

Value of Liquid Biopsy Monitoring of Circulating Tumor DNA in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-04-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 今井, 篤志, 三澤, 清, 山田, 智史, 岡村, 純, 望月, 大極, 山口, 裕貴, 瀧澤, 義徳, 細川, 誠二, 峯田, 周幸 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00004124

HPV 関連中咽頭癌例に対する血液循環腫瘍 DNA を用いたリキッドバイオプシーの有用性

今井 篤志・三澤 清・山田 智史
岡村 純*・望月 大極・山口 裕貴
瀧澤 義徳・細川 誠二・峯田 周幸

Value of Liquid Biopsy Monitoring of Circulating Tumor DNA in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer

Atsushi Imai, Kiyoshi Misawa, Satoshi Yamada, Daiki Mochizuki,
Yuki Yamaguchi, Yoshinori Takizawa, Seiji Hosokawa and Hiroyuki Mineta

(Hamamatsu University School of Medicine)

Jun Okamura

(Seirei Hamamatsu General Hospital)

Liquid biopsy has the alternative utility, besides being a diagnostic tool, as a minimally invasive monitoring tool for disease profiling and prognostication. Recently, the incidence of HPV-associated oropharyngeal cancer has been increasing. Also, the choices of chemotherapy, including immune checkpoint inhibitor therapy, has been increasing. A minimally invasive diagnostic tool is desired.

Herein, we demonstrate the usefulness of liquid biopsy, not only for HPV ctDNA monitoring, but also for diagnosis of recurrence, in a patient with HPV-OPC. The ctDNA concentrations decreased and serum HPV-DNA became negative after surgery for the primary tumor. When the patient developed a pulmonary lesion during the follow-up after initial treatment, we initially suspected primary lung cancer clinically. The operated lesion turned out to be a metastatic lesion. The test for HPV-DNA, which had become negative before, had become positive before the pulmonary surgery, suggesting recurrent disease.

Liquid biopsy for monitoring of the ctDNA has the potential to allow the disease status to be monitored in patients with HPV-OPC.

Keywords : liquid biopsy, circulating tumor DNA, HPV-associated oropharyngeal cancer

はじめに

クリニカルシーケンスとは、がん関連遺伝子変異を網羅的に解析して診断・治療に応用する手段であり、近年では低侵襲で経時的にモニタリング可能なリキッドバイオプシー（液性診断）の研究が増えている。

中咽頭癌ではヒトパピローマウイルス（human papilloma virus: HPV）関連癌の割合が増加してきており、従来の

喫煙関連癌との発現様式や臨床形態の相違から、2017年にUICCの第8版でTNM分類が区別された。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の登場で化学療法の選択肢が増えて薬剤シーケンスの重要性が増していることから、薬剤耐性に関連する病態の経時的分析が個別化医療の鍵になると思われる。

今回われわれは、HPV関連中咽頭癌症例の末梢血か

ら循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) の濃度を測定し, さらに ctDNA から HPV を検出することができた. 治療前から転移を含む経過をモニタリングできたので, 臨床経過との関連を検討して報告する.

症 例

症例: 42 歳, 男性.

主訴: 咽頭痛, 右頸部腫瘍.

既往歴: なし.

嗜好歴: 飲酒歴: ビール 1 本・焼酎 10 杯・日本酒 5 合/日×22 年, 喫煙歴: 15 本/日×22 年.

現病歴: 当科初診 1 ヶ月前に咽頭痛と右頸部腫瘍を主訴に近医総合病院耳鼻咽喉科を受診した. 右口蓋扁桃腫瘍と右頸部リンパ節の細胞診が施行され, 扁平上皮癌の診断であったため精査加療目的で当科紹介受診となった.

初診時所見: 右口蓋扁桃を主座とする弾性硬で 5 cm

大の潰瘍を伴う腫瘍を認めた (図 1 a). また, 右上内深頸リンパ節に 3 cm 大の腫瘍を触知した.

初診後経過: 右口蓋扁桃の腫瘍は, 病理組織学的検査で中～低分化型扁平上皮癌と診断された. また, p16 免疫染色で陽性を示し, 組織生検から抽出した DNA でも HPV は陽性であった. 画像検査では, 中咽頭右側壁に内部不均一で造影効果を伴う約 40 mm 大の腫瘍性病変と, 右上内深頸領域に転移が疑われる 35 mm 大の腫大リンパ節を認めた (図 1 b～e). 中咽頭右側壁癌 cT4N1M0 Stage III (UICC 第 8 版) の診断に対して手術加療を選択された.

