

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18728

研究課題名(和文)メンブレンパッチ法による術中の分子生物学的迅速解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a rapid intraoperative molecular analysis using the membrane patch method.

研究代表者

山口 裕貴 (Yamaguchi, Yuki)

浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：60837821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：初年度は、メンブレンパッチ法による舌癌症例のDNA採取を3症例に行った。DNA量は、腫瘍側が平均1.91ug/ml、正常側が平均1.19ug/mlであった。次年度は、メンブレンパッチ法に改良してサイトブラシ法を導入した。中咽頭癌、舌癌症例のDNA採取を8症例に行った。メンブレンパッチ法と変わらないDNA収量を得ることができた。最終年度は、このDNAをバイサルファイト処理し、E-cadherin, GALR1, TAC1, COL1A2 のメチル化の状態をQ-MSP法にて評価した。最終的には、術中病理検査と同様の時間内でサイトブラシ法による迅速分子生物学的解析は可能であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除後の迅速病理で断端に癌の残存を認めないにもかかわらず局所再発する、すなわち、顕微鏡的に確認できない癌や異形成の存在が疑われ、分子生物学的手法による切除断端、深部断端の癌残存有無の評価が必要である。

本申請は中咽頭癌、舌癌症例の切除後の深部断端における残存癌組織の有無を病理学的手法のみに頼らず、『メンブレンパッチ法』によるDNA採取と『サイトブラシ法』によるDNA採取を比較し、術中短時間HPV解析とDNAメチル化解析の実現を施行し、分子生物学的迅速解析法の確立のための基礎でデータ蓄積を行い、臨床へのリアルタイムな還元の可能性を証明した。

研究成果の概要(英文)：In the first year, DNA was collected in three cases of tongue cancer using the membrane patch method; the average amount of DNA was 1.91 ug/ml on the tumor side and 1.19 ug/ml on the normal side. In the next year, the cytobrush method was introduced as an improvement to the membrane patch method. DNA was collected in 8 cases of oropharyngeal and tongue cancer cases. We were able to obtain DNA that were not different from the membrane patch method. In the final year, bisulfite treated DNA was analyzed the methylation status of E-cadherin, GALR1, TAC1, and COL1A2 was evaluated by Q-MSP method. Finally, we found that rapid molecular biological analysis by the cytobrush method was feasible within the same time frame as intraoperative pathology.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：メンブレンパッチ法 リキッドバイオプシー エピジェネティクス解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は比較的進行した状態で初めて診断されることが多く、1/3以上が stage IV であるという報告が多い。特に舌癌を含む口腔癌は罹患者が多く、治療方法として手術による完全切除が治療の目標となる。しかしながら切除検体断端に明らかな癌を認めず、完全切除できたと思われた症例でも切除部位の再発を多く認めるのが現状であり、そのことが口腔癌の治療成績向上を妨げている。

術中の迅速組織診断による切除断端の評価、切除後の永久標本における断端の評価では完全切除の有無の保証ができない状況であり、これら従来の顕微鏡的所見の評価だけではなく、分子生物学的手法での完全切除の有無を評価する手法が必要である。切除後の粘膜断端は局所再発した場合に肉眼的に観察しやすい部位だが、深部断端に局所再発した場合は肉眼的に観察困難であるため、特に切除後の深部断端における癌細胞残存の有無の評価は非常に重要である。しかしながら深部断端は通常粘膜ではなく筋組織や結合織であることが多く、さらに平面的であり比較的広範囲となるため、現状での顕微鏡的な手法での癌残存の有無の評価は術中では困難かつ不十分となっている。

近年、頭頸部癌特異的なメチル化により発癌をきたす遺伝子が多く報告されてきており、患者唾液、血漿から採取したリキッドバイオプシーからの遺伝子 DNA メチル化を検出することで早期発見を試みる報告や、切除後の断端組織における DNA メチル化が局所再発の予測因子となる可能性が報告されている。以上より申請者は正確な術後の深部断端の細胞採取とその DNA のメチル化を評価することで正確な癌の残存の有無、深部断端の評価ができると考えている。

2. 研究の目的

本研究は、口腔癌、咽頭癌の切除後の深部断端における残存癌組織の有無を、分子生物学的手法を用いることで従来と比べてより正確に診断する方法を確立し、さらにそれを術中に迅速に行うことを目的としている。

口腔癌、咽頭癌切除後の深部断端の細胞を万遍なく採取するために、ニトロセルロースメンブレンを用いて深部断端細胞を採取するメンブレンパッチ法と子宮頸部の細胞診で使われるサイトブラシを用いて採取するサイトブラシ法を比較する。本研究では切除部より直接採取するため、より正確に切除断端部の細胞を採取できると考えておりメンブレンパッチ法とサイトブラシ法を使用するという点でもユニークである。

