

令和元年6月20日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10411

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析による頭頸部がんの放射線感受性予測

研究課題名(英文) Prediction of radiosensitivity of head and neck cancer using comprehensive genomic analysis

研究代表者

茂木 厚 (Motegi, Atsushi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：10433997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中咽頭がん患者の唾液、血液から腫瘍由来のDNAを抽出し、さらに、放射線治療による介入中の腫瘍特異的遺伝子量の変化を前向き観察研究により解析するパイロット試験を行った。唾液中のHPV関連遺伝子は、多くの症例で治療介入後減少するものの、定量性解析で、絶対量が多いと判断された症例の一部が、再発をきたしていた。また、唾液より抽出した遺伝子によるキャンサーパネル解析では、p53やNOTCH1など、頭頸部癌において生じうる遺伝子変異の検出が可能であった。今後、唾液による腫瘍の特異的遺伝子解析により、放射線感受性予測を行う上での基礎的なデータを取得することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部領域のがんに対する放射線治療は、粘膜炎や口腔乾燥などの副作用が問題となる。

研究成果の概要(英文)：We conducted a pilot study investigating the change of the amount of cancer-specific DNA throughout radiotherapy in saliva and blood of the patients with oropharyngeal cancer. HPV-related DNA in the saliva decreased significantly during the treatment period, and part of the patients whose saliva contained large amount of HPV-related DNA experienced recurrences. Head neck cancer-specific mutation, such as TP53 and NOTCH1, were also detectable in DNA extracted from saliva. With these preliminary findings, it will be more feasible to conduct studies to predict radiosensitivity of patients with head neck cancer using their saliva which contains cancer-specific DNA.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：頭頸部癌 放射感受性予測 HPV 網羅的遺伝子解析 バイオマーカー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

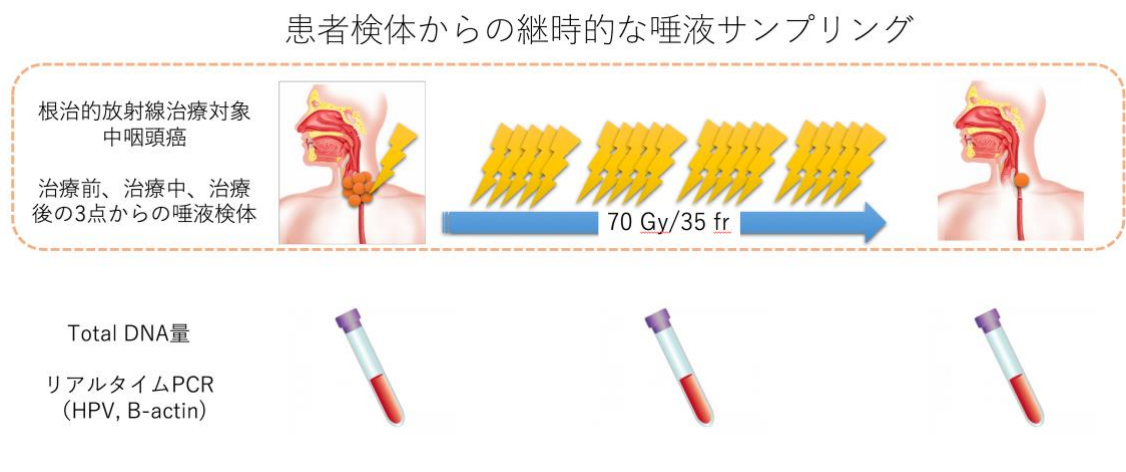
### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌のうち、HPV 陽性中咽頭がんは、放射線治療によく反応し、予後良好であることが知られている。強度変調放射線治療や、粒子線治療など、照射技術の進歩により、正常組織への線量を下げながら標的へ高線量を投与することが可能になりつつある。しかし、それらの技術を用いても、放射線性皮膚炎や粘膜炎、口腔乾燥や嚥下機能低下など、放射線治療による有害事象が患者の生活の質に与える影響は依然解決困難な問題である。現在、HPV 陽性中咽頭がんに対し、治療成績を保ちつつ、治療強度を減弱する臨床試験が多数行われている。治療強度減弱試験を行うにあたっては、適切な患者選択が極めて重要になる。患者選択を行うにあたり、腫瘍組織を生検で採取し、遺伝子変異解析や発現解析を行うことは選択肢の一つになるが、生検は侵襲を伴うことが問題点とされている。また、治療中に腫瘍の絶対量をモニタリングすることができれば、治療介入後の変化を観察することで、最終的な治療感受性予測が可能となることも予想されるが、治療中の生検は、侵襲性がさらに高まることが懸念されている。近年、リキッドバイオプシーに関する研究が広く行われるようになってきた。血液や唾液中の腫瘍特異的 DNA を検出し、分子標的薬の適応の有無を判断したり、早期再発の有無をスクリーニングする技術であり、本研究では、同技術を放射線感受性予測に用いることの実現可能性を検討した。

