

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10044

研究課題名（和文）ドライバー遺伝子変異の監視による口腔潜在的悪性疾患(OPMDs)の新規治療戦略

研究課題名（英文）Novel treatment strategy against oral potential malignant disorders by surveilling the mutation of the driver gene(s)

研究代表者

内田 大亮(Uchida, Daisuke)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20335798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：代表的なOPMDsである口腔扁平苔癬（OLP）、口腔白板症（OLK）のドライバー遺伝子の変異解析を行った。その結果、OLK4例（4/14；28.6%）において、NOTCH1、PIK3CA、HRASのミスセンス変異とTP53のナンセンス変異が重複あるいは単独で認められたが、一般的な病理組織学的検鏡では変異のあった症例を判別できなかった。一方、OLP1例（1/27；3.7%）においてTP53のミスセンス変異が認められたが、この症例は経過観察中に上皮異形成に進展した。以上より、OPMDsにおけるドライバー遺伝子の監視は、早期切除や経過観察の嚴重化を決定する新規治療戦略になりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌(OSCC)は、口腔白板症(OLK)や口腔扁平苔癬(OLP)などの口腔潜在的悪性疾患(OPMDs)が生じ、その後、様々なドライバー遺伝子変異やエピゲノム異常が段階的に蓄積する「multistep carcinogenesis」により発生する。しかしながら、日常臨床で遭遇頻度の高いOLKやOLPでも数%の発癌に過ぎないため、切除や経過観察かの判断は施設ごとに異なり、統一された治療指針がなかった。本研究によりOPMDsの段階でドライバー遺伝子の変異を生じる症例が存在することが明らかとなり、OPMDsの経過観察の嚴重化やOSCCの超早期発見・超早期治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We performed mutation analysis of the driver genes in the representative OPMDs, OLP and OLK. Although we detected missense mutation of NOTCH1, PIK3CA, HRAS, and/or nonsense mutation of TP53 in 4 out of 14 cases (28.6%) in OLKs, the mutational cases were not recognized by the histopathological examinations. On the other hands, we detected missense mutation of TP53 in 1 out of 27 cases in OLPs, whereas this case advanced to epithelial dysplasia during the observation period. These results suggested that surveillance of the driver gene mutation could be a novel treatment strategy for the determination of early dissection or stringent observation in OPMDs.

研究分野：外科系歯学

キーワード：OPMDs TP53 OSCC

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の9割を占める口腔扁平上皮癌 (OSCC) の予後向上には、早期発見・早期治療が重要であることは言うまでもない。実際、当科における OSCC の病期別治療成績 (疾患特異的 5 年生存率) は、Stage I 94.2%、Stage II 85.9%、Stage III 71.2%、Stage IV 62.7% (2001~2012 年度) であり、早期癌では概ね良好な治療成績が得られている。従来、OSCC は、口腔白板症 (OLK) や紅板症 (OEP)、口腔扁平苔癬 (OLP) などの口腔潜在的悪性疾患 (OPMDs) が生じ、その後、様々なゲノム・エピゲノム異常が段階的に蓄積する「multistep carcinogenesis」により発生するとされてきた。しかしながら、OPMDs の発癌は、紅板症では 55-65% と高いものの、OLK では 1-3%、OLP では 0.4-5.3% と低い (Int J Dent 2014:1-6, 2014)。そのため、紅板症以外の OPMDs、とりわけ OLK では、切除か経過観察かの判断は施設や担当医ごとに異なり、現状、統一された治療指針がない。一方、近年の全遺伝子エキソーム解析にて、OSCC を含む頭頸部癌には、限られたドライバー遺伝子が存在し、それらの変異が発癌を誘発することが明らかにされた (Nature 517:576, 2015)。この報告を参考に、当科では頭頸部癌に特化した TP53、HRAS、PIK3CA、NOTCH1、CDKN2A など、7 遺伝子の全エクソンが解析可能なカスタムターゲット遺伝子シーケンスパネル (Ampliseq for Illumina Custom DNA Panel) を作製した。本パネルを用い、当科を受診した OSCC 28 例を解析したところ、TP53:89.3%、NOTCH1:46.4%、HRAS:7.1%、CDKN2A:35.7%、PIK3A:17.9% の割合で変異が確認され、咽頭喉頭を含む頭頸部癌全体を対象とした報告 (TP53:72%、NOTCH1:19%、HRAS:4%、CDKN2A:22%、PIK3A:21%; Nature 517:576, 2015) と同様の傾向を示していた。また、ドライバー遺伝子に変異がなかった症例は 1 例のみであり、その変異率は癌のステージに依存しなかったことから、OSCC は比較的早期よりこれらのドライバー遺伝子に変異を生じることが予想された。さらに、ゲノムの守護神であるがん抑制遺伝子 TP53 に関しては OPMDs の段階で変異するとされていること、Notch シグナルの破綻が頭頸部扁平上皮癌の発症に関与することが報告されていることから、OPMDs の段階でドライバー遺伝子の変異を検出できれば、経過観察の厳重化や OSCC の超早期発見・超早期治療につながる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、OPMDs (OLK, OEP, OLP) におけるドライバー遺伝子の変異を監視する「OPMDs の新規治療戦略」を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ドライバー遺伝子の変異解析

