

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659885

研究課題名(和文) 口腔癌患者末梢血中の循環ミトコンドリアDNAモニタリングによる予後判定法の開発

研究課題名(英文) Circulating tumor-derived mutant mitochondrial DNA: a predictive biomarker of clinical prognoses in human squamous cell carcinoma

研究代表者

丹沢 秀樹 (TANZAWA, HIDEKI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50236775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：さまざまな癌種において、末梢循環血液中の癌関連因子を検出することは困難であった。しかし、ヒト口腔癌細胞を用いたマウスの実験では、臓器や血液サンプルから大量のミトコンドリアDNA(mtDNA)を検出できた。そこで、本研究では、口腔癌患者に対する血中mtDNAを用い、ミトコンドリア全ループ領域を解析した。その結果、5領域で塩基置換による突然変異を同定した。口腔癌患者61例から術前、術後、術後4週で採取した末梢血中mtDNAをこの5領域について解析した。経過不良であった全ての患者は原発腫瘍に有意に異常mtDNAを有していた。以上の結果から、本検査法が癌の予後判定に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In a variety of malignant tumors, it is difficult to detect the circulating tumor-derived molecular targets. But, in murine xenografting human oral cancer cells, human mtDNAs could be quantitatively detected from organs and blood samples. In the present study, we used this mtDNA for patients with oral cancer, and analyzed all mitochondrial loop domains. As a result, we found that the oral cancer derived cell lines had mutation at 5 regions in mtDNA. mtDNA from normal and tumorous tissues and serum mtDNA obtained preoperatively and 4 weeks postoperatively from 61 subjects was examined at these five different regions. All patients with a poor prognosis (recurrence and/or distant metastasis cases, r/m+) had significantly ($P<0.05$) higher amounts of mutant mtDNAs in the tumoral tissues. These results suggested that this approach may have useful diagnosis for predictor of the prognosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：mtDNA 口腔癌 qPCR-HRMA 予後判定

1. 研究の背景

近年、試みられている末梢血循環癌細胞ならびに癌細胞由来循環遊離核酸 (circulating nucleic acids:以下 CNAs) の検出による微量残存腫瘍の検出が必ずしも良好な結果を得ることができない理由としては、CNAs は量的に少なく検出効率に限界があることが挙げられる。そこで本研究では、末梢血中の癌由来遊離 DNA として、細胞内に核酸 DNA の数百倍のコピー数があるミトコンドリア DNA (mitochondrial DNA: 以下 mtDNA) をターゲットとし、高解像度融解曲線分析法 (high resolution melting curve analysis: 以下 HRMA) を用いた、簡便で正確な新規診断法を開発する。本法が確立すれば、わずか数 cc の血液を毎月検査して、術後 1,2 カ月程度の非常に早い段階で癌の微小残存や微小転移を診断でき、従来法に比較して画期的な診断法になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、mtDNA をターゲットとし、近年開発された HRMA を用いた mtDNA 変異解析により、従来の検査では検出できないような微小残存腫瘍を早期に簡便・正確に同定できる新たな診断法開発を目的とする。この方法を用いれば、一旦、検量線を作成すると、その後は非常に簡便な操作により迅速性と正確な変異 DNA 検が可能となる。わずかな末梢血液を用いて微量残存腫瘍の検出により、非常に早期に再発診断を行うことができるため、臨床的に検出可能な大きさの腫瘤を形成・再発する前に化学療法などを施すことにより、癌再発を抑制あるいは再発までの期間を延長して、生存期間を大幅に延長できる可能性が期待でき、実際に臨床で使用できる画期的な診断法になると考えられる。

3. 研究の方法

(1)対象と材料

口腔扁平上皮癌一次症例で、術前に遠隔転移を認めず、かつ既往歴に自己免疫疾患がない多数の臨床サンプル(原発巣組織。術前、術後定期的採取末梢血)と口腔癌由来培養細胞株を用いる。すべての対象は病理組織検査において、原発巣手術切除断端と頸部リンパ節転移を検定する。

(2)DNA の抽出、精製

組織検体の mtDNA は、mtDNA Extractor CT Kit(Wako 社)、血清中の mtDNA は、QIAamp Ultrasens Virus Kit(Qiagen 社)を用いて抽出・精製した。DNA の定量は NanoDrop により測定し、解析に使用するまで -80 °C で保存した。

(3)ヒトミトコンドリア全ループ領域の塩基配列解析と変異の検出

正常口腔上皮細胞(HNOKs)と培養細胞株に関して、ヒトミトコンドリアゲノムの全ループ領域の塩基配列決定を行う。具体的には、PCR 産物を TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen 社) を用いてサブクローニングし、QIAprep Spin MiniPrep Kit (Qiagen 社)を用いてプラスミド DNA を精製する。塩基配列は、ジデオキシヌクレオチドを蛍光標識した Dye Terminator 法によって決定し、得られたデータは、MITOMAP と比較・照合する。

(4)qPCR-HRMA と融解曲線パターンによる変異の検出

臨床検体における変異 mtDNA 量を解析するための検量線を作成する。すなわち、癌細胞株から得られた mtDNA を 100% 変異 mtDNA とし、これを正常口腔上皮細胞の mtDNA で段階希釈したものを調整し、HRMA にて融解曲線を作成する。術前・術後 4 週間の血清および癌部組織・非癌部組織 (正常口腔粘膜組織) から抽出した mtDNA の融解曲線を検量線と比較することで検索対象の変異 mtDNA 量を決定する。

(5)統計解析

本研究における統計学的有意差検定は、Mann-Whitney の U 検定にて統計処理し、危険率 5%未満 (以下、 $p < 0.05$) を有意差ありと判定する。

4. 研究成果

【対象症例の臨床諸指標】

研究対象は、千葉大学医学部附属病院歯科・顎・口腔外科において外科的切除を受けた術前治療歴のない口腔扁平上皮癌一次症例 61 症例で、すべての対象は病理組織検査において原発巣手術断端陰性で頸部リンパ節転移がないと判定された。このうち術後経過良好例が 45 例、術後経過不良例が 16 例であった。これらの症例における変異 mtDNA の有無との関係は表 1 に示すように、予後良好例全てで変異 mtDNA (-)、術後経過不良例全てで (+) であった。(表 1)

| Feature | r/m(-) n=45(74%) | r/m(+) n=16(26%) | p-value |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------|
| Age at surgery(yrs) | 67.1(27~85) | 64.4(47~83) | |
| <60 | 12 | 6 | 0.470 |
| 60-70 | 11 | 5 | |
| 70+ | 22 | 5 | |
| Gender | | | |
| Male | 25 | 9 | 0.961 |
| Female | 20 | 7 | |
| T-primary tumor | | | |
| T1 | 15 | 0 | 0.001* |
| T2 | 22 | 8 | |
| T3 | 2 | 6 | |
| T4 | 6 | 2 | |
| T1+T2 | 37 | 8 | 0.011 |
| T3+T4 | 8 | 8 | |
| Stage(UICC,2002) | | | |
| I | 2 | 0 | 0.647 |
| II | 12 | 6 | |
| III | 9 | 4 | |
| IV | 22 | 6 | |
| I-II | 14 | 6 | 0.640 |
| III-IV | 31 | 10 | |
| Histopathological type | | | |
| Well | 32 | 10 | 0.458 |
| Moderately | 11 | 6 | |
| Poorly | 2 | 0 | |
| Tumor site | | | |
| Gingiva | 19 | 5 | 0.719 |
| Tongue | 20 | 7 | |
| Buccal mucosa | 3 | 2 | |
| Oral floor | 3 | 2 | |
| outcome | | | |
| alive | 44 | 9 | 0.001* |
| dead | 1 | 7 | |
| SCC(<1.5 ng/ml) | 0.99(0~3.1) | 0.86(0~1.3) | 0.568 |

