

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20190

研究課題名(和文) 上咽頭癌における新たなリキッド・バイオプシー法の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development and clinical application of new liquid biopsy method in nasopharyngeal carcinoma

研究代表者

平井 信行 (HIRAI, NOBUYUKI)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：40632534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：上咽頭癌患者31名の血清を用いて、血清中のEpstein-Barr virus (EBV) 関連RNAの定量を行った。今回EBV関連RNAであるBamHI A rightward transcripts (BART) microRNAs (miRNAs) のうち、3つのBART miRNAsについて検討した。その定量結果と上咽頭癌患者の病期や再発の有無などと比較検討した結果、miR-BART17-5pが最も治療後の上咽頭癌患者の予後を反映することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) -related RNA in serum was quantified using serum from 31 patients with nasopharyngeal carcinoma. We examined three BamHI A rightward transcripts (BART) miRNAs among BART miRNAs which are EBV-related RNA this time. As a result of comparing the quantitative results with the stage and recurrence of nasopharyngeal carcinoma patients, it was found that miR-BART17-5p reflects the prognosis of patients with nasopharyngeal carcinoma after treatment most.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：上咽頭癌 Epstein-Barr virus miRNA バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 上咽頭癌は転移しやすい特徴を有するため、多くが進行癌の状態で見られ、治療後も遠隔転移再発の割合が比較的多い疾患である。そのため上咽頭癌の病勢を反映する鋭敏なバイオマーカーの開発は重要である。

(2) 上咽頭癌の大多数でその発癌に EBV 潜伏感染が密接に関わっており、EBV 関連因子がその診断に用いられている。現在臨床的に多用されている EBV 抗体価の測定は感度が高い方法であるが、治療後も抗体価が高く維持される症例があり、再発や遠隔転移を鋭敏に察知できるほど特異度は高くない。また血液中の遊離 EBV-DNA 定量は上咽頭癌の病期や予後の推測に役立つと報告されているが、遊離 EBV-DNA は細胞死をきたした上咽頭癌細胞に由来するため、生きた上咽頭癌細胞の量や活動性を鋭敏に反映するとは言い難い。

(3) 近年、エクソソームと呼ばれる小胞に内包され、細胞中の RNA や蛋白が細胞外へ分泌されることが報告されている。EBV 関連 RNA である EBV-encoded small RNAs (EBERs) や BART miRNAs は生きた上咽頭癌細胞で大量に転写され、エクソソームに内包され細胞外へ放出されることが報告された。すでにこれらの RNA がエクソソームやエクソソームとそれを含む血清から抽出後、定量することが可能であることが報告されている。エクソソームの放出が生きた細胞に限定される現象であることから、これら EBV 関連 RNA を定量することで、EBV 抗体価の測定や EBV-DNA の定量といった従来の Liquid Biopsy よりも、より鋭敏に上咽頭癌細胞の量や生物学的動態をとらえることが可能であると考えた。

(4) そこで実際の上咽頭癌患者の血清を用いて、EBV 関連 RNA の定量を行いその意義について検討を行うこととした。

2. 研究の目的

(1) 上咽頭癌患者において、血清中の EBV 関連 RNA を定量する。

(2) EBV 関連 RNA の鋭敏なバイオマーカーとしての有用性を明確にする。

各定量結果を上咽頭癌患者の病期や治療前後での変化、予後などと比較検討することで、上咽頭癌の診断、治療効果判定、予後予測などに有用か検討する。

EBV-DNA と各 EBV 関連 RNA を比較して、EBV 関連 RNA の有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 定量的 PCR を行うため、EBERs、BART miRNAs、BamHI-W 領域 DNA のコ

ントロール・プラスミドを作成する。

(2) EBV 陽性上皮細胞株 (C666-1、NPC-KT) と EBV 陰性上皮細胞株 (CNE2) を用いて定量的 PCR のシステム構築を行う。

(3) 上咽頭癌患者 30 例を対象にして、in situ hybridization 法で EBERs を同定し、EBV 潜伏感染の有無を確認する。

EBER 陽性上咽頭癌患者の血清からエクソソームを抽出し、エクソソーム内に存在する RNA の抽出と定量を行う。

EBER 陽性上咽頭癌患者の血清から EBV-DNA を抽出し定量を行う。

(4) EBER 陽性上咽頭癌患者と、コントロールである上咽頭癌以外の頭頸部癌患者と健常人において EBV 抗体価の測定を行い比較する。

(5) FDG-PET の metabolic tumor volume、臨床病期などと EBV-DNA および RNA の定量結果を比較する。

(6) 治療後 3 か月時点で EBV-DNA および RNA が再発予測因子として有用か検討を行う。

4. 研究成果

(1) システムの構築にあたり、EBERs と BamHI-W 領域 DNA のプラスミドを作成した。また BART miRNAs は、血清中の miRNA 量と腫瘍細胞 1 個中の miRNA 量が有意に相関することが報告されており (Wong et al. 2012)、その中から miR-BART2-5p、17-5p、18-5p を選択した。miRNA を定量するにあたっては、標準曲線作成のため合成 miRNA を業者に委託し、逆転写反応から PCR までの効率や条件をそろえるため、毎回テストサンプルと同時に逆転写反応と PCR を行った。そのため敢えてプラスミドの作成は行わなかった。細胞株での実験では、BamHI-W 領域 DNA、EBERs、miR-BART2-5p、17-5p、18-5p はいずれも大量に検出された。

