

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09758

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるctDNA検出法の確立および臨床応用

研究課題名(英文) Establishment and clinical application of ctDNA detection in head and neck cancer

研究代表者

平川 仁(Hirakawa, Hitoshi)

琉球大学・病院・講師

研究者番号：50437993

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)：頭頸部癌リキッドバイオプシーにおけるctDNA採取の課題である微量なcell free DNAを正確に採取する事ができた。特に、血漿を遠心分離するまでの時間がサンプルの品質に大きく影響するため、時間を統一した。採血後時間が経過するに従い、相対的にctDNA量が減少する。そのため、採血後の検体を凍結することなく血漿の遠心分離を行うプロトコルを作成し、実施可能であることを確認した。頭頸部上、中、下咽頭癌、喉頭癌、副鼻腔癌症例で、152症例321検体を採取し、ctDNAの採取に成功した。これらにつき臨床経過と照らし合わせ再発の有無に比例して、ctDNAが増減することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞は血流、リンパ流に乗って遠隔転移していき、上皮間葉転換することにより遠隔転移が成立しやすくなる。また癌細胞は宿主免疫や治療から逃れるため、分子プロファイルを変えている。リキッドバイオプシーは血液や唾液などの体液からこのような循環癌細胞、循環癌細胞由来DNAなどの分子生物学的情報を抽出する技術であり、症例に応じた癌治療を行える利点がある。近年癌研究分野で急速に進歩しているが、頭頸部領域ではまだ報告が少なく、その有用性は確立されていない。本研究の結果はctDNAは腫瘍由来ゲノム情報を含み、癌の予後予測、微小残存癌測定による再発リスク判定などへの応用が期待できることを示した。

研究成果の概要(英文)：The trace amount of cell free DNA, which is a challenge for ctDNA collection in head and neck cancer liquid biopsy, could be accurately collected. The time required for centrifugation of the plasma is a major factor affecting the quality of the sample. In particular, the time taken to centrifuge the plasma greatly affects the quality of the sample, so the time was standardized. The relative amount of ctDNA decreases as time passes after blood collection. Therefore, a protocol for centrifugation of plasma without freezing the specimens after blood collection was developed and confirmed to be feasible. We collected 321 specimens from 152 patients with head and neck cancer of the upper, middle, and lower pharynx, larynx, and paranasal sinus, and successfully collected ctDNA. By comparing the results with the clinical course, we found that ctDNA increased or decreased in proportion to the presence or absence of recurrence.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：リキッドバイオプシー ctDNA 頭頸部腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は血流、リンパ流に乗って遠隔転移していき、上皮間葉転換することにより遠隔転移が成立しやすくなる。また癌細胞は宿主免疫や治療から逃れるため、分子プロファイルを変えている。リキッドバイオプシー (Liquid biopsy) は血液や唾液などの体液からこのような循環癌細胞 (circulating tumor cells; CTCs)、循環癌細胞由来 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA)、エクソソーム (micorRNA など) などの分子生物学的情報を抽出する技術であり、症例に応じた癌治療を行える利点がある。

近年肺癌や大腸癌などの領域ではドライバー遺伝子による分子標的薬の選択 (コンパニオン診断) さらにはこの薬剤に耐性化した際にゲノム変化を liquid biopsy で把握しセカンドラインの分子標的薬へ変更する事が臨床で実用化されている。2014 年から肺・消化器癌においては SCRUM-Japan (産学連携全国がんゲノムスクリーニング事業) で多遺伝子パネル診断に基づいた liquid biopsy の開発研究を開始しており、2018 年からは免疫関連遺伝子発現のプロファイリング研究、進行再発大腸癌における血管新生・免疫関連因子の研究も開始された。最近では免疫チェックポイント阻害薬の効果予測としてマイクロサテライト不安定 (MSI)

DNA ミスマッチ修復機能 (MMR)、Tumor mutation burden (TMB) などが候補に挙がり、liquid biopsy による測定の有用性が報告されている。