表 1 対象症例の臨床諸指標

【細胞株および臨床検体における qPCR-HRMA】

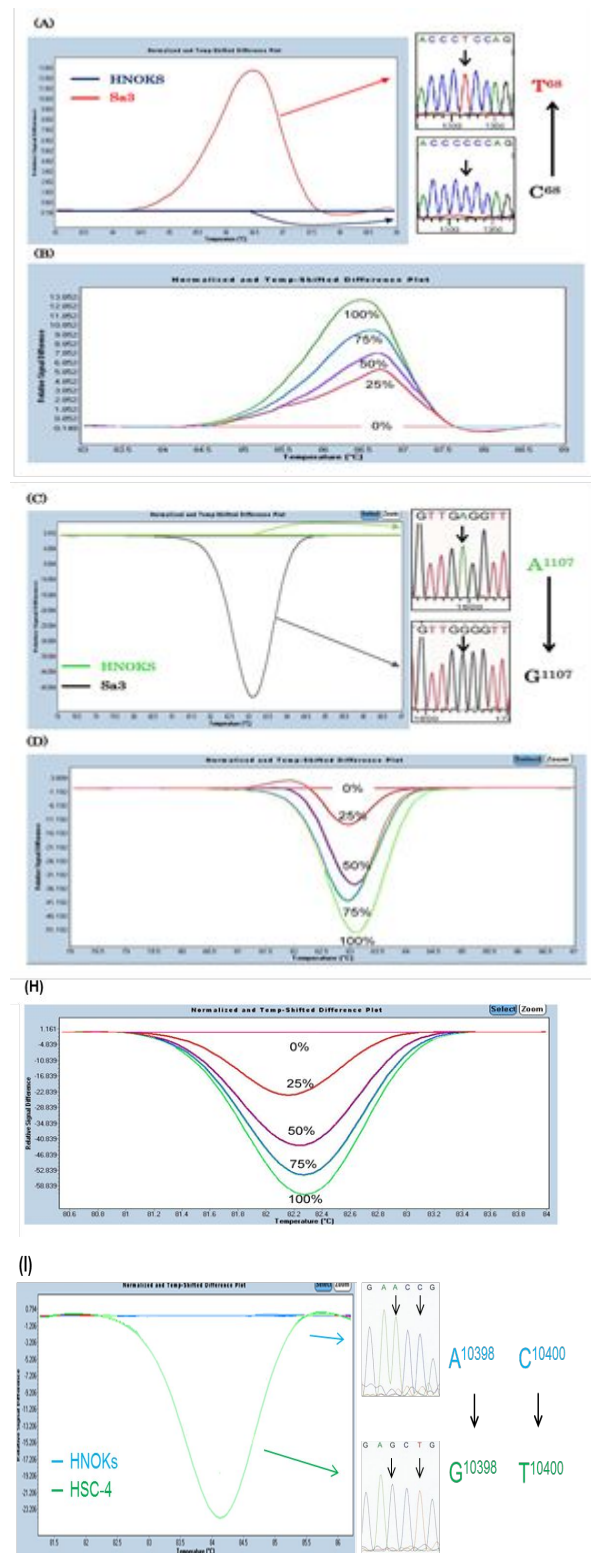
ヒトミトコンドリアゲノム全ループ領域解析のうち、全 D ループ領域塩基配列を決定した結果、D ループ塩基 68(np68)のシトシン(C)からチミン(T)への塩基置換が Sa3 細胞株において認められ、この部位をターゲットとした最適なプライマーを用いた qPCR-HRMA の結果、HNOKs と Sa3 細胞株における融解曲線に明瞭な差異が検出された。(図 1A)

