

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16833

研究課題名(和文) デジタルPCRを用いた頭頸部がん血中循環腫瘍DNAの解析と新規バイオマーカー確立

研究課題名(英文) Analysis of circulating tumor DNA in head and neck cancer using digital PCR and establishment of novel biomarkers

研究代表者

明石 健 (Akashi, Ken)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：90779331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来の方法より高感度かつ再現性高く遺伝子変異を検出可能なデジタルPCRを用いて頭頸部がんの血中循環腫瘍DNA(ctDNA)の解析を行い、新規バイオマーカーを確立することを目的とした。

ヒト乳頭腫ウイルス由来のctDNAが検出されることが報告されているp16陽性中咽頭癌症例の解析を行った。治療開始前には25例中14例(56%)でctDNAが検出され、14例全例で初回治療後に病変はCRとなりctDNAは陰性化した。このうちの2例に再発を認め、いずれもctDNAが再び検出された。臨床経過を反映したctDNAの変化が観察され、病勢評価のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌において、病勢や治療効果を判定するバイオマーカーはほとんど確立されていないのが現状である。ctDNAは、非侵襲的かつ繰り返し採取可能な臨床簡便かつ有用なバイオマーカーであることからliquid biopsyとして様々な癌腫で注目され、臨床応用も始まっている。本研究では、p16陽性中咽頭癌においてctDNAが検出されることを確認し、さらに病勢を反映してctDNAが変化することを観察し、バイオマーカーとして有用である可能性を示した。一方でctDNAの検出率の低さなどの問題点も見いだされ、臨床応用に向けての課題も確認することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish a novel biomarker by analyzing circulating tumor DNA (ctDNA) in blood of head and neck cancer using digital droplet polymerase chain reaction (PCR), which can detect genetic mutations with higher accuracy, sensitivity, and precision than traditional real-time PCR.

In p16-positive oropharyngeal carcinoma cases, HPV-derived ctDNA was detected in 14 (56%) of the 25 patients. In all the patients, the samples were found to be ctDNA-negative after initial treatment. Cancer recurrence was observed in 2 of the 14 patients; HPV-derived ctDNA was detected at the time of recurrence. Our results indicate that HPV-derived ctDNA can be a prospective biomarker for predicting the recurrence of p16-positive oropharyngeal cancer.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：血中循環腫瘍DNA ctDNA デジタルPCR 頭頸部癌 p16陽性中咽頭癌

1. 研究開始当初の背景

頭頸部がんにおけるバイオマーカーの現状

頭頸部がんはその半数が初診時に進行期と判断され、5年生存率は概ね50%程度であり、生活習慣に起因するがんであるため、重複癌や併存症も多く治療に難渋することが多い。バイオマーカーとは、「血液や体液、あるいは組織中に検出可能な、特定の病状の生物学的な指標」を指す。頭頸部がんにおける予後予測バイオマーカーとして、上咽頭がんにおける Epstein-Barr ウィルス (EBV)、中咽頭がんにおけるヒト乳頭腫ウイルス (HPV) の感染が知られており、治療選択や予後予測の一助となっている。

その一方で頭頸部がんにおける治療効果判定や再発予測の有用なバイオマーカーは確立されておらず、治療中および治療後の病勢の評価は視触診および画像評価を中心に行われ、残存や再発の早期発見が困難であるのが現状である。頭頸部がんの治療効果判定および再発の早期発見へつながる新たなバイオマーカーの確立が急務である。

血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA) のバイオマーカーとしての可能性

古くから血液中には cell free DNA が存在することが知られていたが、1994年にがん患者の血液中から RAS 変異を有する DNA 断片が検出されて以来、その重要性が注目されるようになった (Br J Haematol 1994)。がん患者では、腫瘍細胞のアポトーシスや壊死に伴い血中に DNA が放出され、cell free DNA の量が健常人よりも増えることが知られるようになった。この血液中に存在する腫瘍細胞由来の DNA を血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) と呼び、これを解析することで腫瘍の状態を推し量ることが可能となり、膵臓がんにおける KRAS 変異、大腸がんにおける KRAS、TP53 変異などが検出されている。ctDNA の解析は 10ml 以下の血液で十分なため、非侵襲的かつ繰り返し採取可能な臨床上簡便かつ有用なバイオマーカーであることから liquid biopsy として注目されている (Science 2010)。その一方で、血液中の ctDNA は微量であるため、詳細な解析が困難であるという問題があった。

デジタル PCR による低頻度の変異の検出

デジタル PCR は、近年開発された PCR 反応を応用した解析方法である。第1世代の定性的解析を行う従来の PCR、第2世代の相対的定量を行うリアルタイム PCR に次ぐ、絶対定量を行うことのできる第3世代の方法として注目されている。従来と同様にプライマーおよびプローブを混ぜた反応液を細かいドロップレット状にすることで約2万個の多数の微小区画に分けた上で PCR 反応を行う。鋳型 DNA の濃度を十分低くし、1分子または0分子含む状態で反応を行うと、ターゲットとなる配列を含むドロップレットのみで増幅反応が起こり蛍光を発するようになる。全ドロップレットの蛍光強度を解析し、ポジティブであったドロップレットの割合を測定することによりターゲットの濃度を絶対的に定量することができる。とくに、低頻度の変異の検出においては、従来のリアルタイム PCR では1%未満のものを検出するのが困難であったが、デジタル PCR では0.001%の変異まで検出することが可能となる。

