

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17239

研究課題名(和文)Liquid biopsyは口腔扁平上皮癌で有効か？[NOTCH1に注目して]

研究課題名(英文)Is Liquid biopsy useful in oral squamous cell carcinoma? [Focusing on NOTCH1].

研究代表者

内堀 雅博(Masahiro, Uchibori)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50749273

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): 口腔扁平上皮癌(OSCC)における無細胞DNA(cfDNA)濃度の変化と予後の関連性の解析、腫瘍組織のDNAとcfDNAの遺伝子変異解析を行った。10人の術前と術後1ヶ月、その後3ヶ月ごとのcfDNA濃度変化と予後の関連性を解析した。遺伝子変異解析は、34症例の腫瘍組織のDNAに対して行った。変異がある症例は、cfDNAの解析も行った。予後良好例は術前と術後のcfDNA濃度はほとんど変化しないが、予後不良例は死亡する約2～3ヶ月前からその濃度が急激に上昇した。遺伝子変異解析では、腫瘍組織のDNAに変異を認めた症例は、全ての症例でcfDNAにおいても0.06～1.49%で同じ変異を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でcfDNAは原発巣の遺伝子変異を反映しており、cfDNAの濃度変化と予後の関連性はさらなる解析が必要だが、死期の予測は可能である可能性が示唆された。cfDNAを解析する前提として腫瘍のDNAを反映している必要があるが、これらの解析を行っているOSCCの研究は少ないため、今後のOSCCにおけるcfDNA研究の参考となる。また、死期を知ることができるとそれに向けた準備をすることができる。これを予測することができると思患者本人や家族にとって有意義な効果をもたらすと考える。さらなる解析が必要であるが、この精度を高めることは社会的な意義が十分にあると考える。

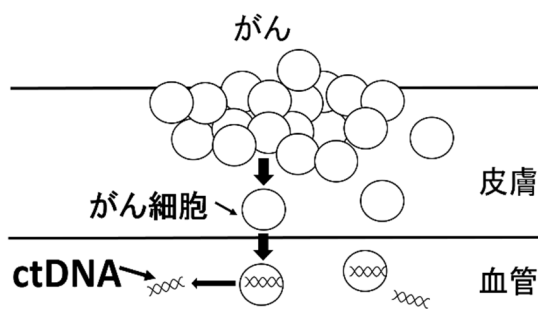
研究成果の概要(英文): We analyzed the association between changes in cfDNA concentration with time and the prognosis of patients with OSCC, and genetic mutation analysis of tumor tissue DNA and cfDNA too. We collected cfDNA from 10 patients preoperatively, one month postoperatively, and every three months thereafter to analyze the association between changes in cfDNA concentration and patient prognosis. We analyzed genetic mutation with tumor tissues collected from 34 patients. An additional analysis was then performed to detect genetic mutations in cfDNA for patients with genetic mutations in tissue DNA. Pre- and postoperative cfDNA concentrations in patients with a good prognosis showed almost no change. However, a rapid increase in cfDNA concentrations was observed approximately 2–3 months before death in patients with a poor prognosis. In a genetic mutation analysis, the patients whose tumor tissue DNA showed genetic mutations had the same mutations detected in cfDNA, at a rate of 0.06 to 1.49%.

研究分野：口腔がん

キーワード：Liquid biopsy cfDNA 口腔がん OSCC NOTCH1 再発転移

1. 研究開始当初の背景

口腔がんの約 9 割が扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma : SCC) であり、本邦では全がんの約 1% とされている。口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma : OSCC) の標準治療は、National Comprehensive Cancer Network (NCCN) のガイドラインにおいては根治的切除が第一選択であり、術後補助療法として化学、放射線療法を行うことがあるが、治療の選択の幅は狭く、特定のマーカーが存在しない。また、術後機能障害が大きいことから、テーラーメイド治療の実現が待たれている。近年、欧米人の頭頸部扁平上皮癌で大規模な遺



伝子変異解析が行われ、NOTCH1 に 13.5%、NOTCH2、3 に 5.4% と高頻度の変異を認め、これらの変異はリガンド結合領域に集中していると報告された (Stransky ら Science 2011)。NOTCH は相対性の高い 4 つのサブタイプ (NOTCH1 ~ 4) を持つ膜一回貫通型の細胞膜受容体であり、細胞外ドメインを構成する Epidermal growth factor like repeat (EGF-like repeat) の 10、11 および 12 がリガンド結合領域とされる。リガンドである JAG あるいは DLL ファミリーが結合すると、図で示すように、経路が活性化される。今までに申請者らは、邦人 OSCC 由来の臨床標本に対し NOTCH1 リガンド結合領域に注目して解析を行ってきた。NOTCH1 リガンド結合領域に 9.5% (8/84) の症例で新規変異を発見し、NOTCH1 の変異が認められた患者群は、有意に予後が良好であった。さらに、リガンド結合部に発見した A465T 変異について立体構造をシミュレーションしたところ、何らかの機能的な変化が生じる可能性が示唆された。(Aoyama ら BBRC 2014)。そこで自身の手により A465T 変異を導入した NOTCH1 安定発現細胞を樹立し、機能解析を行ったところ、腫瘍原性が低下する可能性が示唆された (Uchibori ら Oncol Rep 2017)。また、OSCC 臨床標本における NOTCH1 のエクソン解析を行ったところ、リガンド結合領域に変異が集中しており (日本癌学会 2017 年発表)、OSCC において、NOTCH1 のリガンド結合領域の変異は予後予測因子の候補となる可能性があると考えている。臨床上的問題点は、OSCC の皮弁再建術後に解剖学的形態が大きく変化し、切除断端に対する診察、組織生検が難しいということである。そこで、申請者らは液体生検 (liquid biopsy) に注目している。通常、血液中には無細胞 DNA (cell free DNA : cfDNA) が存在し、悪性腫瘍に罹患している患者の血液には腫瘍細胞由来の血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA : ctDNA) が cfDNA 中に含まれていることが知られている (図)。cfDNA は子宮頸癌、大腸癌などさまざまな領域で有用な検査になり得るとして注目されている (Alix-Panabieres ら Annu Rev Med 2012)。

