

平成22年6月18日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19590367
 研究課題名 (和文) 唾液腺多形腺腫の悪性化における多段階発癌機序の分子病理学的解明
 研究課題名 (英文) Molecular Pathologic Analysis for Mechanisms of Multistep Carcinogenesis of Malignant Transformation in Salivary Gland Pleomorphic Adenoma
 研究代表者
 長尾 俊孝 (NAGAO TOSHITAKA)
 東京医科大学・医学部・教授
 研究者番号：90276709

研究成果の概要 (和文)：唾液腺多形腺腫の悪性化における発癌機序の解明を目的に、多形腺腫由来癌組織標本を用いた病理学的解析を行った。組織学的に悪性成分は高悪性度癌であり、癌発生の早期では既存の多形腺腫の導管を癌細胞が置換しながら増殖していた。また、免疫組織化学的に、癌成分は細胞増殖能が高く、p53 と HER2/*neu* が高率に陽性であった。遺伝子解析では、*H-, K-, N-ras* 遺伝子の変異はなかったが、癌成分にのみ p53 遺伝子の LOH と点突然変異が認められた。今後、目的に向けてさらなる検索を行う必要がある。

研究成果の概要 (英文)：To clarify the mechanisms of multistep carcinogenesis of malignant transformation in salivary gland pleomorphic adenoma, pathologic analysis has been done using histologic specimens taken from carcinoma ex pleomorphic adenoma cases. Histologically, malignant component was high-grade carcinoma and in the early stage of development, carcinoma cells proliferated replacing by ductal structures of pre-existing pleomorphic adenoma. Immunohistochemical study revealed that carcinoma component had high proliferative activities and was frequently positive for p53 and HER2/*neu*. Molecular analysis demonstrated the loss of heterozygosity at p53 microsatellite loci, accompanied by p53 gene point mutation, only in the carcinoma component, but no genetic alterations have been detected in the *H-, K-, and N-ras* genes. More elaborated studies would be necessary to further progress in this field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：唾液腺、癌、病理学、発癌機構、悪性化、遺伝子、免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで当教室にファイルさ

れている約 2500 例に上る唾液腺腫瘍の病理組織分類の確立を行うと共に、これらの

中からまれで臨床病理像が定まっていな
い腫瘍型を取り上げて、免疫組織化学的、
電顕的、および分子生物学的手法を用い
ながらそれらの腫瘍の病因を含めた病理学
的性質を明らかにしてきた。また、今ま
でに報告がなく、概念が確立されていない
腫瘍型を見出し、その病理学的特徴につ
いての報告も行ってきた。さらに、申請者
は2005年に刊行された唾液腺腫瘍新 WHO
組織分類の編纂に本邦の代表として参画
し、国際的な唾液腺腫瘍の組織分類の基
準作りに直接関与するなど、世界の唾液
腺専門病理医とも密な交流を図ってきた。

一方、多形腺腫は、最も発生頻度の高
い良性の唾液腺腫瘍であり、最近になっ
て *β-catenin* 遺伝子や *LIFR* 遺伝子との相互
転座によって起こる *PLG1* と命名された
遺伝子の発現の活性化がこの腫瘍の発生
に深く関与しているとする報告がなされ
ており、注目を集めている。従来より、
多形腺腫の1割弱の症例に悪性化を来す
ことが知られており、このような症例は
多形腺腫由来癌と呼ばれる。この多形
腺腫由来癌をモデルにした唾液腺良性腫
瘍の悪性化における発癌機序を解析する
ことは、唾液腺癌における多段階発癌を
考える上で非常に重要と考えられる。ま
た、そこから導き出された結果は、今後
の唾液腺癌の診断や遺伝子治療への応
用や他臓器腫瘍との比較検討による臓
器特異性の解明などにも深く関係して
くる。しかし、多形腺腫由来癌は比較
的まれな腫瘍であることもあって、その
分子病理学的な解析はほとんど行われ
ておらず、癌関連蛋白の異常発現に関
しても明らかにされているのはごく限
られた分子のみであるのが現状である。

