

機関番号：13601

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) Application of genes expression analysis for diagnosis of salivary gland tumor by FNA samples with qRT-PCR.

研究代表者

海沼 和幸 (KAINUMA KAZUYUKI)

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30334907

研究成果の概要(和文)：現在までに、唾液腺腫瘍に関する有効な治療法は手術である。実際に手術は術前診断をもとに決定されるため、不必要な手術合併症を避けつつ、腫瘍の再発を防ぐためには正確な術前診断が非常に重要である。本研究では、穿刺吸引細胞診(FNA)で得られる微量の細胞から抽出した RNA を基に、遺伝子発現パターンを解析する事により腫瘍の種類を分子遺伝学的手法で見分ける補助診断手法の確立を目指した。その結果、FNA で得られた微量の検体から RNA を抽出し定量する手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：To enhance the diagnostic quality and confidence of salivary gland tumor, we employed molecular genetic method to FNA samples. In this study, we applied quantitative RT-PCR method and whole transcriptome amplification technique for FNA cell samples of salivary gland tumor. As a result, we succeed to detect an amplification product from cell samples picked up by FNA.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 800,000 | 0 | 800,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2009年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 720,000 | 3,920,000 |

研究分野：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：遺伝子発現・頭頸部腫瘍・耳下腺腫瘍

1. 研究開始当初の背景

現在までに、唾液腺腫瘍に関する有効な治療法は手術である。実際に手術を行う際の術式(特に顔面神経の処理)は術前診断をもとに決定されるため、不必要な顔面麻痺等の手術合併症を避けつつも、腫瘍の再発を防ぐためには、正確な術前診断が非常に重要である。

しかしながら、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临床上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。

当研究室では、頭頸部腫瘍全般に対して分子遺伝学的アプローチを試み、腫瘍関連遺伝子の発現解析が頭頸部腫瘍の予後推定に有用であることを報告してきた（Kainuma et al. Acta. Oto-Laryngology, 2006;126:967-974）。

また、唾液腺腫瘍に関しては、多形腺腫とワルチン腫瘍が分子遺伝学的アプローチで分類可能である事を示した。また多形腺腫については組織学的3亜型も分子遺伝学的アプローチで分類可能なことを報告した（Kainuma et al. ANL 2004;31:261-268）。このように、分子遺伝学的な頭頸部腫瘍の解析手法を応用し、遺伝子発現パターンを比較することで、腫瘍細胞を見分ける事が可能となってきた。

また、近年の RNA 抽出試薬の改善などにより穿刺吸引により得られたごく微量の細胞サンプルからも RNA の抽出が可能と成ってきたため、唾液腺腫瘍を分子遺伝学的手法で分類し、より正確な術前評価を行うための基盤が整いつつ有る状況であった。

2. 研究の目的

現在までに、唾液腺腫瘍に関する有効な治療法は手術である。実際に手術は術前診断をもとに決定されるため、不必要な手術合併症を避けつつ、腫瘍の再発を防ぐためには正確な術前診断が非常に重要である。

しかしながら、唾液腺腫瘍に関しては、(一般的には)術前の組織生検は細胞播種の危険があり禁忌であるため、穿刺吸引細胞診により得られた微量の細胞を用いて診断を行う状況下にある。しかしながら、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。特に扱いの難しい悪性腫瘍に限っても、組織学的に 20 種類以上も存在するためその診断は極めて難しい状況にある。

また、多く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無いため、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るため、迅速かつより正確な診断が求められている。

当研究室では、頭頸部腫瘍全般に対して遺

伝子発現パターンを比較することにより、腫瘍関連遺伝子の発現解析が頭頸部腫瘍の予後推定に有用であることを報告してきた。

また、唾液腺腫瘍に関しては、多形腺腫とワルチン腫瘍が遺伝子発現パターンの違いにより分類可能である事を示した。また多形腺腫については組織学的3亜型も分類可能なことを報告した。

このように、分子遺伝学的な解析手法を応用し、遺伝子発現パターンを比較することで、腫瘍細胞を見分ける事が可能と成ってきていることを受けて、臨床での応用を実現可能なものとするため、本研究では穿刺吸引細胞診で得られた微量検体から RNA を抽出してその遺伝子発現パターンを比較することで、腫瘍の分類を可能とする分子遺伝学的補助診断の基盤を確立することを目的とした。