### 2. 研究の目的

本研究では、HPV 陽性中咽頭がんの症例から、放射線治療前、治療中、治療後に血液や唾液を採取して、腫瘍特異的 DNA 量の定量により、放射線治療感受性を予測することが可能かどうか、検討することを目的とした(図 1)。また、唾液中の DNA を対象に、遺伝子診断パネル(キヤンサーパネル)による腫瘍特異的な遺伝子変異が検出可能かどうか、検討した。

#### \*図 1

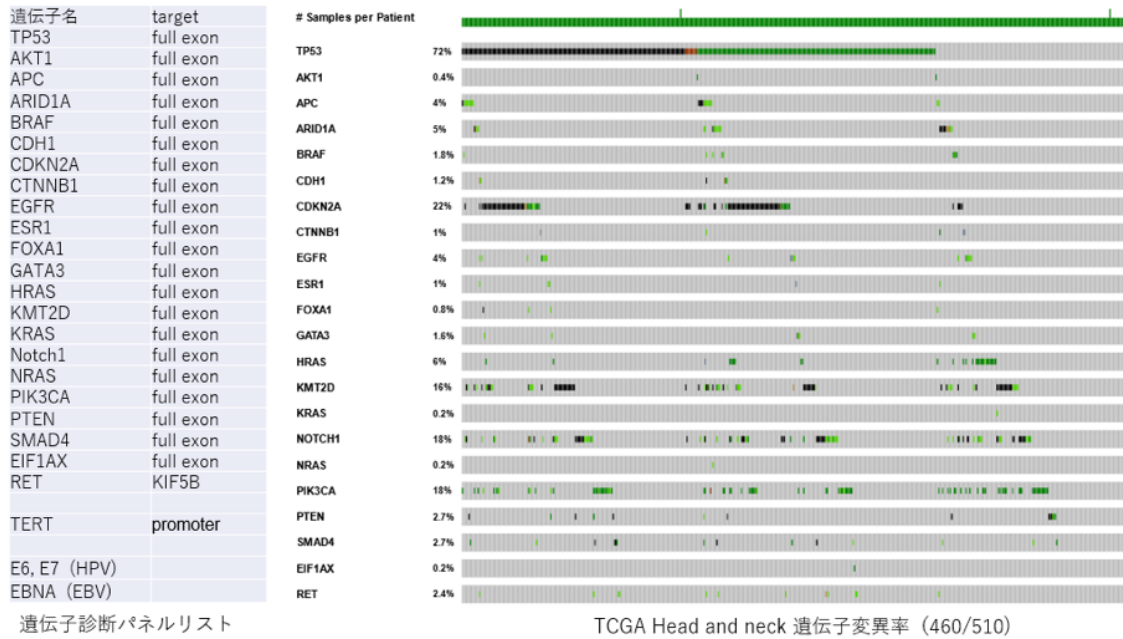


### 3. 研究の方法

まず、照射前後の DNA の検討を行うにあたり、放射線照射により、DNA の断片化が高度に生じている場合は、研究そのものが成立しないことも予想されたため、細胞株を用いた放射線が腫瘍細胞の DNA の断片化を生じるか否か、検討を行った。

その予備実験の結果、腫瘍 DNA は放射線照射によって、断片化しないことがあきらかとなったため、当施設で根治的放射線治療を施行される HPV 陽性中咽頭がん症例に、文書による同意を得た上で、前向き観察研究を行った。治療開始前、治療中、治療終了後に唾液・血液を採取し、DNA 抽出を行い、HPV 特異的遺伝子である E6 や E7 の検出、定量を行った。また、腫瘍特異的遺伝子変異の解析を、キヤンサーパネル(agilent SureSelect TX カスタム)を作成し、ターゲットとして頭頸部癌で変異頻度の高い TP53, CDKN2A 等 23 遺伝子の exon 配列を設定した。また、HPV16, 18 の E6, E7 配列をプローブに用いて、パネル内に組み込んだ。遺伝子のプローブ配列はこれまで実績のある NCC Oncopanel ver. 2 の配列情報を元に作成した(図 2)。まず初めに我々の遺伝診断パネルで頭頸部癌の遺伝子変異をどの程度検出可能かについて public data を用いた検証を行った。TCGA に登録された 510 例の頭頸部癌患者についてこの 23 遺伝子変異の陽性率を調べ結果、図 2 の結果となり、頭頸部癌患者 90% の遺伝子変異が検出可能であることが示された。

