

頭頸部扁平上皮癌の genomics

安藤 瑞生

岡山大学学術研究院医歯薬学域 耳鼻咽喉・頭頸部外科学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌，がんゲノム，ヒトパピローマウイルス（HPV）

Genomic characterization of head and neck squamous cell carcinoma

Mizuo Ando

Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

頭頸部に生じる悪性腫瘍の多くは，扁平上皮癌である。飲酒・喫煙をリスク因子とする古典的な頭頸部扁平上皮癌は，固形腫瘍のなかでも標的治療が難しい癌腫とされてきた。同じく頭頸部に生じる腺癌である唾液腺癌は，人口10万人あたり1～2症例ほどの希少癌であるが，特徴的な融合遺伝子や遺伝子変異が同定されているものが多い。例えば粘表皮癌（mucoepidermoid carcinoma）における *CRTC1-MAML2* 融合遺伝子の発見¹⁾ は2003年であり，上皮性腫瘍の融合遺伝子としてはかなり早い時期に同定されている。また，分泌癌（secretory carcinoma）における *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子に対する TRK 阻害剤の有効性は広く知られており²⁾，HER2 過剰発現を認める唾液腺導管癌（salivary duct carcinoma）では抗 HER2 抗体薬とタキサン系抗癌剤の併用療法の有効性が示されている³⁾。

本稿では，近年増加が著しいヒトパピローマウイルス（human papillomavirus；HPV）関連中咽頭癌を含む頭頸部扁平上皮癌のゲノム解析研究や，がんゲノム

医療の現状を概説する。

網羅的ゲノム解析の黎明期

頭頸部扁平上皮癌に対する次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析は，2011年に2つグループがそれぞれ74症例，32症例の全エクソン解析の結果を報告したものが最初である^{4,5)}。以前から知られていた *TP53*，*CDKN2A*，*PTEN*，*PIK3CA*，*HRAS* などの異常を再確認したことに加えて，血液腫瘍では癌遺伝子として知られる *NOTCH1* が扁平上皮癌では逆に癌抑制的に機能する可能性が初めて指摘されている。また，遺伝子変異の頻度に関して，HPV 関連癌では非関連癌に比べて多いこと（変異総数 4.8 ± 3 vs. 20.6 ± 16.7 ⁴⁾，平均変異数 2.28 vs. $4.83/\text{Mb}$ ⁵⁾）が示された。長期間の飲酒・喫煙による発癌に比べて HPV 関連癌では遺伝子が壊れておらず，そのため治療反応性も良いという解釈は，耳鼻科医にとって納得しやすいものであった。

2015年には，The Cancer Genome Atlas（注1）プロジェクトから279症例の全エクソン解析，コピー数解析，RNA 解析，DNA メチル化解析を統合した結果が

令和3年5月7日受理
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
電話：086-235-7307 FAX：086-235-7308
E-mail：ando-m@okayama-u.ac.jp

注1：The Cancer Genome Atlas（TCGA）：2006年から米国で開始された大型がんゲノムプロジェクトで，ゲノム異常・DNAメチル化異常，遺伝子・タンパク質発現異常について網羅的な解析を実施した。30種類を超える癌腫に関する巨大なデータリソースとして公開されている。

◆ プロフィール ◆



平成12年3月 東京大学医学部医学科卒業
平成17年4月 国立がんセンター中央病院 頭頸科 チーフレジデント
平成20年4月 東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
平成27年5月 東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 講師
平成28年4月 カリフォルニア大学サンディエゴ校 Moores がんセンター 客員研究員（～平成29年6月）
令和2年4月 東京大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 准教授
令和2年12月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学 教授

報告された⁶⁾。ここでは既報とは異なり、HPV 関連／非関連によって遺伝変異の頻度に差は認めておらず、変異検出アルゴリズムの改善が一因と考えられている。他には、HPV 関連癌では *PIK3CA* 活性型変異が多いことに加え、*TRAF3* 失活や *E2F1* 増幅が特徴的であること、ウイルス遺伝子が宿主ゲノムに組み込まれるイベント (integration) がサンプルあたり 1 ヶ所で生じ、その領域では宿主ゲノムの増幅が生じていることなどが報告されている。HPV 関連／非関連のいずれであっても扁平上皮癌に至る発癌経路はほぼ共通であるが、個々の遺伝子レベルで異常をきたすメカニズムが変異、増幅・欠失、DNA メチル化、ウイルス由来タンパクによる失活など、それぞれ異なるものと理解されている。

