

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10827

研究課題名(和文) 頭頸部癌における機能温存を目指した集学的治療に対するバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of biomarkers for multimodality treatment aimed at function preservation in head and neck cancer

研究代表者

家根 旦有 (YANE, Katsunari)

近畿大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40220199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌基礎研究会の14施設から収集した中咽頭癌stage III / IV 80例を、次世代シーケンサーを用いて分析した。80例中HPV陽性は56例(70%)、HPV陰性は24例(30%)であった。HPV陽性ではPIK3CAが最も多いゲノム変化であり(12例,21.4%)、次にFGFR3(5例,8.9%)、PTEN(4例,7.1%)であった。HPV陰性では、TP53(11例,45.8%)が最も多い変異であった。これらの結果は、日本における中咽頭癌のゲノム変化が他の国の遺伝子変異と比べて相違のないことを示した。今後は、HPVの状況によって異なる治療法を考慮する必要があると思われる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed 80 fresh frozen samples using next generation sequencing. The samples were obtained in patients with previously untreated stage / oropharyngeal cancer who underwent multimodality therapy at 14 Japanese hospitals that were the member of the Japan Cooperative Study Group for Basic Research in Head and Neck Cancer. Among 80 samples, HPV+ was 56 cases (70%) and HPV- was 24 cases (30%). In HPV+ samples, PIK3CA was the most common genomic alteration (12, 21.4%), the second one was FGFR3 (5, 8.9%) and the third one was PTEN (4, 7.1%). In HPV- samples, TP53 (11, 45.8%) was most frequently altered. These results indicate that genomic alterations in Japanese oropharyngeal cancers are not different in those in other countries. We may have to consider the different treatment by HPV status.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：中咽頭癌 HPV バイオマーカー ゲノム解析 分子標的薬 集学的治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌に対して2012年12月に我が国で初めてEGFR抗体薬であるセツキシマブが保険適応となり急速に臨床応用が拡大しているがその治療効果は限定的なものである。セツキシマブの投与前にその治療効果を予測することができれば患者にとって有害事象の回避や医療経済的な面からも非常に有益である。本来は治療効果を予測する「バイオマーカー」を指標にして投与するべきであるが現在頭頸部癌において有効なものはない。

(2) 近年、頭頸部扁平上皮癌のうち中咽頭癌の発症原因としてHPV感染の関与が注目されており、本邦においても約50%がHPV陽性であると報告されている。HPV陽性癌はHPV陰性癌に比べて予後は良好で、化学放射線療法に対する感受性は高いと報告されている。HPV陽性の中咽頭癌はセツキシマブに感受性が高いという報告がありHPV感染と抗EGFR抗体薬の治療効果には何らかの関連があると考えられている。

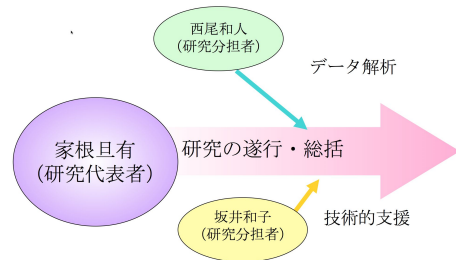
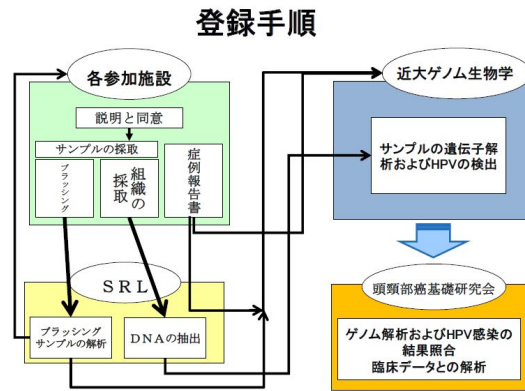
2. 研究の目的

