

プロジェクト名

頭頸部・食道扁平上皮がん精密医療研究拠点形成プロジェクト

目的

本研究は、頭頸部・食道扁平上皮がん (HNSCC・ESCC)の臨床検体をバイオリソースセンター (BRC)と連携しながらバンキングおよび解析するシステムを構築した上で、クリニカルシーケンスを通じた個別化医療 (Precision Medicine)を実践するための体制を整備し、難治性がんである SCC 患者およびその家族の苦痛の軽減と療養生活の質の維持向上を目的として実施する。

構成メンバー

- 稲澤 譲治 教授 ゲノム応用医学研究 分子細胞遺伝
- 石川 俊平 教授 ゲノム応用医学研究 ゲノム病理学
- 角田 達彦 教授 ゲノム応用医学研究 医科学数理
- 河野 辰幸 教授 医学部附属病院 食道外科
- 江石 義信 教授 医学部附属病院 病理部
- 朝蔭 孝宏 教授 医学部附属病院 頭頸部外科
- 三宅 智 教授 医学部附属病院 腫瘍センター
- 原田 浩之 教授 歯学部附属病院 顎口腔外科
- 坂本 啓 講師 歯学部附属病院 口腔病理
- 竹本 暁 特任助教 疾患バイオリソースセンター
- 村松 智輝 助教 難病基盤・応用研究プロジェクト室

研究成果

・扁平上皮がん (SCC)を対象としたがん浸潤・転移解析

HNSCC・ESCC は、比較的早期にリンパ節転移が起きやすく、予後不良である。本研究では、口腔扁平上皮がん (OSCC)および ESCC を対象とし、がん転移関連遺伝子の同定を目指した。*In vivo selection* 法を用いて、OSCC 細胞株 HOC313 (親株)から高転移性亜株 HOC313-LM を樹立し、ゲノムコピー数解析により、19p13.2-13.13 領域に HOC313-LM 特異的な増幅を認め、その増幅領域に座位する Deoxyhypusine synthase (DHPS)をがん転移関連遺伝子として同定した。DHPS は、ハイプシン経路の活性化を介し、RhoA による移動・浸潤能を亢進するだけでなく、*in vivo* での腫瘍形成能をも上昇させることを明らかにしました。さらに、東京医科歯科大学・ESCC 臨床検体を用いた免疫組織化学染色の解析では、DHPS 高発現群において再発の予後不良に関連していることならびに遠隔転移との相関を認めた。したがって、ハイプシン化経路は、扁平上皮がんにおける新規がん治療標的経路であることが示唆された。(Muramatsu T et al. *Oncogene* 2016)

さらに、HOC313-LM から放出されるエクソソーム内のマイクロ RNA (miRNA)の機能解析を行った。エクソソーム内の miRNA を網羅的 miRNA 発現アレイにより解析し、高転移性株のエクソソーム特異的に発現している *miR-1246* を同定した。*miR-1246* は、標的遺伝子

である DENND2D の発現を抑制することにより、がん細胞の運動能を亢進させた。以上より、*miR-1246* は、がん転移促進 miRNA である可能性が示唆された。(Sakha S et al. *Sci Rep.* 2016)

・食道扁平上皮がんのエピゲノム解析

ESCC ではリンパ節転移の有無が予後を大きく左右するためリンパ節転移予測マーカーの同定を試みた。67 例を対象に外科切除の ESCC 腫瘍/非腫瘍組織由来 DNA を用いてビーズアレイ法による網羅的 DNA メチル化解析を実施した。その結果、ESCC のリンパ節転移の有無と有意に相関する DNA メチル化マーカー候補として計 10 個の遺伝子 (座) が統計学的に選出された。選出された 10 遺伝子のバイオマーカーとしての有用性を確認するため、先の 67 例とは異なる ESCC 57 症例の検証コホートを用いてパイロシーケンスによる DNA メチル化検出の再現性の確認とリンパ節転移の関連性について統計学的に解析した。その結果、新規の ESCC リンパ節転移予測 DNA メチル化マーカーとして最終的に 2 遺伝子 (HOXB2、SEPT9) を絞り込むことができた。今回の研究において見出された 2 種類の ESCC リンパ節転移予測マーカーの臨床応用に期待がかかる。(Nagata H et al. *Oncotarget* 2017)

