

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03890

研究課題名(和文) 遺伝子異常に基づいた口腔扁平上皮癌制御戦略

研究課題名(英文) Treatment strategies for oral squamous cell carcinoma based on genetic alterations

研究代表者

中城 公一 (Nakashiro, Koichi)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90314880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍はゲノム・エピゲノム異常により生じることが広く知られている。そこで、われわれは口腔扁平上皮癌診療に有用となる遺伝子異常の同定を試みた。すなわち、口腔扁平上皮癌の原発腫瘍および隣接正常部よりゲノム DNA と total RNA を抽出し、ターゲットディープシーケンシングによる遺伝子変異解析とマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。変異解析では、90% の症例に TP53 の変異が認められた。一方、発現解析では頸部リンパ節転移や遠隔転移に関連して有意な発現変動を示す遺伝子が多数認められた。これらの遺伝子異常は、口腔扁平上皮癌の転移予測や再発監視に有用となる可能性を有している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国では超高齢社会の到来とともに口腔扁平上皮癌の罹患数は増加しており、2019年の時点で年間約11,000人とされ、5年生存率は約60%にとどまっている。本研究成果により、口腔癌診療に遺伝子異常所見が用いられるようになれば、潜在性頸部リンパ節転移や微小残存病変の把握、さらに有効な分子標的薬の選択が可能となり、適切な治療法による治療成績の飛躍的な向上が期待できる。また、無益な治療の回避により患者の治療後の生活の質が担保できる。

研究成果の概要(英文)：It is widely known that human malignancies are caused by genomic and epigenomic alterations. Therefore, we have attempted to identify gene alterations that would be useful in the diagnosis and treatment of oral squamous cell carcinoma. We extracted genomic DNA and total RNA from the primary tumor and adjacent normal tissues, and performed gene mutation analysis using targeted deep sequencing and comprehensive gene expression analysis by microarray. In the mutation analysis, mutations in TP53 gene were observed in 90% of the cases. On the other hand, the expression analysis revealed numerous genes that showed significant correlations with cervical lymph node metastasis and distant metastasis. These gene alterations have the potential to be useful for predicting metastasis and monitoring recurrence for oral squamous cell carcinoma.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：口腔扁平上皮癌 遺伝子異常 頸部リンパ節転移予測 リックドバイオプシー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では超高齢社会の到来とともに口腔扁平上皮癌の罹患数は増加しており、2019年の時点で年間約 11,000 人とされ、5 年生存率は約 60% にとどまっている。従来、早期症例に対しては手術療法のみ、進行症例に対しては手術、放射線、化学療法などの集学的治療が行われてきた。いずれの治療法も年々進歩しているが、治療成績の飛躍的な向上には至っていない。一方、悪性腫瘍はゲノム・エピゲノム異常により生じることが広く知られている。口腔扁平上皮癌も例外ではなく、これらの異常が多数国内外で報告されている。実際に、肺癌診療などではすでにゲノム異常に基づいて治療方針が決定されている。しかしながら、口腔扁平上皮癌診療ではゲノム異常は調べられておらず、全く活用されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子異常に基づいた口腔扁平上皮癌に対する新規治療戦略を確立することを目的とする。すなわち、潜在性頸部リンパ節転移予測、再発監視、再発・転移難治性腫瘍の制御に個々の症例のゲノム・エピゲノム異常を活用することにより口腔扁平上皮癌の完全制御を目指す。

3. 研究の方法

(1) 頸部リンパ節転移予測法の確立

口腔扁平上皮癌症例 (150 例) 原発腫瘍組織の一部より ISOGEN を用いて total RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。つづいて、GeneSpring GX を用いて頸部リンパ節転移陽性症例 (82 例) と陰性症例 (68 例) の遺伝子発現プロファイルを比較することにより、頸部リンパ節転移に関連して有意に発現変動する遺伝子を同定した。さらに、これら遺伝子群を用いてサポートベクターマシン (SVM) による頸部リンパ節転移予測機械学習モデルを構築した。

