

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18722

研究課題名（和文）DNAメチル化異常特性に基づく化学放射線治療効果予測と発癌分子機構の解明

研究課題名（英文）Therapeutic efficacy prediction based on DNA methylation, and elucidation of molecular mechanism in HNSCC oncogenesis

研究代表者

黒川 友哉（Kurokawa, Tomoya）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80837120

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、中咽頭癌治療体系において遺伝子メチル化解析技術を活用し、放射線治療の効果予測マーカーを樹立することを目的とした。根治的放射線治療を受ける前の中咽頭癌生検検体75検体を用い、Infinium 450Kによる網羅的メチル化解析の結果から治療効果と遺伝子メチル化に相関関係があること及びこれらから構築された治療効果予測マーカーパネルによる放射線治療の効果予測が可能であることが明らかとなった。pyrosequenceによるメチル化状態の検証及びマーカー遺伝子の絞り込みを実施した最終的な治療効果予測性能は正診率94%、AUC値0.98と高く、予後解析結果からも本効果予測性能が検証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌は他の癌腫と同様に治療成績は不十分であることに加え、治療による体へのダメージが大きいことから、個々の患者のがんの特徴に合わせた治療の選択が求められている。これまで、治療選択のために有用な指標がなかったものの、今回の研究によりがんの遺伝子に付けられた化学修飾（メチル化）がその糸口になることを解明した。8つの遺伝子メチル化マーカーを用いてこれまでに治療が行われた患者のがん組織を解析しなおしたところ、このマーカーにより高い治療効果予測ができることが明らかとなった。今後実際の医療現場での使用に向けて期待の持てる結果であり、さらなる開発研究が求められる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish predictive markers for radiotherapy efficacy by utilizing gene methylation analysis technology in the treatment system for mesopharyngeal cancer.

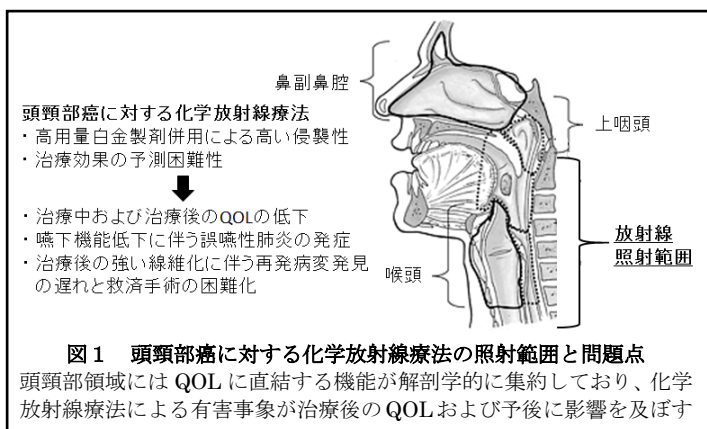
Using 75 biopsy specimens of nasopharyngeal carcinoma prior to radical radiotherapy, the results of comprehensive methylation analysis using the Infinium 450K showed that there is a correlation between treatment efficacy and gene methylation, and that it is possible to predict radiotherapy efficacy using a panel of markers established from the results of this analysis. The final prediction performance of the treatment effect after verification of methylation status by pyrosequence and refinement of marker genes was high, with a 94% positive diagnosis rate and an AUC value of 0.98. The results of prognostic analysis also verified the prediction performance of the treatment effect.

研究分野：頭頸部癌、レギュラトリーサイエンス

キーワード：頭頸部癌 エピゲノム 治療効果予測

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌に対する標準的治療は、根治的治療として手術または化学放射線療法が実施され、根治治療の適応とならない患者に対し、全身化学療法が用いられている。特に、頭頸部癌に対する化学放射線療法は、根治が期待できる一方で、咽頭粘膜炎や周囲組織の器質化を伴い、摂食、嚥下、構音、発声、呼吸機能などを著しく低下させ、無効例に対しては再発病変発見の遅延や救済手術の困難化などの問題点を有している。したがって、化学放射線療法の個別化は頭頸部癌治療における重要な課題である。この個別化に向けた動きとして近年は高リスク型ヒトパピローマウイルス (HPV) の感染の有無による層別化¹⁾がなされているものの、治療効果のばらつきや予後解析の結果から HPV 以外の予後因子特定を含めたさらなる個別化が求められている。



