

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18762

研究課題名（和文）下咽頭粘液Liquid Biopsyによる早期癌診断

研究課題名（英文）Early Cancer Diagnosis by Nasopharyngeal Mucus Liquid Biopsy

研究代表者

河邊 浩明（Kawabe, Hiroaki）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・医員

研究者番号：40826088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：通常診察では診断困難な下咽頭癌を早期に診断するため、外来でできるスクリーニングの方法として、下咽頭粘液Liquid Biopsyを検討した。まずは進行下咽頭癌と診断された患者から術前に唾液、うがい液、術中下咽頭粘液の洗浄液、術後に検体から腫瘍組織と正常組織を採取した。それぞれの検体からDNAを精製し、PCRでTP53遺伝子の増幅を確認した症例をDNAシーケンス解析で遺伝子異常を検索し、その異常が唾液、うがい液、粘液洗浄液に含まれているか確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下咽頭癌の場合、遺伝子異常は多岐にわたっているため、遺伝子異常をスクリーニングとして評価するのは難しく、今後癌特有のタンパク質などスクリーニングしやすい物質で評価することを検討していく必要がある。また、うがい液だけでなく唾液など採取可能な検体で評価ができれば、より簡易な検査で下咽頭癌の早期診断が可能になり、医療費削減だけでなく、患者の利益、しいては公共の利益に繋がる。

研究成果の概要（英文）：In order to diagnose nasopharyngeal carcinoma at an early stage, which is difficult to diagnose in a normal examination, we investigated nasopharyngeal mucus liquid biopsy as a screening method that can be performed in an outpatient setting. First, saliva and gargle fluid were collected from patients diagnosed with advanced nasopharyngeal carcinoma before surgery, washings of nasopharyngeal mucus were collected intraoperatively, and tumor tissue and normal tissue were collected from specimens after surgery. DNA was purified from each specimen, and cases in which the amplification of the TP53 gene was confirmed by PCR were searched for genetic abnormalities by DNA sequencing analysis to confirm whether the abnormalities were contained in saliva, gargle fluid, or mucus washings.

研究分野：頭頸部外科

キーワード：下咽頭癌 早期診断 Liquid biopsy

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下咽頭癌は飲酒と喫煙による扁平上皮癌がほとんどである。全体の癌の中では5%程度と多くはないが、下咽頭癌の進行癌では咽喉頭摘出術による失声、放射線化学療法による副作用などの治療の困難さがあり、5年生存率も50%程度で予後不良である。反対に下咽頭癌早期癌の場合、内視鏡切除が可能で、5年生存率も95%程度と予後良好である。下咽頭癌は早期か進行かでQOLと予後が全く異なっており、いかにして早期発見するかが課題となっている。

下咽頭腔は平常時はほぼ閉じており、常時粘液が貯留している。内視鏡観察が難しく、症状も出にくいいため、下咽頭癌の早期発見は困難である。患者は咽喉頭異物感を主訴に耳鼻咽喉科外来を受診するが喉頭内視鏡検査では見落とされる事も多い。この時点で全例に対して入念な上部消化管内視鏡検査を行えばよいが、同症状の患者は多く存在するため医療経済的な観点から現実的ではない。そこで耳鼻咽喉科外来の段階で使用可能な早期下咽頭癌スクリーニングのツールが必要と考えられる。

体内の腫瘍は常時崩壊増殖を繰り返しており、体液中には cell free DNA (cfDNA) と呼ばれる腫瘍 DNA が微量ながら存在している。体液からの cfDNA 採取は、肉眼的腫瘍そのものからの組織採取 biopsy になぞらえて Liquid biopsy と呼ばれている。血液 liquid biopsy は既に実用化されているが、行うためにはある程度以上の腫瘍体積が必要である。下咽頭を始めとした早期癌では血中 cfDNA 量が少ないため感度が低くなり実用出来ない。一方、口腔癌では粘液(唾液) liquid biopsy で癌を早期診断する試みがなされており、実用化に向けた研究が行われている。唾液中の CTCs、ctDNA、ctRNA、タンパク質などの研究が進んでおり、すでに実用化されているものもある。

2. 研究の目的

下咽頭には粘液が常時貯留しておりこれを採取すれば口腔癌と同様に cfDNA を採取することが可能になると考えられる。今回の研究では下咽頭でも同様に精査可能か検討するための研究である。下咽頭癌から粘液 liquid biopsy で cfDNA を検出する手法の開発を目的とする。対象は既に確定診断されている下咽頭癌症例で、唾液、うがい液、下咽頭粘液を採取し、癌細胞特有の DNA、RNA、タンパク質の発現について精査する。発現を確認できた場合、より確実に、より簡易な採取方法を模索する。この研究により簡易な検査で下咽頭癌の早期診断が可能になれば、医療費削減だけでなく、患者の利益、しいては公共の利益に繋がる。

