

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09309

研究課題名(和文) 高悪性度唾液腺癌に対する網羅的遺伝子解析による新規治療標的分子の発見

研究課題名(英文) Genetic analysis for high grade salivary gland cancer

研究代表者

加納 里志 (Kano, Satoshi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：00374421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺導管癌における遺伝子発現様式は免疫染色に基づいた唾液腺導管癌の分類に一致していた。VEGFA、ERBB2(HER2)、IGF1R、RB1、XBP1はde novo発癌より多形腺腫由来癌で発現が高かった。一方、SLIT2、PTENはde novo発癌より多形腺腫由来癌で発現が低かった。これらの遺伝子の機能は血管新生やAKT/PI3Kシグナル経路に集中していた。複数の機械学習法を用いて解析した結果、VEGFAが唾液腺導管癌の多形腺腫由来とde novo発癌の間における特徴的な違いを示す遺伝子の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高悪性度癌の一つである唾液腺導管癌の新しい発現メカニズムの一端を解明できた。唾液腺導管癌の発癌メカニズムにおいてVEGFAの関与に関する報告は過去にはなく、今後の治療薬開発へつながる新知見である。唾液腺導管癌はde novo型発症と多形腺腫由来型発症があるが、その内、多形腺腫由来型で特にVEGFRの高発現が認められていることから、これまでその原因が不明であった、多形腺腫の悪性化の解明にもつながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The gene expression pattern was generally consistent with the corresponding immunostaining classification. The expression levels of VEGFA, ERBB2(HER2), IGF1R, RB1, and XBP1 were higher, while those of SLIT2 and PTEN were lower in Ca-ex-PA than in de novo. The functions of those genes were concentrated in angiogenesis and AKT/PI3K signaling pathway. Multiple machine learning methods show that VEGFA can be a candidate for the characteristic differences between Ca-ex-PA and de novo.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：頭頸部癌 唾液腺癌 唾液腺導管癌

1. 研究開始当初の背景

唾液腺癌の病理組織型は非常に多く、2017年の新WHO分類では23種類にも及ぶ。ところが、病理組織型が多岐にわたるにもかかわらず治療は画一的であり、唾液腺癌の標準治療は手術と術後放射線治療である。悪性度も様々であり、特に高悪性度に分類される唾液腺癌は再発・転移が多い。しかし、唾液腺癌は総じて放射線感受性が低く、有効な化学療法も確立していない。そのため再発・転移が生じた場合、それが外科的に摘出困難であれば次に行うべき救済治療がないというのが現状であった。

我々は、高悪性度唾液腺癌の一つである唾液腺導管癌におけるHER2分子の特異的な発現に注目し、唾液腺導管癌の約40%にHER2分子が過剰発現していることを発見した。さらに、唾液腺導管癌が稀少癌であるため、多施設による研究グループを立ち上げて症例を集積し、152例に関して後方視的に解析したところ、頸部リンパ節転移が臨床的な予後因子であることを発見した。また、免疫組織染色により、HER2分子は良性腫瘍である多形腺腫からの唾液腺導管癌への悪性化に関与し、さらにアンドロゲン受容体とサイトケラチン5/6、p53が予後因子であることを世界で初めて発見した。これら一連の研究結果をもとに、「再発転移のHER2陽性唾液腺癌に対する抗HER2抗体(トラスツズマブ)とドセタキセルによる併用薬物療法」の第2相臨床試験を医師主導で行った。

しかし、HER2陰性の高悪性度唾液腺癌に対しては、依然として有効な薬物療法は存在しない。本研究で解析する病理組織型は、唾液腺癌の中でも比較的高頻度で悪性度が高い、唾液腺導管癌、腺様嚢胞癌、粘表皮癌である。腺様嚢胞癌ではc-kit分子の過剰発現が報告されているが、c-kitに対する分子標的薬の臨床試験では有効性が示されなかった。粘表皮癌では融合遺伝子の関与が報告されているが、予後良好群での発現が多く、治療標的分子には適さない。また、世界的にも唾液腺癌の細胞株がないため、細胞株を用いた基礎的な実験データが絶対的に不足しており、癌細胞内でのシグナル伝達や発癌のメカニズムが不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では、高悪性度唾液腺癌組織を用いて、網羅的に遺伝子変異や発現プロファイル解析し、HER2に続く新たな治療標的分子を同定し、さらに唾液腺癌細胞株の樹立とそれを用いた基礎的な裏付け実験を行い、最終的には新たな治療方法の開発を目指している。

