

平成 28 年 12 月 10 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861915

研究課題名(和文)なぜ長期経過観察後にも頸部リンパ節転移は生じるのか

研究課題名(英文)The mechanism of late lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma.

研究代表者

高橋 謙一郎 (TAKAHASHI, Ken-Ichiro)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：90613604

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)：口腔癌症例における長期経過後の頸部リンパ節転移を生じる仕組みを明らかにするために、超高密度の全ゲノム領域にわたる遺伝子コピー数の変異検索を行った。その結果、舌扁平上皮癌症例の原発巣と頸部リンパ節転移巣における遺伝子コピー数変異は、その大部分が共通しているものの、頸部リンパ節転移領域に特異的なコピー数の増加が20q11.2に認められ、同領域に存在するE2F1遺伝子が転移リンパ節転移巣の形成に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We compared the genetic profile of paired primary tumor (PT) and metastatic lymph node (MLN) samples obtained from patients with oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC). Large-scale genetic profiling was performed on paired PT-MLN samples obtained from 10 OTSCC patients using high-density single-nucleotide polymorphism microarrays. We compared the genetic profile of PT and MLN OTSCC samples to identify common and specific copy number alterations (CNAs) and copy-neutral loss-of-heterozygosity (CN-LOH). This study indicates that additional genetic changes, such as 20q11.2 gain, which encodes the E2F1 gene, can be acquired through clonal evolution, and may be required for the metastatic process.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 原発巣 頸部リンパ節転移巣 相同性 相違性 SNPsアレイ

1. 研究開始当初の背景

原発巣治療後の経過観察期間と本研究の必要性

近年、診断技術・治療法の向上、および早期発見・早期治療の概念の徹底により、癌の治療成績は確実に向上しているが、依然として癌による死亡が本邦における死亡原因の第一位を占めている。一方、口腔癌は他の臓器に比べ、早期発見、早期治療が可能であると言われているが、その治療成績は未だ満足されるべきものではない。口腔癌の治療成績をさらに向上させるためには、原発巣を制御に加えて、**頸部リンパ節転移の制御が極めて重要である。**

特に、初診時に頸部リンパ節に転移が認められず、原発巣治療後に転移リンパ節が発見される、いわゆる**後発頸部リンパ節転移は治療成績を低下させる重要な臨床的因子**の一つである。しかし、後発頸部リンパ節転移を臨床的に予測して、予防的に頸部郭清を行うか、原発巣のみを治療して、頸部転移に対しては厳重経過観察とし、リンパ節転移が認められた時点で頸部郭清を行うべきなのかは、統一された見解が得られていない。

こうした中で、一次治療時に頸部リンパ節転移に対する治療を行わなかった患者に対する経過観察または予防的化学療法などの後治療は、それ以降転移が確実に起こらないと担当医が経験的に予想する時期を越えるまでに行っているのが現状である。しかし、転移が生じるまでの期間は症例により一定せず、臨床の現場では**担当医の予想を超えて、後治療終了後に転移が発見されることもしばしばおこっている。**こうした中で、患者ごとの必要経過観察期間の目安に関する臨床的な知見は十分に得られておらず、実際に一般的に導入された事実も乏しい。そこで、転移が生じるまでの期間に關与する癌細胞の遺伝学的特徴を特定できれば、経過観察期間や後治療期間を症例ごとに分けて考えることが可能となり、不必要な後治療を行う可能性や、経過観察終了後の転移による不幸な転帰を回避することが出来る見込みがある。

SNPs アレイによる網羅的遺伝子 CNV 解析

癌の臨床経過の多様性に大きく關与する因子として、癌細胞における遺伝子コピー数の変化(以下 CNV)が知られている。近年開発された手法である SNPs アレイを用いた網羅的 CNV 解析により、アレイ CGH をはるかに超えた粒度での CNV 解析が可能となり、がん治療に有益な知見の数々が比較的短期間のうちに得られるようになった。さらに、従来までは遺伝子の構造破壊により困難だった、ホルマリン固定パラフィン包埋標本(以下 FFPE

標本)からの遺伝子抽出による上記 CNV 解析の手法も実用化された。

ホルマリン固定された標本から品質の高い DNA が抽出できなかった従来までの手法では、本研究の計画を前向き研究とせざるを得ず、実験群の収集に長期の待機期間が不可避であったが、こうした FFPE 標本を解析に利用することから、本研究を後ろ向き研究として計画することが可能となり、**すでに蓄積された症例の中から実験群と対象群を選択することができ**、本研究の速やかな進行が可能となった。

