

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09316

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌の発癌機構におけるmicrobiomeの関与に関する研究

研究課題名(英文) Involvement of microbiome in carcinogenesis mechanism of head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

齊藤 祐毅 (Saito, Yuki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40611009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HPV-HNSCC全ゲノムデータを用いて新しいプライマー/プローブセットを設計した。設計されたセットは、CaSki 細胞株DNAを用いてスクリーニングし、HPV-HNSCC患者の咽頭うがい液サンプルで確認した。結果、HPV-16ゲノムのうち、E5領域とL2領域の間で最もリード数が多く、E1領域に普遍的に存在する領域が存在した。CLIA認定の実験室環境において、2つのセットとE7セットの組み合わせにより、咽頭うがい液サンプルにおいて感度は96% (27/28)、特異度は100% (0/15)だった。結論：HPV-HNSCCにおけるHPV-16 DNA検出能を改善できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPV関連中咽頭癌は現在増加傾向を有するウイルス関連癌である。本癌に対する前がん病変は明確ではないため、今後嗽液や血液からのリキッドバイオプシーによる発がんリスク分類が必要となってくる領域である。本研究ではその発がんリスク分類を明らかにするために既存のゲノム情報からより検出感度を高めるプライマー/プローブセットを開発することに成功した。本研究をもとにこれまで困難であったHPV関連中咽頭癌の早期発見を可能にする基盤を作成したと考える。

研究成果の概要(英文)：Methods: We used genomic HPV-HNSCC sequencing data from a single institutional and a TCGA cohort. Optimized primer/probe sets were designed and tested for analytical performance in CaSki HPV-16 genome and confirmed in salivary rinse samples from patients with HPV-HNSCC.

Results: The highest read density was observed between E5 and L2 regions. The E1 region contained a region that was universally present. Among candidate PCR primer/probe sets created, six reliably detected 30 HPV-16 copy number. In a CLIA certified laboratory setting, the combination of two novel primer/probe with E7 sets improved performance in salivary rinse samples with a sensitivity of 96% and specificity of 100%.

Conclusions: PCR-based detection of HPV-16 DNA in HPV-HNSCC can be improved using rational genomic design.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：咽頭癌 ウィルス 細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HPV 関連中咽頭癌は増加傾向にあるもののその多くが頸部リンパ節転移で自覚されることが多く、早期発見が難しいという問題点があった。

2. 研究の目的

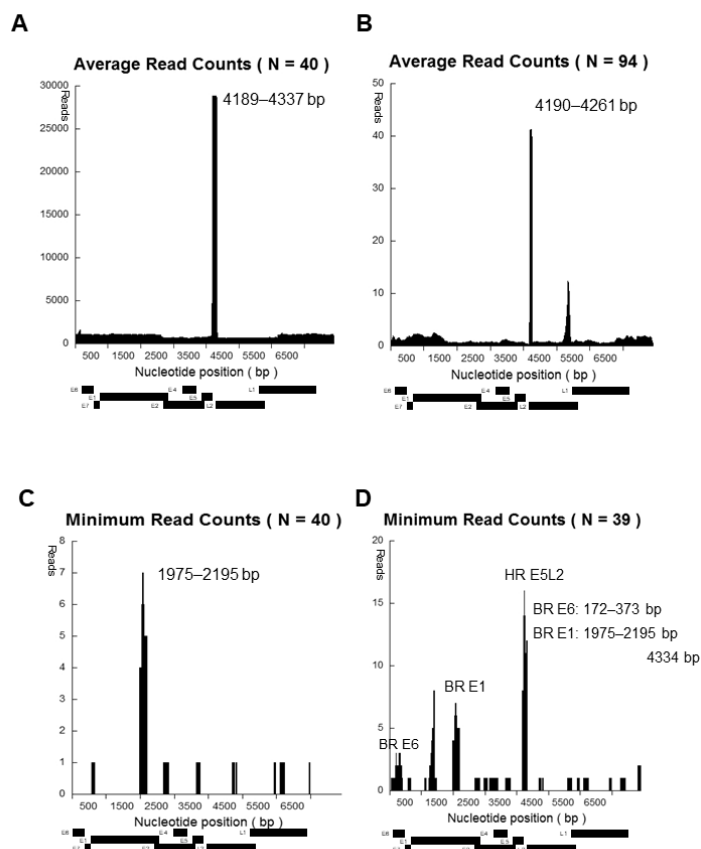
咽頭癌内における Microbiome として HPV の関与を検討し、その検出に関してゲノムデータを用いて最適化することを通して早期発見および再発転移の発見に寄与すること。