(2) リキッドバイオプシーの有用性評価

個々の口腔扁平上皮癌症例 (48 例) について、生検標本の一部より QIAamp Fast DNA Tissue Kit を用いて原発腫瘍および隣接正常組織由来ゲノム DNA を抽出し、Ampliseq for Illumina Custom DNA Panel を用いてライブラリーを作成した。つづいて、ベンチトップ型次世代シーケンサー iSeq 100 システムを用いてウルトラディープシーケンシングを行い、腫瘍特異的遺伝子変異の有無について VariantStudio 3.0 を用いて評価した。

同時に、治療前に同一患者より採血 (8 ml) し、分離した血漿より QIAamp MinElute ccfDNA Kit を用いて cell-free DNA (cfDNA) を抽出した。これらをテンプレートとして原発腫瘍の腫瘍特異的変異を検出できる TaqMan probe & primers を各症例ごとに設計、合成し、デジタル PCR 法にて変異検出解析を行った。

4. 研究成果

(1) 頸部リンパ節転移関連遺伝子の同定

口腔扁平上皮癌 150 症例の原発腫瘍組織を解析した。ヒト約 5 万転写産物について隣接正常部と比較して腫瘍部において有意かつ 2 倍以上の発現変動を示す遺伝子を 1,418 種類同定した。その中から、頸部リンパ節転移に関連して有意かつ 2 倍以上の発現変動を示す遺伝子を 29 種類同定した (表 1)。発現亢進遺伝子は 6 種類、発現低下遺伝子は 23 種類であった。発現亢進群には、matrix metalloproteinase、collagen、fibronectin など細胞外マトリックスに関与する遺伝子が含まれていた。発現低下群には、keratin 13 やケラチン細胞分化を制御する small proline-rich protein ファミリー遺伝子が含まれていた。

表 1. 口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Title	Fold Change
MMP13	matrix metalloproteinase 13	2.743785
CST1	cystatin SN	2.299443
COL10A1	collagen, type X, alpha 1	2.205842
COL11A1	collagen, type XI, alpha 1	2.189384
MMP7	matrix metalloproteinase 7	2.087744
FN1	fibronectin 1	2.040428
SPRR3	small proline-rich protein 3	-2.94921

TGM3	transglutaminase 3	-2.90637
SPINK7	serine peptidase inhibitor, Kazal type 7	-2.84327
RHCG	Rh family, C glycoprotein	-2.83987
SPRR2A	small proline-rich protein 2A	-2.74822
KRT13	keratin 13	-2.69452
DEFB103A	defensin, beta 103A	-2.48071
KLK13	kallikrein-related peptidase 13	-2.41176
SPRR1A	small proline-rich protein 1A	-2.35218
CRCT1	cysteine-rich C-terminal 1	-2.29778
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	-2.26013
KLK12	kallikrein-related peptidase 12	-2.25975
FAM25A	family with sequence similarity 25, member A	-2.25305
CNFN	cornifelin	-2.23052
CRNN	cornulin	-2.22463
KLK6	kallikrein-related peptidase 6	-2.20512
TMPRSS11D	transmembrane protease, serine 11D	-2.10895
PI3	peptidase inhibitor 3, skin-derived	-2.10722
FAM25B	family with sequence similarity 25, member B	-2.103
TMPRSS11E	transmembrane protease, serine 11E	-2.06017
KLK11	kallikrein-related peptidase 11	-2.04214
TMPRSS11B	transmembrane protease, serine 11B	-2.01501
IGH@	immunoglobulin heavy locus	-2.01049

(2) 腫瘍特異的遺伝子変異の検出

口腔扁平上皮癌の遺伝子変異を検出するためにカスタムパネルを用いた。癌抑制遺伝子として、TP53、NOTCH1、CDKN2A、FBXW7、癌遺伝子として PIK3CA、HRAS、BRAF を解析対象とした。癌抑制遺伝子は全コーディング領域を、癌遺伝子はホットスポットのみをシーケンシングした。隣接正常組織由来のパーソナルゲノムをリファレンスとして腫瘍に特異的な遺伝子変異のみを検出した。口腔扁平上皮癌 48 症例の原発腫瘍を用いた変異解析では、TP53 90%、NOTCH1 38%、CDKN2A 21%、PIK3CA 8%、HRAS 6% の症例に腫瘍特異的遺伝子変異が認められ、1 症例を除いた全ての症例において何らかの遺伝子変異が検出された (図 1)。