初診約 3 週間後に, 下顎離断と上顎部分切除を伴う中咽頭悪性腫瘍切除術, 両側頸部郭清術 (I～IV), 気管切開術, 遊離腹直筋皮弁再建術を施行した (図 2). 摘出標本は病理組織学的検査で p16 陽性の低分化型扁平上皮癌との診断であった. 腫瘍径は 44 × 42 × 37 mm で

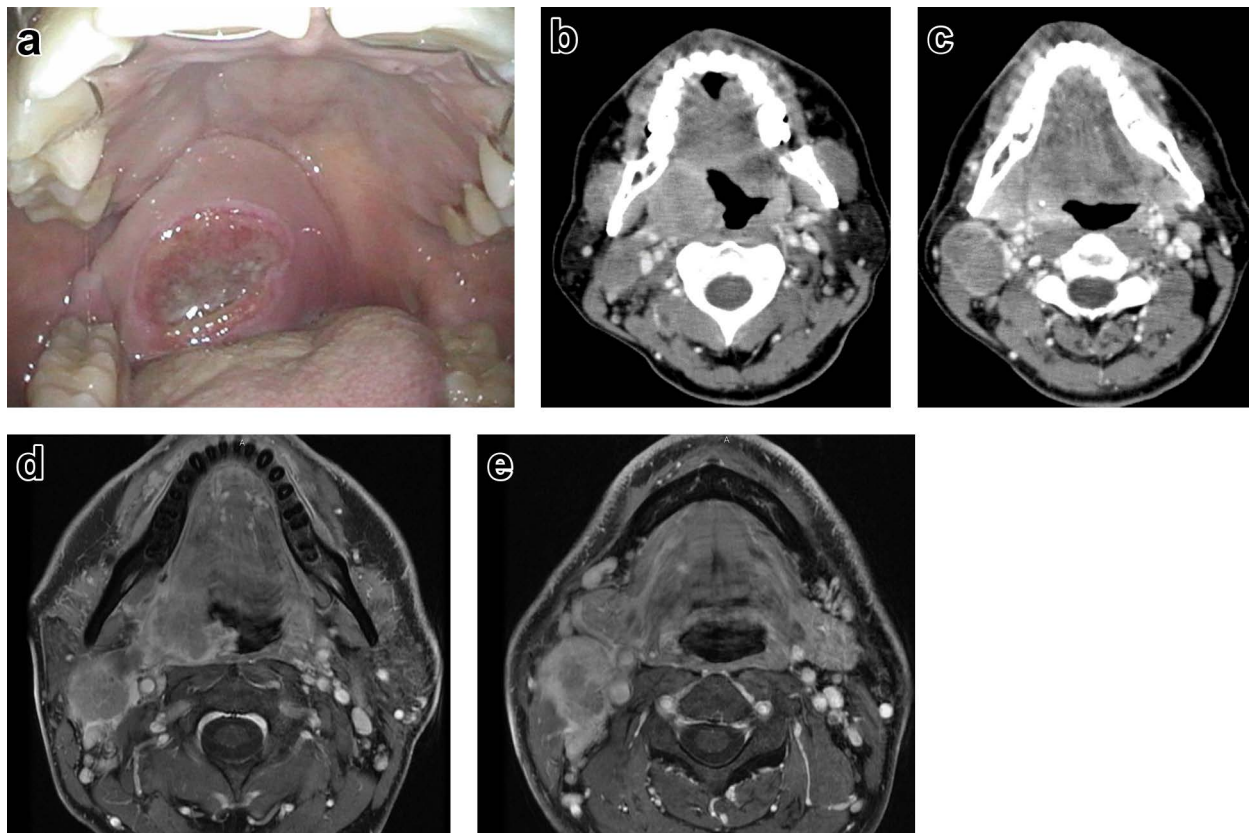


図 1 術前所見

a: 初診時所見. 右口蓋扁桃に潰瘍を伴う腫瘍を認めた.

b・c: 造影 CT 所見 (冠状断). d・e: 造影 MRI 所見 (冠状断). 中咽頭右側壁に 40 mm 大の腫瘍と, 右上内深頸部に 35 mm 大の腫大リンパ節を認めた.

