

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2017～2019  
 課題番号：17K08710  
 研究課題名(和文) 病理-NGSゲノム解析のシームレス早期頭頸部扁平上皮癌診断法の確立と治療薬の探索

研究課題名(英文) Pathology-Seamless NGS genome analysis Establishment of early diagnosis of H&N Squamous cell carcinoma and search for therapeutic agents

## 研究代表者

森 泰昌 (Mori, Taisuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医師

研究者番号：00296708

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)：術前生検標本によるタンパク質表現型分析および外科標本による変異状態分析が外科的マージン距離を決定し、臨床転帰を予測できるかを調査した。結果として、HPV関連SCC患者を除き、FFPE生検または外科標本を使用し臨床転帰を正確に予測することが可能であった。TP53変異は、p53タンパク質表現型2+ないしlostとして分類される「p53有害機能」とTP53野生型はp53タンパク質表現型+と、±は「p53良好機能」として分類された。「p53の有害な機能」は患者の全生存、局所制御および遠隔転移のない生存の独立した予後因子であった。さらに、適切な外科的マージンの後の局所再発率は高いことが明かとなった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

TP53などの腫瘍抑制遺伝子のゲノムおよびタンパク質レベルを分析する詳細な方法としてTP53エキソン配列全体の状態とp53タンパク質の表現型を詳細に調べる本研究開発は、頭頸部扁平上皮癌の生物学的特性を把握するのに効果的であった。ゲノム解析に関するさらなる技術革新は、生検標本から術前のマイクロサンプルを使用して腫瘍の生物学的特性を予測するのに役立つ、この情報は、個別の外科治療の戦略を立て、外科的マージン距離の決定を可能にすると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to investigate whether protein phenotype analysis via preoperative biopsy specimens and mutation status analysis via surgical specimens could determine surgical margin distances and predict clinical outcomes. The findings of the study accurately predicted clinical outcomes using formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies or surgical specimens, except in patients with HPV-associated SCC. We categorized TP53 mutation as p53 protein phenotype 2+, lost as p53 adverse functions, TP53 wild-type and TP53 mutation as p53 protein phenotype +, and ± as p53 favorable functions. As a result, p53 adverse functions remained an independent prognostic factor for overall survival, local control, and distant metastases-free survival in enrolled patients. Moreover, local recurrence rates after adequate surgical margins were higher. Therefore, larger surgical margin distances were required for patients.

研究分野：人体病理

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 ゲノム診断 p53 次世代シーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)は増加傾向にある。HNSCCは、喫煙・アルコール摂取に加えて高リスク群のヒトパピローマウイルス(HPV)による感染を含む heterogeneous な過程により形成される。また HNSCC は進行した際の手術侵襲と審美性と機能の喪失が大きく、再発時のサルベージ手術も困難なことが多い。このため効果的な早期診断法と副作用が少なく治療効果の高い癌治療薬の開発が喫緊の課題となっている。

現在、HNSCC 早期診断の問題点として、

- 1) 先行して存在する異型病変には異形成と反応性や再生性異型上皮が含まれて診断が難しいことが挙げられる。現状ではスペクトラムである異型病変は臨床的要因を含め様々な解釈により分類されているため、診断が一定の均てん化された解釈に拠っていない。
- 2) 治療効果の高い癌治療薬開発の問題点は、他臓器のがんに比して集積した情報に拠った基礎的な解析が進んでいないことが挙げられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者自身のこれまでの成果と The Cancer Genome Atlas(ATGC)の結果に基づき、HNSCC に高頻度に変異を来すがん抑制遺伝子(TP53, CDK2A 等), PIK3CA, 遺伝子についてエクソン全領域シーケンスによる解析を行う。特に申請者の p53 等の IHC とデータベースを基に早期病変(異形成と反応性異型)とその後に明確に癌に進展した病変、早期再発例、治療不応例について腫瘍の特質と腫瘍発生・増殖における不均一性の解析を行い、癌抑制遺伝子の遺伝子変異の蓄積解析から早期頭頸部扁平上皮癌診断法の確立を目的とする。さらに PIK3CA 経路やその下流細胞による未承認薬・適応外薬を含む治療薬の実用化を含めた新たな治療法の開発に役立つ基盤構築を目的とする。

## 3. 研究の方法

レトロスペクティブな早期病変と癌発症例病理パラフィン検体試料の病理組織学的評価

・後向き臨床情報・試料集積(700例)の評価

過去5年間の頭頸部扁平上皮癌、特に舌癌を中心として頭頸部扁平上皮癌の早期病変(異形成+反応性異型)から扁平上皮癌と診断された症例と異形成までに留まる症例について情報収集、詳細な病理組織学的な評価を行う。項目としては、発症までの期間、再発、転移、治療法のデータベース作成を進める。また p53, p16 各分子の発現パターンによるクラスター分類を行う。また、各分子が悪性度や予後の推定、治療法の選択のマーカーとして有益であるかを解析する。