3. 研究の方法

対象は既に確定診断されている下咽頭癌症例で、まずは腫瘍量が多い進行下咽頭癌を中心に選択する。下咽頭癌と診断がついた治療前の患者から術前に唾液とうがい液を採取する。下咽頭咽喉頭摘出術の最中に咽喉切開の段階で下咽頭に生理食塩水を満たし、その洗浄した生理食塩水を下咽頭の粘液ごと回収する。術後には切除検体から腫瘍組織と正常組織を採取する。採取した検体は-80℃で保存する。

次に採取した唾液、うがい液、粘液洗浄液を遠心分離機(500G,5min,4℃)にかけて上澄み液を捨て、残った液体2mlに対して、NuclioSpIn Blood Lを用いて、DNAを精製する。採取した腫瘍組織と正常組織はNuclioSpIn DNA RapidLyseを用いて、DNAを精製する。精製したDNAについてDNA量を確認する。

先行論文を参考に、下咽頭癌で変異の多いがん抑制遺伝子 TP53(17p13.1)の exon2,3、exon4、exon5,6、exon7、exon8,9を増幅するためのPCRプライマーを注文し、準備する。

腫瘍組織と正常組織から精製したDNAを準備したPCRプライマーを用いてPCRを行う。PCRにはタカラバイオ株式会社のPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを使用する。PCR条件は3 step PCRで熱変性は98℃10秒、アニーリングは55℃15秒、伸長は72℃40秒に設定する。

PCRで増幅したDNAを電気泳動で想定したサイズかどうか確認する。予定通りのサイズなら、TP53の exon2,3、exon4、exon5,6、exon7、exon8,9は増幅したと考え、DNAシーケンス解析を施行する。解析ソフトにはBenchlingを用いて、腫瘍組織と正常組織のDNA配列を比較して、遺伝子異常を検索する。

標的のTP53から遺伝子異常を認めた場合は異常のあった部位でプライマーとプローブを作成し、デジタルPCRを用いて、唾液とうがい液、粘液洗浄液から同じ遺伝子異常を認めるか確認す

る。またどの検体で遺伝子異常を多く検出できるか比較検討する。

4. 研究成果

6名の下咽頭癌患者から術前に唾液、うがい液、術中に下咽頭粘液の洗浄液、術後に検体から腫瘍組織と正常組織を採取した。2名はTP53遺伝子の増幅を確認できなかったが、4名は唾液、うがい液、下咽頭粘液の洗浄液、腫瘍組織、正常組織からTP53遺伝子の増幅を確認したので、DNAシーケンス解析を施行した。その中で3名はTP53遺伝子異常を認めなかった。1名はTP53のexon8に異常を認めたため、プライマーとプローブを設計し、デジタルPCRを施行した。その結果からは唾液、うがい液、下咽頭粘液の洗浄液からは異常な遺伝子は有意に認めなかった。

問題点はTP53のexonに遺伝子異常が少なかったことである。他の遺伝子(ALDH2、PIK3CAなど)やエピジェネティックな異常があった可能性が推測される。遺伝子増幅ができなかった検体はプライマー領域に変異があった可能性もある。このことから予想以上に遺伝子変異部分が多岐にわたっており、スクリーニングとして遺伝子変異を検査することが困難であることが判明した。そして検体採取に関しても課題が多い。検体を採取するにあたり、うがい液を採取したが、人によって咽頭までうがい液が届く人と、全く届かない人が存在し、検体採取に関しても改良すべき点がある。また検査数が少なくなってしまったのは、コロナ感染が蔓延し、一時手術が中止となったため、6名以上の検体が集まらなかったことが大きい。