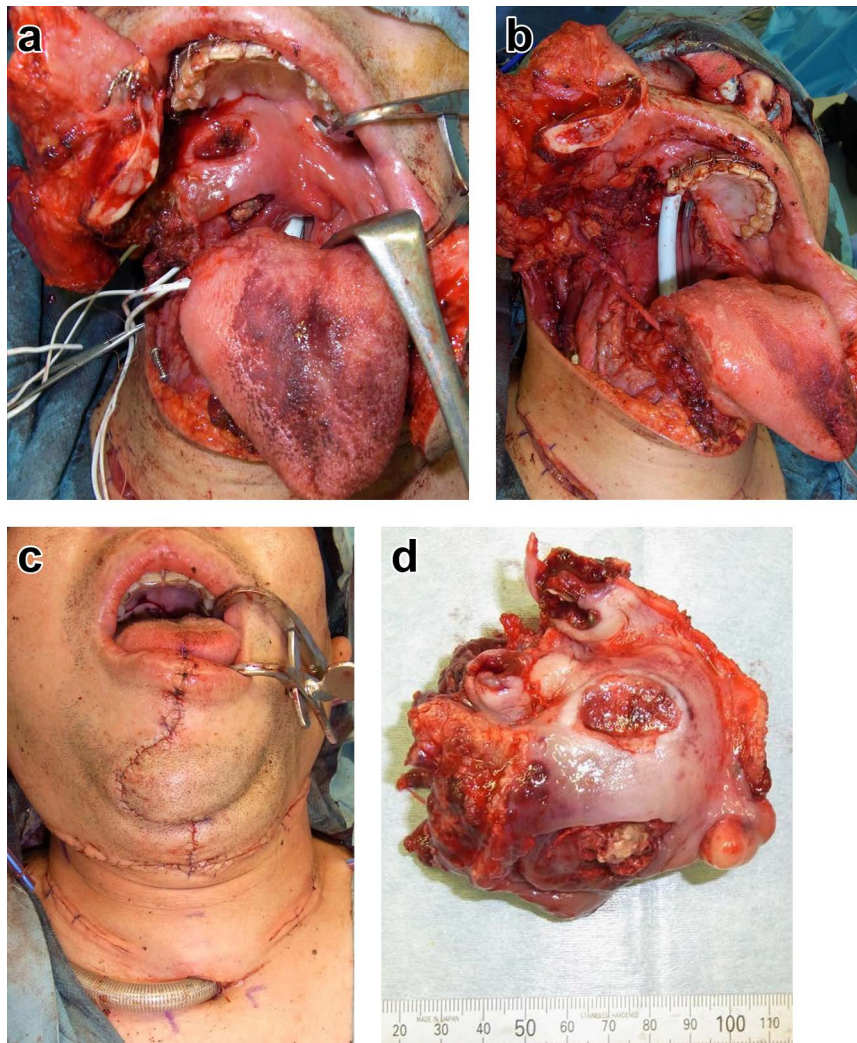


図2 手術所見

a～c: 下顎離断を伴う腫瘍摘出手術を行った。
d: 中咽頭右側壁腫瘍の摘出標本

内側翼突筋に浸潤しており、リンパ管や神経への軽度侵襲、静脈への中等度侵襲も伴っていた。転移リンパ節は、左上内深頸部リンパ節に節外浸潤を伴う最大径 55 mm 大のものが1個と左上内深頸部リンパ節に1個の合計2個であり、pT4N2と診断された。

再発高リスク群と判断し、後治療として術後6週間目から化学放射線同時療法（concurrent chemoradiotherapy: CCRT/ シスプラチン 80 mg/m² を3週ごとに3コース、60 Gy/30 fr）を施行した。

一次治療後の経過: 外来で経過を観察していたところ、術後12ヵ月目にCTで右肺下葉S6に20 mm 大の結節

性腫瘍と右肺門部にリンパ節腫大を新たに認め、FDG-PET/CTでもFDGの集積を伴っていた（図3）。呼吸器内科にコンサルトし、気管支鏡下に施行されたリンパ節の細胞診で癌腫であることは確認されたが、組織型の推定は困難であった。呼吸器内科と放射線診断科によると転移性肺癌より原発性肺癌の可能性が高いとのことであった。呼吸器外科にコンサルトし、術後14ヵ月目に右肺中下葉切除術が施行された。摘出標本は病理組織学的検査ではp16/HPV陽性の低分化型扁平上皮癌であり、中咽頭癌の転移と診断された。