HPV 関連癌

HPV によって引き起こされる HPV 関連中咽頭癌の臨床的特徴について、あらためて概説する。HPV 関連中咽頭癌は、同じく HPV 感染に起因する子宮頸癌よりも近年の患者数増加が著しく、比較的若年者に生じることから、その制圧が世界的な課題となっている。米国では子宮頸癌の罹患数は減少傾向にあるが、中咽頭癌は急激に増加しており、年間全発症数において既に子宮頸癌を上回っている。本邦では子宮癌検診の受診率や HPV ワクチン接種率が低いことも影響していると考えられ、子宮頸癌の罹患数がまだ多いが、HPV 関連中咽頭癌の著しい増加傾向は同様である。HPV 感染と中咽頭癌に関する多施設共同研究が行われ、約 50 % の感染率であること、高リスク型である HPV16 が 90 % を占めることが報告されている⁷⁾。

HPV 関連中咽頭癌は、飲酒や喫煙によって引き起こされる従来型の中咽頭扁平上皮癌とは臨床的性質が大きく異なる。HPV 関連中咽頭癌は早期からリンパ節転移を起こしやすいものの、幸いなことに放射線治療や化学療法 (シスプラチン) への感受性が高く、従来の頭頸部癌よりも一般的に予後が良好である。2018 年の TNM 分類 (第 8 版) において、HPV 関連 (p16 陽性) 中咽頭癌と HPV 非関連 (p16 陰性) 中咽頭癌は別個の疾患として記載され、HPV 関連癌が従来よりもダウンステージされた。HPV 関連／非関連による治療個別化のエビデンスはまだ確立していないが、HPV 関連癌に対する低侵襲治療を意図した臨床試験が進行中である。放射線治療併用薬として抗 EGFR 抗体薬である

cetuximab が期待されていたものの、シスプラチンに対する非劣性を示すことはできていない^{8,9)}。

1. HPV 関連中咽頭癌と子宮頸癌

ゲノム異常の観点で HPV 関連中咽頭癌と子宮頸癌とを比較した報告が散見される。まず、宿主ゲノムへの HPV integration について、子宮頸癌では 8q24.21 への integration が多いことが報告されていた¹⁰⁾。この領域には癌遺伝子である *MYC* が存在し、遺伝子増幅による発癌寄与が示唆されるが、一方、現在のところ HPV 関連中咽頭癌においては特定の遺伝子領域への integration は示されていない。しかし、integration が生じる領域では宿主ゲノムの不安定性が生じ、周辺遺伝子の機能異常から発癌に至るというメカニズムは同様と考えられている¹¹⁾。

次に、子宮頸癌では以前から抗ウイルス因子 APOBEC3 が HPV ゲノムに変異を蓄積し、発癌に関与する可能性が報告されていた¹²⁾。網羅的ゲノム解析によって様々な癌腫の遺伝子変異プロファイルが明らかになると、APOBEC signature と呼ばれる特徴的な変異パターンが HPV 関連中咽頭癌と子宮頸癌 (他に乳癌、膀胱癌、肺扁平上皮癌、肺腺癌) で強く見られることが報告された^{13,14)}。TCGA の報告においても、HPV 関連中咽頭癌で APOBEC signature の存在が確認されている⁶⁾。HPV による発癌を統一的に説明できる魅力的な仮説として研究が続けられているが、明確な結論は出ていない。

2. HPV 関連中咽頭癌のエピゲノム

HPV 関連中咽頭癌は DNA メチル化などのエピゲノム異常に富むことが知られているが、その全体像は明らかになっていない。著者らは、米国カリフォルニア大学サンディエゴ校と共同で、HPV 関連中咽頭癌の腫瘍組織 47 例、および健常者の中咽頭組織 25 例を対象として、ゲノム・エピゲノムの統合的解析を実施した¹⁵⁾。具体的には遺伝子変異解析、発現解析、DNA メチル化解析を実施した。さらに、ヒトの腫瘍組織をマウスに移植して増殖させる PDX (patient-derived xenograft) を用いて、エピゲノム調節機構のひとつであるヒストン修飾も解析した。得られた結果を検証するために、TCGA の公開データベースを使用して検証的解析を行い、細胞株を用いた分子生物学的実験も実施した。

