

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592141

研究課題名（和文）唾液腺腫瘍の病理診断標準化のための組織学的ならびに分子生物学的研究  
研究課題名（英文）Histological and molecular biological study for standardization of pathological diagnosis of salivary gland tumors

研究代表者

小川 郁子（OGAWA IKUKO）

広島大学・病院・講師

研究者番号：70136092

研究成果の概要（和文）：

唾液腺腫瘍の病理診断を標準化するための客観的診断基準の確立を目的として、組織学的、免疫組織化学的ならびに分子生物学的検討を行い、各種筋上皮マーカーの発現・局在を組み合わせた評価、多形腺腫における PLAG1 タンパクの過剰発現、腺房細胞癌における MUC タンパクの発現、Ki-67 やゲミニン陽性細胞率による増殖活性の評価などが鑑別や診断の確定に有用であることを明らかにした。また、細胞周期関連因子であるオーロラキナーゼ B の過剰発現と悪性度との関連なども明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

For establishment of objective diagnostic standards of salivary gland tumors, we analyzed the expression of various proteins and genes by histological, immunohistochemical and molecular pathological methods. The results indicated that the expression and localization of various myoepithelial markers, overexpression of PLAG1 protein in pleomorphic adenoma, MUC protein expression in acinic cell carcinoma and evaluation of cell proliferative markers including Ki-67 and geminin were useful for the differential diagnosis and the prediction of the prognosis. It was also clarified the relationship between overexpression of cell cycle related factors such as Aurora kinase and malignancy of the tumors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔病理

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：病理診断，唾液腺腫瘍，筋上皮マーカー，PLAG1，細胞増殖マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍に対する適切な治療の選択には、診断、特に確定診断である病理診断の正確性が大きな影響を与える。しかし、病理診断は、病理診断医の知識と経験によるところが大きく、病理診断医の不足と専門の細分化が社会問題となっている昨今、腫瘍の病理診断の標

準化は、施設間での医療の均質化と治療成績の評価にとって必要不可欠である。

唾液腺腫瘍は、WHO 国際分類(2005)では39と非常に多数の腫瘍型に分けられている。その治療方針の決定や予後推測には正確な病理診断が不可欠であるが、唾液腺腫瘍は、分類が複雑な上に、

・1つの腫瘍型内に様々な組織学的亜型が存在する

・異なる腫瘍型間に共通して認められる組織構築や細胞形態がある

という特徴から、病理診断の難しい腫瘍とされている。また、悪性であっても細胞異型に乏しい腫瘍型も多く、治療方針の選択に直接関わる良・悪性の確定さえ困難な症例も少なくない。さらに、同一の腫瘍型内にも悪性度の異なるグレードが存在するため、その決定も重要である。唾液腺腫瘍の病理診断の難しさは、コンサルテーション症例数の多いことから指摘されており、診断の標準化が必要な腫瘍の1つに挙げられている。

本研究の代表者、分担者は、日本病理学会の頭頸部、口腔領域の病理診断コンサルテーションシステムのメンバーとして、これまでも唾液腺腫瘍診断基準の確立と標準化について検討を重ね、講演、アトラスの執筆や症例検討会の開催など、基盤整備に取り組んできた。そこで、これまでの検討で浮かんだ唾液腺腫瘍の病理診断の問題点をさらに明らかにし、診断の標準化に必要な客観的マーカーを明らかにする必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来のHE染色標本を基本とする組織学的所見に加えて、腫瘍細胞の分化や増殖活性、また、遺伝子異常などを反映する免疫組織化学、さらに分子病理学的な検討を組み合わせることにより、唾液腺腫瘍の客観的な診断基準の確立を目的とする。また、腫瘍の予後を踏まえた最適な治療を選択するのに必要な臨床応用可能なマーカーを提示し、病理診断の面から腫瘍に対する医療に貢献することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず、診断の標準化に直結する客観的診断基準の確立を目的とするため、形態学的特徴、増殖や分化に関わる遺伝子・タンパク発現を鑑別が問題となる腫瘍型間で比較する。つぎに予後に関わるものが推測される細胞増殖マーカー、細胞周期関連因子、増殖因子などについて検討する。

