

研究報告書
令和5年度：A課題

2025年 4月 30日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 信州大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科

住 所 長野県松本市旭 3-1-1

研究者氏名 岩佐 陽一郎

(研究課題)

DNA メチル化解析による頭頸部癌の抗 PD-1 抗体耐性メカニズムの解明

令和6年 3月 18日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しました
のでご報告いたします。

1. 研究の背景

頭頸部癌に対する治療は、抗 PD-1 抗体の登場により近年大きく変化し、特に再発・転移例において予後の改善が顕著に見られるようになった。一方で、抗 PD-1 抗体への治療耐性の問題が新たな課題として浮上しており、その発生機序や患者間の治療効果の個人差については未だ不明な点が多い。

抗 PD-1 抗体に対する治療耐性の機序としては、MHC class I を介した抗原提示の異常、IFN γ シグナルに対する感受性の低下、他の免疫チェックポイント分子の発現上昇などが報告されているが、未だ確立された結論には至っていないのが現状である。

我々はこれまでに、抗 PD-1 抗体治療を受けた頭頸部癌組織において、耐性獲得前後でエピジェネティック修飾（DNA メチル化やヒストン修飾）に関連するパスウェイの活性化および MHC class I の発現低下が生じていることを明らかにしてきた（Iwasa et al. *Biomolecules*. 2023）。これらの知見は、治療耐性機構におけるエピジェネティック修飾の関与を強く示唆するものである。しかし、治療耐性に関与する具体的なゲノム上のメチル化部位については未解明な点が多く、これを明らかにすべく本研究を着想した。

2. 研究の目的

抗 PD-1 抗体（Nivolumab）治療を受けた頭頸部癌患者の腫瘍組織に対して、DNA メチル化プロファイルの網羅的解析を行い、治療抵抗性獲得の分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究方法

・対象

当院で Nivolumab 治療を受けた頭頸部扁平上皮癌患者 55 例のうち、最良効果が完全奏功（CR）または部分奏功（PR）であった症例（n=4）、ならびに病勢進行（PD）となった症例（n=2）を対象とした。また、PR 症例の 1 例においては、Nivolumab 投与前（PR_pre）および病勢進行後（PR_post）の腫瘍組織が得られており、双方を解析に用いた。

・手法

ホルマリン固定パラフィン包埋組織（FFPE）から DNA を抽出し、RRBS（Reduced Representation Bisulfite Sequencing）法によりメチル化解析を実施した。ライブラリー調製後、NovaSeq システムにより 150 bp のペアエンドリードによるシーケンスを行った。

データ解析には methylKit を用い、リードカウントの正規化を行った上でロジスティック回帰モデルによる変動メチル化領域（DMR: Differentially Methylated Region）の抽出を行った。N=1 での 2 群比較では Fisher's exact test を使用した。

以下の 2 条件で 2 群間比較を実施し、|meth.diff| > 25 かつ q 値 < 0.01 を抽出条件とした：

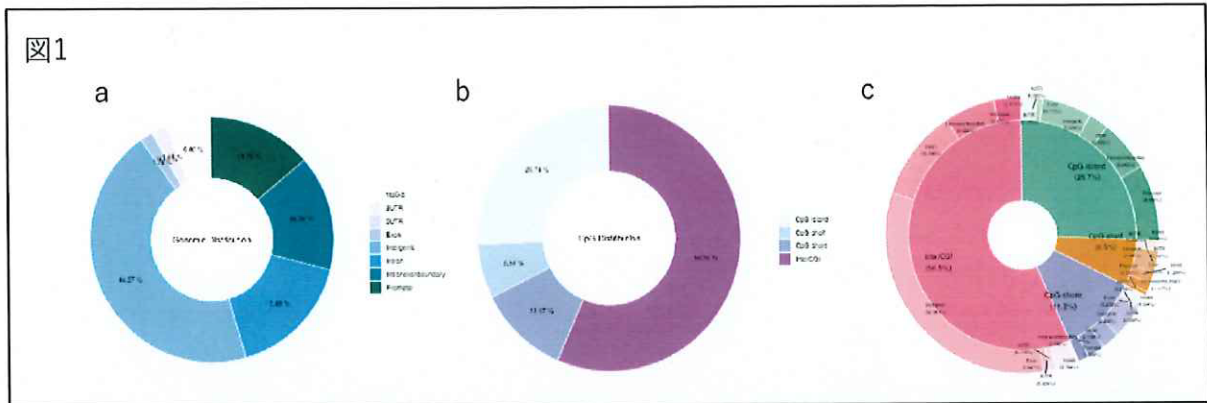
- ① CR+PR 群 vs PD 群（ICI 反応良好群 vs 不良群）
- ② PR_pre vs PR_post（耐性獲得前後）

4. 研究成果

・本検討で検出されたメチル化サイトの位置

全ゲノム領域を 1000 bp ごとに分割し、各領域内のメチル化サイトのうち全サンプルでカウントデータが 10 リード以上存在するメチル化サイトのリードカウントを合算し、各領域のリードカウントとした。得られたメチル化領域のうち、プロモーター領域に位置するものは 13.78%、CpG-island に該当するものは 25.74%、プロモーターかつ CpG-island に該当するものは全体の 8.9%であった（図 1a-c）。この領域は遺伝子発現制御と密接に関係するため、Nivolumab 治療効果の差異に関わる可能性が高いと考えられる。

図1



・ 2 群間比較による DMR の抽出

① CR+PR 群 vs PD 群

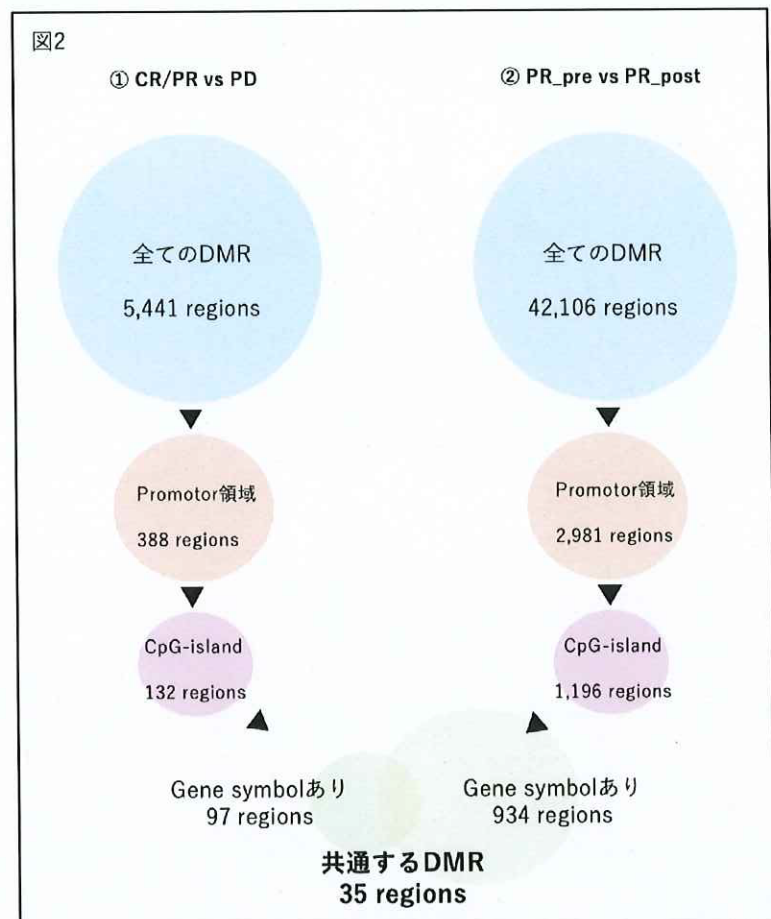
5441 領域の DMR が抽出され、そのうちプロモーター領域に該当するものは 388 領域、CpG-island に一致するのは 132 領域であった。Gene symbol が付与された領域に絞ると 97 領域となった。

② PR_pre vs PR_post

42106 領域の DMR が抽出され、うちプロモーター領域は 2981 領域、CpG-island は 1196 領域であり、Gene symbol が付与されたものは 934 領域であった。

この 2 群間解析により共通して同定された DMR は 35 領域であり（図 2）、ICI への抵抗性に関連する領域である可能性が高い。中でも、methyldiff が正（すなわちメチル化亢進）であった 6 つの遺伝子（RNA5-8SN2, DLX5, NBAT1, LAT, HOXB4, MESTIT1）は、Nivolumab 治療抵抗性に関与する可能性が示唆された。

図2



今後はこれらの候補遺伝子（RNA5-8SN2, DLX5, NBAT1, LAT, HOXB4, MESTIT1）の発現解析や機能解析を進め、Nivolumab 抵抗性の克服に資する新たなバイオマーカーや治療標的の同定を目指す。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる援助を賜りました公益財団法人がん研究振興財団に深く感謝申し上げます。