口腔癌、咽頭癌切除後、病理学的に癌細胞なしとされた深部断端から採取された DNA のメチル化の有無を評価することで、今後の局所再発の予測ができると考えている。口腔癌、咽頭癌術後の深部断端に特化した報告は、今現在ないため最初の報告を目指す。また、短時間(約 150 分)で DNA メチル化を評価する方法については報告されているが、実際に術中に評価した報告はなく、手技の確実化を目指し改良していく。

3. 研究の方法

口腔癌および正常組織においてメンブレンパッチ法ならびにサイトブラシ法による細胞採取および DNA 抽出を行い十分な細胞と DNA が採取可能であることをすでに確認した。

術中メンブレンパッチ法は、口腔癌患者の切除後病変部に ウェスタンブロットで使う Amersham Western Blotting メンブレン (GE ヘルスケアジャパン) を 10 秒以上接着させて細胞を採取、その後 1%SDS-PK 溶液内に保存し攪拌後に細胞を回収する。

術中サイトブラシ法は、産婦人科の子宮頸部で使用されている細胞診用のブラシ EndoCervex-Brush® (Rovers) を使用した。術中創部にブラッシングによる細胞採取を行い、PBS 溶液に入れ攪拌し細胞を回収した。

メンブレンパッチ法、サイトブラシ法、それぞれカネカ簡易 DNA 抽出キット Version 2 にて DNA を抽出し十分な濃度の DNA が採取できることを確認した。

術前の組織生検からの DNA から E-cadherin, GALR1, TAC1, COL1A2 のメチル化解析を手術前日までに行う。手術当日、メンブレンパッチ法ならびにサイトブラシ法による DNA 抽出そしてメチル化解析の精度を上げることができると考え実施した。

採取面の残存面は、腫瘍摘出後の残存舌、残存中咽頭、残存頬粘膜面である。

バイサルファイト法は、DNA メチル化解析を行うために、DNA をバイサルファイト処理しシトシンをチミンに変換し、メチル化シトシンは変換されずシトシンのままにすることで、その違いを検出しメチル化度を評価する方法で必要な処理となる。今回、短時間(約 150 分)で DNA メチル化を評価するために、高速キットである Fast Bisulfite Conversion Kit Epigenetic Kits (Abcam) を使用した。

4. 研究成果

1) 術前腫瘍組織生検からの DNA から E-cadherin, GALR1, TAC1, COL1A2 のメチル化解析 (図 1)

| 症例 | TAC1 | CDH1 | COL1A2 | GALR1 | 原発部 | T分類 | 転機再発 |
|------|------|------|--------|-------|-----|-----|------|
| MP-1 | | | | | 舌 | 1 | なし |
| MP-2 | | | | | 舌 | 3 | なし |
| MP-3 | | | | | 舌 | 4a | なし |
| CB-1 | | | | | 中咽頭 | 2 | なし |
| CB-2 | | | | | 舌 | 3 | なし |
| CB-3 | | | | | 舌 | 4a | なし |
| CB-4 | | | | | 頬粘膜 | 4a | あり |
| CB-5 | | | | | 舌 | 1 | なし |
| CB-6 | | | | | 舌 | 4a | あり |

| | |
|--|-------|
| | 高メチル化 |
| | 中メチル化 |
| | 低メチル化 |

2) 術中メンブレンパッチ法による E-cadherin, GALR1, TAC1, COL1A2 のメチル化解析 (図 2)

| 症例 | 採取面 | TAC1 | CDH1 | COL1A2 | GALR1 | 原発部 | T分類 | 転機再発 |
|------|-----|------|------|--------|-------|-----|-----|------|
| MP-1 | 残存面 | | | | | 舌 | 1 | なし |
| | 腫瘍面 | | | | | | | |
| MP-2 | 残存面 | | | | | 舌 | 3 | なし |
| | 腫瘍面 | | | | | | | |
| MP-3 | 残存面 | | | | | 舌 | 4a | なし |
| | 腫瘍面 | | | | | | | |

| | |
|--|-------|
| | 高メチル化 |
| | 中メチル化 |
| | 低メチル化 |

3) 術中サイトブラシ法による E-cadherin, GALR1, TAC1, COL1A2 のメチル化解析 (図 3)