### (1) 腫瘍性筋上皮マーカーの検討と評価

①腫瘍性筋上皮細胞が構成成分である多形腺腫、基底細胞腺腫/基底細胞腺癌、多型低悪性度腺癌、腺様嚢胞癌、上皮筋上皮癌を主な対象としビメンチン、S100タンパク、GFAP、サイトケラチン14、p63、 $\alpha$ -平滑筋アクチン、カルポニンの発現・局在を組織検体を用いて免疫染色により検討し、腫瘍型間での違いを明らかにする。

②①での結果を非定型的組織像を示す症例の適応し、有用性を確認する。

### (2) 腺上皮・腫瘍性筋上皮細胞よりなる腫瘍

型の鑑別マーカーの検討と評価

①多形腺腫で高率に認められる8q12により過剰発現されるPLAG1の発現程度、局在が鑑別に有用かを、多形腺腫、腺様嚢胞癌の組織検体を用い、免疫染色により調べ、さらに染色体転座との関係について検討する。

②①と同じ材料を用い、腺様嚢胞癌で陽性となることが報告されているc-kitについて、免疫染色により調べ、腫瘍型間での発現の違いの有無や診断への応用の可能性について評価する。また、過剰発現症例ではc-kit遺伝子の変異について検討する

### (3) 腺房細胞癌の診断マーカーの検討と評価

多様な組織構築、細胞型が存在する腺房細胞癌の確定のため、腺房細胞癌の定型例、亜型の組織検体を用い、MUC3、MUC5AC、MUC6の発現について免疫組織化学的に調べ、腺房細胞が組織像にかかわらず、陽性を呈するかを検討し、診断への有用性を評価する。

### (4) 唾液腺導管癌の診断マーカーの検討と評価

高悪性度腫瘍である唾液腺導管癌の確実な診断に有用なマーカーを明らかにするため、c-erbB2(Her2)、Androgen receptor、GCDP15に加えて、Estrogen receptor(ER) $\beta$ とPELP1/MNARの発現を唾液腺導管癌、腺癌、NOS、嚢胞腺癌の組織検体を用い、免疫染色により検討する。

### (5) 細胞増殖マーカーの検討

良性腫瘍(多形腺腫、基底細胞腺腫)と細胞異型に乏しい悪性腫瘍(基底細胞腺癌、腺様嚢胞癌、多型低悪性度腺癌、上皮筋上皮癌)の組織検体を用い、細胞増殖マーカーとして汎用されているKi-67とDNA複製の制限に関わるゲミニンの陽性細胞率を調べ、良・悪性腫瘍での違いを検討する。

### (6) 細胞周期関連因子の検討

M期の進行に関わるオーロラキナーゼ(AおよびB)の発現について、組織検体を用いて検討し、細胞増殖活性との関連を調べる。また、過剰発現のメカニズムについて、共発現するタンパクを検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 腫瘍性筋上皮マーカーについて

$\alpha$ -平滑筋アクチン、カルポニン、サイトケラチン14、p63は、正常唾液腺の筋上皮/基底細胞に規則的に発現されており、それらは、腫瘍においても筋上皮の特異的マーカーとなる。一方、ビメンチン、S100タンパク、GFAPは、正常筋上皮での発現はなく、腫瘍化に伴って発現さ、腫瘍型による発現の違いが推測される。

