



Title	Studies on the role of MicroRNA-296-3p in the malignant transformation and liquid biopsy for the metastasis in head and neck cancer
Author(s)	蠣崎, 文彦
Description	配架番号 : 2199
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12095号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12095
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67218
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiko_Kakizaki.pdf



学位論文

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

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

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
本論文全体の緒言	2 頁
第一章	3 頁
本章に関連した緒言	4 頁
略語表	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	12 頁
考察	19 頁
第二章 固形がんにおける liquid biopsy に関する検討	21 頁
本章に関連した緒言	22 頁
略語表	27 頁
実験方法	29 頁
実験結果	37 頁
考察	45 頁
総括および結論	47 頁
謝辞	48 頁
引用文献	49 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

Tomohiko Kakizaki, Yuji Nakamaru, Hiromitsu Hatakeyama, Dai Takagi, Masanobu Suzuki, Takatsugu Mizumachi, Tomohiro Sakashita, Satoshi Kano, Akihiro Homma, Satoshi Fukuda.

The role of MicroRNA-296-3p in the malignant transformation of sinonasal inverted papilloma.

Biochemical and Biophysical Research Communications

本研究の一部は以下の学会に発表した。

蠣崎文彦、本田一文、加藤 健、庄司広和、佐久間朋寛、山田哲司、Steven Fang、Andrew Wu、Chwee Teck Lim、古田 耕.

消化管がんにおける末梢循環腫瘍細胞 Circulating tumor cells (CTC) に関する検討.

第 33 回 日本分子腫瘍マーカー研究会. 横浜、2013.10.2

Tomohiko Kakizaki, Hirokazu Shoji, Koh Furuta, Ken Kato, Seiichi Yoshimoto, Fumihiko Matsumoto, Taisuke Mori, Tomohiro Sakuma, Satoshi Fukuda, Tesshi Yamada, Chwee Teck Lim and Kazufumi Honda.

Next-generation sequencing of circulating tumor cells isolated from peripheral blood and circulating free DNA in solid cancer patients.

第 74 回 日本癌学会学術総会. 名古屋、2015.10.10

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 2002 年地域がん登録による推計値 (国立がん研究センターがん対策情報センター) によると我が国では全がんのうち約 5%程度であり、世界的にみれば 6 番目に頻度が高いがん腫である。鼻、副鼻腔、耳下腺、舌、喉頭、咽頭など種類が非常に多く、発生原因や治療法、予後が異なるのが特徴である。発生頻度が高いのは口腔がん、頭頸部がん全体の 35%以上を占め、喉頭がん、下咽頭がんがこれに続く。発症要因で知られているのは飲酒と喫煙で、頭頸部がん全体の約 80%に関与しているといわれる。その他、上咽頭がんでは Epstein Barr virus (EBV) 感染¹、中咽頭がんと口腔がんでは human papilloma virus (HPV) 感染²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のが現状である。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、その一方で頸部リンパ節転移をきたしやすいことも明らかとなっている³。これにより HPV が関連するがんか否かで治療強度を決定した方が、リスクアンドベネフィットの観点からも有益であるとのコンセプトも提唱されている⁴⁻⁷。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も秘めており、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

1. 鼻腔内反性乳頭腫

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。鼻腔側壁 (中鼻道、中鼻甲介、下鼻甲介) から発生することが多く、周囲の篩骨洞、頭蓋底、眼窩に進展することがある。形態的には円柱上皮あるいは扁平上皮が内反性に増殖することが特徴で、5-15%の患者では扁平上皮がんへの悪性転化が見られるため、内反性乳頭腫と診断された場合には外科的に摘出するなど根治的治療が必要とされる⁸⁻¹⁰。近年の頭蓋底手術、内視鏡手術の発展や、ナビゲーションシステムに代表される手術支援器具の進歩^{11,12}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てきたが、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。

2. HPV 感染と鼻腔内反性乳頭腫

発がんに関連する高リスク型 human papilloma virus (HPV) 感染は、内反性乳頭腫の発症や悪性化に関連すると考えられている^{10,13}。HPV 感染からの発がんは、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ている¹⁴。HPV に感染すると、HPV のゲノム上のウイルスの増殖に関係する遺伝子である E6 領域や E7 領域が上皮細胞の遺伝子にトランスフェクトされる。E6 タンパク質は、p53 と結合し、p53 の自己ユビキチン化とそれに続く分解を促進する。E7 タンパク質も p21 や p27 などの細胞周期の調節因子を抑制するほか、pRB と直接相互作用し、細胞増殖を促進する。このように HPV 感染は細胞周期の調節やがん抑制遺伝子の機能喪失を通して、内反性乳頭腫の悪性化に関連すると考えられている¹⁵。しかし、内反性乳頭腫から生じた鼻副鼻腔扁平上皮がんの全てにおいて、高リスク型 HPV が確認されるわけではない。実際に高リスク型 HPV が確認されるのはその 37.8%にすぎないという報告¹⁶があり、高リスク型以外の患者の発がんのメカニズムは不明である。また、発がんメカニズムの解明という観点から見ると内反性乳頭腫のがん化転化モデルは、同一検体において、正常上皮細胞、異型細胞 (IP、dysplasia)、扁平上皮がん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といえる。

3. miRNA

miRNA は、約 19-22 ヌクレオチドの小さな転写されるがタンパクには翻訳されない遺伝子 (non-coding RNAs) である¹⁷。これまでに、ヒトでは、1500 を超える miRNA が同定されており、転写抑制や mRNA 開裂を介して、遺伝子発現を制御することや、がん化、分化、アポトーシス、転移に関連すると報告されて

いるものがある¹⁷。頭頸部領域では、扁平上皮がん細胞で **miRNA** が顕著に発現していること、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¹⁸⁻²⁰。

4. 本研究の目的

これまで、内反性乳頭腫の一部が悪性転化することは知られていたが、そのメカニズムは解明されていなかった。**miRNA** が頭頸部扁平上皮がんのがん化に関与することは報告されており、内反性乳頭腫のがん化においても何らかの影響を与えていることが想定される。本研究では、内反性乳頭腫の悪性化における **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。

5. 本研究で明らかになったこと

本研究では 200 種類以上の **miRNA** が良性の内反性乳頭腫と悪性の扁平上皮がんの間で 2 倍以上増加もしくは減少して発現していることがわかった。また、今回着目した **miR-296-3p** はがん抑制遺伝子である **PTEN** の発現を抑制し、乳頭腫のがん化に関係している可能性が示唆された。

また、**miR-296-3p** は **PTEN** 以外の発がん関連遺伝子も標的としており、**PTEN** 同様に内反性乳頭腫のがん化における浸潤および転移に関係している可能性が示唆され、今後更なる検討が必要と考えられた。

略語表

本文中、ならびに図中で使用した略語は以下のとおりである。

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GPS	global positioning system
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HPV	human papilloma virus
IP	inverted papilloma
IRS	immunoreactive score
miRNA	microRNA
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
RB	retinoblastoma
SCC	squamous cell carcinoma
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBST	tris-buffered saline and tween 20
TLDA	TaqMan® Low Density Array
UTR	untranslated region

実験方法

1. 実験材料

以下に本研究で用いた実験材料の由来及び調剤法などを示した。各装置などの製造元の社名は社名のあとに社と略記した。

< 1 > 培養細胞

SCC25 (ATCC、USA)

< 2 > 装置

Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies 社、USA)

ABI7900HT real time PCR machine (Applied Biosystems 社、USA)

< 3 > キット

RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion 社、USA)

Agilent RNA 6000 NanoLabChip kit (Agilent Technologies 社、USA)

ABI Megaplex protocol without pre-amplification (Applied Biosystems 社、USA)

Taqman[®] miRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems 社、USA)

Megaplex RT Human Pool A primers (Applied Biosystems 社、USA)

biotin-labeled rabbit anti-mouse secondary antibody kit (ニチレイ社、Japan)

< 4 > 各種酵素

Taqman[®] Universal PCR Master Mix (2x) without UNG (Thermofisher scientific 社、USA)

Lipofectamine 2000 (Thermofisher scientific 社、USA)

microRNA Mimic Transfection Control with Dy547 (GE Healthcare 社、USA)

< 5 > 各種核酸

miRNA mimics/inhibitor and negative controls were purchased from Dharmacon (Lafayette 社、USA)

< 6 > 抗体

anti-phosphatase and tensin homolog (PTEN) antibody (Cell Signaling Technology 社、USA)

anti-p21 antibody (Cell Signaling Technology 社、USA)

anti β -Actin antibody (Cell Signaling Technology 社、USA)

< 7 > SDS-PAGE、ウェスタンブロット関連試薬

protease inhibitor cocktail mini tablet (Roche 社、USA)

< 8 > ソフトウェア

DataAssist v3.0 software (Applied Biosystems 社、USA)

ImageG gauge software version 4.1 (富士フイルム社、Japan)

2. 実験方法

以下に本研究で施行した実験方法について示した。なお、臨床検体の採取、取り扱い、北海道大学病院倫理委員会で承認された方法で適切に行われた。事前に全患者からインフォームド・コンセントを得た。

<1> 患者

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内反性乳頭腫の 25 患者から採取された 36 検体を対象とした。検体採取時において、放射線治療や化学療法の先行治療はなかった。治療前の臨床、病理データを表 1 に示す。

病理組織は、①非異形成内反性乳頭腫 (IP non-dysplastic)、②扁平上皮がんと共に共存する内反性乳頭腫 (IP coexisting with SCC) ; 同一切片上に内反性乳頭腫と扁平上皮がんが存在するもののうち内反性乳頭腫の組織、③内反性乳頭腫から生じた扁平上皮がん (SCC arise from IP) ; 同一切片上に内反性乳頭腫と扁平上皮がんが存在するもののうち扁平上皮がんの組織、④扁平上皮がん (SCC) ; 内反性乳頭腫から発生した扁平上皮がんの 4 種類に分けた。

性別	
男性	19
女性	6
年齢 (歳)	範囲 : 32-84 (中央値=63)
病理組織	
非異形成内反性乳頭腫 (IP non-dysplastic)	6
扁平上皮がんと共に共存する内反性乳頭腫 (IP coexisting with SCC)	12
扁平上皮がん (SCC)	7

表 1. 免疫組織化学染色を行った患者 (n=25)

25 人の患者検体から 36 検体を回収した。

<2> 培養細胞

SCC25 細胞は ATCC から購入し、DMEM + FBS (10%) の培養液を用い、37℃ で培養した。

<3> RNA 抽出と microRNA の TLDA アッセイ

Recover All Total Nucleic Acid Isolation kit を用いて total RNA を抽出した。抽出された RNA は Agilent RNA 6000 NanoLabChip kit と Agilent 2100 bioanalyzer を用いて分析し、品質をチェックした。こうして得られた total RNA は ABI Megaplex protocol without pre-amplification により増幅を行い、ABI miRNA Reverse transcription Kit and Megaplex RT Human Pool A primers を用いて miRNA を含む cDNA へと精製した。cDNA を新しいチューブに移し、Taqman Universal PCR Master Mix を加えたうえで、TaqMan® Low Density Array (TLDA) にアプライした。ABI7900HT real time PCR マシンを用いて、TLDAs を添付プロトコール通り解析した。得られたデータは、TLDA のコントロールで標準化し、DataAssist v3.0 で解析した。