肺手術後は外来で経過を観察していたが、術後4ヵ月

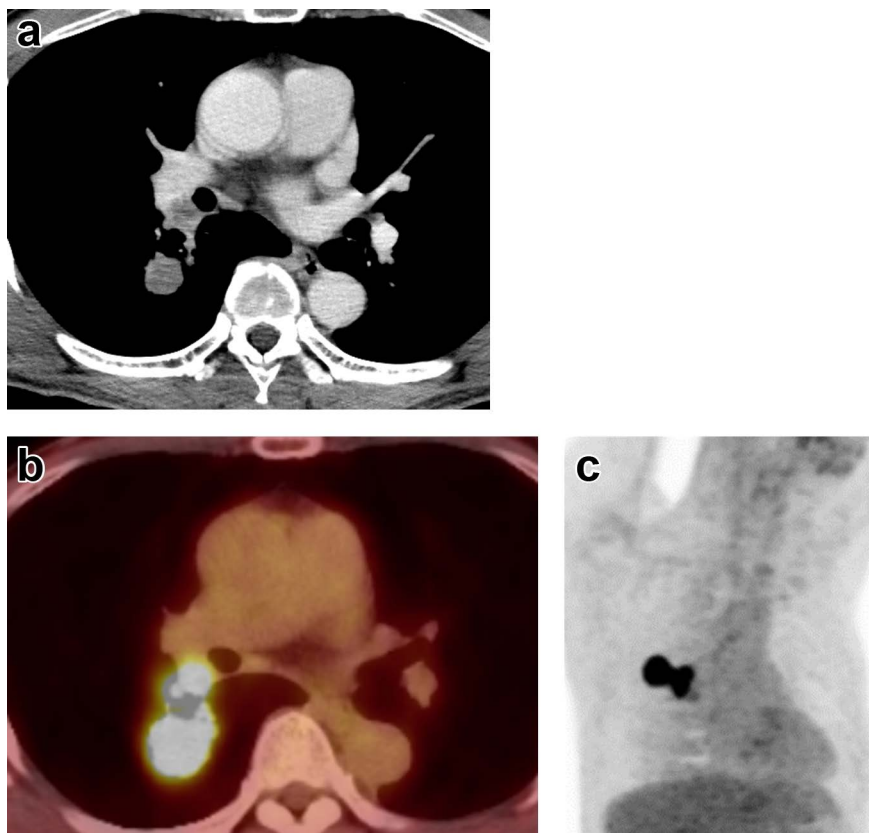


図3 術後12ヵ月時検査所見

a: CT所見(軸位断). 右肺下葉に20 mm大の結節性腫瘤を認め, 右肺門部リンパ節にも腫大を認めた.
b・c: FDG-PET/CT所見(a: 軸位断, b: 冠状断). 右肺下葉S6と右肺門リンパ節にFDG集積を認めた.

目にFDG-PET/CTで右胸膜および縦隔に転移病変を認めた.

緩和的化学療法として, 術後5ヵ月目から5-フルオロウラシル(1000 mg/m² × 4日), シスプラチン(80 mg/m²), セツキシマブ(初回400 mg/m²・2回目以降250 mg/m²)を開始した. 1stライン開始2ヵ月時点で病変は不変であったが, 1stライン開始5ヵ月後(5コース施行後)にprogressive disease (PD)となった. 疼痛が出現したため, 胸膜および縦隔に緩和目的の姑息照射(39 Gy/13 fr)を施行した. 翌月からは2ndラインとしてニボルマブ(240 mg/m²)の隔週投与を開始した. 2ndライン開始2ヵ月後には転移病変はやや縮小したが, 2ndライン開始5ヵ月後にPDとなった. 翌月から3rdラインとしてパクリタキセル(80 mg/m²)およびセツキシマブ(初回400 mg/m²・2回目以降250 mg/m²)の毎週投与を開始したが, 3ヵ月後にPDとなった. 翌月か

ら4thラインとしてTS-1(100 mg/日)を開始した. 4thライン開始3ヵ月時点でstable diseaseであり, 外来で経過観察を継続している. 疼痛に対しては医療用麻薬を用いておおむね問題なく日常生活を送っており, 就労も続けている.

