

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18250

研究課題名（和文）頭頸部癌の血中循環腫瘍細胞による上皮間葉移行モニタリング法の確立

研究課題名（英文）EMT monitoring of circulating tumor cell in HNSCC

研究代表者

今井 篤志（Imai, Atsushi）

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30794309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：リキッドバイオプシーを用いてセルフリーDNAを高感度かつ高精度で分析する技術が競って開発されている。頭頸部癌においては、免疫チェックポイント阻害薬の登場で化学療法の選択肢が増え、薬剤耐性に関連する可塑性（plasticity）や不均一性（heterogeneity）を備えた癌細胞の病態の経時的分析が、個別化医療の鍵になると考えられる。申請者はHPV関連中咽頭癌のcfDNAからのHPV検出に加え、治療前後から再発転移を含む経時的な臨床経過との関連を報告した。しかし、HPV非関連癌のリキッドバイオプシーへの応用はなされていない。今回、HPV非関連頭頸部癌のバイオマーカーを確立したいと考えた。

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、従来の殺細胞性抗癌剤・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大きく広がった。それに伴い効果判定基準も従来の腫瘍縮小効果に基づいたRECIST ver.1.1から免疫療法の異型反応を捉えて評価するimmune RECISTが提唱されるなど基準が複雑化している。そのため腫瘍の再発を含めた病勢や化学療法の効果・予後予測を判定する明確なバイオマーカーの確立が求められている。今回、エピジェネティクス変化をとらえることで病態・治療効果・予後に関わるHPV関連・非関連頭頸部癌のバイオマーカーを確立したいと考えた。

研究成果の概要（英文）：Techniques for analysing cell-free DNA with high sensitivity and accuracy using liquid biopsy are being developed competitively. In head and neck cancer, the advent of immune checkpoint inhibitors has increased the number of chemotherapy options, and the analysis of the pathology of cancer cells over time, with their plasticity and heterogeneity associated with drug resistance, is considered to be a key to personalised medicine. The applicant reported HPV detection in cfDNA of HPV-associated mesopharyngeal carcinoma, as well as its association with the clinical course over time, including recurrent metastases from before and after treatment. However, this has not been applied to liquid biopsy of HPV-unassociated cancers. In the present study, we wanted to establish a biomarker for HPV-unrelated head and neck cancers.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：クリニカルシーケンス リキッドバイオプシー 腫瘍循環細胞 セルフリーDNA 個別化医療 上皮間葉移行 薬剤抵抗性 原発不明癌

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。

1. 研究開始当初の背景

再発・転移を有する進行頭頸部癌において、従来の殺細胞性抗癌剤・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大きく広がった。それに伴い効果判定基準も従来の腫瘍縮小効果に基づいた RECIST ver.1.1 から免疫療法の異型反応を捉えて評価する immune RECIST が提唱されるなど基準が複雑化している。そのため腫瘍の再発を含めた病勢や化学療法の効果・予後予測を判定する明確なバイオマーカーの確立が求められている。今回、リアルタイムなエピジェネティクス変化をとらえるモニタリング法を開発することで病態・治療効果・予測に関わる HPV 非関連頭頸部癌のバイオマーカーを確立したいと考えた。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌の個別化治療アプローチを改善するために、新しいバイオマーカーが早急に必要とされている。グローバルな DNA の低メチル化は、多段階の発がんにおいて広範な機能を有しており、long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) の低メチル化は、レトロトランスポゾン活性の亢進やゲノムの不安定性に関連している。

レトロトランスポゾン活性の亢進とゲノムの不安定性の誘導に関連している。LINE-1 の発現が、上皮間葉移行(EMT)の過程と転移の発生を活性化について関連性について報告されている。しかし、頭頸部扁平上皮癌における LINE-1 の低メチル化とその再発・予後に関する情報は、これまで報告されていない。