2. 研究の目的

先行研究では、中咽頭癌患者 80 症例の臨床検体を用いたビーズアレイによる網羅的な遺伝子メチル化解析 (Infinium 450K analysis) が実施され、中咽頭癌における HPV 感染と遺伝子の高メチル化に強い相関関係があることが示されている²⁾ (図 2)。また、放射線治療を受け、効果判定 (CR または non-CR) が確定された 37 症例の遺伝子メチル化情報に基づき、治療効果とメチル化に相関を示す 10 遺伝子 (以下、「遺伝子群」) を同定した。予備的な ROC 解析の結果、当該遺伝子群による、放射線治療に対する治療効果予測は感度 95.8%、特異度 84.6%、正診率 91.9% であり、現在臨床現場において汎用され、事実上の治療効果予測因子と認識されている HPV 感染の有無 (感度 83.3%、特異度 61.5%、正診率 75.7% (自験例より)) と比較して高い有用性が期待される。これらからエピゲノム異常に基づく頭頸部癌の新たな層別化および異常にメチル化された遺伝子の機能解析を実施することにより、頭頸部癌の発癌分子機構の解明の礎になると考えている。加えて、これまでに提唱されていない化学放射線療法感受性マーカーの確立により、化学放射線療法の適応患者の精確な選別、頭頸部癌治療における過度の放射線および抗がん剤曝露の回避、ならびに適切なタイミングでの手術治療への移行が可能になると考えている。以上より、本研究では遺伝子メチル化情報に基づく発癌機構の解明と化学放射線療法の効果予測検査を確立することを目的とした。

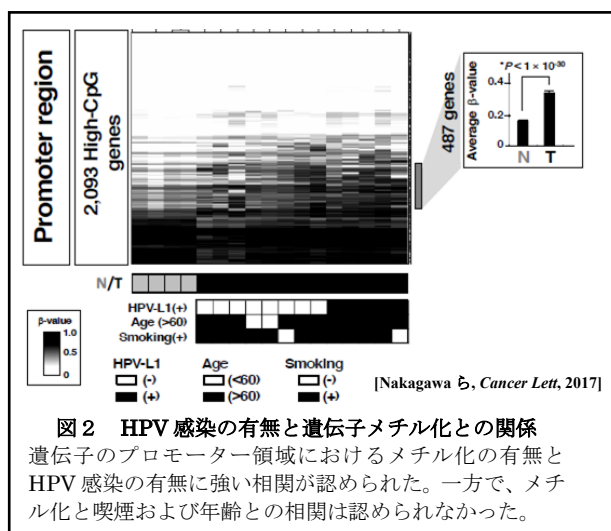


図 2 HPV 感染の有無と遺伝子メチル化との関係
遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化の有無と HPV 感染の有無に強い相関が認められた。一方で、メチル化と喫煙および年齢との相関は認められなかった。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体

本研究では、75 例 (トレーニング検体 40 例、検証用検体 35 例) の中咽頭癌検体を用いた。トレーニング検体には、放射線治療予定の未治療の中咽頭癌患者 57 例のうち除外基準に合致する 17 例を除く 40 例が登録された。登録された研究対象者は治療効果から、治療反応例と非反応例とにそれぞれ分類された。照射後に完全寛解 (CR) に達し、6 カ月以上その状態を維持した患者、あるいは照射後の救出手術で採取した検体から生存癌細胞が検出されなかった患者を治療反応例と定義した。CR に達しなかった患者、照射後の救出手術で採取した標本に生存癌細胞が認められた患者、一時的に CR に達したが照射後 6 カ月以内に局所または遠隔転移で再発した患者を治療非反応者と定義した。検証用検体には、初回治療として放射線照射を受けた中咽頭癌患者 35 例が登録された。また、臨床検体について 2 人の独立した病理医が、凍結または FFPE 標本について腫瘍細胞の含有量を薄切プレパラートにて確認し、腫瘍細胞含量が 50% 以上であった 75 検体を本研究に使用

