

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09689

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるエピゲノム動態のリアルタイムモニタリング法の確立

研究課題名(英文) Epigenetic real-time monitoring of head and neck cancer

研究代表者

三澤 清 (Misawa, Kiyoshi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：90334979

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、Epigenetic inactivationとactivationの両面からのアプローチによる頭頸部癌におけるエピゲノム機構の解明とリアルタイムモニター法の確立を目指すことを目標としてきた。成果として、オピオイド受容体のメチル解析によって口腔癌におけるリキッドバイオプシーによるメチル化マーカーを見つけることができた。また、HPV関連中咽頭癌におけるエピゲノム動態を評価するために定期的に採血し検体を収集した。さらに、原発不明癌のリキッドバイオプシーによる原発部位の特定のための研究をすすめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再発・転移を有する進行頭頸部癌において、従来の抗癌剤・分子標的薬に加えて免疫チェックポイント阻害薬が加わったことで薬剤シーケンスの選択の幅が広がった。そのため、腫瘍再発などの病勢や化学療法の効果・予後予測を判定するバイオマーカーが求められている。今回、エピジェネティックな変化を計測することで病態・治療効果予測に関わるHPV関連・非関連頭頸部癌のバイオマーカーを確立を目指した。リキッドバイオプシーによるctDNA解析で、口腔癌、HPV関連中咽頭癌さらに原発不明癌症例の解析を行った。CT、MRI、PET-CTによる画像評価と違った精度での治療効果判定、再発病変の検出ができる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study has been to elucidate the epigenetic mechanisms in head and neck cancer by using both epigenetic inactivation and activation approaches and to establish a real-time monitoring method. As an outcome, we were able to find methylation markers by liquid biopsy in oral cancer by methyl analysis of opioid receptors. In addition, blood samples were routinely drawn and collected to evaluate epigenomic dynamics in HPV-associated mesopharyngeal carcinoma. In addition, we have conducted a study to identify the primary site by liquid biopsy in cancers of unknown primary site.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：エピゲノム動態 リキッドバイオプシー リアルタイムモニター法 頭頸部癌 原発不明癌 クロマチン動態

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化を始めとするエピジェネティックな変化が、RNA 合成、ひいてはタンパク質の発現を抑制することから、癌化メカニズムの一つとして広く認識されている。また、癌細胞の不均一性獲得は、エピゲノムによる可塑性に起因するとされている。本研究は、新たなステージに入ったエピゲノム研究を、これまで蓄積してきた我々の経験を活かし継続することにより、新たな頭頸部癌におけるエピゲノム機構の解明につなげることを目標としている。

Epigenetic inactivation と activation の両面からのアプローチをおこない、頭頸部癌におけるエピゲノム機構 (DNA 脱メチル化、クロマチン動態) の解明とリキッドバイオプシーを使ったエピゲノム機構をリアルタイムにモニタリングする方法の確立を目指す。

また、新たな目標として原発不明癌の原発部位の特定のためのリキッドバイオプシーによるメチル解析も行った。

2. 研究の目的

これまで、複数の G-タンパク質共役受容体 (GPCR) の働きを検討し、GPCR 遺伝子の発現抑制・DNA 高メチル化は頭頸部癌の独立した予後因子であり生存率を有意に低下させることを見出した。これらの結果は、GPCR を標的とする分子標的治療の有用性を示唆するものと考えている。最近では、脱メチル化酵素 TET 遺伝子群の発現と、5hmC レベルとが関連することを報告している。さらに、今回オピオイド受容体に着目し解析を行い、頭頸部癌の再発、予後マーカーとなりうるのか解析を行った。

本研究に先立ち、HPV 関連癌におけるリキッドバイオプシーの DNA メチル化マーカーの選定をシークエンサー解析で行い、3 遺伝子マーカー (CALML5, DNAJC5G, LY6D) を抽出した。繰り返してリキッドバイオプシーを行い、腫瘍の状態 (手術前、無癌、担癌状態) と関連する結果を経時的に得ることに成功している。この手法を用いて、原発不明癌の症例の原発部位の特定に応用できないか解析を行った。再発、予後マーカーとして、さらに原発部位特定のマーカーの可能性について検討した。このような取り組みが将来、超早期がんの検出ならびにがん検診に応用できないか研究をはじめている。