#### \*図 2

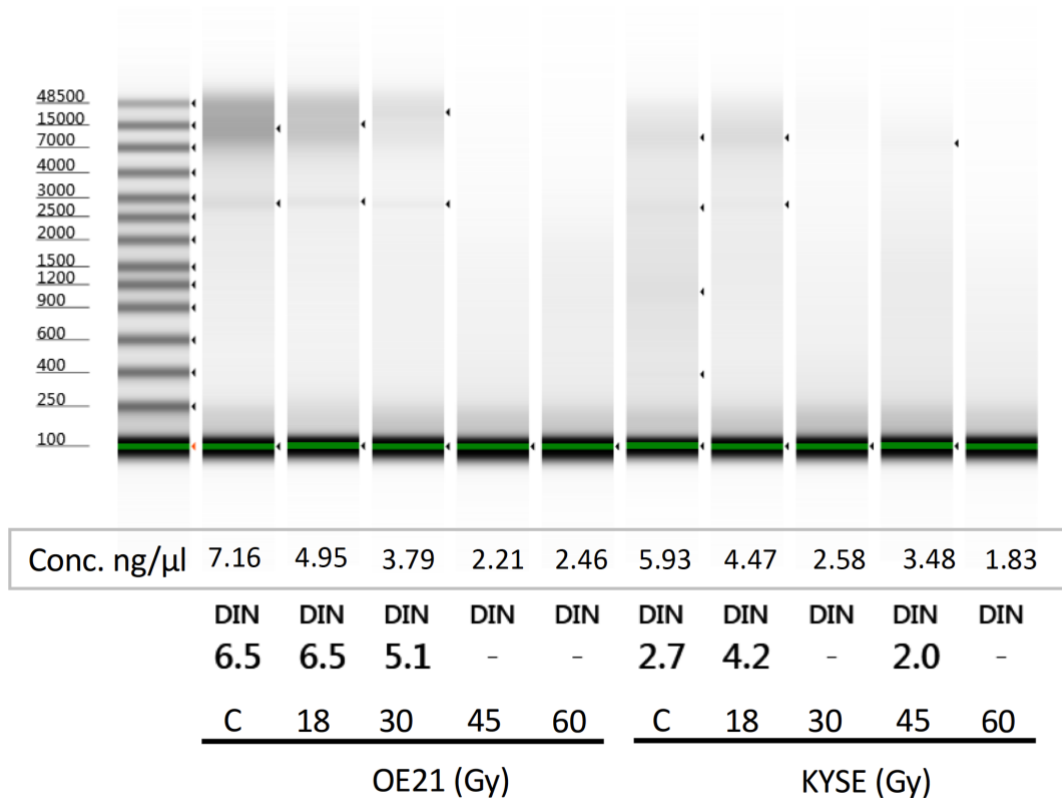


遺伝子診断パネルリスト

#### 4. 研究成果

予備研究においては、細胞株として OE21、KYSE を用いて分割照射を行い (3 Gy/回で 20 回、合計 60 Gy)、DNA 量の測定と DNA の断片化の有無を検討した。その結果、照射線量が増えても、DNA の断片化は認められず、分割照射中に DNA を採取し、検討することの意義があることが確認された (図 3)。

