

令和元年6月10日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20239

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるリキッドバイオプシーによるエピジェネティック解析

研究課題名(英文) Epigenetic research and liquid biopsy assays in HNSCC

研究代表者

遠藤 志織 (Endo, Shiori)

浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：10625205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、我々はHPV関連中咽頭癌の血漿循環中DNAによる再発検出に有効な遺伝子の抽出とメチル化解析を行った。HPV関連中咽頭癌症例の癌側、健側と比較した網羅的DNAメチル化解析と、HPV関連癌細胞株の脱メチル化治療による遺伝子発現変化をNGSで解析し、21候補遺伝子を抽出した。次に、この21遺伝子のHPV関連中咽頭癌(35例)と非HPV関連癌(217例)のメチル化解析を行い多変量解析にて、再発予後マーカーとなる8遺伝子を選出した。最後に、HPV関連中咽頭癌症例(5例)の血漿循環中DNAメチル化解析にて、再発検出マーカーとなりえるか解析を行ない4遺伝子の有効性を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌には、診断、予後、治療効果判定に適した遺伝子マーカーはいまのところ見つかっていない。今回、血漿循環中DNAのメチル化解析による腫瘍再発の検出に有効な遺伝子の抽出を試みた。次世代シーケンサーによる解析から、21候補遺伝子を抽出し、そのうち8遺伝子がHPV関連頭頸部癌の予後と関連することがわかった。そして4遺伝子が、血漿循環中DNAメチル化解析に有効であることが判明した。HPV関連頭頸部癌におけるリキッドバイオプシーによる血漿循環中DNAメチル化解析は、腫瘍の検出に有効である可能性がある結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：A technique under development to facilitate monitoring is the serial measurement of circulating tumor DNA (ctDNA). RNA-sequencing of HPV-related cell lines treated with a demethylating agent and MethylCap-sequencing of palatine tonsil cancer tissue, were performed. By combining MethylCap- and RNA-sequencing data, we identified 21 potentially methylated genes. Multivariate Cox regression analysis of a panel of 21 genes, amplified using methylation specific PCR (MSP) was performed. We identified eight DNA methylation probes that were significantly associated with poor prognosis in HPV-related HNSCC patients. ctDNA samples from five HPV-related cancer patients were analyzed for evidence of DNA methylation. We identified a panel of four methylation probes for prediction of recurrence in HPV-related HNSCC patients. These results demonstrate that ctDNA analysis is a technically feasible method for detection of tumor specific DNA methylation in HPV-related HNSCC patients.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：リキッドバイオプシー 頭頸部癌 メチル化解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の特に中咽頭癌におけるヒト乳頭腫ウイルス (human papilloma virus : HPV) に起因した割合はすでに半数を占めており今後も増加が見込みこまれている。そのため新たな観点からの診断法・治療法の開発が望まれている。最近、末梢血中を循環する血中循環 DNA を用いて遺伝子変異などの検出が可能になっている。この検出法は、低侵襲でリアルタイムに個々の癌の状態をモニタリングすることが可能な手法であり、臨床応用が進んでいる。今回我々は、HPV 関連癌と非関連癌に分類した頭頸部癌症例のリキッドバイオプシー血漿循環中 DNA から、エピジェネティクス解析を行って新たなバイオマーカーを確立したいと考えた。

### 2. 研究の目的

今回我々は、頭頸部癌におけるリキッドバイオプシー血漿循環中 DNA の癌抑制遺伝子の DNA メチル化に焦点をあてリアルタイムなエピゲノム変化を解析した。癌細胞の不均一性は、患者の予後など治療を困難にしている最大の障壁の一つと考えられる。頭頸部癌の HPV 関連癌と非関連癌のリキッドバイオプシーによるメチル化解析が、早期診断・再発・予後診断や治療選択などに克服する次世代の分子診断法として有用であるのかを明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

HPV 関連癌細胞株の脱メチル化治療 (5-azadeoxycytidine) による遺伝子発現変化と、HPV 関連中咽頭癌症例の癌側、健側と比較した網羅的 DNA メチル化解析を次世代シーケンサーで行い、21 候補遺伝子を抽出した。次に、この 21 遺伝子の HPV 関連中咽頭癌(35 例)と非 HPV 関連癌(182 例；口腔癌 73 例、喉頭癌 49 例、下咽頭癌 60 例)のメチル化解析を行い多変量解析にて、再発予後マーカーとなる 8 遺伝子を選んだ。最後に、HPV 関連中咽頭癌症例(5 例)の治療前の血漿循環中 DNA メチル化解析にて、腫瘍検出マーカーとなりえるか解析を行ない 4 遺伝子の有効性を確認した。

