

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19090

研究課題名(和文) アンドロゲン受容体の統合的理解に基づくホルモン依存性唾液腺腫瘍の治療開発

研究課題名(英文) Development of hormone-dependent salivary cancer therapy based on the comprehensive understanding of androgen receptor

研究代表者

櫻井 浩平 (Sakurai, Kouhei)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：10608756

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)：本研究の目的は、唾液腺導管癌 SDCの分子病理学的性質を明らかにすることである。SDCはアンドロゲン受容体ARを発現する、比較的まれな唾液腺悪性腫瘍であり、非常に予後が悪いことが特徴である。SDCの増殖はアンドロゲン依存性であることが報告されている。他のAR発現腫瘍(前立腺癌やアポクリン乳癌)と同様に、アンドロゲン遮断療法がSDCに有効であることが明らかになりつつあるが、SDCの遺伝子発現様式の詳細は不明である。本研究ではSDC、前立腺癌、アポクリン乳癌の3腫瘍の遺伝子発現を比較検討することによって、共通あるいは特異的な性質を明らかにし、SDCの診断マーカー同定や治療開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the molecular pathogenesis of salivary duct carcinoma (SDC). SDC, an androgen receptor (AR)-positive malignancy, is a relatively rare salivary cancer characterized by extremely poor outcome. The growth of SDC is reported to be androgen dependent. Although androgen deprivation therapy (ADT) might be effective in SDC based on its effect on other AR-expressing cancers, such as prostate cancer (PCa) and apocrine carcinoma of the breast (ACB), its detailed gene expression signature in SDC is unclear. In this study we compare the gene expressions of SDC, PCa and ACB to reveal their shared and distinct features. We aim to identify novel diagnostic marker and develop therapeutic strategy for SDC.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：唾液腺導管癌 転写因子 FOXA1 マイクロアレイ

### 1. 研究開始当初の背景

本研究は、アンドロゲン受容体 (Androgen Receptor: AR) を発現する唾液腺悪性腫瘍、特に唾液腺導管癌 (salivary duct carcinoma: SDC) に注目する。SDC は、男性ホルモンであるアンドロゲンに依存して増殖する可能性が指摘されている。前立腺癌や AR を発現するアポクリン乳癌などの類似性が予想されており (図 1)、アンドロゲン除去療法が有効であることも知られている。しかし AR が誘導する遺伝子制御ネットワークは、ほとんど解析されておらず、他のホルモン依存性悪性腫瘍と、どの程度、類似しているかは全く不明である。

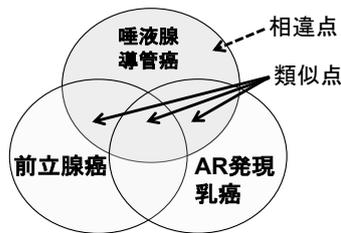


図1. SDC、前立腺癌、AR発現乳癌の類似点、相違点を明らかにする

### 2. 研究の目的

SDC の遺伝子発現プログラムを分子病理学的に解析し、乳癌や前立腺癌と照らし合わせることによって、類似点・相違点を明らかにすることが可能である。本研究は AR を中心とした SDC の遺伝子発現制御の統合的な理解から、SDC の診断マーカーの同定や治療開発を目指した。

### 3. 研究の方法

SDC の多くの症例は、AR を発現することが知られている。SDC と性質が類似していると思われる前立腺癌やアポクリン乳癌と比較検討することで、他の癌との類似点のみならず、SDC 特異的な性質を明らかにする。SDC、前立腺癌、アポクリン乳癌の3つの腫瘍を、病理学的あるいは分子生物学的に解析し、診断マーカーや治療標的分子を同定する (図 2)。