一方、頭頸部癌における liquid biopsy では、HPV、TP53、CDK、PIK3A を遺伝子変異ターゲットとし口腔癌、中咽頭癌、喉頭癌、下咽頭癌でそれぞれ 80%、91%、86%、100% と高い正診率であったことが報告 (Wang Y, et al, Sci Transl Med 7(293):293ra104, 2015) されている。また唾液の遺伝子変異情報を加えると中咽頭癌以外すべて正診率 100% であったと報告し liquid biopsy の有用性を示した。しかし症例数は限定的で、liquid biopsy の利点である複数回・低侵襲・リアルタイムモニターという特徴を生かしきれていない。

このようにリキッドバイオプシーは近年癌研究分野で急速に進歩しているが、頭頸部領域ではまだ報告が少なく、その有用性は確立されていない。ctDNA は腫瘍由来ゲノム情報を含むため、癌の予後予測、微小残存癌測定による再発リスク判定、分子標的薬を含めた薬物療法の効果予測などへの応用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は頭頸部癌における ctDNA の有用性を明らかにし、臨床応用への道をつけることにある。頭頸部癌以外では臨床応用への臨床試験が開始されている。しかし、頭頸部癌では HPV の検出、EGFR、KRAS/NRAS などの遺伝子に関する報告はみられるが、ctDNA から得られる情報と予後、薬剤感受性などについて検討はほとんど行われていない (Lauritano D et al, Oral Oncol, 97:7-17, 2019)。申請者が所属している機関に県内の 90% 以上の頭頸部癌症例が集積されており、診断・治療が行われ、関連施設とともにフォローアップを行っている。この利点を生かし、ctDNA 解析から得られる質的・量的情報を解析し、ctDNA の有用性を確立するところが独自性である。Droplet digital PCR 法は第 3 世代の PCR 法であり、微量のコピー数でも検出できる。Realtime PCR と droplet PCR を組み合わせる汎用性の検証も考える。

今後の precision medicine へ近づき、不要な治療を減らし、医療費の削減や患者さんの QOL 向上につながると想定した。

3. 研究の方法

血漿中の cell free DNA の中で、ctDNA は 0.01% 以下で、その濃度は 1 ~ 100 ng/ml と低く (Diehl F, et al, Nat Med 14:985-90, 2008)、腫瘍量を反映している (De Rubis G, et al, Trend in Pharmacol Sci, 40:172-86, 2019)。さらに通常のゲノム DNA と異なり、血中では 80 - 200 塩基対程度に分解されておりその半減期は 2.5 時間と極めて短い (Wan JCM, et al, Nat Rev Cancer 17: 223-38, 2017) ため、リアルタイムの腫瘍細胞の情報を反映している。

微量な ctDNA 検出で正確な結果を得るには試料の収集法と解析前サンプル調製の標準化が重要である。解析前サンプル調製の過程は大きく分けて、患者からの血液採取、遠心による血漿分離、血漿 DNA 抽出、および抽出 DNA の定量である。特に、**血漿を遠心分離するまでの時間がサンプルの品質に大きく影響するため、時間を統一する**。採血後時間が経過するに従い、ctDNA は崩壊し、さらに血中有核細胞由来 DNA 量が増加し、相対的に ctDNA 量が減少する。そのため、採血後の検体を凍結することなく **1 時間以内** に血漿の遠心分離を行う。この問題を克服するため血中有核細胞からの DNA 放出を防ぐ ctDNA 解析専用の採血管を使用する。この使用により細胞溶解を防ぎ、有核細胞が保存された状態で輸送することが可能である。ctDNA を磁性ビーズ法により、血漿サンプルから濃縮、精製を行った。精製ステップではカラムメンブレンに QIAamp UCP MinElute Columns を使用した。この方法は、迅速かつ簡便である、濃縮ステップにおける、サンプル間のクロスコンタミネーションがほぼない、感染の可能性のあるサンプル取り扱いの際、安全性が高いことがあげられる。

ctDNA の判定に関して血液中には正常細胞由来 DNA と ctDNA の両方が含まれており、ctDNA のみを選別して抽出するのは困難であり、ゲノム中のいずれの塩基が腫瘍特異的なシグナルとなるかは患者ごとに異なる。

ctDNA は特に 2 つの情報を持つ。質的情報 (ゲノム情報) heterogeneity (転移および治療抵抗性) の解明、薬物療法効果予測と量的情報 (ctDNA の濃度) 初診時の予後・遠隔転移予測、術後根治性診断、化学療法治療効果のモニタリング、再発の早期診断である。

