

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16904

研究課題名(和文) 中咽頭癌個別化医療のためのクリニカルシーケンス導入の試み

研究課題名(英文) Identification of novel methylation markers in HPV-associated oropharyngeal cancer for precision medicine

研究代表者

今井 篤志 (Imai, Atsushi)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30794309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：まずRNAシーケンスと網羅的メチル化解析によって、21メチル化候補遺伝子を抽出した。次に、中咽頭癌症例のDNAサンプルにて、予後と関連した10遺伝子を抽出した。さらに、リキッドバイオプシーからのctDNAサンプルにてメチル化解析をこの10遺伝子に行い、3遺伝子(CALML5, DNAJC5G, and LY6D)がリキッドバイオプシーによるメチル化解析によるHPV関連中咽頭癌症例の再発リスクならびにモニタリングに有効であることを確認した。今回の研究により、最近増加しているHPV関連中咽頭癌の症例の予後改善ならびに治療効果の判定を見極めるのに有効なマーカーを抽出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究は、リキッドバイオプシーによるHPV関連中咽頭癌の腫瘍状態を見極められるマーカーを探索することが目的であった。3種類の遺伝子のDNAメチル化を調べることによって治療後の腫瘍の状態、再発による腫瘍の増大を検知できる手法を開発することができた。従来、CT、MRI、PET-CTによる画像評価が治療に行われていたが、患者への負担が少ない採血から得られたctDNAによって、腫瘍の状態を評価することができ今後の臨床に応用されていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide discovery using RNA sequencing and reduced representation bisulfite sequencing yielded 21 candidates for methylation-targeted genes. A verification study using Q-MSP identified 10 genes that showed an increase recurrence in methylation groups with oropharyngeal cancer (OPC). Further study on ctDNA in HPV-associated OPC showed that three genes (CALML5, DNAJC5G, and LY6D) had a high predictive ability as emerging biomarkers for a validation set, each capable of discriminating between the plasma of the patients from healthy individuals. Among pre-treatment ctDNA samples, methylated CALML5, DNAJC5G, and LY6D were observed in 8/8 (100%), 7/8 (87.5%), and 7/8 (87.5%) samples, respectively. Methylated CALML5, DNAJC5G, and LY6D were found in 2/8 (25.0%), 0/8 (0%), and 1/8 (12.5%) of the final samples in the series, respectively. Here, we present the relationship between the methylation status of three genes and cancer recurrence for risk classification of HPV-associated OPC cases.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：HPV関連癌 リキッドバイオプシー 中咽頭癌 メチル化 cell free DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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すると考えられている。HPV 関連中咽頭癌の予後は、放射線治療への感受性から良好とされるが、HPV 関連中咽頭癌症例の 10-15%は、予後が不良とされている。このような背景から、新たな診断法・治療効果判定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。この検出方法は、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 関連中咽頭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。癌治療における再発病変の発見の遅れは、追加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 関連中咽頭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今回の研究の目的としている。

3. 研究の方法

同意を得た中咽頭癌患者 8 例から組織サンプル(生検または手術)と末梢血 10ml を採取した。組織サンプルから p16 免疫染色と TaKaRa PCR Human-Papillomavirus Typing Set による HPV 解析をおこなっている。末梢血から血漿を分離して、QIAamp MinElute cfDNA Midi Kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて腫瘍循環 DNA を抽出した。すべての症例で複数回(2-11 回)採血を行っている。HPV 関連中咽頭癌患者のリキッドバイオプシーサンプルから腫瘍循環 DNA を抽出し濃度を測定し、その DNA を使って HPV の PCR を行った。また、バイサルファイト処理した DNA を使ってメチル化解析をおこなった。CALML5、DNAJC5G、LY6D の 3 遺伝子について、経時的にメチル化度を計測し臨床状態との比較を行った。

4. 研究成果

すでに、次世代シーケンサーを使った網羅的メチル化解析、mRNA 解析で得られた、HPV 関連中咽頭癌のメチル化マーカーを 21 遺伝子抽出し、予後と関連する遺伝子を 8 遺伝子抽出した。その 8 遺伝子を、腫瘍循環 DNA にてメチル化解析をおこない、3 遺伝子が腫瘍循環 DNA でメチル化解析にて有効なマーカーであること、術前の腫瘍循環 DNA では高メチル化を認め、治療後腫瘍循環 DNA のメチル化は低下し、再発病変を認めると早期にメチル化が上昇することがわかった。つまり、HPV 関連中咽頭癌患者の腫瘍の状態に相関することがわかった。