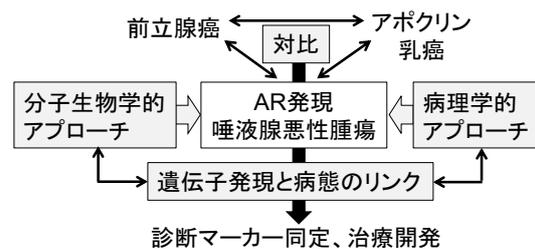


図2. 本研究の進め方

#### (1) 病理学的アプローチ

藤田保健衛生大学病院で、SDC と病理診断された 20 症例のホルマリン固定パラフィン包

埋組織 (formalin-fixed paraffin-embedded tissue: FFPE) 検体を用いて、AR 等の免疫染色を行なった。

#### (2) 分子生物学的アプローチ

SDC の FFPE 検体の癌部と非腫瘍部から、それぞれ RNA を抽出し、マイクロアレイを行った (3D-Gene mRNA Oligo chip)。

### 4. 研究成果

#### (1) 病理学的アプローチの結果

解析した SDC 20 症例全てにおいて、AR が核に陽性であることを確認した。次に、前立腺癌で高発現することが知られている AMACR ( $\alpha$ -methylacyl-CoA Racemase) と、AR 標的遺伝子の一つである TMPRSS2 (Transmembrane protease, serine 2) を SDC 症例で免疫染色した。その結果、AR の発現領域と一致して AMACR と TMPRSS2 の発現が認められた (図 3)。

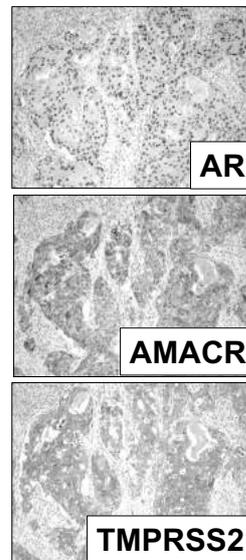


図3. SDCにおけるAR, AMACR, TMPRSS2の免疫染色

AMACR、TMPRSS2 とともに、前立腺癌の進展に関与することが報告されており、SDC においても前立腺癌と同様の分子機構が存在することが示唆された。

さらに、AR の co-factor である FOXA1 (Forkhead box protein A1) の免疫染色も行なった。FOXA1 も、AR の発現領域とほぼ一致して発現がみられた (図 4)

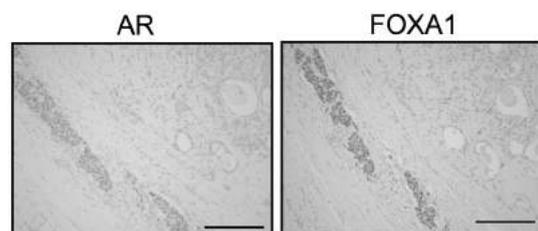


図4. AR と FOXA1 の免疫染色

前立腺癌や乳癌（アポクリン乳癌以外も含む）において、FOXA1 は、pioneer factor としてゲノム DNA 上のクロマチン構造を変換し、AR をはじめホルモンレセプターを動員することが報告されている。さらに FOXA1 は AR と結合し、AR 標的遺伝子の転写を協調的に制御することも知られている。SDC において AR と FOXA1 が共発現していることは、乳癌や前立腺癌と同様の遺伝子制御機構が働いていることが考えられる。上記の通り、本研究では SDC に発現する因子として AMACR、TMPRSS2、FOXA1 を見出した。これらは SDC の診断マーカーとして利用できる可能性があるため、症例数を増やしてさらに検討する。また AMACR、TMPRSS2、FOXA1 のそれぞれの pathway に関連するタンパクの解析も現在、進めているところである。

## (2) 分子生物学的アプローチの結果

SDC 症例の癌部と非腫瘍部から抽出した RNA を用いて、マイクロアレイを行い、非腫瘍部と比較して、癌部で発現上昇（2 倍以上）あるいは低下（1/2 以下）している mRNA に注目した（図 5）。

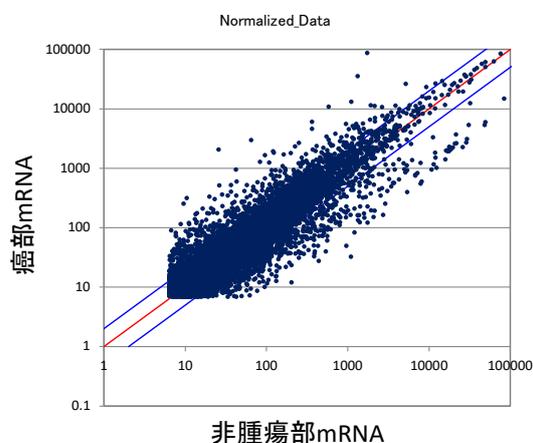


図5. SDC症例の癌部と非腫瘍部における mRNA発現網羅解析

その結果、AR mRNA をはじめとして、これまでに報告のない様々な mRNA の発現が、癌部で変動していることが明らかとなった。その中で、癌部で特に発現が大きく増加あるいは低下している mRNA を解析候補として選択した。現在、RT-PCR と免疫染色による検証を行っているところである。