3. 研究の方法

腫瘍サンプルとリキッドバイオプシー

臨床検体は、浜松医科大学附属病院耳鼻咽喉科で頭頸部癌の手術治療を受けた患者 (n = 301) から採取した。浜松医科大学の倫理委員会より倫理的承認を得た (倫理コード : 17-041 および 25-149)。参加者全員から書面によるインフォームド・コンセントを得ている。男女比は 253 : 48 であった。平均年齢は 65.5 歳 (32 ~ 92 歳) であった。原発部位は中咽頭 75 例、下咽頭 79 例、喉頭 59 例、口腔 88 例であった。臨床情報は患者の診療記録からえている。

口腔がん患者 5 名、原発不明癌患者 6 名から手術前後の血液サンプルを採取した (リキッドバイオプシー)。末梢血サンプル (各 10mL) を CellFree DNA Collection Tubes (Roche) に採取した。ctDNA は、QIAamp MinElute ccfDNA Kit (QIAGEN) にて抽出した。

バイサルファイト修飾処理と定量的リアルタイムメチル化・非メチル化 PCR

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて新鮮組織からゲノム DNA を抽出した。MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulfite Modification Kit (TaKaRa) を用いて、重亜硫酸ナトリウム変換を行った。オピオイド受容体遺伝子ならび TET 遺伝子の定量的リアルタイムメチル化・非メチル化 PCR のプライマー配列を表 1 に示す。

Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Base pairs
OGFR	GTCGTCGAGTATGGACGATT	GTCCTCGCAATCCTCGTCCTC	91
OPRD1	GATTTTCGCGTTTAGGGCGTA	TAAACGTCGAAACGTTAAC	125
OPRK1	CGTAGAGTCGTCGTTAGTAGT	CGTCACGAATCCCGTCAACT	137
OPRL1	CGGACGGAGCCGACCGGTAGT	TCTCGTGCCCTCCACTGTCGTG	116
OPRM1	TGTGGTAGCGGCGAAAGGAAG	CCGAACGAACACCGCTATAC	90
TET1	ATCGGCGCGAGTTGGAAAGTT	GACCCCAACTCACCGCTAACCG	103
TET2	CGCGGGTAACGGGATTTAAAG	GTACCCTCGCTTAACCCCG	123
TET3	CGAGGGGGTGGAGATGGTCGAAAGAAAC	CGTACGACGATTAATACAAC	108
SSTR1	CGGGTGC GCGAGGAGAAAGTT	TAGTTCGGGTAGTTGCGGCGAA	127
GALR1	GGTTCGCGGTATTCGGTAGT	GGTTCGCGGTATTCGGTAGT	99
GALR2	CGATTGCGGGGTTGGAGTTTCGGA	CCAACAACGACCGACGACGCTA	119
ACTB	TGGTGATGGAGGAGTTAGAAGT	AACCAATAAACCTACTCCTCCCTAA	133

表 1 : 定量的リアルタイムメチル化PCRのプライマー配列

EpiScope Methylated HCT116 gDNA (TaKaRa) および EpiScope® Unmethylated HCT116 DKO gDNA (TaKaRa) の 5 つの連続希釈標準溶液をプロットすることにより、定量的リアルタイムメチル化および非メチル化 PCR (Q-MSP および Q-UMSP) の標準曲線を作成した。正規化メチル化値 (NMV) は以下のように定義した： $NMV = (TSGs-S/TSGs-FM) / (ACTB-S/ACTBFM)$ 。ここで、TSGs-S および TSGs-FM は、それぞれサンプルおよび普遍的にメチル化された DNA 中の TSGs メチル化レベルを表し、ACTB-S および ACTB-FM は、それぞれサンプルおよび普遍的にメチル化された DNA 中の β -アクチン (ACTB) レベルに対応する。メチル化率は、メチル化分子と非メチル化分子の合計との比 [非メチル化コピー数 / (メチル化コピー数 + 非メチル化コピー数)] として定義した。

4. 研究成果

頭頸部癌腫瘍検体におけるオピオイド受容体遺伝子メチル化レベルの分布。

301 サンプルの頭頸部癌サンプルを用いて、5 つのオピオイド遺伝子のメチル化状態の定量的メチル化特異的 PCR (Q-MSP) 解析を行った。メチル化頻度は、OGFR 遺伝子 18.9% ; OPRD1 遺伝子 7.6% ; OPRK1 遺伝子 21.3% ; OPRL1 遺伝子 30.6% ; および OPRM1 遺伝子 48.8% であった (図 1A)。中咽頭、下咽頭、喉頭、口腔の 5 つのオピオイド遺伝子における臨床病理学的因子との関係を図 1B に示す。オピオイド遺伝子レベルの部位特異的解析結果を図 1C に示す。オピオイド遺伝子のメチル化と腫瘍部位との間に有意な関連は観察されなかった。