頭頸部癌の癌関連遺伝子変異は TP53, PIK3, CDKN2A, FBXW7, HRAS, NRAS などが報告されている (Cancer Genome Atlas Network, Nature 517:576-82, 2015)。また HPV 関連中咽頭癌に関しては HPV (E6)、上咽頭癌では EBV が ctDNA の指標となりうる (Chan KCA, et al, N Engl J Med 377:513-22, 2017)。悪性腫瘍患者の初診時生検、および手術検体組織を新鮮凍結標本、パラフィンブロックとして保存しており遺伝子変異測定が可能である。

ctDNA は TaqMan プローブ法を用いてゲノムコピー数を測定する。指標ゲノム変異を真の腫瘍ゲノム変異として血液から採取した ctDNA の結果を比較した。HPV16 DNA を本方法で検出できることを確認した。

4 . 研究成果

頭頸部癌リキッドバイオプシーにおける ctDNA 採取の課題である微量な cell free DNA を正確に採取する事ができた。特に、血漿を遠心分離するまでの時間がサンプルの品質に大きく影響するため、時間を統一した。採血後時間が経過するに従い、相対的に ctDNA 量が減少する。そのため、採血後 の検体を凍結することなく血漿の遠心分離を行うプロトコールを作成し、実施可能であることを確認した。本研究において、重要なことは頭頸部外来及び病棟にて適格患者に対し、本研究用の採血を行った後、2 時間以内に遠心分離を耳鼻咽喉科研究室において行うシステムを作ることであった。臨床における採血は適宜、患者の不利益にならないよう行われるため、このシステム構築は極めて重要であった。この結果、頭頸部上、中、下咽頭癌、喉頭癌、副鼻腔癌症例で、152 症例 321 検体を採取し、ctDNA の採取に成功した。これらにつき臨床経過と照らし合わせ再発の有無に比例して、ctDNA が増減することを突き止め学会のシンポジウム (気管食道科学会 2022 年 10 月、沖縄、宜野湾市) で発表した。また研究奨励賞をいただき授賞式にて本結果を発表した (2023 年 2 月沖縄、那覇)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 3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 Hirakawa Hitoshi, Matsuzuka Takashi, Uemura Hirokazu, Yoshimoto Seiichi, Miura Kouki, Shiotani Akihiro, Sugasawa Masashi, Homma Akihiro, Yokoyama Junkichi, Tsukahara Kiyooki, Yoshizaki Tomokazu, Hanai Nobuhiro, Suzuki Hidenori, Suzuki Mikio, Hasegawa Yasuhisa	4. 巻 49
2. 論文標題 Distribution pattern and pathologic analysis of metastatic sentinel and non-sentinel lymph nodes in lymphatic basin dissection for clinical T2/T3 oral cancer with clinical N0 status	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 680 ~ 689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2021.11.010	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 Heianna Joichi, Makino Wataru, Hirakawa Hitoshi, Agena Shinya, Tomita Hayato, Ariga Takuro, Ishikawa Kazuki, Takehara Shota, Kusada Takeaki, Maemoto Hitoshi, Maeda Hiroyuki, Murayama Sadayuki	4. 巻 49
2. 論文標題 Therapeutic efficacy of selective intraarterial chemoradiotherapy with docetaxel and nedaplatin for human papilloma virus-negative oropharyngeal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 468 ~ 476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2021.10.014	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 Yasumatsu Ryuji, Shimizu Yasushi, Tsukahara Kiyooki, Hirakawa Hitoshi, Yamauchi Moriyasu, Watanabe Akihito, Omori Koichi, Yamazaki Tomoko, Monden Nobuya, Kudo Naomi, Arai Makoto, Yonekura Syuji, Asakage Takahiro, Nekado Takahiro, Yamada Takayuki, Homma Akihiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Outcomes of long-term nivolumab and subsequent chemotherapy in Japanese patients with head and neck cancer: 2-year follow-up from a multicenter real-world study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 95 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-02047-y	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 Makino Wataru, Heianna Joichi, Ishikawa Kazuki, Kusada Takeaki, Maemoto Hitoshi, Ariga Takuro, Matayoshi Akira, Nakasone Toshiyuki, Hirakawa Hitoshi, Agena Shinya, Yamashita Yukashi, Maeda Hiroyuki, Murayama Sadayuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Patterns of recurrence after low-dose postoperative radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Egyptian National Cancer Institute	6. 