上記(1)と(2)の結果から、SDC のタンパク発現と mRNA 発現の一部は、前立腺癌や乳癌と類似していることが明らかとなった。今後はタンパクと mRNA の結果を総合的に解析しつつ、他の腫瘍で用いられている治療の応用を目指す。さらに SDC 特異的な進展分子機構も明らかにして、新規の診断マーカー、治療標的分子の同定を目指していく。

## 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 5 件）

(1) Sakurai K, Tsukamoto T.

“Unveiling the protein coding-independent function of the *TET* family in gastric cancer”  
Non-coding RNA Investigation, 2:17, doi: 10.21037/ncr.2018.03.03. (2018)査読有り

(2) Hamed MA, Nakata S, Shiogama K, Suzuki K, Sayed RH, Nishimura Y, Iwata N, Sakurai K, Badawy BS, Inada K, Tsuge H, Tsutsumi Y.

“Cytokeratin 13, cytokeratin 17 and Ki-67 expression in human acquired cholesteatoma and their correlation with its destructive capacity: an immunohistochemical study”  
Clinical and Experimental Otorhinolaryngology, doi: 10.21053/ceo.2016.01263. (2017) 査読有り

(3) Sakurai K, Wasano K, Kawasaki T, Kusafuka K, Urano M, Okabe A, Nakagawa M, Kuroda M, Kasahara M, Tashiro K, Kondo K, Ikeda M, Nakajima A, Imaeda Y, Shiogama K, Mizutani Y, Onouchi T, Hikichi M, Shiroki R, Sato T, Tsutsumi Y, Inada K.

“Immunohistochemical coexpression of androgen receptor and its pioneering factor forkhead box protein A1 in salivary duct carcinoma”  
Journal of Oncology Research and Therapy, Issue 03 (2016) 査読有り

(4) Onouchi T, Shiogama K, Matsui T, Mizutani Y, Sakurai K, Inada K, Tsutsumi Y.

“Visualization of neutrophil extracellular traps and fibrin meshwork in human fibrinopurulent inflammatory lesions. II. Ultrastructural study”  
Acta Histochemica et Cytochemica, 49(4): 117-23 (2016) 査読有り

(5) Shiogama K, Onouchi T, Mizutani Y, Sakurai K, Inada K, Tsutsumi Y.

“Visualization of neutrophil extracellular traps and fibrin meshwork in human fibrinopurulent inflammatory lesions. I. Light microscopic study”  
Acta Histochemica et Cytochemica, 49(4): 109-16 (2016) 査読有り

〔学会発表〕（計 16 件）

(1) 岡部麻子、桐山諭和、鈴木周五、櫻井浩平、高橋智、塚本徹哉

“DNA 二重鎖切断マーカー  $\gamma$ -H2AX を用いた胃発がん物質の短期同定”  
第 34 回 日本毒性病理学会学術総会、沖縄かりゆしアーバンリゾート・ナハ（2018 年 1 月 25～26 日）

(2) 荒川敏、伊勢谷昌志、富重博一、川辺則彦、永田英俊、浅野之夫、伊藤良太郎、清水謙太郎、稲田健一、櫻井浩平、堀口明彦

“大腸癌先進部における低分化胞巣と  
Desmoplastic reactionとリンパ球浸潤の検  
討”  
第26回 日本癌病態治療研究会、横浜マリ  
ンタワーホール、2017年6月1日～2日

(3) 塩竈和也、**櫻井浩平**、稲田健一、堤寛  
“炎症性細胞診標本中に好中球細胞外トラ  
ップは存在するのか?”  
第58回 日本臨床細胞学会、大阪国際会議場、  
2017年5月26日～28日