本研究では、LINE-1 の低メチル化が無病生存率(DFS)の低下と関連し、HPV 非関連頭頸部癌である口腔癌において重要なイベントであることを示した。さらに、本研究は、5-hmC レベルの蓄積亢進がグローバルな LINE-1 低メチル化レベルと逆相関することを明らかにし、頭頸部扁平上皮癌におけるグローバルな低メチル化の制御に関する基本的な知見を提供した。最後に、新規 ctDNA ベースのエピジェネティックマーカーを同定し、口腔癌の診断と予後を効率的に改善する能力を証明するために実施した検証研究の結果を報告する。

3. 研究の方法

腫瘍サンプル

317 サンプルの原発性頭頸部扁平上皮癌組織と 225 サンプルの正常組織から手術中に得られた。全患者は浜松医科大学耳鼻咽喉科で治療を受けた。すべての患者は、当院の施設審査委員会 (Institutional Review Board) で承認されたプロトコルに基づき、書面によるインフォームド・コンセントを得た (承認コード: 25-149)。患者の平均年齢は 65.8 歳 (32~92 歳) であった。患者のうち、男性は 261 人、女性は 56 人であった。原発腫瘍部位は、喉頭 (n=64)、下咽頭 (n=87)、中咽頭 (n=68)、口腔 (n=98) であった。

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。LINE-1 遺伝子ならびに他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'
ACTB	TGGTGATGGAGGAGGTTTGAAGT	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA
LINE-1 MSP	CGCGAGTCGAAGTAGGGC	ACCCGATTTTCCAATACGACCG
LINE-1 UMSP	TGTGTGTGAGTTGAAGTAGGGT	ACCCAATTTTCCAATACAACCATCA
CCBE1	GTGCGGAGGAGTAGGACGCTT	CTCGAAAACGACGACACCATC
TAC1	GGCGGTTAATTAATATTGAGCAGAAAAGTCGC	AAATCCGAACGCGCTCTTTTCG
DCC	TTGTTTCGCGATTTTTGGTTTC	ACCGATTACTTAAAAATACGCG
MGMT	TTCGACGTTCTGAGGTTTTCGC	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG
CDH1	GTGGGCGGGTCGTTAGTTTC	ACCACAACCAATCAACGCGA
GHSR	TAGTATGTGGAACGCGACGT	AACTCGTCGCCAACGAATC
COL1A2	ACGGTAGTAGGAGGTTTCGG	CGCAAAACCCCTAAATCACCGACG
NPY4R	AGGTTGGGCGGGCTAGGCGGGA	CGAAACAAAACCGCGCTACTT
NPY2R	CGAGTGAGTCGGTGTAGGCG	CGAACGAACAACCGAAACAATC
NMUR1	GCGCGGGTTGGGGTCGTTGT	CGCACTACCATACGACCCG

表 1: 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

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。既知量の LINE-1 メチル化 DNA 分子と非メチル化 DNA 分子を用いて、絶対標準曲線を作成した (それぞれ、 $y = -6.125 * \log(x) + 26.54$ および $y = -2.765 * \log(x) + 21.19$)。メチル化または非メチル化 LINE-1 配列コピー数は標準曲線から推定した。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。

5-hmC 定量用酵素結合免疫吸着アッセイ

ゲノム DNA の 5-hmC 含量は、Quest 5-hmC DNA enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (Zymo Research) を用いて測定した。アッセイは、製造元の説明書に従い、1 ウェルあたり 100 ng の DNA を負荷し、4 μ g/mL の抗 5hmC ポリクローナル抗体を用いて行った。430nm の吸光度を SynergyH1 マイクロプレートリーダーと Gen5 ソフトウェア (Bio-Tek) を用いて測定した。5-hmC の量は、キットのコントロールを用いて作成した標準曲線に基づいてパーセンテージとして計算した。

ゲノム DNA の 5-hmC 含量は、Quest 5-hmC DNA enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) を用いて測定した。アッセイは、製造元の説明書に従い、1 ウェルあたり 100 ng の DNA を負荷し、4 μ g/mL の抗 5hmC ポリクローナル抗体を用いて行った。430nm の吸光度を SynergyH1 マイクロプレートリーダーと Gen5 ソフトウェア (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) を用いて測定した。5-hmC の量は、キットのコントロールを用いて作成した標準曲線に基づいてパーセンテージとして計算した。