・FFPE 組織由来 DNA を用いたターゲットリシーケンス解析

口腔扁平上皮がん (OSCC)における診断および予後に関するゲノム要因について次世代シーケンサー (NGS)を用いて明らかにすることを目的とした。220 例の OSCC 臨床検体のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE)組織より gDNA を抽出し、がん関連 50 遺伝子のターゲットリシーケンスを行った。検出された体細胞変異およびコピー数変異と臨床病理学的情報を統合解析した結果、チロシンキナーゼ受容体 (RTK)の増幅を認めた 37 例中 9 例が遠隔転移を認め、これは全遠隔転移例の 43%を占めていた。RTK 増幅群の 5 年生存率は 64.6%であり、さらに RTK 増幅かつ TP53 の体細胞変異を有する群では 5 年生存率は 41.6%と極めて予後不良であった。RTK の増幅は口腔扁平上皮がんにおける遠隔転移の予後予測因子であることならびに NGS を用いたクリニカルシーケンスの有用性が示された。(Oikawa Y et al. *Cancer Sci.* 2017)

・食道扁平上皮がんのゲノム・エピゲノム、トランスクリプトーム統合オミックス解析

本学医学部附属病院および癌研究所で収集された ESCC 患者の腫瘍/非腫瘍組織のペア検体 88 例 (本学: 68 例、癌研究所: 20 例)を対象に、全エクソンシーケンス、網羅的 DNA メチル化ビーズアレイ、RNA-seq のデータを基に統合オミックス解析を行った。その結果、細胞周期関連遺伝子やいくつかのシグナル経路に特徴的な遺伝子変異および増幅が検出された。さらに、ESCC は遺伝子変異の特徴によって 2 つの異なるクラスターに分類できることが明らかになった。現在、上記研究成果については投稿準備中である。

・血液検体の採取・蓄積の状況 (疾患バイオリソースセンターとの連携)

2018 年 10 月末日までに、食道癌 204 症例、咽頭癌 61 症例、喉頭癌 12 症例、口腔癌 347 症例 (医学部附属病院 77 症例、歯学部附属病院 270 症例)が、各々包括的同意に基づいて

検体収集されている。組織、血清、DNA,FFPE の内訳を以下に示す。

	食道癌	咽頭癌	喉頭癌	口腔癌 (医)	口腔癌 (歯)
同意取得者	204	61	12	77	270
血清	196	50	12	62	270
DNA	193	50	12	60	270
病理凍結検	84	22	4	58	249
FFPE 検体	66	18	4	28	44
累計	539	140	32	208	833

・クリニカルシーケンスの進行状況

2017 年 8 月より医学部附属病院において開始されたクリニカルシーケンスは、2018 年 10 月末日までに 70 例を超える。そのうち、食道癌が 6 例、頭頸部癌が 4 例含まれる。

・マイクロ RNA を用いた核酸創薬の開発

マイクロ RNA(miRNA)は、約 22 塩基からなるノンコーディング機能性 RNA であり、標的遺伝子の転写産物に直接結合することにより、遺伝子発現を負に制御する働きを持つ。ヒトでは 2,500 種以上の miRNA が知られており、発生、分化、細胞増殖・生存、代謝調節など様々な生命現象に深く関与している。近年、核酸医薬として、がん抑制型 miRNA の補充療法が注目されている。しかし、効率的にがん細胞に miRNA を送達させるためのドラッグデリバリー技術の開発は、非常に課題が多いため、核酸創薬のボトルネックともいえる。一方で、HNSCC・ESCC は比較的病変部に直接アプローチしやすいことから、miRNA 含有塗り薬の開発や局所投与を目的とした創薬が有用であると考え、現在までに我々が同定してきたがん抑制型 miRNA を種とし、臨床応用を目指した核酸医薬の開発を推進している。