臨床情報として、患者の年齢、性別、治療開始前の Stage、Performance Status、前治療歴、該当する悪性疾患の診断日、初回治療開始日、初回化学療法開始日、該当する治療の開始日、増悪確認日、最終生存確認日および打ち切りの有無、抗がん剤の治療効果などの情報を収集する。抗がん剤の治療効果については、無増悪生存期間などを求める。

レトロスペクティブな早期病変と癌発症例からの、遺伝子変異解析

2)-1:1)で評価されたサンプル700例からDNAを抽出し、それらの遺伝子変異パターンを次世代シーケンサーにより解析する。また1)によりクラスター化したデータを重ね検証する。

## 4. 研究成果

重要ながん抑制遺伝子であるTP53は、頭頸部扁平上皮癌の約70%で変異が認められ、ナンセンス変異、フレームシフト変異、プライミング異常、一部のミスセンス変異が予後不良因子と報告されている。一方、病理診断におけるp53蛋白(D0-7 clone)の免疫組織化学染色(IHC)では、強陽性(2+)・染色性の陰性(-lost)といった異常染色パターンが認められる。過去3年に当院で外科加療を行った頭頸部扁平上皮癌患者367例の切除標本のFFPE検体からDNAを抽出、Illumina社の次世代シーケンサー(MiSeq)にてTP53の全エクソン変異解析と免疫染色によるp53蛋白発現解析の融合解析を行った。結果として、TP53変異は全体の60%の症例にみとめられ、ナンセンス変異、フレームシフト変異は独立した予後不良因子であるが、ミスセンス変異は単独で予後因子とはならなかった。なお、Lostと2+の症例間で大きな差は認めなかったが、野生型とLost, 2+を併せたグループとの比較では、2年生存

率、再発に優位な差が認められた。したがって、TP53エクソン配列全体の状態とp53タンパク質の表現型を詳細に調べることが、HNSCCの生物学的特性のほとんどを把握するのに効果的であった。これらの結果を元として術前の生検検体を用いた免疫染色から同一検体を用いたシームレスな TP53 全エクソンシーケンス解析により、症例の確度の高い診断と予後の推定が可能となった。

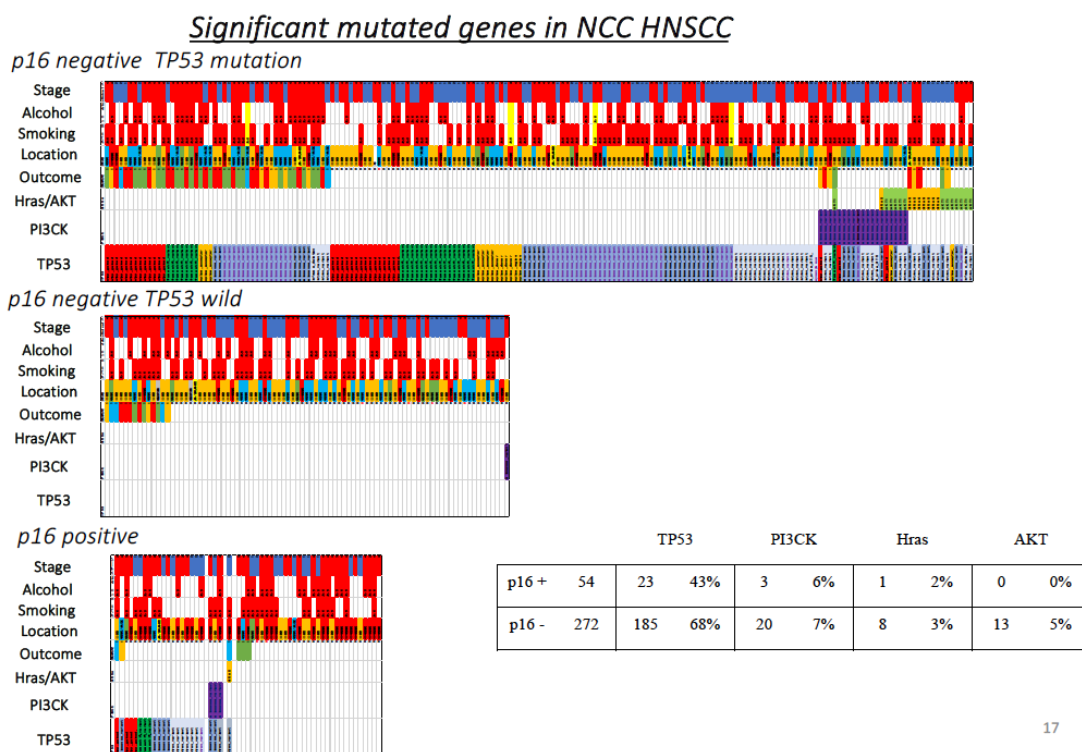
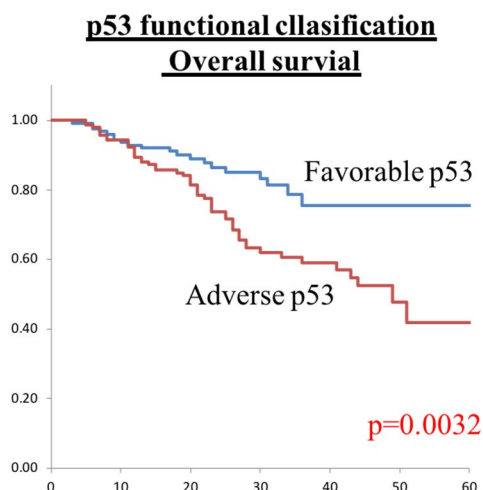
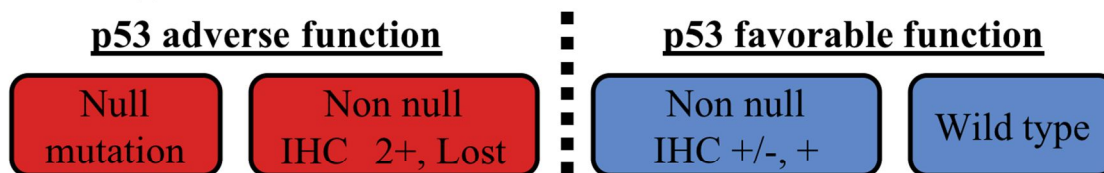