前述のごとく、当科では、獨協医科大学口腔外科との共同で、TP53、HRAS、PIK3CA、NOTCH1、CDKN2A などの 7 遺伝子を搭載したカスタムターゲット遺伝子シーケンスパネル (Ampliseq for Illumina Custom DNA Panel) を作製している。このパネルは搭載した上記遺伝子の全エクソンをカバーしており、OSCC 28 例を用いた pilot study にて良好な結果を得ている。本研究では、初診時あるいは経過観察中に、臨床的あるいは病理組織診断にて診断された比較的遭遇頻度の高い OPMDs である OLK 14 例、OEP 1 例、OLP 27 例に本パネルを応用した。組織よりゲノム DNA を抽出後にライブラリーを作製し、愛媛大学学術支援センターにてベンチトップ型次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ社) によるディープシーケンシングを行い、ゲノム異常の有無について VariantStudio software v3.0 (イルミナ社) を用いて評価し、腫瘍特異的なゲノム異常を検索した。これらの解析にて、至適デプスと信頼度が得られたサンプルにおいてのみ、個々のドライバー遺伝子のタンパクレベルでの変異型 (置換、欠失、挿入、重複、フレームシフト) を検討した。

(2) ドライバー遺伝子変異型の詳細に関する検討

すべての変異に対して、Jackson Laboratory の The Clinical Knowledgebase (CKB; <https://ckb.jax.org>) を用いて変異型の詳細を検索した。TP53 の変異型については、TP53 の悪性度を検索できる Baylor 大学の EAp53 サーバー (<http://eaction.lichtargelab.org/Eap53>) も用い TP53 の質的変異を検索した。

(3) ドライバー遺伝子変異と臨床病理組織学的因子の関連性

変異解析を行った症例に関して、ドライバー遺伝子変異と臨床病理学的因子の関連性を検討した。臨床病理組織学的因子は、年齢 (50 歳以上)、性別 (女性)、嗜好歴 (喫煙・飲酒)、糖尿病、病理組織 (高度異形成)、C 型肝炎の罹患歴とした。

(4) 経過観察期間

生検あるいは全切除にて病理組織学的に OPMDs の診断が得られたすべての症例において、5 年間の経過観察を行い、発癌や再発の有無を監視する予定とした。

4. 研究成果

(1) OPMDs におけるドライバー遺伝子の変異

代表的な OPMDs である OLK と OLP のドライバー遺伝子の変異解析を行った。その結果、OLK 4 例 (4/14; 28.6%) において、NOTCH1 (1 例) のフレームシフト変異とミスセンス変異、PIK3CA (3 例) と HRAS (1 例) のミスセンス変異、TP53 (1 例) のナンセンス変異が重複あるいは単独で認められた。一方、OLP に関しては、変異を認めたものは 1 例 (1/27; 3.7%) のみであり、TP53 のミスセンス変異が認められた (図 1)。なお、OEP1 例に関しては変異を認めなかった。

図 1. ドライバー遺伝子変異を認めた OPMDs

症例	臨床診断 (病理)	TP53	CDKN2A	HRAS	NOTCH1	PIK3CA	FBXW7
1	OLK (low grade dysplasia)	-	-	-	フレームシフト変異 G200S (ミスセンス変異)	E545K (ミスセンス変異)	-
2	OLK (low grade dysplasia)	ナンセンス変異	-	-	-	-	-
3	OLK (low grade dysplasia)	-	-	-	-	G1049R (ミスセンス変異)	-
4	OLK (low grade dysplasia)	-	-	G12S, G13V (ミスセンス変異)	-	H1047R (ミスセンス変異)	-
5	OLP	Y205D (ミスセンス変異)	-	-	-	-	-

(2) 変異型の詳細

PIK3CA の E545K と H1047R はいわゆる hot spot 変異であり、MEK1/2 あるいは Akt を活性化することにより、増殖因子非依存的に細胞を生存させる gain of function 変異であった。また、G1049R 変異も hot spot ではないものの、肺がんや乳がん等で gain of function 変異が報告されていた。HRAS の G12S は、頭頸部癌における HRAS 変異型の中で最も多く検出されていた変異であった。TP53 の Y205 変異は、頻度は少ない変異とされているが、database 上は EA score 94.27 であり予後不良との関連性が高い高リスク変異であった。