2. 研究の目的

口腔癌において、後発頸部リンパ節転移の生じるまでの期間は症例により様々であるため、経過観察期間や予防的化学療法の長期化、ひいては医療コストの増大の一因となっている。

本研究の目的は、一次治療終了後に**長期間経過してから生じる頸部リンパ節転移症例を予め予測する因子を解明**するため、このような症例の癌細胞が、比較的早期に転移するものと比べて遺伝学的にどう異なるのかを SNPs アレイを応用して網羅的 CNV/LOH 解析を行い、転移時間の差異が生じるメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

対象: 治療経過期間中に頸部リンパ節転移を合併した舌扁平上皮癌症例のうち、一時治療として術前治療を行わず、外科手術を施行した 10 例を対象とした。頸部リンパ節転移の発症時期による内訳は、同時性頸部リンパ節転移 3 例、後発頸部リンパ節転移 7 例とした。**DNA の抽出法:** 上記の 10 症例における原発巣と転移リンパ節巣それぞれのパラフィン包埋ホルマリン固定(FFPE)組織、計 20 サンプルを用いた。各サンプルが腫瘍のみで構成されるようトリミングし、通法どおりにゲノム DNA を抽出した。

SNPs アレイ: 上記の 20 サンプルに対して、高密度の SNP(single-nucleotide polymorphisms) アレイである OncoScan® FFPE Assay (Affymetrix)を用いて、全ゲノムコピー数解析を行った。

データ解析: 統計解析は R statistical software (version 3.1.0)を用いて行い、またヒートマップも同ソフトウェア上で作成した。コピー数は 2.0 以上を"gain"、2.0 未満を"loss"とそれぞれ定義した。そして、OncoScan に搭載されている全てのプローブについて各々、コピー数の状態(gain, loss, normal)および CN-LOH の状態を原発巣・転移巣ともに評価し、また両者間での比較を Fisher の正確確率検定により行った。また CNA 数および CN-LOH 数の比較は対応のある t 検定を用いて行った。これらのデータは、Gene Expression Omnibus に

GSE76014 として登録された。

4. 研究成果

症例 3 の原発巣(3-P)・転移巣(3-L)における CNA および CN-LOH の情報を全染色体にわたって Figure 1 に示す。この症例からは、11q13.3 領域(Figure 1A 赤矢印)のコピー数増幅は 3-P と 3-L で共通してみられる(Figure 1B)一方で、7p 領域のコピー数増幅(Figure 1A 緑矢印)は 3-P ではみられず 3-L でのみみられた(Figure 1C)。CN-LOH についても同様に、2q 領域(Figure 1A 青矢印)において 3-P と 3-L の CN-LOH の様相は概ね共通しているが、部分的に異なっている(Figure 1D)。

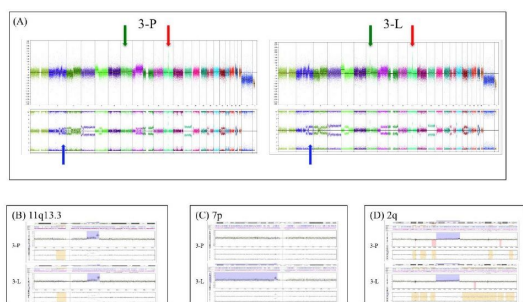


Figure 1(A-D)

このように、Case 3 において、原発巣と転移巣の大部分は遺伝的に共通した癌細胞集団で構成されているが、一部の細胞集団はその両者間で異なっていることが示唆された。他の 9 症例についても同様の評価を行い、さらに原発巣 10 症例と転移巣 10 症例の間での比較解析も行った(Figure 2)。その結果、3q, 5p, 7p, 8q, 11q13, 20q の gain, 3p, 22q の loss は 10 症例中 5 症例において原発巣・転移巣で共通した CNA であった。また、CN-LOH について原発巣・転移巣で最も共通してみられた領域は 1p, 3p, 16p であった。

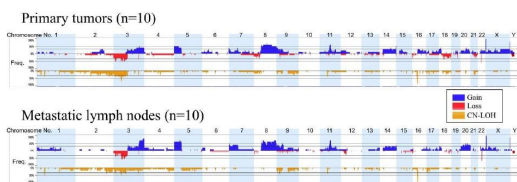


Figure 2

次に全 20 サンプルを対象に事前ラベルなしの階層クラスタリング解析を行い(Figure 3)。その結果 10 症例中 7 症例において、原発巣・転移巣のクラスターが形成され、原発巣と同一患者の転移巣は概ね遺伝的に共通した癌細胞集団で構成されていることが裏付けられた。