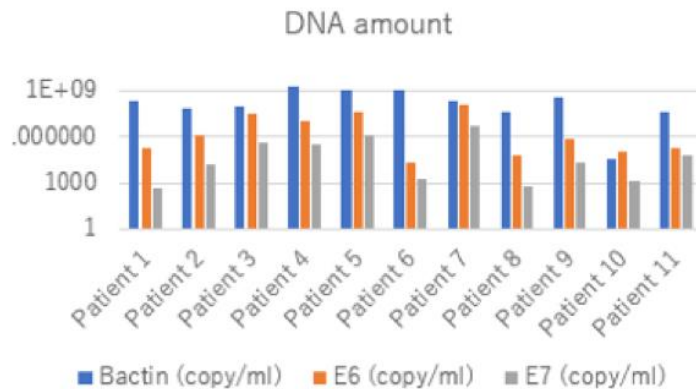
\* 図 3



前向き観察研究として、HPV 陽性中咽頭癌患者のうち、放射線治療を施行される 11 例より同意取得が得られ、唾液を採取し、Oragene DNA (ライフサイエンス) により常温保存の上、DNA 抽出を行った。さらにそれぞれの検体より採取した DNA に対して絶対量の測定、リアルタイム PCR によりコントロールとして Beta actin, HPV 特異的遺伝子である E6, E7 の検出、定量を行った。その結果、各患者で数十倍程度の差異は認めるものの全ての症例で  $1 \mu\text{g/ml}$  以上の DNA 抽出は可能であった。さらに各遺伝子の検出でもコントロールの Beta actin は Total DNA 量に類似した検出を示した。一方興味深いことに E6, E7 は抽出された DNA 量に一致せず、 $10^4 \sim 10^8$  copy/ml

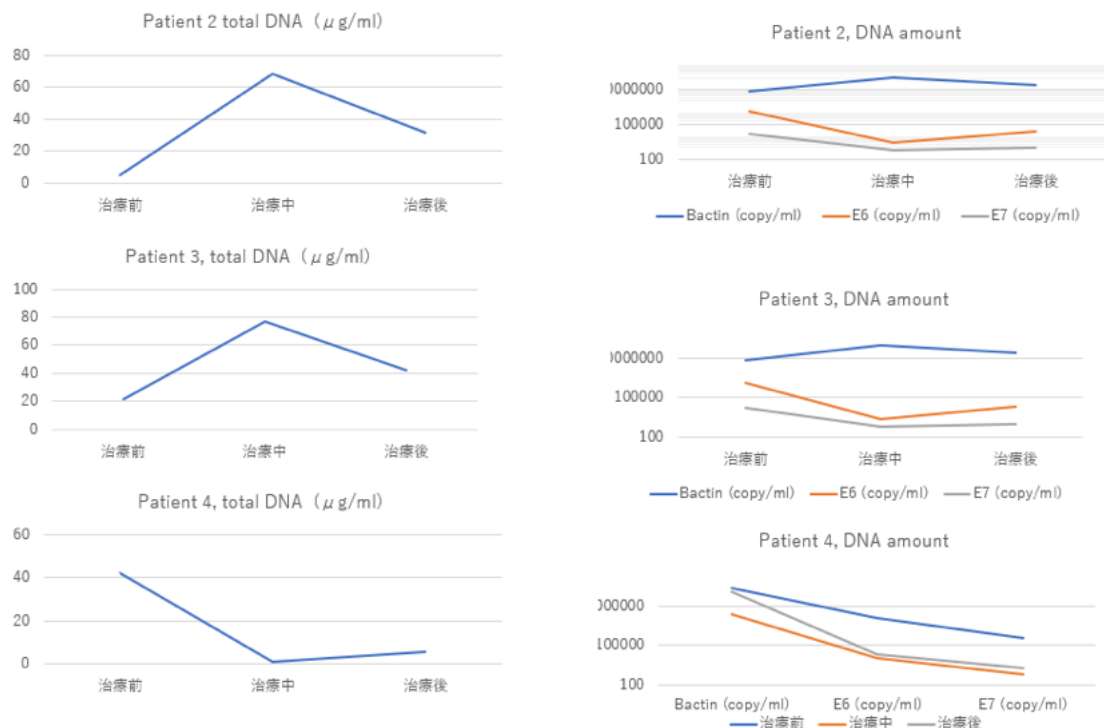
と検出量に非常に大きな差が見られた(図4)。

\*図4



登録患者 2, 3, 4, 6, 7, 8 は治療前、治療中、治療後の検体採取が可能であり、患者 1, 5 はそれぞれ治療前、治療中のペア、治療前、治療後のペア検体であり、9, 10 は治療前検体のみの検体採取であった。治療前、治療中、治療後の DNA 検出結果の一部は以下の通りであり(図5に患者 2, 3, 4 に関する HPV-DNA 量の変化を示す)、放射線治療中に Total DNA, Beta actin DNA は増加ないし 1/90 までの低下であったのに対し、HPVDNA は全ての症例で 1/80~1/14000 の大幅な低下を認めた。これは HPV DNA が腫瘍 DNA 量に一致し、放射線治療中の腫瘍細胞の減少に由来するものであると考察した。

