

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19089

研究課題名(和文)悪性唾液腺腫瘍におけるTrkB, BDNFの発現と機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of TrkB and BDNF expression and function in malignant salivary gland tumors

研究代表者

近藤 裕介 (KONDO, Yusuke)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：70610070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性唾液腺腫瘍で最も悪性度が高いとされているSalivary duct carcinoma (SDC)に焦点を絞り、TrkB, BDNF, NT-4の解析を行った。その結果、SDCではいずれタンパク質も細胞質に発現を認めた。統計解析では、pT1-3群よりもpT4群で有意にTrkB陽性例が多かった。また、de novo症例よりもex-PA(良性唾液腺腫瘍から二次的に発生したSDC)症例で有意にBDNF陽性例が多かった。NT-4に相関関係や有意差はなかった。mRNAのcopy numberに有意差や相関関係はなかった。TrkB発現の有無がSDCの予後予測に活用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果を基にTrkBを対象とした分子標的治療の樹立が期待できる。SDC治療の第一選択は切除であったが、切除による顔貌の変化や唾液減少による口腔内環境悪化が問題となっている。TrkB分子標的治療が実現できれば、これらの問題が大幅に軽減できる可能性があり、治療後のQOL低下の波及効果が高い。また、SDCのみならず、他の悪性唾液腺腫瘍に対しても応用が期待でき患者利益は大きい。

研究成果の概要(英文)：We analyzed TrkB, BDNF and NT-4 in salivary duct carcinoma (SDC). We found that all proteins expressed in the cytoplasm of SDC. There was high number of TrkB-positive cases in the pT4 group than pT1-3 and BDNF-positive cases in the ex-PA group. There were no significant findings related to NT-4. There were no significant differences or correlation in mRNA copy number. Expression of TrkB may be involved in SDC tumor growth.

研究分野：病理学

キーワード：唾液腺導管癌 TrkB BDNF

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性唾液腺腫瘍では唾液腺導管癌(Salivary Duct Carcinoma; SDC)において Human epidermal growth factor 2 (HER2)の発現が確認され、それがバイオマーカーとなり診断や治療に貢献している。近年、HER2と同型の受容体である Tyrosine kinase receptor B(TrkB)の発現や機能についても様々な腫瘍で研究されはじめた。しかしながら、悪性唾液腺腫瘍にける TrkB の研究報告は極めて少ない。TrkB の発現の有無や機能が唾液腺腫瘍でも明らかとなれば、診断や治療に大きく貢献する可能性があり、それらの解明が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、HER2 の発現が確認されている SDC に焦点を絞り、SDC における TrkB の発現と機能について検討した。また、TrkB のリガンドである Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) と Neurotrophin-4(NT-4)の発現、及び TrkB との相互作用について臨床病理学的観点から解析した。

3. 研究の方法

(1) TrkB, BDNF, NT-4 のタンパク発現の解析

- ①SDC20 例に対して、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから薄切した標本で抗 TrkB 抗体、抗 BDNF 抗体、抗 NT-4 抗体を用いて免疫組織化学を施行した。癌細胞に強く染色されるものを 3+、中等度に染色されるものを 2+、弱く染色されるものを 1+、極めて弱い染色ないしは染色されないものを 0 とした。各症例ごとにそれぞれのスコアの占める面積の割合を測定した。3+と 2+を占める面積の割合を「陽性率」とした。
- ②①の結果と臨床病理学的特徴(年齢、腫瘍サイズ、pT, pN, M, *de novo/ex-PA*)と統計解析を行った。

(2) TrkB, BDNF, NT-4 の mRNA の発現量の解析

- ①SDC20 例に対して、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから全 mRNA 抽出、cDNA 合成を行った。定量 PCR で TrkB, BDNF, NT-4 の mRNA 発現量を解析した。特に TrkB に関しては Full lengths である TrkB-FL のほかに Splicing variant である TrkB-T1 についても解析した。
- ②(1)の結果と統計解析を行った。

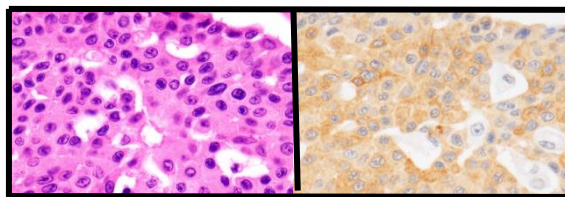
4. 研究成果

(1) TrkB, BDNF, NT-4 のタンパク発現

①発現結果

- 1) TrkB(陽性率 10%以上を陽性とした)では、陰性 10 例、陽性 10 例となった。
平均陽性率は、陰性例は 1.0%で、陽性例は 32.0%であった。TrkB は主に細胞質に陽性となった(Fig. 1)。腫瘍内には heterogeneity があつた。3+を示す癌細胞を認めた症例はなく、陽性症例の最高スコアは 2+であった。

