

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16894

研究課題名（和文）頭頸部癌における循環腫瘍DNAを用いたPrecision Medicineの確立

研究課題名（英文）Establishment of ctDNA monitoring system in HNSCC

研究代表者

古後 龍之介（Kogo, Ryunosuke）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90529885

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）：頭頸部癌26症例をSCC panelで変異解析を行い、同定された腫瘍特異的変異遺伝子をctDNA候補遺伝子と定義し、digital PCRを用いてctDNAモニタリングを行った。最も多く認められた変異はTP53であり、変異遺伝子を同定できなかった2例を除いた24例中15例（62.5%）で認められた。6例はdigital PCRが施行できず、継続的にctDNAモニタリングを施行可能であった残りの18例について解析を行った。7例は初回治療後ctDNAが陽性となり、7例全例再発もしくは腫瘍の残存を認めた。初回治療後ctDNAが陰性を維持している11例に比べて、陽性例は有意に予後不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌には既存の腫瘍マーカーの測定についても有用性が確立されておらず、新規のバイオマーカーの同定が期待されている。ctDNAはバイオマーカーとしての利用が期待されているが、頭頸部癌は変異スペクトラムが広く、特定の単一ctDNAをバイオマーカーとして使用することはできない。本手法によるctDNAモニタリングは頭頸部癌の臨床経過を鋭敏で反映していることがわかった。また、治療後に検出されるctDNAは再発や予後に寄与していることも判明した。今後、変異遺伝子のprimer-probeのライブラリの作成をすすめることでより簡易に安価でctDNAを臨床的バイオマーカーとして利用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Mutation analysis of tumor and normal (PBMC) DNAs of 26 patients with HNSCC was performed using a custom SCC panel. The identified individualized mutated genes were defined as ctDNA candidates. We performed frequent ctDNA monitoring via digital PCR (dPCR). TP53 was the most frequently mutated gene and was detected in 14 of 24 cases (62.5%), wherein 2 cases were excluded owing to the absence of tumor-specific mutations in the SCC panel. Six cases were excluded because of undesignable and unusable primer-probes for dPCR. Longitudinal ctDNA was monitored in a total of 18 cases. In 7 cases, ctDNA tested positive again or did not tested negative, and all 7 cases relapsed after initial treatment. In 11 cases, after initial treatment, ctDNA remained negative and patients were alive without recurrence. Patients who remained negative for ctDNA during follow-up after initial treatment (n = 11) had a significantly better prognosis than those who reverted to ctDNA positivity (n = 7; P < 0.0001).

研究分野：頭頸部外科

キーワード：ctDNA リキッドバイオプシー 頭頸部癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌は全癌の 4-5%と比較的まれな悪性腫瘍であり、腫瘍の部位、発癌の機序も多岐にわたるため、有用なバイオマーカー研究が進んでいない。血液中のいわゆる腫瘍マーカー測定の意味についても「頭頸部癌診療ガイドライン 2018 年版」において、測定の有用性は確立されていないとされている。しかしながら、頭頸部癌診療において、化学放射線療法後の治療効果の評価や再発腫瘍の診断は CT, MRI, PET-CT などの画像モダリティを使用しても、難渋することを多く経験する。循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA) は血液を介して、腫瘍由来の遺伝子を検出する方法であり、微小残存病変の検出に有用であることがいくつかの癌で報告されている。ctDNA のこのような性質を利用して、頭頸部癌の新規バイオマーカーになるかどうかを検討したい。

2. 研究の目的

まず、ctDNA が頭頸部癌患者の血中で検出可能かどうかを検討し、検出可能な ctDNA が治療経過のモニタリングに有用であるか、また再発・転移の有用なバイオマーカーとなるかを検討する。

