

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791596

研究課題名（和文）頭頸部癌における分子標的薬治療の検査確立を目指した遺伝子解析

研究課題名（英文）Genetic analysis in head and neck carcinomas in order to establish useful biomarkers.

## 研究代表者

蝦原 康宏 (EBIHARA YASUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50422291

研究成果の概要（和文）：頭頸部扁平上皮癌の治療において治療選択と効果の予測指標としてバイオマーカー確立が急務である。今回研究により、バイオマーカーとして注目されている *TP53* 遺伝子の変異様式が、日本人においてナンセンス変異が優位であるという特殊性を発見した。*EGFR*、*EGFR variant type III*、*ALK*、*EML4-ALK* など他の遺伝子については、検索範囲内で異常を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：To improve the effectiveness of therapies in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs), it is important to identify biomarkers related to clinical gain. In this research, we found dominance of nonsense mutations in Japanese HNSCCs compared with other previous reports in the world. However, *EGFR* mutations, *EGFR variant type III*, *ALK* mutations, *EML4-ALK* fusions were not found in all the cases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部外科学、頭頸部腫瘍、頭頸部癌、遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は、罹患数・死亡数とも増加にあり、この部位はQOLとして食事（嚥下）・発声・コミュニケーションに深く関わるため、その治療には困難が伴う。近年、頭頸部癌の原発巣別の特徴が解明されつつあり、治療の個別化が一層必要とされている。また、現在癌治療の各方面において分子標的薬の導入が図られおり、

これらの治療薬が侵襲の少ないがん治療の担い手として、頭頸部癌においても今後は有望と考えられる。しかし既存の報告は、人種・原発巣による差を充分反映したものではないため、頭頸部癌における分子標的治療の適応決定の指標となる、遺伝子プロファイル作成が、必須と考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 扁平上皮癌が多数を占める頭頸部癌において、*EGFR*の発現程度と予後との関連についての報告があり、海外ではCetuximab (抗*EGFR*抗体)が臨床使用され、効果が確認されている。これまでの頭頸部扁平上皮癌の*EGFR*変異に関する報告は、日本人と、原発巣別の解析(特に中・下咽頭癌)に関して不十分である。現在、中・下咽頭癌における治療選択肢である手術(喉頭摘出を含む)と放射線化学療法の治療前選別に有効なバイオマーカーはなく、本研究が将来の分子標的薬を含めた治療反応性の指標として確立すれば、QOLに直結する喉頭温存の可能性に道を拓き、臨床応用の面に大きな価値があると考えられる。

(2) 他の遺伝子として、大腸癌において報告された*K-ras*遺伝子、肺癌において報告された*EML4-ALK* fusion 遺伝子、神経芽細胞腫にて報告された*EGFR*同様の tyrosine kinase 異常活性化の原因となりうる*ALK*遺伝子、神経膠芽腫において報告された*EGFR variant type III* 遺伝子、これまで頭頸部扁平上皮癌にて報告のある*TP53*遺伝子が、治療標的そのものやバイオマーカー候補として重要と考えられる。

(3) *CADMI* 遺伝子は肺癌において初めて同定された癌抑制遺伝子であり、細胞膜上に発現する細胞接着分子をコードするため、癌の浸潤・転移に深く関わっている可能性が高い。これまで頭頸部扁平上皮癌において*EGFR*の過剰発現と予後の相関は示されているが、遠隔転移は*EGFR*発現の程度とは相関しないと報告され、遠隔転移の制御を目指す上での課題は多い。この点、*CADMI*のメチル化による発現抑制が、上咽頭癌において転移頻度に関わる可能性が示されているほか、肺癌・食道癌・子宮頸癌などにおいて*CADMI*のメチル化が癌の予後と関連するとの報告があるが、頭頸部扁平上皮癌において*CADMI*メチル化の報告は未だない。

以上より、今回、頭頸部腫瘍組織標本から抽出した、ゲノムDNA、RNA、タンパク質を用いて、上記遺伝子の異常の有無を調べることにより、頭頸部腫瘍における分子生物学的メカニズムの解明に寄与し、診断や治療へ応用可能な情報を得る

ことを目標とする。

### 3. 研究の方法

東京大学耳鼻咽喉科外来の頭頸部腫瘍患者を対象とする。説明同意書を用いて当該研究の説明を行い同意を得た。標本は、手術にて摘出後、液体窒素にて凍結し速やかに-80度の deep freezer にて保存、もしくは、Qiagen All protect tissue reagent をマニュアルに沿って使用して保存とした。その後 Qiagen All prep mini kit を使用して DNA、RNA を抽出した。抽出 DNA、RNA は分光光度計(日立 Gene Spec III)にて濃度・純度を測定、以下の実験に使用した。各遺伝子異常の検出方法は以下の通り。