Fig. 1 TrkB の免疫組織化学



- 2) BDNF(陽性率 30%以上を陽性とした)では、陰性 11 例、陽性 9 例となった。
平均陽性率は、陰性例は 9.5%で、陽性例は 63.9%であった。BDNF は細胞質に陽性となった(Fig. 2)。また、多形腺腫(Pleomorphic adenoma, PA)から二次的に発生した ex-PA では SDC 成分の BDNF の結果に関わらず PA 成分は 2+~1+を示した(Fig. 3)。

Fig. 2 BDNF の免疫組織化学

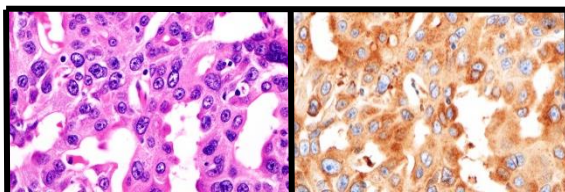
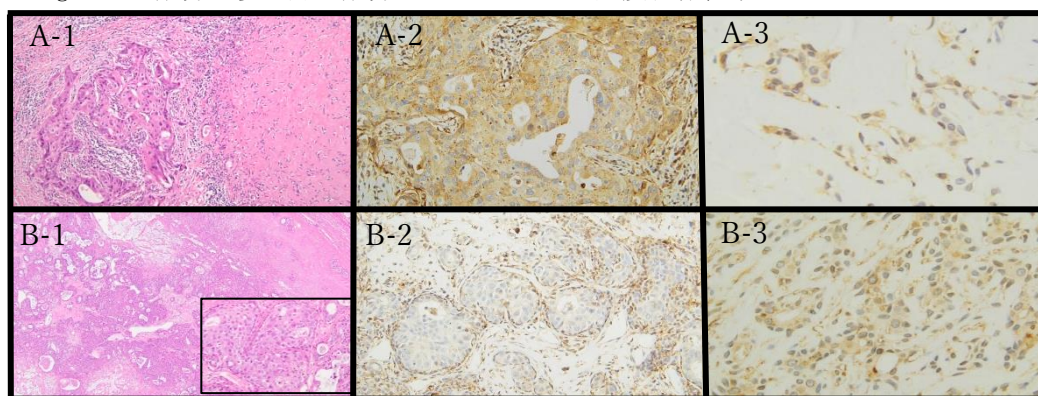


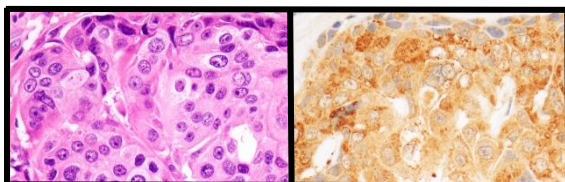
Fig. 3 SDC 成分と多形腺腫成分における BDNF の免疫組織化学



A-1, Case 7 (BDNF 陽性症例) A-2, SDC 成分 A-3 多形腺腫成分
B-1, Case19 (BDNF 陰性症例) B-2, SDC 成分 B-3 多形腺腫成分

3) NT-4(陽性率 30%以上を陽性とした)では、全例陽性となった。平均陽性率は 61.8%であった。NT-4 は細胞質に陽性となった (Fig. 4)。

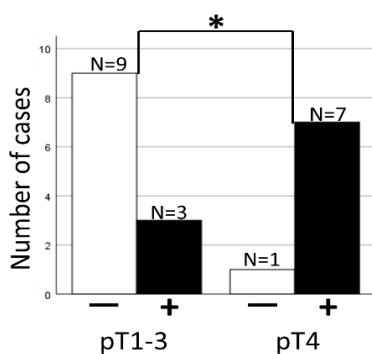
Fig. 4 NT-4 の免疫組織化学



②統計解析

1) TrkB では、pT4 群 (陰性 1 例, 陽性 7 例) の方が pT1-3 群 (陰性 9 例, 陽性 3 例) よりも有意に陽性症例が多かった (* $p=0.010$, Fisher exact test) (Fig. 5)。また、TwoStep クラスタ解析では、TrkB、pT、pN、M で解析すると TrkB の結果を最重要項目として 2 つのクラスタに分類できることが可能であった (Table 1)。