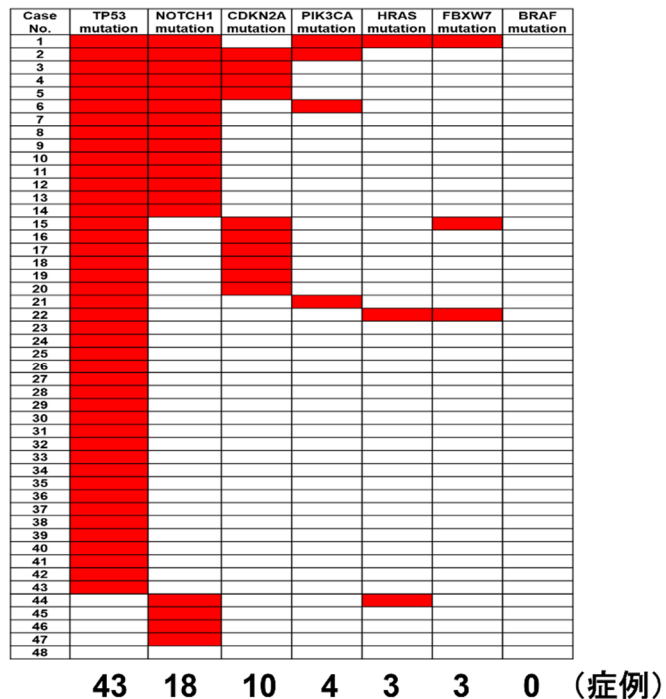


図 1. 口腔扁平上皮癌の遺伝子変異

つづいて、原発腫瘍ゲノム DNA より同定した TP53 の変異を検出できる TaqMan プローブ、プライマーを設計、合成し、デジタル PCR を行った。TP53 変異を有する口腔扁平上皮癌患者で

