

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08106

研究課題名(和文) 血液リキッドバイオプシーによる子宮頸癌放射線治療後の遺残・再発のモニタリング

研究課題名(英文) Monitoring of residual and recurrence of cervical cancer after radiotherapy using blood liquid biopsy.

研究代表者

磯橋 文明 (Isohashi, Fumiaki)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00448036

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)：子宮頸癌のほとんどでヒトパピローマウイルス(HPV)が発癌に関わっていることから、子宮頸癌細胞のがんゲノムに組み込まれているHPV-DNAを血中のcfDNAから検出し、子宮頸癌放射線治療後の再発のモニタリング方法となりうるかを検証することを目的とし、本研究を開始した。当初の想定では治療後に腫瘍が縮小した症例ではHPV-DNAの濃度が下がり、治療後すぐに再発した症例では上昇すると考えていたが、治療前後で明らかな変化がなく、血中HPV-DNAの検出により子宮頸癌の新しい再発のモニタリング方法を確立することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大変残念であるが、少なくとも我々の実験結果からは血中HPV-DNAの検出により子宮頸癌の放射線治療後の新しい再発のモニタリング方法を確立することができなかった。ネガティブデータではあるが、同様の研究を行う予定の研究者には参考になるデータと考えられる。ただし、頭頸部癌患者における血中HPV-DNA(HPV-16)の検出は再発のモニタリングに使えるという報告もあり、子宮頸癌と何が違うのかを明らかにすることは今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Because human papillomavirus (HPV) is involved in the carcinogenesis of most cervical cancers, this study was started with the aim of detecting HPV-DNA, which is incorporated into the cancer genome of cervical cancer cells, from blood cfDNA and to verify whether it could be a monitoring method for recurrence after radiation therapy for cervical cancer. Our initial assumption was that the concentration of HPV-DNA would decrease in cases in which the tumor shrank after treatment and increase in cases in which recurrence occurred immediately after treatment, but there was no clear change before and after treatment, and we were unable to establish a new monitoring method for cervical cancer recurrence by detection of HPV-DNA in blood.

研究分野：放射線科学

キーワード：子宮頸癌 放射線治療 HPV リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌に対する放射線治療は遠隔転移のない全てのステージにおいて、確立された根治的治療の1つである。局所進行癌においては、化学療法の同時併用における治療成績の向上が報告され、化学放射線療法が現在の標準的治療となっている。しかし、局所進行癌における化学放射線療法後の約40%になんらかの再発が認められ、治療成績は決して満足できるものではない。治療途中での早期治療効果予測や治療後の迅速な再発診断は、治療方法の変更や、放射線治療後の追加治療の判断に有効と考えられる。しかし、現状では、それらの判定は、身体所見、血液学的所見及び、画像所見で行われることが通常であり、放射線治療後の腫瘍縮小は緩徐であることが多く、治療後の遺残や再発の診断に時間がかかることが臨床上の問題のひとつである。

そこで今回着目したのはデジタル PCR などの技術により血液中の cfDNA (cell-free DNA) の検出が容易になってきていることである。血液中の cfDNA から癌のゲノムの情報は高感度に検出可能となってきており、癌治療後の微小遺残病変 (Minimal Residual Disease; MRD) の検出に優れ、がん治療後の腫瘍縮小や再発の検出に関して CT、MRI などの画像変化よりも早期に察知することが可能と報告されている (Nat Rev Clin Oncol. 2019 Jul;16(7):409-424.)。

一方で、ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染は、子宮頸癌の発癌過程への関連がよく知られている。HPV が子宮頸癌粘膜細胞へ感染し、そのゲノム DNA に HPV-DNA が組み込まれることが癌発生の要因のひとつである。子宮頸癌の約 96% から HPV-DNA が検出されるといわれ、特にハイリスクといわれる HPV サブタイプが発癌と関連が強いといわれている。子宮頸癌では組織型によって検出される HPV サブタイプのプロファイルが異なり、内訳の上位 3 位までを列挙すると、扁平上皮癌で HPV-16: 54%, HPV-18: 11%, HPV-45 5%、腺癌で HPV-7 41%, HPV-18 37%, HPV-45 6% とされる (Vaccine. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70)。以上から、子宮頸癌のほとんどで HPV-DNA が検出されるということになる。

血中 cfDNA の HPV-DNA 検出に関しては、中咽頭癌患者の血中 cfDNA から HPV-DNA 量を測定し腫瘍の縮小や再発のモニタリングに有用であったとする報告 (Annals of Oncology 2018 29:1980-1986)、転移性子宮頸癌患者の全身治療のモニタリングに有用であったという報告がある (Clin Cancer Res. 2017 Nov 15;23(22):6856-6862)。しかし、我々が調べた限り、子宮頸癌の放射線治療後の遺残・再発モニタリングに血中 cfDNA を用いた HPV-DNA の有用性を示した報告はないため、本研究で明らかとしたいと考えた。

2. 研究の目的

血中 cfDNA から HPV-DNA を定量し、子宮頸癌の放射線治療後遺残や再発の予測に有効であるかを検証することを目的とする。

3. 研究の方法

・デジタル PCR での実験系の確立

子宮頸がん細胞株 CaSki (HPV-16 陽性)、HeLa (HPV-18 陽性) から、genome DNA を抽出し、デジタル PCR での HPV-16 や HPV-18 の定量性を検討した。次に、デジタル PCR で HPV-16、HPV-18 を同時に検出できるかどうかを可能かどうかを検討した。