した。

(2) 治療効果予測マーカー候補の抽出

まず、40例のトレーニング検体を用いた、Infiniumから得られた網羅的なDNAメチル化情報に基づき、クラスター解析を行うことでメチル化状態と治療効果との相関を確認した。その上で効果予測が可能となるようなマーカー遺伝子候補を抽出し、その効果予測性能をROC解析で検討した。実際の臨床現場への応用を考慮し、より簡便かつ安価にメチル化状態を確認できるパイロシーケンス法を用いて、マーカー遺伝子候補のメチル化状態を確認した。パイロシーケンス法でもメチル化が確認できたマーカーのみを用いて最終的なマーカーパネルを構築した。

(3) 治療効果予測マーカーによる効果予測性能の検証

(2)で構築されたマーカーパネルによる治療効果予測性能を検証するため、これまで用いられてきたトレーニング検体とは別の35例の検証用検体を用いて、効果予測性能の検証を行った。最後に、今回構築されたマーカーパネルの予後との相関について無増悪生存期間と全生存期間を指標として検討を行った。

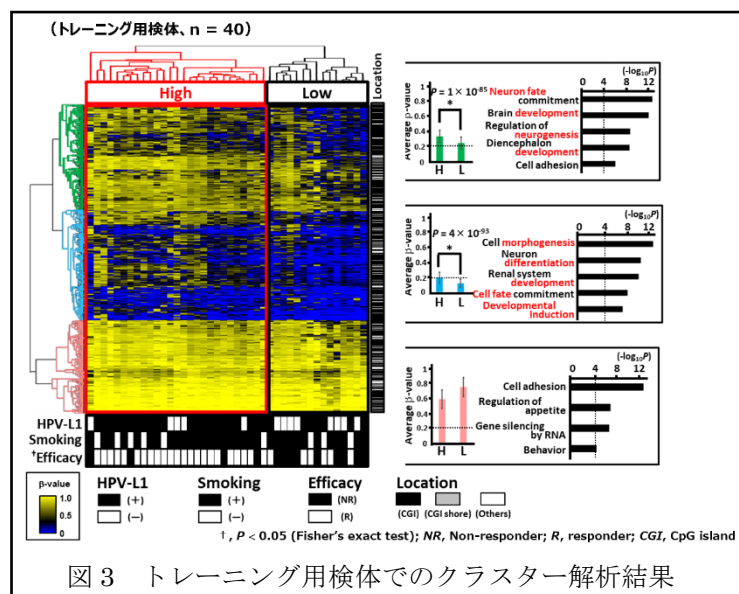
(4) 統計解析

臨床病理学的因子とHPV感染またはDNAメチル化との関連は、フィッシャーの正確検定、2検定、およびスチューデントのt検定を用いて分析した。教師なし2方向階層型クラスタリングは、C Clustering Library version 1.59ソフトウェアを使用し、Cluster 3.0を使用して実施した。トレーニング検体と検証用検体それぞれにおける治療効果予測性能について、受信者動作特性(ROC)分析を行い、曲線下面積(AUC)値を算出した。無増悪生存期間(PFS)は、照射療法の完了日から、再発(局所、局所領域、遠隔転移)または死亡の日までとした。PFSの分布はKaplan-Meier法で推定し、群間差はRソフト(www.r-project.org/)を用いたlog-rank検定で判定した。単変量解析および多変量解析は、Cox比例ハザードモデルを用いて行った。P < 0.05を統計的に有意とした。

4. 研究成果

(1) 遺伝子メチル化と治療効果との相関

40例のトレーニング用検体を対象とした、階層的クラスタ解析の結果、メチル化状態の異なる大きく二つのクラスターに分けられること、そしてよりメチル化の多く入っているクラスターには放射線治療に対する治療反応例が有意に多く含まれることが明らかとなった。さらにメチル化状態に差が見られた遺伝子クラスターについて、Gene ontology解析を行ったところ、細胞分化、発