図5



次にこの遺伝子診断パネルを用いて患者唾液 DNA から次世代シーケンサーを用いた解析を試みた。ライブラリは sureselect XT HS を使い、Hiseq4000 でそれぞれ 2Gb のシーケンス解析を行った。アライメント、癌遺伝子変異検出は agilent surecall ver 4.1 を使い、hg19 をリファレンスとして行った。HPV 検出は FASTQ file に対して BWA0.7.17 を用いて mapping を行い、samtools (1.9) を用いて duplicates, unmapped data を除外し、read 数を求めた。遺伝子診断パネル解析についてはまだ解析、検証途中であるが、現段階で少なくとも複数の検体から HPV DNA 検出があること、リアルタイム PCR との比較解析の結果、一定の定量性が保たれていると考えられた。遺伝子変異についても唾液中に Allele frequency 1%前後の変異が多数含まれていることが確認されており、今後これらの変異検出の妥当性について検証する予定である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕（計 5 件）

- (1) Radiotherapy increases plasma levels of tumoral cell-free DNA in non-small cell lung cancer patients. Kageyama S, Nihei K, Karasawa K, Sawada T, Koizumi F, Yamaguchi S, Kato S, Hojo H, Motegi A, Tsuchihara K, Akimoto T. 2018;10;9(27) 19368-19378. Oncotarget
- (2) Difference in the relative biological effectiveness and DNA damage repair processes in response to proton beam therapy according to the positions of the spread out Bragg peak. Hidehiro Hojo, Takeshi Dohmae, Kenji Hotta, Ryosuke Kohno, Atsushi Motegi, Atsushi Yagishita, Hideki Makinoshima, Katsuya Tsuchihara, and Tetsuo Akimoto. 2017;12(1) Acta Oncol
- (3) Impact of EGFR Mutation and ALK Translocation on Recurrence Pattern After Definitive Chemoradiotherapy for Inoperable Stage III Non-squamous Non-small-cell Lung Cancer. Nakamura M, Kageyama SI, Niho S, Okumura M, Hojo H, Motegi A, Nakamura N, Zenda S, Yoh K, Goto K, Akimoto T. 2019; printing. Clin Lung Cancer.
- (4) Proton beam therapy for olfactory neuroblastoma. Naoki Nakamura, Sadamoto Zenda, Makoto Tahara, Susumu Okano, Ryuichi Hayashi, Hidehiro Hojo, Kenji Hotta, Satoe Kito, Atsushi Motegi, Satoko Arahira, Hidenobu Tachibana, and Tetsuo Akimoto. Radiother Oncol 2017;122(3) 368-372
- (5) Long-term Clinical Results of Concurrent Chemoradiotherapy for Patients with Cervical Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Atsuhiko Kumabe, Sadamoto Zenda, Atsushi Motegi, Masakatsu Onozawa, Naoki Nakamura, Takashi Kojima, Hiroyuki Daiko, Naoyuki Shigematsu, and Tetsuo Akimoto. 2017;37(9) 5039-5044 Anticancer Res.

### 〔学会発表〕（計 2 件）

- (1) 頭頸部扁平上皮癌における低侵襲バイオマーカーの開発 茂木厚 日本放射線腫瘍学会 生物部会 2018 年
- (2) 新病期分類(AJCC 第 8 版)に基づく中咽頭癌の放射線治療成績の検討 茂木厚、全田貞幹、中村直樹、田原信、林隆一、藤井誠志、秋元哲夫 第 42 回頭頸部癌学会 2018 年

### 〔図書〕（計 2 件）

- (1) 頭頸部がん薬物療法ガイドランス 第 2 版 公益社団法人 日本臨床腫瘍学会 金原出版 2018 年
- (2) 小児・AYA 世代の腫瘍に対する陽子線治療診療ガイドライン 2019 年版 日本放射線腫瘍学会 / 日本小児血液・がん学会 金原出版 2019 年

### 〔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〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：秋元哲夫

ローマ字氏名： Tetsuo Akimoto

所属研究機関名：国立がん研究センター東病院

部局名：先端医療開発分野

職名：科長

研究者番号（8桁）：10261851

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：土原 一哉

ローマ字氏名：Kazuya Tsuchihara

※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、研究者個人に帰属されます。