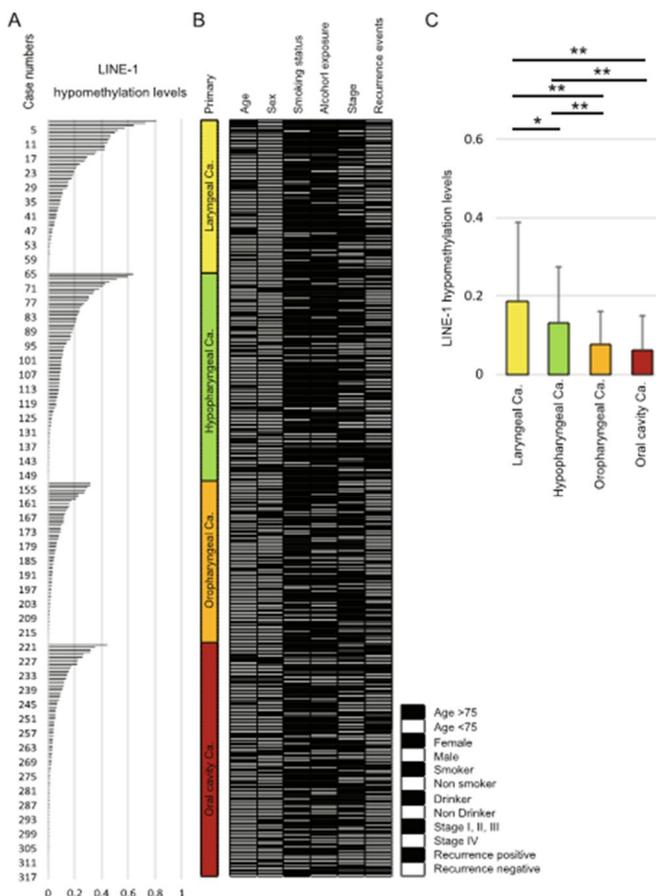
リキッドバイオプシー

治療前後に得られた ctDNA を用いて、5 人の OCC 患者からなる検証試験で LINE-1 の低メチル化レベルを検証した。4.0mL の血漿検体から ctDNA を分離し、製造者の指示に従って磁気ビーズに親和性で結合させた (QIAamp MinElute ccfDNA Kit, QIAGEN)。末梢血サンプル (各 10mL) を細胞安定化チューブ (Cell-Free DNA Collection Tube, Roche, CA, USA) に採取した。

4. 研究成果

頭頸部扁平上皮癌腫瘍検体における LINE-1 低メチル化レベルの分布。

LINE-1 低メチル化レベルの分布と臨床病理学的因子。A) LINE-1 低メチル化レベルの部位別比較。左の列の数字は症例番号 (1-317 と表示) を表し、棒グラフは 317 症例中の LINE-1 メチル化低下レベルを示している。B) 塗りつぶしたボックスと開いたボックスは臨床病理学的鑑別を示す。C) Student の t 検定による様々な原発群における LINE-1 メチル化レベルの比較。(図 1) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$



LINE-1 低メチル化レベルと臨床病理学的因子との関連。

- A) 喉頭がん：LINE-1 メチル化低下レベルと年齢、および LINE-1 メチル化低下レベルと腫瘍の大きさの間に統計学的に有意な差が認められる。
- B) 下咽頭がん：いずれの臨床的特徴においても差は認められない。
- C) 中咽頭がん：LINE-1 メチル化低下レベルと HPV の状態（陽性と陰性）の間に統計学的に有意な差が認められる。
- D) 口腔がん：LINE-1 ハイメチル化レベルと再発イベント（陽性と陰性）の間に統計学的有意差が認められる。平均値と標準偏差も示した。*P < 0.05