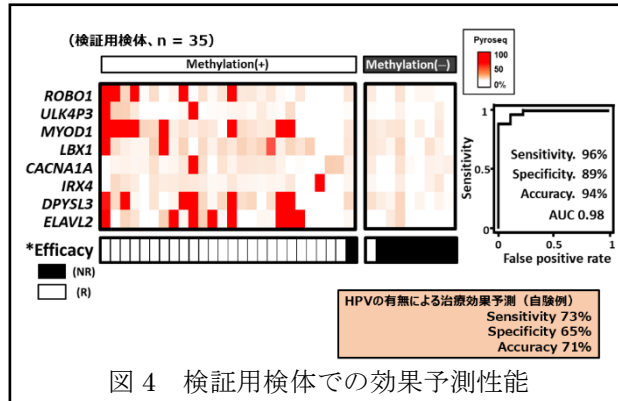
達に関わる遺伝子が有意に多く含まれることがわかり、これらのメチル化状態の違いが細胞の機能や形態に何かしらの影響を及ぼしていることが示唆された³⁾(図3)。

(2) 治療奏効例と相関のあるメチル化遺伝子

40例のトレーニング用検体を奏効例と非奏効例に分け、メチル化状態に有意に差のあった遺伝子を上位10個抽出し、治療効果予測マーカーとした。抽出された10マーカーのうち1つでもメチル化が入っているサンプルを「メチル化陽性」と定義したところ、メチル化陽性サンプルには奏効例とHPV陽性のサンプルが有意に多く含まれ、効果予測性能としては感度、特異度、精度が90%、AUC値0.96と、検査としての高い有用性が示された³⁾。

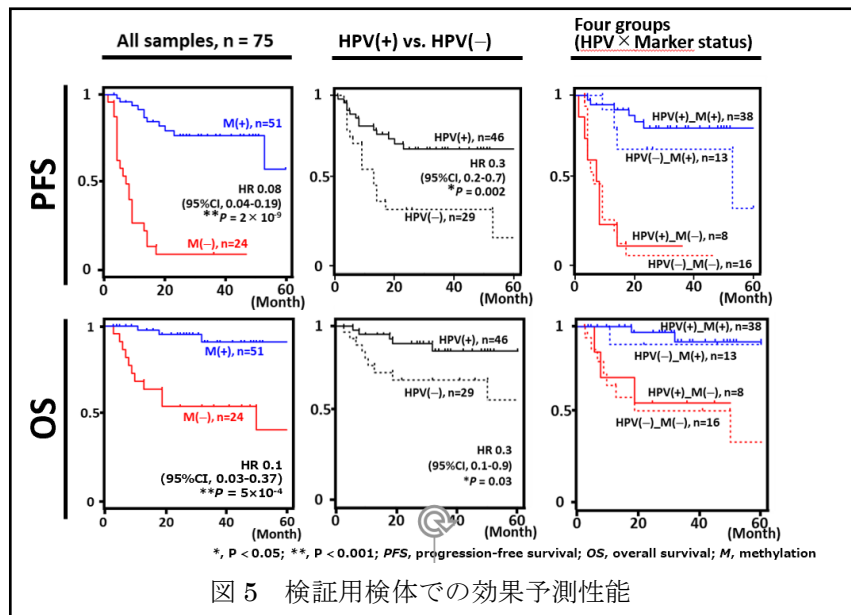
(3) 治療効果予測マーカーによる検査性能の検証

上記(2)までで示されたマーカーパネルの検査性能を検証するため、新たなサンプルセットを検証用検体として35例用いて、同様にパイロシーケンスによる解析を行ったところ、感度96%、特異度89%、精度94%と高い治療効果予測能が再現された³⁾(図4)。