<4> トランスフェクション

Thermofisher 社の Lipofectamine 2000 を用いた。SCC25 細胞をあらかじめディッシュまたはプレートに撒いておき、一晚培養した。プロトコール通り、導入する miRNA を分注し、Lipofectamine 2000 を添加し、15 分間静置した後、細胞に滴下した。5% CO₂、37℃ で 6 時間の培養後、細胞の培地を新しい培地に交換し、さらに培養を続けた。

<5> ウェスタンブロット

細胞をディッシュよりトリプシン/EDTA 溶液またはセルスクレイパーにて剥離、回収し、遠心したうえで、沈殿した細胞を更に PBS で洗浄し、遠心をかけた。沈殿した細胞を、RIPA lysis buffer (1 mM NaVO₃、1 mM DTT、1 mM PMSF、phosphatase inhibitor cocktail、protease inhibitor cocktail) にて懸濁し、超音波破砕機にて凝集塊が見えなくなるまで数秒間破砕後、15 分間氷上で静置した。遠心し上清を回収し、Bradford absorbance assay でタンパク濃度を測定したうえで、1/2 量の 3×SDS サンプル緩衝液を加え、SDS-PAGE を行った。ゲルをウェットタイプの転写装置でニトロセルロース膜に転写し、ブロッキングを行った。TBST で洗浄し、一次抗体反応を行った。抗体反応後、再度 TBST で洗浄し、2 次抗体反応を行った。TBST で洗浄した後、ECL Western Blotting Detection Reagents にて化学発光反応を行った。信号強度は Image gauge にて定量化し、β-actin で標準化した。

<6> 免疫組織化学染色

パラフィン固定された鼻腔腫瘍のブロック標本より、4 μm の連続切片を作製した。切片をキシレンに 30 分浸し脱パラフィン化した後、100 %アルコールで 3 回、流水で 1 分洗浄した。0.1% 過酸化水素を用いて内因性ペルオキシダーゼを不活化し、0.1 M のクエン酸 buffer (pH 6.0) に浸透し、Microwave (750W 5 分) 処理を行い、抗原を賦活化した。非特異的な抗原抗体反応を避けるため、10% ウサギ血清を 30 分浸漬させたうえで、PTEN もしくは p21 の抗体を一次抗体として添加し、湿箱、37.8°C の環境下で一晩反応させた。PBS で洗浄した後、二次抗体を添加し、37.8°C で 30 分反応させ、ストレプトアビジン-ビオチン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体で反応させた。ジアミノベンジジン溶解液にスライドを浸漬させ、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

こうして作成されたスライド検体を、染色の強度と陽性細胞占有率でスコア化した。スコア化は臨床データを知らされていない共同研究者二名によって行われた。強度は、0、1+、2+、3+ の 4 段階、占有率は、0 : 0%、1+ : 1% to 10%、2+ : 11% to 50%、3+ : 51% to 80%、4+ : >80% の 5 段階に分けて判定した。PTEN の発現は細胞質の染色で、p21 の発現は核染色で評価した。両タンパクの発現は、immunoreactive score (IRS) を用いて半定量化した。IRS は染色強度スコアと陽性細胞占有率スコアの積と定義した (図 1)。Nagata score²¹ に従って、IRS score が 3 以上であるとき、PTEN と p21 陽性と判断した。

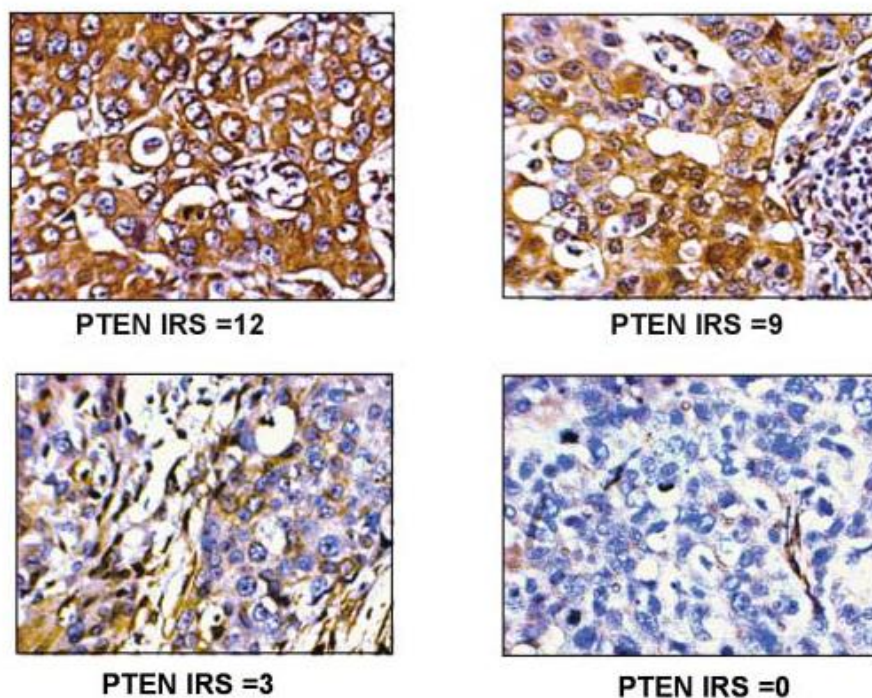


図 1. PTEN の免疫反応スコア (IRS) (文献 21 より引用)

実験結果

1. 内反性乳頭腫と扁平上皮がん細胞間の miRNA 発現の差

検体は計 8 人の患者から採取され、内反性乳頭腫と扁平上皮がんからそれぞれ 5 検体ずつ (2 検体は同一患者から採取) 採取し、内反性乳頭腫の発がんにおける miRNA の役割を検討した。全ての内反性乳頭腫の検体は、扁平上皮がんに移行し、全ての扁平上皮がん検体は内反性乳頭腫から発生していた。miRNA を分析した患者を表 2 に示した。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。miRNA のうち、内反性乳頭腫と扁平上皮がんの間で最も発現の差を示した計 20 種類の miRNA を表 3 に示した。これらの中で、miR-296-3p は、内反性乳頭腫では扁平上皮がんと比較し 23 倍の減少を示した。また、miR-296-3p は、内反性乳頭腫と同患者の扁平上皮がん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ことができることが知られているため、miR-296-3p に関して Targetscan 6.2 (<http://www.targetscan.org>) を用いて検索を行った。その結果から、miR-296-3p が標的であると推定される 66 か所の保存部位と 26 か所の不十分な保存部位を含む 66 個の標的遺伝子のリストを得た。このリストの中から、本研究では PTEN に関して注目した。PTEN は腫瘍抑制因子として同定されたタンパク質^{22,23}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、内反性乳頭腫の悪性化に関連するという仮説を立てた。

性別	
男性	7
女性	1
年齢 (歳)	38-77 (中央値=54)

表 2. miRNA の分析患者 (n=8)

miRNA の分析のために 8 人の患者から計 10 検体を採取した。

2 検体の内反性乳頭腫及び扁平上皮がんの検体は、それぞれ同じ患者から採取した。

SCC で発現が上昇したもの		SCC で発現が減少したもの	
Name	Fold change	Name	Fold change
hsa-miR-206	37.74	hsa-miR-892b	183.83
hsa-miR-675	28.9	hsa-miR-874	144.4
hsa-miR-105	25.38	hsa-miR-371-3p	121.14
hsa-miR-296-3p	23.92	hsa-miR-16-2	116.27
hsa-miR-577	21.88	hsa-miR-129	85.26
hsa-miR-574-3p	12.94	hsa-miR-518f	70.78
hsa-miR-93	9.09	hsa-miR-431	59.55
hsa-miR-936	8.87	hsa-miR-593	49.27
hsa-miR-922	8.75	hsa-miR-1225-3p	45.06
hsa-miR-616	8.68	hsa-miR-92b	43.71

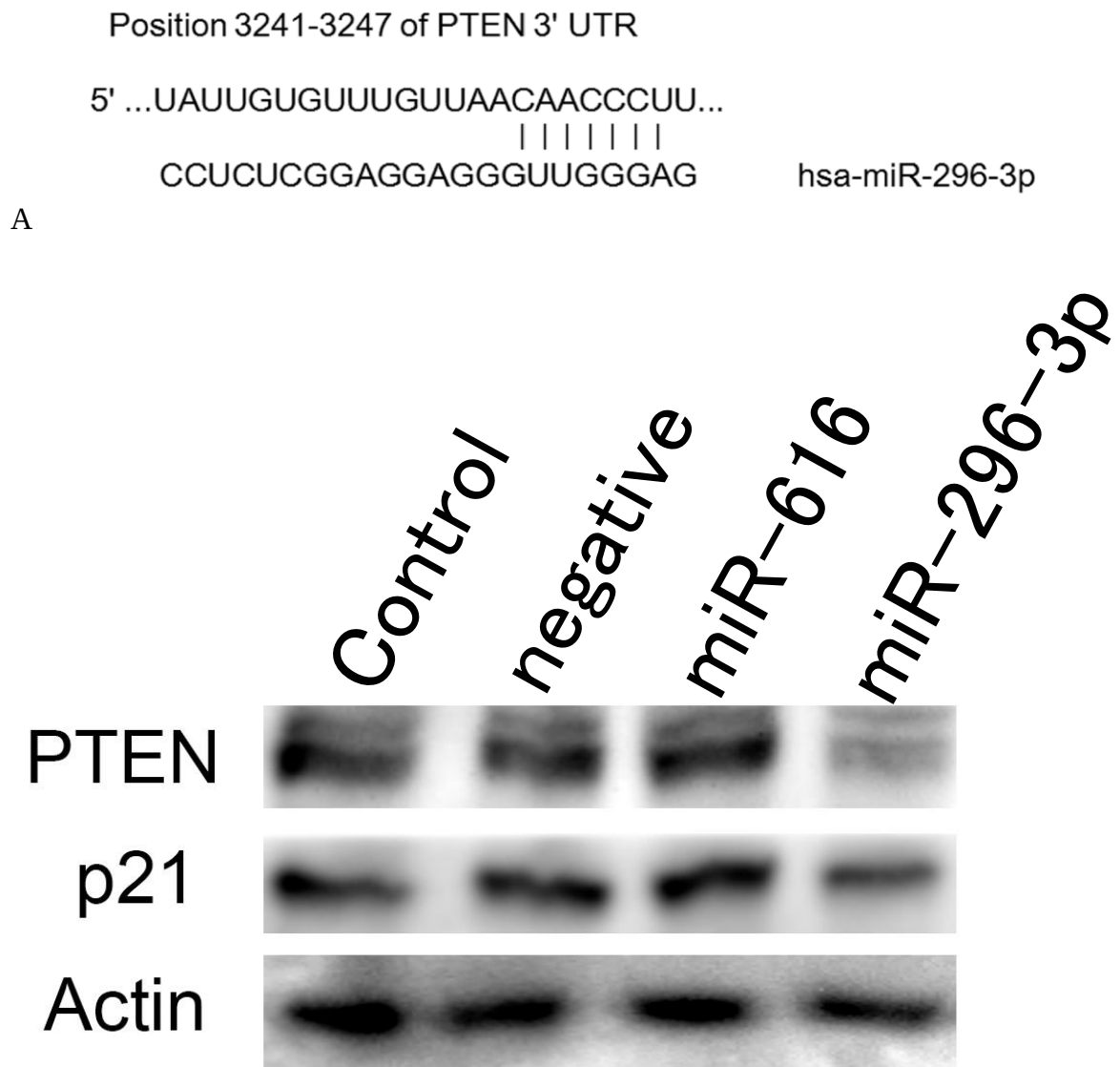
表 3. 扁平上皮がん (SCC) と内反性乳頭腫 (IP) の間で最も発現の差が見られた 20 種類の miRNA