は、原発腫瘍のみならず、血漿から抽出された cell-free DNA からも TP53 変異を検出することが可能であった (図 2)。

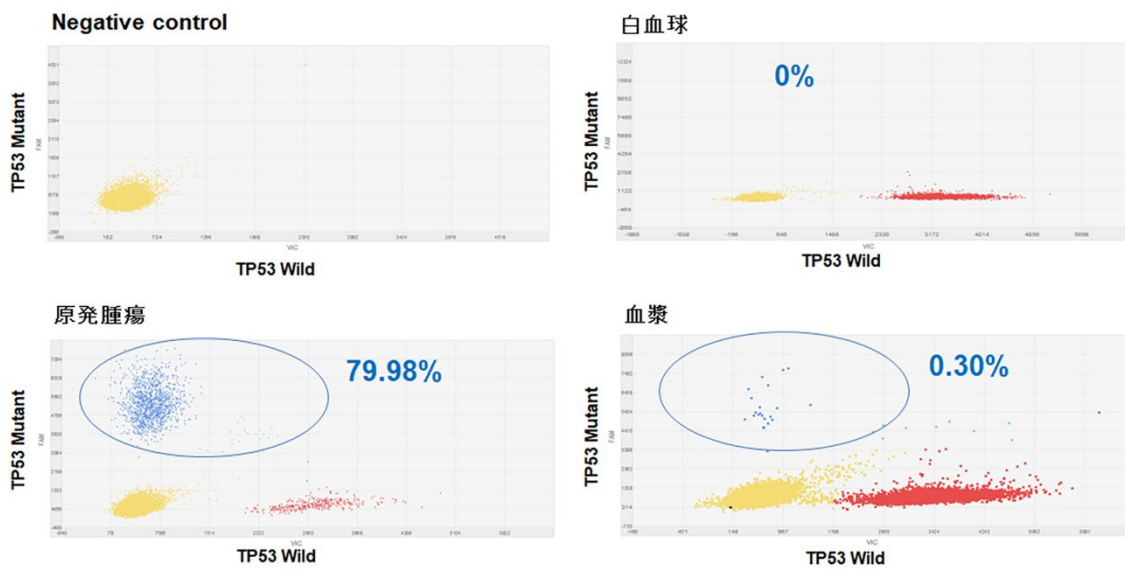


図 2. 口腔扁平上皮癌患者の原発腫瘍および血漿からの TP53 変異の検出

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 6件）

1. 著者名 Izumi Sayaka, Komiyama Yuske, Shimura Michiko, Sawatani Yuta, Oshima Ryo, Zama Manabu, Fukumoto Chonji, Kamimura Ryouta, Yaguchi Erika, Wakui Takahiro, Nakashiro Koh-ichi, Uchida Daisuke, Kawamata Hitoshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Molecular and histopathological analysis of peripheral ameloblastoma of the mandible mimicking a papillomatous lesion on the buccal mucosa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 359-363
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 Hyodo Toshiki, Kuribayashi Nobuyuki, Fukumoto Chonji, Komiyama Yuske, Shiraishi Ryo, Kamimura Ryouta, Sawatani Yuta, Yaguchi Erika, Hasegawa Tomonori, Izumi Sayaka, Wakui Takahiro, Nakashiro Koh-ichi, Uchida Daisuke, Kawamata Hitoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 The mutational spectrum in whole exon of p53 in oral squamous cell carcinoma and its clinical implications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-25744-8	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 Tokuzen Norihiko, Nakashiro Koh-ichi, Tojo Shin, Goda Hiroyuki, Kuribayashi Nobuyuki, Uchida Daisuke	4. 巻 22
2. 論文標題 Human papillomavirus?16 infection and p16 expression in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12789	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 Ogawa Himiko, Nakashiro Koh-ichi, Tokuzen Norihiko, Kuribayashi Nobuyuki, Goda Hiroyuki, Uchida Daisuke	4. 巻 111
2. 論文標題 MicroRNA 361 3p is a potent therapeutic target for oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1645 ~ 1651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14359	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 Sakaue Tomohisa, Hamaguchi Mika, Aono Jun, Nakashiro Koh-ichi, Shikata Fumiaki, Kawakami Natsuki, Oshima Yusuke, Kurata Mie, Nanba Daisuke, Masumoto Junya, Yamaguchi Osamu, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 110
2. 論文標題 Valve Interstitial Cell-Specific Cyclooxygenase-1 Associated With Calcification of Aortic Valves	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Annals of Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 40 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2019.09.085	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 SHIMURA MICHIKO, NAKASHIRO KOH-ICHI, SAWATANI YUTA, HASEGAWA TOMONORI, KAMIMURA RYOTA, IZUMI SAYAKA, KOMIYAMA YUSKE, FUKUMOTO CHONJI, YAGISAWA SHUMA, YAGUCHI ERIKA, HITOMI-KOIDE MASAYO, HYODO TOSHIKI, UCHIDA DAISUKE, KAWAMATA HITOSHI	4. 巻 34
2. 論文標題 Whole Exome Sequencing of SMO, BRAF, PTCH1 and GNAS in Odontogenic Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 3233 ~ 3240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12159	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 Sawatani Yuta, Komiyama Yusuke, Nakashiro Koh-ichi, Uchida Daisuke, Fukumoto Chonji, Shimura Michiko, Hasegawa Tomonori, Kamimura Ryouta, Hitomi-Koide Masayo, Hyodo Toshiki, Kawamata Hitoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Paclitaxel Potentiates the Anticancer Effect of Cetuximab by Enhancing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity on Oral Squamous Cell Carcinoma Cells In Vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6292 ~ 6292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176292	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 Hasegawa Tomonori, Nakashiro Koh-Ichi, Fukumoto Chonji, Hyodo Toshiki, Sawatani Yuta, Shimura Michiko, Kamimura Ryouta, Kuribayashi Nobuyuki, Fujita Atsushi, Uchida Daisuke, Kawamata Hitoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Oral squamous cell carcinoma may originate from bone marrow-derived stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 170 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12431	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17件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 雑賀将斗、中城公一、徳善紀彦、栗林伸行、白井博之、内田大亮
