



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the role of MicroRNA-296-3p in the malignant transformation and liquid biopsy for the metastasis in head and neck cancer [an abstract of entire text]
Author(s)	蠣崎, 文彦
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2199 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12095号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61766
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiko_Kakizaki_summary.pdf



学位論文（要約）

Studies on the role of MicroRNA-296-3p in the
malignant transformation and liquid biopsy for the
metastasis in head and neck cancer

（頭頸部がんにおける悪性転化に関する MicroRNA-296-3p
の役割および転移に関するリキッドバイオプシーの研究）

2016 年 3 月

北海道大学

蠣崎 文彦

学位論文（要約）

Studies on the role of MicroRNA-296-3p in the
malignant transformation and liquid biopsy for the
metastasis in head and neck cancer

（頭頸部がんにおける悪性転化に関する MicroRNA-296-3p
の役割および転移に関するリキッドバイオプシーの研究）

2016 年 3 月

北海道大学

蠣崎 文彦

本論文全体の緒言

頭頸部がん (口腔、上・中・下咽頭、喉頭、鼻副鼻腔、唾液腺、甲状腺、頸部食道がん等) のうち、頭頸部扁平上皮がんの罹患率は全がんのうち約 5%程度であり、発生部位により治療法、予後が異なるのが特徴である。発症要因で知られているのは飲酒と喫煙である。その他、中咽頭がんと口腔がんでは human papilloma virus (HPV) 感染などウイルス感染の関与も報告されている。

最近の 20 年間で頭頸部がん治療において、手術技術・放射線・化学療法の技術の進歩はみられるが、頭頸部がんの生存率の明らかな向上に結びついていない。HPV 関連の頭頸部がんの場合は放射線や化学療法に対する治療効果が高く予後良好であるが、頸部リンパ節転移をきたしやすく、HPV が関連するがんか否かで治療強度を決定した方が有益であると考えられている。同様に、ある特定の遺伝子の発現異常や変異、細胞・タンパク発現異常が予後規定因子となる可能性があり、これら原因遺伝子に対する個別化治療が確立した場合には頭頸部がん患者の予後改善につながることを期待される。

本論文ではまず第 1 章において、HPV が関与する鼻腔乳頭腫の悪性化に関する microRNA (miRNA) に関して免疫組織化学的手法を用いて明らかにし、さらに第 2 章では、頭頸部がんにおいても予後予測因子や治療反応の指標となりうる血性試料を用いたリキッドバイオプシー検体から施行した遺伝子解析に関して検討する。

第一章

鼻腔内反性乳頭腫の悪性転化に関する MicroRNA-296-3p の役割

本章に関連した緒言

鼻腔内反性乳頭腫 (Inverted papilloma : IP) は、鼻腔や副鼻腔に生じる良性腫瘍である。しかし、5-15%の患者では扁平上皮がん(Squamous Cell Carcinoma : SCC) への悪性転化が見られるため、IP と診断された場合には根治的治療が必要とされ、近年の頭蓋底手術、内視鏡手術の発展や、手術支援器具の進歩により機能面、整容面を損なうことなく切除が可能となったが、中には再発し複数回の手術が必要となる患者も存在する。発がんに関連する高リスク型 human papilloma virus (HPV) 感染は、IP の発症や悪性化に関連すると考えられ、その発がんは、p53 や pRB 経路などのがん抑制因子の障害によると推測され、細胞周期の調節やがん抑制遺伝子の機能喪失によるものと考えられている。IP のがん化モデルは、同一検体において、正常上皮細胞、異型細胞 (IP、dysplasia)、SCC 細胞を有しそれぞれを比較することができるため、優れた解析対象である。miRNA は、約 19-22 ヌクレオチドの小さく、タンパクには翻訳されない遺伝子 (non-coding RNAs) であり、遺伝子発現を制御することや、がん化、分化、アポトーシス、転移に関連する。頭頸部領域では、SCC で miRNA が顕著に発現し、発がんや化学療法抵抗性に関連することが報告されている。本件球では、IP の悪性化における miRNA の役割と制御を受ける分子機構を明らかにすることを目的とした。

