

平成22年 4月 30日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19791203

研究課題名 (和文) 分子遺伝学的手法を用いた唾液腺腫瘍の新しい術前診断の試み

研究課題名 (英文) Pre-operative diagnosis of salivary gland tumor by using the molecular genetic approach.

研究代表者

海沼和幸 (KAZUYUKI KAINUMA)

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30334907

研究代表者の専門分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：唾液腺腫瘍、耳下腺、遺伝子発現パターン

1. 研究計画の概要

(1)研究課題の目的

唾液腺腫瘍は病理学的に非常に多彩な腫瘍であるため、画像診断、穿刺吸引細胞診を用いても術前に診断確定ができないことが多い。この場合術中迅速病理診断の結果にて術式を決定することになるが、組織学的に **low grade malignancy** 等の場合は、術中迅速診断でも悪性と診断されず、術後の永久病理診断の結果によっては、術後すぐに再手術を余儀なくされることもあり臨床で大きな問題となっている。このように、唾液腺腫瘍は術前の確定診断が容易でないため、手術術式を含めた治療方針の決定が施設により統一されていない。また一般的に耳下腺腫瘍に対する生検は腫瘍細胞播種の危険のため禁忌（最も高頻度の多形腺腫では厳禁）とされている。穿刺吸引細胞診は、術前に必要不可欠であり、細胞播種の危険も低い安全な検査である。穿刺方法の工夫などにより正診率の向上は認められるものの、得られる検体量が少ないため、その精度には限界がある。そこで、本研究では、穿刺吸引細胞診により得られた微量検体を用いて、分子遺伝学的解析手法 (cDNA microarray) による補助診断を従来の検査法と併用することで、より正確な術前評価を可能にし、より適切な術式決定に寄与することを目的とした。

(2)異なる組織型の腫瘍特有の遺伝子発現パターンの探索

すべての唾液腺腫瘍症例を対象に、腫瘍および正常部唾液腺のサンプルを採取し、各々より mRNA を抽出して標識 cDNA を調製する。腫瘍関連遺伝子を乗せた DNA チップを用いて、各々の組織型について特異的に過剰発現

および発現抑制している遺伝子群を検索同定する。クラスター解析を行い、臨床データと相関の高いクラスタリングのできる遺伝子のリストアップを行う。

(3)唾液腺腫瘍分類に必要な解析遺伝子の選定
上記により、各々の組織型と高い相関を持ってクラスタリングされる遺伝子群についてはさらに施行を繰り返すことで、遺伝子候補の絞込みを行い、効率の高く簡易な検査手法の確立に向けての基盤整備を進める。

(4)微量検体からの解析手法の確立
摘出した腫瘍サンプルに対して穿刺吸引細胞診を行い、採取した微量検体から mRNA を抽出し、DNA チップで上でデータを取れる量まで T7 RNA Polymerase により増幅する。DNA マイクロアレイ解析を行い得られたデータと、従来の手法（手術検体から十分な量を mRNA を抽出使用）で得られたデータと比較検討して、微量検体からの解析手法の確立を行う。また、必要に応じてより検出感度を高めた手法も試みる。

(5)唾液腺腫瘍の臨床データの検討
腫瘍の部位、大きさ、その他の局所所見や術中迅速病理診断、術式、摘出物病理診断などの鈴層的情報をデータベース化し診断の的中度と術式の検討を行う。

2. 研究の進捗状況

(1)腫瘍関連遺伝子発現の解析

唾液腺腫瘍症例を対象に、腫瘍及び正常部唾液腺のサンプルを採取し、各々より mRNA を抽出して、標識 cDNA を調整する。腫瘍関連遺伝子を載せた DNA チップを用いて各々の組織型について特異的に過