図 1 臨床情報と解析結果の相関図

## p53 functional classification



**Local recurrence rate after complete resection**

	NED	Local recurrence
Adverse p53	88	23
Favorable p53	88	10

p=0.0375

図 2 p53 によるグループ化と臨床的予後

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mori Taisuke, Kobayashi Kenya, Yoshimoto Seiichi	4. 巻 26
2. 論文標題 ASO Author Reflections: Precise p53 Analysis in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Specimens Can Predict Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Outcomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 614 ~ 615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07433-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Kenya, Yoshimoto Seiichi, Matsumoto Fumihiko, Ando Mizuo, Murakami Naoya, Omura Go, Fukasawa Masahiko, Matsumoto Yoshifumi, Matsumura Satoko, Akamatsu Maki, Hiraoka Nobuyoshi, Eigitsu Ryo, Mori Taisuke	4. 巻 26
2. 論文標題 All-Exon TP53 Sequencing and Protein Phenotype Analysis Accurately Predict Clinical Outcome after Surgical Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 2294 ~ 2303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07287-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kosugi Ayaka, Kasahara Masataka, Yang Longqiang, Nakamura-Takahashi Aki, Shibahara Takahiko, Mori Taisuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Method for diagnosing neoplastic lesions by quantitative fluorescence value	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7833-7838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44287-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Takatsugu, Yamazaki Hiroshi, Honda Kazufumi, Ryo Eijitsu, Kaneko Akihiro, Ota Yoshihide, Mori Taisuke	4. 巻 55
2. 論文標題 Altered DNA methylation is associated with aberrant stemness gene expression in early?stage HNSCC	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 915-924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4857	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teshima Masanori, Tokita Kazuya, Ryo Eijitsu, Matsumoto Fumihiko, Kondo Madoka, Ikegami Yota, Shinomiya Hiroataka, Otsuki Naoki, Hiraoka Nobuyoshi, Nibu Ken-ichi, Yoshimoto Seiichi, Mori Taisuke	4. 巻 19
2. 論文標題 Clinical impact of a cytological screening system using cyclin D1 immunostaining and genomic analysis for the diagnosis of thyroid nodules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 245-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-5452-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森 泰昌
2. 発表標題 TP53 の全エクソームシーケンスと蛋白発現解析は頭頸部扁平上皮癌の正確な外科的処置方法決定に寄与する
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 泰昌
2. 発表標題 取り扱い規約の改正点 (頭頸部癌取り扱い規約, 口腔癌取り扱い規約) と WHO2017 における上気道・咽頭・口腔の表面上皮腫瘍性病変について
3. 学会等名 第82回 日本病理学会関東支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----