

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20228

研究課題名(和文) 粘表皮癌の各組織形態に基づいたキメラ融合遺伝子検出と新たな分子治療標的の同定

研究課題名(英文) The chimeric fusion transcript detection and identification of a new molecular treatment target based on each histological subtype of Mucoepidermoid carcinoma.

研究代表者

藤巻 充寿 (FUJIMAKI, MITSUHISA)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10514490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：近年、粘表皮癌(MEC)の40-70%にCRTC1-MAML2もしくはCRTC3-MAML2融合遺伝子が見られることが発見され、MECの予後マーカーとして有力な研究対象となった。本研究では(1)MECの病理組織学的「疑診」例を加えて融合遺伝子陽性例の病理組織像を解析することにより、MECの診断に有用なデータを収集、日常の診断精度を向上させた。(2)MECの予後不良群に関連する融合遺伝子群、細胞周期/癌抑制遺伝子/上皮分化に関連する蛋白・RNA解析を行い、分子標的治療の根拠となるデータを集積しており、引き続き融合遺伝子下流の制御機構を明らかにしていく。

研究成果の概要(英文)：Recently it was reported that the expression of CRTC1-MAML2 or CRTC3-MAML2 fusion was found on 40-70% of mucoepidermoid carcinoma. These fusions are becoming the important prognostic marker gene for MEC. We analyzed the positive cases to the fusions that include suspicious cases for histopathological diagnoses. We show the data has improved the diagnostic accuracy of MEC. We analyze the fusions clusters related to bad prognosis group and also protein and RNA related to the cell cycle/tumor suppressor gene/epithelial differentiation. Thus we would like to evaluate the downstream of fusions target genes.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：粘表皮癌 CRTC1-MAML2 融合遺伝子 RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

粘表皮癌(mucoepidermoid carcinoma、以下 MEC) は大・小唾液腺原発悪性腫瘍の中でも 20%と高頻度に認められ、また全身の他臓器・比較的若年者にも発生する。近年、唾液腺 MEC の 40-70%に MEC に特徴的な遺伝子変異である、t(11;19)(q21;p13)転座より、19p13 から Mucoepidermoid Carcinoma Translocated gene-1(MECT1) のエクソン 1 と、11p21 から Masrtermaind-like gene family(MAML2) のエクソン 2-5 が融合する MECT-MAML2 キメラ遺伝子が発見された。MECT-1 遺伝子は cAMP/cAMP-responsoive element binding protein(CREB)signaling に関連する遺伝子である。MECT1-MAML2 キメラ遺伝子は cAMP/CREB 関連遺伝子を活性化させ、粘表皮癌が発生する機序が考えられている。同様に CRTC3-MAML2 融合遺伝子も検出されている。これらの遺伝子異常は他の唾液腺原発悪性腫瘍には見られない特異性を持っていることが発見された。粘表皮癌の予後因子として、組織学的悪性度、年齢、性別、臨床病期、増殖活性、ki-67 発現、p27 発現などが報告されている。唾液腺癌は通常外科的切除が標準的治療となり、その診断は病理組織学的所見に委ねられ、悪性度に伴う adjuvant therapy の必要性、予後因子はその所見に左右される。MEC の大半症例は特徴的な所見を有し、病理診断は容易とされてきた。しかし、組織学的亜型や高悪性度例などの疑診例、また頸部リンパ節転移で発見され、原発巣が確定し得ない、所謂「原発不明癌」の中には大・小唾液腺もしくは異所性唾液腺に発生した MEC が転移したものもあり、これら症例は特徴的な組織像を有さず、確定診断に到達し得ず、また原発巣の検索に苦慮することが多い。また、MEC の予後因子、悪性度分類には組織学的所見を点数化した WHO 分類が用いられてきたが、その指標としては不十分であり、より特異的な手法の確立が急務である。

本研究者らは Fahr A ら [Genes,Chromosomes&Canser,2009]により報告された特異的なプライマーを用いたパラフィン切片からの RT-PCR 法および directsequence 法で CRTC1-MAML2 遺伝子の検出法を確立し、当院で唾液腺 MEC の「確診」「疑診」例に対し、融合遺伝子の有無の検討を行った。そこで我がグループ

は病理診断では疑診であった膨大細胞型亜型を確定診断し得た [Fujimaki M,Fukumura Y,Saito T,et al.Hum Pathol,2011]。また、他部位原発の MEC 疑診例についても遺伝子の検出を行い、日常診療に取り入れている。

2. 研究の目的

予備研究において我々は 1998 年から 2012 年までに当院にて生検もしくは手術が施行された 20 症例(表 1)を対象に融合遺伝子の検索を行った。その結果、融合遺伝子陽性例は 6 例(30%)に確認し得た。全例 RT-PCR 施行後、陽性例は Direct sequencing 法を用いて、塩基配列の決定を行った。頭頸部癌の予後因子としてリンパ節転移の制御は最重要事項である。後ろ向き検討において陽性例 6 例中、4 例が N0 症例であり、全例において初期治療で CR が得られたことが確認できた。