また、腫瘍が HPV ポジティブの症例でも、血漿からはポジティブの症例、ネガティブの症例が存在することがわかった。つまり、腫瘍からの腫瘍循環 DNA の中に HPV が存在するかどうかで、予後と関連する可能性があるとして予想された。

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 3 遺伝子(CALML5、DNAJC5G、LY6D)を有効なマーカーとして選別した。(図 1)

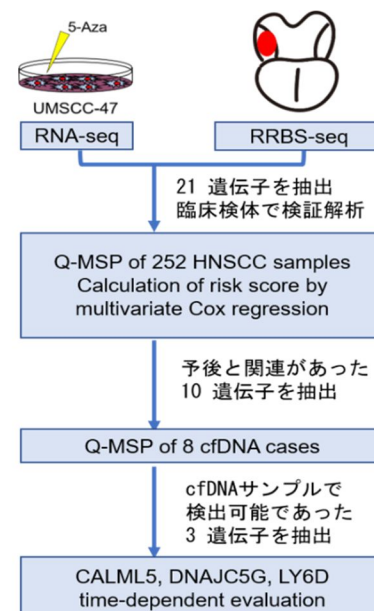


図1 HPV関連中咽頭癌におけるメチル化遺伝子マーカー候補の抽出の流れ

Patient number	Age (years)	Gender	Primary HPV status	cfDNA HPV status	Smoking status	Alcohol exposure	TNM stage	Primary site	Initial treatment	DFS (months)	OS (months)
Patient 1	42	Male	positive	positive	Smoker	Ever	T4N2M0	R-Tonsil	oropharyngectomy, B-ND	12	27
Patinet 2	72	Female	positive	negative	Smoker	Ever	T4N2M0	R-Tonsil	CRT (CDDP+70Gy)	6	6
Patient 3	45	Male	positive	negative	Smoker	Ever	T4N0M0	BOT	oropharyngectomy, B-ND	12	12
Patinet 4	73	Female	positive	negative	Non smoker	Ever	T2N2M0	L-Tonsil	oropharyngectomy, L-ND	22	27
Patient 5	66	Female	positive	positive	Non smoker	Never	T2N0M0	L-Tonsil	oropharyngectomy, L-ND	25	25
Patinet 6	47	Male	positive	positive	Non smoker	Never	T2N1M0	L-Tonsil	oropharyngectomy, L-ND	4	13
Patient 7	60	Male	positive	positive	Smoker	Ever	T2N2M0	L-Tonsil	oropharyngectomy, B-ND	12	12
Patinet 8	61	Male	positive	positive	Smoker	Ever	T2N1M0	R-Tonsil	CRT (CDDP+66Gy)	12	12

DFS, disease-free survival; OS, overall survival; BOT, base of tongue; ND, neck dissection; CRT, chemoradiotherapy; B, bilateral; R, right; L, left.

