

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18794

研究課題名(和文) 頭頸部癌における循環癌細胞のheterogeneityとその臨床意義の解析

研究課題名(英文) Analysis of heterogeneity clinical significance of circulating cancer cells in head and neck cancer and its clinical significance

研究代表者

井田 翔太 (IDA, SHOTA)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00814211

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)：循環癌細胞の解析は、新しい癌の診断・評価法であるliquid biopsyの観点から注目を集めている。今回、頭頸部扁平上皮癌の循環癌細胞の生物学的特徴・意義や臨床因子との関連についてHPV(ヒトパピローマウイルス)関連癌・非関連癌の観点から比較を行った。HPV関連癌と非関連癌の間には、循環癌細胞における遺伝子発現(上皮間葉系移行や免疫チェックポイント関連の分子)等の分子生物学的性質に一部差があることが明らかになった。またCTCsにおける一部の遺伝子発現レベルと予後の間に関連を認め、予後予測のバイオマーカーになりう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

現在、癌の直接的な診断は組織生検による検査が最も重要とされるが、組織生検は観血的処置であり、患者さんへの侵襲は大きい。liquid biopsyは通常の血液検査と同様の手順で行うことができるため低侵襲であり、血液中の循環癌細胞を解析し癌の性質や予後を予測できることは今後の癌治療において大きな恩恵をもたらすと考えられる。今回の頭頸部扁平上皮癌における循環癌細胞の解析でも、HPV関連癌・非関連癌の間で分子生物学的性質の違いや予後との関わりが明らかになり、今後の実臨床での検査への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Circulating cancer cells are attracting attention as a new method for diagnosing and evaluating cancer, liquid biopsy.

This time, we compared the biological characteristics and significance of circulating cancer cells of squamous cell carcinoma of the head and neck cancer and their relationship with clinical factors from the viewpoint of HPV (human papillomavirus) -related cancer and non-related cancer. There were differences in molecular phenotypes such as gene expression (molecules related to epithelial mesenchymal transition and immune checkpoint) in circulating cancer cells between HPV-related cancers and non-HPV-related cancers. We also found an association between the prognosis and the expression level of some genes in CTCs, suggesting that it may be a biomarker for predicting prognosis.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学、腫瘍免疫学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 循環癌細胞 HPV CTC

1. 研究開始当初の背景

現在、癌の直接的な診断は組織生検による検査が最も重要とされるが、組織生検は観血的処置であり、患者さんへの侵襲は大きい。liquid biopsy は通常の血液検査と同様の手順で行うことができるため低侵襲であり、血液中の循環癌細胞を解析し癌の性質や予後を予測できることは今後の癌治療において大きな恩恵をもたらすと考えられる。

現在までに、当研究室では頭頸部扁平上皮癌における循環癌細胞(circulating cancer cells : CTCs)の検出、また分子生物学的特徴の解析を行い、liquid biopsy としての有用性を検討してきた。今回の研究では、新たに頭頸部扁平上皮癌の中でもヒトパピローマウイルス感染により発癌を惹起された Human papillomavirus(HPV)関連癌に注目した。HPV 関連癌は HPV 非関連癌と比較し、治療に対する反応性が良好で予後が良い / 比較的早期の T stage でもリンパ節転移を有する症例が多いなど、臨床的・生物学的な性格が異なることが知られており、現行の TNM 分類に置いて異なる分類法となっている。そこで、HPV 関連癌-非関連癌の間における CTCs の分子生物学的特徴の違いについて検討することを思いついた。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌の中で、HPV 関連癌-非関連癌における CTCs の分子生物学的特徴と HPV status 間における違い明らかにし、頭頸部扁平上皮癌における予後予測のバイオマーカーの可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血液サンプル採取

当院で治療を行った頭頸部扁平上皮癌 73 例から血液サンプルを取得した。症例の内訳を Table1. に示す。全 73 例のうち、HPV status の内訳は HPV 陰性が 38 例(52%)、HPV 陽性が 35 例 (48%)であった。