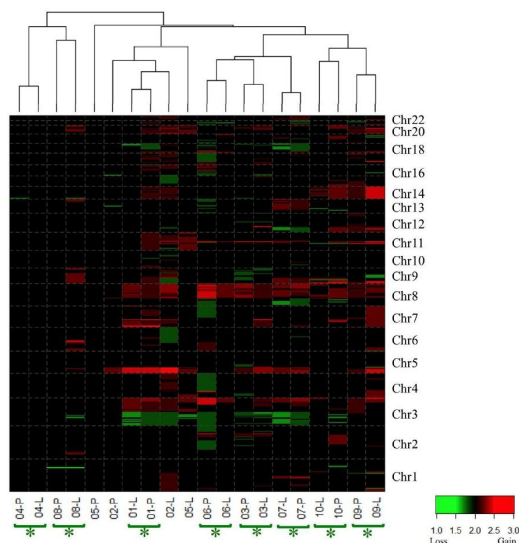


Figure 3

同時性・後発頸部リンパ節転移の 2 群間における比較において両者に統計学的に有意な CNV または CN-LOH クラスターは存在しなかった。続いて、原発巣と転移巣の間での CNA 数および CN-LOH 数の比較を行った(Figure 4)。結果、数の変化については CNA、CN-LOH いずれも一定の傾向はみられなかった。

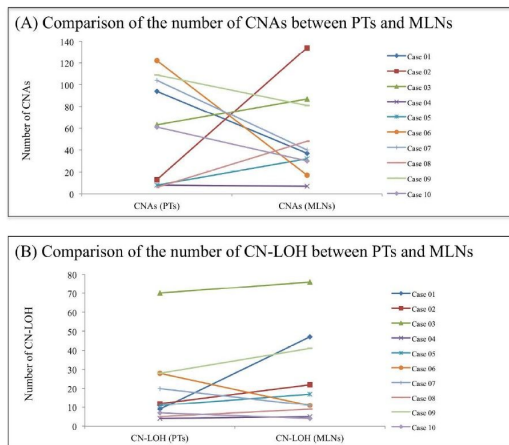


Figure 4

さらに原発巣と同一患者の転移巣の CNA および CN-LOH の比較解析を行った結果、10 症例中 6 例において、8q11.21, 8q12.2-3, 8q21.3 の gain および 22q11.23 の loss が共通してみられた。また 16p11.2 の CN-LOH は 10 症例中 9 例で共通してみられた。一方で、20q11.2 の gain は 10 症例中 5 例の転移巣のみでみられた変異であり、統計学的有意差をもって ($p=0.0325$)、転移巣特異的な変異であることが示された。逆に原発巣特異的な CNA は見られなかった。

本研究におけるゲノム解析の結果、20q11.2 の gain は転移巣特異的な CNA であることが

わかり、この現象について2通りの説明が考えられる。一つ目は、20q11.2のgainは原発巣でも実は起こっているのだが、それはごく一部の細胞集団にとどまっているためSNPアレイでは検出されない。しかし、この変異を持つ集団は転移・増殖能を有しており、転移の過程で“clonal evolution”を通して顕著に増殖し、そのため転移巣でのみ検出された、という考えである。もう一つの説は、原発巣では20q11.2のgainは全く生じておらず、転移した後に発生してその集団が大多数を占めるようになった、というものである。これらの仮説の立証に向けて、さらなる解析が求められる。

20番染色体長腕のgainは多くの癌種で見られる。この染色体上に位置する遺伝子の中でDNMT3Bは最も興味深い遺伝子である。DNMT3Bタンパクは、遺伝子プロモーターであるCpGアイランドの過剰メチル化に大きく関わっていて、癌抑制遺伝子の不活化に寄与していると報告されている。DNMT3Bは食道癌や肺癌、口腔癌における癌化との関連が指摘されている。また20q11.2上のもう一つの重要な遺伝子として、RB遺伝子の下流に位置するE2F1があり、細胞周期の制御やDNA損傷に応じたアポトーシスの誘導に大きく関わっている。

CN-LOHは片方の対立遺伝子(allele)が欠失した結果残ったもう一方のalleleが2倍となることで、コピー数は正常だがヘテロ接合性消失を認めるという変異であり、核型分析やSNPアレイを通してのみ検出される。CN-LOHは様々な癌種で報告されているが、OTSCCではほとんど解析がなされていない。本研究では、16p11.2のCN-LOHにおいて強い相同性がみられ、OTSCCの発癌過程に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この領域には、TP53、TG3などの遺伝子が存在するが、OTSCCの関連はこれまで報告されていない。

