治療を行った口腔癌の手術検体を用いて治療成績と関連する遺伝子の解析を試みた。

口腔癌の手術検体からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて50種類のがん関連遺伝子のホットスポットについて変異の解析を行った。

DNA抽出の段階で歯肉由来の検体ではDNAの回収が困難であることが判明した。遺伝子解析の結果、検体ごとに変異総数の差異が大きなことが判明した。臨床情報と関連づけるためにはさらに追加実験が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose is to analyse the genetic relations with the preoperative radiation therapy for oral cancer.

The amount of extracted DNA varied depending on the lesion site, that obtained from gingival cancer was small. We used a next-generation sequencer and performed target-capture sequencing of the extracted DNA and analyzed mutational status in 50 known cancer-related genes.

As a result, We identified that the number of gene mutations are greatly different in every sample.

We are going to improve the DNA sampling method and analyze more samples.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：遺伝子変異 放射線感受性 口腔癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、次世代高速シーケンサを用いた網羅的ゲノム解析手法の急速な発展・普及に伴い、がんにおける新規の遺伝子変異の発見が相次いでいる。その結果、例えば肺腺癌などこれまで組織学的に同一のカテゴリーに分類されていたがんが、特定の遺伝子変異またはその組み合わせによって細分類されつつある<sup>1,2,3</sup>。薬物療法に関しては、がんの遺伝子変異に基づいた治療の個別化が進み、EGFR 変異や ALK 遺伝子融合などチロシンキナーゼ遺伝子群の活性化変異陽性のがんはそれぞれの変異遺伝子産物を標的とした Gefitinib、Crizotinib による分子標的治療に高い治療効果を示す<sup>4</sup>。一方で、昨今の大規模がんゲノム解析によりヒストンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含めたクロマチンリモデリング遺伝子群の失活変異が、様々ながん種において高頻度(数 10%程度)に生じていることが明らかになってきている<sup>5</sup>。

放射線治療の臨床現場では、同程度の進行期および宿主状態、かつ同じ組織型のがんであっても照射への反応性が異なることが経験される。癌細胞のヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性が放射線感受性を左右することが見出されるなど<sup>6</sup>照射への反応性に寄与する遺伝子変異の同定は、放射線治療の個別化に極めて有用な基盤情報になると考えられる。しかし現状では、チロシンキナーゼ遺伝子の活性化変異やクロマチンリモデリング遺伝子群の失活変異を含めたがんにおける遺伝子変異と、実臨床上の放射線治療への反応性との関連については明らかにされていない。

日本における口腔癌の年間新患発生数は約 6000 例とされており、他部位の悪性腫瘍と比較して多くはないが、口腔は五感や生命維持に不可欠な臓器であり、この領域に発生するがん治療では機能維持や美容などの面から放射線治療へ大きな貢献が期待される<sup>7</sup>。しかし症例数が限られており口腔癌における遺伝子変異は不明な点が多く、また放射線治療の効果との関連も未解明である。

### 2. 研究の目的

本研究は、口腔領域の腫瘍細胞の遺伝子変異解析と放射線治療への反応性と関連する遺伝子変異プロファイルの同定を目的とする。具体的には、本施設歯科口腔・顎顔面外科で生検、または手術を行った癌患者の試料について高速シーケンサを用いたターゲットキャプチャシーケンシングによる大規模な遺伝子異常(点変異、挿入欠失変異、遺伝子融合)の解析をおこない、得られた遺伝子異常およびその組み合わせと治療方法(手術、術後化学放射線治療、化学放射線療法など)、臨床成績(局所制御率、無再発生存率、原病生存率など)を比較検討することで、口腔癌のがん遺伝子検索と放射線治療への反応性および抵抗性と関連する遺伝子変異(群)を探索する。

### 3. 研究の方法

(1) 臨床検体収集: 本研究施設で治療される口腔癌患者で、手術検体、および放射線治療前時点での腫瘍組織の生検検体のホルマリン固定・パラフィン包埋組織を用い、病理学的にがん細胞の含有が認められた試料から DNA を抽出する。初年度は 40 症例の集積を予定する。また治療成績の付随した口腔癌の既採取試料約 50 例についても、倫理審査の後、当該解析に供する。