実験方法

北海道大学病院耳鼻咽喉科で 1993 年から 2012 年の間に治療された鼻腔 IP の 25 患者から採取された 36 検体を対象とした。年齢の中央値は 64.7 歳 (範囲 39-93 歳)であった。病理組織を同定しホルマリン組織から DNA を回収した。クオリティチェックを行い、754 種類の miRNA に関して Taqman アレイを用いしらべた。その結果の解析は、data assist を用いた。miRNA ミミックとインヒビターとネガティブコントロールを SCC25 細胞にトランスフェクトさせ、48 時間以上経過後回収した。タンパク濃度を標準ブラッドフォードアッセイで定量し、SDS-PAGE で分離しニトロセルロースメンブレンに移し、phosphatase and tensin homolog (PTEN)、p21 と β -Actin でインキュベートし、その発現をウェスタンブロット法で評価した。腫瘍組織は 4-mm の厚みで薄切し、脱パラフィン化、脱水し、内在性のペルオキシダーゼ活性を抑制した。スライドをヒト PTEN と p21 の特異的モノクローナル抗体でインキュベートし、その後二次抗体でインキュベートした。ナガタ法に基づき免疫組織化学染色で免疫反応スコアの評価を行った。

実験結果

1. IP と SCC 間の miRNA 発現の差

計 8 人の患者から IP と SCC からそれぞれ 5 検体ずつ (2 検体は同一患者から) 採取し、IP の発がんにおける miRNA の役割を検討した。RT-PCR アレイを用いて、754 種類の固有の miRNA の発現分析を行った。IP と SCC の間で最も発現の差を示した miRNA の中で miR-296-3p に着目した。これは、IP では SCC と比較し 23 倍の減少を示し、また、IP と同患者の SCC との間の発現において 76 倍の差を示した。miRNA は複数の遺伝子を調節するため、miR-296-3p に関して TargetsScan 6.2 を用いて検索を行った。その結果から、miR-296-3p が標的とする遺伝子のリストを得た。この中から、PTEN に注目した。PTEN は腫瘍抑制因子として同定されたタンパク質であり、p53 および RB 経路に関与していることが知られている。これらの結果から、miR-296-3p が PTEN に作用し、IP の悪性化に関連するという仮説を立てた。

2. 頭頸部 SCC 細胞における miR-296-3p の直接標的としての PTEN

miR-296-3p が PTEN のどの塩基配列に作用しうるかを検討した。コンピュータ解析により、miR-296-3p の 5'シード領域の 7ヌクレオチドが PTEN の 3'側の非翻訳部位 (untranslated region : UTR) に相補的であり、これにより PTEN を標的とする可能性が示唆された。次に、生体内でどのように働くかを評価する目的で、ウェスタンブロット法で評価した。ヒト舌扁平上皮がん細胞株 SCC25 に、miR-296-3p をトランスフェクトさせ、ウェスタンブロット法で PTEN の発現を確認した。miR-296-3p をトランスフェクトさせた細胞ではネガティブコントロールに比べ、PTEN の発現が著しく低下した。

今までに、miR-296 のうち、miR-296-5p は p21 を標的にすること報告されており、p21 はサイクリン依存性キナーゼ阻害剤であり、p53 によって調節され、頭頸部 SCC の発がんに関与している。これらの知見と結果をあわせ、miR-296-3p も p21 に影響を与えるという仮説を検討した。そこで、同様に miR-296-3p を SCC25 にトランスフェクトさせ、ウェスタンブロット法で p21 の発現を検討したが、コントロールと比較して p21 の発現に明らかな違いは見られなかった。

3. IP と SCC における PTEN と p21 の発現と臨床病理学的特徴との相関

PTEN と p21 の免疫組織化学的検討を行った。その内訳は、非異形成 IP (IP non-dysplastic) は 6 検体、SCC のみの検体は 7 検体、SCC と IP が共存しているものは 12 検体あり、そのうちの 1 検体では IP の部位は状態が悪かったため、11 検体を使用し、IP が共存する SCC の部位は、全 12 検体を使用した。その結果、IP は 17 検体、SCC は 19 検体使用した。PTEN の発現は、腫瘍細胞の核だけで