### ①スクリーニングマーカー

上記の7種類のタンパクのなかで、腫瘍性筋上皮/基底細胞様細胞を構成成分とする腫瘍型(多形腺腫、筋上皮腫/筋上皮癌、基底

細胞腺腫/基底細胞腺癌、腺様嚢胞癌、上皮筋上皮癌)では、p63 とビメンチンの発現が筋上皮/基底細胞様細胞にもっとも広範に陽性となり、唾液腺腫瘍での筋上皮細胞のスクリーニングに有用であることが明らかとなった。この2つのタンパクを診断に用いる場合には、p63 は、扁平上皮にも陽性となり、扁平上皮化生を伴わない部分での評価が必要であることに注意を要する。また、ビメンチンは、腫瘍性筋上皮の関与のない腺癌 NOS や腺房細胞癌でも陽性になり、p63 よりも特異性が低かった。なお、サイトケラチン 14 は、腫瘍では腺上皮にも陽性となり、筋上皮性マーカーとしての有用性は低かった。

なお、p63 発現の検討の過程で、腺癌 NOS や嚢胞腺癌でも外層に p63 陽性細胞を伴う領域があり、これらが排泄導管から発生し、導管内進展を示し、p63 陽性の正常基底細胞が残存していることが示された。

#### ②特異的マーカー

$\alpha$ -平滑筋アクチンとカルポニンは、腫瘍であっても正常と同様の腺上皮-筋上皮(基底細胞)による腺管を形成する部分では、筋上皮細胞に高率に陽性であったが、正常とは異なる形態を示す領域での陽性率は低かった。したがって、筋上皮の特異的マーカーではあるけれども、腫瘍への適用の普遍性に乏しかった。

#### ③腫瘍型の鑑別マーカー

S100 タンパクは、多形腺腫、筋上皮腫/筋上皮癌、上皮筋上皮癌のグループでは、筋上皮細胞に高率で明瞭に発現され、一方、基底細胞腺腫/基底細胞腺癌、腺様嚢胞癌のグループでは、むしろ腺上皮に不規則に発現される傾向があった。したがって、S100 タンパクは、筋上皮のスクリーニングマーカーや特異的マーカーとしては使用できないが、その他のマーカーと組み合わせることにより、腫瘍型間の鑑別に有用であった。特に、しばしば鑑別が問題となる小唾液腺に発生する多形腺腫と腺様嚢胞癌、また、腺様嚢胞癌様の篩状胞巣が主体の多形腺腫の診断には、両腫瘍型での S100 タンパクの局在の違いを検討することが確定に役立つことが明らかとなった。

GFAP は、多形腺腫、筋上皮腫では陽性細胞が種々の程度にみられ、診断を確定するための補助として使用可能であった。しかし、他の腫瘍型でも陽性細胞が少数認められる症例があり、他のマーカーと組み合わせて評価する必要がある。

#### ④多型低悪性度腺癌での発現

腫瘍性筋上皮の関与の有無について議論があり、また、多形腺腫や腺様嚢胞癌との鑑別が問題となる多型低悪性度癌での上記の“筋上皮マーカー”の発現を検討した。その結果、多くの腫瘍細胞がビメンチン、S100 タ

ンパク陽性で、また、 $\alpha$ -平滑筋アクチン、カルポニン陽性細胞も認められ、多形腺腫と類似した発現を示した。一方、p63 陽性細胞は少なく、筋上皮マーカーとともに上皮膜抗原(EMA)も陽性である細胞が多数認められた。以上の所見より本腫瘍型には筋上皮の関与を認めるものの、他の腫瘍型とは異なる特異な分化を示しており、それが本腫瘍の特徴である多彩な組織像の形成に関係することが示唆された。

(2)腺上皮・腫瘍性筋上皮細胞からなる腫瘍型の鑑別マーカーについて

#### ①PLAG1 発現

PLAG1 タンパクは、多形腺腫でしばしば認められる染色体転座 t(3;8)(p21;q12)、t(5;8)(p13;q12)により過剰発現されることが示されている。抗 PLAG1 抗体を用いた免疫染色では、正常唾液腺はすべて陰性であったのに対して、多形腺腫 25 例中 18 例で核に陽性反応が認められた。陽性例では、腺上皮、筋上皮ともに陽性であり、また、充実性増殖や腺管形成部に加えて、粘液腫様、軟骨様域でも腫瘍細胞が陽性となり、PLAG1 タンパクの過剰発現は多形腺腫の発生に関わることが示唆された。また、筋上皮腫でも高率に陽性であり、両腫瘍型の発生には PLAG1 による共通した変化が関与することも推測された。多形腺腫との鑑別が必要となる腫瘍型(基底細胞腺腫/基底細胞腺癌、腺様嚢胞癌、上皮筋上皮癌)での発現を検討中である。

#### ②c-kit 発現

クラス III 膜貫通型チロシンキナーゼをコードする c-kit は、点突然変異により過剰発現することにより増殖活性を促進し、腫瘍発生に関わると考えられている。唾液腺腫瘍でも腺様嚢胞癌で c-kit の過剰発現が生じ、鑑別に有用であることが報告されている。そこで、腺様嚢胞癌、多形腺腫、筋上皮腫/筋上皮癌、多型低悪性度腺癌を用いてその有用性を評価した。その結果、腺様嚢胞癌であっても陽性症例は 27 例中 11 例と半数以下であり、陽性細胞数も症例により大きな差があった。また、陽性例においても c-kit 遺伝子に変異を認めなかった。さらに、良性腫瘍である多形腺腫、筋上皮腫でも陽性であり、唾液腺腫瘍における c-kit タンパクの過剰発現は、腫瘍化とは直接関係しないと考えられ、鑑別マーカーとしては不適であることが明らかになった。また、腺様嚢胞癌で c-kit 発現と転移や予後との関係を調べたが、有意な違いはなく、腺様嚢胞癌における c-kit タンパクの発現は、予後評価にも適さなかった。

#### (3)腺房細胞癌の診断マーカーについて

腺房細胞癌では、分泌タンパク(アミラーゼ、ラクトフェリンなど)の発現が診断マーカーとなることが知られているが、亜型では、それらの発現が低下するため、より普遍的な

マーカーが必要である。MUC は、上皮細胞で産生される粘液のコアタンパクであり、分泌型 (MUC3, MUC7) と膜結合型 (MUC5AC, MUC6) に分けられる。その発現パターンは、臓器により異なり、さらに、腫瘍化とともに変化することが知られている。そこで、定型的な腺房細胞癌 5 例で検討した結果、MUC3 は 4 例で陽性であったのに対して、MUC5AC, MUC6 は全例が陰性であった。垂型 10 例でも、組織型、細胞型にかかわらず同じ結果であり、これら 3 種類のムチンコアタンパクと従来のマーカーとを組み合わせることにより、腺房細胞癌の垂型を確実に診断できる可能性が明らかとなった。なお、対象として用いた粘表皮癌では、MUC3 は陰性で、MUC5AC 陽性であり、腺房細胞癌とは異なる染色結果であった。このことから、MUC に対する染色は、腺房細胞癌の垂型と粘表皮癌との鑑別にも有用であることが示された。

#### (4) 唾液腺導管癌の診断マーカーについて

代表的な高悪性唾液腺腫瘍である唾液腺導管癌は、Her2/neu, androgen receptor, GCDP15 を発現することが知られているが、estrogen やその receptor (ER) の発現についての検討は少なく、マーカーとしての有用性に関しては不明な点が多い。そこで、ER $\beta$  と ER の活性を調節する PELP/MNAR の発現を検討した。唾液腺導管癌で使用できたのは 4 例のみであったが、3 例で ER $\beta$  は核に、PELP/MNAR は細胞質に染色され、2 例は、どちらも陽性であった。したがって、唾液腺導管癌では androgen に加えて、estrogen も腫瘍の発生や進展に関わる可能性が示唆された。腺上皮性分化を示す細胞からなる他の腫瘍型について検討中である。

#### (5) 増殖マーカーについて

G1 期以外のすべての細胞が発現する Ki-67 は、種々の腫瘍型で細胞増殖マーカーとして頻用されている。唾液腺腫瘍で良・悪性の鑑別が必要となる腫瘍型についてその値を比較したところ、多形腺腫を代表とする良性腫瘍ではすべて 5% 以下であったのに対して、腺様嚢胞癌では 27 例中 23 例で 10% 以上となり、小さな生検組織での鑑別に有用であることが明らかとなった。一方で、多型低悪性度腺癌では、Ki-67 陽性細胞率は 5% 以下であり、良性腫瘍との間に違いはなかったため、鑑別には不適であった。

ゲミニンは、DNA 複製のライセンス化阻害因子であり、DNA 複製の重複を防ぐ役割を有する。S 期で発現が上昇し、M 期に入るとユビキリン分解され、発現が低下するが、悪性腫瘍では、発現が上昇することが報告されている。そこで、ゲミニンの発現を良性・悪性腫瘍で検討し、まず、Ki-67 の値と比較した。その結果、両者には有意な相関関係があったが、ゲミニン陽性細胞率は、Ki-67 陽性細胞

率よりも低い傾向にあり、特に、良性腫瘍では 3% 以下、低悪性度腫瘍 (腺房細胞癌、多型低悪性度腺癌、低悪性度の粘表皮癌) では、いずれも 10% 以下であった。高悪性である唾液腺導管癌では、20% 以上の高値を示し、低悪性、高悪性の鑑別に有用となる可能性が示唆された。予後との関連性については検討中である。

#### (6) 細胞周期関連因子について

細胞増殖活性の上昇に関わる因子を検討するため、細胞周期の G2-M 期の進行に関わるオーロラキナーゼ A, B の発現と Ki-67 陽性細胞率との関係を調べた。その結果、良・悪性腫瘍ともにオーロラ B は、核に陽性となり、その数は、Ki-67 陽性細胞率と相関していた。一方、オーロラ A は核と細胞質に陽性反応が認められたが、いずれも少数であり、Ki-67 陽性細胞率との関係は不明であった。したがって、唾液腺腫瘍ではオーロラ B の過剰発現が腫瘍の発生に関わる可能性が示唆された。扁平上皮癌を対象とした検討オーロラ B の過剰発現 (安定化) がサイバインの核内蓄積と関係することを報告しており、唾液腺腫瘍でも同様のメカニズムが存在するのかが検討中である。

なお、ワルチン腫瘍から粘表皮癌が発生した症例について、細胞周期関連因子の発現の変化を検討した結果、p53 の異常とオーロラ B の過剰発現が認められ、良性腫瘍の悪性化にも、細胞周期関連因子の変化に関わることが明らかとなった。

#### 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 9 件)

1. 小川郁子, 吉田真希, 大林真理子, 高田 隆, 小唾液腺に発生する腫瘍と腫瘍類似病変の病理学的特徴, 病理と臨床, 査読有, 2011 (印刷中)
2. 小川郁子, 武島幸男, 井内康輝, 高田 隆, 耳下腺に発生した Mucoepidermoid carcinoma arising in Warthin tumor の 1 例, 診断病理, 査読有, 2011 (印刷中)
3. 小川郁子, 北川雅恵, 工藤保誠, 宮内睦美, 高田 隆, 小唾液腺に発生する腫瘍と腫瘍類似病変, 日本唾液腺学会誌, 査読無, 51, 39-48, 2010
4. Ohta K, Ogawa I, Ono S, Taki M, Mizuta K, Miyauchi M, Takechi M, Shigeishi H, Takata T, Kamata N. Histopathological evaluation including cytokeratin 13 and Ki-67 in the border between Lugol-stained and -unstained areas, Oncol Rep, 査読有, 24, 9-14, 2010
5. 小川郁子, 高田 隆, 病理形態学キーワード 被膜外浸潤 (唾液腺), 病理と臨床, 査読