内反性乳頭腫と扁平上皮がん間の最大差次的発現を示す 20 種類の miRNA に関して示した。データは、TLDA カード上のコントロールに基づいて正常化し、DataAssist v3.0 ソフトウェアで解析した。

2. 頭頸部扁平上皮がん細胞における miR-296-3p の直接標的としての PTEN

まず、miR-296-3p が PTEN のどの塩基配列に作用しうるかを検討した。公開されているデータベースを用いた解析により、miR-296-3p は、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) (図 2A) に相補的であることが明らかになり、これにより PTEN を標的とする可能性が示唆された。次に、miR-296-3p が PTEN に与える影響を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である 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。これにより、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ていた (図 2B)。また、miR-616 もコンピュータ解析で扁平上皮がんと内反性乳頭腫との間に発現量の差を認めたが、ウェスタンブロット法では、PTEN の発現に差を認めなかった。

今までに、miR-296 のうち、miR-296-5p は p21 を標的にすることがわかっている²⁴。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、頭頸部扁平上皮がんの発がんに関与している。これらの知見と前述の結果をあわせ、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、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。しかし、miR-296-3p をトランスフェクトさせた細胞とコントロールを比較すると、p21 の発現に明らかな違いは見られなかった (図 2B)。



B

図 2. PTEN は、miR-296-3p の潜在的標的である。

A. PTEN の 3'UTR サイトにおける miR-296-3p の推定上の結合部位が示されている。

B. SCC25 細胞における PTEN、p21 および Actin のタンパク質レベルを、miR-296-3p、miR-616、及びネガティブコントロールにおいてトランスフェクションの 48 時間後に評価した。

3. 内反性乳頭腫と扁平上皮がんにおける PTEN と p21 の発現と臨床病理学的特徴との相関

次に、PTEN と p21 の免疫組織化学的検討を行った。非異形成内反性乳頭腫 (IP non-dysplastic) は 6 検体であった。また、扁平上皮がんのみの検体は 7 検体であった。扁平上皮がんと内反性乳頭腫が共存しているものは 12 検体あったが、そのうちの 1 検体において内反性乳頭腫部位は状態が悪かったため、11 検体を使用した。内反性乳頭腫が共存する扁平上皮がんは、全 12 検体を使用した。結果、内反性乳頭腫は 17 検体、扁平上皮がんは 19 検体となり、これらに対して PTEN と p21 の免疫組織化学的検討を行った (表 4)。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 (図 3C、D)。PTEN および p21 についての代表的な強染色画像を図 3A-D に示した。PTEN 染色陽性検体は、17 検体中 13 検体 (76.4%) の内反性乳頭腫に認められ、扁平上皮がんの 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 ($P = 0.0005$) (表 3)。また、p21 染色陽性検体は、17 検体中 11 検体 (64.7%) であり、扁平上皮がんの 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 ($P = 0.0086$) (表 4)。非異形成内反性乳頭腫と扁平上皮がんと共存する内反性乳頭腫間、内反性乳頭腫と共存する扁平上皮がんと扁平上皮がんのみの検体間では PTEN や p21 の発現に有意差は認めなかった。

	検体	PTEN 陽性	PTEN 陰性	p-value	p21 陽性	p21 陰性	p-value
	n=36						
IP non- dysplastic	6	5	1		3	3	
IP coexisting with SCC	11	8	3		8	3	
				n.s.			n.s.
SCC arise from IP	12	2	10		3	9	
SCC	7	2	5		2	5	
				n.s.			n.s.
All IP	17	13 (76.5%)	4 (23.5%)		11 (64.7%)	6 (35.3%)	
All SCC	19	4 (21.1%)	15 (79.9%)		5 (26.3%)	14 (73.7%)	
				p=0.0005			p<0.001

表 4. PTEN と p21 の発現

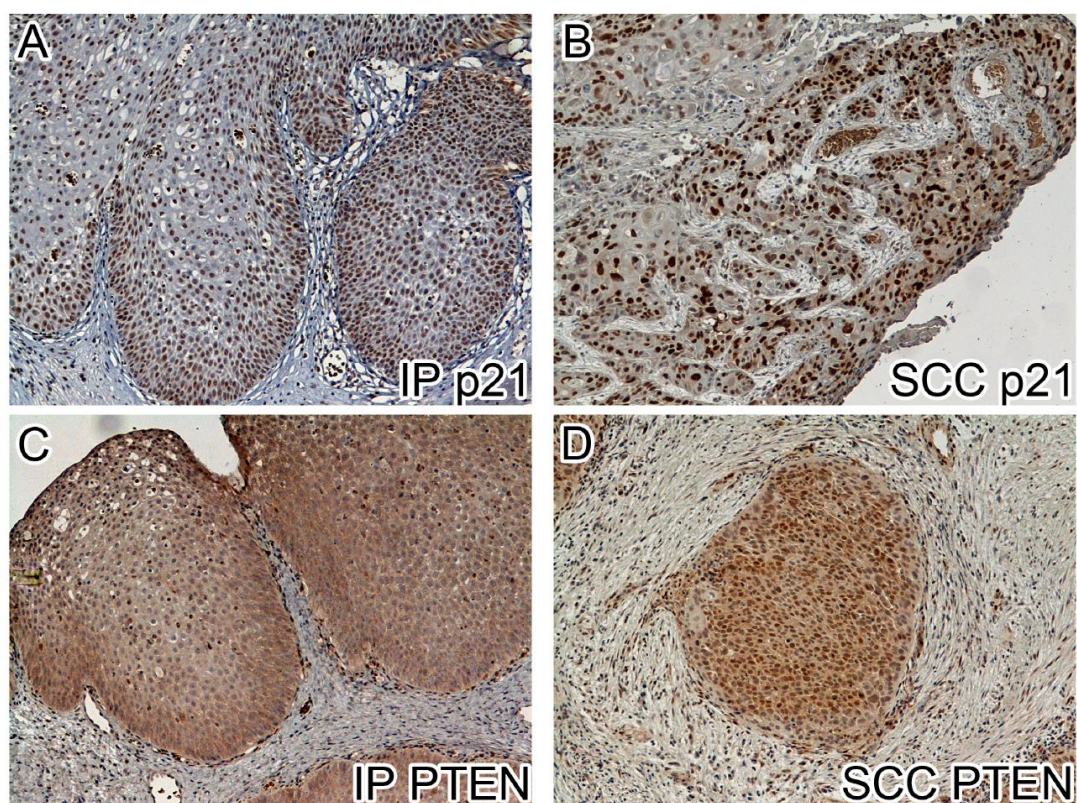


図 3. 内反性乳頭腫 (IP) と扁平上皮がん (SCC) における p21 および PTEN の発現。(オリジナル倍率×200)

- A. IP における p21 陽性染色
- C. IP における PTEN 陽性染色

- B. SCC における p21 陽性染色
- D. SCC における PTEN 陽性染色

考察

300種類を超える miRNA の発現変化を内反性乳頭腫と扁平上皮がんの間で解析したところ、多くの miRNA の発現が変化していた。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。

本研究でもいくつかの変化のあった miRNA が、がん遺伝子を制御するか検討したものの、多くは影響を来さなかった。しかし、扁平上皮がんでは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、他の検体を用いた免疫組織化学染色においても内反性乳頭腫と扁平上皮がんにおいて、PTEN の発現量に違いを認めた。

本研究で扁平上皮がんと内反性乳頭腫の間で発現の差が認められた miR-296 についてはこれまでに、乳がん²⁴、神経膠腫²⁵ 及び食道がん²⁶ において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、今回注目した miR-296-3p とは、標的となる遺伝子は異なっていた。前立腺がんでは、miR-296-3p が、細胞接着分子 1 を介して末梢循環腫瘍細胞が NK 細胞の免疫を逃れることが可能となり、転移を促進することがわかっている²⁷。本研究で行っ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 の他にもジンクフィンガープロテイン 629 とクローディン 2 のような発がん関連遺伝子が含まれているがわかった。今回はこれらの発現については検討していないものの、PTEN 同様に内反性乳頭腫のがん化における浸潤および転移に寄与している可能性がある。

PTEN は、がん抑制遺伝子として同定されたタンパク質であり²³、p53 および RB 経路に関与していることが知られている。PTEN の転写は、p53 によって活性化され、PI3K/Akt シグナル伝達経路を阻害²⁸ することによって細胞の生存に対し負の調節を行っている。

この PTEN や、PI3K/Akt シグナル伝達経路は、頭頸部扁平上皮がんの発がん²⁹ においても関与し、頭頸部扁平上皮がんでは 8-30% の PTEN の変異や欠損があり^{30,31}、5-10% で PIK3CA の変異を認めたとの報告もある³²。PTEN 欠損を有するマウスでは、タバコ類似物へ曝露されると口腔扁平上皮がんを発症することが報告されている³³。

本研究では、200 種類以上の miRNA は、がん化の過程で 2 倍以上発現が増加もしくは減少しており、さらに miR-296-3p 一つにおいても、66 種類の遺伝子が標的候補となっている。さらには miR-296-5p と -3p では p21 の制御機能が異なっており、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っている。このことを考えると、がん化において、多くの miRNA が変化し、莫大な数の遺伝子に影響を与えることが想定され、これらが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。今回は PTEN と miR-296 に注目したが、発がんにおける miRNA のメカニズムを解明するためには、より詳細かつ包括的な分子生物学的研究が必要と考えられる。近年のトランスクリプトーム解析やプロテオミクス解析の進歩は著しいものがある^{34,35}。さらに、次世代シーケンサーを用いた exome の研究も進歩している。こういったデータを加え、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ている³¹。

