

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21591

研究課題名(和文) 唾液腺型腫瘍における新規融合遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel fusion gene in salivary gland tumor

研究代表者

富樫 由紀 (Togashi, Yuki)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 分子標的病理プロジェクト・研究員

研究者番号：00648016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではとくに腺様嚢胞癌に着目し、100例を解析した。全例に対しFISHを施行し、凍結保存検体が利用可能であった27例に対しては分子生物学解析も行った。その結果、27例全例でMYBあるいはMYBL1のmRNA高発現が見られ、それらの遺伝子座の再構成と一致していた。ホルマリン固定パラフィン包埋検体のみ利用可能であった73例によるvalidationにより、ほぼ全例においてMYBあるいはMYBL1遺伝子座の再構成が生じていることを見出した。予後解析により、組織学的グレード、初発時腫瘍サイズ、初発時リンパ節転移は独立した予後不良因子であることが示された。これらの結果を論文に発表した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed 100 cases of adenoid cystic carcinoma (ACC). FISH analyses were performed on all cases, while molecular analyses were also performed on 27 cases whose fresh frozen specimens were available. High levels of mRNA expression of MYB or MYBL1 were observed, and intriguingly the expression was accompanied by the corresponding genomic locus rearrangement in all the 27 cases. FISH assays using additional 73 cases, in which only formalin-fixed paraffin-embedded specimens were available, confirmed that either MYB or MYBL1 locus was rearranged in almost all cases of ACC (70/73). As a result, 97% (97/100) of ACC harbored MYB or MYBL1 locus rearrangement in the present study. In clinicopathological analyses, histological grade, primary tumor size, and lymph node metastasis were identified as independent poor prognostic factors. These results have been published as a peer-reviewed English-written paper.

研究分野：分子生物学

キーワード：融合遺伝子 唾液腺型腫瘍

1. 研究開始当初の背景

唾液腺型腫瘍は、全臓器腫瘍のおよそ 1% にみられる稀な腫瘍である。これまで詳細な解析がなされておらず、治療標的となりうるドライバー変異が潜在している可能性が示唆されていた。唾液腺型腫瘍の組織型は多彩であることから、形態学的分類が困難であり、治療選択に難渋する例が目立つ。しかしながら、近年、唾液腺型腫瘍において融合遺伝子が組織型特異的に同定され、診断に有用となっている。たとえば、粘表皮癌における *CRTC1-MAML2* や 分泌癌における *ETV6-NTRK3*、硝子化明細胞癌における *EWSR1-ATF1*、腺様嚢胞癌における *MYB-NFIB* などである。研究代表者らは 2015 年 7 月に、腺様嚢胞癌の肺腫瘍検体において、新規融合遺伝子 *MYBL1-NFIB* を同定したことから、とくに腺様嚢胞癌に着目することとした。*MYBL1-NFIB* に関しては、2012 年 12 月に海外の研究グループらによって報告がなされた。

これまでの PCR-based の報告から、腺様嚢胞癌のおよそ 60% が *MYB-NFIB* あるいは *MYBL1-NFIB* を有すると推計された。しかしながら、残りの 40% は融合遺伝子陰性であり、病因は不明であった。そこで、本研究課題では、腺様嚢胞癌の病因不明群にフォーカスを当て、多数の腺様嚢胞癌検体を用いて、組織病理学的、分子生物学的手法を組み合わせた独自のアプローチによる腺様嚢胞癌の統合的解析を行った。

2. 研究の目的

本研究課題では、唾液腺型腫瘍の病型診断、悪性度分類、および分子標的治療の開発に寄与することを目的として、とくに腺様嚢胞癌における *MYB-NFIB* あるいは *MYBL1-NFIB* の発生頻度を調べるとともに、それらのいずれも陰性である症例群のドライバー変異を検索した。新規同定した *MYBL1-NFIB* の機能解析も行う予定であったが、途中、海外の研究グループらによって報告がなされたため、本研究では施行しなかった。

3. 研究の方法

2005 年 1 月から 2016 年 10 月までにがん研有明病院で診断・治療を受けた腺様嚢胞癌症例 123 例のうち、3 名の病理医が組織学的レビューを行い、腺様嚢胞癌と確定した 100 症例を解析対象とした。組織学的レビューと同時に、すべての例について、充実性成分の割合によって組織学的グレードが規定された。

まず、*MYB* あるいは *MYBL1* 遺伝子座の構造異常を調べるため、全例について、*MYB*、*MYBL1* の split FISH、*MYB-NFIB*、*MYBL1-NFIB* fusion FISH を施行した。*MYB* split FISH に関しては、conventional なプローブで陰性となった症例については、

これまでの報告で使用されたものよりもはるかに広い領域、すなわち *MYB* 周辺の計 20Mb 弱をカバーするプローブを使用し、再解析を行った。最近、*MYB* 上流の *AIG1* (6q24.2) や下流の *NKAIN2* (6q22.31) と *NFIB* との融合転写産物が報告されたのを考慮したことによる。