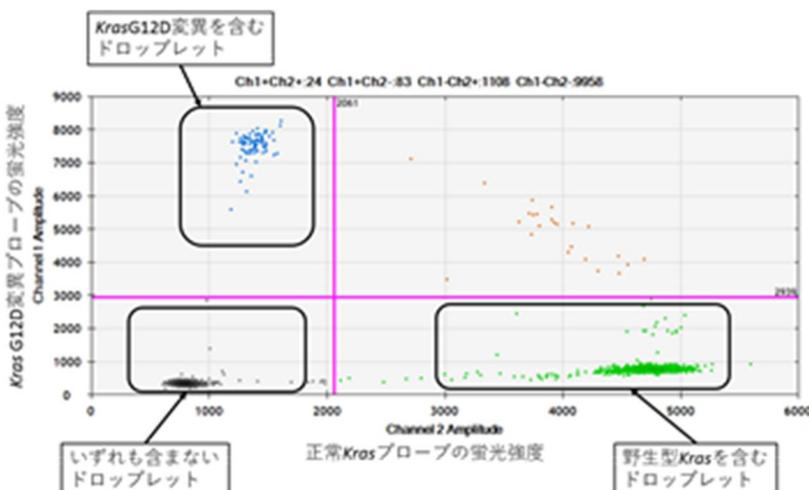


図1. デジタル PCR による解析

2. 研究の目的

頭頸部がん患者の ctDNA を経時的に解析し、病勢や治療効果と比較することによりこれらとの相関を検討し、さらに ctDNA の解析にデジタル PCR を用いることで、より感度と精度の高い詳細な解析を行ない、新たなバイオマーカーを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科を受診し、頭頸部がんと診断され治療を受けた患者を対象とした。同意を得られた患者より治療開始前、治療経過中、治療後や再発時等のタイミングで血液を 10ml ずつ採取し、遠心分離で得られた上清を血漿として -20 で保存した。Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega) を用いて血漿から cell free DNA を抽出した。cell free DNA からの ctDNA の検出はデジタル PCR を用いて行った。DNA サンプルとプライマー、プローブおよび専用バッファーを混ぜた反応液を作成し、ドロップレットジェネレーター (Bio-rad) でドロップレット状にした後、通常の PCR 反応を行い、ドロップレットリーダー (Bio-rad) を用いて個々のドロップレットの蛍光強度の解析を行った。プローブは通常のリアルタイム PCR で用いる Taqman プローブを利用した。

頭頸部がんの中で、まずは血中にウイルス由来 DNA が検出されることが報告されているウイルス関連がんである Epstein-Barr Virus (EBV) 関連上咽頭がんおよび Human Papilloma Virus (HPV) 関連の p16 陽性中咽頭がんを対象とした。EBV 関連上咽頭がんでは EBNA と LMT1 の 2 カ所をターゲットとし、p16 陽性中咽頭がんでは E6 と E7 の 2 カ所をターゲットとした。いずれもターゲット 2 カ所両方で蛍光が検出された場合を陽性と判定した。PPP30 をコントロール遺伝子とし、これを定量することで cell free DNA の量を求め、ctDNA 量の比率を求めた。

4. 研究成果

各プライマー、プローブのセットの有効性確認のため、EBV 関連上咽頭がんの腫瘍組織より DNA を抽出し、これをサンプルとして EBNA, LMT1 のセットでデジタル PCR 解析を行い、いずれのセットでも蛍光が観察されることを確認した。HPV 関連中咽頭がんの E6, E7 のセットについても同様に蛍光が検出されることを確認した。

EBV 関連上咽頭がん症例は 4 例集積された。性別はすべて男性で、平均年齢は 61 歳であった。病期は Stage I/II/III/IV が 0/1/1/2 名であった。治療前の血液中から ctDNA が検出できたのは 3 名 (75%) であった。検出されなかった 1 名は Stage の症例であり、期以上の症例は 3 名とも検出されていた。症例数が限られているために十分な解析を行うことができないが、有望な結果であると考えられる。

p16 陽性中咽頭がん症例は 25 例集積された。性別は男性 22 名、女性 3 名で、平均年齢は 66 歳であった。病期は Stage I/II/III/IV が、頭頸部癌取扱い規約第 5 版では 0/2/2/21 名、第 6 版では 19/1/3/2 名であった。治療前の血液中から ctDNA が検出できたのは 14 名 (56%) であった。T 分類、N 分類、新旧分類の臨床病期、年齢、性別などの臨床因子と ctDNA 検出の有無との有意な相関は認めなかった。