(4) 予後との相関

(3)までで得られた結果の妥当性を検証するため、本研究で登録された75検体すべてを用いて無増悪生存期間および全生存期間を検討した。結果、メチル化マーカーパネルでは、HPVの有無と比較して、予後が明確に層別されること、さらにこれまで同定が困難であったHPV陽性にも関わらず予後不良であった患者層の抽出に成功し、予後不良なHPV陰性の患者と極めて似た経過を辿っていることが示された(図5)。この予後解析結果について、単変量解析及び多変量解析を行ったところ、単変量解析ではHPV、メチル化マーカーも含めていくつかの因子が予後因子として抽出されたが、多変量解析ではメチル化マーカーのみが、独立した予後因子として残される結果であった³⁾。



(5) 考察と今後の展望

本研究により構築されたマーカーパネルではメチル化陽性患者の治療効果が良好であることが示されたが、その中にはHPV陽性の患者が多く含まれていた。既報⁴⁻⁶⁾からHPV陽性中咽頭癌の予後が良好であることは知られており、さらにHPV感染によりDNMT活性が上昇し、広汎な遺伝子メチル化が起こりやすいことが報告されていることから、本研究においてメチル化陽性患者の予後が良好であったのはHPVの影響が大きい可能性が示唆される。しかし、図5に示すとおりHPVの状態に関わらずメチル化陽性群で良好な治療効果が得られていたこと、多変量解析の結果からPFSに対する独立した予後因子はマーカー判定結果のみであったことを踏まえると、HPV感染の有無によらず、中咽頭癌における「メチル化状態」の重要性が示されたと考えられる。

また、本研究において、治療奏効群で有意にメチル化されていた遺伝子群は”細胞接着”、“細胞増殖”に関わる遺伝子が多く含まれていたことから、これらに関わる遺伝子がメチル化されることによって、良好な治療効果に繋がっているのではないかと考えた。実際に、既報ではマーカー

一に含まれる ROBO1⁷⁾、LBX1⁸⁾、MYOD1⁹⁾ といった遺伝子において、癌の転移又は増殖に関わっているとの報告がなされている。これら頭頸部癌における報告はないものの、マーカー遺伝子の一部が癌の転移浸潤促進に関与していることが期待される。以上を踏まえると、放射線治療は局所治療であり、癌の浸潤能、遠隔転移の有無が治療の成否に影響しうることから、マーカー遺伝子のメチル化により、良好な予後に繋がっているのではないかと推測する。

以上の結果及び考察から、今回中咽頭癌に対するエピゲノム技術特にメチル化状態を用いることで放射線治療効果予測のマーカーパネルを樹立し、本マーカーパネルによる、高い治療効果予測能が示された。今後、得られたマーカー遺伝子の機能及び治療効果予測のメカニズムについて引き続き検討していく。