2. 研究の目的

上記のような背景から行った本研究の
目的は、多形腺腫由来癌症例における病
理組織学的変化、癌抑制遺伝子産物・癌
遺伝子産物・細胞周期関連蛋白といった
種々の癌関連蛋白発現の異常、および
遺伝子変異を解析することにより、唾
液腺癌の多段階発癌機序を解明するこ
とにある。すなわち、悪性化した多形
腺腫症例の病理標本を用いて、正常部
、多形腺腫部、および癌腫部における
癌関連蛋白発現や遺伝子の変異の差
異を免疫組織化学的、分子生物学的手
法を用いて検討し、その多段階発癌機
序に迫ろうとするものである。

まず、申請者の教室にストックされて
いる約100例の多形腺腫由来癌の HE
標本を

用いて、詳細な組織学的検討により悪
性化の組織基準をより明確にし、その
癌腫成分の組織分類を行った。次に、
免疫組織化学的に良性部分と悪性部分
との癌関連蛋白の発現様式の差異を
検討した。そして、遺伝子レベルで
の解析を行い、唾液腺癌の多段階発
癌における特異的な遺伝子の変異に
ついて解析した。

3. 研究の方法

(1) 多形腺腫由来癌症例標本の病理組
織学的検討と免疫組織化学的検討を行
った。

①申請者の教室にストックされている約
2,500例におよぶ大唾液腺腫瘍の手術
検体標本の中からセレクトされた約100
例の多形腺腫由来癌症例(約1200例
の多形腺腫症例の中で悪性化した症
例)の HE 標本を用いて、詳細な組織
学的検討により従来から用いられて
いる悪性化の組織基準をより明確に
し、その癌腫成分の組織分類を行っ
た。

②多形腺腫組織内での癌細胞の進展
様式の検討は、HE 標本と上皮マーカー
(*pan-CK*, *EMA*, *CEA*)・筋上皮マーカー
(α -*SMA*, *S-100* 蛋白, *calponin*, *p63*)・および
Ki-67 の免疫染色標本を照らし合
わせながら行った。免疫組織化学
的検討には当教室にある自動免疫染
色装置 (*Ventana* 社製) を使用した。

③多形腺腫由来癌における *p53*, *HER-2/neu*,
Ki-67 といった癌抑制遺伝子産物、
癌遺伝子産物、および細胞周期関連
蛋白の発現を免疫組織化学的に検
討し、良性部分と悪性部分との発
現様式の差異について調べた。

(2) 多形腺腫由来癌標本(25症例)か
ら抽出した DNA を用いて、多形腺腫
の悪性化における遺伝子変異の解
析も行った。すなわち、多形腺腫
由来癌の良性部分と悪性部分およ
び腫瘍周囲の正常唾液腺組織を HE
染色標本から *Laser Capture Microdissection*
法(当教室にある *Arcturus* 社, *LM200*,
Pixcell IIe を使用)を用いて、DNA
を抽出した。まず、抽出した DNA
を蛍光標識(6-FAM)したプライマ
ーを用いて PCR にて増幅し、17p
領域(*TP53* と *p53* intron 1 の VNTR
部)の LOH の検出を行った。さら
に、*H-, K-, N-ras* 遺伝子の codon
12, 13 および 61 と *p53* 遺伝子
(Exon 5-8)における遺伝子変異の
有無に関しては DNA direct
sequence 法によりその変異様式
を調べた。上記の DNA 解析には
ABI 社の *Genetic Analyzer 310*
を使用した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

本研究では、多形腺腫の悪性化にお
ける発癌機序を解明するために、ヒ
トから手術的に採取された多形腺腫
由来癌の病理組織標本を用いて、組
織学的、免疫組織化学的、および
分子病理学的な側面からのアプローチ

行った。

まず、病理組織学的には、癌腫成分の組織分類とその頻度や多形腺腫由来癌の早期の段階における癌細胞の進展機序を明らかにした。すなわち、多形腺腫由来癌症例の標本を組織学的に検討した結果、悪性部分の組織型は、ほとんどが高悪性度癌で、その内訳は唾液腺導管癌(図1)が最も多く、その他、腺癌 NOS、筋上皮癌、未分化癌の順であった。