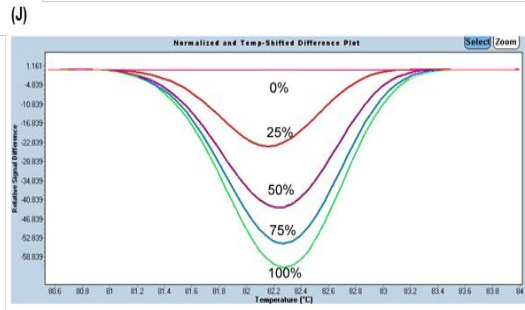
Sa3 細胞株からクローニングされた D ループ変異部位を含むプラスミドを HNOKs の mtDNA に対してそれぞれ 0%, 25%, 50%, 75%, 100%混合させた 5 サンプルの融解曲線はそれぞれ明瞭な差異を示した。(図 1B)

他の領域についての解析を行ったところ、12S-rRNA 領域において 1107(np1107)のアデニン(A)からグアニン(G)への塩基置換が Sa3 細胞株において認められ(図 1C,D) さらに 16S-rRNA についても 3190(np3190)のチミン(T)からシトシン(C)への塩基置換が HSC-4 細胞株において認められた。(図 1E,F)

また呼吸酵素複合体である ND1~ND6 領域についても解析を行ったところ、ND2 領域において 5108(np5108)のチミン(T)からシトシン(C)への塩基置換(図 1G,H)、ND3 領域において 10398(np10398)のアデニン(A)からグアニン(G)への塩基置換と 10400(np10400)のシトシン(C)からアデニン(A)への塩基置換についても、HSC-4 細胞株において新たに確認された。(図 1I,J)

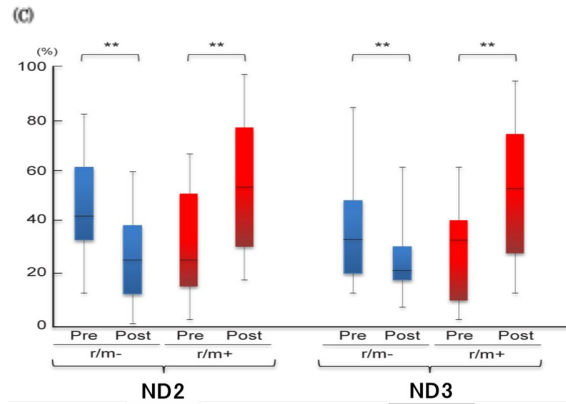
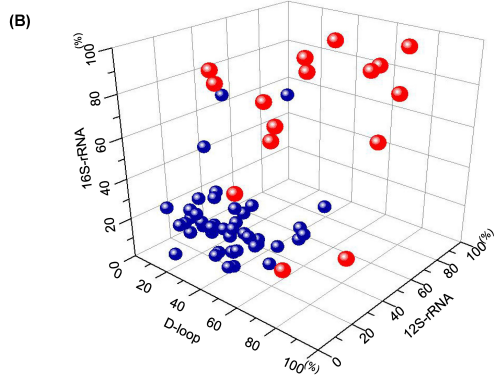
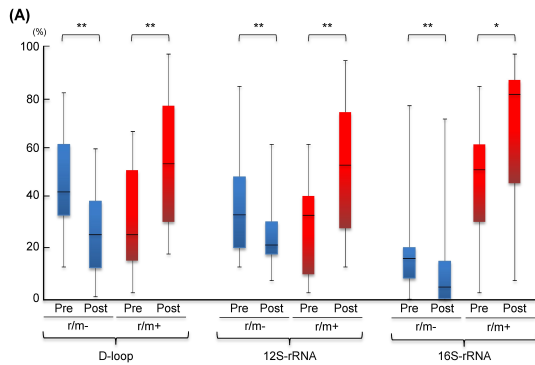
図 1. qPCR-HRMA による変異 mtDNA 解析





