

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11288

研究課題名（和文）口腔癌における腫瘍内不均一性の形成機序と評価法に関する研究

研究課題名（英文）Study on formation and evaluation method of intratumoral heterogeneity in oral cancer

研究代表者

鶴澤 成一（UZAWA, NARIKAZU）

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30345285

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：舌癌原発巣と同一患者に生じたリンパ節転移巣に生じている腫瘍内不均一性の変化をSNPsアレイを用いて解析した。その結果、CNVは転移過程において原発巣とリンパ節転移巣ではほぼ一致していたが、E2F遺伝子がリンパ節特異的にコピー数が増加していることを見出した。また、リンパ節転移を有する舌癌症例を次世代シーケンサーによりディープシーケンスを行い、遺伝子変異の同定ならびに同変異を有するクローンの頻度を解析した。その結果、TP53, CDKN2A, ATMに遺伝子異常が認められ、そのような異常を有するクローンの頻度は原発巣とリンパ節転移巣との間で大きく異なっていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌に限らず「腫瘍内不均一性」が、癌治療における大きな障壁になっている。そのため、今後、新規治療法開発に際しては、癌組織という複雑な細胞集団における不均一性の正確な評価が求められる。本研究では口腔癌の「正常 上皮性異形成 浸潤癌」という発癌過程における腫瘍内不均一性の評価法の開発を図り、さらに、リンパ節転移過程における腫瘍内不均一性の解析に初めて取り組み、将来の癌治療への基礎的知見を与えたと考える。

研究成果の概要（英文）：Changes in intratumoral heterogeneity occurring in lymph node metastases in the same patient as tongue cancer primary tumor were analyzed using SNPs array. As a result, CNV was almost identical between the primary lesion and the lymph node metastasis during the metastasis process, but the copy number of the E2F gene increased in a lymph node-specific manner. We found that expression was significantly enhanced in lymph node metastases. In addition, DNA was extracted from FFPE samples of tongue cancer cases with multiple lymph node metastases, and deep sequencing was performed by a next-generation sequencer to identify gene mutations and analyze the frequency of clones having the mutations. As a result, genetic abnormalities were found in TP53, CDKN2A and ATM, and it was found that the frequency of clones having such abnormalities was largely different between primary and lymph node metastasis.

研究分野：口腔外科学

キーワード：腫瘍内不均一性 口腔 癌 ゲノム 悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

研究は昨今、マイクロアレイ技術や次世代シーケンサーの開発により飛躍的な進歩を遂げている。特に、全ゲノムシーケンシング技術の発展によって、全ゲノムあるいは全エクソームを網羅的に解析することが可能となった。さらに、ゲノム上の同一部位を数十回～数千回も塩基配列をリードすることにより、サンプル全体中の非常に少数の細胞しか有していない遺伝子変異まで解析することができるようになった。これにより、さまざまな遺伝子変異や一塩基多形型を指標とした同一腫瘍内の不均一性の評価も可能となってきた。また、かつては稀と考えられていた上皮性固形癌における染色体転座についても、肺癌の EML4-ALK 融合遺伝子の発見などの報告以降、従来の核型分析に代わり次世代シーケンサーを用いた新規融合遺伝子の探索がなされている。これら分子生物学的なアプローチの結果、数々の分子標的薬が新たに開発され、すでにその一部は臨床応用されている。発癌に必須な driver oncogene を標的とした治療により成果が得られている一方で、治療抵抗性を示す症例が存在しその対策を講じることが求められてきている。

癌の治療抵抗性を攻略するにあたり、障壁となるのが「癌の不均一性」である。癌組織は均一な集団ではなく多様な細胞クローンから構成されており、それは病理組織像などでも容易に観察できる。さらに、癌の不均一性は、同一腫瘍内 (Intratumoral) だけではなく、転移巣腫瘍どうし (Intermetastatic)、転移巣腫瘍内 (Intrametastatic) においても生じており、さらに、病理組織学的には同一の腫瘍であっても、個人個人により遺伝学的には異なっている (Interpatient)。すなわち、このさまざまな状況における「不均一性」こそが、癌の本質とも言える。そして、この「癌の不均一性」は、再発や抗がん剤・放射線への抵抗性に大きく関与しており、癌治療を行う上で、大きな障壁となっている。