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌細胞を用いた microRNA-375の機能解析
3. 学会等名 第58回日本口腔組織培養学会学術大会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中城公一、徳善紀彦、栗林伸行、合田啓之、内田大亮
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の遺伝子異常とその臨床的意義
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳善紀彦、中城公一、栗林伸行、合田啓之、内田大亮
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌転移リンパ節の網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Saika Masato, Nakashiro Koh-ichi, Tokuzen Norihiko, Shirai Hiroyuki, Uchida Daisuke
2. 発表標題 Expression and function of microRNA-375 in human oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 The 81th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tojo Shin, Kuribayashi Nobuyuki, Nakashiro Koh-ichi, Tokuzen Norihiko, Goda Hiroyuki, Kojima Sayaka, Uchida Daisuke
2. 発表標題 Clinical significance of CXCL13 as a novel biomarker in advance oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 The 81th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白井博之、中城公一、徳善紀彦、雑賀将斗、内田大亮
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌治療標的としての miR-346 の有用性
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 雑賀将斗、中城公一、徳善紀彦、内田大亮
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における microRNA-375 の機能と臨床応用
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳善紀彦、中城公一、合田啓之、内田大亮
2. 発表標題 唾液腺癌遠隔転移症例に対するがんゲノム医療の試み
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雑賀将斗, 中城公一, 徳善紀彦, 村上静郁, 森野 恵, 栗林伸行, 合田啓之, 内田大亮
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移予測におけるmicroRNA-375の有用性
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児島さやか, 栗林 伸行, 中城 公一, 東條 晋, 徳善 紀彦, 合田 啓之, 川又 均, 内田 大亮
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における p53 遺伝子の変異解析
3. 学会等名 第34回日本口腔診断学会・第31回日本口腔内科学会合同学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tojo Shin, Kuribayashi Nobuyuki, Nakashiro Koh-ichi, Tokuzen Norihiko, Goda Hiroyuki, Kojima Sayaka, Kawamata Hitoshi, Uchida Daisuke
2. 発表標題 High frequency of p53 gene mutations in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saika Masato, Nakashiro Koh-ichi, Tokuzen Norihiko, Kuribayashi Nobuyuki, Goda Hiroyuki, Uchida Daisuke
2. 発表標題 Downregulation of microRNA-375 is associated with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東條 晋, 栗林伸行, 中城公一, 徳善紀彦, 内田大亮
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における新規腫瘍マーカーである CXCL13 の発現
3. 学会等名 第57回日本口腔組織培養学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳善紀彦, 中城公一, 栗林伸行, 合田啓之, 内田大亮
2. 発表標題 高悪性度口腔扁平上皮癌の遺伝子変異と治療標的の探索
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kuribayashi Nobuyuki, Nakashiro Koh-ichi, Tokuzen Norihiko, Goda Hiroyuki, Kawamata Hitoshi, Uchida Daisuke
2. 発表標題 Whole-exome sequencing of p53 gene in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第 79 回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中城公一, 栗林伸行, 東條 晋, 徳善紀彦, 合田啓之, 内田大亮
2. 発表標題 カスタム NGS パネルを用いた口腔扁平上皮癌ゲノム異常の検出
3. 学会等名 第 44 回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳善紀彦、中城公一、合田啓之、栗林伸行、内田大亮
2. 発表標題 口腔悪性末梢神経鞘腫瘍における新規融合遺伝子の同定
3. 学会等名 第 24 回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020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
研究分担者	合田 啓之 (Goda Hiroyuki) (00464371)	愛媛大学・医学部附属病院・講師 (16301)	
研究分担者	徳善 紀彦 (Tokuzen Norihiko) (10723843)	愛媛大学・医学部附属病院・助教 (16301)	
研究分担者	内田 大亮 (Uchida Daisuke) (20335798)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	

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