

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15647

研究課題名(和文)唾液腺腺様嚢胞癌における遺伝子学的異常とその臨床病理学的意義

研究課題名(英文) Genetic mutation and their clinicopathological significance in salivary gland adenoid cystic carcinoma

研究代表者

津田 香那 (Tsuda, Kana)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：60790756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺癌の中でも高頻度で、長期予後不良な腺様嚢胞癌(AdCC)において、我々はMYC蛋白高発現症例が、MYB-NF1B融合遺伝子を有する症例と相関し、遠隔転移や腫瘍再発のリスク因子である可能性を提唱した。そのため、MYC蛋白高発現を示すAdCC症例に対し、FISH法でMYC遺伝子増幅の有無を検討したが、有意な相関は認めなかった。また我々は多施設共同研究として約200例のAdCCを蒐集した。これらを対象に次世代シーケンサー(NGS)による網羅的解析を行う前段階として、遺伝子異常の報告の多い唾液腺導管癌でNGSを行った。その結果、ERBB4、NPM1、TP53、RET等の遺伝子異常を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺悪性腫瘍は比較的稀な疾患であり、多彩な病理像を示すため、病理診断においても苦慮する症例が多く存在する。発生頻度は稀であるが、予後不良である悪性腫瘍も多い。その中で最も代表的な組織型の一つである唾液腺腺様嚢胞癌(AdCC)は診断に苦慮するのみならず、明確な治療法も確立されていない。本研究によってAdCCを含めた唾液腺悪性腫瘍における臨床病理学的意義や新たな治療法の確立につながる可能性も考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adenoid cystic carcinoma (AdCC) is one of the most common salivary gland malignancies. AdCC patients show a variable clinical course, but the long-term prognosis is poor. We showed that in AdCC cases, MYC protein overexpression correlated with the present of MYB-NF1B fusion gene and could be a risk factor for distant metastases and tumor recurrence. Therefore, we examined the amplification of MYC gene by FISH in AdCC cases with MYC protein overexpression, but no significant correlation was observed.

We also collected about 200 AdCCs in multi-institutional joint research. We performed a next-generation sequencer analysis in salivary duct carcinomas (SDCs), which many gene mutations have been reported. As a preliminary study before performing a comprehensive analysis of AdCCs, we examined SDC cases using a next-generation sequencer. As a result, gene mutations such as ERBB4, NPM1, TP53, and RET were found in 20 to 30% of SDC cases.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：唾液腺悪性腫瘍 唾液腺腺様嚢胞癌 FISH法

1. 研究開始当初の背景

唾液腺悪性腫瘍は比較的稀な疾患であり、多彩な病理像を示すため、病理学的診断が困難な症例も多く存在する。申請者らは、唾液腺悪性腫瘍の中でも最も頻度が高い腫瘍の一つであり、長期予後不良である腺様嚢胞癌(AdCC)について研究を行ってきた。AdCCにおいては、2009年に本腫瘍に特異的な遺伝子転座である *MYB-NFIB* 融合遺伝子が報告され^[1]、2016年に *MYBL1-NFIB* 融合遺伝子が報告された^[2]。申請者らは、これらの報告に基づき、FISH法によってAdCCにおける *MYB*、*MYBL1*、*NFIB* の遺伝子異常が持つ臨床病理学的意義や予後に与える影響を検討した。その結果、約90%の症例において、*MYB*、*MYBL1*、*NFIB* のいずれかの遺伝子分離を認め、さらにAdCCは *MYB-NFIB*、*MYB-X*、*MYBL1-NFIB*、*MYBL1-X*、*NFIB-X*、遺伝子異常陰性の6つのグループに分類することが可能であると提唱した。*MYB* 遺伝子分離陽性を示すAdCC(*MYB-NFIB*又は*MYB-X*症例)とその他の症例を比較したところ、前者は腫瘍の局所浸潤性と関連する可能性があることを明らかにした^[3]。

AdCCは *MYB-NFIB* 融合遺伝子の形成によって *MYB* 遺伝子が活性化し、細胞周期制御、アポトーシス、細胞増殖に関連した機序の異常で発生すると考えられている。しかし申請者らが行った研究の中で、*MYB-NFIB* 融合遺伝子陰性症例においても、*MYB* 蛋白の高発現が認められ、融合遺伝子陽性・陰性症例における共通した標的遺伝子の存在が想定された。申請者らは、*MYB* 遺伝子と関連がある *MYC* 遺伝子に注目し、その発現を予備的に検討したところ、*MYC* 蛋白の高発現症例は *MYB-NFIB* 融合遺伝子と相関し、遠隔転移や腫瘍再発のリスクを予測する予後因子である可能性が得られた^[3]。申請者らはAdCCにおける *MYC* 遺伝子異常の意義についてさらに検討が必要であると考えた。

また、申請者らはAdCCにおける他の遺伝子変異の臨床病理学的意義や *MYB family* 遺伝子、*MYC* 遺伝子異常を持つ症例との関連を考察するため、より多くの症例を対象として、既に癌と関連するといわれている他の遺伝子の変異の有無を網羅的に検索する必要があると考えた。

2. 研究の目的

- (a) 唾液腺腺様嚢胞癌における *MYC* 遺伝子の解析
- (b) 腺様嚢胞癌を含む唾液腺悪性腫瘍における次世代シーケンサーを用いた網羅的解析
- (c) 200例の唾液腺腺様嚢胞癌における遺伝子解析

3. 研究の方法

(a) 唾液腺腺様嚢胞癌における *MYC* 蛋白と *MYC* 遺伝子の解析

対象は蒐集された70例のAdCCのうち、*MYC* 蛋白の免疫組織化学染色が可能であった55例とした。*MYC* 蛋白発現の評価方法は、*MYC* 蛋白陽性細胞が全腫瘍細胞の50%未満を弱陽性、50%以上を強陽性とした。*MYC* 蛋白は主に一部の正常リンパ球や基底細胞が陽性となるため、これらの細胞を陽性コントロールとして評価した。免疫組織化学染色に用いられた *MYC* 抗体は Y69 を使用した。

MYC 蛋白高発現を示す症例においては、その発現が経路上流からのシグナルによる以外に *MYC* 遺伝子そのものの増幅が関与している可能性があるため、*MYC* 遺伝子(8q24)と *CEP 8* Control probe を用いて FISH 解析を行い、*MYC/CEP8* 比から遺伝子増幅を検討した。蛍光色素はローダミン(赤)、FITC(緑)を用いた。

(b) 腺様嚢胞癌を含む唾液腺悪性腫瘍における次世代シーケンサーを用いた網羅的解析

(c) 200例の唾液腺腺様嚢胞癌における遺伝子解析

申請者らは、次世代シーケンサーによる解析に AmpliSeq for Illumina Cancer Hotspot Panel v2 を使用した。これにより、Catalogue of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) データベースで同定された既知の癌関連50遺伝子(表1)のホットスポット領域を迅速かつ高精度に探索することが可能であった。

申請者らは約200例のAdCC症例を蒐集し、これらを解析対象として行う予定であったが、これらの中には貴重な症例も多く存在することから、AdCCの解析を行う前段階として、遺伝子異常が多く報告されている唾液腺導管癌(SDC)の35例を対象とし、次世代シーケンサーによる網羅的解析を行った。

ABL	BRAF	EGFR	FGFR1	GNAS	JAK2	KRAS	NPM1	PTPN11	SMO
AKT1	CDH1	ERBB2	FGFR2	GNAO	JAK3	MET	NRAS	RB1	SRC
ALK	CDKN2A	ERBB4	FGFR3	HNF1A	IDH2	MLH1	PDGFRA	RET	STK11
APC	CSF1R	EZH2	FLT3	HRAS	KDR	MPL	PIK3CA	SMAD4	TP53
ATM	CTNNB1	FBXW7	GNA11	IDH1	KIT	NOTCH1	PTEN	SMARCB1	VHL

4. 研究成果

(a) 唾液腺腺様嚢胞癌における MYC 蛋白と MYC 遺伝子の解析

55 例の AdCC のうち、弱陽性は 25 例、強陽性は 30 例であった。これに対し、年齢、性別、原発部位、組織型、病理学的ステージの臨床病理学的意義における統計学的解析を行った結果、有意な相関はみられなかった。

申請者らは、さらに強陽性を示した 30 例に対して、遺伝子の増幅を FISH 法で行った。そのうち FISH 法が可能であった 15 例の結果は、増幅を確認できた症例が 1 例、増幅を確認できなかった症例が 14 例であった。

AdCC における MYC 遺伝子増幅に関しては、実施した症例数も少ないため、プローブを変更して更なる検討が必要だと考えられるが、MYC 蛋白過剰発現の機序として、経路上流からのシグナルによる可能性も考えられる。MYC を標的とする *Notch1* や *Wnt* シグナルとの関連性などについて、今後検討する必要があると考える。

また、AdCC における MYC 蛋白過剰発現が、AdCC 特有のものであるかを検証するため、他の唾液腺悪性腫瘍を対象に、MYC 蛋白発現の有無を検討していく。

(b) 腺様嚢胞癌を含む唾液腺悪性腫瘍における次世代シーケンサーを用いた網羅的解析

(c) 200 例の唾液腺腺様嚢胞癌における遺伝子解析

申請者らは多施設との共同研究の事務局として、約 200 例の唾液腺腺様嚢胞癌を蒐集し、これらのデータ管理を行っている。今回、これらに対する遺伝子異常の解析を行うための前段階として、遺伝子異常が多く報告されている唾液腺導管癌 (SDC) を対象として網羅的解析を行った。名古屋市立大学病院で手術を行った SDC の 35 例のうち、20 例に何らかの遺伝子異常が明らかとなった。最も多い遺伝子異常は *ERBB4* で 12 例 (34%) に見られた。次いで、*NPM1* が 10 例 (29%)、*TP53* および *RET* が 8 例 (23%)、*CSF1R* および *FLT3* が 6 例 (17%)、*HRAS* が 5 例 (14%) に確認された (表 2)。

ERBB4 は *EGFR* や *ERBB2(HER2)* とともに ErbB 受容体チロシンキナーゼファミリーの一つであり、細胞の分化や増殖に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。Ku ら^[4]の報告によると、SDC において *ERBB4* を含めた *EGFR* や *ERBB2(HER2)* という同一ファミリーの遺伝子異常が次世代シーケンサーによる網羅的解析においても報告されているが、申請者らの研究結果においては、*ERBB4* の遺伝子異常は多数の症例でみられたが、*EGFR* の遺伝子異常を認める症例は少数であり、*ERBB2(HER2)* の遺伝子異常を認める症例はみられなかった。

その他の遺伝子異常においては、*TP53* や *HRAS* は他の報告と同程度の割合で遺伝子異常を持つ症例が確認された。*FLT3*、*RET* においては、対応する分子標的薬が存在する遺伝子異常であり、SDC におけるこれらの遺伝子異常についての報告は、*RET* の遺伝子異常を持つ症例が報告されている^[5]が、少数例のみであり、その臨床病理学的意義などは申請者の知る限りはいまだ明確になっていない。

次世代シーケンサーによる解析は比較的最新の遺伝子解析技術であり、その正確性については一度の解析により得られた結果のみでは不十分と考えている。そのため、今後、これらの結果に対してサンガー法等による結果の整合性の確認や二度目の次世代シーケンサーによる解析を行う予定である。また、本研究を行うことで得られた手技や問題点を元に、約 200 例の AdCC における遺伝子異常の網羅的解析を行う予定である。今後 AdCC を含めた唾液腺悪性腫瘍の遺伝子異常を検索していくことで、新たな臨床病理学的意義や治療法の確立につながる可能性があると考えられる。

参考文献

- [1] Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:18740-4. [2] Cancer Discov. 2016;6:125-7.
[3] Histopathology 2017 Nov;71(5):823-834. [4] J. Transl Med. 2014 Oct 25;12:299
[5] Clin Cancer Res. 2016 Dec 15;22(24):6061-6068

	申請者 (症例数)	(%)	Bo Mi Ku ら ^[4]	(%)
<i>CSF1R</i>	6	17.10	0	0
<i>EGFR</i>	2	5.70	4	10.80
<i>ERBB2</i>	0	0	4	10.80
<i>ERBB4</i>	12	34.30	4	10.80
<i>FLT3</i>	6	17.10	1	2.70
<i>HRAS</i>	5	14.30	4	10.80
<i>KIT</i>	1	2.90	11	29.70
<i>KRAS</i>	0	0	3	8.10
<i>MET</i>	1	2.90	5	13.50
<i>NPM1</i>	10	28.60	0	0
<i>PIK3CA</i>	3	8.60	9	24.30
<i>PTEN</i>	3	8.60	5	13.50
<i>RET</i>	8	22.90	2	5.40
<i>SMAD4</i>	1	2.90	4	10.80
<i>STK11</i>	1	2.90	4	10.80
<i>TP53</i>	8	22.90	17	45.90

表 2 次世代シーケンサーによる網羅的解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Beppu S, Ito Y, Fujii (Tsuda) K, Saida K, Takino H, Masaki A, Murase T, Kusafuka K, Iida Y, Onitsuka T, Yatabe Y, Hanai N, Hasegawa Y, Ijichi K, Murakami S, Inagaki H.	4. 巻 71(2)
2. 論文標題 Expression of cancer/testis antigens in salivary gland carcinomas with reference to MAGE-A and NY-ESO-1 expression in adenoid cystic carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 305-315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.13226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ito Y, Fujii (Tsuda) K, Murase T, Saida K, Okumura Y, Takino H, Masaki A, Beppu S, Kawakita D, Ijichi K, Inagaki H	4. 巻 67(6)
2. 論文標題 Striated duct adenoma presenting with intra-tumoral hematoma and papillary thyroid carcinoma-like histology.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 316-321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujii (Tsuda) K, Murase T, Beppu S, Saida K, Takino H, Masaki A, Ijichi K, Kusafuka K, Iida Y, Onitsuka T, Yatabe Y, Hanai N, Hasegawa Y, Inagaki H.	4. 巻 71(5)
2. 論文標題 MYB, MYBL1, MYBL2 and NF1B gene alterations and MYC overexpression in salivary gland adenoid cystic carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 823-834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.13281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saida K, Murase T, Ito M, Fujii (Tsuda) K, Takino H, Masaki A, Kawakita D, Ijichi K, Tada Y, Kusafuka K, Iida Y, Onitsuka T, Yatabe Y, Hanai N, Hasegawa Y, Shinomiya H, Nibu K, Shimozato K, Inagaki H	4. 巻 9(24)
2. 論文標題 Mutation analysis of the EGFR pathway genes, EGFR, RAS, PIK3CA, BRAF, and AKT1, in salivary gland adenoid cystic carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 17043-17055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤井（津田）香那、別府慎太郎、齋田昂佑、滝野寿、正木彩子、村瀬貴幸、伊地知圭、草深公秀、
2. 発表標題 唾液腺腺様嚢胞癌におけるMYB、MYBL1、MYBL2、NFIBのFISH解析による検討
3. 学会等名 第61回日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kana Fujii (Tsuda), Shintaro Beppu, Kosuke Saida, Hisashi Takino, Ayako Masaki, Takayuki Murase,
2. 発表標題 Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: MYB, MYBL1, and NFIB fusions and clinical characteristics
3. 学会等名 5th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井（津田）香那、村瀬貴幸、齋田昂佑、坂本祐真、榊原健夫、滝野寿、正木彩子、稲垣宏
2. 発表標題 唾液腺腺様嚢胞癌におけるMYB/MYBL1遺伝子異常とMYC 蛋白発現
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----