今後は下咽頭癌スクリーニングのためには遺伝子検査ではなく、癌特有のタンパク質などスクリーニングしやすい別の物質で評価することも検討している。また検体採取に関してもうがい液では個人差が出てしまうので、より簡便で個人差の出ない検体採取方法も検討し、今後の課題としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 河邊浩明, 大野十央, 川田研郎, 高橋亮介, 立石優美子, 岡田隆平, 有泉陽介, 杉本太郎, 朝蔭孝宏	4. 巻 73
2. 論文標題 内視鏡的咽喉頭手術を施行した下咽頭類基底細胞癌の2例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本気管食道学会会報	6. 最初と最後の頁 222-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 岡田隆平, 大野十央, 高橋亮介, 河邊浩明, 立石優美子, 有泉陽介, 堤剛, 朝蔭孝宏	4. 巻 115
2. 論文標題 頭蓋底転移で発見された甲状腺低分化癌例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科臨床	6. 最初と最後の頁 159-165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 河邊浩明, 立石優美子, 朝蔭孝宏, 堤剛	4. 巻 58
2. 論文標題 頭頸部がん治療における嚥下障害	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine	6. 最初と最後の頁 864-868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 千田邦明, 別府武, 得丸貴夫, 山田雅人, 杉山智宣, 小出暢章, 河邊浩明	4. 巻 47
2. 論文標題 下咽頭癌重複癌症例の治療選択と成績 特に食道重複癌を中心に	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 頭頸部癌	6. 最初と最後の頁 59-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yokoyama K, Manabe O, Tsuchiya J, Oyama J, Kawabe H, Tateishi Y, Asakage T, Yamamoto K, Tateishi U	4. 巻 48
2. 論文標題 A rare case of cranial and spinal leptomeningeal dissemination of recurrent ethmoid carcinoma detected by [18F]-FDG PET/CT	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging	6. 最初と最後の頁 1266-1267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00259-020-05048-7	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 Ohno K, Kawada K, Sugimoto T, Kiyokawa Y, Kawabe H, Takahashi R, Koide N, Tateishi Y, Tsaki A, Ariizumi Y, Asakage T	4. 巻 48
2. 論文標題 Evaluation of synchronous multiple primary superficial laryngopharyngeal cancers that were treated by endoscopic laryngo-pharyngeal surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 1162-1166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2021.03.022	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 Takahashi R, Kawabe H, Koide N, Tasaki A, Ohno K, Ariizumi Y, Kobayashi D, Asakage T	4. 巻 49
2. 論文標題 Superior mediastinal paraganglioma initially suspected of being a mediastinal thyroid goiter	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 520-524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2020.11.001	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 Yokoyama Kota, Manabe Osamu, Tsuchiya Jyunichi, Oyama Jun, Kawabe Hiroaki, Tateishi Yumiko, Asakage Takahiro, Yamamoto Kouhei, Tateishi Ukihide	4. 巻 48
2. 論文標題 A rare case of cranial and spinal leptomeningeal dissemination of recurrent ethmoid carcinoma detected by [18F]-FDG PET/CT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING	6. 最初と最後の頁 1266-1267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00259-020-05048-7	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 高橋 亮介, 河邊 浩明, 小出 暢章, 大野 十央, 有泉 陽介, 朝蔭 孝宏	4. 巻 71
2. 論文標題 下咽頭喉頭全摘出術を施行した下咽頭癌における術後副甲状腺機能の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本気管食道科学会会報	6. 最初と最後の頁 397-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 高橋 亮介, 河邊 浩明, 小出 暢章, 田崎 彰久, 大野 十央, 有泉 陽介, 朝蔭 孝宏	4. 巻 39
2. 論文標題 症例をどうみるか 頭蓋底手術を施行した修復性巨細胞肉芽腫の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 780-783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Nomura Fuminori, Ariizumi Yosuke, Kiyokawa Yusuke, Tasaki Akihisa, Tateishi Yumiko, Koide Nobuaki, Kawabe Hiroaki, Sugawara Takashi, Tanaka Kentaro, Asakage Takahiro	4. 巻 46