3. 研究の方法

高悪性度唾液腺癌組織の臨床検体(ホルマリン固定および凍結標本)からDNA、RNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子変異プロファイル解析および遺伝子発現プロファイル解析を行う。臨床検体での結果を裏付けるための基礎実験を行うため、高悪性度唾液腺癌の新鮮腫瘍検体を用いて唾液腺癌細胞株を樹立する。

4. 研究成果

唾液腺導管癌症例における、保存検体を用いてDNAおよびRNAの遺伝子変異および遺伝子発現解析を行った。遺伝子変異に関しては有意な結果が得られなかったが、遺伝子発現に関しては、遺伝子発現プロファイルによりサブタイプングマーカー遺伝子計84遺伝子のうち、9つの遺伝子AR(Androgen receptor), ERBB2(Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2), ESR1(Estrogen Receptor 1), GATA3(GATA binding protein 3), GLI1(GLI family zinc finger 1), GRB7(Growth factor receptor-bound protein 7), KRT18(Keratin 18), KRT19(Keratin 19), SLC39A8(Solute carrier family 39, member 6), TFF3(Trefoil factor 3), VEGFA, XBP1(X-box binding protein 1)でDi Palma分類間(過去に報告されている免疫染色に基づいた唾液腺導管癌の分類。HER2-positive群、Luminal-AR群、Basal-like群の3つに分類されている)における遺伝子発現の有意差を認めた。さらに、我々は、ランダムフォレスト法を用いて、Di Palma分類に寄与した説明変数の重要度の推定を通して、遺伝子発現レベルにおけるDi Palma分類の免疫染色マーカーに対応する遺伝子(HER2, AR等)の分類マーカーとしての妥当性について検討した。その結果、変数重要度の上位2遺伝子はHER2, ARであった。ランダムフォレストは決定木を用いた分類モデルであることを考えると、上記結果はDi Palma分類アルゴリズムと合致するものであり、