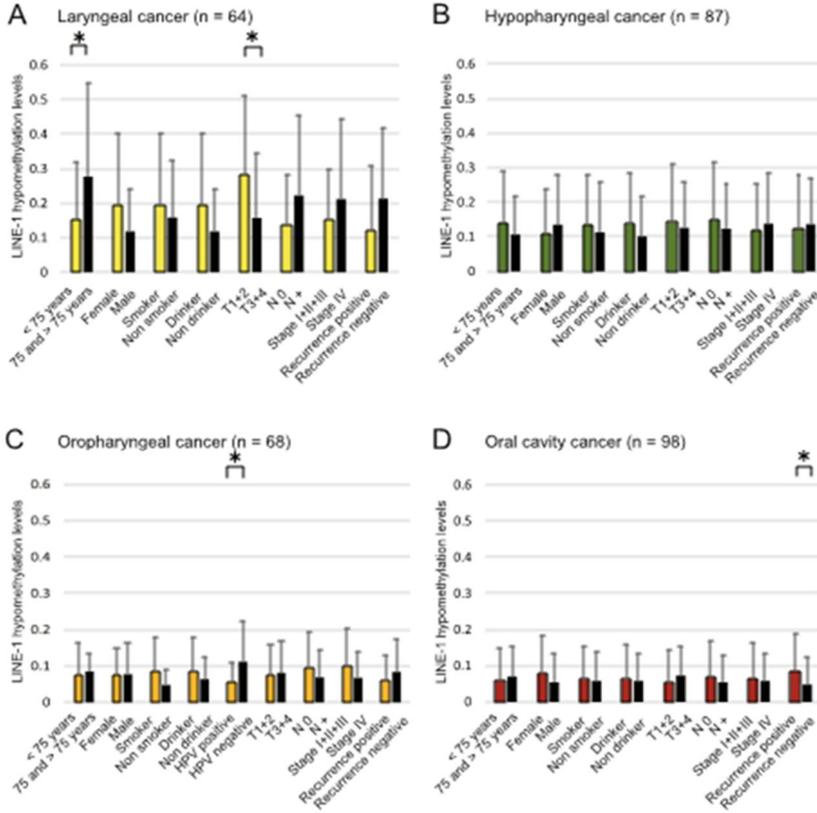


図 2

LINE-1 の低メチル化レベルに応じた Kaplan-Meier 生存曲線。

- A) 317 症例の無病生存率 (P = 0.626)
- B) 口腔がん (n = 98; P = 0.038) *P < 0.05

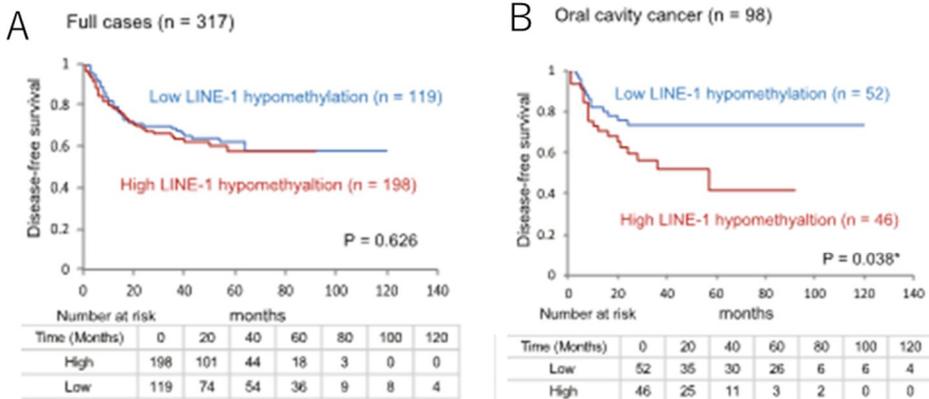


図 3

頭頸部扁平上皮癌原発組織における 10 個の癌抑制遺伝子の 5-hmC レベルおよびメチル化インデックス (MI) と LINE-1 低メチル化レベルの比較。

A) 177 症例の頭頸部扁平上皮癌における 5-hmC レベルと LINE-1 高メチル化レベルのスピアマン順位相関 ($R^2 = 0.0929$, $P < 0.001$)