表1 リキッドバイオプシーをおこなったHPV関連中咽頭癌の内訳

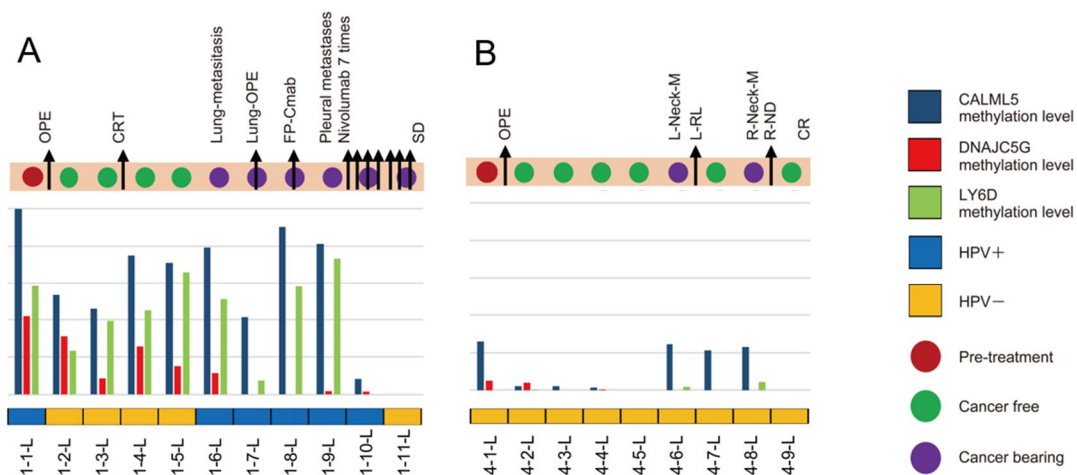


図2 リキッドバイオプシーによるメチル化解析の例 (A) Patient 1、(B) Patient 4

リキッドバイオプシーを行った8例の内訳を表1に示す。年齢は、平均年齢は58.2歳(42-73歳)で、男女比は、5:3であった。リキッドバイオプシーからの腫瘍循環DNAのHPV解析では、5例がHPV陽性、3例がHPV陰性であった。治療は、CRTが2例、腫瘍摘出術が6例であった。(表1)

8例のうち、代表的な2例を提示する。

Patient 1: 42歳の男性、右口蓋扁桃腫瘍の中～低分化型扁平上皮癌であった。免疫染色検査でp16は陽性で組織生検からのDNAでHPVは陽性であった。中咽頭右側壁癌 cT4N1M0の診断に対して手術加療となった。病理組織学的検査ではp16陽性の低分化型扁平上皮癌のpT4N2と診断された。再発高リスク群と判断され、後治療として化学放射線治療を施行された。術後12ヶ月後のCTで右肺下葉に21mm大の結節と右肺門部にリンパ節腫大を2個認め、PET-CTで集積を認めた。右肺中下葉切除術を施行した。病理組織学的検査ではp16/HPV陽性の低分化型扁平上皮癌であり、中咽頭癌の転移と診断された。肺術後4ヶ月にPET-CTで右胸膜、縦隔に転移病変を認めた。緩和的化学療法の1stラインとしてFP-Cmab(5FU 1000mg/m²×4日, Cisplatin 80mg/m², Cetuximab 初回400mg/m² 2回目以降250mg/m²)を開始した。2ヶ月後の病変は不変であったが1stライン開始後5ヶ月(FP-Cmab 5コース)でPD(progressive disease)となった。疼痛の出現があり、姑息照射を一次治療開始後5ヶ月から胸膜・縦隔に39Gy/13frを施行した。2ndラインとしてNivolumab(240mg/m², 隔週投与)を翌月から開始した。2ndライン開始後2ヶ月目にはやや縮小効果を認めたが、5ヶ月でSD(stable disease)となった。(図2A)

Patient 4: 73歳の女性、左口蓋扁桃腫瘍の扁平上皮癌であった。免疫染色検査でp16は陽性で組織生検からのDNAでHPVは陽性であった。中咽頭右側壁癌 cT2N2M0の診断に対して手術加療となった。病理組織学的検査ではp16陽性の中～低分化型扁平上皮癌のpT2N2と診断された。術後12ヶ月後のCTで左頸部リンパ節転移を指摘、左頸部リンパ節群郭清を施行した。術後18ヶ月後、PET-CTにて右頸部リンパ節転移を指摘、右頸部リンパ節群郭清を施行した。

リキッドバイオプシーからの腫瘍循環DNAのHPV解析では、Patient 1が術前に陽性であったが術後に陰性化した。肺転移を認めると再び陽性化した。Patient 4は、術前からすべてのサンプルで陰性であった。

次に、腫瘍循環 DNA のメチル化解析は、Patient 1 が術前から CALML5、DNAJC5G、LY6D 遺伝子ともに高メチル化であった。術後、メチル化度は減少傾向であったが、CALML5、DNAJC5G は再び上昇を認めた。肺転移を PET-CT で認めるより早く高メチル化した。Patient 4 は、術前に CALML5、DNAJC5G 遺伝子のメチル化を認めた。術後、頸部リンパ節転移を認めると CALML5 のメチル化度が上昇した。