また、従来行っていた DNA マイクロアレイを用いた解析の問題点として、検査ごとにデータ間のばらつきが大きいことが指摘されているため、一般的には3回ほど重複した実験を行い、平均値を用いるなどの手法が行われているが、解析に時間とコストがかかるという問題点がある。

本研究では、リアルタイム PCR などのより定量製の高い手法を導入することで、迅速かつコストを抑制した検討を行い、新しい手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微量検体からの RNA 抽出手法の検討

研究を開始するまでに遺伝子発現パターン違いにより分類可能であることが明らかとなっていた多形腺腫について、組織学的3亜型について、穿刺吸引細胞診により得られる微量の細胞から RNA を抽出することが可能かどうかに関して検討を行った。

具体的には、研究期間中に多形腺腫の手術を行った症例のうち、研究協力に関する十分な説明の後、書面によりインフォームドコンセントを取得した上で、協力を得られた9例に関して、手術により摘出した腫瘍塊に、通常の穿刺吸引細胞診と同様の手法により細胞の採取を行った後に RNA 抽出キットの比較を行った。

用いた RNA 抽出キット・逆転写キットとしては、通常の RNA 抽出に用いる QIAGEN 社の RNeasy mini kit および Applid Biosystems 社の High Capacity RNA to cDNA™ Kit と、少数の細胞を溶解後に RNA 抽出を行わずに、そのままダイレクトに逆転写を行う Takara 社の CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit および、Applied Biosystems 社の TaqMan Fast

Cells-to-CT™ Kit の比較を行った。

(2) 定量 Realtime PCR を用いた定量解析

従来、我々が行ってきた DNA マイクロアレイを用いた解析の問題点としては、検査ごとにデータ間のばらつきが大きいため、3回ほど重複した実験を行い、平均値を用いるなどの手法が行われている。しかしながら、同様の解析を3回重複するため、時間とコストがかかるという問題点があり、臨床的には実現可能性が低いという問題点があった。そこで、本研究では臨床応用可能な迅速かつ低コストで実施可能な、定量性の高い定量リアルタイム PCR 法を応用する事を目的とした。

発現量の定量的解析には、我々の研究室で cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、組織学的 3 亜型を遺伝子発現量により分類可能なことを報告した多形腺腫のマーカーとなる 13 遺伝子 (表 1) の発現解析を行った。発現量の定量解析には Applied Biosystems 社の TaqMan Gene expression Assays を用いた。また、解析には Applied Biosystems 社の Step One Plus realtime PCR 装置を用いた。

| 遺伝子名 | Gene expression assay ID |
|---------|--------------------------|
| TGFB2 | Hs00234244_m1* |
| MMP2 | Hs01548727_m1* |
| KRT14 | Hs00265033_m1* |
| COL11A2 | Hs00365416_m1* |
| TGFBR3 | Hs01114253_m1* |
| AREG | Hs00950669_m1* |
| CSPG2 | Hs00171642_m1* |
| NTRK2 | Hs00178811_m1* |
| FRZB | Hs00173503_m1* |
| FGFR3 | Hs00179829_m1* |
| FGF7 | Hs00384281_m1* |
| E2F3 | Hs00605457_m1* |
| MMP7 | Hs01042796_m1* |

表 1 発現量解析を行った遺伝子

また、RNA 抽出を行わずに、そのままダイレクトに逆転写を行う Takara 社の CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit および、Applied Biosystems 社の TaqMan Fast Cells-to-CT™ Kit では RNA の定量を行う事が出来ないため、穿刺細胞吸引で得られた細胞の数をコントロールすることが出来ないため、internal control として β アクションなどのハウスキーピング遺伝子の発現量を測定する事で得られた RNA 量を計算で求め、遺伝子発現量の補正を行った。用いた TaqMan Gene expression Assays は表 2 に示した。

| 遺伝子名 | Gene expression assay ID |
|--------|--------------------------|
| ACTB | Hs99999903_m1* |
| GAPDH | Hs99999905_m1 |
| RPLP0 | Hs99999902_m1* |
| UBC | Hs00824723_m1* |
| IP08 | Hs00183533_m1* |
| POLR2A | Hs00172187_m1* |