3. 研究の方法

多くの頭頸部扁平上皮癌は特定のドライバー遺伝子変異はなく、変異スペクトラムも広い。このため、特定の遺伝子変異を ctDNA として血中で検出することは困難である。本研究では、症例ごとに遺伝子変異を同定し、その遺伝子を血中で ctDNA 候補遺伝子として検出することにした。まず、治療開始前・開始時に腫瘍組織と末梢血単核球 (正常組織) を採取し、ペアで変異解析を行った。これにより腫瘍組織特異的な変異遺伝子を同定した。(全エクソン解析による変異解析はコスト、時間ともかかるため、札幌医科大学 フロンティア医学研究所 ゲノム医科学分野との共同研究で同教室が作成した custom SCC panel を使用し、変異解析を行った。)

変異解析結果から、VAF (Variant Allele Frequency) の高い遺伝子を ctDNA 候補遺伝子として設定し、その変異遺伝子に対する野生型・変異型を検出可能な digital PCR 用 primer-probe を作成した。

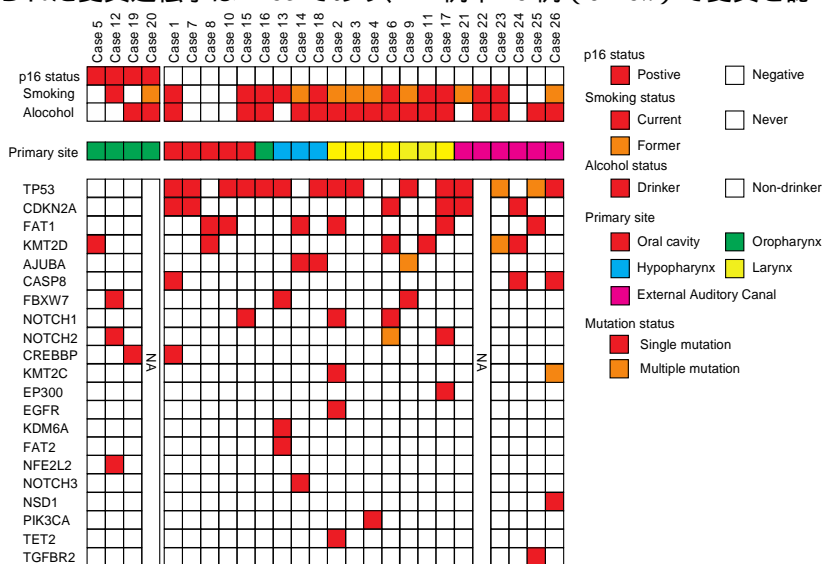
治療前、治療中、治療後、フォロー中の頭頸部癌患者の血液を経時的に採取し、cell free DNA (cfDNA) を抽出した。

作成した変異遺伝子に対する digital PCR 用 primer-probe を用いて、cfDNA 中の ctDNA を検出した。ctDNA の VAF を計算し、臨床経過との比較、予後や臨床病理学的因子との検討を行った。

4. 研究成果

頭頸部癌 26 症例について腫瘍組織、末梢血単核球 (PBMC) DNA から SCC panel を用いて腫瘍特異的な変異遺伝子を同定した (図 1)。26 症例のうち 24 症例で腫瘍特異的な変異遺伝子を同定可能であった。最も多く認められた変異遺伝子は TP53 であり、24 例中 15 例 (62.5%) で変異を認め