(2) 臨床情報整理: (1) の症例群の背景因子と放射線治療成績を整理し、データベース化する。

(3) 遺伝子異常の検出: ターゲットキャプチャシーケンシング法を用い、チロシンキナーゼ遺伝子およびクロマチンリモデリング遺伝子群を含む、各種がんにおける変異好発遺伝子群や遺伝子融合を検出する(表 1)。具体的には、すでに稼働しているライフテクノロジー社のシステムを用い、解析遺伝子群に対応するゲノム DNA 領域を濃縮し、Ion Proton 高速シーケンサで平均 depth 500 の基準でシーケンシングリードを取得する。また現在開発中である、ホルマリン固定パラフィン包埋試料から抽出した DNA を用いたシーケンシング法を確立する。

<i>ABL1</i>	<i>AKT1</i>	<i>ALK</i>	<i>PAC</i>	<i>ATM</i>	<i>BRF</i>	<i>CDH1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>CSF1R</i>	<i>CTNMB1</i>
<i>EGFR</i>	<i>ERBB2</i>	<i>ERBB4</i>	<i>EZH2</i>	<i>FBXW7</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>FLT3</i>	<i>GNA11</i>
<i>GNAS</i>	<i>GNAO</i>	<i>HNF1A</i>	<i>HRAS</i>	<i>IDH1</i>	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>IDH2</i>	<i>KDR</i>	<i>KIT</i>
<i>KRAS</i>	<i>MET</i>	<i>MLH1</i>	<i>MPL</i>	<i>NOCH1</i>	<i>NPM1</i>	<i>NRAS</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>
<i>PTPN11</i>	<i>RB1</i>	<i>RET</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>SMO</i>	<i>SRC</i>	<i>STK11</i>	<i>TP11</i>	<i>VHL</i>

表 1. 本研究で解析する遺伝子

(4) 遺伝子異常の解析と放射線治療反応性との関連解析: がんの発生において直接的に重要な役割を果たすドライバー遺伝子の解析とともに、放射線治療応答群、非応答群それぞれ 50 例を目標に遺伝子異常の情報を取得し、臨床成績との関連を解析し、放射線治療反応性に寄与する遺伝子異常の候補を抽出する。まず初期治療に対する局所反応不良例や、初期治療から 1 年以内の早期に転移を認める症例に特徴的な遺伝子異常プロファイルについて解析を開始する。その後、2 年無再発生存率、2 年原病生存率など中期的臨床成績が集積し次第、順次解析をおこなう。個々の遺伝子単独の解析、および遺伝子群を機能別にグループ化しての解析を行う。

(5) 関連解析の validation: (4) の解析に使用しなかった試料について (4) と同様の関連解析をおこない、抽出された候補異常遺伝子の蓋然性を検討する。

(6) 候補異常遺伝子の機能解析: (5) において放射線治療反応性との関連が validate された遺伝子異常に対し、培養細胞実験系およびヌードマウス実験系を用いた機能解析をおこなう。具体的には、遺伝子異常の活性型・不活性型に応じて、培養細胞実験系において各種ヒトがん細胞株に候補異常遺伝子産物を過剰発現または発現抑制させた後、X 線照射し、コロニー形成法で放射線感受性への影響を評価する。培養細胞実験系において放射線感受性との関連が認められた遺伝子異常について、異常遺伝子産物を過剰発現または発現抑制させたヒトがん細胞株をヌードマウス皮下に接種し、形成した腫瘍に X 線照射し、経時的に腫瘍径を測定することで放射線感受性への影響を評価する。

#### 4. 研究成果

臨床検体の遺伝子解析を含む本研究内容について、ゲノム指針・疫学指針による施設内 IRB 承認を得た。(口腔癌の放射線反応性に関連する遺伝子プロファイルの同定: 後向き観察研究)。IRB 承認後、本研究施設に保存されている手術検体を集積・整理した。同時に患者背景、術前・術後のステージ、手術情報、放射線治療についての情報、治療後の局所制御および生存といった情報を取得、整理し、データベース化した。また近年悪性腫瘍の免疫療法については飛躍的な進歩があることから、これらの検体および情報については当施設で施行している腫瘍の免疫学的背景を探索する研究とも関連可能なようにした。