以上の結果から、腫瘍循環 DNA の CALML5、DNAJC5G、LY6D 遺伝子メチル化解析は、HPV 関連中咽頭癌患者の腫瘍の状態に相関する結果が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Misawa K, Misawa Y, Imai A, Mochizuki D, Endo S, Mima M, Ishikawa R, Yamatodani T, Kawasaki H and Kanazawa T	4. 巻 9(6)
2. 論文標題 Epigenetic modification of SALL1 as a novel prognostic factor of early T1 and T2 patients with head and neck cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 941-949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.23527	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 Misawa K, Mochizuki D, Imai A, Mima M, Misawa Y and Mineta H	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Site-specific epigenetic analysis of the tumor-related genes in head and neck cancer: potential utility as biomarkers for prognosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 E27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers10010027.	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 Misawa K, Mima M, Imai A, Mochizuki D, Misawa Y, Endo S, Ishikawa R, Kanazawa T and Mineta H	4. 巻 10
2. 論文標題 The neuropeptide genes SST, TAC1, HCRT, NPY, and GAL are powerful epigenetic biomarkers in head and neck cancer: A site-specific analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-018-0485-0	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 Misawa Kiyoshi, Misawa Yuki, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Endo Shiori, Mima Masato, Ishikawa Ryuji, Kawasaki Hideya, Yamatodani Takashi, Kanazawa Takeharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Epigenetic modification of SALL1 as a novel biomarker for the prognosis of early stage head and neck cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 941 ~ 949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.23527	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 Misawa Kiyoshi, Mochizuki Daiki, Imai Atsushi, Mima Masato, Misawa Yuki, Mineta Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis of Site-Specific Methylation of Tumor-Related Genes in Head and Neck Cancer: Potential Utility as Biomarkers for Prognosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 27 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers10010027	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 Hosokawa Seiji, Takahashi Goro, Okamura Jun, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Takizawa Yoshinori, Yamatodani Takashi, Misawa Kiyoshi, Mineta Hiroyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Risk and prognostic factors for multiple primary carcinomas in patients with head and neck cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 124 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyx178	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 Misawa Kiyoshi, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Misawa Yuki, Endo Shiori, Hosokawa Seiji, Ishikawa Ryuji, Mima Masato, Shinmura Kazuya, Kanazawa Takeharu, Mineta Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Genes encoding neuropeptide receptors are epigenetic markers in patients with head and neck cancer: a site-specific analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.19356	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 Misawa Kiyoshi, Mochizuki Daiki, Imai Atsushi, Misawa Yuki, Endo Shiori, Mima Masato, Kawasaki Hideya, Carey Thomas E., Kanazawa Takeharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Epigenetic silencing of SALL3 is an independent predictor of poor survival in head and neck cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-017-0363-1	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 Kanijo Tomoyuki, Matsumoto Komei, Onitsuka Tetsuro, Imai Atsushi, Iida Yoshiyuki, Nagaoka Masato, Kitani Takashi	4. 巻 121
2. 論文標題 New Approach to Prevention of Postoperative Delirium in Patients Undergoing Head and Neck Cancer Surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho	6. 最初と最後の頁 31～37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3950/jibiinkoka.121.31	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 Misawa Yuki, Misawa Kiyoshi, Kawasaki Hideya, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Ishikawa Ryuji, Endo Shiori, Mima Masato, Kanazawa Takeharu, Iwashita Toshihide, Mineta Hiroyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Evaluation of epigenetic inactivation of vascular endothelial growth factor receptors in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Tumor Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1010428317711657	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 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Atsushi Imai, Kiyoshi Misawa, Daiki Mochizuki, Takeharu Kanazawa, Hiroyuki Mineta
2. 発表標題 Prognostic value of aberrant promoter hypermethylation of tumor-related genes in early-stage head and neck cancer
3. 学会等名 109rd AACR Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井篤志、望月大極、岡村 純、三澤 清、細川誠二、峯田周幸
2. 発表標題 同時性4臓器6重複癌の1例.
3. 学会等名 第41回頭頸部癌学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 今井篤志、峯田周幸	4. 発行年 2017年
2. 出版社 全日本病院出版会	5. 総ページ数 6
3. 書名 ENTONI No. 210(2017年9月・増大号) 術後せん妄に対する向精神病薬の使い方. もう迷わない耳鼻咽喉科疾患に対する向神薬の使い方	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----