

2022.2.22 Cypher研究会

HPV関連中咽頭癌の ゲノム・エピゲノム解析

岡山大学病院
耳鼻咽喉・頭頸部外科
安藤 瑞生

職歴/研究歴

2000年 東京大学耳鼻科



2005年 国立がんセンター中央病院 頭頸科
東大病院 耳鼻科

2010年 東大大学院 (がんゲノム研究 [wet])
東大病院 耳鼻科
UCSD (がんゲノム研究 [dry])
東大病院 耳鼻科 (がんゲノム医療)



次世代シーケンサー

2021年 岡山大学病院 耳鼻科



がん遺伝子パネル検査

単一遺伝子の機能解析



ゲノム・**エピゲノム**解析



ゲノム医療 (の検査ツール)

ゲノム とは、
「遺伝情報の全体・総体」であり、
ある生物が持つ全核酸(≒DNA)の遺伝情報

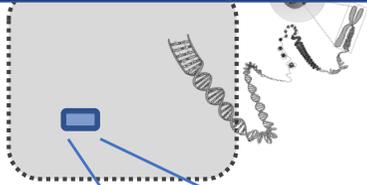
接頭辞 **epi-**: 上・外・の間・後ろ・近く

エピゲノム とは、
DNA塩基配列の変更を伴わない染色体変化に
起因する遺伝子活性の調節機構

The epigenome is dynamic and responsive to external stimuli.

現行の「がん遺伝子パネル」検査は ～500個の遺伝子をシーケンスする

全ゲノム解析(3Gb)



ヒト全遺伝子: 約20,000個

全エクソン解析(45Mb)

がん関連遺伝子: 約500個

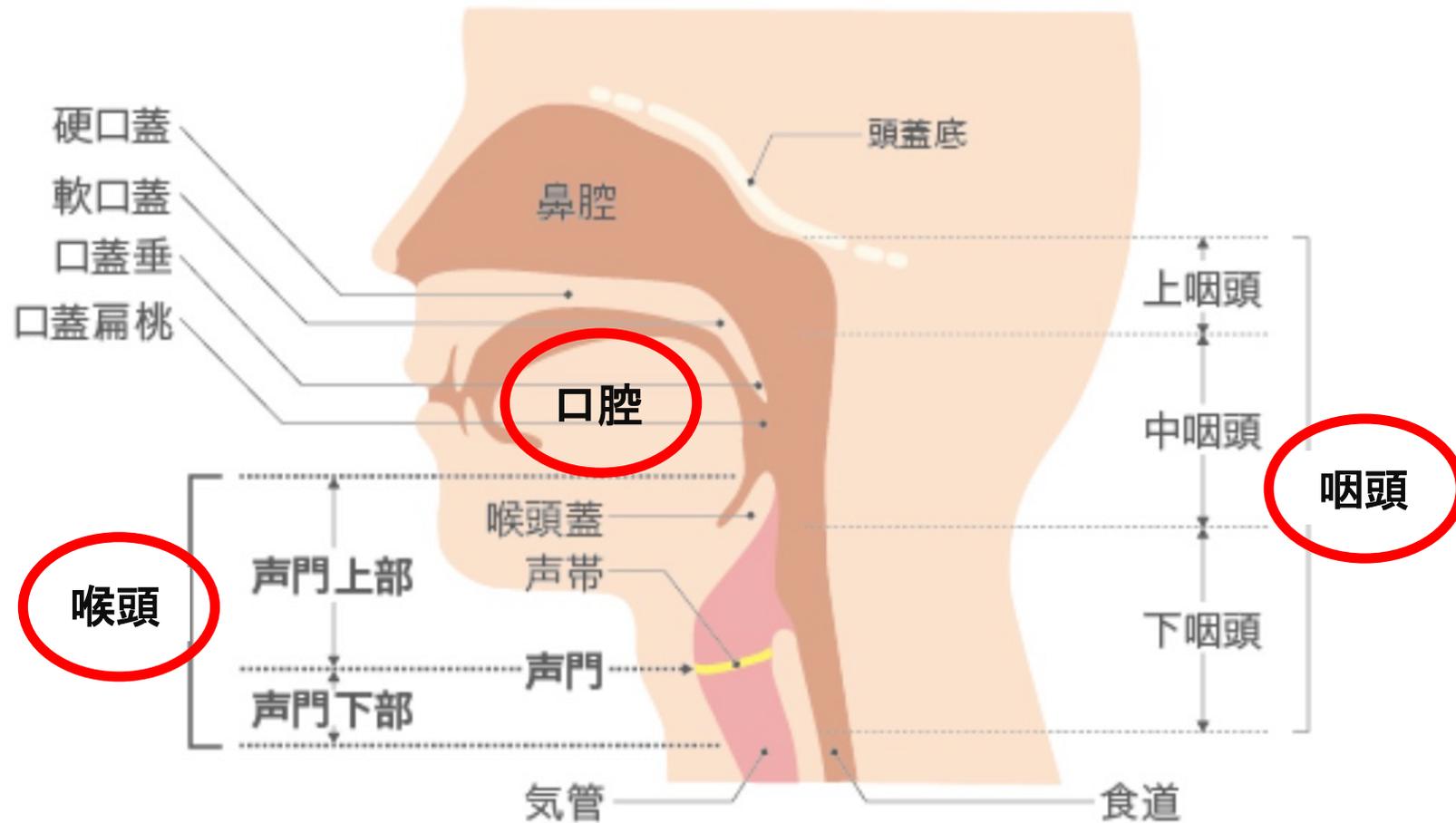
がん遺伝子パネル検査(1-2Mb)



現時点で臨床的に
有用な遺伝子: ～100個

頭頸部がん

Head & Neck Cancer



頭頸部がん領域で21世紀最大のイベント

HPVと中咽頭癌の関連が明らかに

Human Papillomavirus

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer

K. Kian Ang, M.D., Ph.D., Jonathan Harris, M.S., Richard Wheeler, M.D., Randal Weber, M.D., David I. Rosenthal, M.D., Phuc Felix Nguyen-Tân, M.D., William H. Westra, M.D., Christine H. Chung, M.D., Richard C. Jordan, D.D.S., Ph.D., Charles Lu, M.D., Harold Kim, M.D., Rita Axelrod, M.D., C. Craig Silverman, M.D., Kevin P. Redmond, M.D., and Maura L. Gillison, M.D., Ph.D.

NEJM 2010

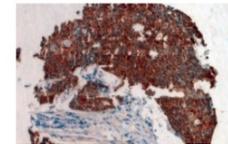
RESEARCH HIGHLIGHTS

GENETICS

Staging and prognostic value of p16 expression in oropharyngeal cancer

A strong independent prognostic marker for oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) has been identified by researchers in Switzerland. The report suggests that expression of p16 should be included in the official staging system for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) to identify patients with OPSCC. Claude Fischer and

OPSCC. "Multivariate analysis reveal[ed] p16 to be the strongest and most reliable prognostic factor compared [with] the conventional staging parameters [primary tumor extension] and [lymph node involvement] classification," Fischer reports. The investigators note that immunohistochemical staining of p16



Nat Rev Clin Oncol 2010

Commentary

Human Papillomavirus Status in Head and Neck Cancer

The Ethics of Disclosure

Andrew G. Shuman, MD^{1,2} and Gregory T. Wolf, MD¹

Human papillomavirus (HPV) is an emerging causative factor for squamous carcinoma of the oropharynx and perhaps other head and neck cancers. There is a great deal of uncertainty regarding the clinical significance and implications of HPV status in this patient population. As a result, there is no established protocol for informing patients of the potential link between viral infection and their cancer. This paper discusses some of the ethical issues involved with informing head and neck cancer patients of their HPV status, recognizing the dilemma posed by unresolved clinical questions and the need to respect the autonomy of patients by disclosing relevant information. *Cancer* 2010;116:4221-6. © 2010 American Cancer Society.

KEYWORDS: human papillomavirus, head and neck cancer, oropharynx, disclosure, patient autonomy.

Cancer 2010

頭頸部癌で初の大規模ゲノム解析

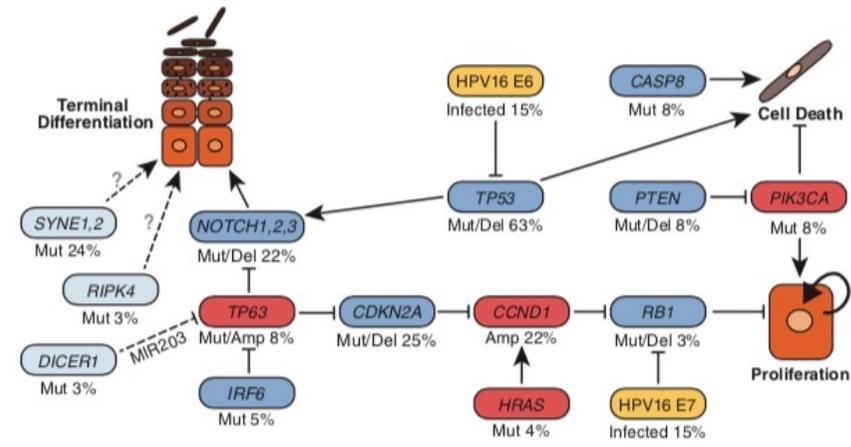
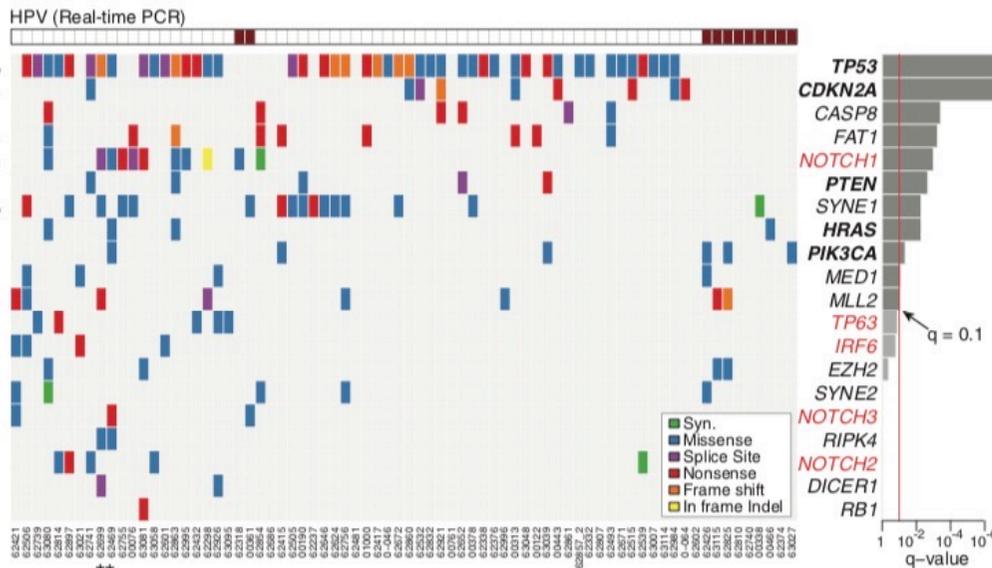
SCIENCE VOL 333 26 AUGUST 2011

The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Nicolas Stransky,^{1*} Ann Marie Egloff,^{2*} Aaron D. Tward,^{1,3,4*} Aleksandar D. Kostic,^{1,5} Kristian Cibulskis,¹ Andrey Sivachenko,¹ Gregory V. Kryukov,^{1,5} Michael S. Lawrence,¹ Carrie Sougnez,¹ Aaron McKenna,¹ Erica Shefler,¹ Alex H. Ramos,¹ Petar Stojanov,¹ Scott L. Carter,¹ Douglas Voet,¹ Maria L. Cortés,¹ Daniel Auclair,¹ Michael F. Berger,¹ Gordon Saksena,¹ Candace Guiducci,¹ Robert C. Onofrio,¹ Melissa Parkin,¹ Marjorie Romkes,⁶ Joel L. Weissfeld,⁷ Raja R. Seethala,⁸ Lin Wang,⁸ Claudia Rangel-Escareño,⁹ Juan Carlos Fernandez-Lopez,⁹ Alfredo Hidalgo-Miranda,⁹ Jorge Melendez-Zajgla,⁹ Wendy Winckler,¹ Kristin Ardlie,¹ Stacey B. Gabriel,¹ Matthew Meyerson,^{1,5,10,11} Eric S. Lander,^{1,5,12} Gad Getz,¹ Todd R. Golub,^{1,5,11,13,14} Levi A. Garraway,^{1,5,10,11}†† Jennifer R. Grandis,^{2,15}††

- 74 症例の全エクソン解析
- TP53, NOTCH1, CASP8, HRAS, PIK3CA, ...

腺癌にみられるような
強い癌遺伝子は無いのか...

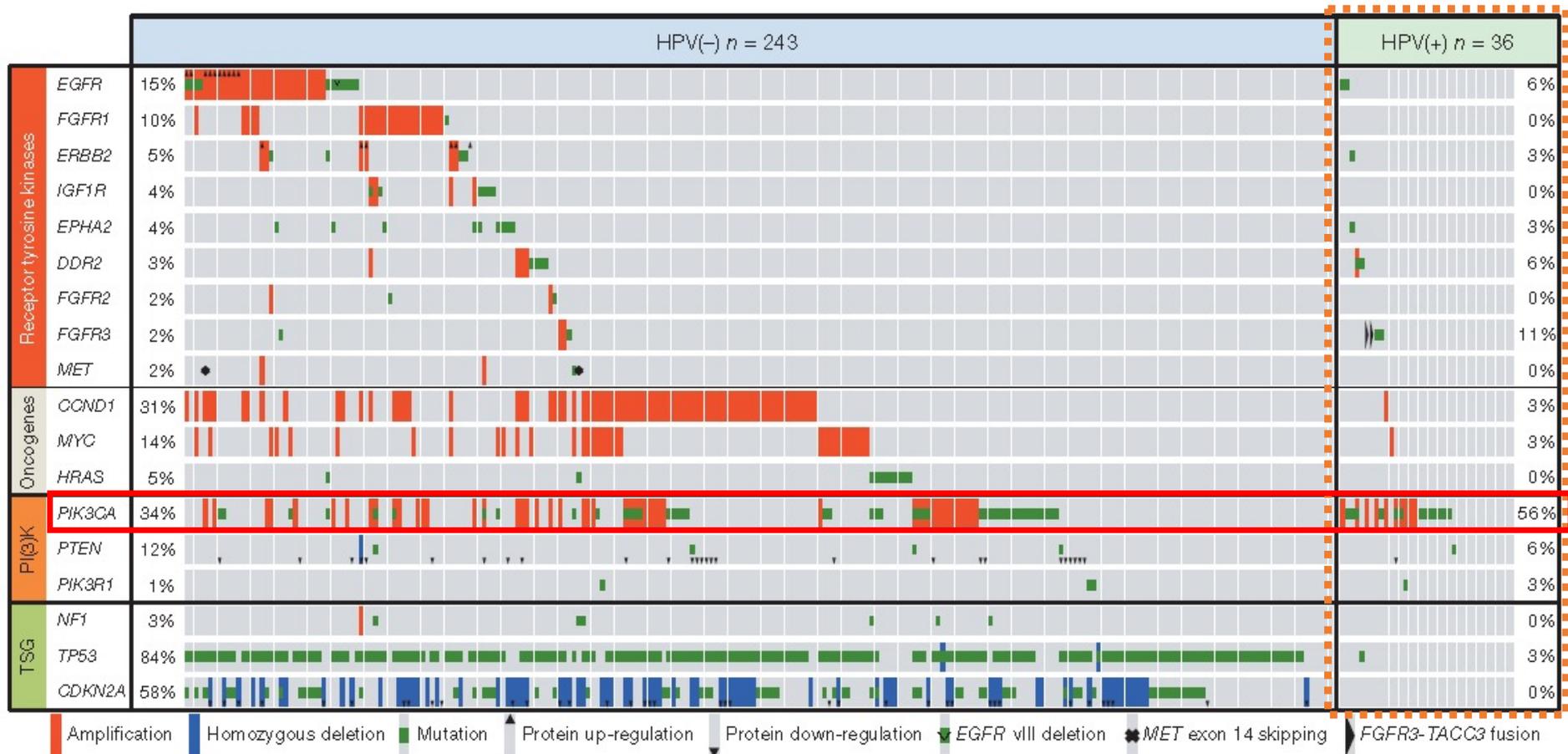


Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas

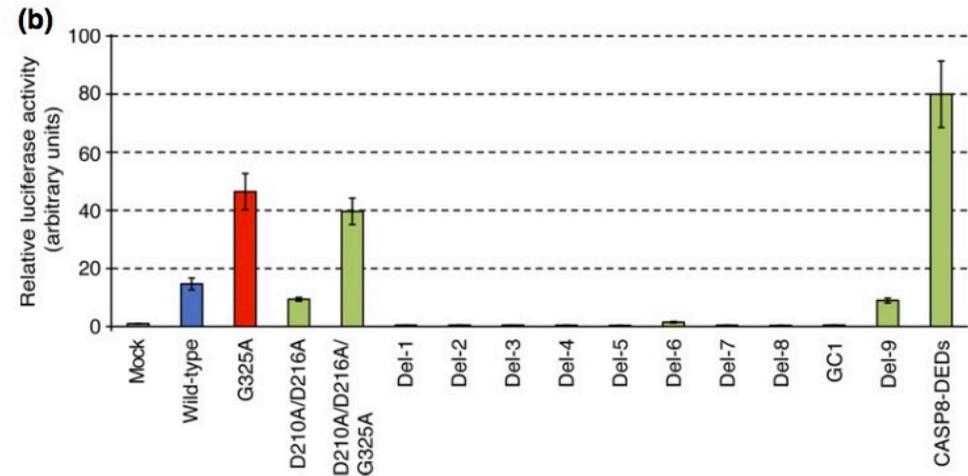
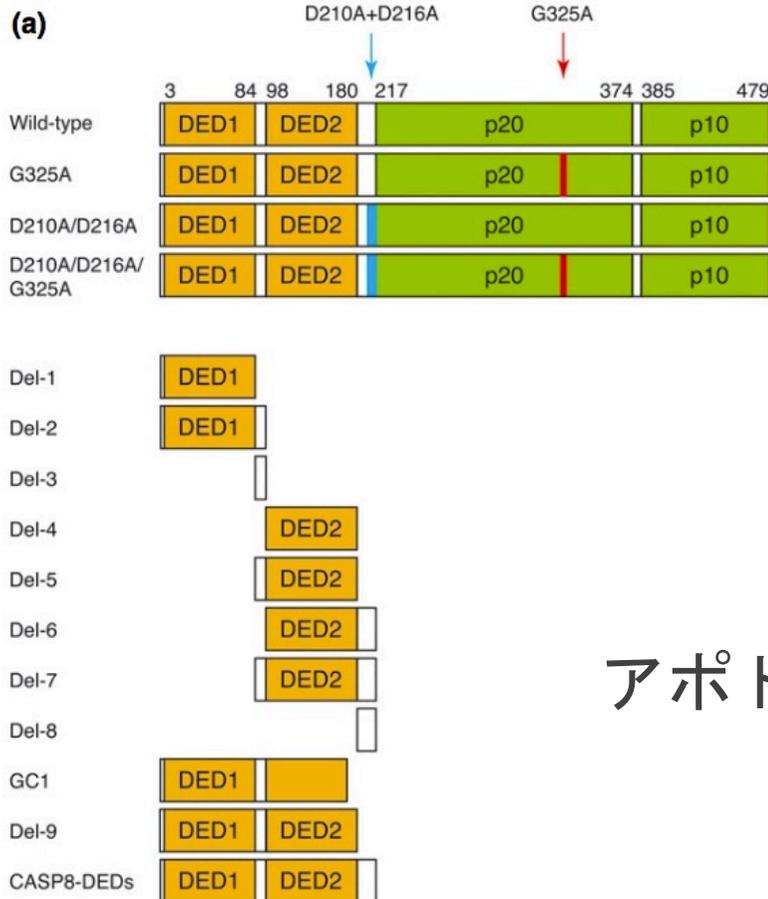
The Cancer Genome Atlas Network*

HPV(-)
243症例

HPV(+)
36症例

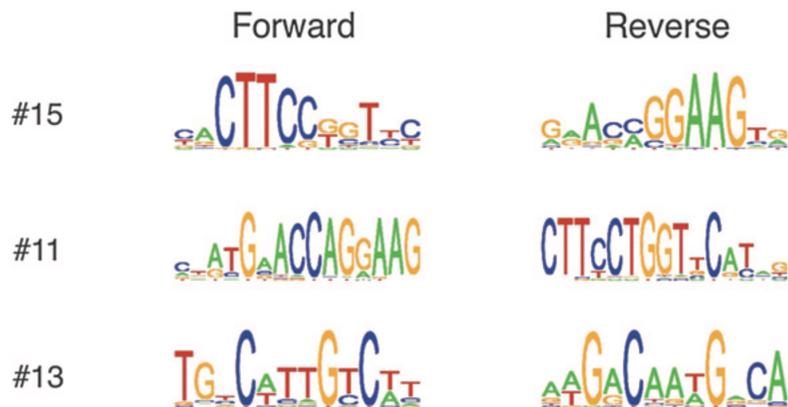
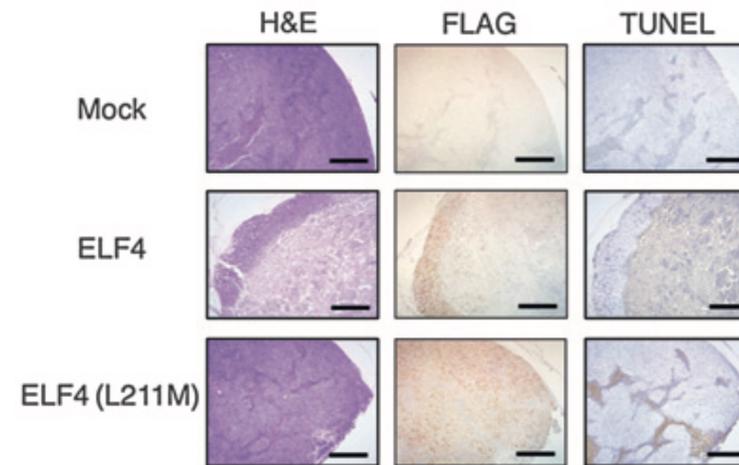
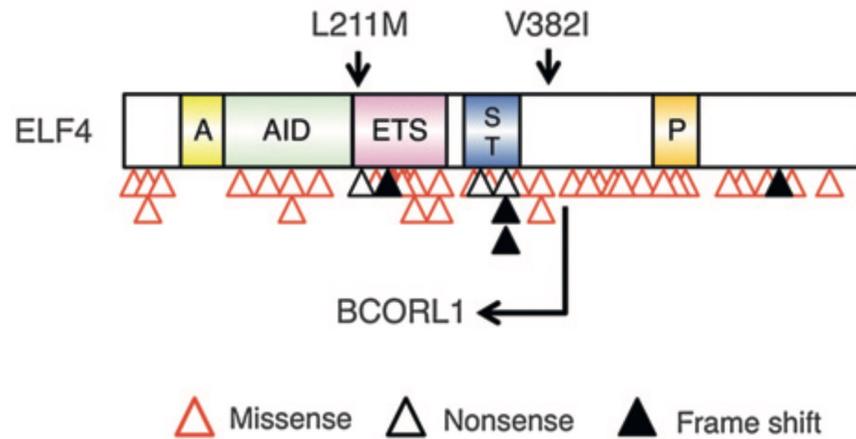


単一遺伝子の機能解析(1)



アポトーシス誘導因子 *CASP8* 変異体は
NF- κ B誘導能を有する

単一遺伝子の機能解析(2)



血液腫瘍のがん遺伝子 *ELF4* は固形腫瘍では逆にがんを抑制する

なぜ単一遺伝子の機能解析？

頭頸部癌の細胞株を10個選んで、全エクソン解析
(遺伝子2万個)



細胞株あたり20個くらいの遺伝子変異一覧が得られる



注目する遺伝子変異を数個決めて、機能解析をする
合理的思考と、勘と運

遺伝子変異Aが発癌に寄与する！



日本人患者の癌検体を使って、

遺伝子変異Aの実際の変異頻度を調べる

遺伝子変異Aが細胞株にしか見られない変異だったら。。。

Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas

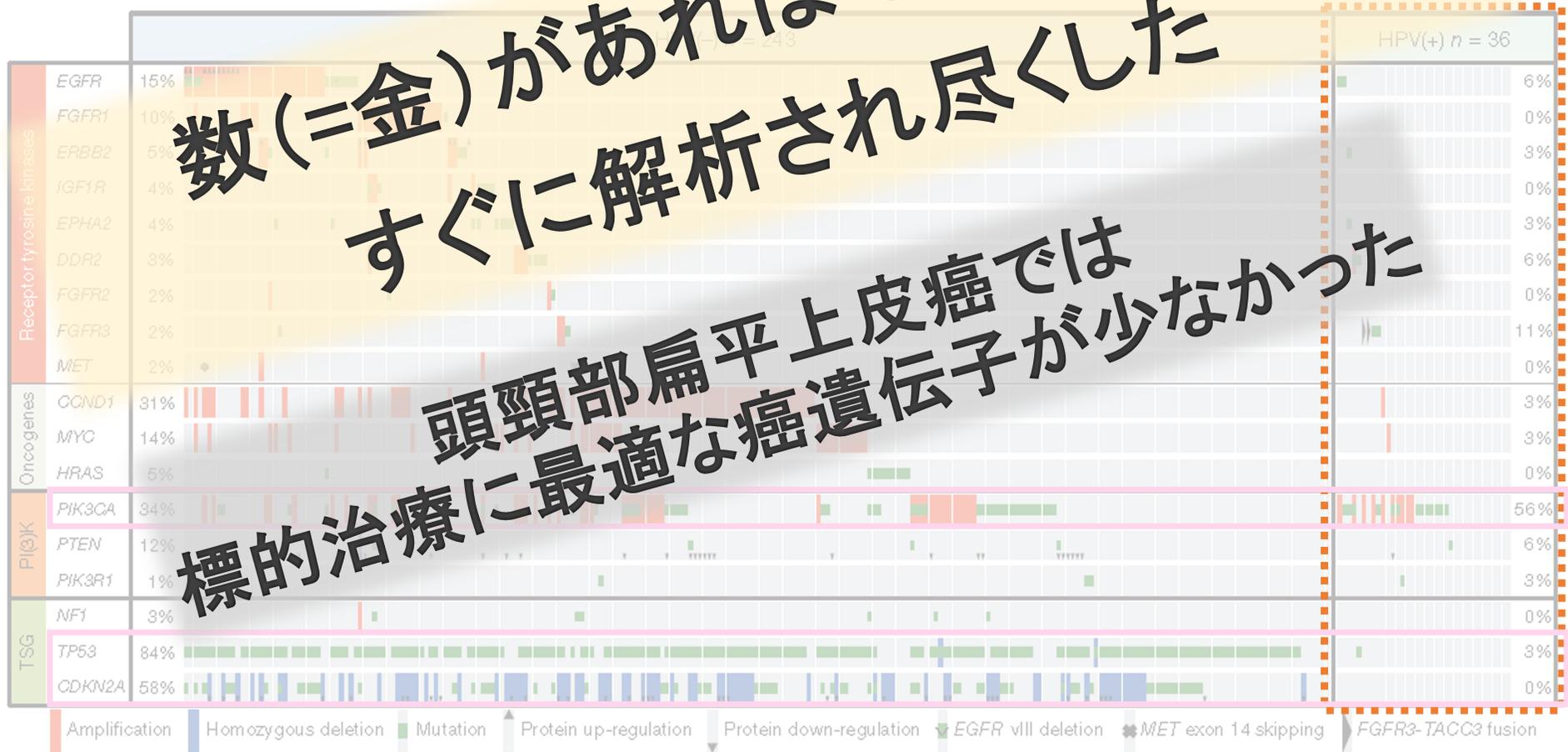
The Cancer Genome Atlas Network*

HPV(-)
243症例

HPV(+)
36症例

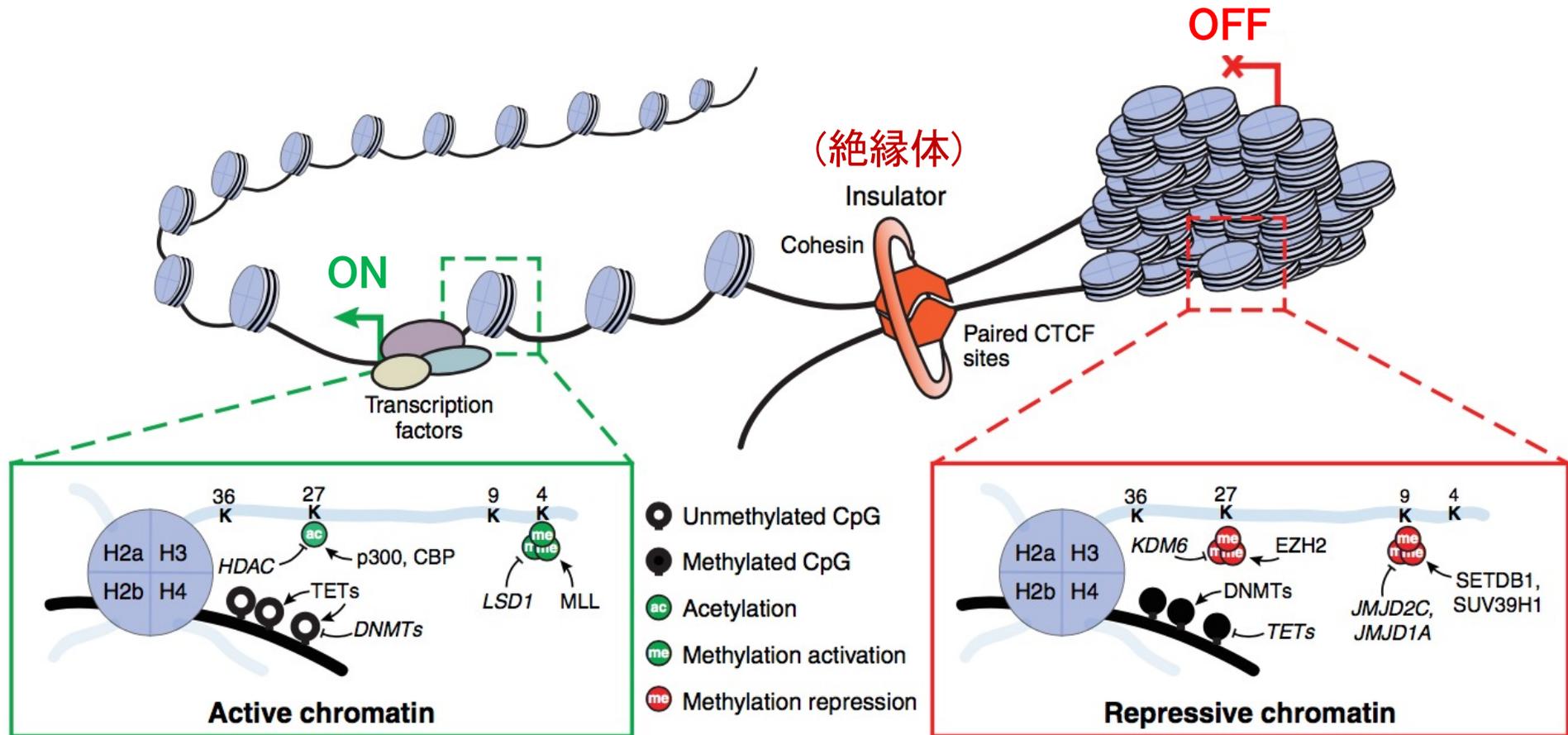
数(=金)があればできるものは
すぐに解析され尽くした

頭頸部扁平上皮癌では
標的治療に最適な癌遺伝子が少なかった



古典的なエピゲノム調節機構

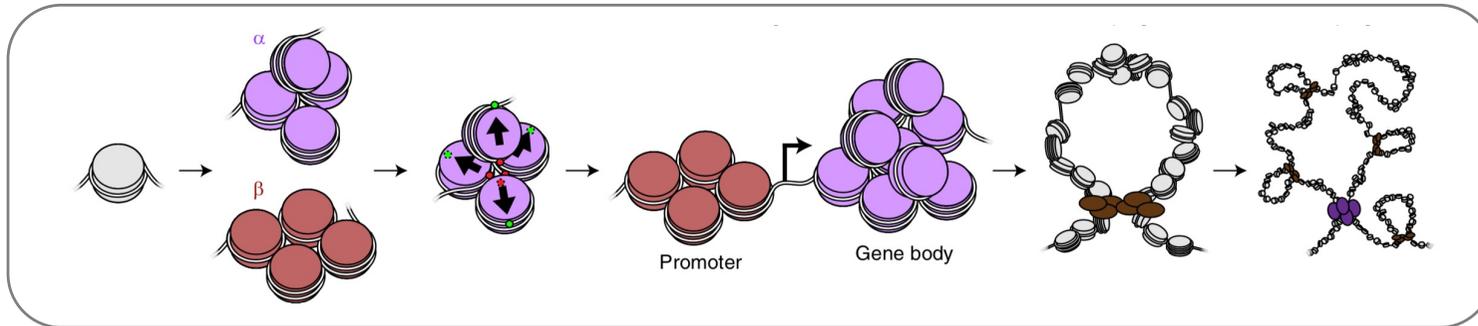
– DNAメチル化、ヒストン修飾 –



遺伝子発現の活性化

遺伝子発現の抑制

DNAの三次元構造

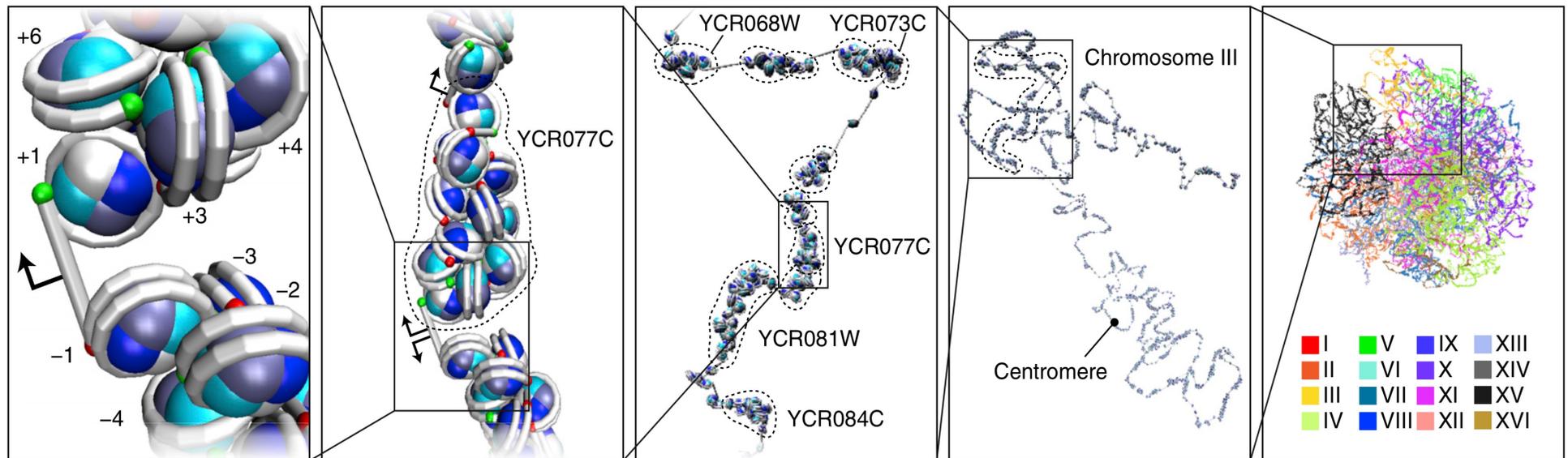


1遺伝子レベル

遺伝子群レベル

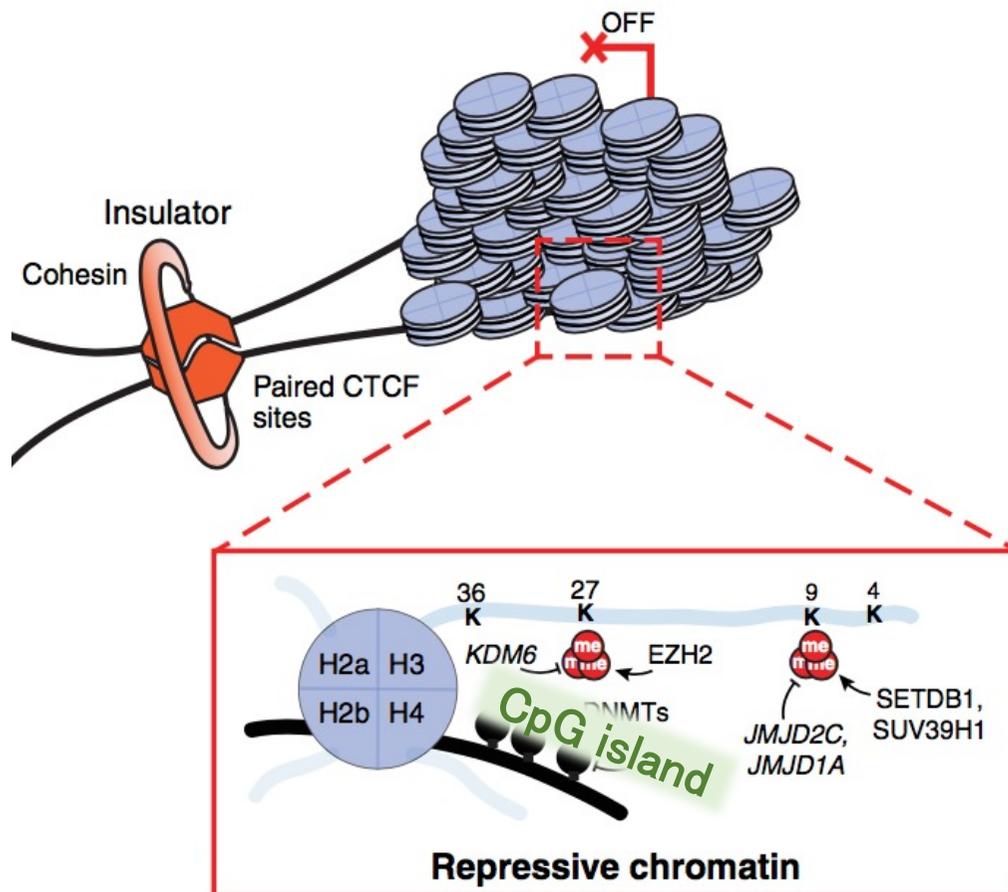
1染色体レベル

全染色体レベル



古典的なエピゲノム調節機構

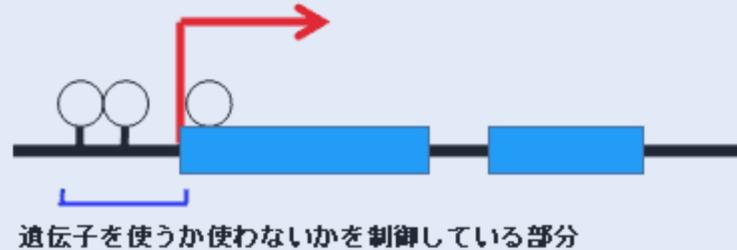
– DNAメチル化、ヒストン修飾 –



遺伝子発現の抑制

転写開始点
(TSS, Transcription Start Site)

使える遺伝子



DNAメチル化により使えなくなった遺伝子



- DNAがメチル化されている状態
- DNAがメチル化されていない状態

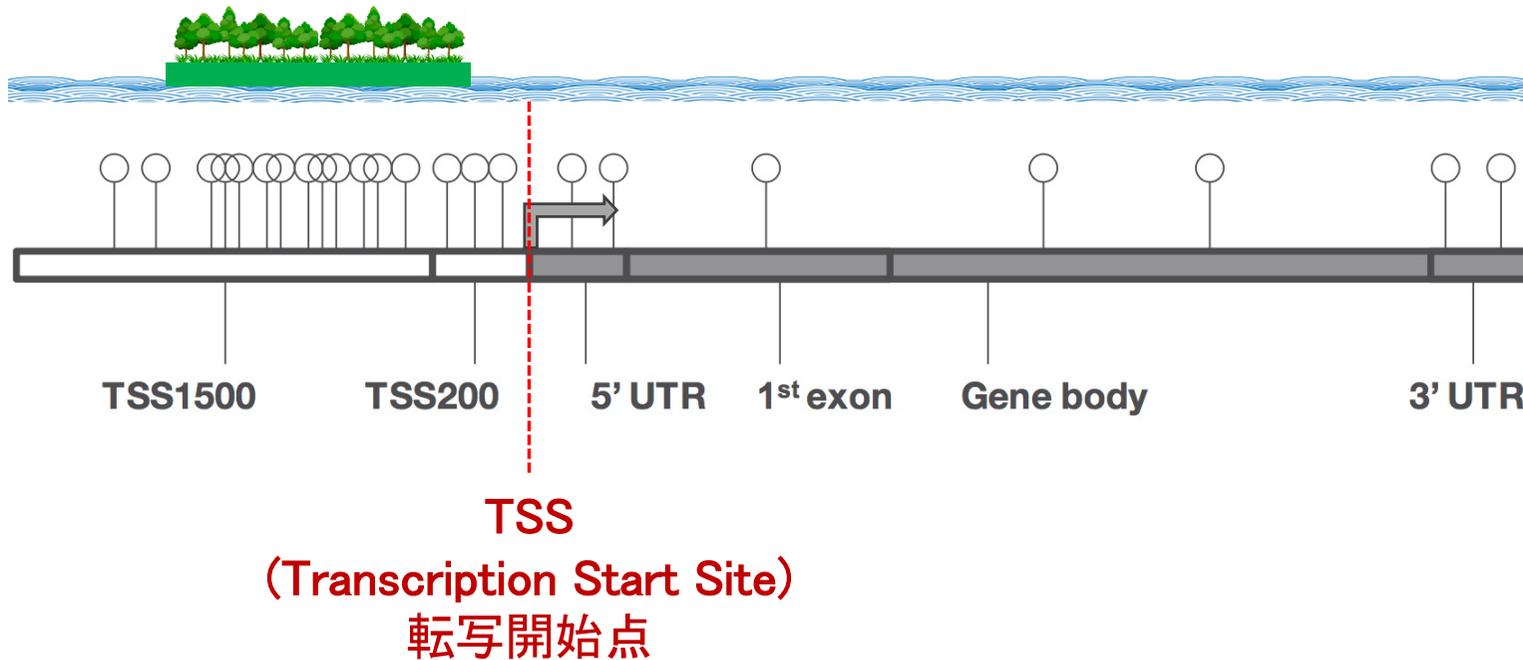
図1 DNAメチル化による遺伝子の不活化

遺伝子を使うか使わないかを制御している部分（プロモーター）がメチル化されると、遺伝子は使えなくなる。

DNAメチル化の測定

Infinium® HM450 BeadChip
(マイクロアレイ)

CpG islandは、
TSS上流(遺伝子プロモーター領域)に
存在することが多い





CpG
island

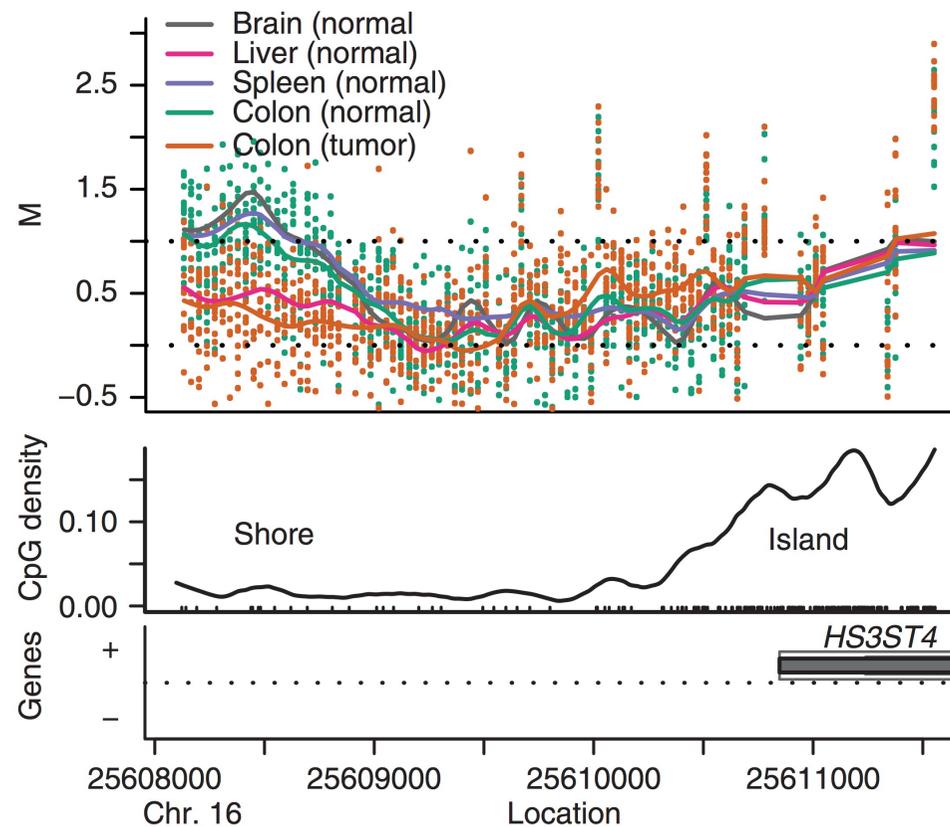
CpG
shore
(岸)

open sea

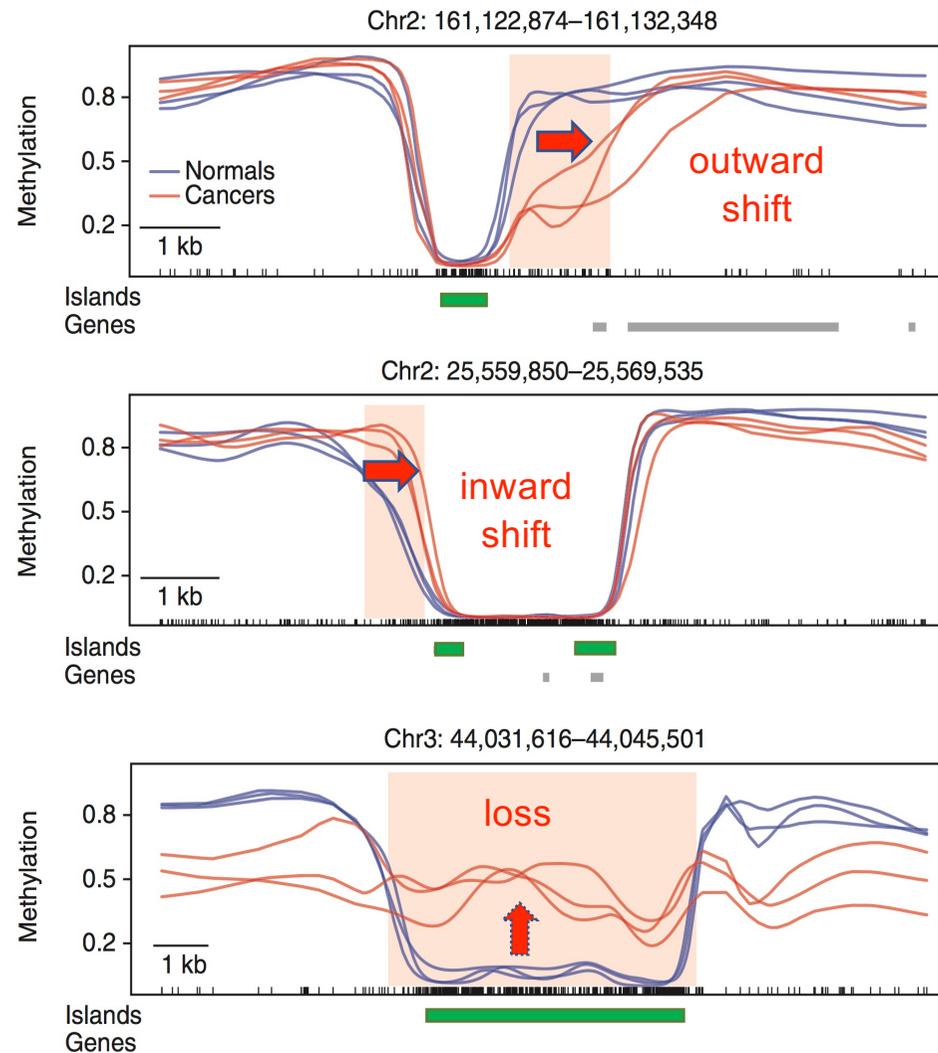
DNAメチル化の測定

WGBS: Whole Genome Bisulfite Sequencing
(次世代シーケンス)

Tissue-specific differential DNA methylation is located at CpG shores

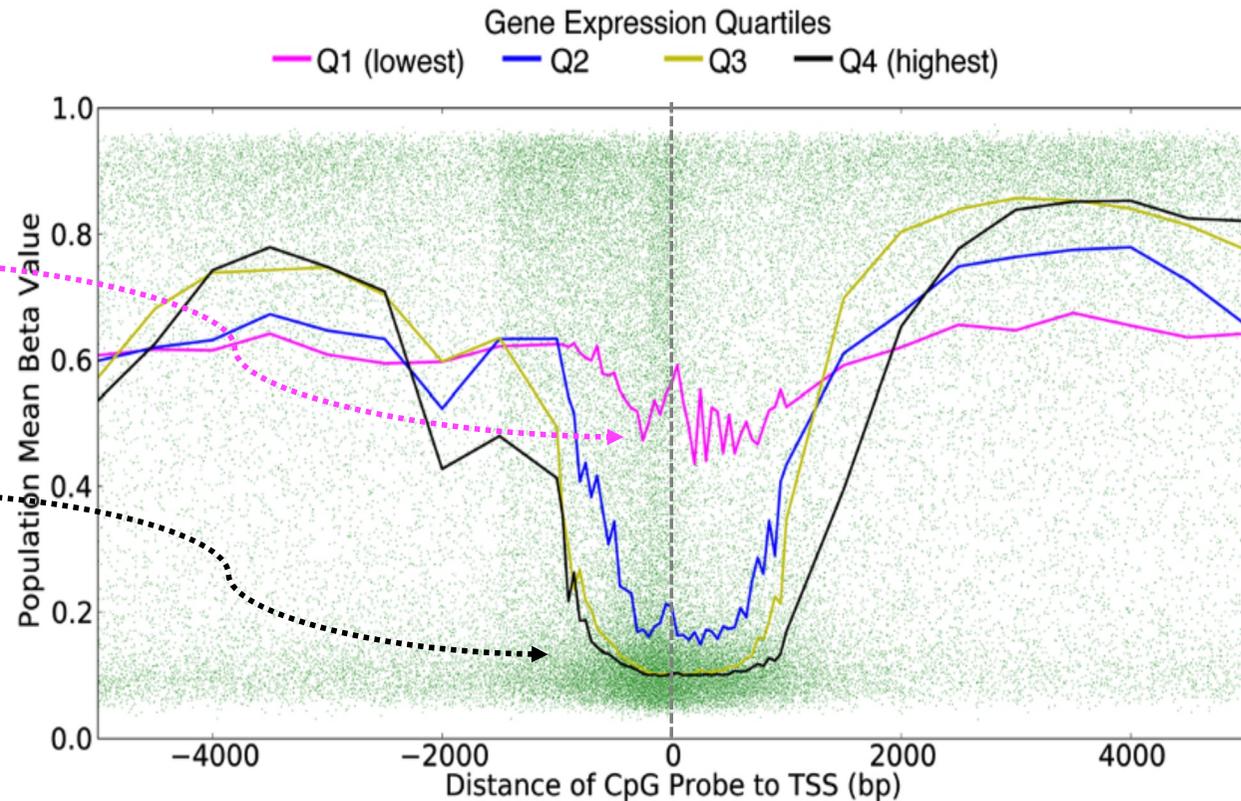
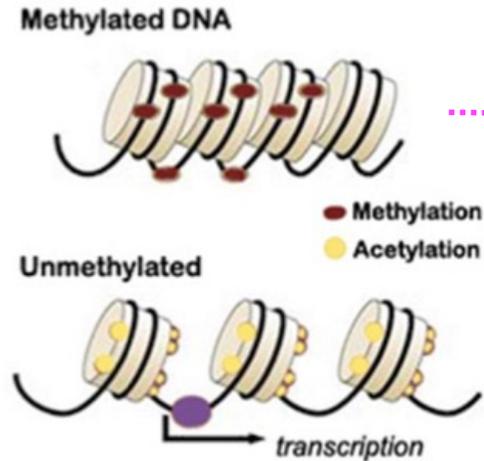
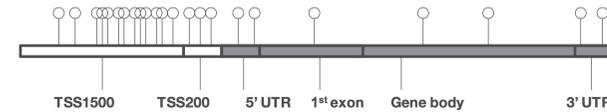


Methylation boundaries at CpG islands



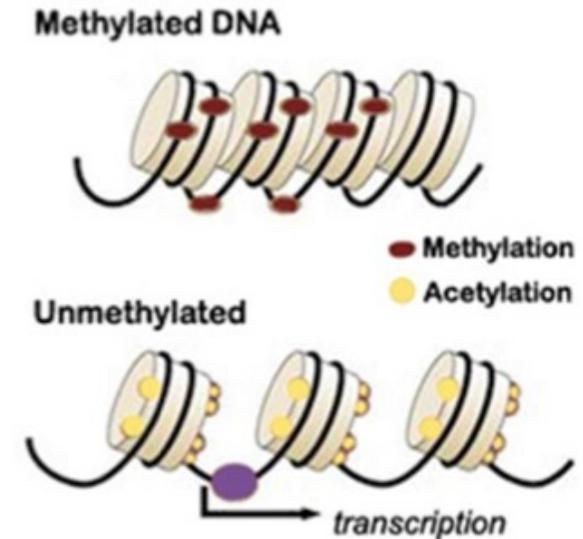
β values of CpG probes **near TSS** depends on the gene's expression level

※ HM450 マイクロアレイ使用



[仮説]

- DNAメチル化状態の変化は、CpG islandだけに注目すべきではない
 - TSS周囲か？
 - 正常/腫瘍細胞の差は？
- 遺伝子発現と関連させて検討
- ヒストン修飾も協調的に働く
- このようなエピゲノム異常の特徴によって分類される腫瘍がある



Johns Hopkins Univ. cohort

[対象]

HPV陽性中咽頭癌患者の原発腫瘍 47 症例

健常者の中咽頭組織 25 症例

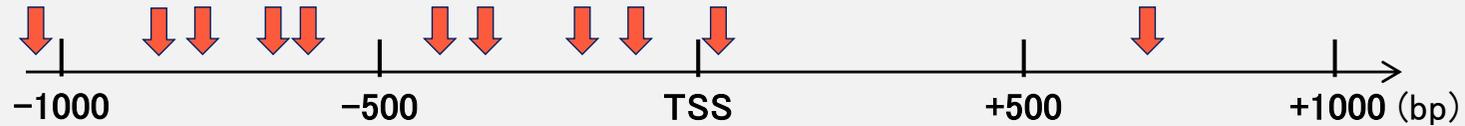
[方法]

- Exome-seq (DNA変異) * 原発腫瘍/正常ペア
- RNA-seq (RNA発現) * 原発腫瘍、健常者中咽頭
- MBD-seq (DNAメチル化) * 原発腫瘍、健常者中咽頭
- ChIP-seq (ヒストン修飾) * xenograft (PDX)

DNAメチル化の測定

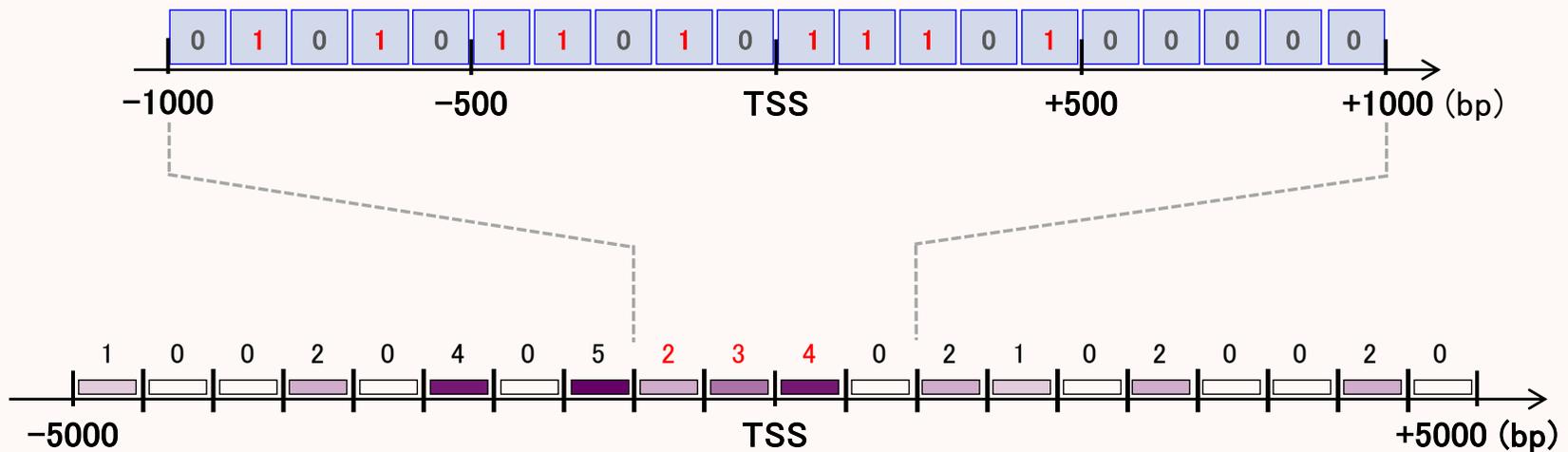
マイクロ
アレイ

予めデザインされたprobeによる測定



MBD-seq

ゲノム全体をより均等に測定



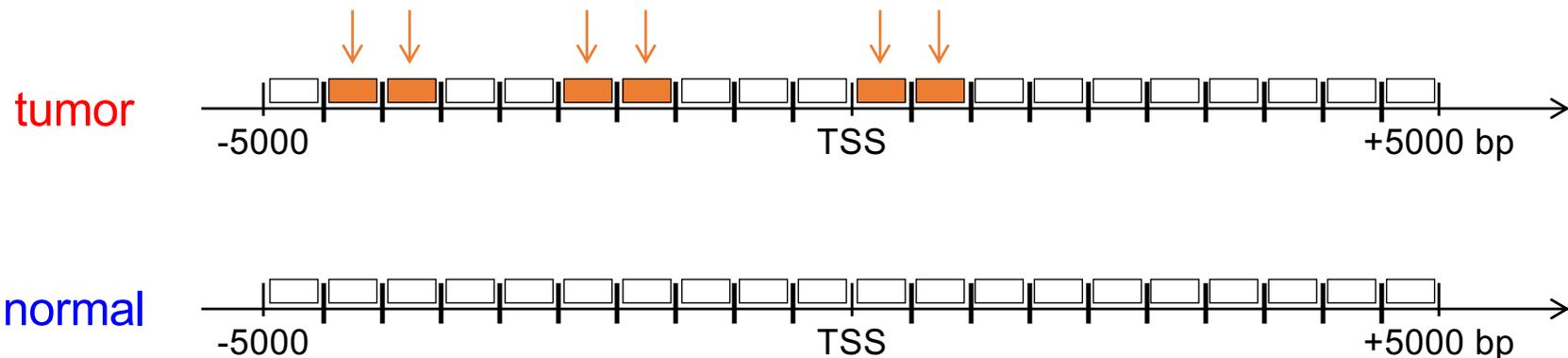
WGBS

最も網羅的

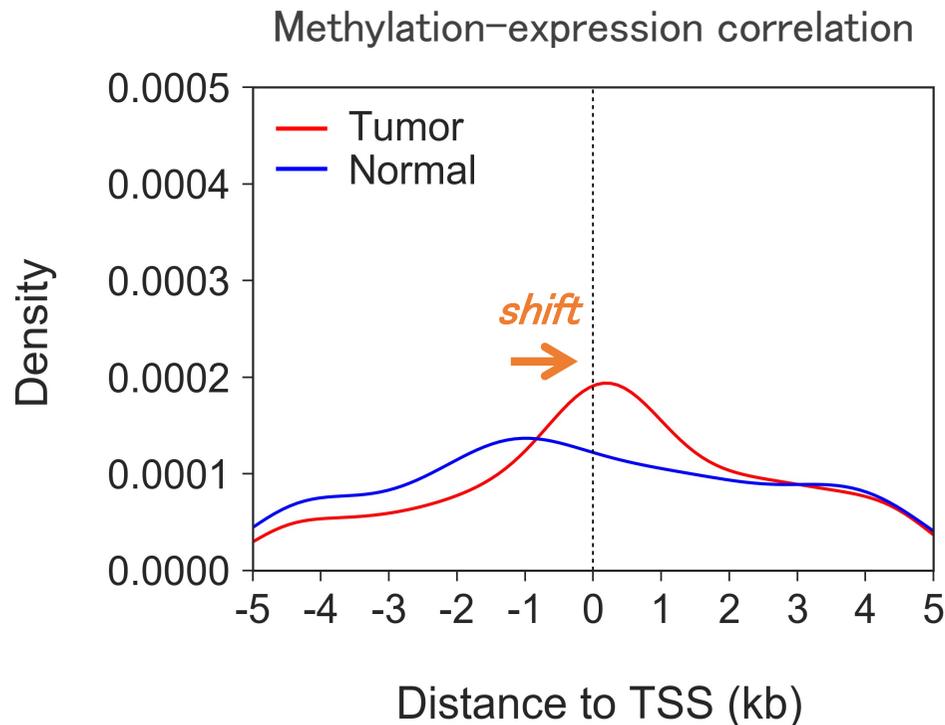
DNAメチル化状態と遺伝子発現の関連

symbol	chr	start	end	CpGi	strand	TSSdist	Tratio	Nratio	spmnrhoT	spmnpT	spmnbHpT	spmnrhoN	spmnpN	spmnbHpN
PAX1	chr20	21681301	21681800		+	-4746	0.17021	0	-0.3421525	0.0185698	0.0315687			
PAX1	chr20	21681801	21682300		+	-4246	1.21277	0	-0.4376599	0.0020948	0.0059352			
PAX1	chr20	21682301	21682800		+	-3746	1.3617	0	-0.4432363	0.001807	0.0059352			
PAX1	chr20	21682801	21683300		+	-3246	0.59574	0	-0.3992858	0.0054304	0.013188			
PAX1	chr20	21683301	21683800		+	-2746	0.95745	0	-0.3712681	0.0101903	0.0216544			
PAX1	chr20	21683801	21684300	CpG: 50	+	-2246	1.23404	0	-0.4654899	0.000977	0.0041521			
PAX1	chr20	21684301	21684800	CpG: 50	+	-1746	0.80851	0	-0.4826011	0.0005915	0.0033518			
PAX1	chr20	21684801	21685300		+	-1246	0.02128	0	-0.0761641	0.6108684	0.6490477			
PAX1	chr20	21685301	21685800		+	-746	0	0						
PAX1	chr20	21685801	21686300	CpG: 141	+	-246	0.51064	0	-0.3342171	0.0216735	0.0334954			
PAX1	chr20	21686301	21686800	CpG: 141	+	254	1.21277	0.2	-0.4886154	0.0004928	0.0033518	-0.3041669	0.1393382	0.2122065
PAX1	chr20	21686801	21687300	CpG: 141	+	754	1.87234	0.8	-0.5190479	0.0001854	0.0031516	-0.3026138	0.141471	0.2122065
PAX1	chr20	21687301	21687800	CpG: 141	+	1254	1.80851	0.24	-0.3649193	0.0116679	0.0220393	-0.1656168	0.4288413	0.4288413
PAX1	chr20	21687801	21688300		+	1754	0.19149	0	-0.2257958	0.1269902	0.1542023			
PAX1	chr20	21688301	21688800		+	2254	0.02128	0	0.0435223	0.7714512	0.7714512			
PAX1	chr20	21688801	21689300		+	2754	0.7234	0	-0.263094	0.0739799	0.102127			
PAX1	chr20	21689301	21689800		+	3254	0.55319	0	-0.2595547	0.0780971	0.102127			
PAX1	chr20	21689801	21690300	CpG: 31	+	3754	0.29787	0	-0.1766179	0.2349949	0.2663276			
PAX1	chr20	21690301	21690800		+	4254	0	0						
PAX1	chr20	21690801	21691300		+	4754	0	0						

DNA methylation significantly correlates with gene expression



DNAメチル化状態の変化が 遺伝子発現と最も相関する位置は？

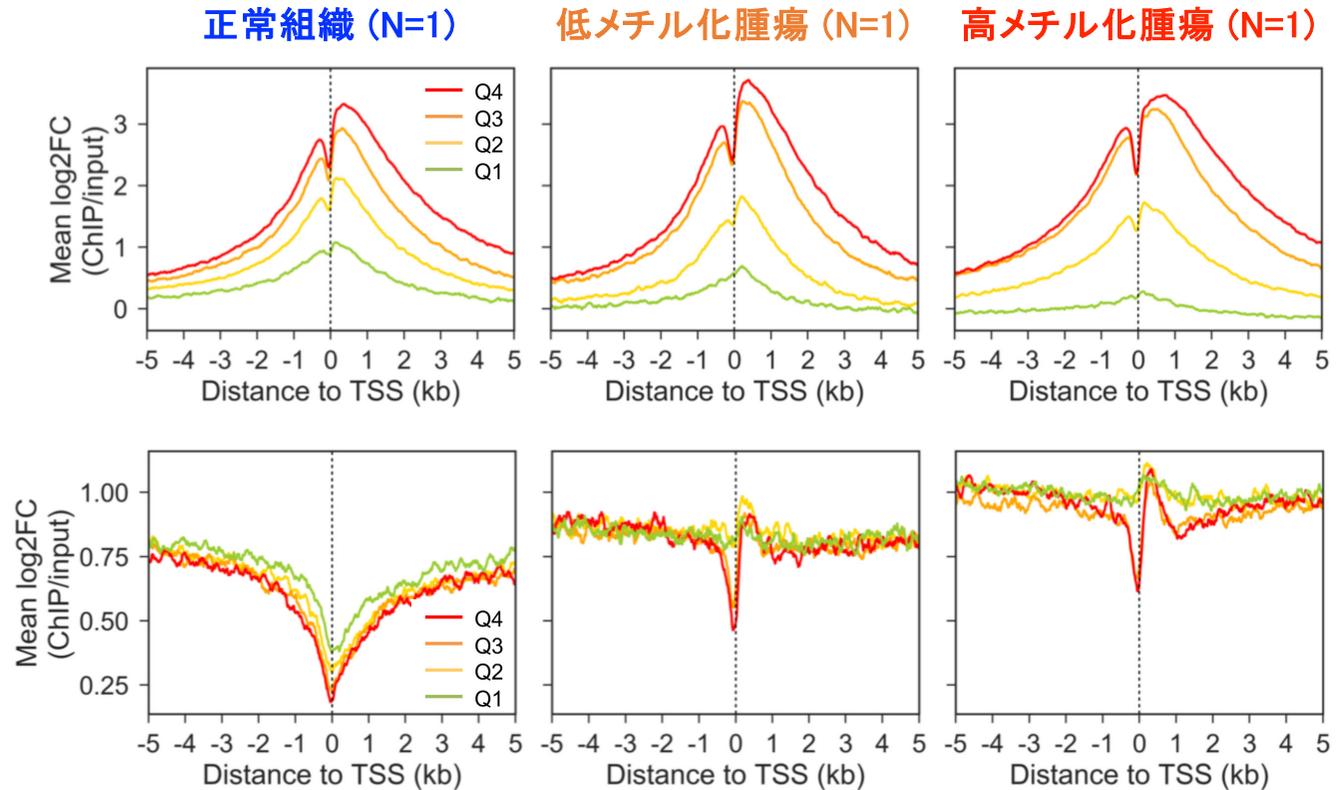
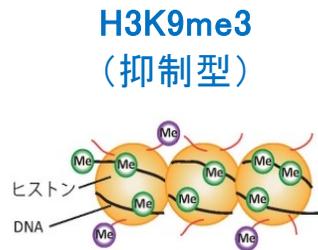
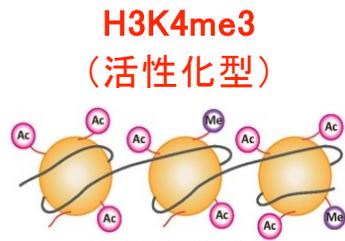


腫瘍組織：ほぼTSS

正常組織：TSSの約1kb上流
(≡ プロモーター領域)

腫瘍組織のDNAメチル化変化は、単なる gain ではなく、
プロモーター領域から TSS への **shift** である

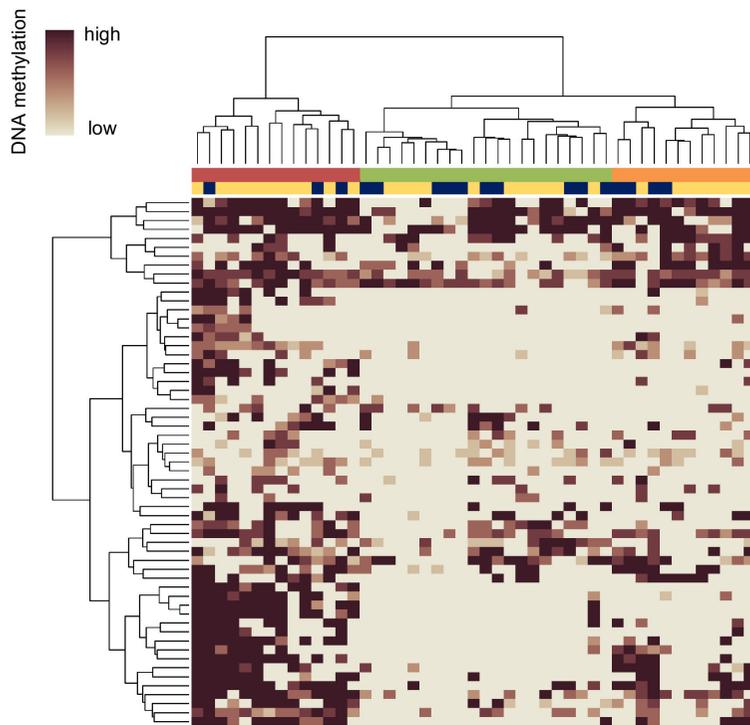
ヒストン修飾の変化



抑制型ヒストン修飾の変化も、**TSS近傍** において顕著

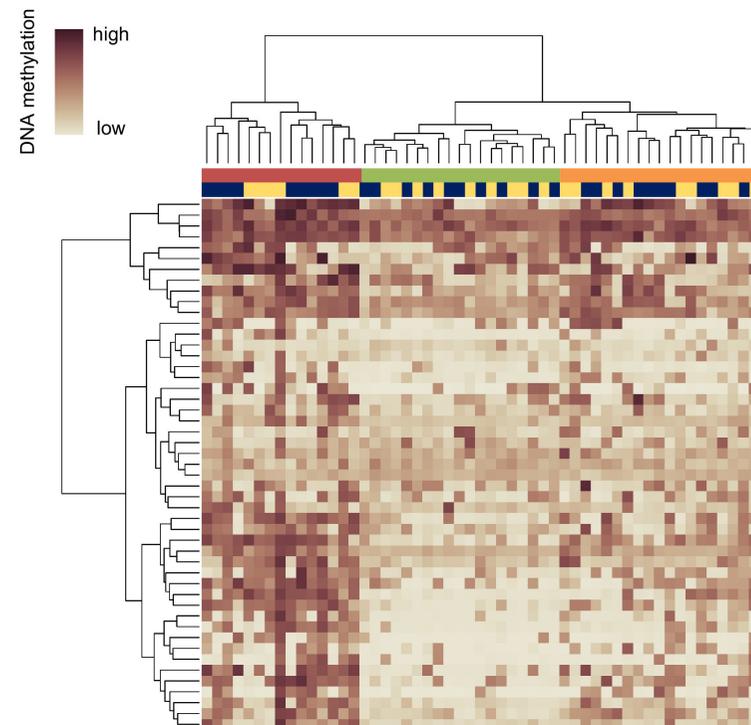
DNAメチル化を指標としたサブタイプ分類

Discovery cohort
(JHU, MBD-seq)



高メチル化腫瘍

Validation cohort
(TCGA, HM450K)



高メチル化腫瘍

Methylation subtype

- High (Tumor-H)
- Intermediate
- Low (Tumor-L)

Tobacco use

- Yes
- No

まとめ

HPV関連中咽頭癌のエピゲノム変化は、
プロモーター領域よりも **TSS** に注目すべき
(転写開始点)

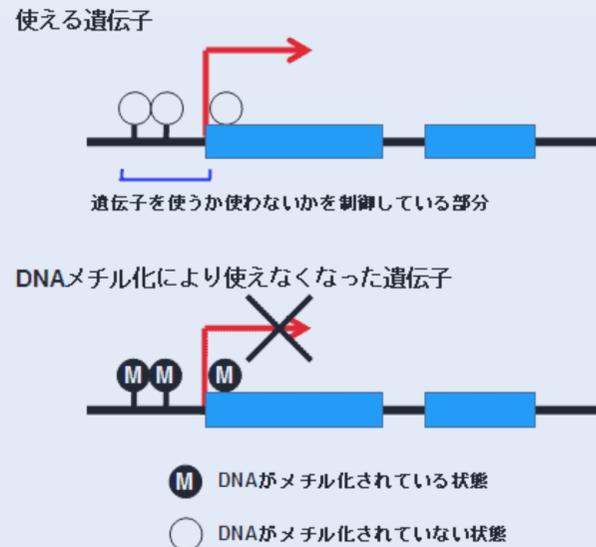


図1 DNAメチル化による遺伝子の不活化
遺伝子を使うか使わないかを制御している部分（プロモーター）がメチル化されると、遺伝子は使えなくなる。

(国立がん研究センター研究所HP)

Dr. Califano



Mathematic side
or biology side?

Biology side.

A new era of computational analysis !



```

? -> Introduction and overview of IPython's features.
%quickref -> Quick reference.
help -> Python's own help system.
object? -> Details about 'object', use 'object??' for extra
details.

In [1]: %matplotlib inline
        from numpy.random import beta
        import matplotlib.pyplot as plt
        plt.style.use('bmh')

        def plot_beta_hist(a, b):
            plt.hist(beta(a, b, size=10000), histtype='stepfilled',
                    bins=25, alpha=0.8, normed=True)
            return

        plot_beta_hist(10, 10)
        plot_beta_hist(4, 12)
        plot_beta_hist(50, 12)
        plot_beta_hist(6, 55)

In [2]: %run ~/Downloads/mri_with_eeg.py
loading eeg /Users/fperez/usr/conda/lib/python3.5/site-packages/mat
plotlib/mpl-data/sample_data/eeg.dat

```

```

1 #!/usr/bin/env python
2
3
4 This now uses the imshow command instead of pcolor which *is much
5 faster*
6
7 from __future__ import division, print_function
8
9 import numpy as np
10
11 from matplotlib.pyplot import *
12 from matplotlib.collections import LineCollection
13 import matplotlib.cbook as cbook
14 # I use if 1 to break up the different regions of code visually
15
16 if 1: # load the data
17     # data are 256x256 16 bit integers
18     dfile = cbook.get_sample_data('s1045.ima.gz')
19     im = np.fromstring(dfile.read(), np.uint16).astype(float)
20     im.shape = 256, 256
21
22 if 1: # plot the MRI in pcolor
23     subplot(221)
24     imshow(im, cmap=cm.gray)
25     axis('off')
26
27 if 1: # plot the histogram of MRI intensity
28     subplot(222)
29     im = np.ravel(im)
30     im = im[np.nonzero(im)] # ignore the background
31     im = im/(2.0*15) # normalize
32     hist(im, 100)
33     xticks([-1, -.5, 0, .5, 1])
34     yticks([])
35     xlabel('intensity')
36     ylabel('MRI density')
37
38 if 1: # plot the EEG
39     # load the data
40
41     numSamples, numRows = 800, 4
42     eegfile = cbook.get_sample_data('eeg.dat', asfileobj=False)
43     print('loading eeg %s' % eegfile)
44     data = np.fromstring(open(eegfile, 'rb').read(), float)
45     data.shape = numSamples, numRows
46     t = 10.0 * np.arange(numSamples, dtype=float)/numSamples
47     ticklocs = []
48     ax = subplot(212)
49     xlim(0, 10)
50     xticks(np.arange(10))
51     dmin = data.min()
52     dmax = data.max()
53     dr = (dmax - dmin)*0.7 # Crowd them a bit.
54     y0 = dmin
55     y1 = (numRows - 1) * dr + dmax
56     ylim(y0, y1)

```