その結果、HPV 関連中咽頭癌の腫瘍組織は正常組織とは異なる DNA メチル化状態を示し、従来注目され

てきた遺伝子の調節領域であるプロモーター領域（注2）よりも、むしろ転写開始点における DNA メチル化状態の変化が遺伝子発現と強く関連していることを示した（図1）。TCGA データベースを用いた検証実験により、中咽頭癌だけでなく乳癌においても、転写開始点における DNA メチル化状態の変化がより重要であることが示唆された。また、抑制性のヒストン修飾（H3K9me3）が転写開始点において DNA メチル化と協調的にはたらいっている可能性も示された。

がんゲノム医療時代の頭頸部扁平上皮癌

本邦においては、2019（令和元）年に2種類のがん遺伝子パネル検査（OncoGuide NCC オンコパネルおよび FoundationOne CDx がんゲノムプロファイル）が保険収載され、令和元年はまさに日本のがんゲノム医療元年となった。現在、全国12カ所の「がんゲノム医療中核拠点病院」を始め、33カ所の「がんゲノム医療拠点病院」、180カ所の「がんゲノム医療連携病院」でがんゲノム医療を受けることが可能となっている。

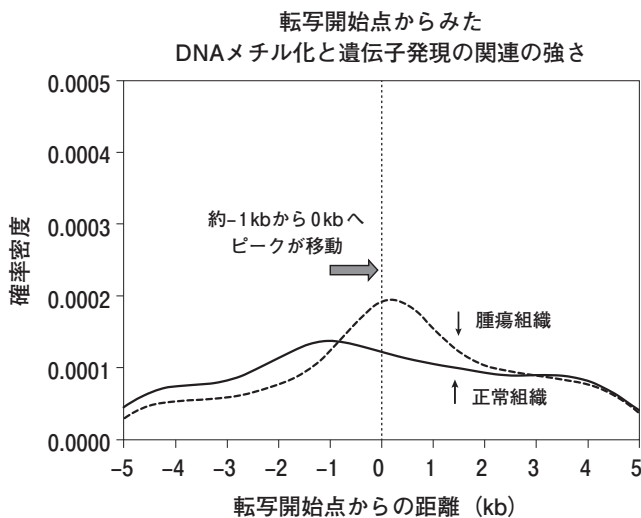


図1 DNA メチル化状態の変化が遺伝子発現に関連するゲノム上の位置

約2万遺伝子の総和として転写開始点からの距離で示している。実線で示す正常組織では転写開始点よりも約1 kb 上流（遺伝子プロモーター領域）にピークがあるのに対し、破線で示す腫瘍組織のピークは0 kb（転写開始点）にほぼ一致している。

注2 プロモーター領域：転写（DNAからRNAを合成する段階）に関与し、遺伝子発現のタイミングや発現量の制御に重要な役割をもつ領域。実際に転写が始まる位置は、転写開始点と呼ばれる。プロモーター領域は転写開始点のやや上流に位置し、ここに転写因子というタンパクが結合して転写が始まる。

しかし、次世代シーケンサーを用いたがん遺伝子パネル検査は比較的高額な最先端の検査法であり、全ての癌腫でコスト・ベネフィットの評価が定まっているわけではない。2020年に発表された ESMO (European Society for Medical Oncology) ガイドライン¹⁶⁾では、転移性癌に対する癌遺伝子パネル検査が日常臨床でルーチンに推奨される癌腫は、非小細胞肺癌、前立腺癌、卵巣癌、胆管細胞癌とされており、頭頸部領域では唾液腺癌および甲状腺癌において TMB (tumor mutational burden) の測定が推奨されている程度である。頭頸部扁平上皮癌では日常診療における有用性が確立していない現状ではあるが、ESMO では ESCAT (ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets) に従った遺伝子異常と対応薬剤のエビデンス分類¹⁷⁾を発表している（表1）。ESCAT tier I（日常的に使用可能；ready for routine use）に挙げられている頭頸部扁平上皮癌のマーカーは、下記4種類である。