本研究から miRNA や PTEN の発現量が良性と悪性病変の間で異なることがわかった。原発組織での遺伝子の状況を確認し、その結果を治療へ応用することが今後治療に有用であると考えられる。しかし、進行頭頸部がんにおいては、再発や転移をおこす可能性があり、もしも再発が起きた場合は、初期治療を行った時点と遺伝子の発現が異なる可能性がある。しかし、再生検が困難である場合や、手術が不可能である場合があるため、より侵襲が少ない方法を用いて、予後予測や、リアルタイムに遺伝子の発現を確認することが可能となれば、頭頸部がんを克服するための重要な一手となることが期待される。他の固形がん（大腸がん、乳がん、肺がん）などでは、液性試料を用いた liquid biopsy という方法により遺伝子発現を確認する方法が確立されつつある。頭頸部がんでも同様の方法で、遺伝子発現を確認できれば患者にとってもメリットが大きいと考えられる。次章では、頭頸部がんにおいても、liquid biopsy が可能であるかどうか、将来的に臨床応用が可能であるかどうか検討したい。

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 1. 近年のがん研究

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ったことがあげられる³⁶⁻³⁹。原発巣の中でも遺伝子変異や増幅が異なり、不均一性 (heterogeneity) があると報告されている⁴⁰⁻⁴⁵。また抗がん剤や放射線治療に対する耐性化が従来想定されていた時点よりも早く起こる可能性が指摘されている⁴⁶⁻⁵¹。このような背景のもとで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という概念が提唱されるようになった⁵²。これは、1回の生検だけではなく、継時的に何回も繰り返し生検を行うことによりできるだけ標的をリアルタイムに把握しようとするものである。

2. Liquid biopsy

これまでの生検は固形がんを対象とするものが多かったが、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という手技が開発され、その有用性が報告されるようになった。2012年にDiaz Jrら⁵³によりliquid biopsy⁵⁴という言葉が提唱され、液性試料を対象とした生検として、注目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を伴う。liquid biopsyは現在研究から実臨床への過渡期にあるが、血液採取は比較的容易なこともあり、今後日常的な検査手技となりうる可能性が示唆されている^{53,55,56}。circulating tumor cells (CTC) や circulating tumor DNA (ctDNA) の解析によるがんの遺伝子背景は原発巣と異なる可能性があり、その場合根本的にがん治療を考え直す必要がある。2010年頃までは、CTCをテーマとした学会において血液からのCTCやctDNAの回収が議論され、その回収方法の有用性を競っていたが、2013年頃より回収できるようになり、CTCやctDNAをいかに医療分野に応用していくかに関心が移行しつつある。

3. 末梢循環腫瘍細胞 (CTC) の背景

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によって腫瘍細胞に類似した細胞が死亡した患者で発見されたのが最初の報告⁵⁷である。その後、CTCの分離、生物学的特性に関する研究結果が数多く報告されている。CTCの検出や性状における最近の生物学的進歩は、マルチプレックスな定量的なRT-PCR法に基づく方法や、画像処理、マイクロフィルターやマイクロチップに基づく試みを含んでいる。現在CTC研究の主流となっているのは、

Veridex社のCellSearch[®] systemであり、アメリカ食品医薬品局 (FDA) で承認されている。同システムを用いて、177人の切除不能・再発乳がん患者を対象としたprospective studyが報告されている⁵⁸。治療前のCTC数が末梢血7.5 mL中に5個以上ある場合は、5個未満の場合と比較して、progression-free survival (PFS) やoverall survival (OS) が有意に短いことが判明した。また、治療開始3-5週以内のCTC数が治療前のベースラインのCTC数より増加した場合は、減少した場合と比較し、PFSおよびOSが有意に短いことが報告された⁵⁹。現在、末梢血中のCTC数に基づいて治療法を変更すべきかどうかを検証する第III相試験が現在進行中である。

乳がんと同様に、切除不能・再発前立腺がんおよび切除不能・大腸がんにおいても、CellSearch[®] system を用いた効果予測バイオマーカーの報告がある^{60,61}。切除不能・再発大腸がんでは、化学療法導入前の末梢血 7.5 mL 中に CTC が 3 個以上ある場合は、CTC が 3 個未満の場合と比較し、PFS や OS が有意に短いことが報告されている⁶²。さらに、初回治療後に CTC 数が 3 個以上の患者は 3 個未満の患者に比べ生存期間が短いことから治療効果の予測マーカーになることを報告している。

4. CTC の分離

CTC の検出と性状解析における最近の技術的な進歩として、(a) 古典的な免疫細胞組織化学 のような画像に基づくアプローチ、細胞表面マーカーによるCellSearch[®] system、the Ariol system、レーザー走査型サイトメトリー、(b) 高感度 RT-qPCR 法、マルチプレックス RT-PCR 測定法、分子解析的のものと画像を組み合わせた CTC の核酸分析に基づく分子測定法、そして、(c) CTC から遊離したタンパク質を検出する EpiSpot assay といったタンパク質の測定法が挙げられる。これまでのほとんどの CTC の検出に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による選択によって行われている。しかしながら、腫瘍細胞の中には EpCAM を発現しないもの⁶³もあり、これまでの方法では検出できないといった問題点もあった。また、CTC の検出には煩雑な操作が必要であることや、費用が高いことも問題点であった。

今回用いたのは国立シンガポール大学の Swee Jin Tan らが開発した CTChip-Spiral[®] system である⁶⁴。装置の概要を図 1 に示した。微小流体と遠心力を用いて形態やサイズの違いといった物理的性質を用いて腫瘍細胞を他の血中細胞から分離する CTC 検出装置である。同システムを用いた乳がん、大腸がんの腫瘍細胞の分離効率は約 80%と良好な結果が報告されている⁶⁵。同システムの利点として、検出に必要な末梢血が 7.5 mL で済むこと (従来の CellSearch[®] system で

は 20 mL の末梢血が必要)、表面マーカー発現の有無 (EpCAM など) に関係なく CTC が分離できること、バイオチップがシンプルかつ操作が単純であること、費用が安いことなどが挙げられる。

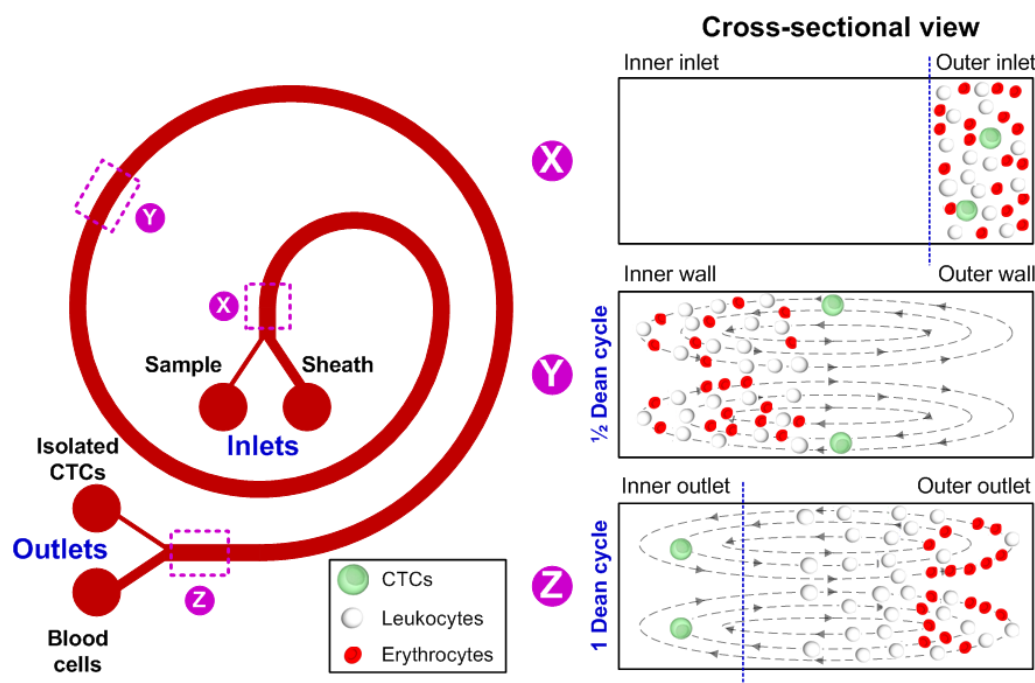


図 1. CTChip-Spiral® system の原理 (文献 64 より引用)

微小流体と遠心力を用いて細胞表面マーカーに依存せず、径の大小により分離される。径の大きな CTC と径の小さな赤血球やリンパ球が分離される。

5. 頭頸部がんにおける遺伝子変異

2011 年 Science 紙に Stransky ら³¹、Agrawal ら³²により頭頸部がん組織の次世代シーケンシング (next generation sequencing : NGS) を用いた遺伝子解析が報告され、以下のような結論を得られた。①p53 遺伝子の高率な異常 (Stransky ら³¹、Agrawal ら³² : 63%、47%)、②NOTCH 遺伝子の異常 (15%、22%)、③従来、発がんに関係するといわれてきた重要な遺伝子の異常が低頻度ではあるが重要な変異を示す (CDKN2A : 25%、9%、PI3K : 8%、6%、HRAS : 4%、4%、PTEN : 8%、-)、④HPV 感染細胞は遺伝子変異が少ない (1 腫瘍 あたりの変異数 : 20.6 対 4.8)。

6. 頭頸部がん・消化管がんにおける分子標的薬に対する耐性機序

近年、頭頸部がんにおいても、分子標的薬が臨床的に使用されるようになり、現在保険で認められているものは頭頸部がんの 90%以上で増幅が認められる EGFR に関するセツキシマブである。

大腸がんにおいて EGFR モノクローナル抗体であるセツキシマブやパニツムマブに対する耐性機序として KRAS (codon 12、13) 変異が挙げられる。この説は、いくつかの後ろ向き研究結果から得られたものであり、前向きに検証した試験結果から得られた治療効果の予測因子ではない。その KRAS 変異例を詳細に見直した結果、codon 13 変異では、もともと予後の悪いグループであり、明らかに抗 EGFR 抗体薬の上乗せ効果がないとはいえないという結果が得られている。

また、pre-clinical なエビデンスとして以下の耐性機序のメカニズムが指摘されている⁶⁶⁻⁷⁰。EGFR のリガンドである TGF α の過剰発現、EGFR 自体の過剰発現、EGFR のユビキチン化、Src family kinase (SFKs) による EGFR の調節により EGFR と HER3 の結合が強化され PI3K/Akt 経路の恒常的に活性化しがん細胞の生存につながることを指摘されている。また、VEGF の産生が増えることで新たな血管新生が行われることも報告されている。さらに、PTEN と Ras の両方の変異による下流のシグナルの活性化のためセツキシマブに対する抵抗性も指摘されている。EGFRvIII は、EGFR の一種で、正常細胞には発現していないと考えられているが、乳がん、卵巣がん、転移性前立腺がん、大腸がん、頭頸部がんなどで発現していることが知られている^{67,71-74}。細胞外領域のうち、エクソン 2 から 7 までの部分がないこの変異型は約 150-KDa の EGFR であり、リガンドの結合と関係なく恒常的にリン酸化され細胞増殖に関連する。EGFRvIII は EGFR モノクローナル抗体による治療に抵抗性を持つ可能性が指摘されている。