3. 研究の方法

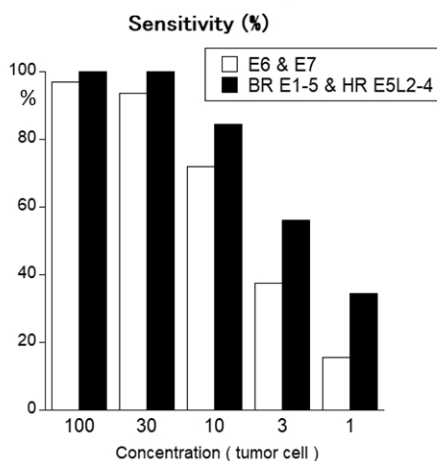
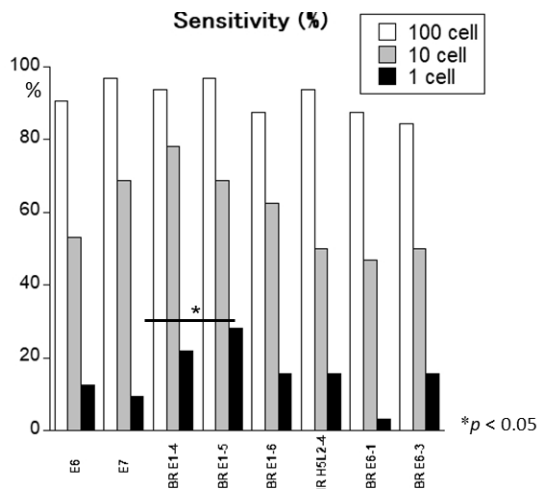
本研究は UCSD との共同研究としても行った。TCGA データベース、UCSD での採取検体を対象に、ゲノムデータから最適化したプライマー、プローブセットをもとに HPV 関連癌の検出方法の最適化を試みた。

4. 研究成果

本研究のプライマー、プローブを設計するにあたり、まず TCGA データと既存のデータセットから既存の E6 および E7 よりもリード数が多い領域を把握することとした。WGS データを HPV-16 にアライメントしなおしたところ、これまでの E6 および E7 の領域よりもより高いリード数が E5-L2 領域に存在していること、およびすべての症例で遍く存在している E1 領域が存在していた。



そのためこの領域に対してプライマー、プローブを設定することでこれまでより効率よく HPV 関連癌を検出できると考え、細胞株から HPV のコピー数毎の検出感度を明らかにする実験を行ったところ、E1 から検出するプライマー、プローブセットが E6 および E7 よりもより効率的に検出が可能であり、今回新たに設定された 2 つのプライマー、プローブセットは既存の E6 および E7 よりも少量の DNA における検出が優れていた。



Figure

さらに、このデータを用いて他コホートにおける検出頻度を検索したところ、唾液検体からは新しいプライマープローベセットにメチル化遺伝子群によるメチル化遺伝子を検出することで、HPV および PAX5、EDNRB のメチル化遺伝子検出を併用することで感度 0.97，特異度 0.87 まで工場が可能である事が明らかになった。

Models	Primary disease		
	AUC	Sensitivity	Specificity
Single Biomarker			
BR E1-5	0.77	0.60	0.91
HR E5L2-4	0.76	0.52	1.00
E7	0.76	0.57	0.91
Any HPV	0.90	0.89	0.90
EDNRB	0.83	0.72	0.95
PAX5	0.78	0.70	0.91
p16(INK4a)	0.59	0.17	1.00
AIC Criteria			
BR E1-5 + HR E5L2-4 + EDNRB + PAX5	0.93	0.97	0.87
BR E1-5 + HR E5L2-4 + EDNRB + PAX5 + p16(INK4a)	0.93	0.97	0.85
BR E1-5 + HR E5L2-4 + E7 + EDNRB + PAX5	0.91	0.97	0.85
All Markers	0.93	0.97	0.85
BR E1-5 + PAX5 + EDNRB	0.91	1.00	0.85
Clinical hypotheses with 'AnyHPV'			
	AUC	Sensitivity	Specificity