2. 研究の目的

OSCC において血液を用いた Liquid biopsy を確立することである。cfDNA を回収し、量を測定するとともに配列を解析する。また、今までの申請者の研究結果より、OSCC における NOTCH1 リガンド結合領域は OSCC 病態解明の上で重要な因子であると考えられるため、cfDNA、癌組織の NOTCH1 リガンド結合領域の変異の有無と臨床病態を照合させ、その意義を検討する。

3. 研究の方法

NOTCH1 の分子的な解析は終了しているため、cfDNA の解析を主に行った。

(1) サンプル

2018 年から 2021 年に東海大学口腔外科を受診した 34 人の OSCC 患者より術前に 20ml の血液を採取し、その血漿より cfDNA を回収した。血液サンプルは cfDNA-BCT (Streck 社) を使い、cfDNA は QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Catalog #55114) で抽出した。また、その中の 10 人については、術前、術後 1 ヶ月、その後 3 ヶ月ごとに術後 2 年まで定期的に cfDNA を回収した。

(2) 腫瘍 DNA と cfDNA の遺伝子変異解析

腫瘍 DNA に対し、口腔癌のドライバー遺伝子を含めた 76 の遺伝子を用いてカスタムパネルを作成し、これを用いて次世代シーケンサー (NGS) でターゲットシーケンスを行った。腫瘍 DNA に遺伝子変異を認めた症例については、同患者の cfDNA においても NGS とデジタル PCR (ddPCR) による遺伝子変異解析を行った。

4. 研究成果

われわれが以前解析した健常人の cfDNA 濃度は 4.9 ng/mL (3.2-6.6 ng/mL) であり、本研究で解析した OSCC 患者の平均 cfDNA 濃度は 12.1 ng/mL (5.1-23.9 ng/mL) であった。OSCC 患者は他

の癌研究と同様に cfDNA 濃度が健常人よりも有意に高かった。cfDNA 濃度の経時的な解析では、術後に術前よりも cfDNA 濃度が高かった患者は再発を認め、cfDNA 濃度の変化は再発や転移の予測ができる可能性が示唆された(図)

また、予後良好例は術前と術後の cfDNA 濃度はほとんど変化しないが、予後不良例は死亡する約2~3ヶ月前からその濃度が急激に上昇した。遺伝子変異解析において、腫瘍組織の DNA に変異を認めた症例は、全ての症例で cfDNA においても 0.06~1.49% で同じ変異を検出した。さらに、組織 DNA に認めた遺伝子変異を検出する方法として NGS と ddPCR のどちらが有用であるか

解析、検討した。全ての遺伝子変異について ddPCR のプローブを作成したが、TP53、NSD1、NOTCH1 の特定の遺伝子変異を検出するプローブのみ解析が可能であった。また、これら 3 変異について cfDNA の解析を行ったが、TP53 のみ検出することができた。ddPCR は使用する DNA 量を増やさないといけない可能性があり、現時点では NGS の方が有用と考える。

本研究で、cfDNA は原発巣の遺伝子変異を反映しており、cfDNA の濃度変化で、再発や転移を予測するためにはさらなる解析が必要だが、死期の予測は可能である可能性が示唆された。

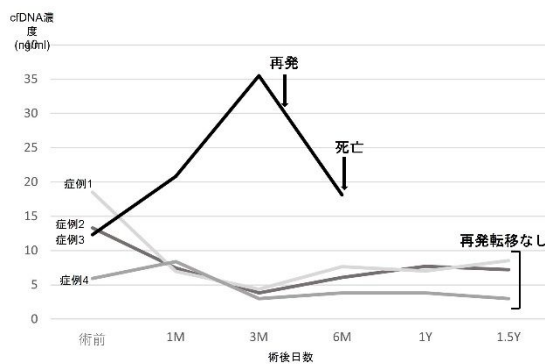


図 : cfDNA 濃度変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内堀雅博、細道一善、田嶋敦、太田嘉英、木村穰
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌患者におけるcfDNAは 原発巣を反映しているか？
3. 学会等名 2021年日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内堀雅博
2. 発表標題 口腔癌におけるLiquid biopsyへの現状と期待
3. 学会等名 メルクバイオファーマ株式会社 神奈川県口腔癌セミナー （招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内堀雅博
2. 発表標題 口腔癌におけるLiquid biopsyへの現状と期待
3. 学会等名 日本口腔腫瘍学会 シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内堀雅博
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌とcell free DNAの関係性について
3. 学会等名 日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内堀雅博
2. 発表標題 Analyzing of usefulness of Liquid biopsy in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2022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