また、がん幹細胞と上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) の関連が示唆されている^{75,76}。さらに、がん幹細胞の機能維持や EMT にはテロメレーズの触媒サブユニットである hTERT が関与することも報告されている⁷⁷。薬剤に対する耐性機序の一つとして、テロメレーズやがん幹細胞、EMT の影響が示唆されていることより、hTERT やがん幹細胞マーカー、EMT マーカーなどの発現と治療効果との相関を調べることで、治療効果予測に有益な情報が得られることが期待される。

7. 本研究の目的と意義

Lindstrom らは、乳がんが進行・再発時に生物学的変化することを報告している⁷⁸。再発乳がんを患っている女性患者の腫瘍のエストロゲン受容体 (estrogen receptor : ER)、プロゲステロン受容体 (progesterone receptor : PgR)、HER2 の状態は原発腫瘍と再発腫瘍の間で変化することが大規模な retrospective study で示した。459 人の原発腫瘍および再発腫瘍における ER の発現が検査され、約 33% において、治療から再発までの間に腫瘍の ER の状態に変化がみられた (ER が発現または消失)。PR の発現を検査した女性 430 人のうち 40%以上で、治療から再発までの間に PR の状態に変化が認められた。また、原発腫瘍と再発腫瘍の

HER2 の状態を検査した 104 人の女性のうち約 15%において、治療から再発までの間に HER2 の状態に変化が認められた。

このように腫瘍は薬物療法により腫瘍の特徴が変化することは明らかであり、さらに、前述した分子標的薬に対する耐性機序は、実際の耐性機序のごく一部を説明しているに過ぎないため、既知のシグナル伝達系や、分子標的薬が標的としている下流の分子の異常のみを検索するだけでは耐性機序の解明には不十分である。したがって、分子標的薬の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える。しかしながら、原発巣が存在しない場合、生検（例：肝生検、リンパ節生検など）はときに侵襲的な手技になる可能性が高い。また、予後が規定された進行がん患者に対して、化学療法の評価の度に生検の苦痛を与えることは大変ストレスとなる。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 を培養、PCR、ELISA 等を行い腫瘍細胞の遺伝子解析・タンパク発現解析を行うことで、治療効果との相関性を調べ、化学療法の治療反応性および予後予測が可能となれば、臨床において、患者にとってメリットのあるツールとなりうることができ、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。

8. 本研究で明らかになったこと

頭頸部がんおよび消化管がんから得られた液性試料（CTC、ctDNA）から NGS を用いた解析により体細胞変異を検出することができた。CTC と ctDNA の体細胞変異が異なる可能性が示唆された。CTChip-Spiral[®] system を用い NGS を行ったのは世界で初めてと考えられた。検出率は CTC の方が ctDNA よりも低く、将来的に実臨床への応用は ctDNA が先であると考えられるが、CTC のさらなる解析により悪性腫瘍の浸潤、転移機構の解明に寄与する可能性が示唆された。

9. 研究デザイン

トランスレーショナルリサーチ

侵襲が非常に少ない前向き観察研究である。

略語表

本文中、ならびに図中で使用した略語は以下のとおりである。

CK	cytokeratin
CRC	colorectal cancer
CTC	circulating tumor cells
ctDNA	circulating tumor DNA
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12
EBV	epstein barr virus
EC	esophageal cancer
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELIZA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epithelial-mesenchymal transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ER	estrogen receptor
FDA	food and drug administration
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
GC	gastric cancer
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2
HNC	head and neck cancer
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HPV	human papilloma virus
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
NEAA	non-essential amino acid
NGS	next generation sequencing
OS	overall survival
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PFS	progression-free survival
PgR	progesterone receptor
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
RAS	rat sarcoma

SFKs	Src family kinase
TGF α	transforming growth factor α
VEGF	vascular endothelial growth factor
WGA	whole genome amplification

実験方法

1. 実験材料

以下に本研究で用いた実験材料の由来及び調剤法などを示した。各装置などの製造元の社名は社名のあとに社と略記した。

< 1 > 培養細胞

H1975 (ATCC、USA)

< 2 > 培養関連試薬

DMEM/F-12, HEPES (Gibco 社、USA)

RPMI 1640 (Gibco 社、USA)

Fetal Bovine Serum (Gibco 社、USA)

Fetal Bovine Serum Qualified for human Embryonic Stem cells (Biological Industries 社、Israel)

NEAA (Cyagen Bioscience 社、USA)

NSS (Abcam 社、UK)

Resuspension buffer (Clearbridge 社、Shingapore)

PBS (Gibco 社、USA)

< 3 > 溶血試薬

赤血球溶解緩衝液 (和光社、Japan)

< 4 > 装置

CTChip-Spiral[®] (Clearbridge 社、Shingapore)

StepOnePlus real time PCR machine (Applied Biosystems 社、USA)

< 5 > キット

REPLI-g Single Cell Kit (QIAGEN 社、Germany)

Pure Link Genomic DNA Mini Kits (Life Technologies社、USA)

QIAamp DNA FFPE Tissue (QIAGEN社、Germany)

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社、Germany)

Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies 社、USA)

< 6 > NGS 関連試薬等

5×Ion Ampliseq Cancer Hot Spot Panel v2 (Life Technologies 社、USA)
Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Life Technologies 社、USA)
Ion PGM Template OT2 200 Kit (Life Technologies 社、USA)
Ion Library TaqMan Quantitation Kit (Life Technologies 社、USA)
Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 (Life Technologies 社、USA)
Ion 316 Chip Kit v2 (Life Technologies 社、USA)
Ion 318 Chip Kit v2 (Life Technologies 社、USA)
Dynabeads[®] MyOne[™] Streptavidin C1 Magnetic Beads 2ml (Veritas 社、USA)

< 7 > DNA 精製試薬

Agencourt AMPure XP 60mL (Beckman Coulter 社、USA)

< 8 > 抗体

抗ケラチンサイトケラチンモノクローナル抗体 マウス
Keratin/Cytokeratin (AE1、AE3) (ニチレイ社、Japan)
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488) (ab150113) (Abcam 社、UK)

< 9 > 抗菌薬、抗真菌薬

アンピシリン (Sigma-Aldrich 社、USA)
ゲンタマイシン (Sigma-Aldrich 社、USA)
アンホテリシン B (Sigma-Aldrich 社、USA)

< 10 > 培養ディッシュ

Nunc 96 オプティカルボトムプレート TC 黒カバーガラス (Thermofisher scientific 社、USA)
RepCell 3.5cm ディッシュ (CellSeed 社、Japan)

< 11 > 細胞固定液等

Paraformaldehyde (コスモバイオ社、Japan)
Triton[™] X-100 (Sigma-Aldrich 社、USA)

< 12 > チューブ

1.5 mL DNA Lo-binding tube (Eppendorf 社、Germany)
15 mL 遠沈管 (和光社、Japan)
50 mL 遠沈管 (和光社、Japan)

2. 実験方法

以下に本研究で施行した実験方法について示した。なお、臨床検体の採取、取り扱い、国立がん研究センター中央病院倫理委員会で承認された方法で適切に行われた。事前に全患者からインフォームド・コンセントを得た。

<1> 患者の選択

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 (表 1)。

原発巣	
大腸がん (CRC) KRAS (WT/MT)	11 (6/5)
食道がん (EC)	8
胃がん (GC)	1
頭頸部がん (HNC)	13
性別	33
男性	23
女性	10
年齢 (歳)	42-80 (中央値=62)

表 1. 患者背景

CRC : colorectal cancer、WT : wild type、MT : mutation、EC : esophageal cancer、GC : gastric cancer、HNC : head and neck cancer

<2> 実験デザイン (図 2)

患者より血液を 10~15 mL 採取し、CTC 回収用に 7.5~10 mL を使用し、CTChip-Spiral® system を用い CTC を回収した。回収した CTC は①培養用、②細胞数カウント用、③NGS 用に全ゲノム増幅 (WGA : whole genome amplification) を施行した。残りの血液を使用して ctDNA、buffy coat から DNA を採取した。原発巣を使用できる患者は FFPE あるいは凍結切片を用いて DNA を採取した。これら

CTC、ctDNA、buffy coat、原発巣より回収された DNA から NGS を使用して遺伝子変異を比較検討した。

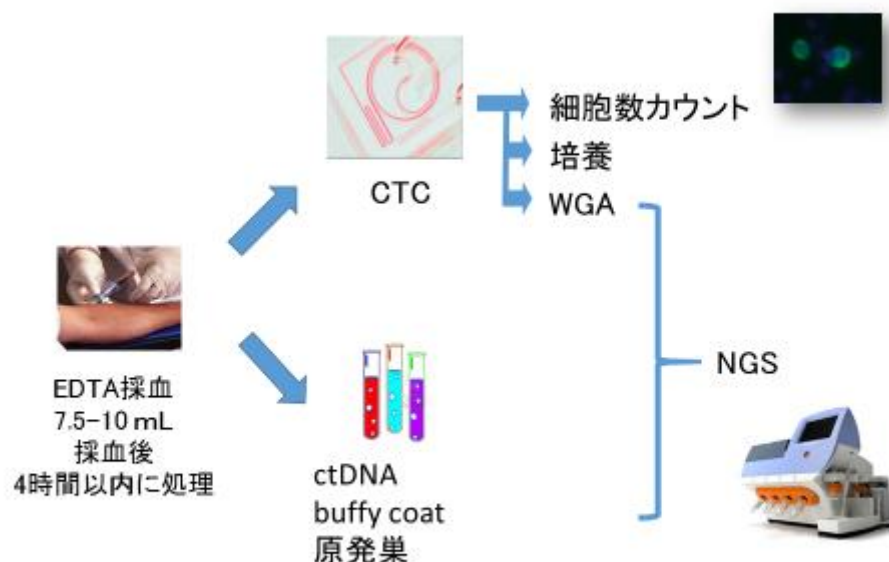


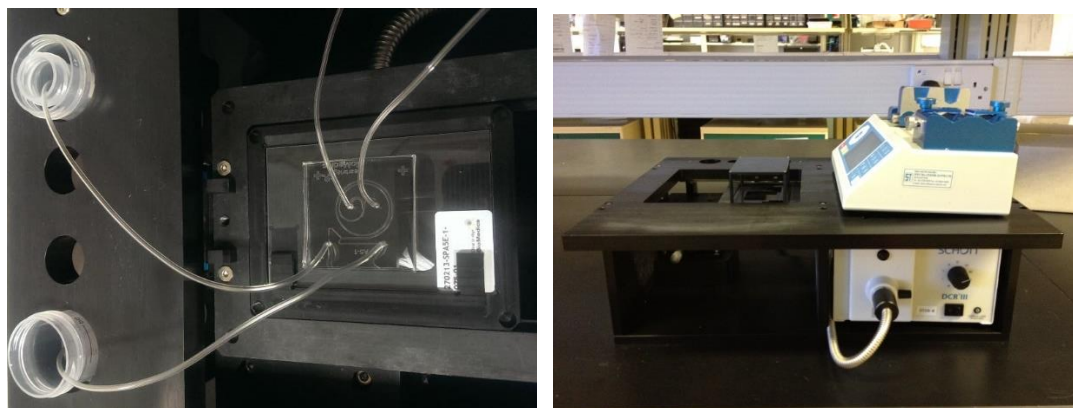
図 2. 実験デザイン

患者より血液を採取し、CTC、ctDNA、buffy coat から DNA を採取した。CTC は回収後に細胞数カウント用、培養用、NGS 用に分け、NGS 用は全ゲノム増幅 (WGA) を施行した。原発巣を使用できる患者は FFPE あるいは凍結切片を用いて DNA を採取した。これら CTC、ctDNA、buffy coat、原発巣より回収された DNA の遺伝子変異を NGS を用いて比較検討した。

< 3 > CTC の回収

CTC 検体の調製は 7.5~10 mL の EDTA 処理チューブに採取した。検体は、凝血塊を減少させ、細胞の生存能力を維持するために、採血後 3~4 時間以内に処理を開始した。採取した血液の 3 倍量の赤血球溶解緩衝液を加え、室温で 5~6 分間穏やかに転倒混和し、溶血させた。次に 10 分間 500 × g で遠心分離し、細胞のペレットを崩さないように上清を除去し、採取血液量の 2/3 量の Resuspension buffer を加え再懸濁を行った。CTC を含む細胞懸濁液を 100 mL/min で PBS を 800 mL/min の速さで CTChip-Spiral® system のコネクタより流し、CTC 溶液を分離回収した (図 3A、B)。回収した CTC 溶液は遠心管を用いて 10 分間 500 × g で遠心分離し、ペレットを崩さないように上清を除去し、1000 μL の PBS で再懸濁した。回収された CTC 溶液から細胞数カウントに用いるもの、培養を行うもの、

DNA を回収するものに向けた。



A

B

図 3. CTChip-Spiral[®] system (Clearbridge 社) の概要

A: 左上方の 15 mL 遠沈管に CTC 溶液が回収される。

左下方の 50 mL 遠沈管に廃液が流入する。

B: シリンジポンプを用い検体の流量を調整している。

< 4 > CTC 検体からの DNA 回収

CTChip-Spiral[®] system から回収した濃縮末梢循環腫瘍細胞溶液を 1.5 mL DNA Lo-binding tube に移し、 $200 \times g$ で 5 分間遠心分離を行い、丁寧に上清を除去した。CTC 検体からの DNA 抽出は WGA Kit である REPLI-g Single Cell Kit を使用し回収した。回収した DNA 濃度は、Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit を用い測定した。

< 5 > 血液からの ctDNA 抽出

EDTA 処理を行った血液 4-5 mL を室温で 10 分間、 $800 \times g$ で遠心分離し血漿を調製した。血漿を新しいチューブに移し、室温で 10 分間、3000 rpm で再遠心分離した。遠心分離後、上清の血漿を回収し、新しいチューブに移した。ctDNA を抽出するまで 4°C で冷蔵保存した。ctDNA は、QIAamp circulating nucleic acid kit を使用して回収した。ctDNA の濃度は、Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit を用いて測定した。

< 6 > 原発巣からの DNA 抽出

国立がん研究センター中央病院の病理部門のホルマリン固定パラフィン包埋組織が保管されている消化管がん患者を選択した。原発巣の DNA は、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit の説明書に従って HE 染色スライド上の腫瘍細胞の病理組織を確認後、ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded : FFPE) 組織から抽出した。頭頸部がん患者は凍結組織を用い、PureLink genome DNA Mini Kit の説明書に従い DNA を抽出した。原発巣の DNA 濃度は、Qubit® dsDNA HS Assay Kit を用いて測定した。

< 7 > buffy coat からの DNA 抽出

ヒト末梢血単核球 peripheral blood mononuclear cell (PBMC) は、QIAamp DNA Mini Kit を用いて末梢血から単離した。buffy coat の DNA 濃度は、Qubit® dsDNA HS Assay Kit を用いて測定した。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。

< 8 > CTC の同定検出

回収された CTC 溶液には大径のリンパ球も混在していた。CTC を同定する方法はさまざま報告されているが、本研究では CTC の定義は、①高度の核細胞質比—細胞質比があり、②白血球よりも大きく、③サイトケラチン (cytokeratin : CK) 陽性細胞とした。

回収された CTC の 1/10 量を、Nunc 96 オプティカルボトムプレート TC 黒カバーガラスを使用し、DMEM/F-12, HEPES + 10% Fetal Bovine Serum + ゲンタマイシン + アンホテリシン B を用い 1 日培養を施行した。翌日 PBS (Gibco 社) で洗浄後、4% paraformaldehyde (PFA) を用い 4°C の条件で 2 時間固定した。そして、PBS で 1 回洗浄を行い、0.1% Triton™ X-100 /PBS 100 μ L をウェルに入れた。その 3 分後に PBS で 2 回洗浄を行った。10% normal sheep serum (NSS) を用い 1 時間ブロッキングを行い、抗ケラチンサイトケラチンモノクローナル抗体マウス Keratin/Cytokeratin (AE1、AE3) を 100 μ L 加え 4°C で一晩反応を行った。反応後 PBS で 2 回洗浄を行い Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) を用い室温で 30 分間の二次抗体反応を行った。CK 陽性細胞は 3-133 CTCs/mL (中央値 14.5 CTCs/mL) であった (図 4)。

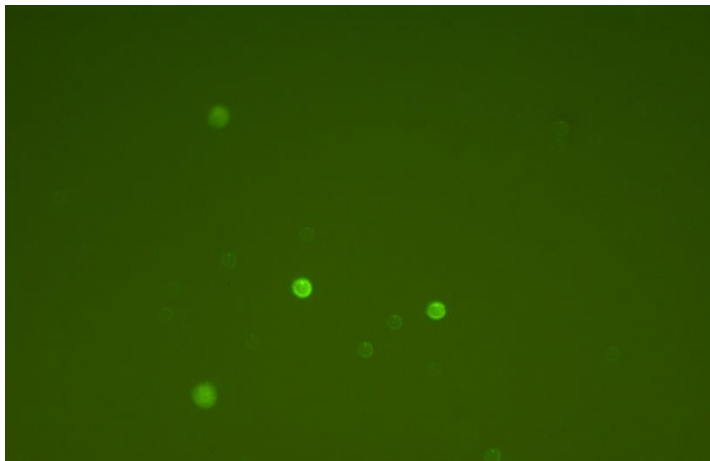


図 4. Cytokeratin 陽性細胞 (オリジナル倍率×200)

< 9 > Whole genome amplification (WGA) を行う前の事前実験

単離された CTC を使用する前に、細胞株 H1975 cell を RPMI 1640 + 10% FBS、37℃、5% CO₂ の条件下で培養を行い、10 個、100 個、1000 個を Nunc 96 オプティカルボトムプレート TC 黒カバーガラスに撒き 1 日培養を施行した。翌日には well から直接 WGA を行った。H1975 cell を 10 個撒いたウェルからも NGS に必要な十分量である 10 ng 以上の DNA を回収することができることを確認した。このことから、実臨床検体からも十分な検体量を採取できると考えられた。

< 10 > 次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing : NGS)

Ion Ampliseq Library Kit 2.0 を使用し、そのプロトコールに従い、10~50 ng の DNA をプールし 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 (表 2)。アダプター結合後に、AMPure ビーズを用い精製を行い、その後全 10 サイクルの PCR で増幅し、得られたライブラリーをさらに AMPure ビーズを用いて精製した。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、及び濃縮を施行した。得られた試料を Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 を使用し、Ion 316 Chip Kit v2 または Ion 318 Chip Kit v2 を用いシーケンスを施行した。

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

表 2. 標的 50 遺伝子

上に示す 50 遺伝子に関して NGS を施行し、遺伝子変異を検討した。

実験結果

1. CTC の培養

当初の方針は CTC の培養により細胞株を作製することと、細胞を増殖させてから、十分な DNA 量を採取してから NGS を行うことであった。

RPMI 1640 + 10% FBS を使用して回収された CTC の培養を行った。図 3 のように、CTC を分離する作業と実験台は清潔ではないため、最初の数検体は翌日には細菌のコンタミネーションを認めた。そこで、アンピシリンを培地に混ぜて使用した。週に 2 回 PBS で洗浄を施行した。抗菌薬を使用することにより、培養期間は延長されたが、2 週間程度培養を行うと、真菌の混入が見られたため、培地にゲンタマイシンとアンホテリシン B を使用することとした。抗真菌薬を併用することにより数か月培養することが可能となった。しかし、培養期間は延長したが、細胞は増加しなかった。そこで、培養条件の変更を試みた。CTC は幹細胞様であることが現在まで報告されているため⁷⁶、FBS を幹細胞培養に用いる Fetal Bovine Serum Qualified for human Embryonic Stem cells に変更し、非必須アミノ酸 (non-essential amino acid ; NEAA) を加え、培地を Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 (DMEM/F12) に変更し CTC を培養した。当初培養ディッシュには、Nunc 96 オプティカルボトムプレート TC 黒カバーガラスを使用した。腫瘍細胞が増殖した際に、トリプシンによる細胞障害を避け、ディッシュの交換を容易にするため温度応答性細胞培養容器である Repcell™を使用した。培養に関しては試行錯誤を繰り返し数か月培養したが、細胞の増殖がおこらず、培養を継続することは不能であった。

2. NGS による体細胞変異解析

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表に示した (表 3A-E)。

10 検体で遺伝子変異を確認した (10/33、30.3%)。

10 検体で遺伝子変異を確認した (10/33、30.3%)。

	CRC											EC								GC	HNC													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
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			■	■																														

表 3. 体細胞変異 A. CTC の体細胞変異

■ : missense, ■ : synonymous

10 検体で体細胞変異を確認し、そのうち頭頸部癌は3 検体であった。

原発	患者 番号	塩基置換
大腸	1	SMO c.969C>T, SMO c.971C>T ABL1 c.1206C>T
	3	VHL c.3551G>A, FGFR3 c.1936A>G, KIT c.96G>A KDR c.2623A>G, FBXW7 c.1444A>G, APC c.4329T>G MET c.4329T>G, SMO c.1229T>A, GNAQ c.671C>A KRAS c.148A>C, RB1 c.2009T>C, TP53 c.286T>C ERBB2 c.2580A>G, SMAD4 c.767A>T
	5	NRAS c.399G>A, IDH2 c.431G>A, SRC c.1574C>T
	6	SMARCB1 c.492C>T
	11	KIT c.1621A>C
食道	2	ALK c.3551G>A, KIT c.96G>A, APC c.4298C>T EGFR c.2617G>A, MET c.535G>A, GNAQ c.671C>A ABL1 c.1206C>T, ATM c.3912A>G, RB1 c.2039T>C TP53 c.290T>C, ERBB2 c.2580A>G, SMAD4 c.1060G>C
	7	AKT1 c.493A>G
頭頸部	8	CDKN2A c.197A>G
	9	TP53 c.214G>C
	11	APC c.4298C>T