1998 年以来、申請者は、科学研究費補助金・若手研究 B 等の支援により、口腔扁平上皮癌より FNA (fine-needle aspiration) : 穿刺吸引により採取した癌細胞を対象に FISH 法 (fluorescence in situ hybridization) を行なう FNA-FISH 法により、主に細胞周期関連遺伝子である Cyclin D1 および p 16 遺伝子を中心に分子遺伝学的解析を進め、その結果を報告してきた [日口外誌, 48(5) : 245-251 (2002), Cancer, 95: 2152-2159 (2002), Oral oncology 39: 610-618 (2003), Cancer, 104: 2709-2716(2005), Cancer, 110: 2230-2239(2007)]。また、EGFR 遺伝子の数的異常に関しても同様に解析し、同遺伝子の数的異常は、タンパク質レベルの異常と比べて臨床的有用性が高く、頸部リンパ節転移巣における被膜外浸潤の有無とも有意に相関していることをみだした [OSI, 6(1): 46-54(2009), Br J Cancer, 104(5): 850-855(2011), Eur J Cancer, 47(15): 2364-2372(2011)]。さらに、2009 年度より、科学研究費補助金・基盤研究 C の支援を受け、FISH を用いたゲノム不安定性の評価方法を考案し、報告してきた [BMC Cancer, 10(1): 182(2010)]。また、2005 年度より、科学研究費補助金・若手研究 A の支援を受け、ライカ製レーザーマイクロ・ダイセクション (LMD) 装置を購入し、同一患者の舌癌の中心部、上皮性異形性部および正常粘膜部から LMD を行い、検体を採取した。それぞれの検体から mRNA を抽出し、舌癌の発生・進展にともなう mRNA の変化を、cDNA アレイを用いて網羅的に解析し、舌癌の発生・進展に関わる遺伝子群の発癌過程に伴う mRNA 発現の変化をデータベース化した。さらに、2006 年度より、当大学情報医科学センターとの共同研究により、口腔癌 64 検体を対象に、High density SNP マイクロアレイ (Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array set) によるゲノムコピー数の解析を行い、数々の興味深い知見が得られ、報告してきた [Int J Oncol, 48(6): 1907-1914(2012), Int J Cancer 132(3):540-548(2013)]。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、いまだほとんど探索されていない口腔癌発生・進展過程における癌を構成する細胞クローンの変化を、上述の実験手法に改良を加えて、解明を試みる。

口腔癌発生過程におけるクローン進化の過程を明らかにし、口腔癌はどの段階から不均一な細胞集団に変化してゆくのか明らかにする～前癌病変の癌化予測へ応用

口腔癌原発巣とリンパ節転移巣における構成する細胞クローンの比較を行い、原発巣のどのクローンが転移してゆくのか明らかにする～癌の転移予測に応用

初回治療時と再発時のクローンの構成を比較することにより、治療抵抗性のあるサブクローンの特性を明らかにする～癌の治療抵抗性・治療効果予測に応用

3. 研究の方法

症例の選択 (鶴澤)

今回の研究における解析対象が具備すべき条件は、解析に十分は DNA が採取できること 発癌過程の解析では、浸潤癌周囲に上皮性異形成部が存在し、正常部も十分に存在すること 転移過程の解析では、原発巣のみならずリンパ節転移巣からも十分な量が採取できること 再発過程の解析では、再発巣からも十分な量が採取できること 臨床・病理組織学的データが完備

していることなどが挙げられる。

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルから DNA の抽出と質の評価 (坂本・鵜澤)

まず、上記の条件に合った原発巣の HE 標本より、浸潤癌がなるべく多く含まれる領域を同定し、マーキングする。HE 標本に隣接する FFPE よりマーキングされた部位を採取し、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出する。DNA の質と量は、NanoDrop, qPCR を用いて評価する。

原発腫瘍内不均一性を評価するための遺伝子変異の同定・データ処理 (鵜澤・茂櫛)