はなく細胞質で主に観察された。PTEN 染色陽性検体は、17 検体中 13 検体 (76.4%) の IP に認められ、SCC の 19 検体中 4 検体 (21.0%) と比較すると有意に高い割合であった ($P = 0.0005$)。また、p21 染色陽性検体は、17 検体中 11 検体 (64.7%) であり、SCC の 19 検体中 5 検体 (26.3%) と比較すると有意に高い割合であった ($P = 0.0086$)。

考察

miRNA の発現変化を IP と SCC の間で解析したところ、多くの miRNA の発現が変化した。遺伝子配列からは多くの遺伝子発現が一つの miRNA から制御できることが理論上は可能であるが、実際には干渉しないことも多い。SCC で発現が増加していた miR-296-3p は、実際にがん抑制遺伝子である PTEN の発現を抑制しており、免疫組織化学染色においても IP と SCC において、PTEN の発現量に違いを認めた。miR-296 は、乳がん、神経膠腫、食道がんで過剰発現しているという報告があったが、これらは全て miR-296-5p であり、今回の miR-296-3p とは、標的遺伝子は異なっていた。コンピュータ解析では、miR-296-3p は 66 種類の標的遺伝子を持っており、この中には、PTEN の他にも発がん関連遺伝子が含まれているがわかった。

PTEN は、がん抑制遺伝子であり、p53 および RB 経路に關与する。PTEN の転写は、p53 により活性化され、PI3K/Akt シグナル伝達経路を阻害して細胞の生存に対し負の調節を行う。この PTEN や、PI3K/Akt シグナル伝達経路は、頭頸部 SCC の発がんにおいても關与し、頭頸部 SCC では 8-30% の PTEN の変異や欠損がある。本研究では、200 種類以上の miRNA は、がん化の過程で 2 倍以上発現が変化した。miR-296-3p 一つにおいても、66 種類の遺伝子が標的候補であった。miR-296-5p と -3p では p21 の制御機能が異なり、同じ miRNA であっても干渉する方向によって制御される分子も異なることから、がん化において、多くの miRNA が変化した、莫大な数の遺伝子に影響を与えることが想定され、互いに分子間で与える変化は非常に複雑であることが想定される。より網羅的で機能的なバイオインフォマティクス解析を今後も進めていきたいと考えられた。

第二章

固形がんにおける liquid biopsy に関する 検討

本章に関連した緒言

近年のがん研究の成果の一つとしてがんの原発巣と転移巣の遺伝子背景が必ずしも完全に一致しないということが明らかとなり、また、原発巣の中でも不均一性 (heterogeneity) がある。治療を効果的に行うには、標的となるがんの遺伝子を個々の状況でリアルタイムに知ることが重要となる。その目的を達成するために再生検が必要となるが、これまでの生検は固形がんを対象としたが、2008 年頃より血液中から回収した核酸や腫瘍細胞を解析する手技として、liquid biopsy という液性試料を対象とした生検が報告されるようになった。固形がんから組織採取を頻回に繰り返すことは非常に困難であるが、血液採取は比較的容易であり、今後日常的な検査手技となりうる。

固形がん患者の末梢血液中には微少ながん細胞が循環し存在し、これを末梢循環腫瘍細胞 (CTC) と呼ぶ。1869年にオーストラリアの医師Ashworthによって最初に報告された。現在の主流となっているのは、Veridex社のCellSearch[®] systemを用いた研究であり、CTCの数が多ければ予後不良であると報告されている。これは、腫瘍細胞の上皮性接着分子 (epithelial cell adhesion molecule : EpCAM) の発現に基づく抗体との反応でCTCの同定を行うが、EpCAMを発現しないCTCもある。本研究では微小流体と遠心力を用いて形態やサイズの違いで分離するCTChip-Spiral[®] systemを用いて腫瘍細胞を他の血中細胞から分離する方法を使用した。