た。また、p16 陰性癌に限ると 21 例中 15 例 (71.4%) に変異を認めた (右図)。



腫瘍組織中の VAF の最も高い遺伝子を ctDNA 候補遺伝子とした。TP53 は 11.2%-59.9% と VAF が高い傾向にあった。

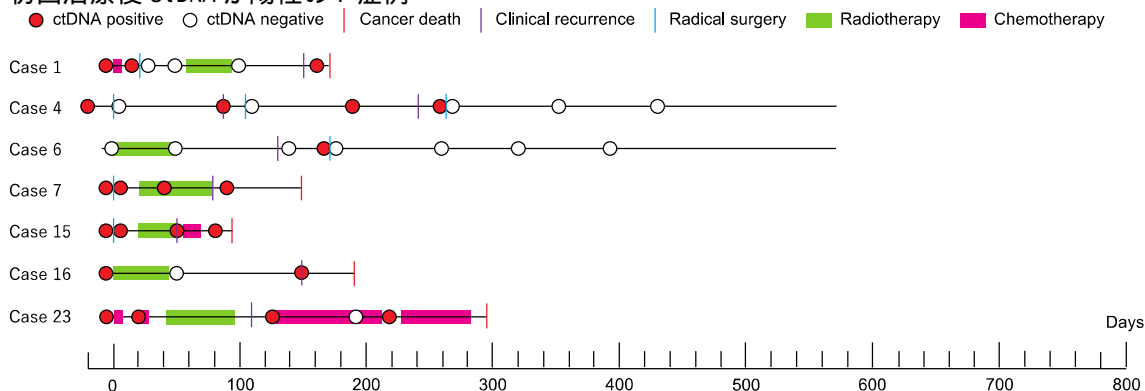
同定された変異遺伝子を検出する ctDNA 用の primer-probe を作成したが、24 症例のうち 6 症例は digital PCR に有用な primer-probe が作成できなかったり、digital PCR がうまくかからなかった。

しかしながら、TP53 の変異については全例 digital PCR を用いた ctDNA 検出が可能であった。

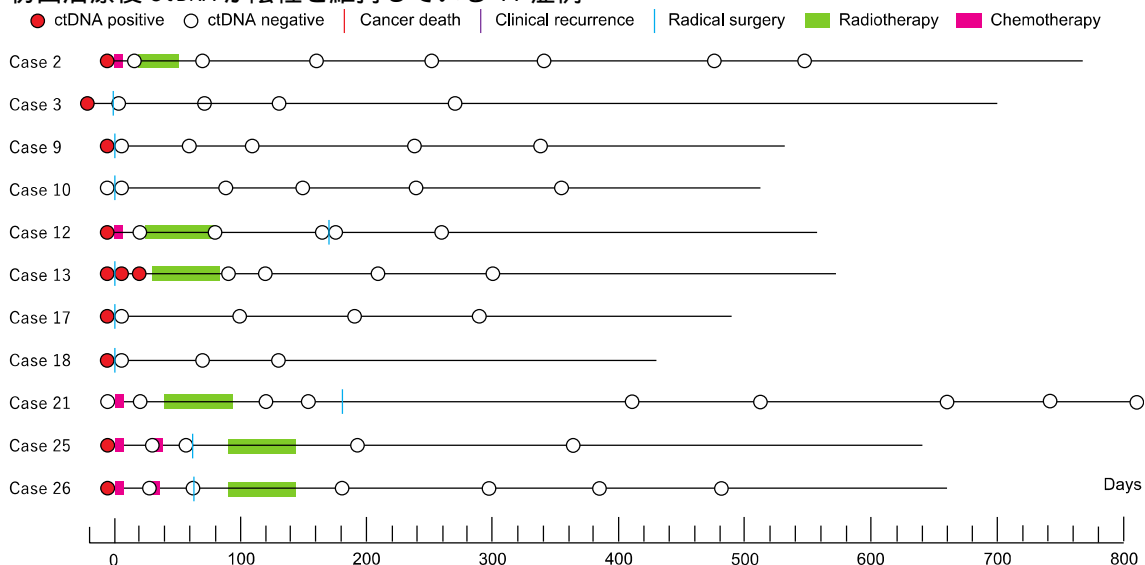
ctDNA を検出可能であった 18 症例について経時的に採取した血漿中の ctDNA を検出するために digital PCR を行った。初回治療後研究期間中に ctDNA が陰性から陽性となった、もしくは ctDNA が陰性化しなかった (陽性のまま維持) 症例を 7 例認め、全例臨床的に腫瘍の残存や再発をきたした。初回治療後研究期間中に ctDNA が陰性を維持している症例は全例臨床的に再発を来

さなかった（下図）。また、ctDNA 陰性を維持している症例（11 例）は ctDNA が陰性化しなかった症例（7 例）に比較し、有意に、無再発生存期間が長かった。（ $P=0.0001$ ，下図）
 症例特異的の変異を検出する digital PCR ベースの ctDNA モニタリングは頭頸部癌の有用な新規バイオマーカーとして期待される。特に p16 陰性の TP53 変異を有する頭頸部癌において本手法は有用な可能性がある。