ホルマリン固定・パラフィン包埋されていた手術検体から DNA を抽出し、これらの精製 DNA を Nano Drop で解析した。収集量を測定したところ、歯肉癌由来の検体では口腔の他の部位と比較して抽出が困難であり、およそ 20 % の検体で DNA 抽出が不可能で、また抽出された DNA 量の中央値も 0.37  $\mu\text{g}$  と少量であった。(他の部位では抽出不可能であったのは 4 % 検体で、また DNA 量の中央値は 10.49  $\mu\text{g}$  であった。)

得られた精製 DNA のうち、十分量が確保できた検体を選び、次世代シーケンサを用いて Ion ampliseq Cancer Hotspot Panel v2(Thermo Fisher)で解析した。Agilent 2100 BioAnalyzer を用いたシーケン斯拉イブラリーの品質検定の段階で DNA の分解が進んでいることが示唆されたが、シーケンスラン自体は可能で、全検体でターゲット領域のデプスは 2000 以上を確保することができた。

検出された遺伝子変異の総数は 10 個程度から 500 個程度と大きく異なっていた。免疫療法では効果予測に遺伝子変異量(Tumor Mutation Burden)の有用性が示されており、今後免疫学的背景を探索する研究の結果との関連を評価する予定である。

また特定の遺伝子変異と臨床情報の結び付けは今回の結果からだけでは困難で、今後さらなる検体の追加が必要と考えられた。検体の状態を確認し、抽出法を再検討することでより質の高い DNA の抽出を試み、さらに前向きに検体の収集も行う予定である。

#### < 引用文献 >

(1) Seki Y, Mizukami T, Kohno T. Molecular process producing oncogene fusion in lung cancer cells by illegitimate repair of DNA double-strand breaks. *Biomolecules* 2015;5:2464-2476.

(2) Govindan R, Ding L, Griffith M et al. Genetic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* 2012;150:1121-34.

(3) Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 2012;486:400-4.

(4) Pal SK, Figlin RA, Reckamp K. Targeted therapies for non-small cell lung cancer: an evolving landscape. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1931-44.

(5) Oike T, Komachi M, Ogiwara H, et al. C646, a selective small molecule inhibitor of histone acetyltransferase p300, radiosensitizes lung cancer cells by enhancing mitotic catastrophe. *Radiother Oncol.* 2014 May;111(2):222-7.

(6) Oike T, Ogiwara H, Torikai K et al. Garcinol, a histone acetyltransferase inhibitor,

radiosensitizes cancer cells by inhibiting non-homologous end joining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;84:815-21.