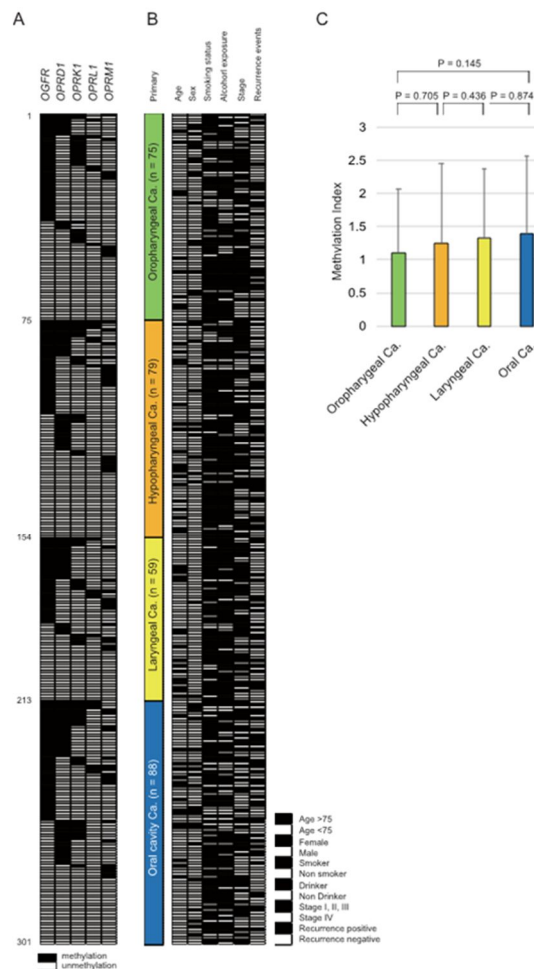


図 1

オピオイド受容体遺伝子のメチル化レベルに応じた Kaplan-Meier 生存曲線。

Kaplan-Meier 解析の結果を図 2 に示す。口腔癌患者 88 人のうち、OPRL1 遺伝子および OPRM1 遺伝子がメチル化されている患者の DFS を非メチル化群と比較した (log-rank 検定、それぞれ $P = 0.024$ および $P = 0.004$) (図 2D および E)。2-4 個のメチル化遺伝子を持つ患者の DFS は、0-1 個のメチル化遺伝子を持つ患者よりも低かった (35.9% 対 65.8% ; log-rank 検定、 $P = 0.002$; 図 2F)。

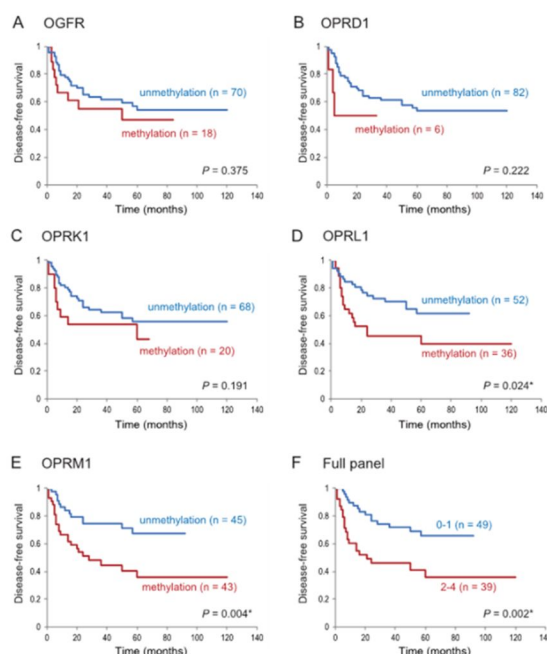


図 2

5つのオピオイド受容体遺伝子、TETファミリー遺伝子間のメチル化頻度の比較

TET 遺伝子のメチル化イベントに基づく 5 つのオピオイド受容体遺伝子のメチル化指数の平均差を図 3A に示す。オピオイド受容体遺伝子のメチル化指数は、すべての TET 遺伝子にメチル化イベントがある患者 (1.57 ± 1.32) および 2 つの TET 遺伝子にメチル化イベントがある患者 (1.47 ± 1.21) では、TET 遺伝子にメチル化イベントがない患者 (1.07 ± 0.95 ; それぞれ $P = 0.010$ および $P = 0.027$) よりも有意に高かった (図 3B)