<参考文献>

- 1) Mehanna H, Robinson M, Hartley A, et al. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2019; 393: 51-60.
- 2) Nakagawa T, Matsusaka K, Misawa K, et al. Frequent promoter hypermethylation associated with human papillomavirus infection in pharyngeal cancer. *Cancer Lett*. 2017; 407: 21-31.
- 3) T Kurokawa, T Nakagawa, K Matsusaka, et al. Establishment of epigenetic markers to predict irradiation efficacy against oropharyngeal cancer. *Cancer Sci*, 111(4) 1407-1416, 2020
- 4) Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363: 24-35.
- 5) Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*. 2010; 11: 781-789.
- 6) Liang C, Marsit CJ, McClean MD, et al. Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2012; 72: 5004-5013.
- 7) Zhou WJ, Geng ZH, Chi S, et al. Slit-Robo signaling induces malignant transformation through Hakai-mediated E-cadherin degradation during colorectal epithelial cell carcinogenesis. *Cell research*. 2011; 21: 609-626.
- 8) Cieply B, Farris J, Denvir J, Ford HL, Frisch SM. Epithelial-mesenchymal transition and tumor suppression are controlled by a reciprocal feedback loop between ZEB1 and Grainyhead-like-2. *Cancer Res*. 2013; 73: 6299-6309.
- 9) Echizenya M, Kondo S, Takahashi R, et al. The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors. *Oncogene*. 2005; 24: 5850-5857.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurokawa Tomoya, Nakagawa Takuya, Matsusaka Keisuke, Fukuyo Masaki, Mima Masato, Misawa Kiyoshi, Rahmutulla Bahityar, Ikeda Jun ichiro, Hanazawa Toyoyuki, Okamoto Yoshitaka, Kaneda Atsushi	4. 巻 111
2. 論文標題 Establishment of epigenetic markers to predict irradiation efficacy against oropharyngeal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1407 ~ 1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14338	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 Misawa Kiyoshi, Imai Atsushi, Matsui Hirotaka, Kanai Akinori, Misawa Yuki, Mochizuki Daiki, Mima Masato, Yamada Satoshi, Kurokawa Tomoya, Nakagawa Takuya, Mineta Hiroyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Identification of novel methylation markers in HPV-associated oropharyngeal cancer: genome-wide discovery, tissue verification and validation testing in ctDNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4741 ~ 4755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-1327-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 -
1. 著者名 Misawa Kiyoshi, Misawa Yuki, Mima Masato, Yamada Satoshi, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Nakagawa Takuya, Kurokawa Tomoya, Endo Shiori, Kawasaki Hideya, Brenner John Chadwick., Mineta Hiroyuki	4. 巻 43
2. 論文標題 Overexpression of Sal-like protein 4 in head and neck cancer: epigenetic effects and clinical correlations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 631 ~ 641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13402-020-00509-5	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 Misawa Kiyoshi, Yamada Satoshi, Mima Masato, Nakagawa Takuya, Kurokawa Tomoya, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Shinmura Daichi, Yamada Taiki, Kita Junya, Ishikawa Ryuji, Yamaguchi Yuki, Misawa Yuki, Kanazawa Takeharu, Kawasaki Hideya, Mineta Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation has novel prognostic value and potential utility in liquid biopsy for oral cavity cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomarker Research	6. 最初と最後の頁 53 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40364-020-00235-y	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 Misawa Kiyoshi, Mima Masato, Satoshi Yamada, Misawa Yuki, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Nakagawa Takuya, Kurokawa Tomoya, Oguro Miki, Ishikawa Ryuji, Yamaguchi Yuki, Endo Shiori, Kawasaki Hideya, Kanazawa Takeharu, Mineta Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Neuropeptide receptor genes GHSR and NMUR1 are candidate epigenetic biomarkers and predictors for surgically treated patients with oropharyngeal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1007-1017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57920-z	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 Misawa Kiyoshi, Yamada Satoshi, Mima Masato, Nakagawa Takuya, Kurokawa Tomoya, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Morita Kotaro, Ishikawa Ryuji, Endo Shiori, Misawa Yuki	4. 巻 10
2. 論文標題 5-Hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation dioxygenases in head and neck carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 5306-5314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.34806	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 0件)

1. 発表者名 黒川友哉、中川拓也、松坂恵介、福世真樹、三澤清、美馬勝人、花澤豊行、金田篤志
2. 発表標題 中咽頭癌に対するエピゲノム技術を用いた 放射線治療効果予測マーカーの樹立
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川友哉、中川拓也、松坂恵介、福世真樹、三澤清、國井直樹、櫻井大樹、花澤豊行、岡本美孝、金田篤志
2. 発表標題 DNAメチル化マーカーを用いた中咽頭癌に対する化学放射線療法感受性予測に関する検討
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Kurokawa, Takuya Nakagawa, Keisuke Matsusaka, Masaki Fukuyo, Yasunobu Mano, Masato Mima, Kiyoshi Misawa, Daiju Sakurai, Toyoyuki Hanazawa, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Prediction of therapeutic efficacy of irradiation or chemoradiotherapy for oropharyngeal cancer based on DNA methylation
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川友哉、中川拓也、松坂恵介、福世真樹、眞野恭伸、美馬勝人、三澤清、花澤豊行、金田篤志
2. 発表標題 中咽頭癌におけるメチル化遺伝子マーカーに基づく放射線療法の治療効果予測の検討
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------