

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07789

研究課題名（和文）腺様嚢胞癌の患者由来細胞株樹立と新規治療標的探索

研究課題名（英文）Establishment of patient-derived cell lines and exploration of novel therapeutic targets in adenoid cystic carcinoma

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：稀少癌である腺様嚢胞癌（ACC）は、長期予後不良な唾液腺型腫瘍である。局所再発や遠隔転移が頻発し、実臨床では有効な阻害剤が切望されてきた。しかしながら、これまで有効な阻害剤に関する知見は乏しく、有効な治療法の確立は困難である現況にある。疾患の稀少性と診断の困難さはもとより、阻害剤の効果を評価し、詳細な分子生物学的解析をするための有用な実験モデルの欠如も原因の一つである。本研究では、腺様嚢胞癌に加えて、同様に唾液腺型腫瘍に分類され、きわめて予後不良かつ標準的な薬物療法が十分に確立されていない唾液腺導管癌（SDC）の患者検体より、実験モデルの樹立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺型腫瘍に分類されるACCおよびSDCは、いずれも稀少癌であり、有効な治療法の確立が求められている。本研究では、患者検体より実験モデルの構築を行い、実際の患者検体と組織像および遺伝子の構造異常、mRNA発現、タンパク発現などの分子生物学的特徴を詳細に比較検討することで、患者検体の性質を保持したモデルであることを担保した。有用な実験モデルの樹立は、今後のACCおよびSDCの治療標的の発見および有効な治療法の確立に資するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Adenoid cystic carcinoma (ACC) is a rare salivary gland-type tumor with poor long-term prognosis. Establishment of practical therapies using effective inhibitors has been desired in clinical settings, as managing the characteristic frequent local recurrence and distal metastasis of ACC is challenging. However, due to the lack of valuable insights, no effective systemic therapies are available still now. Not only the rarity of ACC and difficulty in diagnosis, but also the lack of useful experimental models to evaluate the effect of inhibitors and to perform detailed molecular biological analyses would lead the tough situation. In the present study, we developed experimental models using surgical specimens of ACC and SDC (salivary duct carcinoma), which is also a rare salivary gland-type tumor with extremely poor prognosis and for which standard therapies are not well established yet.

研究分野：唾液腺型腫瘍

キーワード：唾液腺型腫瘍 融合遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

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。唾液腺型腫瘍の組織型は多彩であり、分類が困難であることから、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、癌のドライバー変異と目される融合遺伝子が組織型特異的に同定されており、確定診断に有用となっている。唾液腺型腫瘍の一種である腺様嚢胞癌 (adenoid cystic carcinoma, ACC) では、2009年に *MYB-NFIB* が初めて報告され、2016年には新たな融合遺伝子として *MYBL1-NFIB* が報告された。本邦における ACC の年間発生率は、人口10万人当たり6例未満であり、きわめて稀な腫瘍である。病状の進行は比較的緩やかであるが、局所再発や遠隔転移が頻発することが特徴として挙げられ、長期予後は不良である。現状では為す術なく、治療が手詰まりになってしまふことが多いため、実臨床では有効な阻害剤が切望されてきた。しかしながら、これまで有効な阻害剤に関する知見は乏しく、有効な治療法の確立は困難であると言わざるを得ない現況にある。この理由として、稀少癌であること、診断がむずかしく、分類が困難で、かつ有用な悪性度分類が確立されていないことが挙げられるが、阻害剤の効果を評価し、詳細な分子生物学的解析をするための有用な細胞株や動物モデルが欠如していることも、原因の一つである。申請者はこれまでに、100例の ACC 症例を用いて、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統合的解析を行い、ほぼすべての症例において、*MYB* あるいは *MYBL1* が高発現するようになる染色体構造異常を相互排他的に有し、それらの転写産物は、融合型、切断型、全長型と多様性に富むことを明らかにしてきた (Togashi Y et al. *Mod Pathol*. 2018)。