まず、tier IBは、特定の遺伝子異常に対する薬剤の臨床的有効性が、非ランダム化比較試験にて示されているものである。

1. HRAS 活性型変異

対応する薬剤である tipifarnib は、HRAS の活性化に必要な farnesyltransferase の選択的阻害薬であり、HRAS 変異を有する頭頸部扁平上皮癌を対象とした第Ⅱ相試験¹⁸⁾において奏効率が56%（10/18）であった。頭頸部全体の HRAS 変異頻度は5～8%程度であるが、口腔癌では10%以上とも報告されている^{6,17,19)}。口腔癌には HRAS 活性型変異と CASP8 失活型変異が共存する特徴的な一群があり、細胞死/NF-κB 経路を介した発癌メカニズムが想定されている^{20,21)}。現時点では本邦未承認であるが、頭頸部扁平上皮癌の画期的な標的治療になる可能性がある。

次に、tier ICは、特定の遺伝子異常に対する薬剤の臨床的有効性が、臓器横断的な臨床試験にて示されているものである。残念ながら頭頸部扁平上皮癌における頻度は低いが、本邦でも薬価収載されている薬剤が含まれる。

2. Microsatellite instability-high (MSI-H)

DNA 修復の異常と関連する MSI-H は臓器横断的に見られる所見であり、本邦においても2018年より MSI 検査が抗 PD-1 抗体薬（pembrolizumab）のコンパニオン診断として用いられ、がんゲノム医療の好例となっている。MSI-H の頻度が高い臓器は、子宮内膜癌16.9

表1 頭頸部扁平上皮癌に見られる遺伝子異常と ESCAT エビデンスレベル (文献16より改変)

遺伝子	遺伝子異常の種類	頻度	エビデンス
PI3K/AKT/mTOR 経路			
PIK3CA	活性型変異 (E542K, E545K/A, H1047R/L)	8.9%	ⅢA
	遺伝子増幅	21.6%	ⅢB
	その他の活性型変異	4.0%	ⅢB
PTEN	ホモ接合型欠失	3.4%	ⅢA
	失活型変異	2.2%	ⅢA
MAPK 経路			
HRAS	活性型変異	6.3%	I B
細胞周期と増殖因子			
CDKN2A	失活型変異	21.1%	ⅡA
	ホモ接合型欠失	32.7%	ⅡA
CCND1	遺伝子増幅	23.9%	
CDK6	遺伝子増幅	5.4%	
IGF1R	遺伝子増幅	1.0%	ⅣA
EGFR	遺伝子増幅	10.7%	ⅡA
ERBB2	遺伝子増幅	2.0%	ⅢA
FGFR1	遺伝子増幅	6.9%	ⅢA
FGFR3	活性型変異	1.2%	ⅢA
MET	遺伝子増幅	1.0%	ⅢA
NTRK	融合遺伝子	0.2%	I C
DNA 修復			
TP53	失活型変異	72.0%	V
BRCA1	失活型変異	0.2%	ⅢA
BRCA2	ホモ接合型欠失／失活型変異	2.0%	ⅢA
Microsatellite instability		1.2%	I C

%, 小腸癌8.6%, 胃癌6.7%, 十二指腸癌5.6%, 大腸癌3.8%, 神経内分泌腫瘍3.4%, 前立腺癌3.0%と報告されている²²⁾。頭頸部扁平上皮癌では pembrolizumab が再発転移に対する標準治療と位置づけられ, PD-L1 免疫染色における CPS (combined positive score) をバイオマーカーとしている。そのため MSI 検査に提出される機会は少ないと思われ, 同報告には記載されていないが, おそらく食道癌1.1% (11/1014) に近い頻度と思われる。参考までに, 唾液腺癌0% (0/17), 甲状腺癌0% (0/97) と報告されている。

3. TMB $\geq$ 10/Mb (TMB-high)

TMB のカットオフ値は使用する遺伝子パネルや癌腫に応じても異なる可能性が指摘されているが, 米国 FDA (Food and Drug Administration) では臓器横断的に10/Mb 以上と設定し, pembrolizumab の使用を承認している。前述のように頭頸部扁平上皮癌では

pembrolizumab が再発転移に対する標準治療のひとつに位置づけられているため, 必ずしも TMB の測定は必要ではない。なお, 頭頸部扁平上皮癌における TMB-high の頻度は, およそ10~20%と報告されている^{23,24)}。