無, 28 (臨時増刊号), 2-3, 2010

6. 小川郁子, 武島幸男, 井内康輝, 高田 隆, Mucoepidermoid carcinoma arising in Warthin tumor の 1 例, 日本唾液腺学会誌, 査読無, 50, 36, 2009

7. 小川郁子, 坂井田紀子, 大江千里, 植村芳子, 高田 隆, 広範に篩状胞巣の形成を示した基底細胞腺癌の 1 症例, 日本唾液腺学会誌, 査読無, 49, 35, 2008

[学会発表] (計 8 件)

1. (招待講演) 小川郁子, 高田 隆, 「唾液腺腫瘍の診断と治療」唾液腺腫瘍の病理-小唾液腺腫瘍を中心に-, 第 29 回日本口腔腫瘍学会, 2011. 1. 27-28, 熊本市

2. Ogawa I, Ohbayashi M, Elsayed Mohamed D, Miyauchi M, Takata T, Histopathological diversity and differential diagnosis of epithelial-myoeplithelial carcinoma of salivary gland, 15<sup>th</sup> International Congress on Oral Pathology and Medicine, 16-20 Aug 2010, Seoul, Republic of Korea

3. (招待講演) 小川郁子, 高田 隆, 唾液腺腫瘍の組織学的分類 (WHO2005) 臨床の場で活かすために, 第 34 回日本口腔外科学会教育研修会・口腔四学会合同研修会, 2010. 8. 7-8, 枚方市

4 小川郁子, 廣川満良, 高田 隆, 「唾液腺腫瘍の病理診断」上皮筋上皮癌の組織学的多彩性について, 第 99 回日本病理学会総会, 2010. 4. 27-29, 東京都

5. (招待講演) 小川郁子, 高田 隆, 唾液腺腫瘍の組織学的分類 (WHO2005) 臨床の場で活かすために, 第 33 回日本口腔外科学会教育研修会・口腔四学会合同研修会, 2010. 2. 13-14, 東京都

6. 小川郁子, 高田 隆, 「最近話題の唾液腺腫瘍」小唾液腺腫瘍および腫瘍類似病変の特殊性, 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 1-3, 京都市

7. 小川郁子, 坂井田紀子, 大江千里, 植村芳子, 高田 隆, 耳下腺腫瘍 (basal cell adenocarcinoma), 第 19 回日本臨床口腔病理学会総会, 2008. 8. 21-23, 東京都

8. 小川郁子, 高田晋一, 宮内睦美, 松浦博夫, 高田 隆, 耳下腺に発生した硬化性多嚢胞性腺症 (SPA) の 1 例, 第 97 回日本病理学会総会, 2008. 5. 15-17, 金沢市

[図書] (計 4 件)

1. 小川郁子, 北川雅恵, 工藤保誠, 宮内睦美, 高田 隆, クインテッセンス出版, 口腔外科ハンドマニュアル'11 唾液腺腫瘍の病理 - 診断病理を中心に-, 2011 (印刷中)

2. 小川郁子, 久山佳代, 高田 隆, 医学書院, アトラス 細胞診と病理診断 1. 消化器 口腔粘膜・唾液腺, 2010, 74-75, 83-83

3. 小川郁子, 北川雅恵, 工藤保誠, 宮内睦美, 高田 隆, デンタルダイヤモンド社, 口腔病

変クローズアップ, 2010, 143 頁

4. 小川郁子, 高田 隆, 医歯薬出版, 新口腔病理学 第 18 章 唾液腺腫瘍, 2010, 273-286

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
小川 郁子 (OGAWA IKUKO)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号: 70136092

(2) 研究分担者  
高田 隆 (TAKATA TAKASHI)  
広島大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 10154783

工藤 保誠 (KUDO YASUSEI)  
広島大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 50314753

宮内 睦美 (MIYAUCHI MUTSUMI)  
広島大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 50169265

北川 雅恵 (KITAGAWA MASAE)  
広島大学・病院・助教  
研究者番号: 10403627

(3) 連携研究者  
なし ( )  
研究者番号: