

令和元年5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20232

研究課題名（和文）腺様嚢胞癌の神経周囲浸潤に關与する神経栄養因子と免疫逃避機構の解明

研究課題名（英文）Association of Nerve growth factor and Immune escape for Perineural invasion in Adenoid cystic carcinoma

研究代表者

小林 謙也 (Kobayashi, Kenya)

東京大学・医学部附属病院・登録研究医

研究者番号：80648311

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：腺様嚢胞癌37例の分子生物学的特徴を解析した。免疫によるPD-L1発現解析では、21%で陽性細胞10%以上を認め、陽性症例は局所予後不良だった。融合遺伝子解析では、FISHにて51%でMYB-NF1B融合遺伝子、5%でMYBL1-NF1B融合遺伝子と思われるMYB近傍領域とNF1B融合を認めた。免疫にて神経栄養因子/TrkA受容体陽性症例に対し、Trk受容体をコードするNTRK融合遺伝子の発現を期待しRNAseqを施行したがNF1B以外の融合遺伝子は認めなかった。遺伝子発現解析では、頻度の高い変異はSP1, CEP57, DST, FGFR2, KANK1, EPCAM, NOTCH1であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腺様嚢胞癌は外科治療以外に有効治療がない難治性腫瘍である。その理由として、希少癌であること、神経周囲浸潤・遠隔転移を来しやすいこと、有効な薬剤がないことなどが上げられており、腫瘍の分子生物学的特徴の解明は急務である。本研究では、腺様嚢胞癌の免疫逃避機構の関連、予後との相関を明らかにし、発癌に關与する融合遺伝子も検討した。さらに、変異頻度が高い遺伝子を同定したことで、治療開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed molecular biological features of 37 adenoid cystic carcinoma tumor specimens. PD-L1 expression analysis by immunostaining revealed 21% cases are overexpressed PD-L1(positive cell >10%). PD-L1 overexpression was significantly associated with poor local control rate. In FISH analysis, MYB-NF1B fusion gene were detected in 51% cases. To detected novel NTRK (coding Trk receptor) fusion gene, we performed RNA sequencing for Nerve Growth factor/TrkA receptor overexpress tumor, however there were no detection of novel fusion gene. Gene expression analysis of RNA sequencing, high frequent mutation was SP1, CEP57, DST, FGFR2, KANK1, EPCAM, NOTCH1.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：腺様嚢胞癌 MYB-NF1B融合遺伝子 免疫逃避機構 PDL1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唾液腺に生じる腺様嚢胞癌は高悪性度腫瘍であり、癌細胞の神経周囲浸潤により高率に局所再発を生じる。患者の予後改善の大きな支障となっている神経周囲浸潤のメカニズムを解明することにより、治療標的の同定、さらには神経親和性に基づくオーダーメイド治療を樹立できる可能性があるが、現在のところ大きな進展がない状況が続いている。

基礎研究では2009年頃から *MYB-NFIB* 等の腺様嚢胞癌特有の融合遺伝子が報告されるも、残念ながら臨床応用には結びついていない。一方近年、癌細胞が免疫チェックポイントから回避する機構が注目され、臨床応用が実現している。しかし腺様嚢胞癌においては、腫瘍免疫逃避に関する研究は皆無である。

2. 研究の目的

我々は先行研究により、神経栄養因子 (NGF) 及びその受容体 (TrkA) の発現が神経周囲浸潤に関与し、臨床的な予後因子となることを報告した。神経周囲浸潤の更なる分子生物学的メカニズムの解明のため、TrkA 受容体の責任遺伝子である NTRK の解析、さらに癌細胞の免疫逃避機構に関わる PD-L1 等の発現状況を解析し、神経周囲浸潤部における腫瘍免疫逃避の関与を解析する。神経周囲浸潤の分子生物学的メカニズムを明らかにすることで、治療標的の発見、ひいてはオーダーメイド治療に寄与することを目指す

3. 研究の方法

免疫染色による PD-L1 発現解析

パラフィン包埋された腺様嚢胞癌 37 症例の切除標本における、PD-L1 発現評価を免疫染色で行った。抗体は抗 PD-L1/CD274 抗体 (Spring Bioscience SP142) を使用した。陽性細胞が 10%以上で PD-L1 発現と定義した。さらに PD-L1 発現症例における臨床病理学的関係を検討した。

FISH 法による MYB-FNIB 融合遺伝子発現解析

パラフィン包埋された腺様嚢胞癌 37 症例の切除標本における、MYB-FNIB 融合遺伝子発現解析をおこなった。MYB プロブはセントロメア側が BAC クローン RP11-737N13、テロメア側が RP11-170P19 を、NFIB プロブはテロメア側が RP11-413D24 を使用し、Nick Translation 法によりそれぞれ FITC、Dig 及び Cy3 で標識して作成した。

RNAsequencing による融合遺伝子の検索、遺伝子発現解析

免疫染色で NGF/TrkA 系の過剰発現を認めた代表的な 10 例において、パラフィン包埋切片から RNA を抽出、Illumina RNA Pan-Cancer Panel を使用して、1385 のがん遺伝子の変異融合をターゲットして解析を行った。全ゲノム領域をターゲットとすると非効率的であるため、コスト削減のため、Sequence capture 法を用いて、ターゲットゲノム領域を濃縮してシーケンスを行った。

4. 研究成果

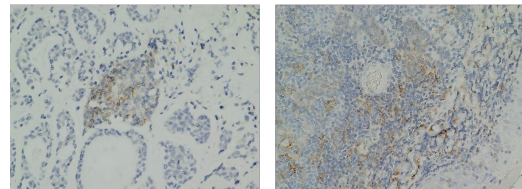
免疫染色による PD-L1 発現解析

PD-L1 の陽性細胞 0% は 49%、1~9% は 30%、10~29% が 16%、30%~が 5%であった。10%以上の細胞が陽性であった症例を PD-L1 発現と定義すると、ACC の約 20%で PD-L1 が発現していることが分かった。

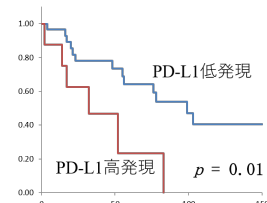
PD-L1 発現症例と神経周囲浸潤 (有 vs 無) 病理組織型 (充実型 vs 非充実型) で関連性は認めなかった。予後に関しては、PD-L1 高発現症例では統計学的に有意に局所制御率が低く、多変量解析でも独立した局所再発因子であった (HR 2.96, 95%CI 1.07-8.15)。

FISH 法による MYB-FNIB 融合遺伝子発現解析

代表的な PD-L1 陽性症例の免疫所見

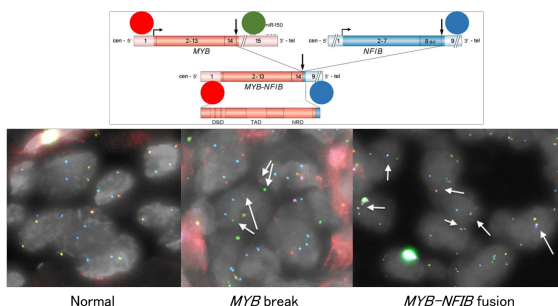


PD-L1 発現と局所制御率



FISHにて51%でMYB-NFIB融合遺伝子を、5%でMYBL1-NFIB融合遺伝子と思わるMYB近傍領域とNFIB融合を認めた。免疫染色にてMyb陽性であった症例で有意にMYB-NFIB融合遺伝子の発現を認めた(70% vs 7% p=0.001)。しかしながら、MYB融合遺伝子と、神経周囲浸潤、病理組織型、予後との相関は認めなかった。

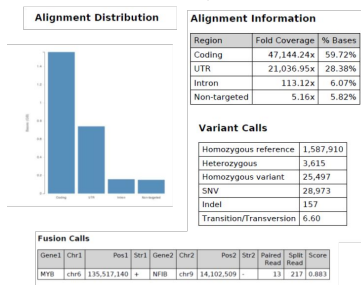
FISHによるMYB-NFIB融合遺伝子の検出



RNAseqによる融合遺伝子の検索、遺伝子発現解析

免染にてNGF/TrkA陽性症例に対し、NTRK融合遺伝子の発現を期待しRNAseqを施行したがNFIB以外の融合遺伝子は認めなかった。RNAseqによる遺伝子発現解析では、頻度の高い変異はSP1, CEP57, DST, FGFR2, KANK1, EPCAM, NOTCH1であった。

融合遺伝子陽性の一例



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

[Kobayashi Kenya](#), Yoshimoto S, Matsumoto F, et al. All-exon TP53 sequencing and protein phenotype analysis accurately predict clinical outcome after surgical treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2019. Epub ahead of print.

[Kobayashi Kenya](#), Matsumoto F, Miyakita Y, et al. Impact of Surgical Margin in Skull Base Surgery for Head and Neck Sarcomas. *J Neurol Surg B*. 2018;79(5):437-444.

[Kobayashi Kenya](#), Mori T, Matsumoto F, et al. Impact of microscopic orbital periosteum invasion in orbital preservation surgery. *Jpn J Clin Oncol*. 2017;47(4):321-327.

[Kobayashi Kenya](#), Matsumoto F, Kodaira M, et al. Significance of delayed primary excision in localized nonmetastatic adult head and neck rhabdomyosarcoma. *Cancer Med*. 2016;5(10):2708-2714.

[学会発表](計 12件)

Risk factors for delayed surgical recovery and massive bleeding in skull base surgery. [Kenya Kobayashi](#) et al. the 6th Asian society of head and neck oncology Korea 2019.

Combined p53 analysis with gene sequencing and immunostaining for head and neck cancer. [Kenya Kobayashi](#) et al. the 119th annual meeting of the ORL Society Japan 2018.

Clinical impact of combined p53 analysis with gene sequencing and immunostaining for head and neck squamous cell carcinoma. [Kenya Kobayashi](#) et al. 17th Korea-Japan Joint Meeting ORL-HNS 2018.

Impact of p53 status in surgical treatment of head and neck squamous cell carcinoma. [Kenya Kobayashi](#) et al. 5th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology 2017

Significance of surgery for head and neck sarcoma with skull base invasion. [Kenya Kobayashi](#) et al. 7th international congress of the World Federation of Skull Base Societies 2016.

[小林謙也](#) 他 当科における頭蓋底手術の切除および断端評価の工夫 第28回日本頭頸部外科学会 2019年

[小林謙也](#) 他 予後不良なTP53ミスセンス変異の検討 第42回頭頸部癌学会 2018年

[小林謙也](#) 他 当科における頭蓋底手術の工夫 第28回日本頭頸部外科学会 2018年

小林謙也 他 免疫染色とシーケンスの併用による p53 機能分類第 41 回頭頸部癌学会
2017 年

小林謙也 他 頭頸部扁平上皮癌の外科治療における p53 免疫染色の意義 第 27 回日本頭
頸部外科学会 2017 年

小林謙也 他 当院における頭蓋底浸潤を伴う肉腫の治療戦略 第 40 回頭頸部癌学会
2016 年

小林謙也 他 下顎骨浸潤を伴う口腔扁平上皮癌の臨床病理学的検討 第 26 回日本頭頸部
外科学会 2016 年

〔図書〕(計 1 件)

頭頸部間葉系腫瘍に対する化学療法 小林謙也 JOHNS Vol.34 No8 2018

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：安藤瑞生
ローマ字氏名：Ando Mizuo

研究協力者氏名：近藤健二
ローマ字氏名：Kondo Kenzi

研究協力者氏名：吉田昌史
ローマ字氏名：Yoshida Masahumi

研究協力者氏名：齊藤祐毅
ローマ字氏名：Saito Yuki

研究協力者氏名：小村豪
ローマ字氏名：Omura Go

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。