

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670866

研究課題名(和文)口腔癌診療への liquid biopsy の応用

研究課題名(英文)Clinical application of liquid biopsy for oral cancer

研究代表者

中城 公一(Nakashiro, Koichi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90314880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔扁平上皮癌における liquid biopsy の可能性を検証することを目的とした。早期および進行口腔扁平上皮癌患者の原発腫瘍組織、血漿、白血球よりそれぞれ DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて 50 種類の癌関連遺伝子の変異解析を行った。その結果、早期および進行口腔扁平上皮癌患者いずれの原発腫瘍組織からも TP53 や PIK3CA に腫瘍特異的変異が検出された。しかしながら、血漿遊離 DNA から同一の腫瘍遺伝子変異が検出されたのは進行癌患者のみであった。よって、進行口腔扁平上皮癌に対して liquid biopsy が有用となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of our study was to evaluate the usefulness and possibility of liquid biopsy for the patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). DNA was extracted from primary tumor tissues, plasma, and white blood cells in the patients with early or advanced OSCC, and then analyzed the mutations of 50 cancer-related genes by the next generation sequencer. As a result, tumor specific mutations in TP53 or PIK3CA were detected in primary tumor tissues from both early and advanced cases. However, each tumor specific mutation was also detected in plasma DNA from only advanced cases but not early case. Therefore, liquid biopsy may be useful for the patients with advanced OSCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 Liquid biopsy

1. 研究開始当初の背景

1996年に腫瘍由来血中遊離 DNA (cell-free circulating tumor DNA: ctDNA) の存在が初めて報告され、その翌年には母体の血漿から胎児の DNA の検出が可能であることが明らかにされた。さらに、上咽頭癌患者の血漿から血中を循環する Epstein-Barr Virus (EBV) DNA の存在が検討された結果、感度 96%、特異度 94% という極めて高い精度で検出でき、早期癌でも検出できることが示された。また、EBV DNA の血中濃度は再発リスクと相関していた。1999年には、肝癌を含めた種々の癌腫と関連する DNA メチル化マーカーが ctDNA から検出され、癌のバイオマーカーとしての有用性が実証された。次いで、2009年にはデジタル PCR により腫瘍特有の突然変異、すなわち上皮成長因子受容体 (EGFR) の変異が ctDNA から検出された。これは、肺癌の EGFR 変異の状態からゲフィチニブに対する感受性を判定できることから癌診療に大きなインパクトを与える研究成果となった。

最近、口腔を含む頭頸部扁平上皮癌のエキソーム解析により口腔癌の悪性形質を支持する遺伝子変異が明らかにされた。これら遺伝子変異を利用した合成致死を誘導する薬剤や直接標的とする創薬は口腔癌の治療成績を向上させるだろう。現在、世界中で 47 種類の分子標的薬が承認され、種々の疾患の治療に用いられているが、2025年には約 140 種類の分子に対して約 500 種類の分子標的薬が上市される見込みである。ここで、重要となるのは口腔癌に対してどの分子標的薬を選択して治療に用いるかである。それは、おそらく個々の症例の腫瘍遺伝子変異に依るところになると考えられる。これまでに、われわれは口腔癌患者の血液あるいは唾液中に含まれる特有の microRNA、蛋白質、代謝産物などを網羅的解析により同定してきた。しかしながら、これらは口腔癌の早期発見や治療後のモニタリングには有用となるものの、治療法すなわち分子標的薬の選択に何らかの示唆を与えるものではない。一方、ctDNA の検出は口腔癌の存在を示すものとなるし、ctDNA のシーケンシングは各症例の腫瘍遺伝子変異の把握を可能にする。今後、分子標的薬の選択において重要となる検査が ctDNA を対象とした liquid biopsy である。

2. 研究の目的

本研究では、口腔癌診療における liquid biopsy の有用性を明らかにすることを目的とした。すなわち、口腔癌患者の腫瘍組織および血漿より DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて腫瘍遺伝子変異を検出した。腫瘍 DNA および血漿 ctDNA から検出される腫瘍遺伝子変異が合致するかどうかを検討した。

3. 研究の方法

早期および進行口腔扁平上皮癌患者 (各 1 名) より手術前に採血 (7 ml) し、血漿および白血球を分離採取した。つづいて、手術時に切除標本より癌組織を採取した。血漿からは QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (キアゲン) を用いて ctDNA を抽出した。また、癌組織および白血球からは DNeasy Blood and Tissue Kit (キアゲン) を用いて genomic DNA を抽出した。

各検体より抽出した DNA (10 ng) から AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いてターゲットエンリッチアンプリコンライブラリーを作成した。変異解析対象遺伝子を以下に示す。

ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAS, GNAQ, HNF1A, HRAS, IDH1, JAK2, JAK3, IDH2, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, VHL

つづいて、デスクトップ型次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ) にてディープシーケンシングを行った。得られたシーケンスデータをサーモフィッシャーサイエンティフィック社から無償提供されている変異解析ソフトウェア Torrent Variant Caller を用いて解析した。白血球 genomic DNA からは検出されず、癌組織 genomic DNA においてのみ検出される変異を腫瘍遺伝子変異とした。次に、患者由来の血漿 ctDNA から癌組織と同一の腫瘍遺伝子変異が検出されるかどうかを上述の方法にて評価した。変異が検出された場合は、QuantStudio3D (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いたデジタル PCR 法にて変異の有無について再検証を行った。

