

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06759

研究課題名(和文) 血中循環腫瘍DNA(ctDNA)を用いた頭頸部がんの新規バイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Analysis of circulating tumor DNA of head and neck cancer using droplet digital PCR

研究代表者

明石 健(Akashi, Ken)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90779331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来の方法より高感度かつ再現性高く遺伝子変異を検出可能なデジタルPCRを用いて頭頸部がんの血中循環腫瘍DNA(ctDNA)の解析を行い、新規バイオマーカーを確立することを目的とした。

頭頸部がんの中でも腫瘍組織中にウイルス由来DNAが検出されることが示されているウイルス関連がんであるEBV関連上咽頭がんならびにHPV関連中咽頭がんをまずは対象とした。EBV関連上咽頭がん症例が4例、HPV関連中咽頭がん症例が18例集積され、治療開始前の時点では、EBV関連上咽頭がんでは3例(75%)で、HPV関連中咽頭がんでは10例(56%)でctDNAを検出できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to examine whether ctDNA of virus-related head and neck cancer could be detected using droplet digital polymerase chain reaction (PCR), which enables quantification of nucleic acids with a higher accuracy, sensitivity, and precision than traditional real-time PCR.

We collected plasma from blood samples of 4 patients with EBV-related nasopharyngeal cancer and 18 patients with HPV-related oropharyngeal cancer. We extracted cell-free DNA from the plasma and detected ctDNA using droplet digital PCR targeting base sequences of EBV-DNA and HPV-DNA integrated into the DNA of cancer cells. We successfully detected ctDNA in the blood of 3 patients (75%) with EBV-related nasopharyngeal cancer and 10 patients (56%) with HPV-related oropharyngeal cancer.

研究分野：頭頸部外科

キーワード：血中循環腫瘍DNA デジタルPCR 頭頸部癌 EBV関連上咽頭癌 HPV関連中咽頭癌

1. 研究開始当初の背景

頭頸部がんにおけるバイオマーカーの現状

頭頸部がんはその半数が初診時に進行期と判断され、5年生存率は概ね50%程度であり、生活習慣に起因するがんであるため、重複癌や併存症も多く治療に難渋することが多い。バイオマーカーとは、「血液や体液、あるいは組織中に検出可能な、特定の病状の生物学的な指標」を指す。頭頸部がんにおける予後予測バイオマーカーとして、上咽頭がんにおける Epstein-Barr ウイルス (EBV)、中咽頭がんにおけるヒト乳頭腫ウイルス (HPV) の感染が知られており、治療選択や予後予測の一助となっている。

その一方で頭頸部がんにおける治療効果判定や再発予測の有用なバイオマーカーは確立されておらず、治療中および治療後の病勢の評価は視触診および画像評価を中心に行われ、残存や再発の早期発見が困難であるのが現状である。頭頸部がんの治療効果判定および再発の早期発見へつながる新たなバイオマーカーの確立が急務である。

血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA) のバイオマーカーとしての可能性

古くから血液中には cell free DNA が存在することが知られていたが、1994年にがん患者の血液中から RAS 変異を有する DNA 断片が検出されて以来、その重要性が注目されるようになった (Br J Haematol 1994)。がん患者では、腫瘍細胞のアポトーシスや壊死に伴い血中に DNA が放出され、cell free DNA の量が健常人よりも増えることが知られるようになった。この血液中に存在する腫瘍細胞由来の DNA を血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) と呼び、これを解析することで腫瘍の状態を推し量ることが可能となり、膵臓がんにおける KRAS 変異、大腸がんにおける KRAS、TP53 変異などが検出されている。ctDNA の解析は 10ml 以下の血液で十分なため、非侵襲的かつ繰り返し採取可能な臨床簡便かつ有用なバイオマーカーであることから liquid biopsy として注目されている (Science 2010)。その一方で、血液中の ctDNA は微量であるため、詳細な解析が困難であるという問題があった。

デジタル PCR による低頻度の変異の検出

デジタル PCR は、近年開発された PCR 反応を応用した解析方法である。第1世代の定性的解析を行う従来の PCR、第2世代の相対的定量を行うリアルタイム PCR に次ぐ、絶対定量を行うことのできる第3世代の方法として注目されている。従来と同様にプライマーおよびプローブを混ぜた反応液を細かいドロップレット状にすることで約2万個の多数の微小区画に分けた上で PCR 反応を行う。鋳型 DNA の濃度を十分低くし、1分子または0分子を含む状態で反応を行うと、ターゲット

となる配列を含むドロップレットのみで増幅反応が起こり蛍光を発するようになる。全ドロップレットの蛍光強度を解析し、ポジティブであったドロップレットの割合を測定することによりターゲットの濃度を絶対的に定量することができる。とくに、低頻度の変異の検出においては、従来のリアルタイム PCR では1%未満のものを検出するのが困難であったが、デジタル PCR では0.001%の変異まで検出することが可能となる。