(1) 中咽頭癌においてセツキシマブを併用する放射線治療が一般的に行なわれているが治療効果を予測する指標は示されていない。近年の報告でHPV陽性の中咽頭癌はセツキシマブ併用放射線治療の感受性が高いとの報告があり、HPV感染の有無で中咽頭癌の治療に対して標準治療であるプラチナ系製剤とセツキシマブとの選択が必要と考えられている。そこで、HPVを指標とした中咽頭癌における抗EGFR抗体薬の治療効果を予測する「バイオマーカー」の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) セツキシマブ著効例を集めるために、すでに中咽頭癌のHPV感染調査で実績のある頭頸部癌基礎研究会を通じて国内から広くサンプルを集める。サンプルの回収は(株)SRLが行いDNAを抽出し、DNAの保管管理は近畿大学で行う。抽出したDNAは近畿大学ゲノム生物学で次世代シーケンサーを用いることによって既知の癌遺伝子および癌抑制遺伝子の変異、コピー数、遺伝子発現、エクソームの解析を行う。特にEGFR関連の遺伝子変異の解析を重点的に行うが、未知の新規遺伝子の探索も行う。HPV感染の有無はすでに頭頸部癌基礎研究会で実績のあるブラッシングによるハイブリッドキャプチャー法と、HPVの型判定が可能なPCR法を用いて検索する。最終的には頭頸部癌基礎研究会で臨床データとの解析を行い、治療予測を可能とする新しいバイオマーカーの探索を行う。研究体制は研究代表者の家根且有が研究の全過程の遂行と総括を行う中で、研究分担者(坂井和子)が実験の技術的な支援を行い、もう一人の研究分担者(西尾和人)が

データの解析を担当する(図参照)



(2) HPV 検査

ハイブリッドキャプチャー法
高リスク型の HPV13 種類 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 型)を一括して検出できるグループ検査法で、患部のブラッシングで検体を採取し、混合RNAプローブを用いた液相ハイブリダイゼーション法により検出する。本法は(株)SRLにて検査を行う。

HPV 型判定検査

抽出したDNAを TaKaRa PCR Human Papillomavirus Detection Set (TaKaRa Bio Inc. #6602) および TaKaRa Human Papillomavirus Typing Set (TaKaRa Bio Inc. #6603) を用いて PCR にて検出する。本法は東京医療センターにて検査を行なう。

免疫組織学的検査

HPVの感染を間接的に反映すると考えられ、世界的に代替マーカーとして用いられている p16 免疫染色 (CINtec p16 Histology: clone E6H4) を行う。本法は東京医療センターにて検査を行なう。

(3) ゲノム解析

ゲノム解析の方法は次世代シーケンサー IonProton システム (Life Technologies 社) を用い、体細胞遺伝子の解析には Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 を用いて約 250 種の既知の体細胞変異解析を行なう。ゲノム解析は近畿大学ゲノムセンターにて検査を行なう。

4. 研究成果

頭頸部癌基礎研究会のメンバーで平成28年12月末までに倫理委員会の承認を得ることができた14施設(近大奈良、東京医療センター、神戸大、北海道大、佐賀大、京都大、九州大、東海大、市立三次中央、奈良医大、金沢医大、藤田保健衛生大、高知大、岐阜大)からサンプルを回収し、(株)SRLにてハイブリッドキャプチャーII法を行い、東京医療センターでPCRによるHPV-DNA検査およびp16免疫染色検査、近畿大学医学部ゲノム生物学教室ではゲノム解析を行なった。採取されたサンプル数は85件で、その内すべての検査が可能であった80例を対象とした。内訳は男性68例、女性12例で、stage3は15例、stage4は65例であった。喫煙歴は喫煙有66例、喫煙無14例、飲酒歴は飲酒有60例、飲酒無20例であった。

HPV検査の結果はPCR法によるHPV陽性は56例(65.9%)、ハイブリッドキャプチャーII法による陽性は54例(63.5%)、16免疫染色法による陽性率は49例(57.6%)で、すべての検査方法が可能であった80例を研究対象とした。その結果、HPV陽性は56例(70%)、HPV陰性は24例(30%)であった。

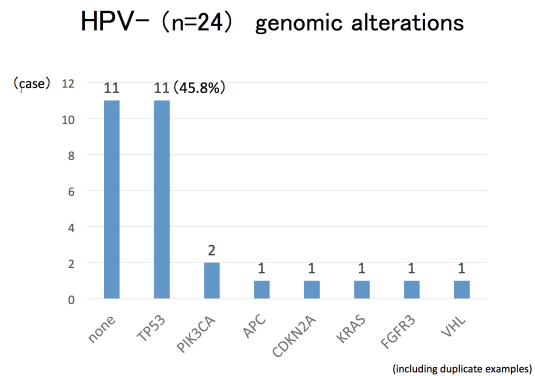
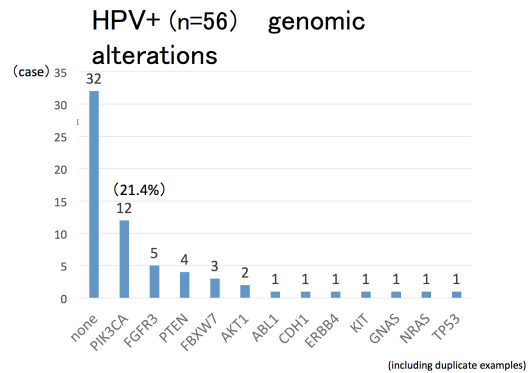
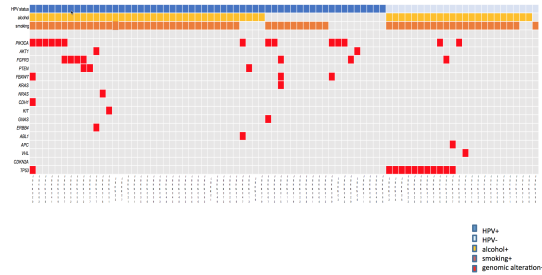
次世代シーケンサーで行なった遺伝子解析の結果は、HPV陽性ではPIK3CAの遺伝子変異が最も多く12例(21.4%)、次いでFGFR3 5例(8.9%)、PTEN 4例(7.1%)であった。HPV陰性ではTP53 11例(45.8%)、次いでPIK3CA 2例(8.3%)であった。飲酒・喫煙歴の無い症例は9例で、全例がHPV陽性でPIK3CA変異は3例(33.3%)であった(図参照)。