Di Palma 分類が遺伝子発現プロファイルを適切に反映することを強く支持する結果と考えられた。

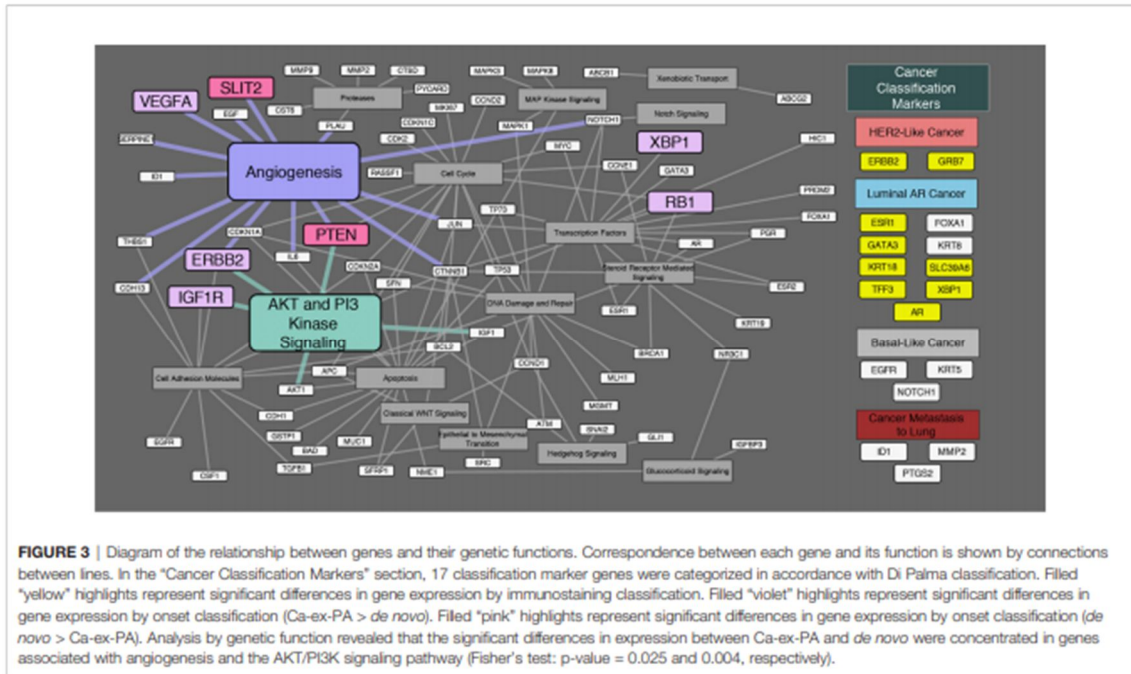
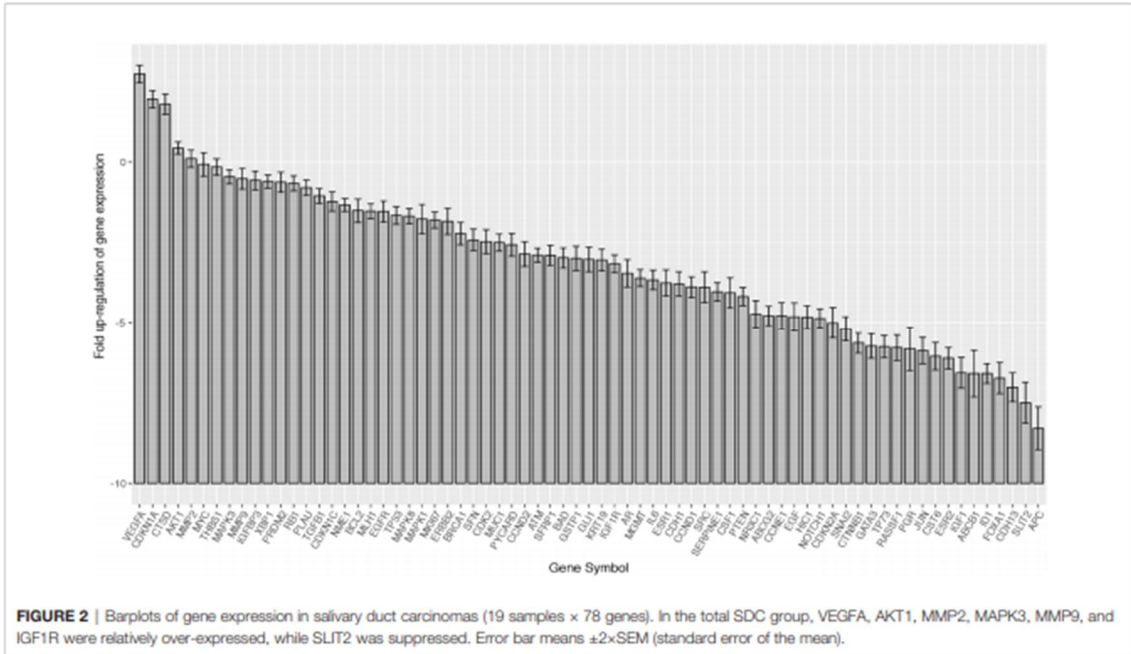
クラスター解析(ヒートマップ)による分類においては、発症様式(de novo型/多形腺腫由来型)間で遺伝子発現プロファイルの相違が示唆された(Fisher's exact test: p-value = 0.046)。各遺伝子ごとの de novo 型、多形腺腫由来型間比較検討では、ERBB2, IGF1R (Insulin-like growth factor 1 receptor), PTEN (Phosphatase and tensin homolog), RB1 (Retinoblastoma 1), SLIT2, VEGFA, XBP1 で遺伝子発現の有意差を認めた。ERBB2, IGF1R, RB1, VEGFA, XBP1 は、多形腺腫由来型優位に遺伝子発現を認め、PTEN, SLIT2 は de novo 型優位の遺伝子発現であった。有意差の見られた遺伝子は主に、血管新生および AKT/PI3K シグナルに關与する遺伝子である(血管新生: VEGFA, ERBB2, PTEN, SLIT2, AKT/PI3K シグナル: ERBB2, IGF1R, PTEN)。血管新生に關しては、VEGFA, ERBB2 は促進的に關与し、PTEN, SLIT2 は抑制的に作用することが知られている。また AKT/PI3K シグナルに關しては ERBB2, IGF1R は促進的に關与し、PTEN は抑制的に作用することが知られている。このことより、多形腺腫由来型は de novo 型に比して AKT/PI3K シグナルおよび血管新生のパスウェイが活性化されている可能性が示唆される。さらには、ランダムフォレスト解析においても、MeanDecreaseGini 係数において VEGFA は相対的高値を示しており、発症様式(de novo 型/多形腺腫由来型)間相違において VEGFA が重要な役割を担っている可能性が示唆される。

VEGF ファミリーは血管新生を誘導する最も重要な因子と考えられている。VEGF ファミリーは、VEGF A, B, C, D および血管内皮細胞増殖因子(placental growth factor: PlGF)で構成される。とりわけ VEGFA は、VEGF 受容体 2 型(VEGFR2)を介して、血管内皮細胞に対して、血管透過性の増強、血管新生の誘発、脈管形成および内皮細胞増殖の誘導、細胞遊走の促進およびアポトーシスの阻害等の、血管新生において主要な役割を担うとされている。また、VEGF はこれまでに数多くの癌腫において高発現が報告されており、非小細胞肺癌や腎細胞癌では、VEGF 高発現が再発、転移、生命予後と相関すると報告されている。