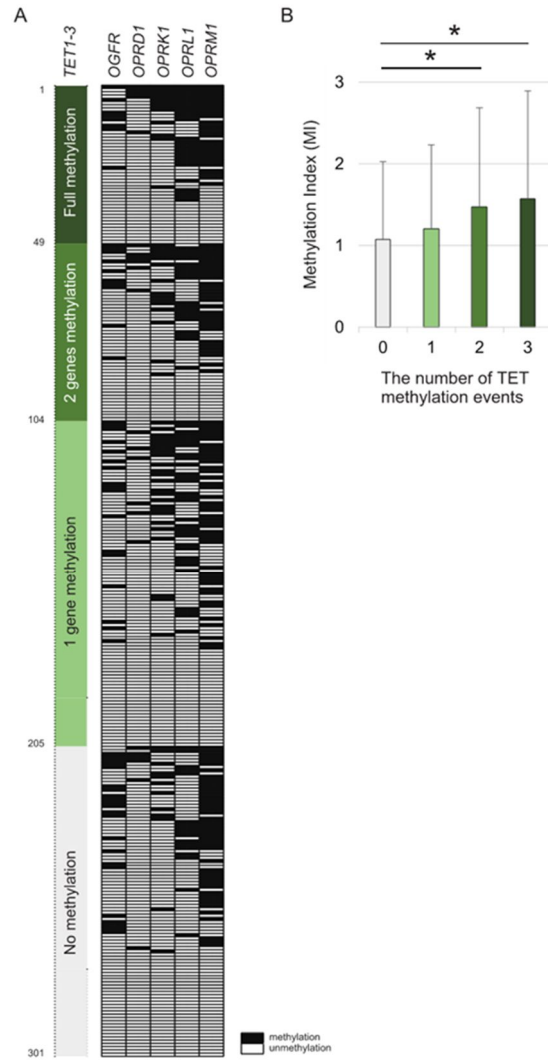


図 3

原発不明癌における原発部位の特定の 3 遺伝子マーカー (CALML5, DNAJC5G, LY6D) による解析

6 症例の臨床病理学的因子ならびに既往歴、治療、病理結果、画像を示す。(図 4)

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4	症例 5	症例 6
年齢、性別	85歳 女性	77歳 男性	69歳 男性	72歳 男性	77歳 男性	67歳 男性
cTNM	cTxN2bM0	cTxN3bM0	cTxN3bM0	cTxN3bM0	cTxN3bM0	cTxN2bM0
既往歴	乳癌	胃癌	精巣腫瘍	なし	胃癌	なし
手術	頸部郭清+扁桃	頸部郭清+扁桃	頸部郭清+扁桃	頸部郭清+扁桃	頸部郭清+扁桃	頸部郭清+扁桃
病理頸部	SCC, p16+	SCC, p16-	SCC, p16-	SCC, p16+	SCC, p16-	SCC, p16+
病理口蓋扁桃	悪性所見なし	悪性所見なし	悪性所見なし	悪性所見なし	悪性所見なし	悪性所見なし