2. 研究の目的

本研究では、ACC 患者の手術検体より得られた原発組織あるいは再発、転移巣から初代培養細胞株や動物モデルなどを樹立し、治療標的分子の探索と治療法の発見を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 解析対象症例の分子生物学的解析と組織型の確定

ACC は稀少癌であり、症例の集積は困難であるが、臨床医および病理医の助力を得て、検体の収集を図った。まず ACC と診断あるいは疑診された患者の手術検体について、詳細な組織病理学的検討を行った。また、残余検体より total RNA を抽出し、すでに確立していた multiplex RT-PCR の系を適用して、融合遺伝子の有無や転写産物を解析した。この系は、*MYB-NFIB* および *MYBL1-NFIB* が取りうる、あらゆる融合点に対応することが可能なものである。また、当該手術検体のホルマリン固定・パラフィン包埋 (FFPE) 検体を用いた Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)、すなわち *MYB*, *MYBL1* の split FISH および *MYB-NFIB*, *MYBL1-NFIB* の fusion FISH を合わせて施行し、*MYB* あるいは *MYBL1* 再構成の確認を行った。さらに、全例に対して RNA seq を施行し、*MYB* あるいは *MYBL1* の相互排他的な mRNA 高発現や遺伝子構造異常の検証を行った。これらの結果を踏まえて、組織型の確定を行った。ACC の類縁疾患である唾液腺導管癌 (salivary duct carcinoma, SDC) は当初、解析対象としていなかったが、ACC 同様に稀な腫瘍であり、きわめて予後不良かつ標準的な薬物療法が十分に確立されていないことから、今回の解析対象に含めることとした。

(2) 患者検体からの実験モデル構築

ACC と診断あるいは疑診された症例の手術残余検体をマウス皮下に移植し、PDX (Patient-derived xenograft) モデルの構築を試みた。腫瘍が生着して増大が見られたタイミングで継代を行い、継代毎に腫瘍組織を採取して、凍結ストックと FFPE ブロックの作製を行った。順調に継代が進んだ症例に関して、患者由来の検体と PDX 検体の組織像を詳細に比較検討した。また、ヒト *GAPDH* とマウス *Gapdh* 特異的なプライマーセットを用いた RT-PCR により、PDX 検体がヒト由来の組織であることを担保し、その上で (1) の multiplex RT-PCR、FISH、RNA seq を施行した。必要に応じて、RNA seq などから得られた情報にもとづき、特異的 RT-PCR や genomic PCR を施行した。また、*MYB* と *PLAG1* の免疫染色による検討を追加し、染色パターンの比較を行った。

4. 研究成果

(1) 解析対象症例の分子生物学的解析と組織型の確定

収集可能であった 14 症例のうち、組織学的検討および分子生物学解析により、ACC であることが確定されたのは 12 例であった。Multiplex RT-PCR と RNA seq により、これら 12 例の *MYB* あるいは *MYBL1* の転写産物や mRNA の高発現を確認した。また、FISH により、*MYB* あるいは *MYBL1* の遺伝子再構成が裏付けられた。残りの 2 例は、組織学的検討により、SDC と確定した。このうちの 1 例では、RNA seq より、*CHCHD7* (Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7) - *PLAG1* (Pleomorphic adenoma gene 1) 融合遺伝子が検出され、特異的 RT-PCR および genomic PCR により、融合配列を確認した。もう 1 例は多形腺腫型の SDC であり、今回の検討では、遺伝子の構造異常は検出されなかった。以上の結果を図 1, 2 に示す。