(4) 塩竈和也、尾之内高慶、水谷泰嘉、**櫻井  
浩平**、稲田健一、堤寛  
“細胞診標本における好中球細胞外トラ  
ップの証明”  
第106回 日本病理学会総会、京王プラザ、  
2017年4月27日～29日

(5) 尾之内高慶、塩竈和也、水谷泰嘉、**櫻井  
浩平**、稲田健一、堤寛  
“NETsとフィブリンの微細構造解析”  
第106回 日本病理学会総会、京王プラザ、  
2017年4月27日～29日

(6) 水谷泰嘉、塩竈和也、尾之内高慶、**櫻井  
浩平**、稲田健一、堤寛  
“酵素抗原法の技術開発：パラフィン包埋切片  
において固定法が抗体活性におよぼす影響”  
第106回 日本病理学会総会、京王プラザ、  
2017年4月27日～29日

(7) **櫻井浩平**  
“前立腺癌進展に関与するアンドロゲン受容  
体制御性non-coding RNA clusters”  
第39回 日本分子生物学会年会、パシフィコ  
横浜、2016年11月30日～12月2日

(8) 尾之内高慶、塩竈和也、水谷泰嘉、**櫻井  
浩平**、稲田健一、堤寛  
“NETsとフィブリンの微細構造：共焦点レー  
ザー顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用い  
たCLEM解析”第57回 日本組織細胞化学  
学会 総会学術集会、杏林大学、2016年9月3  
日～4日

(9) 水谷泰嘉、春宮覚、川久保雅友、塩竈和  
也、尾之内高慶、**櫻井浩平**、稲田健一、中山  
淳、堤寛  
“酵素抗原法によるピロリ菌感染スナネズミ  
における抗ピロリ菌抗体産生細胞の局在証  
明”  
第57回 日本組織細胞化学学会 総会学術集会、  
杏林大学、2016年9月3日～4日

(10) **Sakurai K**, Kusafuka K, Kawai R,  
Urano M, Kuroda M.  
“Shared molecular and pathological  
features among salivary duct carcinoma,  
prostate and breast cancers expressing  
androgen receptor and FOXA1”  
第27回 日本臨床口腔病理学会総会、広島大  
学、2016年8月10日～12日

(11) **櫻井浩平**、和佐野浩一郎、川崎泰士、草  
深公秀、浦野誠

“AR 陽性唾液腺導管癌の進展における  
FOXA1の分子病理学的解析”  
第40回 日本頭頸部癌学会、埼玉ソニックシ  
ティ、2016年6月9日～10日

(12) 和佐野浩一郎、川崎泰士、**櫻井浩平**  
“唾液腺導管癌のアンドロゲン遮断療法に対  
する抵抗性と FOXA1 の発現変動の関連につ  
いて”  
第40回 日本頭頸部癌学会、埼玉ソニックシ  
ティ、2016年6月9日～10日

(13) **櫻井浩平**、塩竈和也、水谷泰嘉、尾之内  
高慶、山道信毅、稲田健一、堤寛  
“ホルモン制御性 long non-coding RNA である  
DRAICは、前立腺癌の浸潤を抑制する”  
(英語発表) 第105回 日本病理学会総会、  
仙台国際センター、2016年5月12日～14  
日

(14) 塩竈和也、尾之内高慶、水谷泰嘉、**櫻井  
浩平**、稲田健一、堤寛  
“HE染色と免疫染色によるNETsとフィブ  
リンの鑑別”  
第105回 日本病理学会総会、仙台国際セン  
ター、2016年5月12日～14日

(15) 水谷泰嘉、塩竈和也、尾之内高慶、**櫻井  
浩平**、稲田健一、堤寛  
“酵素抗原法の技術開発：ホルマリン固定パ  
ラフィン包埋切片作製工程が抗体活性におよ  
ぼす影響” 第105回 日本病理学会総会、仙  
台国際センター、2016年5月12日～14日

(16) 尾之内高慶、塩竈和也、水谷泰嘉、**櫻井  
浩平**、稲田健一、堤寛  
“光-電子相関顕微鏡法によるNETsとフィ  
ブリンの微細構造解析”  
第105回 日本病理学会総会、仙台国際セン  
ター、2016年5月12日～14日

[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：

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 浩平 (Sakurai Kouhei)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号：10608756