AKT/PI3K シグナルパスウェイは、種々の癌種において高頻度に活性化される細胞内シグナル伝達経路であり、血管新生ならびに増殖、接着、移動、浸潤、代謝および生存を含む多数の細胞機能において重要な役割を果たすことが知られている。PI3K 活性化は、主に RAS 突然変異、PTEN 欠損、または ERBB2 (HER2), EGFR, IGF1R, VEGFA のような増殖因子受容体の発現増加によって生じる。一方、腫瘍細胞における AKT/PI3K 経路の活性化は、HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1)依存性に、もしくは HIF-1 とは独立した別の機構によって、VEGFA 分泌を促進することが知られている。したがって、VEGFA は、種々の癌において AKT/PI3K/VEGFA 経路を介して自律的増殖を引き起こすとされ、「自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループ」として報告されている。本研究においても、唾液腺導管癌(de novo 型/多形腺腫由来型)双方で VEGFA, AKT1 において高い遺伝子発現レベルが観察されており、このことは唾液腺導管癌においても「自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループ」の可能性を示唆している。さらに多形腺腫由来型においては、de novo 型に比して有意に ERBB2 の高発現を認めることより、より一層「自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループ」が亢進している可能性がある。PI3K を負に調節する PTEN は、生体内環境のホメオスタシスの維持にとって不可欠であることが判明している。PTEN は種々の癌において高頻度に DNA 変異が認められ、p53 と並ぶがん抑制遺伝子の代表格に位置づけられる。生化学的には、PTEN の主な基質は PIP3 であり、PIP3 の D3 位を脱リン酸化することで PI3K/AKT シグナル伝達経路を負に調節する。また PTEN は血管新生に対しても抑制的に作用し、PTEN 欠損内皮細胞は血管新生および腫瘍形成の増加を示すと報告される。本研究においては、PTEN 欠損は多形腺腫由来型に有意に観察された。このことは、多形腺腫由来型において血管新生がより誘導されやすい環境が整えられていることを示唆する。

本検討では、唾液腺導管癌(de novo 型/多形腺腫由来型)において VEGFA 高発現を認め、血管内皮細胞(tip 細胞/stalk 細胞)への持続的 VEGFA 暴露により、VEGF-VEGFR-DII4-NOTCH-VEGFR フィードバックループの異常亢進が起こっている可能性が示唆される。さらに多形腺腫由来型においては、de novo 型に比して有意な SLIT2 発現抑制を認め、SLIT2-ROB04 機構による VEGF-VEGFR-DII4-NOTCH-VEGFR フィードバックループへの負の制御が無効になっている可能性がある。実際に、癌組織において VEGFA-VEGFR 持続的亢進および SLIT2-ROB04 機構により VEGF-VEGFR-DII4-NOTCH-VEGFR フィードバックループの破綻の結果、血管新生の異常亢進が引き起こされ、さらに新たに生成された血管は脆弱性や不安定性を伴うことが知られている。以上より、唾液腺導管癌においては、MMPs の高発現等、血管新生をサポートする環境が整えられており、かつ多形腺腫由来

型においては有意に SLIT2 発現が抑制され、VEGF-VEGFR-DII4-NOTCH-VEGFR フィードバックループの制御機構の無効化により、さらに血管新生が亢進されると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Takayoshi, Kano Satoshi, Suzuki Masanobu, Yasukawa Shinichiro, Mizumachi Takatsugu, Tsushima Nayuta, Hatanaka Kanako C., Hatanaka Yutaka, Matsuno Yoshihiro, Homma Akihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Enhanced Angiogenesis in Salivary Duct Carcinoma Ex-Pleomorphic Adenoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2020.603717	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木崇祥、加納里志、鈴木正宣、安川真一郎、中園彬、水町貴諭、本間明宏
2. 発表標題 唾液腺導管癌における遺伝子発現解析および発症様式の比較検討
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木崇祥、加納里志、鈴木正宣、安川真一郎、中園彬、水町貴諭、本間明宏
2. 発表標題 唾液腺導管癌における免疫染色およびRT-PCR法を用いた分子生物学的プロファイルの検討
3. 学会等名 第42回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木崇祥、加納里志、対馬那由多、水町貴諭、本間明宏
2. 発表標題 発症様式に基づいた唾液腺導管癌に特徴的な遺伝子発現の探索
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木崇祥、加納里志、浜田誠二郎、対馬那由多、水町貴諭、本間明宏
2. 発表標題 多形腺腫由来型唾液腺導管癌に特徴的な遺伝子発現の探索
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関