

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462672

研究課題名(和文) 高悪性度唾液腺癌に対するオーダーメイド治療の開発

研究課題名(英文) The development of tailor-made treatment 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・助教

研究者番号：00374421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺癌組織における発現タンパク質を解析したところ、EGFRは76%、HER2は20%、c-KITは38%で陽性であり、中でもHER2陽性例が有意に予後不良であった。さらに、HER2陽性例ではその下流シグナルであるPI3K経路の活性化を認めた。また、HER2は唾液腺導管癌に多く発現していたが、de novoに比べ多形腺腫由来癌で多く認められており、多形腺腫からの発癌に強く関与している可能性が示唆された。

これらの結果から、HER2を標的とした薬物治療の開発を検討した。既に乳癌や胃癌で臨床応用されている抗HER2抗体トラスツズマブとドセタキセル併用薬物治療による第2相臨床試験を現在進行中である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of proteins in salivary gland cancer. The results showed that the expression of EGFR, HER2 and c-KIT was 76%, 20% and 38%, respectively. Among them, the patients with HER2-positive tumors had significantly unfavorable prognosis. Furthermore, we found the activation of the PI3K pathway in HER2-positive tumors. HER2 was mainly overexpressing in salivary duct carcinoma, and was detected more frequently in carcinoma ex pleomorphic adenoma than in de novo tumors. This result suggested that HER2 could be involved in carcinogenesis from pleomorphic adenoma. Based on these results, we planned to develop a HER2-targeted therapy in salivary gland cancer.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：唾液腺癌 唾液腺導管癌 HER2 トラスツズマブ

### 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、2005年の新 WHO 分類では 24 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る。

近年、唾液腺癌の分子マーカーの解析が国外中心に行われてきている。特に、唾液腺導管癌における Her2/neu 分子や腺様嚢胞癌における c-kit 分子の過剰発現が報告されている (Skálová, Histopathology, 2003; Jeng, Cancer Lett, 2000) 我々も唾液腺導管癌における Her2/neu の発現を解析したところ、60%の症例で Her2/neu 陽性であった (鈴木ら, 頭頸部外科, 2011) さらに、これらの分子をターゲットにした分子標的薬を用いて治療し有効であったとする症例報告も散見される。(Kraus, Head Neck, 2008) そのため、特定の治療標的分子の発現をみとめる唾液腺癌では、分子標的薬が救済治療として有効な可能性が考えられる。しかし、分子標的治療があらゆる唾液腺癌に適応があるわけではない。治療標的分子の発現は唾液腺癌の病理組織型との関連が強く、病理組織型が多彩であるように、発現分子にも非常に多くのバリエーションが予想される。そういった唾液腺癌の様々な発現分子に対応した治療、つまり症例に応じたオーダーメイド治療の開発が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、現在、臨床応用されている分子標的薬の標的分子を中心にその発現を解析し、病理組織型や臨床像との関連を明らかにし、さらに基礎実験により治療効果を検討する。この研究データを基に、症例に応じたオーダーメイド治療の開発を本研究の最終目標としている。

### 3. 研究の方法

(1) 唾液腺癌の臨床標本を用いて、標的分子の発現を解析する。

臨床検体 (ホルマリン固定標本) を用いて、免疫組織染色法によって標的分子の発現を解析する。大量の検体を同時に染色し、また症例間による染色のムラをなくして同じ条件下で評価するために組織マイクロアレイ法を用いる。

現在解析を予定している標的分子は上皮成長因子受容体 (EGFR), Her2/neu, c-kit, 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF), プロテアソーム, アンドロゲン受容体 (AR), エストロゲン受容体 (ER) である。その他に、

発癌や癌の増殖に關与する p53, p16, cyclin D1, Ki-67, 核内増殖抗原 (PCNA) などの解析を予定している。

過剰発現していた分子では、その活性化を評価するために、受容体のリン酸化や下流のシグナルも免疫染色法にて解析する。

過剰発現していた分子の遺伝子増幅を FISH 法 (蛍光 in situ ハイブリダイゼーション) にて解析する。

(2) 治療標的分子と病理組織型や臨床像 (進行度, 悪性度, 予後) との関連を明らかにする。

過剰発現している分子と、病理組織型や臨床像 (進行度, 悪性度, 予後) との相関関係を検討する。

多変量解析を用いて、予後因子を解析する。

癌の発生や増殖, 転移, 治療抵抗性などに関与している分子を予測する。

(3) 唾液腺細胞株に標的分子を形質導入し、細胞の機能変化 (細胞増殖, 腫瘍形成, 浸潤) を検討する。

治療の標的として考えられる分子を唾液腺細胞株に形質導入する。

形質導入された細胞を用いて、機能解析 (細胞増殖能, 腫瘍形成能, 浸潤能) を行う。具体的には MTT アッセイ, コロニーフォーメーションアッセイ, インベージョンアッセイを予定している。