剰発現および発現抑制されている遺伝子群を検索同定してクラスター解析を行い、遺伝子発現パターンから腫瘍の組織型を特定可能なことを見いだした。

(2) 穿刺細胞吸引 (FNA) 微量検体からの遺伝子発現の解析

前項のマイクロアレイ解析により、唾液腺腫瘍の組織型を遺伝子発現パターンを基に分ける基盤が整ったため、穿刺細胞吸引 (FNA) で得られる微量の検体から解析する手法として、cDNA増幅とRT-PCRを組み合わせて、極微量の検体からでも遺伝子発現を解析することが可能となった。次年度以降は、FNAの微量試料から遺伝子発現解析を行い、クラスター化を行うことで唾液腺腫瘍の組織型を判別可能かどうかを検討する。

(3) 唾液腺腫瘍の臨床データの検討

前年度までに継続してすべての唾液腺腫瘍症例を対象に以下のデータを集積し検討を行った。1. 性別、年齢 2. 部位、大きさ 3. その他の局所所見 4. が像所見 5. 術前吸引細胞診、6. 術中迅速病理診断 7. 術式 8. 摘出物病理診断、また、悪性腫瘍に関しては、9. 臨床病期 10. 局所制御率 11. 累積生存率についても検討した。今年度は特に悪性腫瘍について、予後を規定する臨床症状を統計学的に解析した。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している
(理由)

本研究では、穿刺吸引細胞診により得られた微量検体を用いて、分子遺伝子学的解析手法による補助診断を従来の検査法と併用することで、より正確な術前評価を目的としている。昨年度までの検討で、cDNAマイクロアレイを用いて腫瘍の遺伝子発現パターンをクラスター化して解析することで、組織型をある程度判別できることを明らかにした。また、穿刺吸引細胞診 (FNA) により得た極微量の検体から RNA を抽出し、cDNA 増幅法と RT-PCR 法を組み合わせて、極微量の検体からでも遺伝子発現を解析することが可能となっており、おおむね計画通りに推移していると考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

本年度までに、穿刺吸引細胞診により得られた極微量の検体からでも遺伝子発現を解析することが可能となったため、次年度以降は、穿刺吸引細胞診 (FNA) の微量試料から遺伝子発現解析を行い、クラスター化を行うことで唾液腺腫瘍の組

織型を判別可能かどうかを検討するとともに、診断の的中度や重症度等との相関について検討を行う計画である。

5. 代表的な研究成果

(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)

- ① Kainuma K, Oshima A, Suzuki H, Fukushima M, Shimojo H, Usami S I. Hybrid carcinoma of the parotid gland: report of a case (epithelial-myoepithelial carcinoma and salivary duct carcinoma) and review of the literature. Acta Otolaryngol: 1-5, 2009, 査読有
- ② Kainuma K, Netsu K, Asamura K, Hayashi K, Takumi Y, Ota H, Usami S. Chondrosarcoma of the nasal septum: A case report. Auris Nasus Larynx 36: 601-605, 2009, 査読有
- ③ Kainuma K, Takumi Y, Uehara T, Usami S. Meningioma of the paranasal sinus: a case report. Auris Nasus Larynx 34: 397-400, 2007, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 鈴木宏明、海沼和幸、我妻道生、宇佐美真一、舌癌 T1-2N0 症例の後発リンパ節転移の検討、第 33 回日本頭頸部癌学会、2009. 6. 10~12, 札幌
- ② 海沼和幸、鈴木宏明、我妻道生、宇佐美真一、当科における大唾液腺癌の検討、第 33 回日本頭頸部癌学会、2009. 6. 10~12, 札幌
- ③ 海沼和幸、耳下腺 Hybrid Carcinoma の 1 例、第 32 回日本頭頸部癌学会、2008. 6. 11~13, 東京
- ④ 海沼和幸、鬼頭良輔、宇佐美真一、舌骨原発軟骨肉腫の 1 例、第 70 回耳鼻咽喉科臨床学会、2008. 6. 27~28, 長崎
- ⑤ 海沼和幸、塚田景大、鈴木宏明、浅村賢二、宇佐美真一、耳下腺良性腫瘍の術後顔面神経麻痺に関する検討、第 31 回日本頭頸部癌学会、2007. 6. 13~15, 横浜