さらに、多形腺腫と癌腫との境界部分では、悪性成分が唾液腺導管癌や腺癌 NOS の場合、多形腺腫の導管構造部分を置換するようにしてその内腔側沿って癌細胞が増殖していた(図2)。

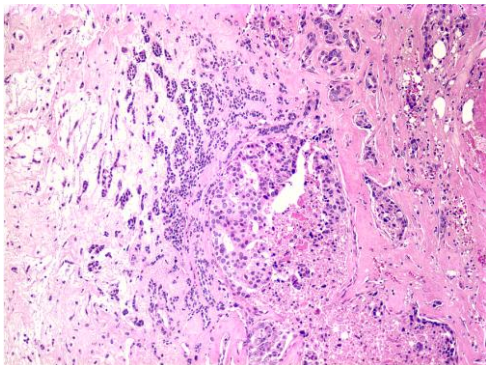


図1. 図左方に多形腺腫成分、図右方に唾液腺導管癌成分をみる。(HE 染色)

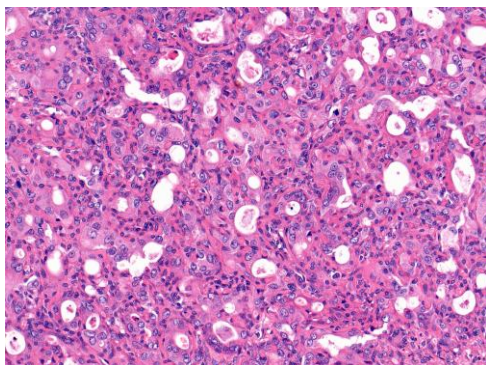


図2. 多形腺腫の導管構造部分を置換しながら癌細胞が増殖している。(HE 染色)

免疫組織化学的に検討してみると、癌細胞で置換された多形腺腫内の導管構造部では、導管構造内腔側に位置する癌細胞は pan-CK, EMA, CEA といった上皮マーカー陽性で、それを筋上皮マーカー (α -SMA, S-100 蛋白, calponin, p63) 陽性腫瘍性筋上皮細胞が縁取って認められた(図3)。このことから癌細胞は多形腺腫の導管上皮細胞から発生したであろうことが示唆された。

また、全ての症例において悪性部分は有意に Ki-67 陽性率が高く(図4)、約半数の症例では悪性部分にのみ p53(図5)と HER2/neu(図6)がびまん性に陽性であった。

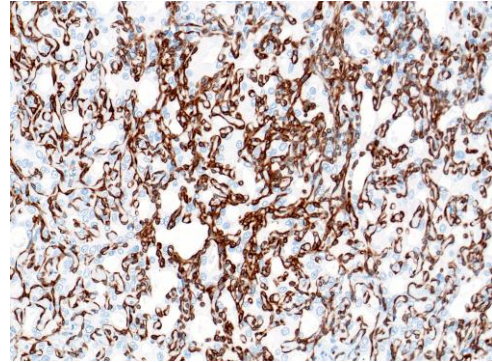


図3. 癌細胞は calponin 陽性細胞によって縁取られている。(免疫組織化学)

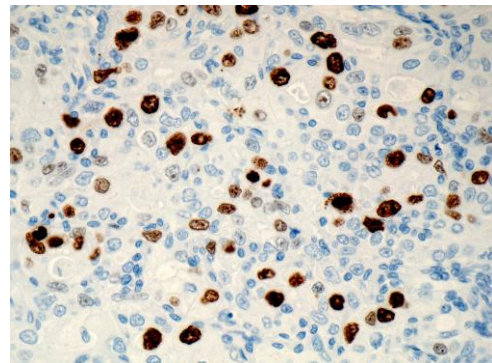


図4. 癌細胞は高い Ki-67 陽性率を示す。(免疫組織化学)

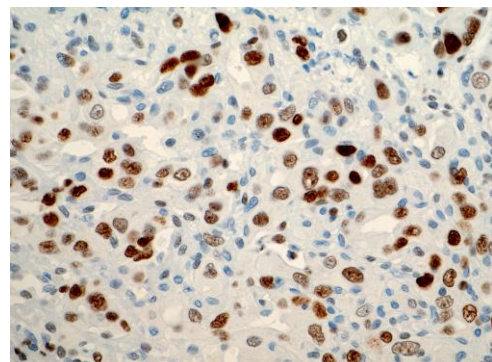


図5. 癌細胞は p53 陽性である。(免疫組織化学)