・Circulating Tumor Cells (CTCs) 解析

CTC 解析の方法の一つとして、現在までに膵臓癌細胞株を移植した担癌マウスの血液から CTC の分離および培養を行い、CTC 亜株の樹立法を確立してきた。上記方法で樹立した CTC 亜株については、表現型や網羅的遺伝子発現アレイの解析により、親株との比較解析を行った。その結果、CTC 亜株における TGFBI 遺伝子の発現亢進が移動・浸潤を増加させることを明らかにした。さらに、膵臓癌臨床検体 75 例を用いた解析では、TGFBI の発現が高い群では予後不良であることを見出した。(Sato T et al. Cancer Sci. 2018) 上記結果から、今後の HNSCC・ESCC を用いた CTC 解析における基礎的なデータを蓄積することができた。

発表業績 (頭頸部・食道 SCC を対象とした研究)

1. Muramatsu T, Kozaki KI, Imoto S, Yamaguchi R, Tsuda H, Kawano T, Fujiwara N, Morishita M, Miyano S, Inazawa J. The hypusine cascade promotes cancer progression and metastasis through the regulation of RhoA in squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 35(40):5304-5316. 2016
2. Nuylan M, Kawano T, Inazawa J, Inoue J. Down-regulation of LAPTM5 in human cancer cells. *Oncotarget*. 7(19):28320-8. 2016
3. Sakha S, Muramatsu T, Ueda K, Inazawa J. Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 6:38750. 2016
4. Oikawa Y, Morita KI, Kayamori K, Tanimoto K, Sakamoto K, Katoh H, Ishikawa S, Inazawa J, Harada H. Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 108(2):256-266. 2017
5. Okuda M, Inoue J, Fujiwara N, Kawano T, Inazawa J. Subcloning and characterization of highly metastatic cells derived from human esophageal squamous cell carcinoma KYSE150 cells by in vivo selection. *Oncotarget*. 8(21):34670-34677. 2017
6. Nagata H, Kozaki KI, Muramatsu T, Hiramoto H, Tanimoto K, Fujiwara N, Imoto S, Ichikawa D, Otsuji E, Miyano S, Kawano T, Inazawa J. Genome-wide screening of DNA methylation associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 8(23):37740-37750. 2017
7. Akdemir B, Nakajima Y, Inazawa J, Inoue J. miR-432 Induces NRF2 Stabilization by Directly Targeting KEAP1. *Mol Cancer Res*. 15(11):1570-1578. 2017

総説 (和文)

1. 村松智輝、稲澤譲治「ハイプシン経路によるがん浸潤・転移メカニズム」
次世代がん治療 :発症・転移メカニズムからがん免疫療法・ウイルス療法、診断法まで
エヌ・ティー・エス 2017年6月8日 p.59-65
2. 村松智輝、稲澤譲治「In vivo 選択法による高転移がん細胞亜株の分離」
がん転移学
日本臨床 2017年11月20日 p.130-136

その他 (特許など)

特許

1. 発明の名称：食道がんのリンパ節転移可能性のデータ取得方法
出願番号：特願 2017-036122
出願日：2017/2/28
発明者：稲澤譲治、村松智輝、永田啓明、谷本幸介、河野辰幸、井元清哉、宮野悟
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、国立大学法人東京大学、株式会社ビー・エム・エル
2. 発明の名称：マイクロ RNA 及びその誘導体を有効成分とするがん治療剤
出願番号：特願 2017-229046
出願日：2017/11/29

発明者：稲澤譲治、玄泰行、村松智輝、外内えり奈
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学