リキッドバイオプシーの方法

本症例におけるリキッドバイオプシーの流れを図4に示す. 中咽頭側壁腫瘍の組織生検検体でp16免疫染色とTaKaRa PCR Human Papillomavirus Typing Set(タカラバイオ株式会社)によるHPV解析のダブルチェックを行ってHPV関連癌と診断した.

治療前後および経過観察期間に末梢血を10 ml採取して, ctDNA濃度およびHPV-DNAの検出の有無について経時的にモニタリングを行った. Cell free DNA抽出用採血管(Roche)に保存した血液サンプルからQIAmp®



図4 リキッドバイオプシーの流れ
初回治療前に組織生検 (p16 免疫染色, PCR を用いた HPV の解析) とリキッドバイオプシーを行い, その後も経時的にリキッドバイオプシーを継続する.

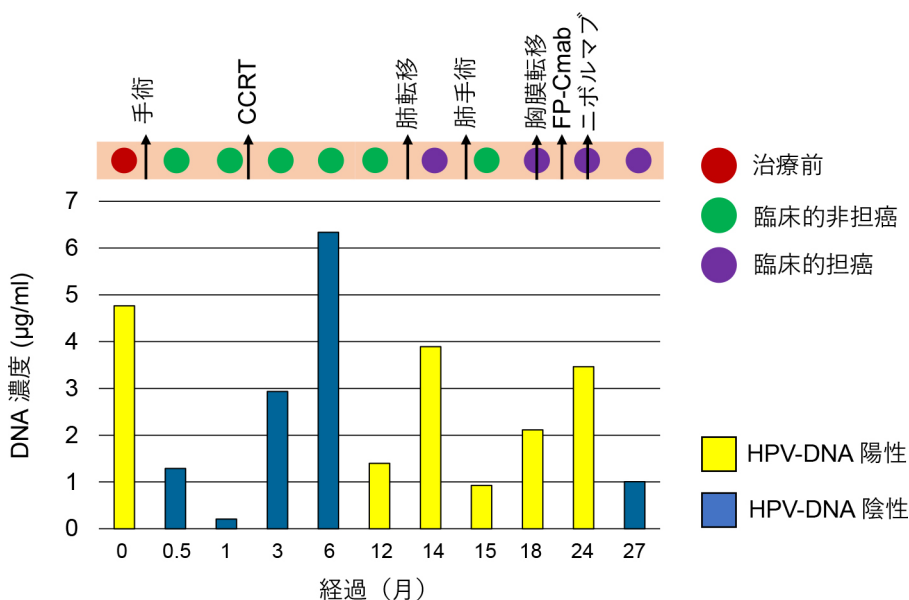


図5 ctDNA 濃度と HPV-DNA 検出の推移
CCRT : 化学放射線同時療法, FP-Cmab : 5-フルオロウラシル+シスプラチン+セツキシマブ

Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) を用いて DNA を回収し, 吸光度計で濃度を測定した. HPV-DNA の検出は, RT-PCR と real time PCR で HPV16-E7 (87 bp) を確認した.

本研究は浜松医科大学附属病院医学倫理審査委員会の承認を受けて実施した (承認番号: 17-041). 患者個人が特定できないように十分な倫理的配慮を行い, また同意書への署名により研究への参加同意を得た.

リキッドバイオプシーの結果

初回治療前から末梢血の ctDNA を一定量測定することが可能であった. さらに ctDNA から HPV を検出することもできた.

治療前後の ctDNA 濃度と HPV-DNA 検出の推移を図5に示す. 初回手術前の ctDNA 濃度は 4.8 µg/ml であったが, 術後は 1.3 µg/ml と著明に減少し, HPV-DNA が陰性化した. CCRT 後に ctDNA 濃度がいったん上昇したが, HPV-DNA は陰性を維持した. CCRT の 8 ヶ月後には ctDNA 濃度が低下したが, HPV-DNA が再度陽性化した. さらに 2 ヶ月後に FDG-PET/CT で新規肺病変に FDG の集積を認め, 肺手術によって中咽頭癌の転移病変であることが判明した. ctDNA 濃度は新規肺病変出現時から上昇し, 肺手術前に 3.9 µg/ml となったが, 術後は 0.9 µg/ml まで低下した. しかし, HPV-DNA は依然として陽性のままであり, 肺手術 4 ヶ月後に胸膜転