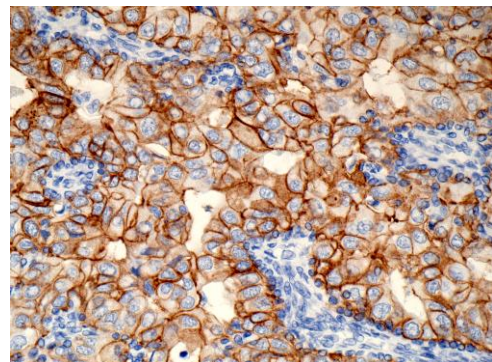


図6. 癌細胞は HER2/neu 陽性である。(免疫組織化学)

つぎに、多形腺腫由来癌症例から抽出した DNA を用いた PCR-direct DNA sequence 法による解析では、*H-, K-, N-ras* 遺伝子の codon12, 13 および 61 の point mutation は見出し得なかった。しかし、多型性マーカーを用いた LOH の検出と *p53* 遺伝子の変異様式を検索したところ、*p53* 陽性癌組織においてのみ 17p 領域の LOH と *p53* 遺伝子の点突然変異が認められた (図 7)。

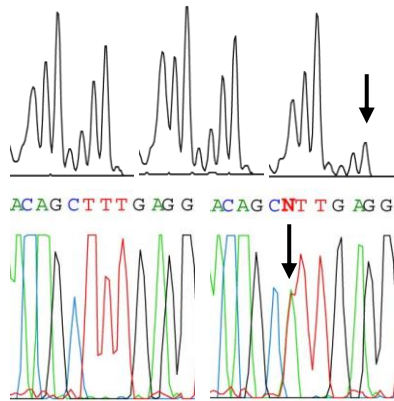


図 7. (上図) 図左側から非腫瘍成分、多形腺腫成分、癌腫成分の順。癌腫成分にのみ LOH を認める。(下図) *p53* 遺伝子 (exon 8). 図左側の多形腺腫成分は野生型であるが、図右側の癌成分には codon 270 に点突然変異 (TTT to ATT) を認める。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

大腸癌に限らず胃癌、膵癌、肝細胞癌、脳腫瘍などにおいても多段階発癌と遺伝子変化との関係の解析が進んでいる。多形腺腫の悪性化は、これらの癌におけるそれと対比しうる貴重な病変であり、その遺伝子変化を解析することは発癌機構の臓器特異性とも深く関わってくる。従って、本研究目的である多形腺腫の悪性化における癌関連蛋白発現の検討や遺伝子的な解析から、詳細な病理組織学的検討を合わせて行うことにより、唾液腺癌の発癌機序の解明に重要な知見が得られた。また、本研究結果は今後の唾液腺癌の診断や遺伝子治療の基礎的データとして必要不可欠なものになると考えられる。国内外いずれにあっても唾液腺腫瘍の病理学的研究は、ごく限られたグループによって行われているに過ぎない。とくに、唾液腺癌発生における遺伝子異常の解明は他の臓器の癌に比べてかなり立ち後れているのが現状である。従って、多形腺腫由来癌をモデルにした唾液腺癌における多段階発癌機序を遺伝子レベルで解明することは世界的に先駆的な研究とみなされよう。

(3) 今後の展望

今後は、多形腺腫由来癌症例組織標本を用

いた種々の癌抑制遺伝子産物、癌遺伝子産物、細胞周期関連蛋白、増殖因子、細胞接着分子、およびホルモンレセプターの発現様式、*in situ* hybridization 法を用いた *PLAG1* 遺伝子発現、および FISH 法による染色体相互転座や *HER-2/neu* 遺伝子増幅の検索により、多形腺腫の多段階発癌機序の解明に多方面から迫る必要がある。さらには、*de novo* 発生の唾液腺癌も上記と同様の検索を行い、多形腺腫を経て癌化したものとの比較検討を行うと共に、組織形態との関連性についても詳細な解析を加えていきたいと考えている。