4. NTRK 融合遺伝子

同様に臓器横断的な臨床試験^{25,26)}において有効性が示されている遺伝子異常である。本邦でも2019年に entrectinib が承認され, larotrectinib の臨床試験が実施中である。頭頸部扁平上皮癌における頻度は1%未満であるが, 唾液腺分泌癌では80~100%, 甲状腺乳頭癌でも約10%に検出され²⁷⁾, ガンゲノム医療の好例となっている。

おわりに

頭頸部扁平上皮癌の発癌メカニズム解明と標的治療を目指したゲノム解析は着実に進んでいるものの, 画期的な発見がなされているとは言い難い。他臓器に発生する扁平上皮癌を含めて, さらに研究が進むよう祈念して本稿を締めたい。

文 献

- 1) Tonon G, Modi S, Wu L, Kubo A, Coxon AB, et al.: t(11;19) (q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. Nat Genet (2003) 33, 208-213.
- 2) Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, et al.: Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. Lancet Oncol (2020) 21, 271-282.
- 3) Takahashi H, Tada Y, Saotome T, Akazawa K, Ojiri H, et al.: Phase II Trial of Trastuzumab and Docetaxel in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Salivary Duct Carcinoma. J Clin Oncol (2019) 37, 125-134.
- 4) Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, et al.: Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. Science (2011) 333, 1154-1157.
- 5) Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, et al.: The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. Science (2011) 333, 1157-1160.
- 6) Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. Nature (2015) 517, 576-582.
- 7) Hama T, Tokumaru Y, Fujii M, Yane K, Okami K, et al.: Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer: a multicenter study in Japan. Oncology (2014) 87, 173-182.

- 8) Gillison ML, Trotti AM, Harris J, Eisbruch A, Harari PM, et al.: Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet* (2019) 393, 40–50.
- 9) Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, et al.: Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* (2019) 393, 51–60.
- 10) Peter M, Stransky N, Couturier J, Hupé P, Barillot E, et al.: Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. *J Pathol* (2010) 221, 320–330.
- 11) Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, et al.: Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Res* (2014) 24, 185–199.
- 12) Vartanian JP, Guétard D, Henry M, Wain-Hobson S: Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. *Science* (2008) 320, 230–233.
- 13) Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LJ, Grimm SA, Fargo D, et al.: An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet* (2013) 45, 970–976.
- 14) Burns MB, Temiz NA, Harris RS: Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet* (2013) 45, 977–983.
- 15) Ando M, Saito Y, Xu G, Bui NQ, Medetgul-Ernar K, et al.: Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers. *Nat Commun* (2019) 10, 2188.
- 16) Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, et al.: Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* (2020) 31, 1491–505.
- 17) Marret G, Bièche I, Dupain C, Borcoman E, du Rusquec P, et al.: Genomic Alterations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Level of Evidence According to ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT). *JCO Precis Oncol* (2021) 5, 215–226.
- 18) Ho AL, Hanna GJ, Scholz CR, Gualberto A, Park SH: Preliminary activity of tipifarnib in tumors of the head and neck, salivary gland and urothelial tract with HRAS mutations. *J Clin Oncol* (2020) 38 (suppl 15), 6504.
- 19) India Project Team of the International Cancer Genome Consortium: Mutational landscape of gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma reveals new recurrently-mutated genes and molecular subgroups. *Nat Commun* (2013) 4, 2873.
- 20) Mayo MW, Wang CY, Cogswell PC, Rogers-Graham KS, Lowe SW, et al.: Requirement of NF- κ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* (1997) 278, 1812–1815.
- 21) Ando M, Kawazu M, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, et al.: Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor- κ B signaling. *Cancer Sci* (2013) 104, 1002–1008.
- 22) Akagi K, Oki E, Taniguchi H, Nakatani K, Aoki D, et al.: Real-world data on microsatellite instability status in various unresectable or metastatic solid tumors. *Cancer Sci* (2021) 112, 1105–1113.
- 23) Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, et al.: Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* (2017) 23, 703–713.
- 24) Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, et al.: Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet* (2019) 51, 202–206.
- 25) Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, et al.: Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol* (2020) 21, 271–282.
- 26) Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, et al.: Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med* (2018) 378, 731–739.
- 27) Musholt TJ, Musholt PB, Khaladj N, Schulz D, Scheumann GF, et al.: Prognostic significance of RET and NTRK1 rearrangements in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Surgery* (2000) 128, 984–993.