治療前に ctDNA が検出された 14 名では、初回治療として全例で根治的治療が行われ CR となった。初回治療終了後の ctDNA は全例で陰性化が確認された。フォローアップ中に 2 名に再発を認めた。

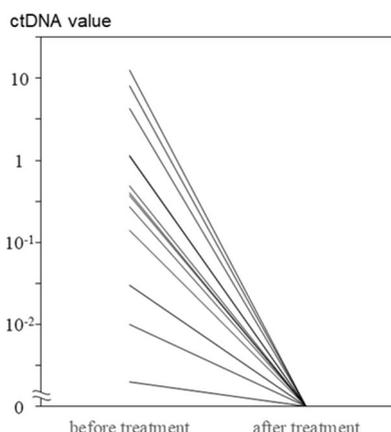


図2 初回治療前後の ctDNA 量

症例 1 は、初回治療として手術を行ったが原発巣に再発を認め、その際に ctDNA が再び

検出された。再発に対して化学放射線治療を行い再び CR となり、ctDNA も再び陰性化した。症例 2 は、初回治療として化学放射線治療を行ったが原発巣再発および遠隔転移を認め、ctDNA が再び検出された。再発に対して免疫チェックポイント阻害剤投与を行ったが病勢は制御できず、ctDNA も陽性のままであった。

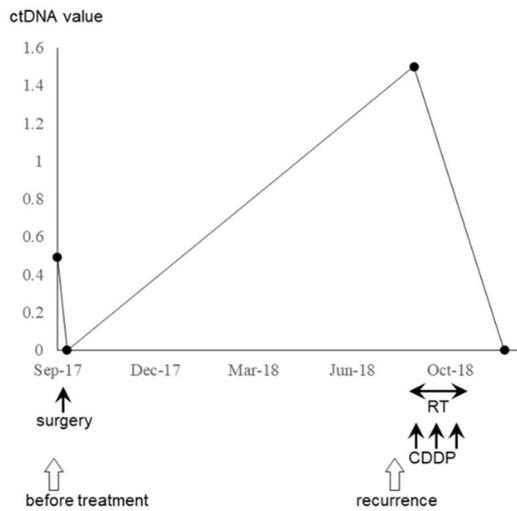


図 3A 治療経過と ctDNA 量 (症例 1)

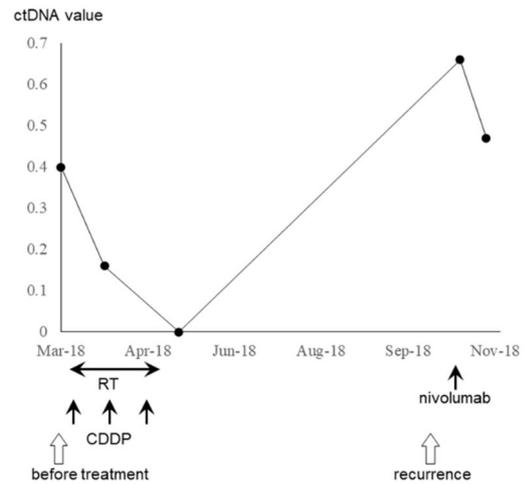


図 3B 治療経過と ctDNA 量 (症例 2)

症例数は限られているものの、臨床経過を反映した ctDNA の変化が観察され、治療効果判定や病勢評価のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。一方で、治療前に ctDNA が検出された割合が 56%にとどまっており、既報と比較しても低い値であり、サンプルの採取や保存方法における課題が確認された。

< 引用文献 >

Akashi K et al. Usefulness of circulating tumor DNA by targeting human papilloma virus-derived sequences as a biomarker in p16-positive oropharyngeal cancer. Sci Rep. 2022 Jan 12;12(1):572.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Akashi Ken, Sakai Toshihiko, Fukuoka Osamu, Saito Yuki, Yoshida Masafumi, Ando Mizuo, Ito Takeshi, Murakami Yoshinori, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Usefulness of circulating tumor DNA by targeting human papilloma virus-derived sequences as a biomarker in p16-positive oropharyngeal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 572
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-04307-3	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 明石健 福岡修 齊藤祐毅 吉田昌史 安藤瑞生 山岨達也
2. 発表標題 HPV関連中咽頭癌症例におけるcirculating tumor DNAの有用性の検討
3. 学会等名 日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken Akashi, Yuki Saito, Mizuo Ando
2. 発表標題 Detection of circulating tumor DNA of HPV-related oropharyngeal cancer using droplet digital polymerase chain reaction
3. 学会等名 癌治療学会
4. 発表年 2018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
研究協力者	山岨 達也 (Yamasoba Tatsuya)	 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	安藤 瑞生 (Ando Mizuo)	 (12601)	
研究協力者	吉田 昌史 (Yoshica Masafumi)	 (12601)	
研究協力者	齊藤 祐毅 (Saito Yuki)	 (12601)	
研究協力者	福岡 修 (Fukuoka Osamu)	 (12601)	
研究協力者	村上 善則 (Murakami Yoshinori)	 (12601)	

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