本研究の目的と意義は、腫瘍は薬物療法により腫瘍の特徴が変化することが明らかであり、薬剤耐性機序を解明するには治療前および増悪後の分子異常の解析が必要であると考えられるが、生検は侵襲的な手技である。よって、侵襲が非常に少ない末梢血採取でCTCを分離し、そのCTCの遺伝子解析・タンパク発現解析を行うことで、治療効果との相関性や化学療法の治療反応性および予後予測が可能となれば、大変有意義であると考えた。本研究ではCTCおよびctDNAからNGSを用いた遺伝子解析法を確立することを目的とした。

方法

患者の選択は、再発、切除不能の消化管がん (11 人の結腸直腸がん、1 人の胃がん、8 人の食道がん)、および Stage III 以上の進行頭頸部がん 13 人の計 33 人の患者が登録された。大腸がんに関しては PCR 法や免疫組織化学染色などを用いて原発巣の KRAS 遺伝子変異の確認を行った。

CTC 検体の調製は 7.5~10 mL の EDTA 処理チューブに採取し、採血後 3~4 時間以内に処理を開始した。CTChip-Spiral[®] system を用いて CTC を回収した。CTC 検体からの DNA 回収は WGA Kit である REPLI-g Single Cell Kit を使用した。

また、血液からの ctDNA 抽出は、QIAamp circulating nucleic acid kit を使用し

た。原発巣からの DNA 抽出は、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いた。頭頸部がん患者は原発巣の凍結組織を用い、PureLink genome DNA Mini Kit を用い DNA を抽出した。また、buffy coat からの DNA 抽出は、QIAamp DNA Mini Kit を用いて回収した。buffy coat は正常細胞の遺伝子変異 (生殖細胞変異) として CTC、ctDNA、原発巣のバックグラウンドをとるために採取した。

CTC の同定検出は抗ケラチンサイトケラチンモノクローナル抗体と二次抗体反応を行い評価した。CK 陽性細胞は 3-133 CTCs/mL (中央値 14.5 CTCs/mL) であった。

次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing : NGS) は Ion Ampliseq Library Kit 2.0 を使用し Library を作成した。標的遺伝子パネルは 5× Ion Ampliseq Cancer Hot Spot Panel v2 を使用した。アダプター結合後に、AMPure ビーズを用い精製を行い、その後増幅し、得られたライブラリーをさらに精製した。ライブラリー濃度は Ion Library TaqMan Quantitation Kit を使用し、StepOnePlus real time PCR machine で計測した。その後、ライブラリーを 8 pM に希釈し、Ion PGM Template OT2 200 Kit を用い、エマルジョン PCR、及び濃縮を施行し、Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 を使用しシーケンスを施行した。

実験結果

登録された 33 患者の検体 (CTC、ctDNA、buffycoat、原発巣) に関して NGS を施行した。その結果を Ion Reporter (Life Technologies 社、USA) の AmpliSeq CHPv2 tumor-normal pair v5.0 を用いて解析した。正常細胞 (buffy coat) で変異が認められないもの (frequency=0) でかつ腫瘍細胞 (CTC、ctDNA) で変異が 2%以上、coverage depth が 200×以上 (範囲 : 256×・2000×) の変異を体細胞変異として抽出した。

< 1 > CTC で同定された体細胞変異

10 検体で遺伝子変異を確認した (10/33、30.3%)。

大腸がんで KRAS 遺伝子変異を確認できたものは、1 検体 (1/11、9.1%) であったが、codon12 および 13 の変異は認めなかった。頭頸部がんでは、CDKN2A (p16) や TP53 の変異がそれぞれ 1 検体で確認された (各 1/13、7.7%)。頭頸部がんでは、synonymous な変異 (塩基置換を認めるが、アミノ酸置換を認めない変異) は認めなかった。食道がんは 2 検体に変異を認めた。胃がんには変異は認められなかった。