表 2 コントロールとして利用した遺伝子

4. 研究成果

(1) 微量検体からの RNA 抽出手法の検討

協力を得られた 9 例に関して、手術により摘出した腫瘍塊に、通常の穿刺吸引細胞診と同様の手法により細胞の採取を行った後に QIAGEN 社の RNeasy mini kit および Applied Biosystems 社の High Capacity RNA to cDNA™ Kit と、少数の細胞を溶解後に RNA 抽出を行わずに、そのままダイレクトに逆転写を行う Takara 社の CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit および、Applied Biosystems 社の TaqMan Fast Cells-to-CT™ Kit の比較を行った。

その結果、通常の RNA 抽出キットおよび逆転写キットを用いた群では、RNA が認められず、また、RT-PCR においても増幅産物が認められなかった。

少数の細胞を溶解後にそのままダイレクトに逆転写を行う Takara 社の CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit および、Applied Biosystems 社の TaqMan Fast Cells-to-CT™ Kit では、どちらの抽出キットを用いた場合にも RT-PCR においても増幅産物が認められた。用いる、RT のステップの違いにより、CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit では、3'末端に近いプローブでは増幅産物が認められたが、3'末端から離れたプローブでは増幅産物を認めなかった。これは 1st stand 合成のステップを Oligo dT で行う事に起因しているものと考えた。

(2) 定量 Realtime PCR を用いた定量解析

本研究では、従来の cDNA マイクロアレイの問題点を克服し、臨床応用可能な迅速かつ低コストで実施可能な、定量性の高い方法として、定量リアルタイム PCR 法を応用する事を目的とした。また、リアルタイム PCR 法は DNA を増幅しながら定量を行う手法であるため、穿刺吸引細胞診で得られた微量の細胞からの微量検体からの遺伝子発現量の定量解析に非常に有利である点でもリアルタイム PCR 法を選択した。

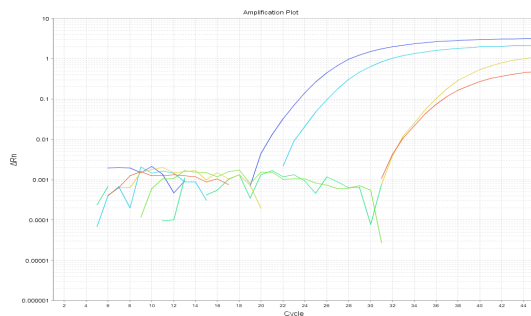


図4 FNA 検体からの *KRT14* 遺伝子の qRT-PCR 解析

その結果、コントロールおよびいくつかのプロブで定量的に増幅産物を得る事が可能であった。また、予測された発現量に関しては事前に予測された各腫瘍での発現量と一致するケースが多かったが、用いたプロブの位置によってはばらつきも認められた。

以上のことより、本研究を通じて穿刺吸引細胞診で得られた微量の細胞からの遺伝子発現を定量する系を確立することが出来たと考えられる。今後、さらに検討を重ねる事で、より定量性の高いプロブを選択する事で実際の補助診断ツールとして臨床応用が可能と成る事が期待される。

5. 主な発表論文等

(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, Kitoh R, Kenji S, Usami S., Inverted papilloma of the middle ear: a case report and review of the literature. 査読あり Acta Otolaryngol. 2011 Feb;131(2):216-20.

② Kainuma K, Oshima A, Suzuki H, Fukushima M, Shimojo H, Usami S., Hybrid carcinoma of the parotid gland: report of a case (epithelial-myoeithelial carcinoma and salivary duct carcinoma) and review of the literature. 査読あり Acta Otolaryngol. 2010;130(1):185-9.

③ Kainuma K, Netsu K, Asamura K, Hayashi K, Takumi Y, Ota H, Usami S., Chondrosarcoma of the nasal septum: A case report. 査読あり Auris Nasus Larynx. 2009 Oct;36(5):601-5.

[学会発表] (計 1 件)

① 海沼和幸、耳下腺 Hybrid Carcinoma の 1 例、日本頭頸部癌学会、2008 年 6 月 11 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海沼和幸 (KAINUMA KAZUYUKI)

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30334907

(2) 連携研究者

宇佐美 真一 (USAMI SHINICHI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：10184996

鬼頭 良輔 (KITO RYOUSUKE)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：80419358

橋本 繁成 (HASHIMOTO SHIGENARI)

信州大学・医学部附属病院・助教 (特定雇用)

研究者番号：90359729

西尾 信哉 (NISHIO SHINYA)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：70467166