B) 頭頸部扁平上皮癌患者における 5-hmC レベルと LINE-1 高メチル化レベルの相関 (Student の t 検定; $P = 0.006$)

C) 10 個の癌抑制遺伝子における LINE-1 の低メチル化レベルとプロモーターのメチル化の分布。網掛けボックスはメチル化の存在を示し、オープンボックスはメチル化の無しを示す。

D) 頭頸部扁平上皮癌患者における MI と LINE-1 メチル化低下レベルの相関 ($P = 0.0003$)。異なるグループの遺伝子メチル化率は Student's t-test を用いて比較した。** $P < 0.01$

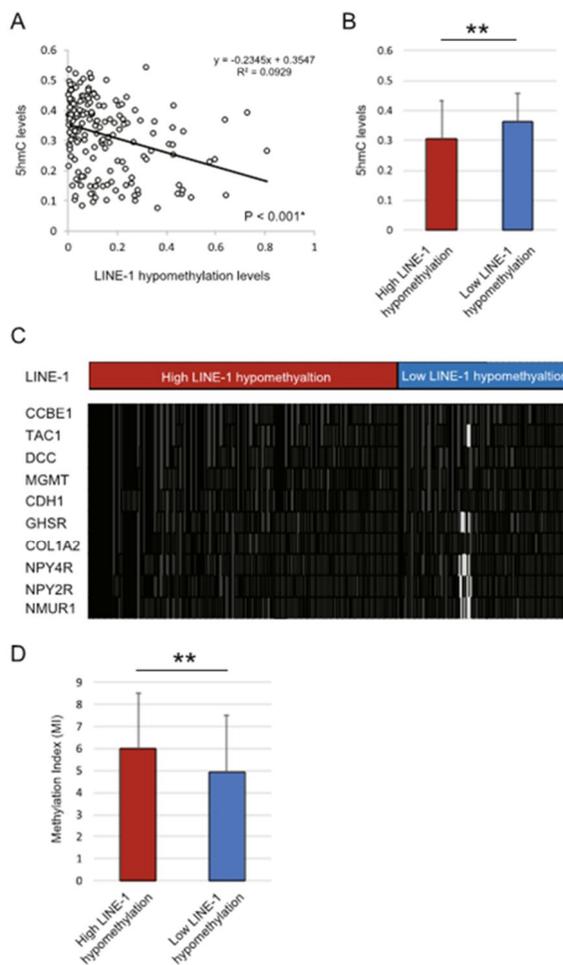


図 4

原発性口腔がん検体と治療前後のペアになった ctDNA 検体における LINE-1 低メチル化レベルの検証解析。原発性サンプル、マッチさせた正常粘膜サンプル、治療前と治療後に分離した ctDNA の 5 つの DNA 標本における LINE-1 ハイメチル化レベルの比較。* $P < 0.05$