移が判明した。その後も ctDNA 濃度は上昇していたが、ニボルマブ投与開始後に胸膜の転移病変が縮小傾向を示した段階で ctDNA 濃度が 3.5 µg/ml から 1.0 µg/ml まで低下し、さらに HPV-DNA が陰性化した。

考 察

がんはその heterogeneity (不均一性)により、初回の生検組織から再発・転移の病態の全体像を把握するには限界がある¹⁾。また、治療経過中のモニタリングのために再発・転移病変から繰り返し組織生検を行うことは、侵襲的、時間的な問題から困難である。そこで、がん細胞の情報を含むとされる血液などの体液を用いたりキッドバイオプシーが、低侵襲で繰り返し施行可能であることから注目されている。リキッドバイオプシーの標的としては、主に腫瘍由来の血中遊離 DNA である ctDNA、循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells: CTCs)、タンパクや miRNA を含むエクソソームなどがある²⁾。ctDNA は腫瘍細胞の壊死やアポトーシス、分泌によって血液中に放出されており、遺伝子変異やメチル化、コピー数異常などの情報を有するとされる³⁾。一方、cell free DNA (cfDNA) の歴史は古く、1948 年に Mandel ら⁴⁾によって初めて報告された。続いて 1977 年に Leon ら⁵⁾ががん患者の cfDNA が増加すること、1989 年に Stroun ら⁶⁾が cfDNA 中に ctDNA が存在することを報告し、1994 年には Sorenson ら⁷⁾が膵臓癌患者の cfDNA 内の KRAS 遺伝子変異を検出した。1999 年以降は digital PCR や次世代シーケンサー (next generation sequencer) などの検出機器の進歩によって、微量な変異 DNA の検出・定量を行う遺伝子解析技術が進み、2012 年にはパネル検査を用いて cfDNA 内の遺伝子を網羅的に解析することが可能になった⁸⁾。2016 年 6 月にはアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration) が組織生検が困難な非小細胞肺癌治療で分子標的薬エルロチニブのコンパニオン診断薬として末梢血からのリキッドバイオプシーによる遺伝子解析を初めて認可しており、日本でも 2017 年 6 月に保険認可している。

2011 年には、全ゲノム解析の結果、頭頸部癌の発癌には癌遺伝子の機能獲得型変異ではなく、主に p53, Rb, p16 などの癌抑制遺伝子の機能喪失変異が関与していることが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。中咽頭癌において HPV 関連癌はすでに半数を占めており、今後増加が見込まれている。そのため、今回われわれは遺伝子変異ではなく

HPV-DNA に着目して、HPV 関連中咽頭癌の末梢血からの HPV-DNA 検出を試みた。Chan ら¹¹⁾は早期診断を目的とした研究で、20174 例の健常者のうち 309 例で血漿から Epstein-Barr virus が繰り返し検出され、そのうち 34 例に上咽頭癌がみつかったと報告している。また Hanna ら¹²⁾は、HPV 関連中咽頭癌で血漿中の HPV-DNA 量が総腫瘍量と相関していることに加えて、遠隔に転移巣をもつほど ctDNA 量が多くなることを報告している。Sozzi ら¹³⁾は、肺癌では ctDNA 量だけでは有用な診断ツールとはならないため、遺伝子変異についての情報も必要と述べており、Spindler ら¹⁴⁾は大腸癌において DNA 量と遺伝子変異の組み合わせによる有意差を認めたと報告している。Pietrantonio ら¹⁵⁾は転移性大腸癌における抗 EGFR 抗体療法に対する耐性獲得機構について、ctDNA をモニタリングすることの有用性を報告しており、緩和化学療法中の薬剤選択の際にもリキッドバイオプシーの活用が期待できると考えられる。