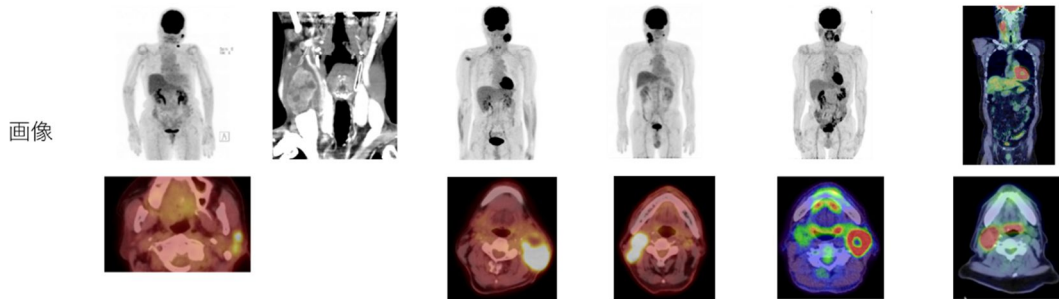


図 4

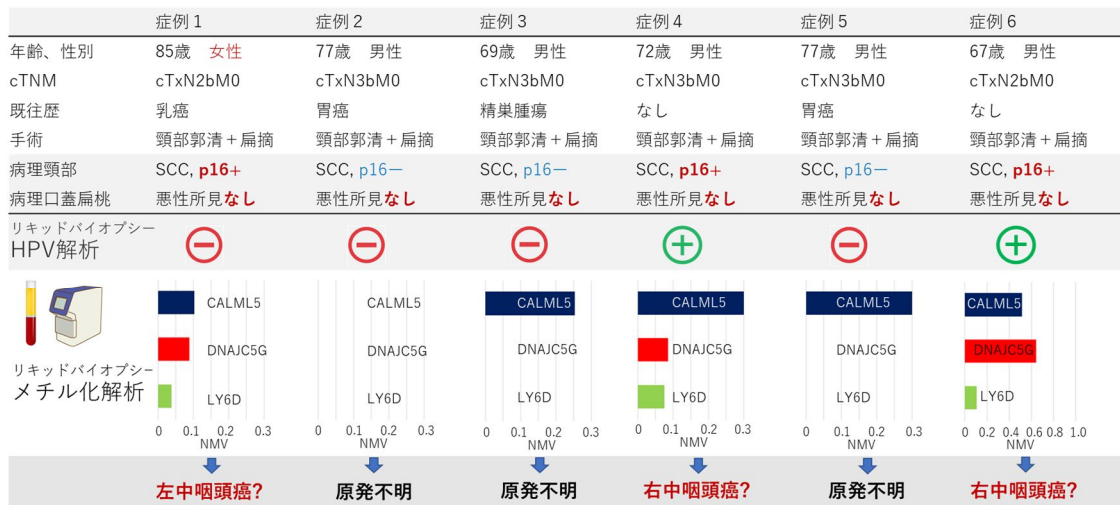


図 5

女性が 1 例、男性が 5 例であった。すべての症例で頸部郭清と口蓋扁桃摘出を施行している。頸部の腫瘍で p16 染色が陽性であった症例が 3 例あった。口蓋扁桃から悪性の組織所見が見つかった症例はなかった。これらの症例の手術前に、リキッドバイオプシーによる HPV 解析、メチル化解析を行った。p16 が陽性であった症例のうち症例 1 は、リキッドバイオプシーからの HPV 解析で HPV は検出されなかった。症例 4 と 6 は検出された。先ほどの 3 遺伝子 (CALML5, DNAJC5G, LY6D) のメチル化解析を行うと、症例 1、4、6 の 3 症例いずれもメチル化を認められた。これらの結果は、手術をする前に、リキッドバイオプシーをして、HPV 解析、メチル化解析をすることで原発部位が中咽頭かどうかわかる可能性があることを示していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Itoh T, Yamada S, Ohta I, Meguro S, Kosugi I, Iwashita T, Itoh H, Kanayama N, Okudera K, Sugimura H, Misawa K, Hariyama T, Kawasaki H	4. 巻 103(1)
2. 論文標題 Identifying active progeny virus particles in formalin-fixed, paraffin-embedded sections using correlative light and scanning electron microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 100020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.labinv.2022.100020	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 Kondo S, Okabe A, Nakagawa T, Matsusaka K, Fukuyo M, Rahmutulla B, Dochi H, Mizokami H, Kitagawa Y, Kurokawa T, Mima M, Endo K, Sugimoto H, Wakisaka N, Misawa K, Yoshizaki T, Kaneda A.	4. 巻 1869(2)
2. 論文標題 Repression of DERL3 via DNA methylation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbadis.2022.166598	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 三澤 清	4. 巻 115
2. 論文標題 エピゲノム異常と頭頸部がん	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 357-366
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 三澤 清	4. 巻 65
2. 論文標題 頭頸部癌とリキッドバイオプシー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科展望	6. 最初と最後の頁 132-137
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 Yamada S, Misawa K, Mima M, Imai A, Mochizuki D, Yamada T, Shinmura D, Kita J, Ishikawa R, Yamaguchi Y, Misawa Y, Kawasaki H and Mineta H	4. 巻 12(8)
2. 論文標題 Telomere shortening in head and neck cancer: association of DNA demethylation and survival.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2165-2172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.54760	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 Ishikawa R, Imai A, Mima M, Yamada S, Takeuchi K, Mochizuki D, Shinmura D, Kita J, Nakagawa T, Kurokawa T, Misawa Y, Nakanishi H, Takizawa Y and Misawa K	4. 巻 46(2)
2. 論文標題 Novel prognostic value and potential utility of opioid receptor gene methylation in liquid biopsy for oral cavity cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Problems in Cancer	6. 最初と最後の頁 100834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.currprobcancer.2021.100834	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 K, Mima M, Yamada S, Imai A, Mochizuki D, Ishikawa R, Kita J, Yamaguchi Y, Endo S, Misawa Y and Mineta H	4. 巻 18