### 4. 研究成果

今回、HPV 関連中咽頭癌の血漿循環中 DNA による再発検出に有効な遺伝子の抽出とメチル化解析を行った。次世代シーケンサーによる網羅的解析で、HPV 関連中咽頭癌の予後に関連する 8 遺伝子を抽出することができた。この 8 遺伝子の解析で、手術検体からの腫瘍 DNA を解析することで予後、再発有無などを予測することができる遺伝子マーカーを抽出することができた。HPV 関連癌におけるリキッドバイオプシーによる血漿循環中 DNA メチル化解析では、4 遺伝子の検出が可能である結果を得られた。今回の研究で得られた知見は、新たな頭頸部癌の診断・治療の開発に有効な基礎データになると考えられる。

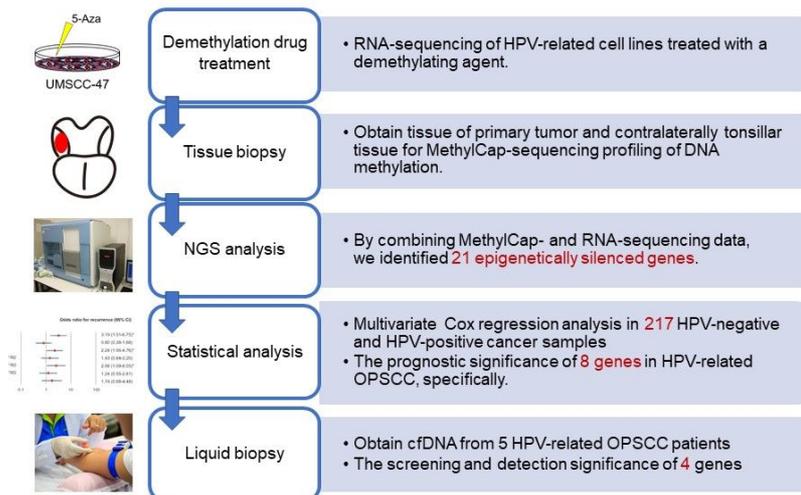


図1 HPV関連中咽頭癌におけるメチル化遺伝子マーカー候補の抽出の流れ

本研究の流れを示す。細胞株の脱メチル化治療により抽出した mRNA を治療前と治療後で比較解析し、治療後 2 倍以上の発現上昇した遺伝子を選んだ。次に、臨床検体の癌部と正常部から DNA を抽出し網羅的メチル化解析を行った。正常部と比べて癌部で 20 倍の高メチル化度を示した遺伝子を選んだ。この両方の条件で抽出された 21 遺伝子を、HPV 関連中咽頭癌のメチル化予後マーカーの候補とした。次に、252 頭頸部癌サンプルのメチル化解析を行い、多変量解析にて予後と関連する 8 遺伝子を選んだ。最後に、リキッドバイオプシーサンプル DNA を使って血漿循環中 DNA メチル化解析で 4 遺伝子を有効なマーカーとして選択した。(図 1)

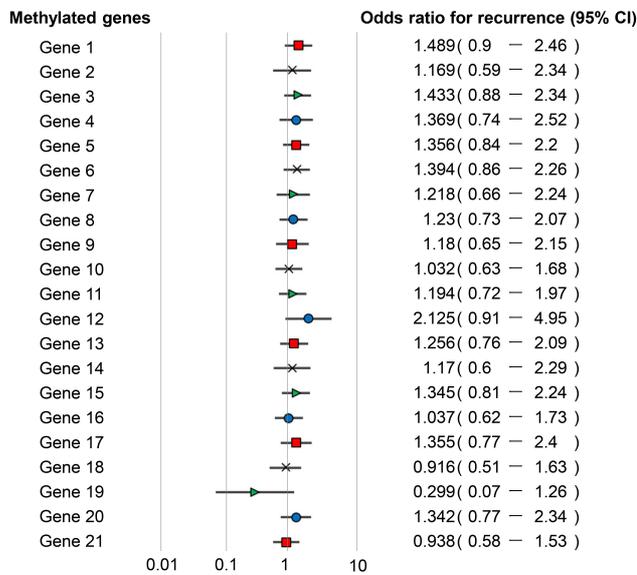


図2 HPV非関連頭頸部癌における多変量解析の結果

HPV 非関連頭頸部癌 182 症例における多変量解析の結果を示す。年齢、性別、喫煙歴、飲酒歴、ステージと各遺伝子のメチル化度で比較を行ったが、21 遺伝子の高メチル化が予後と関連を示すことはなかった。( 図 2 )