(2) CTCs の分離

取得した血液サンプルから、密度勾配遠心法を用いて末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells (PBMCs))分画を分離、red blood cell lysis buffer を用いて混入した赤血球を除去した後、CD45 negative selection 法を用いて CTCs 分画を分離した。

(3)CTCs の遺伝子解析

分離した CTCs から mRNA 抽出、cDNA 合成の過程を経て、real time PCR(以後、PCR)を用いて gene expression analysis を行った。標的遺伝子として、まずは 3 つの上皮系マーカー (*EPCAM*, *EGFR*, *MET*)の遺伝子発現を解析し、3 つのうち 1 つ以上のマーカーが陽性となった症例を CTC 陽性と判定した。その後、CTC 陽性例のサンプルを用いて 7 つの上皮間葉系転換関連遺伝子(*VIM*, *CDH1*, *CDH2*, *SNAI1*, *TWIST1*, *ZEB1*, *ZEB2*)、及び 2 つの免疫チェックポイント関連分子遺伝子(*CD274*, *PDCD1LG2*)についての解析を行った。

(4)CTCs の遺伝子発現と予後データの比較

電子カルテから後方視的に集めた予後情報を元に、CTCs における各遺伝子発現レベルと予後データとの関連について検討した。

4. 研究成果

(1)CTCs の同定、HPV status 間における上皮系マーカーの比較

各サンプルにおける上皮系マーカー遺伝子発現陽性および CTCs 陽性を示したヒートマップを示す(Figure 1.)。全 73 例のうち、43 例(58.9%)において CTCs が陽性であった。各 HPV status における CTCs 陽性の割合は HPV 陰性例で 26 / 38 例(68.4%)、HPV 陽性例で 17 / 35 例(48.6%)であった。

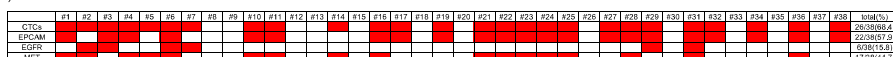
また、各上皮系マーカーの発現と HPV status の関連を比較すると(Table 2.)、HPV 陽性例では陰性例に比べて *EPCAM*, *MET* の陽性率が有意に低いことが分かった。

Table 1. Characteristics of 73 patients with HNSCC

	No. (%)
Age, years	
Median	68
Range	41-89
Gender	
Male	66 (90)
Female	7 (10)
HPV status	
Negative	38 (52)
Positive	35 (48)
Primary lesion	
Hypopharynx	15(21)
Larynx	15(21)
Oral cavity	3(4)
Oropharynx	40(55)
T factor	
T1-2	35 (48)
T3-4	38 (52)
N factor	
Negative	20 (27)
Positive	53 (73)
M factor	
Negative	67 (92)
Positive	6 (8)
TNM stage	
I-II	34 (47)
III-IV	39 (53)

HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma, HPV, human papillomavirus; TNM, tumor-node-metastasis.

(a)



(b)

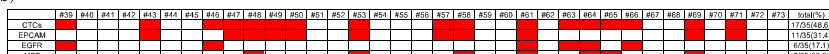


Figure 1.

(a) HPV 陰性例

(b) HPV 陽性例

赤色が各因子の陽性を示す

Table 2. Relationship between the expression of epithelial-related genes and HPV status in 73 patients with HNSCC

	HPV status		p-value
	Negative (n=38)	Positive (n=35)	
EPCAM			
Negative	17	24	0.03
Positive	22	11	
EGFR			
Negative	32	29	0.88
Positive	6	6	
MET			
Negative	21	28	0.02
Positive	17	7	

HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma, HPV, human papillomavirus.