これまでの検討では融合遺伝子の検出率が低値である点、また症例数が少ない点が今後改善すべき点と考えられた。それらを踏まえ、(1)「疑診」例も含め、MEC 症例に対し、上記の既知の融合遺伝子を確認、融合遺伝子陽性症例の病理組織像を抽出し、客観的データを収集する。また、他施設間で対象症例の増加を図る(2)「確診」・「疑診」例の臨床データを解析する。過去の症例に対する、後ろ向き検討および、新規症例に対し前向き検討を平行して行う。(2)組織学的「MEC 確診群」の内、上記融合遺伝子陰性例に対し、5' RACE 法を用いて未知領域のクローニングを行い、新たな fusion partner を発見・確認する。(3)融合遺伝子陽性群、細胞周期/癌抑制遺伝子/上皮間葉系分化に関連する蛋白発現、RNA 解析を行い、今後の MEC 分子標的治療の根拠となるデータを集積するとともに融合遺伝子下流の制御機構データを集積する。

これまでに本邦で 1 施設、欧米において 2 施設で MEC 融合遺伝子検出が行われてきたが、対象は「疑診」例のみであった。本研究においては「疑診」例の検討を行うことにより病理診断精度を向上させるとともに予後因子としての指標を確立し、日常診療・治療法の選択に応用する。また、融合遺伝子亜型の網羅的解析、予後マーカー解析を行い、MEC の遺伝子異常とその制御機構を明らかにするとともに、分子標的治療開発の突破口となる。進行癌に苦しむ、多くの癌患者へ希望与える福音となり得る

有意義な研究であると考えられた。

3. 研究の方法

1) 概要

唾液腺粘表皮癌(MEC)(疑診例を含む)、唾液腺外MEC、原発不明癌頸部リンパ節転移で、ヒトから手術的に採取された病理組織標本(パラフィンブロック)を用い、(1)病理組織像の客観的かつ詳細な評価、(2)頭頸部外科医による患者背景調査、(3)RT-PCRおよびdirect sequencing法によるCRTC1-MAML2、CRTC3-MAML2融合遺伝子の確認、(4)融合遺伝子陽性群と陰性群の病理組織像の比較検討、PCR陰性例/MEC「確診」例の5' RACE法による、新たなFusion partnerの検索(5)細胞周期/癌抑制遺伝子/上皮間葉分化関連因子の免疫組織学的検討および定量的RT-PCRを行う。

これまでMEC「確診」症例を主体とした研究で、融合遺伝子陽性/陰性と臨床予後との関連を調べたものが多い。しかし、本研究においては日常病理診断において時に診断困難となる「亜型」「高悪性度癌」「全身他部位発生群」「原発部位不明群」というMEC「疑診」症例を加えて融合遺伝子を確認し、その陽性群/陰性群の病理組織像を検討することにより、より詳細なMECの病理診断基準の根拠とするとともに、その確定診断率を引き上げることを可能にし得る。

2) 平成27年度の研究内容・方法

病理組織像の客観的指標に基づく評価

20例の対象症例に対し組織学的悪性度分類の再評価を行った。組織学的悪性度はGoode分類(Goode RK, et al. Cancer 1998)を用いた。さらに一般的に癌の悪性度、予後不良因子、再発・転移の重要な因子となる脈管浸潤の有無を検討するためEVG染色、D2-40免疫組織化学染色を行った。

患者背景調査による臨床所見の検討
臨床経過、画像所見を基にした病変の評価、顔面神経麻痺等の症候の有無、既往歴・家族歴といった患者背景因子をそれぞれ抽出した。

RT-PCR法およびDirect-sequence法による融合遺伝子の確認

パラフィン固定検体よりmRNAを抽出し、Synthesis Using Random Primers系(Invitrogen®)を用いてcDNAを得る。CRTC1-MAML2、CRTC3-MAML2に特異的なprimerを用い、PCR反応を行う。電気泳動後ethidiumbromide染色にて可視化する。更に泳動ゲルよりターゲットバンドの切り

出し・精製を行い、DNAシーケンサー(Applied Biosystems®)を用いたサイクルシーケンス法で塩基配列決定を行った。

3) 平成28年度の研究内容・方法

細胞周期/癌抑制遺伝子/上皮間葉分化関連因子の免疫組織学的検討および定量的RT-PCR、免疫組織化学でのCyclin D1、Cyclin D2、beta-catenin、p53、p16、E-cadherinの発現/予後/融合遺伝子型との比較検討を行った。