| 症例 | 採取面 | TAC1 | CDH1 | COL1A2 | GALR1 | 原発部 | T分類 | 転機再発 |
|------|-----|------|------|--------|-------|-----|-----|------|
| CB-1 | 残存面 | | | | | 中咽頭 | 2 | なし |
| | 腫瘍面 | | | | | | | |
| CB-2 | 残存面 | | | | | 舌 | 3 | なし |
| | 腫瘍面 | | | | | | | |
| CB-3 | 残存面 | | | | | 舌 | 4a | なし |
| | 腫瘍面 | | | | | | | |
| CB-4 | 残存面 | | | | | 頬粘膜 | 4a | あり |
| | 腫瘍面 | | | | | | | |
| CB-5 | 残存面 | | | | | 舌 | 1 | なし |
| | 腫瘍面 | | | | | | | |
| CB-6 | 残存面 | | | | | 舌 | 4a | あり |
| | 腫瘍面 | | | | | | | |

| | |
|--|-------|
| | 高メチル化 |
| | 中メチル化 |
| | 低メチル化 |

4) まとめ

本研究では、組織生検とメンブレンパッチ法、サイトブラシ法によって採取した細胞からのDNA抽出を行い、E-cadherin, GALR1, TAC1, COL1A2のメチル化解析を行った。9症例のうち、2症例に術後の再発を認めた。症例CB-4は局所再発、症例CB-6は後発頸部リンパ節転移を認めている。メンブレンパッチ法は、残存面、腫瘍面のメチル化度が一致する症例が多かった。これは、採取時の腫瘍面からのコンタミが原因になっている可能性があった。サイトブラシ法に変更後は、コンタミを防止できている。局所再発を認めた症例CB-4は、残存面から2遺伝子のメチル化を認めた。今後、長期の経過観察によって再発の予測の精度について評価を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Misawa K, Mima M, Yamada S, Imai A, Mochizuki D, Ishikawa R, Kita J, Yamaguchi Y, Endo S, Misawa Y and Mineta H | 4. 巻 18(1) |
| 2. 論文標題 Prostanoid receptor genes confer poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma via epigenetic inactivation. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Translational Medicine | 6. 最初と最後の頁 31 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12967-020-02214-1 | 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, Yamada S, Misawa Y, Imai A, Mochizuki D, Nakagawa T, Kurokawa T, Oguro M, Ishikawa R, Yamaguchi Y, Endo S, Kawasaki H, Kanazawa Takeharu and Mineta H | 4. 巻 10(1) |
| 2. 論文標題 Neuropeptide receptor genes GHSR and NMUR1 are candidate epigenetic biomarkers and predictors for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1007 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-57920-z | 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, Imai A, Kanazawa T, Mima M, Yamada S, Misawa Y, Mochizuki D, Yamada T, Shinmura D, Ishikawa R, Kita J, Yamaguchi Y, Misawa Y and Mineta H | 4. 巻 8(10) |
| 2. 論文標題 G protein-coupled receptor genes, PTGDR1, PTGDR2, and PTGIR, are candidate epigenetic biomarkers and predictors for treated patients with HPV-associated oropharyngeal cancer. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Microorganisms | 6. 最初と最後の頁 1504 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8101504 | 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 山口 裕貴, 細川 誠二, 喜多 淳哉, 望月 大極, 今井 篤志, 瀧澤 義徳, 三澤 清, 峯田 周幸 | 4. 巻 156 |
| 2. 論文標題 頭頸部領域に発生したspindle cell carcinomaの8例 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 耳鼻咽喉科臨床 補刷 | 6. 最初と最後の頁 61-65 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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, Yamada S, Mima M, Nakagawa T, Kurokawa T, Imai A, Mochizuki D, Shinmura D, Yamada T, Kita J, Ishikawa R, Yamaguchi Y, Misawa Y, Kanazawa T, Kawasaki H and Mineta H | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation has novel prognostic value and potential utility in liquid biopsy for oral cavity cancer. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biomarker Research | 6. 最初と最後の頁 53 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40364-020-00235-y | 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, Yamada S, Imai A, Mochizuki D, Ishikawa R, Kita J, Yamaguchi Y, Endo S, Misawa Y and Mineta H | 4. 巻 18(1) |
| 2. 論文標題 Prostanoid receptor genes confer poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma via epigenetic inactivation. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Translational Medicine | 6. 最初と最後の頁 31 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12967-020-02214-1 | 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, Yamada S, Misawa Y, Imai A, Mochizuki D, Nakagawa T, Kurokawa T, Oguro M, Ishikawa R, Yamaguchi Y, Endo S, Kawasaki H, Kanazawa Takeharu and Mineta H | 4. 巻 10(1) |
| 2. 論文標題 Neuropeptide receptor genes GHSR and NMUR1 are candidate epigenetic biomarkers and predictors for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1007 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57920-z | 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|