同一腫瘍内の不均一性を評価するためには、次世代シーケンサーを用いて、限られた領域を 1000 回以上、深くリードすること (ディープシーケンス) が必要である。そのため、癌において遺伝子異常が認められる可能性の高いゲノム領域を増幅することが必要となる。今回は、Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (ライフテクノロジー) を用いて増幅、ターゲットリッチアンプリコンライブラリーを作製する。同パネルは、次に示す癌に関連する 50 遺伝子のホットスポット領域を増幅することができる。さらに、2011 年にサイエンス誌に報告された頭頸部癌 74 例を対象とした全エクソン解析により同定された遺伝子も 7 遺伝子含まれている。引き続き、次世代シーケンサー Ion Proton (ライフテクノロジー) を用いてディープシーケンスを行う。解析ソフトを用いて、遺伝子変異の同定のみならず同変異を有するクローンの頻度を解析する。

原発巣で認められた遺伝子異常を指標した不均一性解析 (鵜澤・茂櫛)

原発巣で遺伝子異常が認められた同一症例における、正常粘膜部、上皮性異形成部 リンパ節転移巣 再発巣より、同様な方法で DNA を抽出し、ライブラリー作製、ディープシーケンスを行う。原発巣で認められた遺伝子異常を有するクローンの割合が、それぞれにおいてどのように変化してゆくのか解析する。また、原発巣では非常に少数の細胞クローンにしか認められなかった遺伝子異常が認められる可能性もある。

driver gene の同定とそれに基づく口腔癌診断用カスタムパネルの作製 (鵜澤・茂櫛・坂本)

最終年度は、これまでのデータを総括して、口腔癌のクリニカルシーケンスに有用な診断用カスタムパネルの作製を試みる。Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 に搭載されている 50 遺伝子群において、口腔癌原発巣において高頻度に異常が同定された遺伝子群を搭載する。さらに、原発巣では低頻度な変異であったが、転移巣、再発巣において高頻度に変化する遺伝子群は、高転移能獲得や治療抵抗性に関わる重要な driver gene である可能性が高い。そのような遺伝子群も搭載し、口腔癌診断用カスタムパネルを構築する。

4. 研究成果

口腔癌の正常上皮 白板症 (上皮性異形成) 浸潤癌という多段階発癌過程での組織を構成する細胞クローンの変化を追跡する目的に、各過程での臨床検体のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルを対象に、SNPs array を用いたコピー数の変化を指標に不均一性の評価を試みた。

舌癌原発巣と同一患者に生じた リンパ節転移巣に生じているゲノム変化を SNPs アレイを用いて解析し、E2F 遺伝子がリンパ節特異的にコピー数が増加しており、タンパクレベルにおいても舌原発巣に比較して有意にリンパ節転移巣では発現が亢進していることを見出した。

口腔癌リンパ節転移巣で被膜外浸潤を呈する症例を対象とし、転移リンパ節のさまざまな状況と臨床的因子の相関性について解析し、リンパ節の短径が小さな症例の方が、大きな症例に比較して再発しやすく、経過が不良であることを見出した。

複数個のリンパ節転移を有する舌癌症例の FFPE 検体より DNA を抽出し、Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (ライフテクノロジー) を用いて増幅、ターゲットリッチアンプリコンライブラリーを作製した。癌に関連する 50 遺伝子のホットスポット領域に対して、ディープシーケンスを行い、遺伝子変異の同定ならびに同変異を有するクローンの頻度を解析した。その結果、TP53, CDKN2A, ATM に遺伝子異常が認められ、そのような異常を有するクローンの頻度は原発巣とリンパ節転移巣との間で大きく異なっていることを見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Small size of metastatic lymph nodes with extracapsular spread greatly impacts treatment outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. Michikawa C, Izumo T, Sumino J, Morita T, Ohyama Y, Michi Y, Uzawa N. Int J Oral Maxillofac Surg. 2018 Jul;47(7):830-835. doi: 10.1016/j.ijom.2017.12.007. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29373201 査読あり

Characterizing Genetic Transitions of Copy Number Alterations and Allelic Imbalances in Oral Tongue Carcinoma Metastasis. Morita T, Uzawa N, Mogushi K, Sumino J, Michikawa C, Takahashi KI, Myo K, Izumo T, Harada K. Genes Chromosomes Cancer. 2016

〔学会発表〕(計 5 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：坂本 啓

ローマ字氏名：Kei Sakamoto

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：大学院医歯学総合研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：00302886

研究分担者氏名：茂櫛 薫

ローマ字氏名：Kaoru Mogushi

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学(系)研究科(研究院)

職名：講師

研究者番号(8桁)：60569292

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：