2. 論文標題 Prostanoid receptor genes confer poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma via epigenetic inactivation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12967-020-02214-1	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 K, Mima M, Yamada S, Misawa Y, Imai A, Mochizuki D, Nakagawa T, Kurokawa T, Oguro M, Ishikawa R, Yamaguchi Y, Endo S, Kawasaki H, Kanazawa Takeharu and Mineta H Miki Oguro 1; Ryuji Ishikawa 1; Yuki Yamaguchi 1; Shiori Endo 1; Hideya Kawasaki 3 and Hiroyuki Mineta"	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
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 K, Imai A, Kanazawa T, Mima M, Yamada S, Misawa Y, Mochizuki D, Yamada T, Shinmura D, Ishikawa R, Kita J, Yamaguchi Y, Misawa Y and Mineta H	4. 巻 8(10)
2. 論文標題 G protein-coupled receptor genes, PTGDR1, PTGDR2, and PTGIR, are candidate epigenetic biomarkers and predictors for treated patients with HPV-associated oropharyngeal cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8101504	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 K, Misawa Y, Mima M, Yamada S, Imai A, Mochizuki D, Nakagawa T, Kurokawa T, Endo S, Kawasaki H, Brenner JC and Mineta H	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Misawa K, Imai A, Matsui H, Kanai A, Misawa Y, Mochizuki D, Mima M, Yamada S, Kurokawa T, Nakagawa T and Mineta H	4. 巻 39(24)
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Misawa K, Yamada S, Mima M, Nakagawa T, Kurokawa T, Imai A, Mochizuki D, Shinmura D, Yamada T, Kita J, Ishikawa R, Yamaguchi Y, Misawa Y, Kanazawa T, Kawasaki H and Mineta H	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
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三澤 清
2. 発表標題 リキッドバイオプシーによるメチル化解析について
3. 学会等名 第35回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三澤 清
2. 発表標題 原発不明癌におけるリキッドバイオプシーについて
3. 学会等名 第73回日本気管食道科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三澤清、美馬勝人、山田智史、黒川友哉、中川拓也
2. 発表標題 ヒト乳頭腫ウイルスによる発癌メカニズムと遺伝子修飾による転写調節異常について
3. 学会等名 第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三澤 清
2. 発表標題 Identification of novel methylation markers predictors for treated patients with HPV-associated oropharyngeal cancer: genome-wide discovery, tissue verification and validation testing in cfDNA
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三澤清、今井篤志、望月大極、山田智史、瀧澤義徳、細川誠二、峯田周幸
2. 発表標題 頭頸部癌の個別化医療を目指したエピゲノム解析
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 三澤清、美馬勝人、峯田周幸
2. 発表標題 Identification of novel methylation markers in HPV-associated oropharyngeal cancer.
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三澤 清
2. 発表標題 シンポジウム 頭頸部癌のエピゲノム解析と臨床応用
3. 学会等名 第44回日本頭頸部癌学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三澤清、今井篤志、望月大極、三澤由幾、遠藤志織、美馬勝人、山田智史、瀧澤義徳、細川誠二、峯田周幸
2. 発表標題 頭頸部がんにおける脱メチル化とテロメア長について
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

〔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	今井 篤志 (Imai Atsushi) (30794309)	浜松医科大学・医学部附属病院・講師 (13802)	
研究分担者	望月 大極 (Mochizuki Daiki) (40467246)	浜松医科大学・医学部附属病院・助教 (13802)	
研究分担者	山口 裕貴 (Yamaguchi Yuki) (60837821)	浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教 (13802)	
研究分担者	石川 竜司 (Ishikawa Ryuji) (90436931)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	

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