(2) 上咽頭癌患者、コントロール群の血清を用いて EBV-DNA と BART miRNAs の抽出と定量を行った。

血清からの EBV-DNA および RNA の抽出に関しては、当初それぞれを別々に抽出し、EBV 関連 RNA はエクソソームから抽出する予定であった。しかし、miR-BART17-5p はエクソソーム非依存的分泌形式であることが報告されており (Gourzones et al. 2013)、DNA を含む全核酸として血清 500µl から抽出することとした。

また当初上咽頭癌患者 30 名を対象としたが、31 名を対象とし in situ hybridization 法で EBERs 陽性を全例で確認した。コントロー

ルは上咽頭癌以外の頭頸部癌患者 20 名、健康人 20 名を対象とした。

EBV-DNA は治療前上咽頭癌患者 20 名全例で検出され、コントロール 40 名では検出されなかった。治療後に検出されたのは 5 名であった。検出された 5 名はいずれものちに再発を認めた。

EBERs は上咽頭癌患者で検出されたのはたった 1 名であり、コントロールからも検出されなかった。

miR-BART2-5p は治療前上咽頭癌患者 17 名で検出され、コントロール 40 名中 6 名で検出された。治療後上咽頭癌患者では、25 名で検出され、そのうち 8 名がのちに再発を認めた。

miR-BART17-5p は治療前上咽頭癌患者 12 名で検出され、コントロール 40 名中 2 名で検出された。治療後上咽頭癌患者では、6 名で検出され、この 6 名はのちに再発を認めた。

miR-BART18-5p は治療前上咽頭癌患者 5 名で検出され、コントロール 40 名中 0 名で検出された。治療後上咽頭癌患者では、2 名で検出され、この 2 名はのちに再発を認めた。

(3) 血清中 EBV 抗体価の測定は良好な結果が得られなかったため、解析をやめた。

(4) FDG-PET 検査では、良好な結果が得られなかったため解析をやめた。

(5) EBERs は上咽頭癌患者血清中から検出することができなかったため、解析をやめた。

今回検討した EBV-DNA と miR-BART2-5p、miR-BART17-5p、miR-BART18-5p はいずれもコントロールに比べて上咽頭癌患者で有意にコピー数が高かった。しかし、治療前感度・特異度を計算すると、EBV-DNA が最も高い感度・特異度を示した。また EBV-DNA コピー数は臨床ステージの進行と相関関係を示し、治療後有意にコピー数の低下を認めた。一方、3 つの BART-miRNAs は臨床ステージの進行とコピー数との間に相関関係を認めず、治療前後のコピー数変化に関しては統計学的に有意な変化を認めなかった。この結果から、治療前診断においては EBV-DNA 定量が有用であることが分かった。

治療後検出においては、予後を最も予測したのは miR-BART17-5p であった。血清中の EBV-DNA の由来は細胞死をきたした上咽頭癌細胞であるのに対して、BART-miRNA は生きた上咽頭癌細胞に由来するため、この結果は miR-BART17-5p が治療後生き残った微小上咽頭癌細胞をより鋭敏にとらえられる可能性を示した。しかし今回の検討は限られた少数での結果であるため、今後さらなる検討が必要と言える。

将来的には、この結果を元に新たな治療後予後予測バイオマーカーを確立し、上咽頭癌

の治療後補助療法の適応決定因子として応用可能となれば、上咽頭癌の予後改善に寄与すると考える。

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 1 件)
平井信行、脇坂尚宏、近藤悟、阿河光治、喜多万紀子、上野貴雄、中西庸介、遠藤一平、杉本寿史、室野重之、佐藤博、吉崎智一、
Potential interest in circulating miR-BART17-5p as a post-treatment biomarker for prediction of recurrence in Epstein-Barr virus-related nasopharyngeal carcinoma
PLOS ONE、査読あり、
11 巻 2016 第 9 号 e0163609
Doi:10.1371/journal.pone.0163609

〔学会発表〕(計 5 件)
平井信行、Post-treatment detection of circulating miR-BART17-5p as a potential biomarker to predict residual tumor cells in Epstein-Barr virus-related nasopharyngeal carcinoma、17th International Symposium on EBV and associated diseases、2016 年 8 月 11 日、スイス

平井信行、Epstein-Barr virus 関連上咽頭癌における治療後バイオマーカーとして miR-BART17-5p の可能性、第 30 回ヘルペスウイルス研究会、2016 年 6 月 18 日、東京都 府中

平井信行、Epstein-Barr virus 関連上咽頭癌におけるバイオマーカーの検討、第 117 回日本耳鼻咽喉科学会、2016 年 5 月 19 日、愛知県 名古屋

平井信行、Epstein-Barr ウイルス関連上咽頭癌における新たなバイオマーカーの可能性、第 28 回日本口腔・咽頭科学会、2015 年 9 月 11 日、大阪府 大阪市

平井信行、Epstein-Barr ウイルス関連上咽頭癌における新たなバイオマーカーの可能性、第 12 回 EB ウイルス研究会、2015 年 7 月 21 日、島根県 出雲市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 信行 (HIRAI, Nobuyuki)
金沢大学・附属病院・医員
研究者番号：40632534

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()