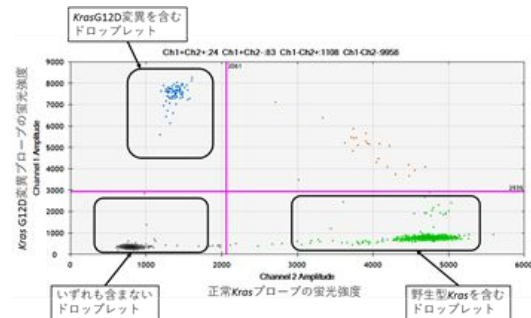


図1. デジタル PCR による解析

2. 研究の目的

頭頸部がん患者の ctDNA を経時的に解析し、病勢や治療効果と比較することにより治療効果判定および再発予測との相関を検討し、さらに ctDNA の解析にデジタル PCR を用いることで、より感度と精度の高い詳細な解析を行ない、新たなバイオマーカーを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科を受診し、頭頸部がんの診断され治療を受けた患者を対象とした。同意を得られた患者より治療開始前、治療経過中、治療後や再発時等のタイミングで血液を 20ml ずつ採取して血漿として保存した。Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega) を用いて血漿から cell free DNA を抽出した。cell free DNA からの ctDNA の検出はデジタル PCR を用いて行った。DNA サンプルとプライマー、プローブおよび専用バッファーを混ぜた反応液を作成し、ドロップレットジェネレーター (Bio-rad) でドロップレット状にした後、通常の PCR 反応を行い、ドロップレットリーダー (Bio-rad) を用いて個々のドロップレットの蛍光強度の解析を行った。プローブは通常のリアルタイム PCR で用いる Taqman プローブを利用した。

頭頸部がんの中で、まずは血中にウイルス由来 DNA が検出されることが報告されているウイルス関連がんである Epstein-Barr Virus (EBV) 関連上咽頭がんおよび Human Papilloma Virus (HPV) 関連中咽頭がんを対象とした。EBV 関連上咽頭がんでは EBNA と LMT1 の2カ所をターゲットとし、HPV 関連中咽頭がんでは E6 と E7 の2カ所をターゲット

とし、いずれも2カ所両方で蛍光が検出された場合を陽性とした。PPP30をコントロール遺伝子とし、これを定量することでcell free DNAの量を求め、ctDNA量の比率を求めた。

4. 研究成果

各プライマー、プローブのセットの有効性確認のため、EBV関連上咽頭がんの腫瘍組織よりDNAを抽出し、これをサンプルとしてEBNA, LMT1のセットでデジタルPCR解析を行い、いずれのセットでも蛍光が観察されることを確認した。HPV関連中咽頭がんのE6, E7のセットについても同様に蛍光が検出されることを確認した。

EBV関連上咽頭がん症例は4例集積された。性別はすべて男性で、平均年齢は61歳であった。病期はStage I/II/III/IVが0/1/1/2名であった。治療前の血液中からctDNAが検出できたのは3名(75%)であった。検出されなかった1名はStageの症例であり、期以上の症例は3名とも検出されていた。

HPV関連中咽頭がん症例は18例集積された。性別は男性15名、女性3名で、平均年齢は67歳であった。病期はStage I/II/III/IVが、頭頸部癌取り扱い規約第5版では0/2/1/15名、第6版では16/0/2/0名であった。治療前の血液中からctDNAが検出できたのは10名(56%)であった。T分類、N分類、新旧分類の臨床病期のいずれもctDNA検出の有無との有意な相関はみられなかったが、新分類のStage IIIの症例2名ではいずれも検出されていた。

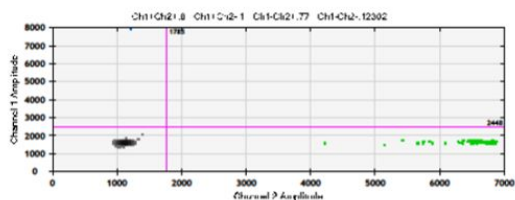
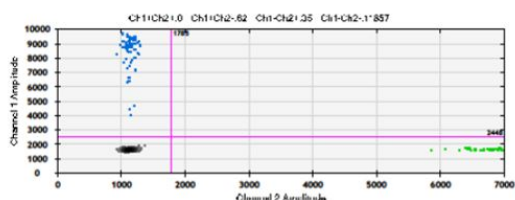


図2. デジタルPCRによるctDNAの検出
青いドットはctDNA (HPVのE6)の蛍光が検出されたドロップレット。緑のドットはコントロール(RPP30)の蛍光が検出されたドロップレット。黒のドットは蛍光が検出されなかったもの。上の図ではctDNAが検出されたが、下の図では検出されなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明石 健 (AKASHI, Ken)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90779331

(2) 研究分担者

()

(3) 連携研究者

()

(4) 研究協力者

山嵜 達也 (YAMASOBA, Tatsuya)

安藤 瑞生 (ANDO, Mizuo)

吉田 昌史 (YOSHIDA, Masafumi)

齊藤 祐毅 (SAITO, Yuki)

福岡 修 (FUKUOKA, Osamu)

村上 善則 (MURAKAMI, Yoshinori)