本研究から、OTSCCの原発巣および同一患者の転移巣におけるゲノムは大部分が共通している一方、20q11.2 gainのように一部の転移巣特異的な変異が転移巣の形成に必要であることが示唆された。今後の研究においては、20q11.2に存在する各遺伝子の詳細な解析および、それらを通して頸部リンパ節転移過程のメカニズムの解明が求められる。

本研究の結果の一部に対し、第33回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会において優秀ポスター賞受賞した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Moriya Y, Uzawa N, Morita T, Mogushi K,

Miyaguchi K, Takahashi K, Michikawa C, Sumino J, Tanaka H, Harada K. The high-temperature requirement factor A3 (HtrA3) is associated with acquisition of the invasive phenotype in oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol.* 2015; 51(1):84-9. 査読有
doi : 10.1016/j.oraloncology.2014.10.001

Sumino J, Uzawa N, Okada N, Miyaguchi K, Mogushi K, Takahashi K, Sato H, Michikawa C, Nakata Y, Tanaka H, Amagasa T. Gene expression changes in initiation and progression of oral squamous cell carcinomas revealed by laser microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Int J Cancer.* 2013; 132(3):540-8. 査読有
doi: 10.1002/ijc.27702.

[学会発表](計 10件)

森田琢磨、鵜澤成一、茂櫛薫、名生邦彦、高橋謙一郎、道川千絵子、炭野淳、出雲俊之、原田清 舌癌同一患者における原発巣-転移リンパ節間のゲノム異常の相同性と相違性について 第53回日本癌治療学会総会・学術大会 2015.10.31 国立京都国際会館(京都府京都市)

堀越 皓太、高橋 謙一郎、関谷 秀樹 Cetuximab 併用化学放射線療法中、再発性水痘を発症した1例 第69回日本口腔科学会学術集会 大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2015.05.14

福井 暁子、高橋 謙一郎、藤本 慶子、小山 修示、曾布川 貴弘、堀越 皓太、関谷 秀樹 大森病院周術期センターにおける口腔トリアージオーラルマネジメント(OM)方式の検討(第1報) 第145回東邦医学会例会 東邦大学(東京都大田区) 2015.02.19

森田琢磨、鵜澤成一、名生邦彦、高橋謙一郎、道川千絵子、炭野淳、守谷友二郎、出雲俊之、原田清 舌癌同一患者における原発巣-転移リンパ節間の全ゲノムコピー数異常の比較 第33回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 奈良県新公会堂(奈良県奈良市) 2015.1.30

鵜澤成一、道川千絵子、炭野淳、森田琢磨、高橋謙一郎、道泰之、大山巖雄、名生邦彦、原田清. 口腔癌頸部リンパ節転移被膜外浸潤の新たな分類に関する検討. 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会 幕張メッセ(千葉県千葉市) 2014.10.17

鵜澤 成一、高橋 謙一郎、茂櫛薫、森田琢磨、守谷友二郎、田中 博、原田清: 口腔癌に

おける腫瘍内 heterogeneity の頸部リンパ節
転移巣への影響. 第 52 回日本癌治療学会学
術集会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市),
2014. 8.28

鵜澤 成一, 高橋 謙一郎, 炭野淳, 守谷友
二郎, 森田琢磨, 道川千絵子, 原田清: 口腔
癌多段階発癌過程における遺伝子発現デー
タベースの構築. 第 38 回日本頭頸部癌学会,
東京ファッションタウンビル (東京都江東
区), 2014. 6.13

高橋謙一郎, 鵜澤成一, 大山巖雄, 炭野淳,
勝村早恵, 栢森高, 原田 清: 下顎骨に発生し
急速に進行した未分化癌の一例. 第 68 回
NPO 法人日本口腔科学会学術集会,京王プラ
ザホテル (東京都新宿区), 2014. 5.19

守谷友二郎, 鵜澤成一, 高橋謙一郎, 道川
千絵子, 炭野淳, 原田清: 上皮性異形成の癌
化に特異的に関与する遺伝子の発現. 第 67
回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 栃木
県総合文化センター(栃木県宇都宮市), 2013.
5.24

高橋謙一郎, 鵜澤成一, 茂柳薫, 守谷友二
郎, 田中博, 原田清: 高密度 SNPs
Microarrays を用いた口腔扁平上皮癌原発巣
と転移巣間での遺伝子 CNV 解析. 第 67 回
NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 栃木県
総合文化センター (栃木県宇都宮市), 2013.
5.23

5. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 謙一郎 (TAKAHASHI, Ken-Ichi ro)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号: 90613604

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし