

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10277

研究課題名(和文) 唾液腺癌発癌に関わる遺伝子の解析と分子標的薬の探索

研究課題名(英文) Analysis of fusion gene of salivary gland carcinogenesis and explore the molecular target agents

研究代表者

野口 一馬 (Noguchi, Kazuma)

兵庫医科大学・医学部・臨床教授

研究者番号：50309473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺癌症例に対する新たなバイオマーカーの探索を行った。対象は粘表皮癌3例、腺様嚢胞癌1例、多形腺腫由来癌1例で、過去に融合遺伝子の候補となる存在が示唆されており、これらに対して融合遺伝子を解析した。粘表皮癌では自験例の2/3でCRTC1-MAML2の融合遺伝子を確認し、1例より初代培養細胞株の樹立に成功した。遺伝子解析から新たなバイオマーカーを検索し、LAMB3とTACSTD2が新たな候補となった。粘表皮癌の臨床検体に対してLAMB3とTACSTD2の発現を免疫組織学的に検討した結果、腫瘍特異的に発現していることを確認し、新たな分子標的治療や血液中のバイオマーカーとして活用できると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外科的切除された唾液腺癌組織より継代可能細胞を作成し、唾液腺癌の細胞生物学的・分子遺伝学的性質を解明し、分子標的薬の開発につなげていくことを目的とする。唾液腺癌培養細胞で株化できたものは極めて少なく、継続的に利用されている細胞はほとんどない。腺様嚢胞癌培養細胞株では、Hela株のコンタミネーションなど多くの細胞株が存在を否定されているため、米国ではAdCC Research Foundation (<https://www.accrf.org>) が基礎研究支援をおこなっている。我々は多施設間で協力しながら唾液腺癌組織と細胞株を共有し合う事で新たな治療標的を探索し、唾液腺癌の治療成績の向上へと繋がる。

研究成果の概要(英文)：We searched for new biomarkers for salivary gland carcinoma. The fusion genes were analyzed in three cases of mucoepidermoid carcinoma, one case of adenoid cystic carcinoma, and one case of carcinoma originated pleomorphic adenoma. In mucoepidermoid carcinoma, the CRTC1-MAML2 fusion gene was identified in 2/3 of the our cases, and a primary cultured cell line was successfully established with CRTC1-MAML2 fusion gene. The genetic analysis led to the search for new biomarkers, and LAMB3 and TACSTD2 became new candidates. Immunohistological examination of LAMB3 and TACSTD2 expression in clinical specimens of mucoepidermoid carcinoma confirmed their tumor-specific expression and suggested that they could be used as new molecular targeted therapy and blood biomarkers.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：唾液腺癌 粘表皮癌 融合遺伝子 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

がんの発生には遺伝子の発現や機能の異常が大きく関わっており、体細胞ゲノム DNA に生じた遺伝子変異の蓄積によって、がんが進展していくことが多くの研究で明らかになった。遺伝子変異の蓄積だけでなく、より広大な染色体異常が存在する事も明らかとなり、現在では染色体の数の異常や、長腕・短腕の欠失、さらには染色体の相互転座が比較的頻繁に確認されている。例えば慢性骨髄性白血病のフィラデルフィア染色体 t(9:22)は BCR 遺伝子と ABL1 遺伝子の融合で、疾患特異的転座によって発がん原因遺伝子が作られ、細胞はクローナルに増殖していく。

唾液腺癌は腺房細胞・導管上皮細胞・筋上皮細胞が発生母地となり、多彩な病理組織像を示す。口腔扁平上皮癌の発癌過程は多段階的で、遺伝子変異は様々であるが癌が成立するための遺伝子変異には一定の共通点があり、*EGFR* や *CDKN2A* (p16), *TP53* (p53)などが共通の変異として確認されている(Leemans CR, et al. Nature Rev Cancer 2018)。しかし、口腔扁平上皮癌と比較すると、唾液腺癌の発生には慢性炎症や画一的カルチノゲンの暴露は関与は少なく、最近の研究から唾液腺癌の成立には血液悪性腫瘍や肉腫の発生要因となる融合遺伝子が関与していることが明らかになってきた(Kas K, et al. Nature Genet 1997)。代表的な唾液腺癌である粘表皮癌は *MECT1-MAML2* (Okabe M, et al. Clin Cancer Res 2006)、腺様嚢胞癌(AdCC)では *MYB-NFIB*(Wysocki PT, et al. Oncotarget 2016)、多形腺腫由来筋上皮癌では *TGFR3-PLAG1*または *FGFR1-PLAG1* (Dalin MG, et al. Nature Comm 2018) が明らかになりつつある。融合遺伝子の解明は分子標的薬の開発に繋がるので、魅力的かつ癌克服には大きなインパクトをもたらす。しかしこれらの解析は外科的切除後のパラフィン包埋の組織からの解析であり、腫瘍組織および細胞で確認されてはいない。そのため新規治療法への開発につながる継続的な研究が進んでいない現状がある。

## 2. 研究の目的

本研究では外科的切除された唾液腺癌組織より継代可能細胞を作成し、従来不明な点が多かった唾液腺癌の細胞生物学的・分子遺伝学的性質を解明し、分子標的薬の開発につなげていくことを目的とする。

唾液腺癌培養細胞で株化できたものは極めて少なく、株化の報告がされても、その後も継続的に利用されている細胞はほとんどない。例えば AdCC 培養細胞株では、Hela 株のコンタミネーションや生物種が異っており、多くの細胞が存在を否定されているため、米国では AdCC Research Foundation (<https://www.accrf.org>) が基礎研究支援をおこなっている。我々は本邦における多施設間で協力しながら由来の明らかな唾液腺癌の腫瘍組織と細胞株を共有し合い、唾液腺癌のバイオバンク作成のきっかけとなることを目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 唾液腺癌の継代培養可能細胞の樹立、株化および唾液腺癌腫瘍組織の集積

唾液腺癌の標準治療は外科的切除であり、生検により確定診断を得た唾液腺癌の切除に伴い、得られた組織の一部を兵庫医科大学へ搬送する。本研究の問題点は、唾液腺癌が発生頻度が少ないことと、培養法が確立されていないことである。そのため、兵庫医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科、大阪大学、神戸大学、長崎大学と協力して症例数を確保することで対応する。

組織はコラゲナーゼなどで一次分解を行ったのちに、outgrowth法を用いて初代培養を行う。われわれはコンタミネーションが無ければ（唾液腺癌は口腔常在菌に暴露されている事は少なく、コンタミネーションは低率である）初代培養から10~15継代までは確実に培養可能な手法を確立している。もちろん、組織からだけでも以下に述べる融合遺伝子の解析は可能であるが、分子標的薬をターゲットにした治療法の確立を目標としているので、細胞培養は必須である。現在の分子遺伝学的解析の技術では10~15継代の細胞数で十分解析可能である。

## (2) 融合遺伝子の解析

唾液腺癌の発生は高頻度に融合遺伝子の形成によることが明らかになって来ている。融合遺伝子解析により、得られた組織または細胞よりDNA・RNAを抽出し、本学に常置されているMiSeq（イルミナ社）を加えた3種類の手法で融合遺伝子の存在を確認する。

## (3) がん化学療法、分子標的薬の標的候補となる融合遺伝子によってもたらされたシグナル経路の解析

一般的に唾液腺癌は殺細胞性の抗癌剤は無効であるとされている。無効である理由としてcell cycleが緩徐で、細胞内または核内に薬剤が蓄積しないことが原因とされてきた。最近、唾液腺癌に対する新規癌化学療法としてトラスツマブやセツキシマブのEGFR阻害薬やPD-1阻害薬のニボルマブの投与を推奨する論文を散見する（Keller G et al. Oral Oncol 2017）（Kawahara K, et al. 2017 Mol Clin Oncol, 2017）。

得られた唾液腺癌培養細胞の融合遺伝子の塩基配列を解析し、融合の結果、生成されるタンパクをコンピューター上で予測し、RT-PCR、WB、細胞染色で発現を確認する。さらに転写因子についても同時に解析し、この2つの点で阻害薬を用いた増殖抑制実験を行う。

## 4. 研究成果

兵庫医科大学 歯科口腔外科学講座で外科的に加療し、病理組織学的に唾液腺癌と診断されて症例に対してバイオマーカーとなり得る融合遺伝子の検討を行った。遺伝子解析に至った症例は粘表皮癌3例、腺様嚢胞癌1例、多形腺腫由来癌1例で、いずれの腫瘍も過去に融合遺伝子の候補となる存在が示唆されている腫瘍を対象とした。これらに対してPCR法およびSanger法やNGSを用いた遺伝子解析を行い、融合遺伝子の存在を解析した。粘表皮癌では*CRTC1/3-MAML2*の融合遺伝子が3例中2例で*CRTC1-MAML2*の融合遺伝子を確認した。これは従来の報告と比較してほぼ同様の結果であった。この粘表皮癌で*CRTC1-MAML2*の融合遺伝子を保持した状態で初代

培養細胞株の樹立を試み、培養に成功した。遺伝子解析の結果から新たなバイオマーカーを検索し、LAMB3 と TACSTD2 が新たな候補として確認された。粘表皮癌の臨床検体 13 例に対して検討した結果、極めて腫瘍特異的に発現していることが確認され、粘表皮癌の新たな分子標的治療や血液中のバイオマーカーとしての可能性が示された。さらに腺様嚢胞癌と多形腺腫由来癌の腫瘍組織からもすでに報告されている融合遺伝子を検討したが、我々の解析では融合遺伝子の発現は認められなかった。腺様嚢胞癌の初代培養細胞株は樹立に成功しており、今後の解析に繋げていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Noguchi K, Kanda S, Yoshida K, Yamanegi K, Kishimoto H, Nakano Y, et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Establishment of patient-derived mucoepidermoid carcinoma cell line with the CRTC1-MAML2 fusion gene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2022.2508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Burassakarn A, Phusingha P, Noguchi K, et al	4. 巻 14
2. 論文標題 Human papillomavirus 16 E6 suppresses transporter associated with antigen-processing complex in human tongue keratinocyte cells by activating lymphotoxin pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14081944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Moridera K, Kitajima K, Noguchi K, Kishimoto H, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Usefulness of quantitative bone SPECT/CT for medication-related osteonecrosis of the jaw in clinical setting	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11604-021-01226-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsuzuki K, Noguchi K, Kishimoto H, et al.	4. 巻 134
2. 論文標題 Odontogenic chronic rhinosinusitis undergoing tooth extraction: oral surgeon and otolaryngologist viewpoints and appropriate management	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Laryngology & Otology	6. 最初と最後の頁 241-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S0022215120000535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ueta M, Takaoka K, Yamamura M, Maeda H, Tamaoka J, Nakano Y, Noguchi K, Kishimoto H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of TGF 1 on the migration and morphology of RAW264.7 cells in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 4331-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2019.10662.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi S, Noguchi K, Wakai K, Hamazaki Y, Tozawa K, Jomori T, Sasako M, Miwa H	4. 巻 39
2. 論文標題 Propagermanium induces NK cell maturation and trends to prolong overall survival of patients with refractory cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 4687-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi K, Moridera K, Sotsuka Y, Yamanegi K, Takaoka K, Kishimoto H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Oral squamous cell carcinoma occurring secondary to oral lichen planus around the dental implant: A case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Science International.	6. 最初と最後の頁 110-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉田和功、野口一馬、服部洋一、神田修二、吉川恭平、高岡一樹、岸本裕充
2. 発表標題 粘表皮癌におけるTherapy relevant biomarkerの探索
3. 学会等名 第57回 日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口一馬、吉川恭平、他
2. 発表標題 CRTC1-MAML2融合遺伝子の発言を認めた粘表皮癌培養細胞の樹立と細胞生物学的特徴の解析
3. 学会等名 日本口腔組織培養学会 学術大会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田和功、野口一馬、他
2. 発表標題 CRTC1/3-MAML2融合遺伝子の有無による粘表皮癌のsignal pathwayの比較検討
3. 学会等名 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大森雄司、野口一馬、他
2. 発表標題 3次元培養下での粘表皮癌および癌関連線維芽細胞の相互作用の解析
3. 学会等名 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔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
研究 分担 者	寺田 友紀  (Terada Tomonori)  (00340977)	兵庫医科大学・医学部・准教授   (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	山根木 康嗣 (Yamanegi Koji)  (00434944)	兵庫医科大学・医学部・講師  (34519)	
研究分担者	柳本 惣市 (Yanamoto Soichi)  (10315260)	長崎大学・病院（歯学系）・講師  (17301)	
研究分担者	岸本 裕充 (Kishimoto Hiromitsu)  (30291818)	兵庫医科大学・医学部・教授  (34519)	
研究分担者	鷓澤 成一 (Uzawa Narikazu)  (30345285)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授  (14401)	
研究分担者	中野 芳朗 (Nakano Yoshiro)  (30360267)	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師  (34519)	
研究分担者	長谷川 巧実 (Hasegawa Takumi)  (50546497)	神戸大学・医学部附属病院・助教  (14501)	

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
---------	---------