

令和 5 年 6 月 1 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：20K09710

研究課題名（和文）リキッドバイオプシーに基づく口腔癌の予防的頸部郭清

研究課題名（英文）Prophylactic neck dissection for oral cancer based on liquid biopsy

研究代表者

鈴木 基之（Suzuki, Motoyuki）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50632329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：舌癌27例の原発巣、血液からDNAを抽出し断片化したDNAターゲットシーケンスを行った。23例(85%)でターゲットとなる遺伝子変異を同定できた。次いで、これら遺伝子変異を血液中に同定できるか検証するため腫瘍組織をデジタルPCRで測定したところ、21例において血液中の変異とほぼ同様の変異率で検出できた。StageとctDNAコピー数には有意な相関を認めた($p<0.001$)。また、原発巣のD01とctDNAにおいても強い相関を認めた。術後1週間前後に血漿中の変異が残存したものは3例あり、うち2例でその後再発を認めた。さらに、再発時のctDNAは1例を除き検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

舌癌患者のリキッドバイオプシーによりターゲットとなる遺伝子変異は進行癌では検出可能であり、早期癌でも再発時には多くの症例で検出された。また、一部の症例では術後早期に潜在的再発を予測できた。今後有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：DNA targeting sequencing was performed on 27 cases of tongue cancer in which DNA was extracted and fragmented from primary tumors and blood. 23 (85%) of the cases had target gene mutations. A significant correlation between Stage and ctDNA copy number was observed ($p<0.001$). A strong correlation was also observed between D01 of the primary tumor and ctDNA. There were three cases in which the mutation remained in the plasma around 1 week postoperatively, and two of them subsequently recurred. Furthermore, ctDNA at the time of recurrence was detected in all but one case.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：舌癌 リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

臨床的にリンパ節転移を認めない stage I/II (T1-2, N0)の口腔癌に対する標準治療は手術である。stage I/II の口腔癌では病理学的にはじめて検出される潜在的なリンパ節転移が約 30%の症例に認められることから、治療方針として 原発巣切除+予防的頸部郭清、 原発巣切除+経過観察、のいずれかが選択される。 では潜在的リンパ節転移が臨床的に顕在化した時点(多くは原発巣切除後 1 年以内)で治療的頸部郭清が行われる。

インドの Ta Ta Memorial Hospital において stage I/II の口腔癌を対象に、 原発巣切除+予防的頸部郭清と 原発巣切除+経過観察を比較するランダム化第 III 相試験が行われた(D’Cruz, et al. *New Engl J Med.* 2015)。その結果、予防的頸部郭清群は経過観察群よりも全生存割合、無病生存割合がともに有意に優れていた。これは予防的頸部郭清を標準治療として位置付けるエビデンスであるが、多くの問題を内包している。例えば、術前検査の精度が低く臨床的リンパ節転移を見逃していた可能性があること、そして、経過観察が触診のみ、あるいは触診+超音波のみで行われており、経過観察の体制が不十分であったことなどである。従って、発展途上国であるインドで得られた結果をそのまま先進国の診療に外挿することはできないと理解されている。

原発巣切除+予防的頸部郭清、あるいは 原発巣切除+経過観察という画一的な治療方針を全ての患者に適用することは、腫瘍や宿主の個性を無視したものであり患者にとって不利益が少なくない。 前者では患者の過半数が本来は不要な頸部郭清により QOL の低下を強いられる。一方、後者では潜在的リンパ節転移が顕在化した際には予防的頸部郭清よりも侵襲が強い治療的頸部郭清を要し、またリンパ節転移の確定診断が速やかに行われなかった際には患者の予後が不良となる。従って、個々の患者に適した治療、即ち潜在的リンパ節転移を有する患者のみを対象として、原発巣切除と同時に、あるいは原発巣切除後に潜在的リンパ節転移が顕在化するよりも早期に予防的頸部郭清を行う個別化治療の確立が求められる。そうした個別化治療のためには潜在的リンパ節転移を予測するバイオマーカーが必要である。

腫瘍細胞は血中へ DNA 断片を放出し(circulating tumor DNA, ctDNA)、これは正常細胞由来の DNA とともに血液の無細胞分画で cell-free DNA として存在する。ctDNA は腫瘍ゲノム全体の代用となり、血液検体を用い非侵襲的に ctDNA を評価する手法はリキッドバイオプシーと呼ばれる。本研究における学術的「問い」は、リキッドバイオプシーを指標とした潜在的リンパ節転移の診断の実現可能性、即ちリキッドバイオプシーを指標として予防的頸部郭清の適応を決定する個別化治療の実現可能性を検証することにある。

2. 研究の目的

臨床的にリンパ節転移を伴わない口腔癌を原発巣切除+経過観察で加療した場合、術後経過観察中に ctDNA が検出されれば、それは潜在的リンパ節転移が存在することを意味していると考えられる。本研究では、原発巣切除+経過観察を行う、即ち予防的頸部郭清を行わない stage I/II の口腔癌を対象として術前後に経時的にリキッドバイオプシーを行い、術後経過観察中に潜在的リンパ節転移が顕在化する(以下、リンパ節再発と呼ぶ)よりも先行して ctDNA が検出されることを後方視的且つ前方視的に実証することを目的とする。

3. 研究の方法

予防的頸部郭清を行わず原発巣切除のみで加療する stage I/II の口腔癌を対象として、経時的なリキッドバイオプシーによる ctDNA のモニタリングを行う。具体的には先ず原発巣の遺伝子