< 2 > ctDNA で同定された体細胞変異

16 検体 (17/33、48.5%) で遺伝子変異を確認した。

最も変異を認めた遺伝子は TP53 であり 9 検体 (9/33、27.3%) に認めた。

大腸がんでは 3 患者で KRAS 遺伝子変異を確認した。患者 5 では KRAS codon12

(KRAS c.35G>A (G12D)) を認め、2 人の患者では KRAS codon13 (KRAS c.38G>A (G13D)) を認めた。APC では 4 検体中 2 検体に nonsense 変異を認めた。

食道がんでは 6 検体 (6/8、75%) に変異を認めた。

頭頸部がんでは 4 検体 (4/13、30.8%) で遺伝変異を認めた。TP53 の変異が 1 検体 (1/13、7.7%) に認められた。synonymous な変異も 2 検体に認められた。

胃がんには変異は認められなかった。

< 3> 原発巣との体細胞変異の比較

大腸がん患者は事前に KRAS 遺伝子変異を確認しており、KRAS wild type は 6 患者、変異は 5 患者 (codon12 変異は 4 患者、codon13 変異は 1 患者) であった。原発巣の遺伝子変異と CTC、ctDNA の遺伝子変異の結果とを比較した。

なんらかの KRAS 遺伝子変異を確認できたものは、CTC では 1 検体、ctDNA では 3 検体であった。FFPE と ctDNA の KRAS 遺伝子変異の位置が一致する患者もいた。また、2 人の患者ではそれぞれ KRAS codon12、13 の変異が事前に確認されており、ctDNA でも同一部位の変異が確認された。

考察

今回の研究では CTC を増殖させてから DNA を抽出し、NGS のために必要な量の CTC 由来の DNA の回収を試みたが、非常に培養が困難であった。また、免疫組織化学染色を行った結果では回収された CTC は 3~133 CTCs/mL であった。しかし、これでは NGS に必要な DNA 量に満たないため、全ゲノム増幅を行った。CTC を回収するデバイスの主流は、上皮性マーカーを用いたものであるが、本研究では上皮性マーカーを用いない、微小流体を用いる方法を用いた。この方法では間葉系の性質を持った CTC やサイズの大きさの不均一な CTC を分離回収できることが利点であるが、問題点としては、リンパ球の混在が起るため、純粋な CTC を回収することが困難であることがあげられる。

NGS では CTC の体細胞変異を解析できた。今回の結果からは CTC と ctDNA の体細胞変異は必ずしも一致しない可能性が示唆された。その理由としては CTC は細胞数が少なく、解析に至るまでの処理が多いことや CTC と ctDNA では観察しているそのものが異なることが考えられた。また、CTC では 10 検体、ctDNA では 16 検体で変異を確認した。現時点では ctDNA の方が安定して NGS を行うことが可能であった今回大腸がんでは KRAS 遺伝子変異に関して、原発巣の免疫組織化学染色と FFPE を 3 検体で比較したが、1 検体では KRAS codon12、13 以外の変異を確認した。免疫組織染色と FFPE の採取時期が異なっているため、治療経過により体細胞変異が変化する可能性も示唆された。頭頸部がんのリキッドバイオプシーから得ることができた体細胞変異は、CTC で 3 検体、ctDNA で 4 検体と大腸がんの変異 (CTC で 5 検体、ctDNA で 6 検体) と比較す

ると少なかった。

現在まで ctDNA から NGS を行ったという報告はなされており、将来的に臨床応用される可能性が見えてきたが、CTC から NGS を行う方法はいまだに確立していない。本システムを用いて回収した CTC から NGS を用いた体細胞変異解析ができる可能性が示唆されたことは、現在までになく非常に有意義であった。

結論

CTChip-Spiral system を用いて固形がん患者より CTC、ctDNA の遺伝子変異を NGS を用いて確認した。

全体の結論

第一章では、良性と悪性病変の間で miRNA や PTEN 遺伝子の発現量に違いを認め、今後は網羅的な検索が必要と考えられた。

第二章では、CTChip-Spiral[®] system を用いて固形がん患者より CTC、ctDNA の遺伝子変異を NGS を用いて確認し、今後は臨床応用のために研究が必要と考えられた。