2. 論文標題 顎関節に生じた色素性絨毛結節性滑膜炎(Pigmented villonodular synovitis occurring in the temporomandibular joint)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris・Nasus・Larynx	6. 最初と最後の頁 609-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2018.10.021	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 小出 暢章, 清川 佑介, 河邊 浩明, 田崎 彰久, 有泉 陽介, 山口 和哉, 久米 雄一郎, 了徳寺 太郎, 岡田 卓也, 星野 明弘, 東海林 裕, 川田 研郎, 中島 康晃, 朝蔭 孝宏	4. 巻 62
2. 論文標題 異時性多重癌に対して複数回ELPSを施行した症例の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科展望	6. 最初と最後の頁 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 山口 和哉, 川田 研郎, 中島 康晃, 東海林 裕, 星野 明弘, 岡田 卓也, 了徳寺 大郎, 久米 雄一郎, 小出 暢章, 河邊 浩明, 田崎 彰久, 清川 佑介, 有泉 陽介, 伊藤 崇, 絹笠 祐介, 朝蔭 孝宏	4. 巻 62
2. 論文標題 喉頭癌放射線治療後、同時性の下咽頭癌、食道癌に対し化学療法後ELPSを行った1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科展望	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河邊浩明, 有泉陽介, 高橋亮介, 立石優美子, 岡田隆平, 田崎彰久, 大野十央, 菅原貴志, 田中顕太郎, 朝蔭孝宏
2. 発表標題 頭蓋底手術をおこなった傍髄膜横紋筋肉腫の3例
3. 学会等名 第34回日本頭蓋底外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河邊浩明, 岡田隆平, 高橋亮介, 立石優美子, 田崎彰久, 大野十央, 有泉陽介, 朝蔭孝宏
2. 発表標題 動脈塞栓術を施行後にアルミノックス治療を行なった下咽頭癌再発の1例
3. 学会等名 第32回頭頸部外科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河邊浩明, 高橋亮介, 小出暢章, 立石優美子, 田崎彰久, 大野十央, 有泉陽介, 朝蔭孝宏
2. 発表標題 化学放射線療法後再発についての検討
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河邊浩明、大野十央、高橋亮介、小出暢章、田崎彰久、有泉陽介、堤剛、朝蔭孝宏
2. 発表標題 ビデオ顕微鏡システムORBEYEを使用した頭頸部腫瘍の3例
3. 学会等名 第30回日本頭頸部外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田崎 彰久、河邊 浩明、高橋 亮介、小出 暢章、大野 十央、有泉 陽介、朝蔭 孝宏
2. 発表標題 当科における耳下腺癌治療の実際
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川田 研郎、河邊 浩明、大野 十央
2. 発表標題 内科と他科(他領域)との内視鏡診療コラボレーション 咽頭食道接合部表在癌に対するELPS+ESD 頭頸部外科とのコラボレーション
3. 学会等名 第100回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河邊 浩明、小出 暢章、立石 優美子、田崎 彰久、大野 十央、有泉 陽介、朝蔭 孝宏
2. 発表標題 ニボルマブの有害事象で大腸亜全摘した1例
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河邊 浩明, 小出 暢章, 立石 優美子, 田崎 彰久, 大野 十央, 有泉 陽介, 朝蔭 孝宏
2. 発表標題 ビデオ顕微鏡システムORBEYTMを使用した頭頸部腫瘍の4例
3. 学会等名 第30回日本頭頸部外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nivolumab投与での 有効症例と有害事象症例
2. 発表標題 河邊浩明
3. 学会等名 Tokyo Young Physicians H&N Seminar
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清川 佑介, 杉本 太郎, 川田 研郎, 大崎 聡太郎, 立石 優美子, 河邊 浩明, 小出 暢章, 田崎 彰久, 大野 十央, 有泉 陽介, 朝蔭 孝宏
2. 発表標題 下咽頭喉頭癌 機能温存への挑戦はどう進んでいるか ELPS
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小出 暢章, 河邊 浩明, 立石 優美子, 田崎 彰久, 大野 十央, 有泉 陽介, 朝蔭 孝宏
2. 発表標題 下咽頭早期癌治療の嚥下機能への影響
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川田 研郎, 河邊 浩明, 杉本 太郎, 小出 暢章, 田崎 彰久, 大野 十央, 有泉 陽介, 朝蔭 孝宏
2. 発表標題 咽喉頭表在癌内視鏡治療例における多発癌の検討
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本 太郎, 川田 研郎, 清川 佑介, 立石 優美子, 大崎 聡太郎, 河邊 浩明, 小出 暢章, 江口 紘太郎, 田崎 彰久, 野村 文敬, 大野 十央, 有泉 陽介, 白倉 聡, 朝蔭 孝宏
2. 発表標題 下咽頭癌放射線療法後残存・再発例に対する経口的切除術による救済手術の治療成績
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有泉 陽介, 河邊 浩明, 小出 暢章, 田崎 彰久, 大野 十央, 朝蔭 孝宏
2. 発表標題 鼻副鼻腔悪性腫瘍に対する経鼻内視鏡手術の有用性と安全性
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大崎 聡太郎, 有泉 陽介, 小出 暢章, 河邊 浩明, 立石 優美子, 田崎 彰久, 大野 十央, 吉村 亮一, 朝蔭 孝宏
2. 発表標題 高用量シスプラチン同時併用放射線療法における緊急入院と長期入院の危険因子
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 裕太, 田崎 彰久, 河邊 浩明, 小出 暢章, 立石 優美子, 有泉 陽介, 大野 十央, 吉村 亮一, 朝蔭 孝宏
2. 発表標題 重篤な放射線性壊死を起こした3症例
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
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
---------	---------