・デジタル PCR による患者検体での HPV-DNA の測定

根治的放射線治療を行う HPV 関連頭頸部癌患者、子宮頸癌患者の血液サンプルを回収した。採血管は Streck BCT tube を使用した。cfDNA を抽出しデジタル PCR 法を用いて HPV-DNA の定量を行った。また、すでに HPV-DNA 検出研究で報告のある頭頸部癌の症例の血液を用いて血液中の HPV-DNA 検出が可能かどうかを検証した。その後に子宮頸がん患者について測定し、その結果を臨床的な再発の有無と関連づけて、血中 HPV-DNA が治療後再発と相関があるのかを解析した。

4. 研究成果

・デジタル PCR の実験系の確立

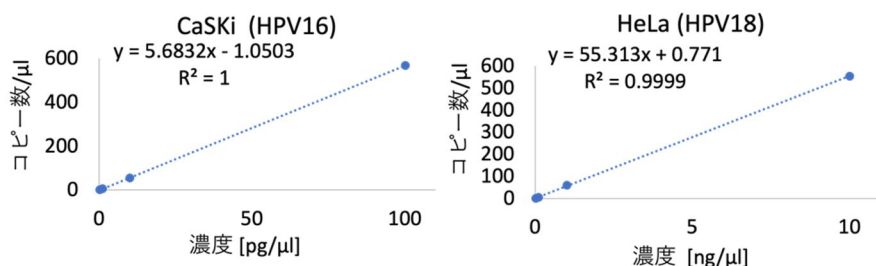


図 1. 細胞株を用いたデジタル PCR を用いた HPV-DNA の定量性評価

子宮頸がん細胞株 CaSki (HPV-16 陽性)、HeLa (HPV-18 陽性) から抽出した genome DNA の濃度と、デジタル PCR での HPV-16 や HPV-18 のコピー数の関係について検討したところ、デジタル PCR 法での HPV-16、HPV-18 のコピー数は、genome DNA 濃度に比例関係にあることがわかった(図 1)。次に、デジタル PCR で HPV-16、HPV-18 を同時に検出できるようにマルチプレックス解析が可能であることを確認した(図 2)。以上から、血漿から cfDNA を抽出し、デジタル PCR 法を用いて HPV-DNA を検出する実験系を確立した。

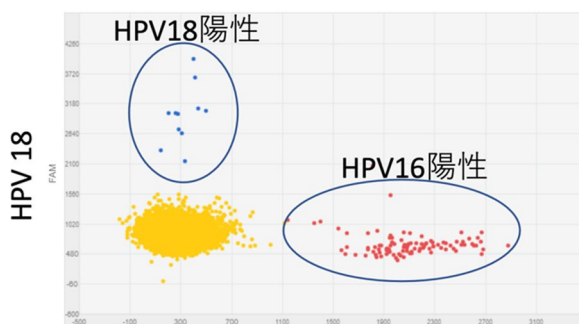


図 2. デジタル PCR を用いた HPV-16, 18 の同時検出

・頭頸部癌患者検体での HPV-DNA の測定(表 1)

頭頸部癌患者 14 症例(p16 陽性 6 例、陰性 8 例)の治療前の血液を用いて、HPV-DNA (HPV-16) の検出で p16 の状態が判定可能かどうかを確かめた。HPV-DNA の陽性判定を 50 コピー/ml plasma 以上とすると、結果を表 1 に示すように、cfDNA を抽出する前の血漿量が 600 μ l よりも 4ml の方がより正確に判定できることが明らかとなった。したがって、cfDNA を精製する元の血漿量は多い方が良いことがわかった。また、我々の測定系は既報通りに HPV-DNA を検出可能であることがわかった。

・子宮頸癌患者での HPV-DNA 検出

子宮頸癌患者の治療前後で HPV-DNA については、治療前については一部の HPV-16 陽性症例のみで検出が可能であった。6 例で治療後の検体が利用可能であったため、その 6 例について治療前後の HPV-DNA コピー数を比較すると、表 2 に示す通り治療後の HPV-DNA のコピー数が治療後再発を予測できる結果ではなかった。

HPV16	HPV-DNA [copies/ml]		生検検体 p16	判定	
	Plasma 600 μ l	Plasma 4 ml		Plasma 600 μ l	Plasma 4 ml
HN-1	217.7	554.8	+	+	+
HN-2	25.4	38.6	-	-	-
HN-3	25.2	7.5	-	-	-
HN-4	1006.0	1076.7	+	+	+
HN-5	25.9	125.9	+	-	+
HN-6	26.9	100.3	+	-	+
HN-7	287.7	36.0	+	+	-
HN-8	129.3	52.1	-	+	-
HN-9	179.3	93.9	+	+	+
HN-10	77.3	30.3	-	+	-
HN-11	251.7	14.3	-	+	-
HN-12	217.0	15.8	-	+	-
HN-13	27.1	37.3	-	-	-
HN-14	73.7	30.6	-	+	-

表 1. 頭頸部癌患者検体を用いて p16 状態が HPV-DNA コピー数と相関する

以上の結果から、我々の当初の予想に反して子宮頸癌患者の HPV-DNA の検出はあまり容易ではないことと、治療後再発例でも HPV-DNA の検出がなかったことから、HPV 陽性中咽頭癌での既報のように治療後の再発モニタリングに使うことが難しいことが示唆された。

Sample	HPV16 copies/ml plasma	HPV16(1M) copies/ml plasma	再発判定
CESC 21	0.293	0.157	再発なし
CESC 22	0.755	0.0827	再発なし
CESC 25	0.235	0	照射野内再発
CESC 27	0.227	0	骨転移
CESC 33	0.155	0.0802	照射野内+骨転移
CESC 35	1.528	0	再発なし

表 2. 子宮頸癌患者の放射線治療前後の血液中 HPV-DNA コピー数の変化では再発は予測できない

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
研究分担者	玉利 慶介 (Tamari Keisuke) (30718995)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	小川 和彦 (Ogawa Kazuhiko) (40253984)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	

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