変異を同定し、その遺伝子変異が術後経過観察中の循環血液中の cell-free DNA においても検出されれば、その後にリンパ節再発が生じることを後方視的且つ前方視的に実証する。

(1) 後方視的解析

コホート

2017年9月から血液検体の収集を開始し、現時点で23例について手術直前および手術後3日目、手術後1ヶ月目の血漿を凍結保存している。更に、経過観察中にリンパ節再発を認めた5例については、再発確定時および頸部郭清後3日目の血漿も凍結保存している。

ターゲットシーケンスによる原発巣の遺伝子変異の同定

The Cancer Genome Atlas (TCGA)で公開されている口腔癌172例のデータベースによれば、10%以上の頻度で変異を認める遺伝子は6遺伝子あり(表1)、89%の症例でそのいずれかの遺伝子に変異を認める。そこで、これら6遺伝子のあらゆる変異を検出可能なカスタムパネルを既に作製した。このパネルを用いて各症例の原発巣の遺伝子変異を同定する。具体的には、分子バーコード技術を採用したキット(xGen Hybridization, IDT社)を用い、原発巣のパラフィン包埋標本からDNAを抽出してシーケンスライブラリーを調整後、次世代シーケンサー(MiSeq, Illumina社)で解析する。このように解析対象遺伝子を限定することにより、全エクソーム解析を行うよりも低コストで効率よく、しかも高感度な変異検出が可能となる。また、原発巣の生検標本と手術摘出標本で同様の結果が得られることを確認する。

デジタルPCRによる循環血液中の遺伝子変異(ctDNA)の検出

ある特定の遺伝子変異の有無を追跡する際、デジタルPCRはターゲットシーケンスよりも更に検出感度が向上すると考えられている。そこで、各症例の原発巣において同定された遺伝子変異のうち最も変異アレル頻度の高いものについて、症例毎にプライマーを作製する。次いで、血液検体から cell-free DNA を抽出してデジタルPCR(QX200, Bio-Rad社)による解析を行い、その遺伝子変異(ctDNA)が検出されるかどうか検討する。尚、我々は臨床的に頸部リンパ節転移を有する口腔癌進行例を対象に同様の解析を行い、術前には ctDNA が検出されるが術後(原発巣切除+頸部郭清)には検出されないことを既に確認している。

ctDNA とリンパ節再発の相関性の解析

リンパ節再発例では原発巣切除後のいずれかの時点で ctDNA が検出されるが、頸部郭清後には ctDNA が検出されないこと、一方、リンパ節非再発例では原発巣切除後のいずれの時点でも ctDNA が検出されないことを確認する。尚、ctDNA の半減期は約数時間とされている。

(2) 前方視的解析

コホートと採血

原発巣切除前および手術後3日目、手術後2週間目、手術後1カ月目、その後は3カ月毎に外来受診日に経時的に採血を行う(図1)。既に症例の集積を開始しており、令和3年度末までに50例超を集積する予定である。リンパ節再発の有無についての経過観察は令和4年度末まで行う。従って、最低でも1年間の経過観察期間がある。

ターゲットシーケンスによる原発巣の遺伝子変異の同定

デジタルPCRによる循環血液中の遺伝子変異(ctDNA)の検出

および については後方視的解析におけると同様に行う。

ctDNA とリンパ節再発の相関性の解析

ctDNA を原発巣切除後のどの時点でも認めない場合、リンパ節再発が生じないこと、一方、ctDNA を原発巣切除後いずれかの時点で認める場合、リンパ節再発が生じることを確認する。

4. 研究成果

舌癌 27 例の原発巣、血液から抽出したリンパ球から DNA を抽出し、コバリスで断片化した DNA からシーケンスライブラリーを作製し、Miseq を用いてターゲットシーケンスを行った。TCGA のデータベースから 81%の症例で変異が検出されると予想された *TP53*、*FAT1*、*CDKN2A*、*NOTCH1*、*PIK3CA*、*KMT2D*、*CASP8* の 7 遺伝子のエクソン領域をターゲットとしたところ、23 例(85%)でターゲットとなる遺伝子変異を同定できた(変異率; 31-63%)。次いで、23 例でこれら遺伝子変異を血漿中に同定できるか検証するため、個々の変異をデジタル PCR で測定するためのプライマープロベセットをデザインした。腫瘍組織をデジタル PCR で測定したところ、21 例において Miseq で得られた変異とほぼ同様の変異率で検出できた。これら症例の治療前の血漿では 21 例中 16 例で検出できた。Stage I-II では 13 例中 8 例、Stage III-IV では 8 例中 8 例で検出され、Stage と ctDNA コピー数には有意な相関を認めた($p < 0.001$)。また、原発巣の DOI と ctDNA においても強い相関を認めた。T1N0M0 の 1 例も検出できた。6 例のうち術後 1 週間前後に血漿中の変異が残存したものは 3 例あり、うち 2 例でその後再発を認めた。これら 2 例は術直後に比べ、再発時の血漿中変異コピー数は上昇していた。11 例に再発を認めたがそのうち 8 例で再発時の血液サンプルが存在した。再発時の ctDNA は 1 例を除き検出された。

舌癌患者のリキッドバイオプシーによりターゲットとなる遺伝子変異は進行癌では検出可能であり、早期癌でも再発時には多くの症例で検出された。また、一部の症例では術後早期に潜在的再発を予測できた。今後有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

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

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