(4) 標的分子が発現している唾液腺癌細胞株を樹立し、それに対する分子標的薬で処理し治療効果を評価する。

既に標的分子の過剰発現が確認されている唾液腺癌細胞株を樹立する。

樹立した唾液腺癌細胞株を、それぞれの分子標的薬で処理し治療効果を評価する。具体的には

MTT アッセイによる細胞増殖実験や TUNEL アッセイによるアポトーシス実験を予定している。さらに抗癌剤との併用による相乗効果も検討する。

樹立した唾液腺癌細胞株をヌードマウスに移植し、in vivo での腫瘍増殖能や転移能を解析する。また、分子標的薬や抗癌剤を用いた治療効果の解析も行う。

(5) 分子標的薬を用いた臨床試験を計画し、オーダーメイド治療への臨床応用を目指す。

基礎実験により得られたデータを基に、手術不能な再発唾液腺癌を対象にした臨床試験を計画する。

大学病院内での倫理委員会に臨床試験の計画書を提出し、承認を目指す。

臨床試験の実施。

### 4. 研究成果

当院で治療した唾液腺癌症例の臨床検体

を用いて免疫組織染色法にて発現タンパク質を解析したところ、EGFR は 76%、HER2 は 20%、c-KIT は 38%で陽性であった。これらの発現と生存率との関係を検討したところ、HER2 陽性例が有意に予後不良であった。(陽性例の 5 年粗生存率 33.3%、陰性例では 83.8%、 $p < 0.01$ ) さらに HER2 陽性例の臨床背景を検討したところ、高齢者に有意に多く、T ステージの進行例に多くみられた。

この結果より、HER2 が唾液腺癌の増殖に関与している可能性が高いと考えられたため、HER2 の下流シグナルに関して解析を行った。その結果、HER2 陽性例の 80%で p-Akt 陽性、100%で p-mTOR 陽性であり、HER2 の下流シグナルである PI3K 経路の活性化を認めた。一方、HER2 陰性例でも PI3K 経路の活性化を認めている症例もあり、その理由として HER2 以外からのシグナル活性や、PIK3CA 遺伝子の変異、PTEN 遺伝子の欠失が考えられた。事実、PTEN 陰性は HER2 陰性例の 60%に認めており、HER2 陽性では認めなかった。さらに PTEN 陰性例は陽性例に比較し予後不良であった。(陽性例の 5 年粗生存率 39.7%、陰性例では 0%、 $p = 0.042$ )

また、HER2 は唾液腺導管癌に多く発現していたが、de novo に比べ多形腺腫由来癌で多く認められた。このことから、良性腫瘍である多形腺腫からの発癌メカニズムに HER2 が強く関与している可能性が示唆された。

計画していた唾液腺細胞株の樹立は今回の研究期間では完成しなかった。今後も継続していきたいと考えている。

これらの研究結果から、唾液腺癌の発癌や増殖、また予後に深く関わる HER2 を標的とした薬物治療の開発を検討した。既に HER2 陽性の乳癌や胃癌で臨床応用されている抗 HER2 抗体トラスツズマブと抗がん剤のドセタキセル併用薬物治療による第 2 相臨床試験を計画し、現在進行中である。対象は再発転移の HER2 陽性唾液腺癌で、トラスツズマブ + ドセタキセルを最大 8 コース施行し、主要評価項目は奏効率である。この臨床試験により良好な治療効果が得られた場合は、トラスツズマブの保険適応拡大申請を予定している。

#### 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 1 件)

1. Clinical Outcomes and Prognostic Factors for Salivary Duct Carcinoma: A Multi-Institutional Analysis of 141 Patients.  
Otsuka K, Imanishi Y, Tada Y, Kawakita D, Kano S, Tsukahara K, Shimizu A, Ozawa H, Okami K, Sakai A, Sato Y, Ueki Y, Sato Y, Hanazawa T, Chazono H, Ogawa K, Nagao T.  
Ann Surg Oncol. Vol23. Issue6.

pp.2038-2045.2016. 査読有.

#### [学会発表](計 8 件)

1. 加納里志、唾液腺導管癌における免疫組織化学的発現解析 - 多施設共同による 152 症例の検討 -、第 213 回日本耳鼻咽喉科学会北海道地方部会、2016.3.27、札幌医科大学(札幌市)
2. 加納里志、唾液腺導管癌における HER2 下流シグナルの解析、第 60 回日本唾液腺学会、2015.12.5、文教学院大学(東京都)
3. 加納里志、多施設共同による唾液腺導管癌の後方視的観察研究 - 救済治療の課題と新たな治療法の開発 -、第 13 回日本臨床腫瘍学会、2015.7.16-18、ロイトン札幌(札幌市)
4. 加納里志、唾液腺癌を対象とした HER2 タンパク過剰発現および遺伝子増幅検査法の臨床的バリデーションに関する検討、第 39 回日本頭頸部癌学会(第 4 回アジア頭頸部癌学会)、2015.6.3-6、神戸国際会議場(神戸市)
5. 加納里志、多施設共同による唾液腺導管癌に対する HER2 発現解析と新たな臨床試験、第 210 回北海道地方部会、2014.10.12、札幌医科大学(札幌市)
6. Kano S、Genetic and Expression Analysis of HER2 in Salivary Duct Carcinoma、IFHNOS 5th World Congress 2014.7.27-30、The Marriott Marquis Square (New York,U.S.A.)
7. 加納里志、唾液腺導管癌における HER2 下流シグナルの解析、第 38 回日本頭頸部癌学会 2014.6.12-13、東京ファッショントアウンビル(東京都)
8. 加納里志、多施設共同による唾液腺導管癌の後方視的観察研究 - 救済治療の課題と今後の展望 - : 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会 2014.5.14-17、ヒルトン福岡シーホーク(福岡市)

#### [図書](計 0 件)

#### [産業財産権] 出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

#### 取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 里志 ( KANO SATOSHI )  
北海道大学・大学病院・助教  
研究者番号：00374421

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：