最初と最後の頁 40 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s43046-021-00098-w	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 Ikegami Taro, Kise Norimoto, Kinjyo Hidetoshi, Kondo Shunsuke, Suzuki Mikio, Tsukahara Narutoshi, Murakami Akikazu, Kiyuna Asanori, Agena Shinya, Tanaka Katsunori, Hasegawa Narumi, Kawakami Junko, Ganaha Akira, Maeda Hiroyuki, Hirakawa Hitoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of Antibodies against HPV-6 and HPV-11 for the Study of Laryngeal Papilloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2024 ~ 2024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13102024	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 Kariya Shin, Shimizu Yasushi, Hanai Nobuhiro, Hirakawa Hitoshi, Sano Daisuke, Yamauchi Moriyasu, Watanabe Akihito, Omori Koichi, Yamazaki Tomoko, Monden Nobuya, Kudo Naomi, Arai Makoto, Yonekura Shuji, Asakage Takahiro, Fujiwara Akinori, Yamada Takayuki, Homma Akihiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Effectiveness of nivolumab affected by prior cetuximab use and neck dissection in Japanese patients with recurrent or metastatic head and neck cancer: results from a retrospective observational study in a real-world setting	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1049 ~ 1056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-01900-4	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 Hanai Nobuhiro, Shimizu Yasushi, Kariya Shin, Hirakawa Hitoshi, Yamauchi Moriyasu, Watanabe Akihito, Omori Koichi, Yamazaki Tomoko, Monden Nobuya, Kudo Naomi, Arai Makoto, Sakurai Daiju, Asakage Takahiro, Doi Issei, Yamada Takayuki, Homma Akihiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Correction to: Effectiveness and safety of nivolumab in patients with head and neck cancer in Japanese real-world clinical practice: a multicentre retrospective clinical study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-01879-y	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 Hirakawa Hitoshi, Ikegami Taro, Kise Norimoto, Kinjyo Hidetoshi, Kondo Shunsuke, Agena Shinya, Hasegawa Narumi, Kawakami Junko, Maeda Hiroyuki, Suzuki Mikio	4. 巻 13
2. 論文標題 Human Papillomavirus Infection and EGFR Exon 20 Insertions in Sinonasal Inverted Papilloma and Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 657 ~ 657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm13040657	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 Matsuzuka Takashi, Tsukahara Kiyooki, Yoshimoto Seiichi, Chikamatsu Kazuaki, Shiotani Akihiro, Oze Isao, Murakami Yoshiko, Shinozaki Takeshi, Enoki Yuichiro, Ohba Shinichi, Kawakita Daisuke, Hanai Nobuhiro, Koide Yusuke, Sawabe Michi, Nakata Yusuke, Hirakawa Hitoshi, Hasegawa Yasuhisa	4. 巻 13
2. 論文標題 Predictive factors for dissection-free sentinel node micrometastases in early oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6188 ~ 6188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-33218-8	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平川仁
2. 発表標題 舌癌に対するセンチネルリンパ節生検の有用性
3. 学会等名 SNNS研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川仁
2. 発表標題 鼻副鼻腔内反性乳頭腫の基礎と臨床
3. 学会等名 日本鼻科学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川仁
2. 発表標題 下咽頭癌導入化学療法におけるDNA修復酵素遺伝子多型を用いた 効果予測
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川仁
2. 発表標題 頭頸部がんにおけるsalvage,conversion surgery
3. 学会等名 気管食道科学会（招待講演）
4. 発表年 2022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	池上 太郎 (Ikegami Taro) (00754409)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	
研究分担者	山下 懐 (Yamashita Yukashi) (60569622)	琉球大学・医学部・委託非常勤講師 (18001)	

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