次に血清中の変異 mtDNA 量について、術前、術後で比較したところ、予後良好群(r/m(-))において、術後4週間で顕著に低下していたのに対し、予後不良群(r/m(+))では術後4週間での変位量の増加を認めた。(図2A) 検量線から求めた変異量を数値化し、D-loop、12S-rRNA、16S-rRNAの3領域ごとに3Dグラフとして表示すると、r/m(-)群(赤)の変異量は低値を示したのに対し、r/m(+群(青)の変異量は高値を示した。(図2B) 新たに見出した2領域において同様に比較したところ、予後良好群(r/m(-))において、術後4週間で低下していたのに対し、予後不良群(r/m(+))では術後4週間での変位量の増加を認めた。(図2C)

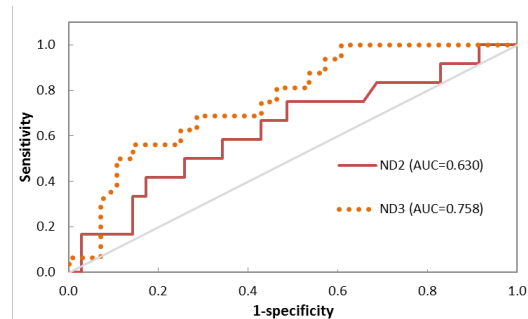
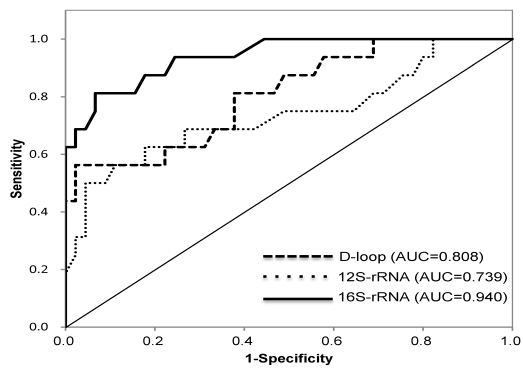
図2.血清中における変異 mtDNA 量の比較解析



【3領域における予後診断ツールとしてのROC曲線の利用】

D-loop、12S-rRNA、16S-rRNAの3領域における変異量を求めたが、これらの因子を用いた予後予測診断能を評価する目的でROC曲線を用いて比較した。その結果、3領域ともにAUC0.7以上となり予測能が高く、診断ツールとしての有用性が示唆された。新たに見出した2領域のうちND3領域はAUC0.7以上であり有用性が示唆された。(図3) 以上の結果から、口腔癌末梢血由来のmtDNAにおけるqPCR-HRMA法を用いた変異mtDNAの解析は、従来の検査では検出できないような微小口腔扁平上皮癌の存在を迅速かつ正確に同定する診断ツールとなる可能性が示唆された。

図3.D-loop, 12S-rRNA, 16S-rRNAおよびND2, ND3におけるROC曲線の比較



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Uzawa K, Baba T, Uchida F, Yamatoji M,

Kasamatsu A, Sakamoto Y, Ogawara K,
Shiiba M, Bukawa H, Tanzawa H. Circulating
tumor-derived mutant mitochondrial DNA: a
predictive biomarker of clinical prognosis in
human squamous cell carcinoma. Oncotarget.
2012 ; 3(7):670-7. 査読有
〔学会発表〕(計1件)

The IADR 91st General Session & Exhibition
(Seattle, Washington, USA. March 20-23, 2013)
Baba T, Uzawa K, Kasamatsu A, Sakamoto Y,
Ogawara K, Shiiba M, Tanzawa H.
Circulating tumor-derived mutant
mitochondrial DNA in oral cancer.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

丹沢 秀樹 (TANZAWA HIDEKI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号 : 50236775

(2) 研究分担者

小池 博文 (KOIKE HIROFUMI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 10595995

神津 由直 (KOUZU YUKINAO)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号 : 70400942