Fig. 5 TrkB と pT 因子



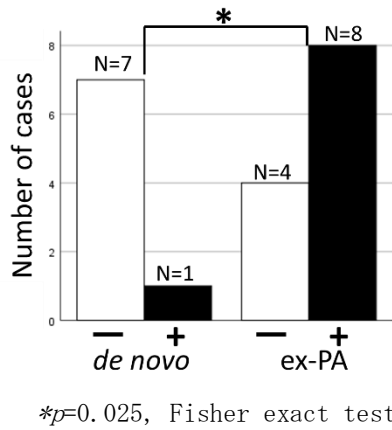
* $p=0.010$, Fisher exact test

Table 1 TrkB の TwoStep クラスタ解析

Importance	Number of case	Cluster 1	Cluster 2	
		10	10	
High	TrkB	+	0	
		-	10	
	pT	pT4a	1	7
		pT3	5	2
		pT2	2	1
		pT1	2	0
pN	N2c	0	1	
	N2b	8	5	
	N1	0	2	
	N0	2	2	
Low	M	M1	0	
		M0	10	

2) BDNF では、ex-PA 群 (陰性 4 例, 陽性 8 例) の方が *de novo* 群 (陰性 7 例, 陽性 1 例) よりも有意に陽性症例が多かった ($p=0.025$, Fisher exact test) (Fig. 6)。

Fig. 6 BDNFと *de novo*/ex-PA



3) NT-4は、いずれも臨床病理学的な関連性はなかった。

(2) TrkB, BDNF, NT-4 の mRNA の発現量の解析

TrkB-FL, TrkB-T1, BDNF, NT-4 のいずれも mRNA の発現を確認した。統計解析では TrkB-FL と T1 の mRNA 発現に有意差はなかった。TrkB-FL, TrkB-T1 のいずれも pT1-3 群と pT4 群では有意差はなかった (Fig. 7)。BDNF mRNA では *de novo* と ex-PA では有意差はなかった (Fig. 8)。いずれの mRNA においても IHC の結果と相関関係はなかった。

Fig. 7 TrkB-FL, T1 mRNA 及び TrkB mRNA と pT 因子

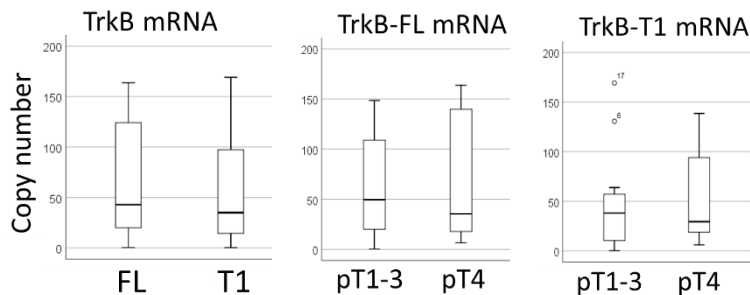
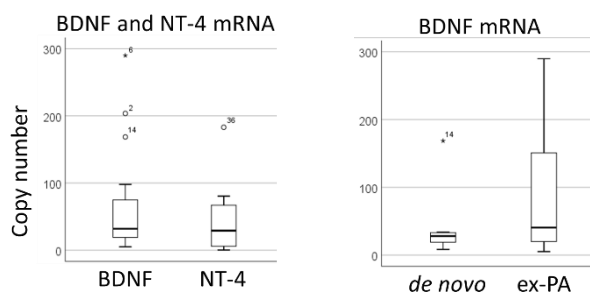


Fig. 8 BDNF, NT-4 mRNA 及び BDNF mRNA と *de novo*/ex-PA



(3) 考察

初めて SDC で TrkB および BDNF と NT-4 の発現が確認され、TrkB が SDC の腫瘍増殖に関与している可能性がある。多形腺腫から二次的に発生した SDC では BDNF が有意に発現しており、*de novo* か ex-PA かの鑑別に有用と考える。TrkB, BDNF, NT-4 のタンパク発現に関しては様々なタンパク発現抑制などを受けている可能性があるが、これに関しては症例数を増やしての再検討や培養細胞など検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤 裕介
2. 発表標題 唾液腺導管癌におけるBDNF, NT-4の発現の意義
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤裕介
2. 発表標題 唾液腺導管癌におけるTrkB発現の意義
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----