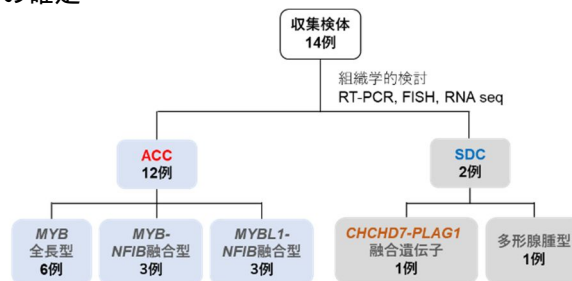


図 1. 解析対象例の内訳

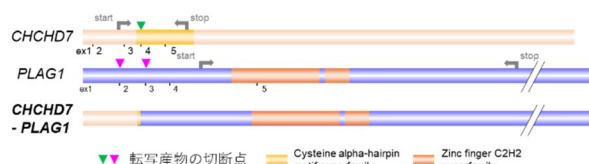


図 2. *CHCHD7-PLAG1* 融合遺伝子の構造図

(2) 患者検体からの実験モデル構築

充実型の組織像を呈する ACC 症例の 1 例においては、PDX モデル樹立の途上にある。本症例の患者検体の転写産物は *MYB* 全長型を示し、*MYB* の mRNA が高発現していた。これまでに収集した PDX 検体でも、*MYB* の mRNA および *MYB* タンパクが患者検体と同程度に高発現していることを、RNA seq および *MYB* 免疫染色により確認した。FISH により、*MYB* の構造異常を検証済みである。PDX 検体の形態は患者検体に相似した充実型を呈し、継代を重ねても再現されていた。結果を図 3 に示す。

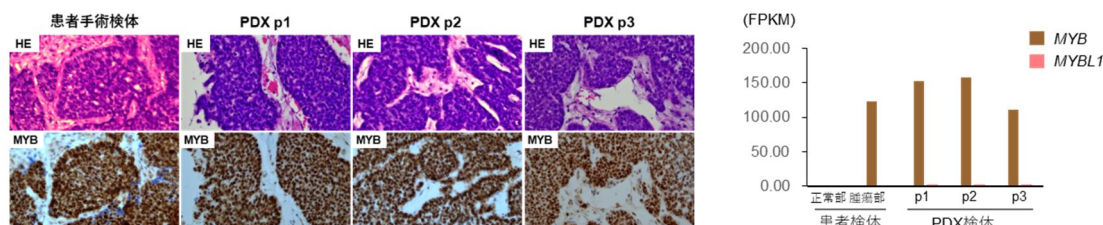


図 3. ACC 患者検体と PDX 検体における *MYB* タンパク発現と mRNA 発現

また、*CHCHD7-PLAG1* 融合遺伝子が検出された SDC 症例の 1 例においては、PDX の継代が順調に進んだ。凍結ストックを再度マウス皮下に移植したところ生着し、継代可能であったことから、樹立が完了したと考えられる。継代により収集した PDX 検体では、いずれの代においても、手術検体と同様の融合遺伝子が保持されており、かつ *PLAG1* の mRNA および *PLAG1* タンパクが高発現していることを、RNA seq および *PLAG1* 免疫染色により確認した。患者検体と PDX 検体の形態は類似しており、組織型が再現されながら受け継がれていることを確認した。本症例は、浸潤傾向が強く、術前に腺様嚢胞癌を疑われていたが、術後に唾液腺導管癌と確定診断されていた。結果を図 4 に示す。

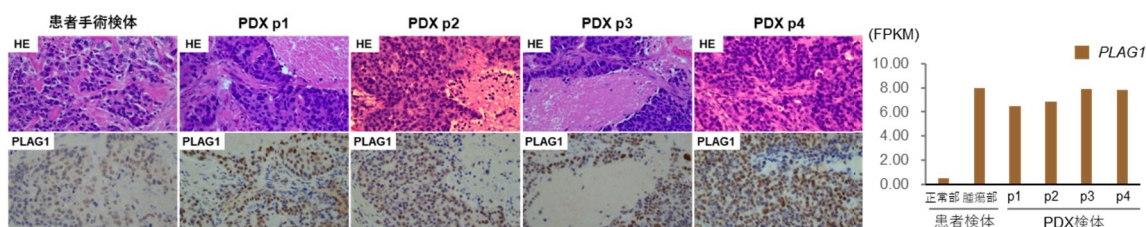


図 4. SDC 患者検体と PDX 検体における *PLAG1* タンパク発現と mRNA 発現

以上の ACC、SDC 由来の PDX 検体はいずれも、ヒト由来の組織であることが担保されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------