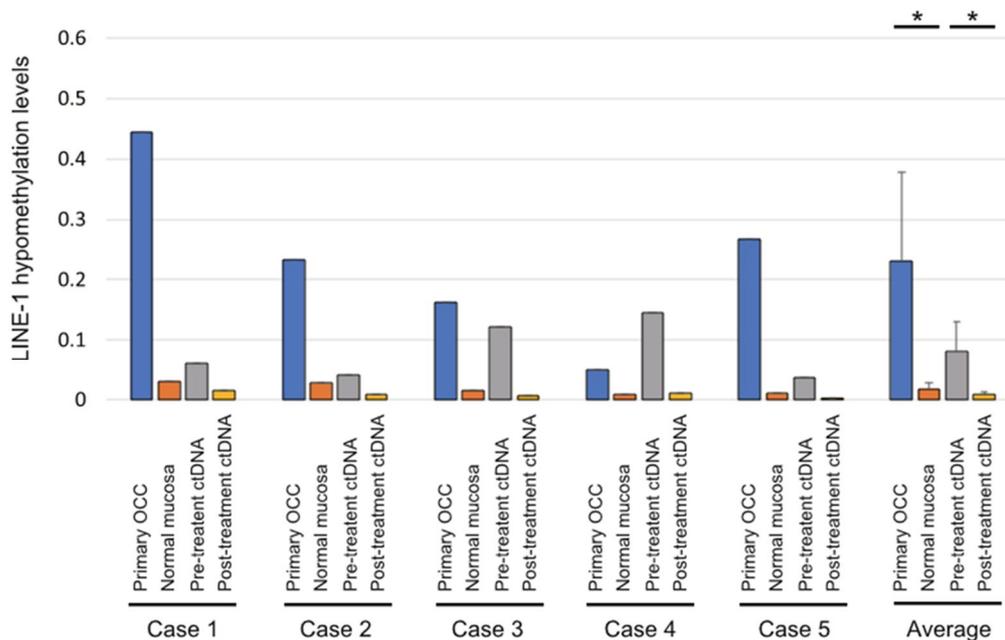


図 5

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 9件）

1. 著者名 Sano A, Inoue Y, Kikuchi H, Fukuchi K, Funai K, Imai A, Matsushita Y, Tamura K, Kitagawa M, Miyake H.	4. 巻 17(5)
2. 論文標題 Development of a Simple and Objective Prognostication Model for Patients with Advanced Solid Malignant Tumors Treated with Immune Checkpoint Inhibitors: A Pan-Cancer Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Target Oncol.	6. 最初と最後の頁 583-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11523-022-00911-z	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 2021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.currproblcancer.2021.100834	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 今井 篤志, 三澤 清	4. 巻 37
2. 論文標題 【分子標的薬と耳鼻咽喉科】頭頸部癌における分子標的薬の役割 頭頸部扁平上皮癌 骨転移症例に対して.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 1573-1576
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 太田 悠介, 今井 篤志, 中川 雅裕	4. 巻 37
2. 論文標題 【口腔癌診療の最前線】治療とリハビリテーション 口腔癌手術における硬性再建 遊離腭骨皮弁の特徴・適応とカスタムメイドプレートの使用経験.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 500-504
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 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(1)
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	4. 巻 10(1)
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, 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(4)
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, 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, 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 -

1. 著者名 今井篤志, 三澤清, 山田智史, 岡村純, 望月大極, 山口裕貴, 瀧澤義徳, 細川誠二, 峯田周幸	4. 巻 156巻
2. 論文標題 HPV関連中咽頭癌例に対する血液循環腫瘍DNAを用いたリキッドバイオプシーの有用性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科臨床 補冊	6. 最初と最後の頁 1-7
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井篤志
2. 発表標題 術後に気管カニューレが必要な症例に対する鹿野式声門閉鎖術の切開孔形成の工夫
3. 学会等名 第123回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井篤志
2. 発表標題 下歯肉癌に対して術前化学療法をおこなったTruMatch使用例
3. 学会等名 第84回耳鼻咽喉科臨床学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井篤志、望月大極、山口裕貴、竹内一隆、羽宇宙、井藤雄次、玉腰明日野、林暁利、名倉悠真、大石宏虎、高橋佳也、別所佑樹、山田智史、山田大貴、新村大地、瀧澤義徳、三澤清、細川誠二、峯田周幸
2. 発表標題 TruMatch Reconstruction システムを用いた下顎再建例 .
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 今井篤志、三澤清、山田智史、望月大極、山口裕貴、細川誠二、峯田周幸
2. 発表標題 当院における甲状腺癌に対するレンパチニブの検討
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 今井篤志、三澤清、山田智史、望月大極、山口裕貴、細川誠二、峯田周幸
2. 発表標題 当院における免疫チェックポイント阻害薬後の救済化学療法
3. 学会等名 第82回耳鼻咽喉科臨床学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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