腫瘍由来 ctDNA は cfDNA の 0.5% 程度といわれており³⁾、健常者と比較すると ctDNA は断片化されており 166 bp と短いものが多い。cfDNA は一般的に健常者では微量なため検出・解析が困難とされるが¹⁶⁾、本症例では一定濃度以上の ctDNA が検出されていた (図 5)。また、初回手術後と肺手術後に低下しており、病勢や腫瘍量と相関している可能性が示唆された。しかし、CCRT 施行後は正常細胞の損傷のためか増加傾向を認めたことから、単一因子として診断に有用とはいえないと思われた。しかしながら、本症例では ctDNA 濃度に加えて末梢血由来の HPV-DNA を検出することができた (図 5)。初回治療後の経過観察中に出現した新規の肺病変に関して、当初は臨床的に原発性肺癌と考えていたが、病理組織学的検査で転移性肺癌と診断された。対してリキッドバイオプシーでは、遠隔転移と診断される少し前から ctDNA から HPV が検出されており、担瘤状態や遠隔転移の可能性を示唆していたことは非常に興味深い。治療後に HPV が検出されなくなったこと、そして再発時に再度検出されるようになったことなどから病勢と相関していることが確認できた。

われわれはこれまでに 9 例 34 サンプルにリキッドバイオプシーを行っており (unpublished data)、治療前に ctDNA から HPV が検出された 3 例全例で初回治療後に HPV が検出されなくなったが、2 例に再発を認めた。これに対して、治療前に ctDNA から HPV が検出されなかつ

た3例は全例で初回の局所治療後に再発・転移を認めていないことから、HPV 検出は再発・転移を反映する予後不良マーカーになり得ると考えられた。

末梢血を用いたリキッドバイオプシーは、低侵襲かつ繰り返し検査が可能であることから、治療標的の検出だけでなく、治療経過中のリアルタイムでのモニタリングが可能である。頭頸部癌においては key drug が増えていることから、速やかに薬剤耐性を明らかにして最適な薬剤を最適なタイミングで導入・変更することが本来の個別化医療につながると考えられる。薬剤耐性や効果予測など治療過程で変化する癌の不均一性の解明のためにリキッドバイオプシーを研究する意義は高いと考えられることから、今後も症例を増やしてさらに検討していきたい。

まとめ

頭頸部癌の治療薬として従来より使用されている殺細胞性抗癌薬と分子標的薬に免疫チェックポイント阻害薬が加わり、最適な薬剤を最適なタイミングで導入・変更することが本来の個別化医療につながると考えられる。本症例では ctDNA の濃度および PCR 法による HPV-DNA の検出の有無を経時的に検討して、リキッドバイオプシーによるモニタリングの一定の有用性を確認し得た。

今後も症例を重ね、ctDNA や CTCs などのエピジェネティック機構や上皮間葉移行の解析なども加えて、病態や治療効果、予後予測にかかわる頭頸部癌のバイオマーカーの確立を目指したい。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP17K16904 の助成を受けて行った。

参考文献

- 1) Siravegna G, Marsoni S, Siena S, et al. : Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **14**: 531–548, 2017.
- 2) 近松一朗, 多田紘恵 : 頭頸部がんの新しい検査 : リキッドバイオプシー. *耳鼻臨床* **112**: 415–421, 2019.
- 3) Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA, et al. : Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *PLoS One* **10**: e0140712, 2015.
- 4) Mandel P and Métais P : Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *C R Seances Soc Biol Fil* **142**: 241–

243, 1948.

- 5) Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. : Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* **37**: 646–650, 1977.
- 6) Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. : Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* **46**: 318–322, 1989.
- 7) Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. : Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **3**: 67–71, 1994.
- 8) Forsheve T, Murtaza M, Parkinson C, et al. : Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* **4**: 136ra68, 2012.
- 9) Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. : The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **333**: 1157–1160, 2011.
- 10) Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al. : Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* **333**: 1154–1157, 2011.
- 11) Chan KCA, Woo JKS, King A, et al. : Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *N Engl J Med* **377**: 513–522, 2017.
- 12) Hanna GJ, Supplee JG, Kuang Y, et al. : Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. *Ann Oncol* **29**: 1980–1986, 2018.
- 13) Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al. : Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* **61**: 4675–4678, 2001.
- 14) Spindler KL, Pallisgaard N, Vogelius I, et al. : Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin Cancer Res* **18**: 1177–1185, 2012.
- 15) Pietrantonio F, Vernieri C, Siravegna G, et al. : Heterogeneity of Acquired Resistance to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* **23**: 2414–2422, 2017.
- 16) Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, et al. : Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol* **24**: 4270–4276, 2006.

別刷請求先 : 今井篤志
〒431-3192 浜松市東区半田山1-20-1
浜松医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

利益相反に該当する事項 : なし