表 3. 体細胞変異 B. CTC の体細胞変異 (塩基置換)

< 2 > ctDNA で同定された体細胞変異 (表 3C、D)

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、患者 4 と 9 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。

	CRC											EC								GC	HNC												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
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																																	

表 3. 体細胞変異 C. ctDNA の体細胞変異

■ : missense、■ : synonymous、■ : nonsense

16 検体で遺伝子変異を確認した。

TP53 の変異は 33 検体のうち 9 検体に認めた。

頭頸部がんでは 4 検体で変異を確認した。

原発	患者 番号	塩基置換
大腸	3	VHL c.767A>T, FGFR3 c.1936A>G KIT c.96G>A, FBXW7 c.1444A>G APC c.4329T>G, MET c.535G>A SMO c.1229T>A, GNAQ c.1230T>A TP53 c.722C>T, ERBB2 c.2580A>G
	4	FBXW7 c. 1436G>A, APC c. 4348C>T KRAS c. 38G>A
	5	PIK3CA c.3140A>G, PDGFRA c.2472C>T APC c.3916G>T, KRAS c.35G>A, TP53 c.580C>T
	9	KRAS c.38G>A, TP53 c.537T>A
	10	IDH1 c.359T>C, FGFR3 c.1936A>G, KDR c.2623A>G APC c.4329T>G, HNF1A c.585A>T, RB1 c.2009T>C
	11	PDGFRA c.2472C>T, KIT c.1621A>C, MET c.534C>T MET c.1124A>G, SMO c.582A>G RET c.2651A>T, TP53 c.710T>A ERBB2 c.2327G>T, SMAD4 c.1060G>C
食道	2	PIK3CA c.1633G>A, TP53 c.743G>A
	3	BRAF c.1799T>A
	4	TP53 c.797G>A
	5	KRAS c.35G>C, RB1 c.393C>A, TP53 c.844C>T
	6	IDH1 c.347A>G
	8	TP53 c.473G>C
頭頸部	5	ABL1 c.1206C>T
	6	HNF1A c.585A>T
	7	SMAD4 c.1335A>G
	11	TP53 c.214C>G

表 3. 体細胞変異 D. ctDNA の体細胞変異 (塩基置換)

<3> 大腸がんの原発巣と CTC、ctDNA の体細胞変異の比較 (表 3E)

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。原発巣の FFPE が利用できたものは 3 例あり表 3E に示した。

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。患者 4 では FFPE と ctDNA の KRAS 遺伝子変異の位置が一致したが、事前に調べていた KRAS 遺伝子変異の位置とは一致していなかった。また、患者 5、患者 9 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原発巣と変異の位置が一致した。

また、頭頸部がんに関しては原発巣から NGS を施行しているが、CTC や ctDNA からの変異は大腸がんと比較して確認できなかった検体も多く、原発巣の coverage depth が低かったため、表には示していない。

患者 番号	KRAS 変異	塩基置換		
		原発	CTC	ctDNA
1	WT	—	SMO c.969C>T SMO c.971C>T ABL1 c.1206>T	—
2	WT	—	—	—
3	WT	TP53 c.722C>T	VHL c. 3551G>A FGFR3 c. 1936A>G KIT c.96G>A KDR c.2623A>G FBXW7 c.1444A>G APC c.4329T>G MET c.4329T>G SMO c.1229T>A GNAQ c.671C>A KRAS c.148A>C RB1 c.2009T>C TP53 c.286T>C ERBB2 c.2580A>G SMAD4 c.767A>T	VHL c.767A>T FGFR3 c.1936A>G KIT c.96G>A FBXW7 c.1444A>G APC c.4329T>G MET c.535G>A SMO c.1229T>A GNAQ c.1230T>A TP53 c.722C>T ERBB2 c.2580A>G
4	WT	FBXW7 c.1436G>A APC c.4348C>T KRAS c.38G>A TP53 c.323G>A	—	FBXW7 c. 1436G>A APC c. 4348C>T KRAS c. 38G>A
5	12MT	—	NRAS c.399G>A IDH2 c.431G>A	PIK3CA c.3140A>G

			SRC c.1574C>T	PDGFRA c.2472C>T APC c.3916G>T KRAS c.35G>A TP53 c.580C>T
6	12MT	—	SMARCB1 c.492C>T	—
7	12MT	—	—	—
8	12MT	—	—	—
9	13MT	—	—	KRAS c.38G>A TP53 c.537T>A
10	WT	NRAS c.183A>T BRAF c.1406G>C TP53 c.733G>A	—	IDH1 c.359T>C FGFR3 c.1936A>G KDR c.2623A>G APC c.4329T>G HNF1A c.585A>T RB1 c.2009T>C
11	WT	—	KIT c.1621A>C	PDGFRA c.2472C>T KIT c.1621A>C MET c.534C>T MET c.1124A>G SMO c.582A>G RET c.2651A>T TP53 c.710T>A ERBB2 c.2327G>T SMAD4 c.1060G>C

表 3. 体細胞変異 E. 大腸がんの原発巣との体細胞変異の比較 (塩基置換)

考察

Liquid biopsy の研究の目的は、(a) 転移性再発または転移の進行の危険性の推定、(b) 患者の層別化及び治療の有効性のリアルタイムモニタリング、(c) 治療標的および耐性機構の識別や転移機構の解析などである。

今回研究対象は CTC と ctDNA とした。CTC の細胞増殖は非常に緩徐であり、この理由としては、CTC が幹細胞様であり増殖しにくいこと⁷⁶、CTC の 97%は血中から数日以内に除去されていること⁷⁹、CTC の一部は、アポトーシスの起こりやすい状態であること⁸⁰や CTC が休眠状態であること⁸¹などが考えられた。当初 CTC の培養を行い、腫瘍細胞を増殖させてから 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、NGS に必要な DNA 量は 10 ng であり、これは 1665 細胞分の DNA 量に該当する。しかし、回収された CTC の全量 (CTC と大径のリンパ球を含む) から DNA を回収しても、必要量には満たないため、全ゲノム増幅を行う方針に変更した。2014 年に Science 紙で乳がんの CTC の培養報告⁸²がなされたが、培養による CTC の研究は今後の課題であると考えられる。CTC を培養することができれば、転移しやすいがん細胞の性質や遺伝子変異がどのようなものであるかがわかる可能性がある。

また、原発腫瘍から EMT を起こしたがん細胞の一部は、間葉系変化に伴い血流への流入が起こり、CTC^{83,84}を形成するため、間葉系の性質を持つことによりその運動性が上昇することとなる。最近の CTC 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 CTChip-Spiral[®] system を用いた。この方法では上皮性マーカーを使用しないため、EpCAM の発現がない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 を分離回収することが可能と考えられる。一方でこの方法の問題点としては、小径の CTC と大径のリンパ球の混在が起こるため、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。CK 染色を行って確認された回収細胞数は 3-133 CTCs/mL (中央値 14.5 CTCs/mL) であった。現在主流である細胞表面マーカーを用いる CellSearch[®] system と 5 人の患者において回収 CTC の数を比較した。CellSearch[®] system は 0-1 個/7.5 mL であった。CellSearch[®] system では EpCAM と CK でセレクションしているので、厳密な比較とは言えないが、本法での回収可能な CTC 数は CellSearch[®] system より多い可能性が示唆された。

NGS 解析の結果に関しては検討の余地があるが、少ない細胞数の中からも、WGA という方法を用い DNA 量を増量し、そこから NGS を行い、CTC の体細胞変異を解析できた。今回の結果では 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。この理由としては、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。たとえば ctDNA は原発や転移巣の腫瘍細胞が壊死し血中に流れ出た DNA であるが、CTC も原発巣、転移巣両者とも反映しうるが、その中でも特に EMT を起こし浸潤能を獲得した腫瘍細胞であるため、壊死して ctDNA を放出しやすい腫瘍細胞とは性質が異なっている可能性が考えられる。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。CTC は不均一な状態であり、本法では回収された CTC 溶液に必ず大径のリンパ球が混入してしまうために、全回収細胞のうち体細胞変異を獲得した細胞の割合が少なければ、NGS で変異を確認できない可能性がある。最近では、本機器を開発した Clearbridge 社より全自動化及び 2 回 run を行い、リンパ球の混在を減少させ、CTC を 1 回 run した場合より純粋に CTC を回収する機器が開発されている。より純粋な CTC を回収できれば解析の成功率も上昇すると考えられる。

今回大腸がんで 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。従来報告されている体細胞変異を持たない CTC であった可能性や正常細胞の割合が多かったため変異を検出できなかった可能性も考えられうる。

現在まで ctDNA から NGS を行ったという報告⁸⁵は数多くなされており、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おらず、報告も CellSearch® system を用いた方法でもいまだに少ない⁸⁶。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り、これは世界で初めてと考えられた。

現時点では CTC からの解析では実臨床への応用は困難と考えられるが、CTC の研究により、がんの浸潤転移の機構の一部が明らかとなってくると考えられた。

総括および結論

1. 得られた新知見

- **miRNA** の発現が内反性乳頭腫のがん化に関して変化していること、扁平上皮がんにおいて過剰発現している **miR-296-3p** は、**PTEN** の発現を調節することを示唆した。
- **CTChip-Spiral® system** を用いて回収された **CTC** や **ctDNA** から **NGS** を行い、体細胞変異を検出し比較することができた。

2. 新知見の意義

- **miR-296-3p** は頭頸部領域における発がんに関連するバイオマーカーとなることが期待される。
- リキッドバイオプシーにより体細胞変異を検出することが可能となれば、患者のがんの体細胞変異をリアルタイムに把握することが可能となると期待される。

3. 今後の研究展開

- **miRNA** の標的として内反性乳頭腫から発生する扁平上皮がんに対する予防および治療戦略、および **PI3K/AKT** 経路と **p53-p21** 経路に対する予防および治療戦略に関係する可能性がある。
- **CTC** 自体がどのようなものか (原発巣を反映するものなのか、転移巣を把握するものか) 分かっていないため、臨床的に先に応用されるのは **ctDNA** であると考えられるが、研究が進歩することによって、がんの転移機構に関する機序の解明につながる可能性がある。