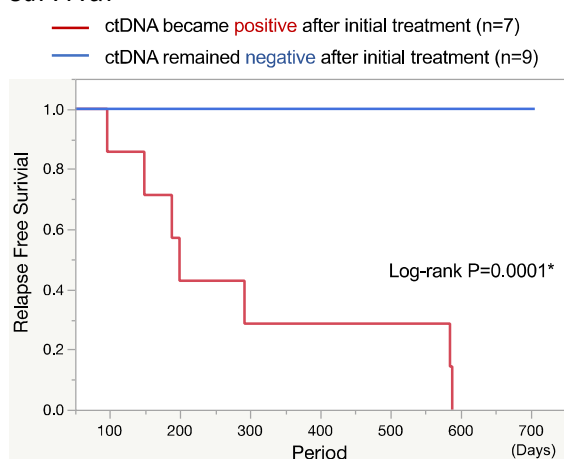
初回治療後 ctDNA が陽性の 7 症例



初回治療後 ctDNA が陰性を維持している 11 症例



初回治療後 ctDNA が陽性となった症例 (n=7) と陰性を維持している症例 (n=11) の relapse free survival



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Komune Noritaka, Sato Kuniaki, Hongo Takahiro, Miyazaki Masaru, Masuda Shogo, Koike Kensuke, Uchi Ryutaro, Tsuchihashi Nana Akagi, Noda Teppei, Kogo Ryunosuke, Wakasaki Takahiro, Yasumatsu Ryuji, Nakagawa Takashi	4. 巻 131
2. 論文標題 Prognostic Significance of Systemic Inflammatory Response in Cases of Temporal Bone Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 1782 ~ 1789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.29421	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 Komune Noritaka, Miyazaki Masaru, Sato Kuniaki, Sagiyama Koji, Hiwatashi Akio, Hongo Takahiro, Koike Kensuke, Noda Teppei, Uchi Ryutaro, Kogo Ryunosuke, Akagi Tsuchihashi Nana, Masuda Shogo, Nakagawa Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Prognostic Impact of Tumor Extension in Patients With Advanced Temporal Bone Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 1229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.01229	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 Sato Kuniaki, Komune Noritaka, Hongo Takahiro, Koike Kensuke, Niida Atsushi, Uchi Ryutaro, Noda Teppei, Kogo Ryunosuke, Matsumoto Nozomu, Yamamoto Hidetaka, Masuda Muneyuki, Oda Yoshinao, Mimori Koshi, Nakagawa Takashi	4. 巻 111
2. 論文標題 Genetic landscape of external auditory canal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3010 ~ 3019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14515	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古後 龍之介, 岩谷 岳, 佐々木 泰史, 時野 隆至, 安松 隆治, 中川 尚志
2. 発表標題 臨床応用を目指したdigital PCRを用いた 頭頸部癌ctDNAモニタリング
3. 学会等名 第5回 Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古後龍之介, 真子知美, 安松隆治, 中川尚志
2. 発表標題 頭頸部癌における症例特異的の変異遺伝子を用いた ctDNAモニタリング
3. 学会等名 第45回 日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryunosuke Kogo, Tomomi Manako, Takeshi Iwaya, Satoshi Nishizuka, Yasushi Sasaki, Masashi Idogawa, Takashi Tokino, Takashi Nakagawa
2. 発表標題 ctDNA monitoring in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma using case specific mutation
3. 学会等名 第80回 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryunosuke Kogo
2. 発表標題 Circulating tumor DNA monitoring in head and neck squamous cell cancer patients using digital PCR
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古後龍之介
2. 発表標題 臨床応用を目指したdigital PCRを用いた 頭頸部癌ctDNAモニタリング
3. 学会等名 第5回 Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古後龍之介
2. 発表標題 circulating tumor DNA(ctDNA)を用いた頭頸部癌モニタリング
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古後龍之介
2. 発表標題 ctDNA monitoring in head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------