Any HPV + <i>EDNRB</i> + <i>PAX5</i>	0.93	1.00	0.85
Any HPV + <i>EDNRB</i>	0.93	0.97	0.85
Any HPV + <i>PAX5</i>	0.89	0.97	0.90
Any HPV + <i>p16(INK4a)</i>	0.89	0.93	0.95
Any HPV + Any Methylation	0.87	1.00	0.85

上記結果は実験室データではあるが、CLIA 基準の他実験室でも追試を行い同様の結果が得られており、HPV 関連癌の早期発見に関して有意義な研究成果を得られたと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukusumi Takahito, Guo Theresa, Ren Shuling, Haft Sunny, Liu Chao, Sakai Akihiro, Ando Mizuo, Saito Yuki, Sadat Sayed, Califano Joseph	4. 巻 58
2. 論文標題 Reciprocal activation of HEY1 and NOTCH4 under SOX2 control promotes EMT in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 226 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2020.5156	査読の有無 無
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 Okano Susumu, Homma Akihiro, Kiyota Naomi, Tahara Makoto, Hanai Nobuhiro, Asakage Takahiro, Matsuura Kazuto, Ogawa Takenori, Saito Yuki,	4. 巻 51
2. 論文標題 Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 173 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa220	査読の有無 無
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 Yokota Tomoya, Homma Akihiro, Kiyota Naomi, Tahara Makoto, Hanai Nobuhiro, Asakage Takahiro, Matsuura Kazuto, Ogawa Takenori, Saito Yuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Immunotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1089 ~ 1096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa139	査読の有無 無
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 Saito Yuki, et al.	4. 巻 126
2. 論文標題 Optimization of therapeutic strategy for p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: Multi institutional observational study based on the national Head and Neck Cancer Registry of Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer	6. 最初と最後の頁 4177 ~ 4187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncr.33062	査読の有無 無
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 Sakai Akihiro, Ando Mizuo, Fukusumi Takahito, Ren Shuling, Liu Chao, Qualliotine Jesse, Haft Sunny, Sadat Sayed, Saito Yuki, Guo Theresa W., Xu Guorong, Sasik Roman, Fisch Kathleen M., Gutkind J. Silvio, Fertig Elana J., Molinolo Alfredo A., Califano Joseph A.	4. 巻 15
2. 論文標題 Aberrant expression of CPSF1 promotes head and neck squamous cell carcinoma via regulating alternative splicing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0233380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0233380	査読の有無 無
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 Shen Sarek, Saito Yuki, Ren Shuling, Liu Chao, Guo Theresa, Qualliotine Jesse, Khan Zubair, Sadat Sayed, Califano Joseph A.	4. 巻 162
2. 論文標題 Targeting Viral DNA and Promoter Hypermethylation in Salivary Rinses for Recurrent HPV-Positive Oropharyngeal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Otolaryngology?Head and Neck Surgery	6. 最初と最後の頁 512 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0194599820903031	査読の有無 無
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 Liu Chao, Sadat Sayed H., Ebisumoto Koji, Sakai Akihiro, Panuganti Bharat A., Ren Shuling, Goto Yusuke, Haft Sunny, Fukusumi Takahito, Ando Mizuo, Saito Yuki, Guo Theresa, Tamayo Pablo, Yeerna Huwate, Kim William, Hubbard Jacqueline, Sharabi Andrew B., Gutkind J. Silvio, Califano Joseph A.	4. 巻 26
2. 論文標題 Cannabinoids Promote Progression of HPV-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma via p38 MAPK Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2693 ~ 2703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-3301	査読の有無 無
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 Ando Mizuo, Kobayashi Hiroshi, Shinozaki-Ushiku Aya, Chikuda Hirotaka, Matsubayashi Yoshitaka, Yoshida Masafumi, Saito Yuki, Kohsaka Shinji, Oda Katsutoshi, Miyagawa Kiyoshi, Aburatani Hiroyuki, Mano Hiroyuki, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 47
2. 論文標題 Spinal solitary fibrous tumor of the neck: Next-generation sequencing-based analysis of genomic aberrations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.12.001	査読の有無 無
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 Saito Yuki, Favorov Alexander V., Forman Michael, Ren Shuling, Sakai Akihiro, Fukusumi Takahito, Liu Chao, Sadat Sayed, Ando Mizuo, Xu Guorong, Khan Zubair, Pang John, Valsamakis Alex, Fisch Kathleen M., Califano Joseph A.	4. 巻 42