続いて、凍結保存検体が利用可能であった 27 例については、以下の解析を行った。

1) *MYB-NFIB* および *MYBL1-NFIB* が取りうる、あらゆる融合点に対応可能な multiplex RT-PCR の系を確立し、得られた産物のダイレクトシーケンスあるいはサブクローニングにて融合点を決定した。必要に応じて、3'-RACE も行った。

2) Capture RNA sequencing により、*MYB*、*MYBL1* の mRNA 発現量やそれらの転写産物を解析した。ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 検体のみ利用可能であった症例 9 例についても capture RNA sequencing を施行した。

さらに、原発部位が頭頸部領域、眼科領域であった 81 症例のうち、*MYB* あるいは *MYBL1* 遺伝子座の再構成が FISH により実証された 78 例について、がん研有明病院頭頸科の協力を得て、臨床情報を収集し、予後因子の抽出を試みた。

4. 研究成果

組織学的グレードについては、充実性成分が 30% に満たない症例を grade 1、30% 以上 50% 未満を grade 2、50% 以上を grade 3 と規定し、high-grade transformation が見られる場合は t を付記し、表記したところ、grade 1 が 65 例、grade 2 が 13 例、grade 3 が 15 例、grade 1t が 5 例、grade 2t が 1 例、grade 3t が 1 例であった。Grade 1,2 を low-grade 群、grade 3 と high-grade transformation 陽性例を high-grade 群と区分すると、low-grade 群が 78 例、high-grade 群が 22 例であった。

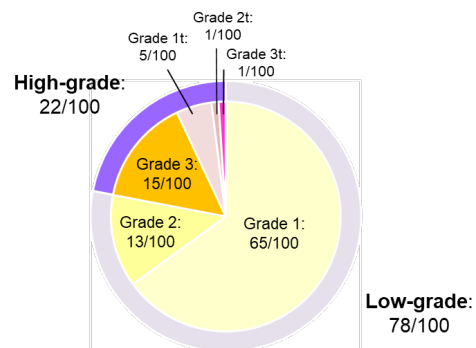


図 1. 解析対象例の組織学的グレード

FISH により *MYB*、*MYBL1* 遺伝子座の再構成が確認されたのはそれぞれ、73 例、24 例

であり、解析対象例のほぼ全例において *MYB* あるいは *MYBL1* の構造異常が生じていることを見出した (97 例/100 例)。

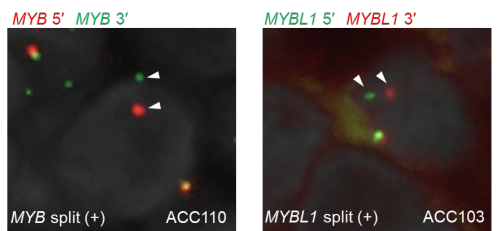


図 2. *MYB*, *MYBL1* split FISH 陽性例

凍結保存検体が利用可能であった 27 例の解析から、以下のことが明らかとなった。

1) *MYB-NFIB*, *MYBL1-NFIB* の頻度と融合点

Multiplex RT-PCR より、*MYB-NFIB* は 9 例 (33%)、*MYBL1-NFIB* は 6 例 (22%) が陽性であった。検出されたすべての転写産物は、DNA 結合ドメイン、転写活性化ドメインを保持していた。また、in-frame だけでなく out of frame である転写産物も検出された。

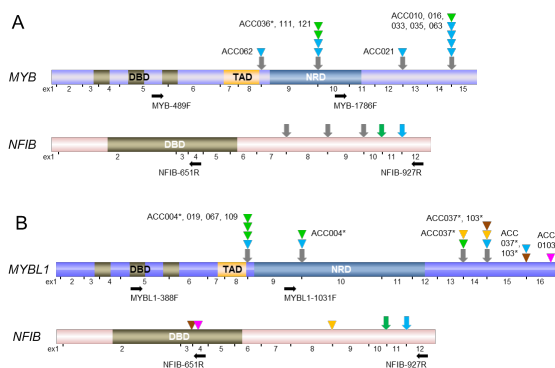


図 3. (A) *MYB-NFIB*, (B) *MYBL1-NFIB* の融合点

2) *MYB*, *MYBL1* の相互排他的な高発現

Capture RNA sequencing より、27 例全例において、*MYB* (18 例, 67%) あるいは *MYBL1* (9 例, 33%) の mRNA が相互排他的に高発現していた。また、*MYB* あるいは *MYBL1* の高発現は、それらの遺伝子座の再構成と一致していた。