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 18 件)

1. Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C: Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a *p53*-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有, 107: 7461-7466, 2010.
2. Inoue R, Nakazawa A, Tsukada N, Katoh Y, Nagao T, Nakanuma Y, Mukai K: POEMS syndrome with idiopathic portal hypertension: autopsy case and review of the literature. Pathol Int, 査読有, 60: 316-320, 2010.
3. 小山芳徳, 長尾俊孝, 山崎一人, 石田康生: 病理 耳下腺腫瘍の細胞診. 検査と技術, 査読無, 38: 99-105, 2010.
4. 長尾俊孝: 【唾液腺腫瘍 その取扱いをめぐって】 唾液腺腫瘍の病理 2005 年改訂 WHO 分類を中心に. JOHNS, 査読無, 26: 147-152, 2010.
5. 長尾俊孝, 井上理恵: 病理形態学キーワード 第 1 章頭頸部「明細胞」. 病理と臨床, 査読無, 臨増 28: 10-11, 2010.
6. 三宅真司, 松林 純, 長尾俊孝: 【顕微鏡検査のコツ 臨床に役立つ形態学】 細胞診呼吸器 気管支擦過. 検査と技術, 査読無, 37: 1175-1177, 2009.
7. 長尾俊孝: 他領域からのトピックス 唾液腺腫瘍の病理. 日本耳鼻咽喉科学会会報, 査読無, 112: 601-608, 2009.
8. 里見貴史, 河野通秀, 續 雅子, 渡辺正人, 蔵口潤, 松林純, 長尾俊孝, 千葉博茂: 急速な再発、転移をきたした顎下腺原発粘表皮癌の 1 例. 北海道医療大学歯学雑誌, 査読有, 28: 1880-1892, 2009.
9. Shinozaki A, Nagao T, Endo H, Kato N,

