

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20208

研究課題名(和文) 唾液腺癌の悪性度別機能と新たな全身治療の開発

研究課題名(英文) Mechanism and potential new treatment for salivary gland carcinomas.

研究代表者

四宮 瞳 (Shinomiya, Hitomi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70623081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：粘表皮癌において、CRTC1-MAML2キメラ遺伝子は予後良好因子といわれている。EGFRのリガンドの一つであるアンフィレグリン(AREG)はこのキメラ遺伝子の下流標的因子と考えられ、粘表皮癌の成立に寄与していると考えられている。我々は、大唾液腺癌33例のCRTC1-MAML2遺伝子、AREG、EGFRの発現を検討した。23例がキメラ遺伝子陽性、10例が陰性であった。CRTC1-MAML2遺伝子とAREG高発現に相関関係があり($p < 0.01$)、AREG高発現群は無病生存期間が有意に良好であった($p = 0.042$)。AREG高発現と、キメラ遺伝子陽性、予後良好群とに関連を認めた。

研究成果の概要(英文)：In mucoepidermoid carcinoma (MEC), CRTC1-MAML2 fusion indicates a favorable prognosis. Amphiregulin (AREG), an EGFR ligand, has been shown to be a downstream target of CRTC1-MAML2 fusion, and to play a role in tumor growth and survival in CRTC1-MAML2-positive MEC cell lines. The aim of this study was to characterize the AREG and EGFR expression in the fusion positive and -negative MEC of the major salivary gland. AREG and EGFR expression was studied by immunohistochemistry in 33 MEC cases of the major salivary glands. CRTC1-MAML2 fusion was tested by RT-PCR (23 CRTC1-MAML2 fusion-positive, 10 fusion-negative). There was a positive correlation between CRTC1-MAML2 fusion and AREG overexpression ($P < 0.01$). AREG overexpression was associated with a longer disease free survival of the MEC patients ($P = 0.042$). Detection of AREG expression may be useful for identifying CRTC1-MAML2-positive MECs and as a marker for favorable prognosis.

研究分野：唾液腺

キーワード：粘表皮癌 CRTC1-MAML2 AREG EGFR

1. 研究開始当初の背景

唾液腺癌は全悪性腫瘍の0.6%を占め、23種類の多彩な組織型があり同じ組織型でも予後の良悪が混在する。解剖学的部位から顔面神経麻痺をきたしQOLの面で問題になるばかりでなく、リンパ節転移や遠隔転移に対する有効な治療法がない疾患である。唾液腺癌は組織型特異的なキメラ遺伝子陽性例があり、そのなかでも粘表皮癌では*CRTC1-MAML2* キメラ遺伝子陽性例が、陰性例より予後がいいことがこれまでの研究でも明らかとなってきている。しかし、キメラ遺伝子の検査は技術・設備的な制約もある。また、キメラ遺伝子から腫瘍形成までのメカニズムを解析することで今後有用な治療法の開発が求められる。

2. 研究の目的

本研究は、キメラ遺伝子の有無により分子標的薬やホルモン治療のターゲットとなりうる受容体の発現・変異を検討し、新たな全身治療の確立を目的とした。

EGFRのリガンドの1つであるアンフィレグリン(AREG)は、粘表皮癌細胞において*CRTC1-MAML2*の下流標的因子でありEGFRに結合し以下の経路が活性化されることで腫瘍生成・腫瘍生存をきたすと提唱されている。我々は粘表皮癌における*CRTC1-MAML2*、AREG、EGFR発現について臨床情報との相関について検討をおこなった。

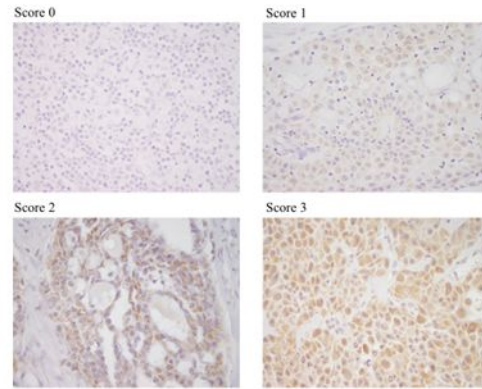
3. 研究の方法

耳下腺・顎下腺腫瘍で初回手術を行い病理組織学的検査で粘表皮癌であった33症例を対象とした。RT-PCR法による*CRTC1-MAML2*の同定、免疫染色によるAREG・EGFR発現の評価を行った。免疫染色でAREG高発現であった3例、低発現であった3例においてAREGの定量RT-PCRを行った。また、唾液腺癌で粘表皮癌以外の組織型についてAREG発現の評価を行った。

4. 研究成果

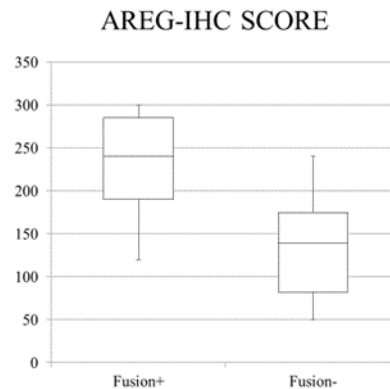
対象症例は、平均年齢55.2歳、男性12例、女性21例であった。耳下腺原発が26例、顎下腺原発が7例であった。T分類別ではT1 10例、T2 10例、T3 8例、T4a 5例であった。N分類ではN0 30例、N2b 3例であった。Stage別ではStageI 10例、StageII 10例、StageIII 7例、StageIV 6例であった。AFIP分類では低悪性15例、中悪性9例、高悪性9例であった。Brandwein分類では低悪性3例、中悪性10例、高悪性20例であった。*CRTC1-MAML2*陽性は23例、陰性は10例であった。免疫染色によるAREG発現は、染色の濃さ(Score0 - 3) × 染色陽性細胞の割合(%)の合算とした(Figure 1)。

Figure 1. AREG IHC scores



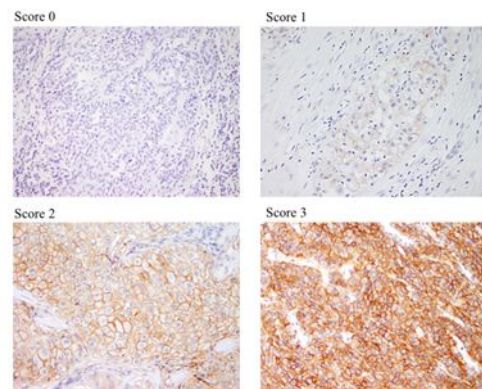
合計スコアが*CRTC1-MAML2*陽性群で平均234.13、*CRTC1-MAML2*陰性群で平均131であった。Fisher検定を用いて*CRTC1-MAML2*陽性陰性両群間のAREGスコアを最も有意に分けるカットオフ値を求めたところ200であった。スコア0~199をAREG低発現、200~300をAREG高発現とした(Figure 2)。

Figure 2. Summary of amphiregulin scores in MEC specimens



免疫染色によるEGFR発現は、ASCO/CAPの乳癌のガイドラインに沿っておこない、Score0、1をEGFR低発現、Score2、3をEGFR高発現とした(Figure 3)。

Figure 3. EGFR IHC scores



23 例の *CRTC1-MAML2* 陽性例のうち、AREG 高発現が 17 例(73.9%)、EGFR 高発現が 14 例(60.9%)であった。10 例の *CRTC1-MAML2* 陰性例のうち、AREG 高発現が 1 例(10%)、EGFR 高発現が 3 例(30%)であった。*CRTC1-MAML2* と AREG 高発現には統計学的に有意な相関があり $P<0.01$ 、*CRTC1-MAML2* と EGFR 高発には有意な相関はなかった(Table 1)。

Table 1. *CRTC1-MAML2* status, patients' characteristics, and

immunohistochemistry of AREG and EGFR.

	<i>CRTC1-MAML2</i> positive (n=23)	<i>CRTC1-MAML2</i> negative (n=10)	P-value
age			
(years) ^a	49.4	68.3	
<60	15	1	0.010 [*]
>60	8	9	
sex			
male	5	7	
female	18	3	0.016 [*]
tumor site			
parotid	18	8	
submandibular	5	2	1.000
tumor size			
<2cm	10	1	0.109
>2cm	13	9	
cT stage			
T1 T2	16	4	
T3 T4	7	6	0.139
cN stage			
N-	22	8	
N+	1	2	0.212
clinical stage			
I II	16	4	
III IV	7	6	0.139
histological grade (AFIP)			
low	14	1	
intermediate	7	2	<0.01 ^b
high	2	7	
histological grade (Brandwein)			
low	3	0	
intermediate	9	1	0.050 ^b
high	11	9	
recurrence metastasis			
none	22	5	
positive	1	5	<0.01 [*]
AREG			
low-expressor	6	9	
high-expressor	17	1	<0.01 [*]
EGFR			
low-expressor	9	7	
high-expressor	14	3	0.141

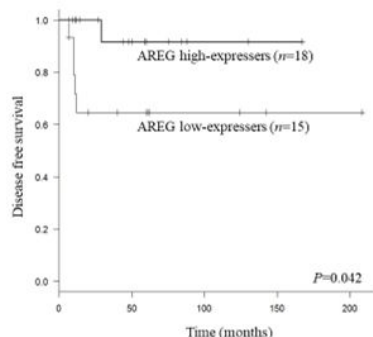
^{*}Average years of the group of the patients, [†] Low and intermediate grade versus

high grade

また、AREG 高発現例は低発現例より無病生存期間が有意に長かった ($P=0.042$) (Figure 4)。

Figure 4. Disease free survival between AREG high-expressers (thick line) and

low-expressers (normal line)

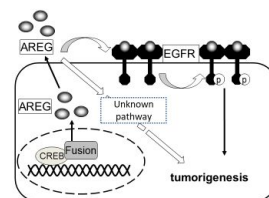


AREG の定量 RT-PCR を免疫染色 AREG 高発現 3 例、低発現 3 例それぞれにおいて行った結果、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ スコアは 146、110、52 と 4.86、

1.95、1 であった。免疫染色による AREG 発現と定量 RT-PCR の結果は相関していた。粘表皮癌以外の組織型での AREG 高発現は、腺様嚢胞癌 2 例(15 例中)、唾液腺導管癌 7 例(9 例中)、多形腺腫由来癌 2 例(12 例中)、腺癌 NOS 0 例(4 例中)、腺房細胞癌 6 例(9 例中)であった。組織型ごとに高発現の率は異なるため、各組織型における AREG の重要性は異なるものと考えた。

AREG 蛋白はまず pro-AREG という膜貫通前駆タンパク質として生成される。pro-AREG はその細胞外ドメインで切断されて soluble AREG となり、この soluble AREG が EGFR に結合して EGFR シグナルが活性化される。最近の論文で pro-AREG の細胞内ドメインが細胞分裂の G2 期から M 期の移行を促進しているとの報告がある (Figure 5)。

Figure 5. Schema of the *CRTC1-MAML2* fusion/AREG/EGFR pathway



CRTC1-MAML2 は *CRTC1* の CREB-binding domain と *MAML2* の transcriptional activation domain 部で結合して構成されている。この融合遺伝子により CREB 経路が持続的に活性化されている。AREG は CREB 標的遺伝子の 1 つであり、EGFR 経路を活性化して粘表皮癌細胞の生成、生存に関与すると *in vitro* と *in vivo* の実験で報告されている。

今回の研究で、AREG 高発現例は *CRTC1-MAML2* キメラ遺伝子陽性例で有意に多くみられたため、AREG は *CRTC1-MAML2* キメラ遺伝子の代替マーカーになりうると思われた。また、*CRTC1-MAML2* 陽性例は従来の報告どおり予後良好例が多かった。

また、AREG 高発現、低発現群における無病生存期間に有意差がでたため、粘表皮癌において AREG 高発現は予後良好の指標になる可能性が示唆された。

CRTC1-MAML2 と AREG には有意な相関を認めたと、*CRTC1-MAML2* と EGFR には相関関係がなかった。諸家の報告で粘表皮癌において EGFR タンパク発現率(58~79%)と EGFR コピー数増加(12.9~18.6%)の不一致は指摘されており原因不明であるが、高悪性粘表皮癌のほうがより EGFR シグナルは活性化されているといわれている。*CRTC1-MAML2* と EGFR に相関関係を認めなかった理由として 3 点考えた。1: EGFR

以下のシグナルが *CRTC1-MAML2* 陽性群ではあまり活性化されていない、2:EGFR を介さないAREG による腫瘍生成経路がある、3:*CRTC1-MAML2* 陰性群では複数の遺伝子異常により多彩なシグナル経路がありEGFR 経路がより活性化されている。他癌においてAREG 高発現例へのEGFR を標的とした分子標的薬治療の効果は有効～効果不良と様々である。*CRTC1-MAML2* 陽性の粘表皮癌ではEGFR を介さない経路での腫瘍生成の可能性があるため、今後AREG を直接標的とした治療法が選択肢になりうるかもしれない。

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3件)

Hitomi Shinomiya, Naoki Otsuki, Daisuke Yamashita, Ken-ichi Nibu: Patterns of lymph node metastasis of parotid cancer *Auris Nasus Larynx* 43: 446-50, 2016. 査読有。

DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.anl.2015.11.002>

Hitomi Shinomiya, Yohei Ito, Mie Kubo, Koichiro Yonezawa, Naoki Otsuki, Shigemichi Iwae, Hiroshi Inagaki, Ken-ichi Nibu: Expression of Amphiregulin in Mucoepidermoid Carcinoma of the Major Salivary Glands: A Molecular and Clinicopathological Study. *Human Pathology* 57: 37-44, 2016. 査読有。

DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.06.016>

耳下腺癌 72 例の臨床的検討。四宮瞳、大月直樹、山下大介、四宮弘隆、手島直則、江島 泰生、清田尚臣、佐々木良平、丹生健一。頭頸部癌。42(1): 51-56, 2016. 査読有。

DOI: <https://doi.org/10.5981/jjhnc.42.51>

[学会発表](計7件)

四宮瞳、伊藤洋平、久保美恵、大月直樹、丹生健一、稲垣宏、粘表皮癌における *CRTC1/3-MAML2* キメラ遺伝子と

Amphiregulin の発現について

Expression of *CRTC1/3-MAML2*

transcripts and amphiregulin in

mucoepidermoid carcinoma 第61回日

本唾液腺学会 東京 2016.12.3

Hitomi Shinomiya, Yohei Ito, Mie Kubo, Naoki Otsuki, Hiroshi Inagaki, Ken-ichi Nibu. Amphiregulin in mucoepidermoid carcinoma of the major salivary gland. 9th International conference on head and neck cancer Seattle, WA 2016.7.16-7.20

四宮瞳、伊藤洋平、久保美恵、米澤宏一郎、大月直樹、岩江信法、稲垣宏、丹生健一、粘表皮癌における *CRTC1-MAML2* キメラ遺伝子とアンフィレグリンの関連について 第40回日本頭頸部癌学会 埼玉 2016.6.9-10

四宮瞳、大月直樹、山下大介、今村善宣、清田尚臣、佐々木良平、丹生健一、Treatment outcome of parotid cancers, 4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology 神戸 2015.6.3-6

四宮瞳、山下大介、大月直樹、丹生健一、耳下腺癌頸部リンパ節転移の検討、第25回日本頭頸部外科学会 大阪 2015.1.29-30

四宮瞳、山下大介、大月直樹、丹生健一、耳下腺粘表皮癌の検討、第38回日本頭頸

部癌学会 東京 2014.6.12-13

四宮瞳、山下大介、大月直樹、丹生健一、
耳下腺粘表皮癌の検討、第 115 回日本耳
鼻咽喉科学会総会・学術総会 福岡
2014.5.14-17

〔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

四宮 瞳 (Shinomiya Hitomi)
神戸大学・医学研究科・医学研究員
研究者番号：70623081

(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

()