今回の多施設共同研究の結果は、日本でも諸外国と同様にHPV陽性はPIK3CAの変異が多く、HPV陰性ではTP53の変異が多い傾向を認めた。今回の対象症例に関して予後調査はまだ行なわれておらず、2018年度以降に予後調査が行なわれる予定である。

今後の研究の推進方策は、HPV感染の有無による遺伝子変化の差、放射線照射や化学療法の反応性、治療による奏効率、予後について遺伝子変化との相関について解析する。化学療法については現在標準治療となっているCDDPとセツキシマブの反応性をHPV statusによる差について検討し、反応性の違いがHPV感染による遺伝子変化の違いによるものかを検討する。HPV陽性例は放射線照射や化学療法のいずれの治療にも治療成績は良好であることから、HPV陽性例は低侵襲の治療でも従来の治療成績より劣ることはないかと推測され、欧米ではHPV陽性例に対する低侵襲治療の臨床試験が現在行われている。今回次世代シーケンサーによって得られた遺伝子検査のデータと各症例の臨床情報を分析することによって、HPV陽性例の放射線量の軽減、CDDPと併用する化学放射線治療(CRT)より低侵襲と考えられているセツキシマブ

との併用である放射線治療(BRT)への治療方法の変更など、低侵襲治療の可能性を探索する。これらの結果から、最終的にはHPV関連中咽頭癌の治療効果を予測する新しいバイオマーカーの開発と、頭頸部がん治療ガイドライン作成の元になるエビデンスを創出したいと考えている

遺伝子解析の結果



Correlation of the HPV status and genomic mutation

Gene	mutation	HPV+		P
		No.	No.	
p53	-	55	13	*0.001
	+	1	11	
PIK3CA	-	44	22	0.1578
	+	12	2	
FGFR3	-	51	23	ND
	+	5	1	
PTEN	-	52	24	ND
	+	4	0	
FBXW7	-	53	24	ND
	+	3	0	
AKT1	-	54	24	ND
	+	2	0	

*P < 0.05 (chi-square test). ND, not determined.

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)

1. 家根旦有: 頭頸部癌学-診断と治療の最新研究動向- 頭頸部癌の予防. 日本臨床 75(2) 査読無 :599-603, 2017、
<http://www.nippon-rinsho.co.jp>
2. 家根旦有: 頭頸部がんの現状とその予防. 奈医報 査読無 30(1):94-97, 2017、
<http://nara.med.or.jp/>

[学会発表](計3件)

1. 家根旦有: Analysis of genomic alterations in HPV+ and HPV- oropharyngeal cancer using next generation sequencing in Japan Cooperative Study Group, 第76回日本癌学会学術総会, 2017,9,28, 横浜
2. 家根旦有: HPV 関連中咽頭癌の治療最適化に関する研究, 第2回日本 HPV 研究会, 2017,10,19, 東京
3. 家根旦有: 頭頸部における HPV 感染, 第1回日本 HPV 研究会 2016.10.19, 横浜,

[その他]

1. 家根旦有: コラム 頭頸部がん と HPV. 藤井正人(監)田原信、清田尚臣(編), 頭頸部がん薬物療法ハンドブック(改訂2版), pp95, 東京, 2017.

<http://www.ebookstore.m2plus.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

家根 旦有 (YANE, Katsunari)
近畿大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 40220199

(2)研究分担者

坂井 和子 (SAKAI, Kazuko)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号: 20580559

藤井 正人 (FUJII, Masato)
独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・その他部局員・研究員

研究者番号: 70129633

(3)連携研究者

西尾 和人 (NISHIO, Kazuto)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号: 10208134