(2) CTCs における gene expression analysis

CTCs 陽性例のサンプルを用いて、更に CTCs における各遺伝子発現レベルを解析し、HPV status 間で比較を行った(Figure 2.)。各遺伝子のうち、CDH1、SNAI1、ZEB2 の発現は HPV 陽性例の CTCs で有意に高く、また PDCD1LG2 の発現は HPV 陰性例の CTCs で高いことが明らかになった。

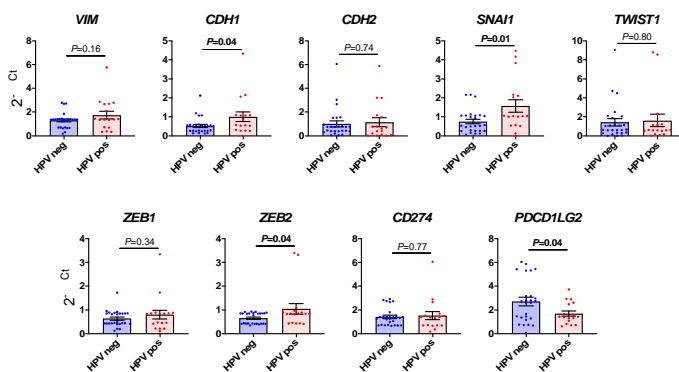


Figure 2.

(3) CTCs における遺伝子発現レベルと予後データの比較

次に、CTCs における各遺伝子の発現レベルについて ROC 曲線を作成しカットオフ値を決定し、高発現群(High)と低発現群(Low)とに分離し、両群間での予後：無増悪期間(PFS)、全生存期間(OS)について比較を行った(Table 3.)。HPV 陰性例、陽性例ともに複数の CTCs における遺伝子発現レベルと予後との間に関連を認めた。特に HPV 陽性例において、CTCs における ZEB2、CD274 の高発現例では PFS・OS とともに有意に延長が見られており、予後良好のマーカーとなりうる可能性が示唆された。

Table 3. Prognostic value of the gene expression in CTCs.

Gene symbol		HPV-negative		HPV-positive	
		P-value	HR (95%CI)	P-value	HR (95%CI)
Progression-free survival					
VIM	Low	0.03	0.29 (0.66-1.30)	0.007	Undefined
	High				
CDH1	Low	0.24	Undefined	0.27	0.40 (0.081-2.00)
	High				
CDH2	Low	0.23	0.46 (0.085-2.43)	0.19	0.27 (0.053-1.35)
	High				
SNAI1	Low	0.19	0.42 (0.13-1.38)	0.04	0.15 (0.030-0.76)
	High				
TWIST1	Low	0.11	Undefined	0.36	0.46 (0.097-2.30)
	High				
ZEB1	Low	0.11	0.31 (0.028-3.44)	0.09	0.20 (0.039-0.97)
	High				
ZEB2	Low	0.35	1.85 (0.56-6.15)	0.007	Undefined
	High				
CD274	Low	0.05	Undefined	0.006	0.096 (0.017-0.53)
	High				
PDCD1LG2	Low	0.03	Undefined	0.24	Undefined
	High				
Overall survival					
VIM	Low	0.25	0.27 (0.0081-8.92)	0.17	Undefined
	High				
CDH1	Low	0.02	Undefined	0.33	Undefined
	High				
CDH2	Low	0.11	Undefined	0.43	Undefined
	High				
SNAI1	Low	0.007	0.080 (0.00022-28.9)	0.06	Undefined
	High				
TWIST1	Low	0.09	Undefined	0.11	0.10 (0.0062-1.67)
	High				
ZEB1	Low	0.26	0.28 (0.026-2.93)	0.54	Undefined
	High				
ZEB2	Low	0.007	0.080 (0.00022-28.9)	0.004	Undefined
	High				
CD274	Low	0.50	0.45 (0.047-4.34)	0.02	Undefined
	High				
PDCD1LG2	Low	0.34	Undefined	0.45	Undefined
	High				

CTC, circulating tumor cell, HPV, human papillomavirus.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------