4. 今後の課題

- 頭頸部領域のがん化に関連する **miRNA** に関して **miR-296-3p** 以外にも発がんや生命予後などに関連する因子がないか、追加して探索を行う必要がある。
- 頭頸部がんの転移に関係すると考えられる **CTC** に関してその性質、体細胞変異などを検討し、今後その結果が実臨床に応用できるように研究をすすめていく必要がある。

謝辞

このような機会を与えてくださった北海道大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野 福田 諭教授、国立がん研究センター研究所 創薬臨床研究分野 分野長 山田哲司先生に厚く御礼を申し上げます。学ばせていただいたさまざまなことを、今後活かしていきたいと思います。

また、同研究所 創薬臨床研究分野の方々にも大変お世話になりました。特に、ユニット長 本田一文先生には、実験に関するさまざまなことを丁寧にご指導いただき、感謝申し上げます。他の大学院生の先生方にはさまざまなことにおいて支えて頂き感謝申し上げます。

さらに、耳鼻咽喉科・頭頸部外科の医局員からも数多くの貴重なご意見、ご協力を頂きました。実験結果についての議論、国内での発表の場を与えて頂いたことを感謝しております。

引用文献

- 1 Raab-Traub, N. & Flynn, K. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell*. 47, 883-889(1986).
- 2 Mineta, H. *et al.* Human papilloma virus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 18, 4765-4768(1998).
- 3 Goldenberg, D. *et al.* Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon. *Head Neck*. 30, 898-903(2008).
- 4 Mizumachi, T. *et al.* Improved survival of Japanese patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int. J. clin. Oncol*. 18, 824-828(2013).
- 5 Allen, C. T. *et al.* Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. *Laryngoscope*. 120, 1756-1772(2010).
- 6 Hoffmann, M. *et al.* p16 (INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int. J. cancer*. 127, 1595-1602(2010).
- 7 Fischer, C. A. *et al.* Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int. J. cancer*. 126, 1256-1262(2010).
- 8 Barnes, L. Schneiderian papillomas and nonsalivary glandular neoplasms of the head and neck. *Mod patho*. 15, 279-297(2002).
- 9 Myers, E. N. *et al.* Management of inverted papilloma. *Laryngoscope*. 100, 481-490(1990).
- 10 Furuta, Y. *et al.* Molecular pathologic study of human papillomavirus infection in inverted papilloma and squamous cell carcinoma of the nasal cavities and paranasal sinuses. *Laryngoscope*. 101, 79-85(1991).
- 11 Nakamaru, Y. *et al.* Preservation of the nasolacrimal duct during endoscopic medial maxillectomy for sinonasal inverted papilloma. *Rhinology*. 48, 452-456(2010).
- 12 Zhang, L. *et al.* Endoscopic management of the inverted papilloma with attachment to the frontal sinus drainage pathway. *Acta Otolaryngol*. 128, 561-568(2008).
- 13 Syrjanen, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J. clin. Virol*. 32 Suppl 1, S59-66(2005).
- 14 zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst*. 92, 690-698(2000).

- 15 Narisawa-Saito, M. & Kiyono, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 98, 1505-1511(2007).
- 16 Syrjanen, K. & Syrjanen, S. Detection of human papillomavirus in sinonasal papillomas: systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope.* 123, 181-192(2013).
- 17 Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* 302, 1-12 (2007).
- 18 Kinoshita, T. *et al.* The functional significance of microRNA-375 in human squamous cell carcinoma: aberrant expression and effects on cancer pathways. *J. Hum. Genet.* 57, 556-563(2012).
- 19 Christensen, B. C. *et al.* A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis.* 30, 1003-1007(2009).
- 20 Hatakeyama, H. *et al.* Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 5, e12702(2011).
- 21 Nagata, Y. *et al.* PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 6, 117-127(2004).
- 22 Steck, P. A. *et al.* Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* 15, 356-362(1997).
- 23 Li, J. *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 275, 1943-1947(1997).
- 24 Yoon, A. R. *et al.* MicroRNA-296 is enriched in cancer cells and downregulates p21WAF1 mRNA expression via interaction with its 3' untranslated region. *Nucleic Acids Res.* 39, 8078-8091(2011).
- 25 Wurdinger, T. *et al.* miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer cell.* 14, 382-393(2008).
- 26 Hong, L. *et al.* The prognostic and chemotherapeutic value of miR-296 in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg.* 251, 1056-1063(2010).
- 27 Liu, X. *et al.* MiRNA-296-3p-ICAM-1 axis promotes metastasis of prostate cancer by possible enhancing survival of natural killer cell-resistant circulating tumour cells. *Cell Death Dis.* 4, e928(2013).
- 28 Stambolic, V. *et al.* Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol. Cell.* 8, 317-

- 325(2001).
- 29 Pedrero, J. M. *et al.* Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 114, 242-248(2005).
 - 30 da Costa, A. A. *et al.* Low PTEN expression is associated with worse overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with chemotherapy and cetuximab. *Int. J. Clin. Oncol.* 20, 282-289(2015).
 - 31 Stransky, N. *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science.* 333, 1157-1160(2011).
 - 32 Agrawal, N. *et al.* Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science.* 333, 1154-1157(2011).
 - 33 Squarize, C. H. *et al.* PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia.* 15, 461-471(2013).
 - 34 Chung, C. H. *et al.* Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell.* 5, 489-500(2004).
 - 35 Hatakeyama, H. *et al.* Protein clusters associated with carcinogenesis, histological differentiation and nodal metastasis in esophageal cancer. *Proteomics.* 6, 6300-6316(2006).
 - 36 Almendro, V. *et al.* Genetic and phenotypic diversity in breast tumor metastases. *Cancer Res.* 74, 1338-1348(2014).
 - 37 Shah, S. P. *et al.* Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature.* 461, 809-813(2009).
 - 38 Klein, C. A. Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature.* 501, 365-372(2013).
 - 39 Aceto, N. *et al.* Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell.* 158, 1110-1122(2014).
 - 40 Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 501, 328-337(2013).
 - 41 Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J. & Swanton, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature.* 501, 338-345(2013).
 - 42 Yap, T. A. *et al.* Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Science Transl. Med.* 4, 127ps110(2012).
 - 43 Shibata, D. Cancer. Heterogeneity and tumor history. *Science.* 336, 304-305(2012).
 - 44 Longo, D. L. Tumor heterogeneity and personalized medicine. *N. Engl. J. Med.*

- 366, 956-957(2012).
- 45 Gerlinger, M. *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* 366, 883-892(2012).
 - 46 Kim, H. *et al.* Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res.* 25, 316-327(2015).
 - 47 Arena, S. *et al.* Emergence of Multiple EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* 21, 2157-2166(2015).
 - 48 Misale, S. *et al.* Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Sci. Trans. Med.* 6, 224ra226(2014).
 - 49 Junttila, M. R. & de Sauvage, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature.* 501, 346-354(2013).
 - 50 Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J. & Siu, L. L. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature.* **501**, 355-364(2013).
 - 51 Zhang, J. *et al.* Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science.* 346, 256-259(2014).
 - 52 Chouaid, C. *et al.* Feasibility and clinical impact of re-biopsy in advanced non small-cell lung cancer: a prospective multicenter study in a real-world setting (GFPC study 12-01). *Lung cancer.* 86, 170-173(2014).
 - 53 Diaz, L. A., Jr. *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature.* 486, 537-540(2012).
 - 54 van de Stolpe, A. *et al.* Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res.* 71, 5955-5960(2011).
 - 55 Magbanua, M. J. *et al.* Genomic profiling of isolated circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Cancer Res.* 73, 30-40(2013).
 - 56 Gasch, C. *et al.* Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin. Chem.* 59, 252-260(2013).
 - 57 Ashworth, T. R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death *Australian Med. J.* 14, 146-7(1869).
 - 58 Cristofanilli, M. *et al.* Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 1420-1430(2005).
 - 59 Hayes, D. F. *et al.* Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall

- survival. *Clin Cancer Res.* 12, 4218-4224(2006).
- 60 de Bono, J. S. *et al.* Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 6302-6309(2008).
- 61 Davis, J. W. Circulating tumor cell assays for the prognosis of prostate and colon cancers. *Expert Opin. Med. Diagn.* 3, 293-301(2009).
- 62 Cohen, S. J. *et al.* Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 3213-3221(2008)
- 63 Konigsberg, R. *et al.* Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* 50, 700-710(2011).
- 64 Hou, H. W. *et al.* Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Sci. Rep.* 3, 1259(2013).
- 65 Tan, S. J. *et al.* Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood. *Biomed. Microdevices.* 11, 883-892(2009).
- 66 Lievre, A. *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66, 3992-3995(2006).
- 67 Sok, J. C. *et al.* Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin. Cancer Res.* 12, 5064-5073(2006).
- 68 Lu, Y. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) ubiquitination as a mechanism of acquired resistance escaping treatment by the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Res.* 67, 8240-8247(2007).
- 69 Rajput, A. *et al.* A novel mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor antagonism in vivo. *Cancer Res.* 67, 665-673(2007).
- 70 Wheeler, D. L. *et al.* Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab. *Cancer Biol. Ther.* 8, 696-703(2009).
- 71 Wikstrand, C. J. *et al.* Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.* 55, 3140-3148(1995).
- 72 Zeineldin, R. *et al.* Mesenchymal transformation in epithelial ovarian tumor cells expressing epidermal growth factor receptor variant III. *Mol. Carcinog.* 45, 851-860(2006).
- 73 Olapade-Olaopa, E. O. *et al.* Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. cancer.* 82, 186-194(2000).
- 74 Cunningham, M. P. *et al.* Coexpression, prognostic significance and predictive

- value of EGFR, EGFRvIII and phosphorylated EGFR in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 27, 317-325(2005).
- 75 Yang, J. *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 117, 927-939(2004).
- 76 Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 133, 704-715(2008).
- 77 Okamoto, N. *et al.* Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108, 20388-20393(2011).
- 78 Lindstrom, L. S. *et al.* Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. *J. Clin. Oncol.* 30, 2601-2608(2012).
- 79 Weinberg, R. A. Leaving home early: reexamination of the canonical models of tumor progression. *Cancer cell.* 14, 283-284(2008).
- 80 Allen, J. E. *et al.* Apoptotic circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of metastatic colorectal cancer patients are associated with liver metastasis but not CTCs. *Oncotarget.* 5, 1753-1760(2014).
- 81 Marches, R., Scheuermann, R. & Uhr, J. Cancer dormancy: from mice to man. *Cell Cycle.* 5, 1772-1778(2006).
- 82 Yu, M. *et al.* Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science.* 345, 216-220(2014).
- 83 Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R. & Thompson, E. W. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The J. Cell Biol.* 172, 973-981(2006).
- 84 Thiery, J. P. & Lim, C. T. Tumor dissemination: an EMT affair. *Cancer Cell.* 23, 272-273(2013).
- 85 Zill, O. A. *et al.* Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer Discov.* 5, 1040-1048(2015).
- 86 Kelley, R. K. *et al.* Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: a pilot study of detection, enumeration, and next-generation sequencing in cases and controls. *BMC Cancer.* 15, 206(2015).