(3) ドライバー遺伝子変異と臨床病理組織学的因子の関連性

OPMDs 42 例におけるドライバー遺伝子変異と臨床病理組織学的因子との関連性について検討したところ、性別と飲酒歴に関して有意差を認めた。一方、OLK の悪性度指標である病理組織学的な上皮異形成の程度は、変異との関連性を認めなかった。

図 2. ドライバー遺伝子変異と臨床病理組織学的因子との関連性

n=42	OPMDs mutation(+)	OPMDs mutation(-)	p value
Age			
< 65 years	1	17	p = 0.275
≥ 65 years	4	20	
Gender			
Male	4	11	p = 0.047
Female	1	26	
Smoking			
Yes	3	13	p = 0.275
No	2	24	
Drinking			
Yes	4	11	p = 0.047
No	1	26	
Diabetes			
Yes	3	6	p = 0.057
No	2	31	
Pathology			
OED (Moderate, Severe)	2	2	p = 0.365
OED (Mild)	3	9	
OLP	0	26	
HCV			
Positive	0	0	-
Negative	3	24	
Unknown	2	13	

Fisher's exact test

(4) TP53 変異を認めた OLP1 例の経過

変異および外科的切除の有無に関わらず、すべての症例について最短 4 ヶ月から最長 39 ヶ月の経過観察を継続しているが、口腔癌に進行した症例はなかった。しかしながら、TP53 変異を認めた OLP1 例については、初診時生検にて OLP の診断であったが、1 年後再診時に肥厚した白色病変を認めたため、生検したところ軽度の上皮異形成に進展していた。なお、再生検した組織における変異解析においても同様の TP53 変異を認めたが、その他のドライバー遺伝子には変異を認めなかった。

図 3. TP53 変異のあった OLP における病変の経時的変化



初診時

約1年後

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hyodo Toshiki, Kuribayashi Nobuyuki, Fukumoto Chonji, Komiyama Yuske, Shiraishi Ryo, Kamimura Ryouta, Sawatani Yuta, Yaguchi Erika, Hasegawa Tomonori, Izumi Sayaka, Wakui Takahiro, Nakashiro Koh-ichi, Uchida Daisuke, Kawamata Hitoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 The mutational spectrum in whole exon of p53 in oral squamous cell carcinoma and its clinical implications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-25744-8	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 Tokuzen Norihiko, Nakashiro Koh-Ichi, Tojo Shin, Goda Hiroyuki, Kuribayashi Nobuyuki, Uchida Daisuke	4. 巻 22
2. 論文標題 Human papillomavirus 16 infection and p16 expression in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12789	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 Kamimura Ryouta, Uchida Daisuke, Kanno Shin-ichiro, Shiraishi Ryo, Hyodo Toshiki, Sawatani Yuta, Shimura Michiko, Hasegawa Tomonori, Tsubura-Okubo Maki, Yaguchi Erika, Komiyama Yuske, Fukumoto Chonji, Izumi Sayaka, Fujita Atsushi, Wakui Takahiro, Kawamata Hitoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Identification of Binding Proteins for TSC22D1 Family Proteins Using Mass Spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10913 ~ 10913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222010913	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 Hasegawa Tomonori, Nakashiro Koh-Ichi, Fukumoto Chonji, Hyodo Toshiki, Sawatani Yuta, Shimura Michiko, Kamimura Ryouta, Kuribayashi Nobuyuki, Fujita Atsushi, Uchida Daisuke, Kawamata Hitoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Oral squamous cell carcinoma may originate from bone marrow-derived stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12431	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗林伸行, 児島さやか, 合田啓之, 徳善紀彦, 日野聡史, 中城公一, 内田大亮
2. 発表標題 口腔疣贅状扁平上皮癌の診断におけるドライバー遺伝子変異解析の有用性
3. 学会等名 第76回日本口腔科学会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kuribayashi N, Nakashiro K, Adachi T, Goda H, Hino S, Uchida D
2. 発表標題 A case of oral verrucous squamous cell carcinoma with mediastinal lymph node metastasis: mutation analysis on custom gene panel by next generation sequencing.
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会,
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 児島さやか, 栗林伸行, 徳善紀彦, 合田啓之, 日野聡史, 中城公一, 内田大亮
2. 発表標題 口腔潜在的悪性疾患における遺伝子解析
3. 学会等名 第41回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 児島 さやか, 栗林 伸行, 中城 公一, 東條 晋, 徳善 紀彦, 合田 啓之, 川又 均, 内田 大亮
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における p53 遺伝子の変異解析
3. 学会等名 第34回日本口腔診断学会・第31回日本口腔内科学会 合同学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田大亮
2. 発表標題 口腔疣贅状扁平上皮癌の治療を再考する
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究分担者	栗林 伸行 (Kuribayashi Nobuyuki) (80617332)	愛媛大学・医学系研究科・助教 (16301)	

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