(7) 大西洋 ほか がん・放射線療法 2010 2010:658.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Saitoh Jun ichi, Shirai Katsuyuki, Mizukami Tatsuji, Abe Takanori, Ebara Takeshi, Ohno Tatsuya, Minato Koichi, Saito Ryusei, Yamada Masanobu, Nakano Takashi	4. 巻 8
2. 論文標題 Hypofractionated carbon ion radiotherapy for stage I peripheral nonsmall cell lung cancer (GUNMA0701): Prospective phase II study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 6644 ~ 6650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2561	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kubo Nobuteru, Kubota Yoshiki, Kawamura Hidemasa, Oike Takahiro, Sakai Makoto, Kumazawa Takuya, Miyasaka Yuhei, Okazaki Shohei, Kobayashi Daijiro, Sato Hiro, Mizukami Tatsuji, Musha Atsushi, Shirai Katsuyuki, Saitoh Jun-ichi, Yokoo Satoshi, Chikamatsu Kazuaki, Ohno Tatsuya, Nakano Takashi	4. 巻 141
2. 論文標題 Dosimetric parameters predictive of nasolacrimal duct obstruction after carbon-ion radiotherapy for head and neck carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiotherapy and Oncology	6. 最初と最後の頁 72 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radonc.2019.07.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shirai Katsuyuki, Kubota Yoshiki, Ohno Tatsuya, Saitoh Jun-ichi, Abe Takanori, Mizukami Tatsuji, Mori Yasumasa, Kawamura Hidemasa, Akahane Keiko, Nakano Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Carbon-ion Radiotherapy for Isolated Lymph Node Metastasis After Surgery or Radiotherapy for Lung Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	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) 10.3389/fonc.2019.00731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 KUBO NOBUTERU, KAWAMURA HIDEMASA, OIKE TAKAHIRO, SATO HIRO, IWANAGA MOTOTARO, MIZUKAMI TATSUJI, ADACHI AKIKO, MATSUI HIROSHI, ITO KAZUTO, SUZUKI KAZUHIRO, NAKANO TAKASHI	4. 巻 33
2. 論文標題 Hypofractionated Intensity-modulated Radiotherapy for Intermediate- and High-risk Prostate Cancer: A Retrospective Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1235 ~ 1241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirai Katsuyuki, Ohno Tatsuya, Saitoh Jun-ichi, Okamoto Masahiko, Katoh Hiroyuki, Murata Kazutoshi, Kawamura Hidemasa, Musha Atsushi, Abe Takanori, Mizukami Tatsuji, Akahane Keiko, Nakano Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Prospective Study of Isolated Recurrent Tumor Re-irradiation With Carbon-Ion Beams	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	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) 10.3389/fonc.2019.00181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takakusagi Yosuke, Kawamura Hidemasa, Okamoto Masahiko, Kaminuma Takuya, Kubo Nobuteru, Mizukami Tatsuji, Sato Hiro, Onishi Masahiro, Ohtake Nobuaki, Sekihara Tetsuo, Nakano Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Long-term outcome of hypofractionated intensity-modulated radiotherapy using TomoTherapy for localized prostate cancer: A retrospective study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0211370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Hidemasa, Group for Genitourinary Tumors at Gunma University Heavy Ion Medical Center, Kubo Nobuteru, Sato Hiro, Mizukami Tatsuji, Katoh Hiroyuki, Ishikawa Hitoshi, Ohno Tatsuya, Matsui Hiroshi, Ito Kazuto, Suzuki Kazuhiro, Nakano Takashi	4. 巻 20
2. 論文標題 Moderately hypofractionated carbon ion radiotherapy for prostate cancer; a prospective observational study "GUNMA0702"	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	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) 10.1186/s12885-020-6570-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li Yang, Kubota Yoshiki, Kubo Nobuteru, Mizukami Tatsuji, Sakai Makoto, Kawamura Hidemasa, Irie Daisuke, Okano Naoko, Tsuda Kazuhisa, Matsumura Akihiko, Saitoh Jun-ichi, Nakano Takashi, Ohno Tatsuya	4. 巻 144
2. 論文標題 Dose assessment for patients with stage I non-small cell lung cancer receiving passive scattering carbon-ion radiotherapy using daily computed tomographic images: A prospective study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiotherapy and Oncology	6. 最初と最後の頁 224 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radonc.2020.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水上達治、河村英将、安達彰子、佐藤浩央、久保亘輝、村田裕人、高草木陽介、小此木範之、大西真弘、岡崎篤、関原哲夫、安藤義孝、中野隆史
2. 発表標題 前立腺癌術後PSA再発に対するTomoTherapyを用いた救済放射線療法の検討
3. 学会等名 第105回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Mizukami, H. Kawamura, N. Kubo, H. Sato, A. Adachi, H. Kato, H. Matsui, K. Ito, K. Suzuki, T. Ohno, T. Nakano
2. 発表標題 Carbon-ion radiotherapy for prostate cancer with bladder invasion
3. 学会等名 International Conference on Advances in Radiation Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水上達治、河村英将、久保亘輝、佐藤浩央、安達彰子、岩永素太郎、加藤弘之、齋藤淳一、伊藤一人、鈴木和浩、中野隆史
2. 発表標題 遠隔転移を有する前立腺癌の局所に対する症状の緩和・予防目的の放射線治療について
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第30回学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水上達治、河村英将、久保亘輝、佐藤浩央、安達彰子、岩永素太郎、加藤弘之、齋藤淳一、伊藤一人、鈴木和浩、中野隆史
2. 発表標題 遠隔転移を有する前立腺癌の局所に対する症状の緩和・予防目的の放射線治療
3. 学会等名 第23回日本緩和医療学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水上達治、山岸健太郎、野村邦紀、阿部秀晴、石田正幸、將積日出夫、齋藤淳一
2. 発表標題 限局声門癌に対する加速放射線治療
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----