(1) *EGFR*, *ALK*, *K-ras*, *TP53* などの体細胞性変異の検索には、塩基配列決定法を用いる。対象 exon は *TP53* が exon5-9、*EGFR* が exon18-21、*K-ras* が exon1-2、*ALK* が exon20-25 であり、各遺伝子のこれまでの報告における変異の hot spot を含む。PCR 酵素には KODFX (Toyobo) を使用した。PCR 生成物は 4℃にて保存後、1.5%アガロースゲルに泳動、エチジウムブロマイドにて染色後、UV にて生成物を確認した。PCR 生成物の純度を高めるために、泳動後のゲルより対象バンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を使用した。その後 Sequence 反応を Applied Biosystems BigDye 3.1kit を用い、泳動を Applied Biosystems 3130xl Genetic analyzer を使用して行った。Direct Sequence の結果は、DNASTAR Laser Gene Seq Man Pro にて解析した。

(2) *CADMI* 遺伝子メチル化の解析には、重亜硫酸処理塩基配列決定法を用いる。

(3) *EML4-ALK* fusion 遺伝子、*EGFR* variant type III の解析には、腫瘍材料から抽出した RNA にて、One-Step RT-PCR kit (Qiagen)を用いて RT-PCR 法を行う。

得られた結果を、臨床データ(原発巣、病期、病理組織型、再発の有無、生存率、制御率)とあわせて解析を行う。

#### 4. 研究成果

東京大学耳鼻咽喉科の頭頸部腫瘍患者より標本は集積されその中でも特に、扁平上皮癌を中心に遺伝子解析を行った。対象症例の内訳を表1、2に示す。

性別	男性 48: 女性 8
年齢	平均 65 (24-87)
病理組織型	扁平上皮癌 56
原発部位	口腔 21
	中咽頭 8
	下咽頭 12
	喉頭 13
	鼻腔 1
	聴器 1
再発症例	12

病期	一次例	再発症例
stage I	4	
stage II	9	
stage III	11	4
stage IV	20	8
計	44	12

これまでのところ *EGFR*、*ALK* 遺伝子の変異は認められなかった。*Kras* の変異は2例に認め、分子標的薬である cetuximab の治療が今後本邦頭頸部扁平上皮癌で導入された際には、治療抵抗性との関連性を調べる上で、*Kras* 変異は有望な重要因子と考えられた。

*TP53* の変異は25例(45%)に認めた。*TP53* 遺伝子に変異を示した症例を、原発巣、臨床病期に従ってまとめた表を示す(表3, 4)。

表3. *TP53* 変異(全変異、ミスセンス変異、ナンセンス変異)

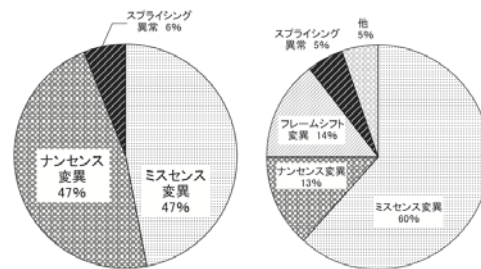
原発部位	口腔	21	(11,5,6)
	中咽頭	8	(2,1,1)
	下咽頭	12	(7,3,4)
	喉頭	13	(4,3,1)
	鼻腔	1	(1,1,0)
	聴器	1	(0,0,0)
再発症例		12	(2,0,2)

表4. *TP53* 変異(全変異、ミスセンス変異、ナンセンス変異)

病期	一次	変異	再発	変異	計
stage I	4	(3,2,1)			4 (3,2,1)
stage II	9	(6,2,4)			9 (6,2,4)
stage III	11	(6,4,1)	4	(2,0,2)	15 (8,4,3)
stage IV	20	(8,5,2)	8	(0,0,0)	28 (8,5,2)
計	44	(23,13,8)	12	(2,0,2)	56 (25,13,10)

これら変異と病期の進行との相関は認められなかった。また、再発例、原発部位別

に *TP53* 変異が特定の原発部位の腫瘍に高頻度に生じる傾向も認められなかった。次に、変異のタイプを分類した、変異スペクトラムを解析した。その結果は、IARC (International agency for research on cancer) データベースと比較して、ナンセンス変異が40%と有意に多い結果となり、日本人頭頸部扁平上皮癌特有の因子の可能性が考えられた。



本研究症例 IARCデータベース症例

頭頸部扁平上皮癌ではこれらナンセンス変異を含めた null type 変異に対して、今後予後因子として注意する必要性が考えられた。臨床症例の生存率、局所制御率について解析を継続しているが、現時点では有意な差は現れていない。

また、*EGFR* variant type III と *EML4-ALK* fusion gene の検出はこれまでのところ全症例認められておらず、*CADM1* のメチル化に関しても有意な結果は得られていない。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 蝦原康宏、岩井美和子、吉田昌史、安藤瑞生、朝蔭孝宏、山嵜達也、村上善則  
頭頸部癌における *TP53*・*EGFR* 遺伝子異常の解析  
頭頸部癌、査読有、37 巻、2011、1-6  
DOI:2011212836

[学会発表] (計 2 件)

① 蝦原康宏  
頭頸部癌における *TP53*・*EGFR* 遺伝子異常の解析  
第 34 回日本頭頸部癌学会 2010. 6. 10 東京

②Yasuhiro Ebihara

Genetic analysis of the TP53 and EGFR genes in head and neck squamous cell carcinomas in Japanese patients.

The 14<sup>th</sup> Japan-Korea Joint meeting of Otorhinolaryngology-Head and neck surgery  
2012. 4. 13 Kyoto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蝦原 康宏 (EBIHARA YASUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50422291

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：