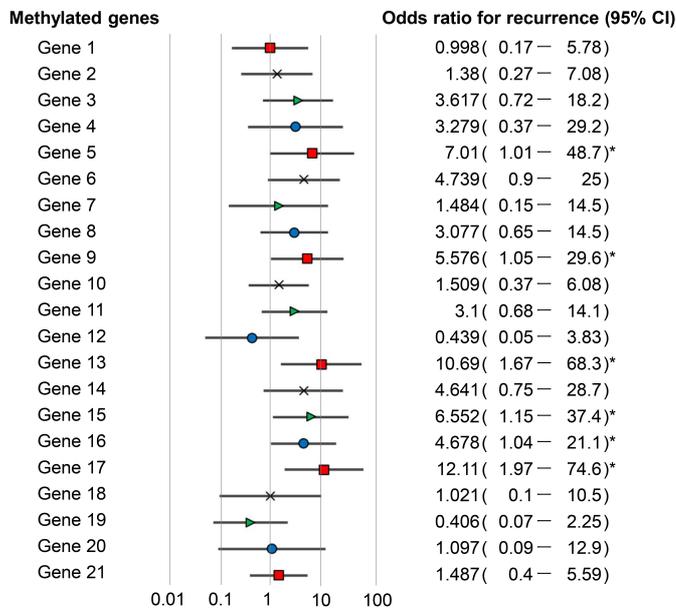


図3 HPV関連頭頸部癌における多変量解析の結果

HPV 関連中咽頭癌 35 例における多変量解析の結果を示す。年齢、性別、喫煙歴、飲酒歴、ステージと各遺伝子のメチル化度で比較を行ったが、遺伝子 5, 9, 13, 15, 16, 17 の 6 遺伝子の高メチル化が予後と関連を示した。また、遺伝子 6 と 14 も比較的強い相関を認めたため、候補遺伝子として選択した。( 図 3 )

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
Gene 5	+	+	+	+	+
Gene 6	-	+	+	+	+
Gene 9	+	+	+	+	+
Gene 13	+	+	+	-	+
Gene 14	-	-	-	+	-
Gene 15	-	-	+	-	+
Gene 16	-	-	-	-	-
Gene 17	-	-	-	-	-

図4 リキッドバイオプシーにおけるメチル化解析の結果

HPV 関連中咽頭癌症例から得たリキッドバイオプシー血漿循環中 DNA を使って血漿循環中 DNA メチル化解析を行った遺伝子 5, 6, 9, 13 が血漿循環中 DNA メチル化解析で解析可能なマーカーであることが判明した。+ :メチル化検出あり、- :メチル化検出なし。( 図 4 )

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Endo S, Mizuta K\*, Takahashi G, Nakanishi H, Yamatodani T, Misawa K, Hosokawa S, Mineta H. The effects of ventilation tube insertion or trans-tympanic silicone plug insertion on a patulous Eustachian tube. *Acta Otolaryngol*; 136(6):551-5. 2016
2. Endo S, Mizuta K\*, Yamatodani T, Nakanishi H, Hosokawa K, Misawa K, Hosokawa S, Mineta H: A case of improved hearing with cochlear implantation in Gaucher disease type 1. *Auris Nasus Larynx*; 45: 603-607, 2017
3. Yamatodani T, Misawa K, Endo S, Nakanishi H, Hosokawa S, Mineta H: Excision Challenges in the First Reported Case of an Ameloblastoma Found in the Middle Ear. *Journal of International Advanced Otology* in press
4. Mochizuki D, Misawa Y, Kawasaki H, Imai A, Endo S, Mima M, Yamada S, Nakagawa T, Kanazawa T and Misawa K\*: Aberrant epigenetic regulation in head and neck cancer distinct EZH2 overexpression and DNA hypermethylation. *International Journal of Molecular Sciences*; 19(12):3707, 2018
5. Misawa K\*, Imai A, Mochizuki D, Mima M, Endo S, Misawa Y, Kanazawa T and Mineta H; Association of TET3 epigenetic inactivation with head and neck cancer. *Oncotarget*; 9(36):24480-24493, 2018
6. Misawa K\*, Mima M, Imai A, Mochizuki D, Misawa Y, Endo S, Ishikawa R, Kanazawa T and Mineta H; The neuropeptide genes SST, TAC1, HCRT, NPY, and GAL are powerful epigenetic biomarkers in head and neck cancer: A site-specific analysis. *Clin Epigenetics*; 10: 52, 2018
7. Misawa K\*, Misawa Y, Imai A, Mochizuki D, Endo S, Mima M, Ishikawa R, Yamatodani T, Kawasaki H and Kanazawa T; Epigenetic modification of SALL1 as a novel biomarker for the prognosis of early tumor stage patients with head and neck cancer. *Journal of Cancer*; 9(6): 941-949, 2018
8. Misawa K\*, Imai A, Mochizuki D, Misawa Y, Endo S, Hosokawa S, Ishikawa R, Mima M, Shinmura K, Kanazawa T, Mineta H: Genes encoding neuropeptide receptors are epigenetic markers in patients with head and neck cancer: a site-specific analysis. *Oncotarget*; 8(44): 76318-76328, 2017
9. Misawa K\*, Mochizuki D, Imai A, Misawa Y, Endo S, Mima M, Kawasaki H, Carey TE, Kanazawa T: Epigenetic silencing of SALL3 is an independent predictor of poor survival in head and neck cancer. *Clin Epigenetics*; 9: 64.2017
10. Mizuta K, Yamatodani T\*, Endo S, Nakanishi H, Takahashi G, Misawa K, Hosokawa S, Mineta H: Clinical Analysis of Secondary Acquired Cholesteatoma. *Archives of General Internal Medicine*; 1(2): 12-16. 2017
11. Misawa Y, Misawa K\*, Kawasaki H, Imai A, Mochizuki D, Ishikawa R, Endo S, Mima M, Kanazawa T, Iwashita T, Mineta H: The evaluation of epigenetic inactivation of