更に蛋白レベルで検出された因子の定量を行い、予後/融合遺伝子型と比較検討する頃を目標とした。

4. 研究成果

1) 平成27年

予備研究の対象となった症例も含め、20例のMEC症例を解析した。男性13例・女性7例、年齢の中央値55歳(26-79歳)。組織学的悪性度の評価として、Goode分類を用い、嚢胞成分の割合>20%が4例、神経浸潤の存在6例、核分裂像の増加(4 or more per 10 high-power fields)6例、壊死の存在7例、退形成の存在5例であった。これらの因子を点数化し分類した結果高悪性度・中悪性度MEC:7例、低悪性度MEC:13例となった。EVG染色・D2-40免疫組織化学染色では脈管浸潤あり;6例、なし;14例であり、高悪性度MECでより脈管浸潤を多く認める結果となった。

臨床因子としては耳下腺原発16例・顎下腺原発4例、T1;4例・T2;9例・T3;4例・T4;1例、N0;8例・N1;1例・N2;11例で臨床病期はI期;4例・II期;3例・III期;3例・IV期;10例であった。全例根治治療として手術が選択されていた。治療前に顔面神経麻痺を有した症例は認めなかった。観察期間の中央値は41ヶ月(13-241ヶ月)で無病生存18例、多因死2例だった。高悪性・中悪性度MEC/低悪性度MECの2群に生存率での差異は認めなかった。

RT-PCR法およびDirect-sequence法によりCRTC1-MAML2融合遺伝子が6例に確認された。CRTC3-MAML2融合遺伝子は確認されなかった。融合遺伝子陽性例はいずれも低悪性度MECであった。上記2種の融合遺伝子は低悪性度MECで出現することはすでに報告されている。本検討においては比較的全例良好な転機を辿っており、予後因子としての有用性は検討し難いものであった。また、過去の報告ではCRTC1-MAML2融合遺伝子の検出頻度は38-70%とばらつきが見られている。本研究では

30%と既報と比較し低かった。いまだ20例と症例が少ないことも一因と考える。

2) 平成28年度

細胞周期/癌抑制遺伝子/上皮間葉分化関連因子の免疫組織学的検討として対象20例への免疫組織化学でのCyclin D1、Cyclin D2、beta-catenin、p53、p16、E-cadherin、vimentinの発現/予後/融合遺伝子型との比較検討を行った。悪性腫瘍における特徴的な染色体再構成は造血器腫瘍や間葉系腫瘍において特に多く認められている。また、特有の臨床病理学的特徴を有する疾患群を形成している。しかし、染色体再構成は上皮系腫瘍においては1%以下と比較的稀である。上皮間葉分化関連因子である、beta-catenin、E-cadherin、vimentinに注目した。高悪性度MECのE-cadherin高発現は2例だったのに比べ低悪性度MECでは8例と高い傾向にあった。Vimentinの発現は高悪性度MECでは3例、低悪性度MECでは5例と低悪性度MECが陽性例は多い結果となったが、一定の傾向は示さなかった。E-cadherinの発現は同一症例の中でも均一ではなく、発現が不均一な症例を認めた。癌細胞が浸潤の際に部分的に上皮間葉転換することは知られており、E-cadherin発現の減弱は部分的な間葉・転換と考えられている。高悪性度MECでは23例中3例のみでこのような間葉転換を認めたが、低悪性度MECにおいては13例中8例に間葉転換と考えるべき部分的なE-cadherin発現の低下を認めた。高悪性度MECと低悪性度MECは同じ粘表皮癌であってもその分子生物学的特性が異なることが知られている。これまで、E-cadherinの発現減弱は転移を引き起こし、頭頸部癌の予後を悪化させる因子として報告されてきた。本検討ではE-cadherinの発現増強が予後が良好であるようなことからこれまでの報告と反対の結果のようにも見える。しかし、低悪性度MECにおいてはE-cadherin発現は低いものの、形態的にもE-cadherin発現も同一・症例の組織内で均一な傾向があり、これが治療効果の安定をもたらしている一因となっている。このためE-cadherinの発現減弱が予後の改善に結びついているものと考え。これを証明するように発現に偏りの多い症例の予後は悪く、高悪性度MECにおいては間葉上皮転換がむしろ放射線化学療法後の治療抵抗性癌細胞残存のファクターとなっているのかもしれない。高悪性度MECと低悪性度MECにおける同一腫瘍内でのheterogeneityについては次世代シーケンサーを用いた遺伝子変化の研究の

観点からも検討することが必要となることが予想された。本研究では腫瘍内のheterogeneityについて上皮間葉転換の面からE-cadherinの発現を用いて検討した。今後はより簡易で質の高い情報を得られる上皮間葉転換の評価システムの確率がテーラード医療への応用にも必要となることが予想される。

粘表皮癌は全唾液腺腫瘍の約5%と稀少な疾患である。今後も症例の蓄積を継続し、来れらの因子についてRT-PCRによる定量的な解析や予後因子としての精密な検討を目指す必要がある。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

藤巻 充寿(FUJIMAKI, Mitsuhsa)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：10514490