2. 論文標題 Rational genomic optimization of DNA detection for human papillomavirus type 16 in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Head & Neck	6. 最初と最後の頁 688 ~ 697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hed.26041	査読の有無 無
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 Shen Sarek, Saito Yuki, Ren Shuling, Liu Chao, Guo Theresa, Qualliotine Jesse, Khan Zubair, Sadat Sayed, Califano Joseph A.	4. 巻 162
2. 論文標題 Targeting Viral DNA and Promoter Hypermethylation in Salivary Rinses for Recurrent HPV-Positive Oropharyngeal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Otolaryngology - Head and Neck Surgery	6. 最初と最後の頁 512-519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0194599820903031	査読の有無 無
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 Liu Chao, Sadat Sayed H, Ebisumoto Koji, Sakai Akihiro, Panuganti Bharat A, Ren Shuling, Goto Yusuke, Haft Sunny, Fukusumi Takahito, Ando Mizuo, Saito Yuki, Guo Theresa, Tamayo Pablo, Yeerna Huwate, Kim William, Hubbard Jacqueline, Sharabi Andrew B, Gutkind J. Silvio, Califano Joseph A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cannabinoids promote progression of HPV positive head and neck squamous cell carcinoma via p38 MAPK activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	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) 10.1158/1078-0432.CCR-18-3301	査読の有無 無
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 Ando Mizuo, Kobayashi Hiroshi, Shinozaki-Ushiku Aya, Chikuda Hirotaka, Matsubayashi Yoshitaka, Yoshida Masafumi, Saito Yuki, Kohsaka Shinji, Oda Katsutoshi, Miyagawa Kiyoshi, Aburatani Hiroyuki, Mano Hiroyuki, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Spinal solitary fibrous tumor of the neck: Next-generation sequencing-based analysis of genomic aberrations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	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) 10.1016/j.anl.2019.12.001	査読の有無 無
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 Saito Yuki, Favorov Alexander V., Forman Michael, Ren Shuling, Sakai Akihiro, Fukusumi Takahito, Liu Chao, Sadat Sayed, Ando Mizuo, Xu Guorong, Khan Zubair, Pang John, Valsamakis Alex, Fisch Kathleen M., Califano Joseph A.	4. 巻 42
2. 論文標題 Rational genomic optimization of DNA detection for human papillomavirus type 16 in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Head & Neck	6. 最初と最後の頁 688 ~ 697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hed.26041	査読の有無 無
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 Liu Chao, Guo Theresa, Sakai Akihiro, Ren Shuling, Fukusumi Takahito, Ando Mizuo, Sadat Sayed, Saito Yuki, Califano Joseph A.	4. 巻 126
2. 論文標題 A novel splice variant of LOXL2 promotes progression of human papillomavirus?negative head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer	6. 最初と最後の頁 737 ~ 748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncr.32610	査読の有無 無
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 Ando Mizuo, Saito Yuki, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-019-09937-w	査読の有無 無
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 Katano Atsuto, Takahashi Wataru, Yamashita Hideomi, Yamamoto Kentaro, Ando Mizuo, Yoshida Masafumi, Saito Yuki, Abe Osamu, Nakagawa Keiichi	4. 巻 97
2. 論文標題 Radiotherapy alone and with concurrent chemotherapy for nasopharyngeal carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e0502 ~ e0502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000010502	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 Liu Chao, Guo Theresa, Xu Guorong, Sakai Akihiro, Ren Shuling, Fukusumi Takahito, Ando Mizuo, Sadat Sayed, Saito Yuki, Khan Zubair, Fisch Kathleen M., Califano Joseph	4. 巻 20
2. 論文標題 Characterization of Alternative Splicing Events in HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Identifies an Oncogenic DOCK5 Variant	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5123-5132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-0752	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0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------