- vascular endothelial growth factor receptors of head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biology*; 39(7): 1010428317711657. 2017
- Misawa K\*, Mochizuki D, Endo S, Mima M, Misawa Y, Imai A, Shinmura K, Kanazawa T, Carey TE, Mineta H: Site-specific methylation patterns of the GAL and GALR1/2 genes in head and neck cancer: potential utility as biomarkers for prognosis. *Mol Carcinogenesis*.; 56(3): 1107-1116. 2017
  - Misawa K\*, Mochizuki D, Imai A, Endo S, Mima M, Misawa Y, Kanazawa T, Carey TE, Mineta H : Prognostic value of aberrant promoter hypermethylation of tumor-related genes in early-stage head and neck cancer. *Oncotarget*; 24: 26087-26098. 2016
  - Misawa K\*, Misawa Y, Kanazawa T, Mochizuki D, Imai A, Endo S, Carey TE, Mineta H: Epigenetic inactivation of galanin and GALR1/2 is associated with early recurrence in head and neck cancer. *Clin Exp Metastasis*.; 33(2): 187-95. 2016

〔学会発表〕(計 7 件)

- 遠藤 志織, 水田 邦博, 中西 啓, 大和谷 崇, 峯田 周幸: 外リンパ瘻を伴った外傷性耳小骨離断の1例 第26回日本耳科学会 2016年10月 長野
- 遠藤 志織, 中西 啓, 水田 邦博, 峯田 周幸: 両側人工内耳埋込術を施行した Auditory neuropathy spectrum disorder(ANSD)の1例 第61回日本聴覚医学会 2016年10月 盛岡
- 遠藤 志織, 水田邦博: 鼻すすり癖の有無による病態と治療法の相違点 第4耳管開放症研究会 2017年7月 福岡
- 遠藤 志織, 水田 邦博, 中西 啓, 大和谷 崇, 細川久美子, 峯田 周幸: 鼻すすり癖の有無による耳管開放症の相違点 第27回日本耳科学会 2017年11月 横浜
- 遠藤 志織, 水田邦博, 荒井真木, 滝澤義徳, 中西啓, 細川久美子, 大和谷崇: 鼻すすり癖のある弛緩部型真珠腫に対する手術法の検討 第119回日本耳鼻咽喉科学会 2018年5月 横浜
- 遠藤 志織, 水田邦博, 荒井真木, 中西啓, 細川久美子, 大和谷崇, 峯田周幸: 鼻すすり癖からみた弛緩部型真珠腫の術後経過 第28回日本耳科学会 2018年10月 大阪
- 遠藤 志織, 水田邦博, 荒井真木, 中西啓, 細川久美子, 大和谷崇, 三澤清, 細川誠二, 峯田周幸: 当科における外耳道削除型鼓室形成術・乳突腔充填術の検討 第120回日本耳鼻咽喉科学会 2019年5月 大阪

〔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

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。