3) *MYB*, *MYBL1* 転写産物の多様性

Capture RNA sequencing, 3'-RACE より、PCR 陰性であった 12 例のうち、3 例から *MYB* exon 14 と *NFIB* 3' 下流の遺伝子外領域の融合配列が得られ、1 例からは *MYBL1* exon 10-*RAD51B* intron 9 の融合配列が得られた。残り 8 例のうち、6 例からは全長型 *MYB*, 2 例からは切断型 *MYBL1* の転写産物が得られた。

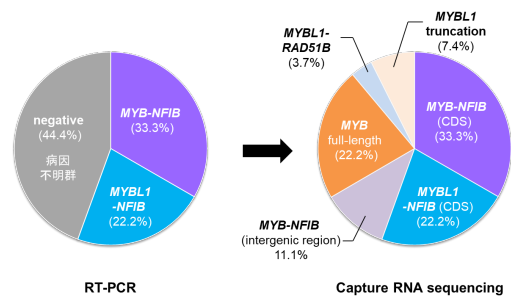
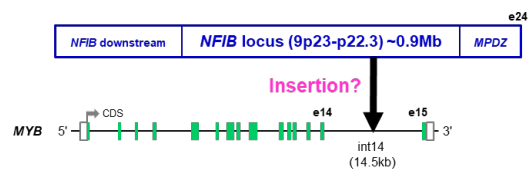


図 4. Capture RNA sequencing により明らかとなった、*MYB*, *MYBL1* 転写産物の多様性

4) *MYB* への *NFIB* 遺伝子座の small insertion

Capture RNA sequencing より、*MYB* split FISH は陰性であったことから一見 *MYB* の構造異常は陰性であるように見えるが、*MYB-NFIB* fusion FISH は陽性であった 3 症例のうち 2 例において、*MYB* への *NFIB* 遺伝子座の 1Mb 未満と考えられる small insertion が示唆される転写産物が得られた。

Case 1



Case 2

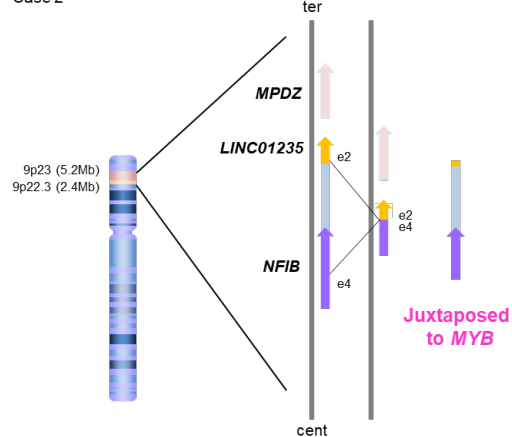


図 5. *MYB* split FISH 陰性、*MYB-NFIB* fusion FISH 陽性であった症例の転写産物から予想される再構成様式

原発組織が頭頸部・眼科領域であった 81 例のうち、FISH により *MYB* あるいは *MYBL1* 遺伝子座の再構成が実証された 78 例の全生存期間について単変量解析を行ったところ、初発時腫瘍サイズ (30 mm <, $P = 0.0028$)、初発時リンパ節転移 (positive, $P < 0.0001$)、組織学的グレード (high, $P = 0.0022$) は予後不良因子であった。多変量解

析により、これらは独立した因子であることが明らかとなった ($P = 0.003$, $P = 0.002$, $P < 0.001$)。また、MYB, MYBL1 遺伝子座の再構成による予後の差は認められなかったものの、MYB 遺伝子座に再構成がある群 (61 例) は MYBL1 遺伝子座に再構成がある群 (17 例) と比較して、組織学的グレードが高い傾向が見られた。

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)

Togashi Y, Dobashi A, Sakata S, Sato Y, Baba S, Seto A, Mitani H, Kawabata K, Takeuchi K.

MYB and MYBL1 in adenoid cystic carcinoma: diversity in the mode of genomic rearrangement and transcripts

Modern Pathology, 査読あり, doi: 10.1038/s41379-018-0008-8. [Epub ahead of print]

[学会発表](計 2 件)

1. 富樫由紀, 土橋映仁, 坂田征士, 佐藤由紀子, 馬場郷子, 竹内賢吾

腺様嚢胞癌における病因論的考察: 組織病理学, 分子生物学, バイオインフォマティクスを用いた統合的解析による 101 例の検討

第 61 回日本唾液腺学会学術集会

2016 年 12 月 3 日, 文京学院大学本郷キャンパス (東京都文京区)

2. 富樫由紀, 土橋映仁, 坂田征士, 佐藤由紀子, 馬場郷子, 蛭名彩, 瀬戸陽, 三谷浩樹, 川端一嘉, 竹内賢吾

腺様嚢胞癌 100 例の検討: 組織病理学, 分子生物学, バイオインフォマティクスを用いた統合的解析

第 41 回日本頭頸部癌学会

2017 年 6 月 9 日, ウェスティン都ホテル京都 (京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富樫 由紀 (Togashi Yuki)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 分子標的病理プロジェクト・研究助手

研究者番号: 00648016