4. 研究成果

早期および進行口腔扁平上皮癌患者 (各 1 名) の原発腫瘍組織、血漿、白血球よりそれぞれ DNA を抽出し、上記 50 種類の癌関連遺伝子の 2,790 種類の変異の有無について解析した。平均リードデプスは約 5,000 であった。その結果、早期および進行口腔扁平上皮癌患者原発腫瘍から TP53、PIK3CA に腫瘍特異的変異が検出された。しかしながら、ctDNA から癌組織と同一の腫瘍特異的遺伝子変異が検出されたのは進行口腔扁平上皮癌患者のみであった (表 1, 2)。ただ、その変異検出率は 0.2% と極めて低値であったため、デジタル PCR 法を用いて再解析を行ったところ、同一の腫瘍特異的遺伝子変異が 0.3% の頻度で再度検出された (図 1-4)。

表 1. 早期口腔扁平上皮癌患者の変異頻度

Gene	Mutation	Primary tumor	WBC	Plasma
PIK3CA	H1047R	26.3	0	0
TP53	R234H	17.3	0	0
TP53	C137Y	36.8	0	0

表 2. 進行口腔扁平上皮癌患者の変異頻度

Gene	Mutation	Primary tumor	WBC	Plasma
TP53	R174*	78.49	0.07	0.2



図 1. Negative Control (デジタル PCR)

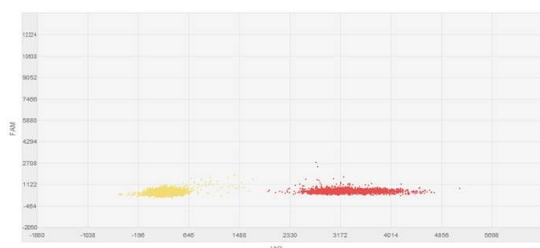


図 2. 白血球 genomic DNA
腫瘍遺伝子変異の検出率は 0% であった。
全て wild-type (赤) であった。

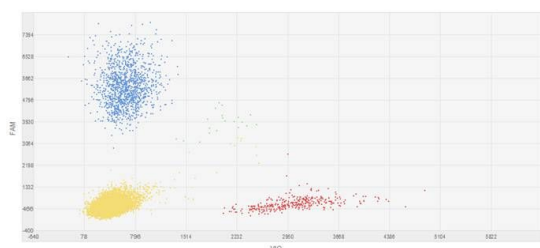


図 3. 原発腫瘍組織 genomic DNA
腫瘍遺伝子変異の検出率は 80% (青) であった。

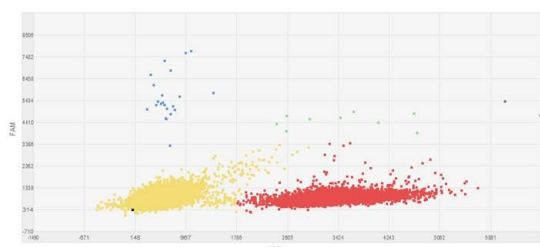


図 4. 血漿 ctDNA
腫瘍遺伝子変異の検出率は 0.3% (青) であった。

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 6 件)

Oka R, Nakashiro K, Goda H, Iwamoto K, Tokuzen N, Hamakawa H. Annexin A8 is a novel molecular marker for detecting lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7:4882-9,2016 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.6639

Tokuzen N, Nakashiro K, Tanaka H, Iwamoto K, Hamakawa H. Therapeutic potential of targeting cell division cycle associated 5 for oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7:2343-53,2016 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.6148

Nakashiro K, Tanaka H, Goda H, Iwamoto K, Tokuzen N, Hara S, Onodera J, Fujimoto I, Hino S, Hamakawa H. Identification of Akt1 as a potent therapeutic target for oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 47:1273-81,2015 査読有 doi: 10.3892/ijo.2015.3134

中城公一、浜川裕之、口腔癌診療への microRNA の応用、*愛媛医学* 34:160-5,2015、査読無

Iwamoto K, Nakashiro K, Tanaka H, Tokuzen N, Hamakawa H. Ribonucleotide reductase M2 is a promising molecular target for the treatment of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 46:1971-7,2015. 査読有 doi: 10.3892/ijo.2015.2912

Fujita Y, Okamoto M, Goda H, Tano T, Nakashiro K, Sugita A, Fujita T, Koido S, Homma S, Kawakami Y, Hamakawa H. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 9:e110378,2014. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0110378

[学会発表](計 3 件)

岩本和樹、中城公一、亀井直樹、徳善紀彦、秋山仁志、寺門永顕、浜川裕之、口腔扁平上皮癌に対する liquid biopsy の試み、第 40 回日本頭頸部癌学会、2016 年 6 月 10 日、ソニックシティー(埼玉県さいたま市)

中城公一、遺伝子制御破綻による口腔粘膜の悪性化、シンポジウム「口腔粘膜の悪性化を捉える」、第 25 回日本口腔内科学会学術大会、2015 年 9 月 19 日、大阪大学（大阪府吹田市）

中城公一、田中宏史、岩本和樹、徳善紀彦、浜川裕之、口腔癌診断・治療への microRNA の応用、シンポジウム「口腔癌研究のシーズを探す」、第 68 回日本口腔科学会学術集会、2014 年 5 月 9 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6．研究組織

(1)研究代表者

中城 公一（Nakashiro, Koichi）

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90314880