- Hirokawa M, Mizobuchi K, Komatsu M, Igarashi T, Yokoyama M, Masuda S, Sano K, Izumi M, Fukayama M, Mukai K: Sebaceous epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary gland: Clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 6 cases of a new histologic variant. *Am J Surg Pathol*, 査読有, 32: 913-923, 2008.
10. Hosaka H, Nagata A, Yoshida T, Shibata T, Nagao T, Tanaka T, Saito Y, Tatsuno I: Pancreatic polypeptide is secreted from and controls differentiation through its specific receptors in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Peptides*, 査読有, 29: 1390-1395, 2008.
 11. 大内知之、賀来 亨、長尾俊孝: 外科病理マニュアル「唾液腺」. 病理と臨床, 査読無, 26 臨時増刊号: 185-189, 2008.
 12. 長尾俊孝: 唾液腺腫瘍の組織分類と病理診断. 日本耳鼻咽喉科学会会報, 査読無, 111: 542-545, 2008.
 13. 長尾俊孝: 耳下腺腫瘍臨床の最前線 — 耳下腺腫瘍の病理診断 —. 頭頸部癌, 査読無, 34: 372-378, 2008.
 14. Koide H, Shibata T, Yamada N, Asaki T, Nagao T, Yoshida T, Noguchi Y, Tanaka T, Saito Y, Tatsuno I: Tumor suppressor candidate 5 (TUSC5) is expressed in brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 360: 139-145, 2007.
 15. Iwaya K, Oikawa K, Semba S, Tsuchiya B, Mukai Y, Otsubo T, Nagao T, Izumi M, Kuroda M, Domoto H, Mukai K: Correlation between liver metastasis of the colocalization of actin-related protein 2 and 3 complex and WAVE2 in colorectal carcinoma. *Cancer Sci*, 査読有, 98: 992-999, 2007.
 16. 長尾俊孝: 唾液腺腫瘍の組織分類と病理診断. 日本唾液腺学会誌, 査読無, 48: 39-53, 2007.
- [学会発表] (計 36 件)
1. 長尾俊孝: 【特別講演】唾液腺腫瘍の病理診断. 東海医学会, 2010 年 2 月 26 日, 神奈川.
 2. 長尾俊孝: 【教育講演】唾液腺腫瘍 — 新 WHO 分類を踏まえて —. IAP 日本支部教育セミナー, 2009 年 11 月 21 日, 東京.
 3. 清水 顕, 伊藤博之, 長尾俊孝, 北村剛一, 豊村文将, 吉田知之, 鈴木 衛: 当科における耳下腺腫瘍の検討. 日本頭頸部癌学会, 2009 年 6 月 10 日, 札幌.
 4. 長尾俊孝: 【特別講演】病理診断学的アプローチによる腫瘍の解析と今後の展望 — 唾液腺腫瘍における研究を中心として —. 東京医科大学医学会総会, 2009 年 6 月 6 日, 東京.
 5. 長尾俊孝: 【特別講演】唾液腺腫瘍の病理診断. 千葉大学医学部病理同門会, 2009 年 5 月 16 日, 千葉.
 6. 小林賀子, 清水 顕, 長尾俊孝, 伊藤博之, 北村剛一, 飯村陽一, 豊村文将, 鈴木 衛: 当科における顎下腺腫瘍の病理学的・臨床学的検討. 日本耳鼻咽喉科学会, 2009 年 5 月 14 日, 東京.
 7. 長尾俊孝, 加藤 拓: 【講演】唾液腺 — 新 WHO 分類に基づく病理組織診断と細胞診との相関 —. 京都病理セミナー, 2009 年 5 月 4 日, 京都.
 8. 長尾俊孝: 【特別講演】唾液腺腫瘍の病理診断. 千葉頭頸部腫瘍研究会, 2009 年 2 月 21 日, 千葉.
 9. Nagao T: 【Slide Seminar, Invited】Salivary gland pathology. The 27th International Congress of the International Academy of Pathology, 2008 年 10 月 14 日, Athens, Greece.
 10. Nagao T: 【Lecture, Invited】Update on salivary gland tumors. Surgical Pathology Update 2008, The Japanese Division of the International Academy of Pathology, 2008 年 6 月 14 日, 湘南.
 11. 長尾俊孝: 【シンポジウム】耳下腺腫瘍臨床の最前線 — 耳下腺腫瘍の病理診断 —. 第 32 回日本頭頸部癌学会, 2008 年 6 月 11 日, 東京.
 12. 篠崎 綾, 長尾俊孝, 遠藤久子, 向井 清, 深山正久: 唾液腺上皮筋上皮癌, 脂腺垂型の臨床病理学的検討 — 新しい垂型の提唱 —. 第 97 回日本病理学会総会, 2008 年 5 月 16 日, 金沢.
 13. Nagao T, Shinozaki A, Fukayama M, Mukai K: Sebaceous epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary gland: A report of 6 cases of a new histologic variant. 2008 United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, 2008 年 3 月 2 日, 米国, デンバー.
 14. 長尾俊孝: 【教育講演】唾液腺腫瘍の組織分類と病理診断. 第 33 回日本耳鼻咽喉科学会夏期講習会, 2007 年 7 月 15 日, 東京.
 15. 長尾俊孝, 三宅真司, 向井 清: 【ワークショップ】稀な唾液腺悪性腫瘍の細胞像. 第 48 回日本臨床細胞学会春期大会, 2007 年 6 月 8 日, 千葉.
 16. 若槻よしえ, 長尾俊孝, 三宅真司, 芹澤博美, 小野寺清隆, 石田康生, 向井 清: 【ワークショップ】発生頻度の高い唾液腺悪性腫瘍の細胞像 (腺房細胞癌・粘表皮癌・腺様嚢胞癌). 第 48 回日本臨床細胞学会春期大会, 2007 年 6 月 8 日, 千葉.
- [図書] (計 2 件)
1. Eveson JW, Nagao T, Informa Healthcare,

Surgical Pathology of the Head and Neck, 3rd Edition. 2009 年, 173 ページ.

2. 長尾俊孝, 南山堂, 病理画像スタディブック ―CBT・医師国家試験の対策として―. CD-R, 2008 年.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長尾 俊孝 (NAGAO TOSHITAKA)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 90276709

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし