

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18313

研究課題名（和文）血中マイクロRNA解析による唾液腺癌バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Research on salivary gland cancer biomarkers using blood microRNA analysis.

研究代表者

手島 直則（Teshima, Masanori）

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10749146

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は耳下腺癌患者の腫瘍側と健側耳下腺から流出する外頸静脈内の血液中に存在するmiRNAおよび代謝産物の情報を取得し、両側耳下腺付近の血液内の検出量を比較検討することで、耳下腺腫瘍に特異的な新規バイオマーカーを探索することを目的とした。その結果、悪性腫瘍が占拠する耳下腺由来の血液と正常耳下腺由来の血液でプロファイルの異なる3種類のmiRNA（未発表のためmiR-12xx, miR-67yy, miR-68zzとする）を同定した。悪性腫瘍組織中には正常耳下腺組織と比較してこれらのmiRNAは低く発現していることがわかった。今後、バイオマーカーと成り得る可能性について研究を継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺癌特に耳下腺癌の治療において術前診断は重要であり、術前診断に基づく治療計画が治療成功の鍵となるが、耳下腺癌の組織診断は多彩で予後も著しく異なる。本研究では、耳下腺癌の診断目的に特異的なmiRNAを同定するため、正常耳下腺経路の血液と悪性腫瘍由来血液中のmiRNA発現を比較し、悪性腫瘍血液中のみで低発現なmiRNAを同定した。このmiRNAが今後の耳下腺癌診断のバイオマーカーと成り得るかを診断的応用についても検討可能なものである。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to obtain information on miRNAs and metabolites present in the blood in the external jugular vein draining from the tumour side and the normal parotid gland of patients with parotid cancer and to compare their detection in the blood derived from the bilateral parotid glands, in order to search for new biomarkers specific for parotid tumours. As a result, three miRNAs (unpublished and referred to as miR-12xx, miR-67yy and miR-68zz) with different profiles were identified in blood derived from the parotid gland occupied by malignant tumours and normal parotid gland. These miRNAs were found to be less expressed in malignant tumour tissue compared to normal parotid tissue. Further studies will continue to investigate their potential as potential biomarkers.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：耳下腺癌 耳下腺腫瘍 マイクロRNA バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

耳下腺癌の年間発症数は 10 万人あたり 1.04 ~ 1.6 人で、全癌の 0.2 ~ 0.3% といわれている。耳下腺癌の病理は、他に類を見ないほど多彩で(WHO 国際分類 2016)、病理診断に難渋することが少なくない。現在、術前の良性・悪性の鑑別は、穿刺吸引細胞診(FNA)の診断結果に臨床所見や超音波や CT, MRI などの画像診断の情報を組みあわせて行っているが、悪性腫瘍を良性、良性腫瘍を悪性と誤った診断となるリスクが少なからず存在する。

現在、耳下腺癌の標準治療は外科的切除である。進行癌の多くは耳下腺全摘出術の適応となり、高悪性度腫瘍では顔面神経を合併切除することも多い。耳下腺癌は放射線治療や化学療法に対する感受性が乏しく、術後に(化学)放射線治療を行っても不完全な切除では再発のリスクは高い。再発や転移は高悪性度腫瘍では生命予後に直結し、低悪性度腫瘍であっても繰り返す局所再発は、患者の生活の質(QOL)の著しい低下を招く。適切な術式選択は、耳下腺癌の治療の成否を握る鍵であり、術前の悪性度診断の担う責任は大きい。

当科から以前報告した耳下腺悪性腫瘍 72 例の臨床的検討では、高悪性度腫瘍は全例で悪性腫瘍と術前に診断されていたが、低および中悪性度腫瘍では約 7 割の症例でのみ術前に悪性腫瘍と診断されておらず、やはり低・中悪性度腫瘍では正確な術前診断は困難であった。また、全例の 5 年相対生存率および疾患特異的生存率は 79%、82%と比較的良好であったが、唾液腺導管癌などの高悪性度腫瘍においては急速な局所進行と遠隔転移をきたし予後不良な症例も多く、高悪性度腫瘍再発・転移例に対する効果的な薬物療法の開発が課題であると考えられた。

耳下腺癌の治療において術前診断は重要であり、術前診断に基づく治療計画が治療成功の鍵となる。しかしながら、耳下腺癌の組織診断は多彩であり、その悪性度により予後が著しく異なる。耳下腺腫瘍において細胞診の診断が困難な原因として、腫瘍の多様性と特殊性が挙げられ、術前に良性と診断されても、術後の病理診断で悪性に覆ることが稀ではない。一方、近年、唾液腺癌では、各病理組織型に特異的な染色体の転座と、それに伴う融合遺伝子がみられることが報告されており(Shinomiya H, et al. Human pathol, 2016) FNA による術前診断の精度向上を目指して、耳下腺腫瘍の細胞診検体を用いた遺伝子診断の研究開発が進められている状況である。

2. 研究の目的

唾液腺腫瘍における染色体の転座とそれに伴う融合遺伝子は病理組織型に特異的で、該当する病理組織型と診断する可能性は極めて高い。これらの染色体転座や融合遺伝子は必ずしも全ての症例で検出される訳ではない。microRNA (miRNA) は 21-25 塩基 (nt) 長の 1 本鎖 RNA 分子で、真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与するといわれ、ヒトゲノムには 1000 以上の miRNA がコードされていると考えられている。miRNA はその標的 mRNA に対して不完全な相同性をもって結合し、一般に標的遺伝子の 3'UTR を認識して、標的 mRNA を不安定化するとともに翻訳抑制を行うことでタンパク質産生を抑制する。miRNA が介する転写抑制は、発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシスまたは代謝といった広範な生物学的プロセスに重要な役割を担うことが知られている。多くの悪性腫瘍において重要な役割を果たしており、近年、その診断や予後予測のマーカーとして期待されている。唾液腺腫瘍における miRNA に関する報告は少ない(Clin Cancer res 2013)。そこで、本研究では、融合遺伝子を認めない唾液腺腫瘍の診断に有用な新たなバイオマーカーの開発を目的に唾液腺腫瘍に特異的な miRNA の同定を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

唾液腺腫瘍の miRNA を同定するため、耳下腺腫瘍組織と耳下腺から流出する血液を用いた研究を行うこととした。

1. 耳下腺腫瘍の手術時に腫瘍側と健側の耳下腺からそれぞれ流出静脈である外頸静脈からの血液を採取するにおける血液中の miRNA および代謝産物を網羅的に測定する。

2. 耳下腺摘出標本から吸引細胞診と針生検を行い、融合遺伝子の同定を行う。

1) 試料の採取方法:

血液検体: 手術当日、全身麻酔導入後、執刀前に腫瘍側及び健側耳下腺を經由した血液を外頸静脈より採取し血清を分離する。採取した血清から RNA を抽出し一本鎖 cDNA を合成する。miRNA 特異的プライマーを用いて cDNA からリアルタイム PCR を行い、miRNA を定量化する。腫瘍側、健側それぞれとマイクロアレイ miRNA を抽出してマイクロアレイを行いサンプル中に存在する miRNA について網羅的に探索する。また代謝物(メタボローム)についてもガスクロマトグラフ質量分析計を用いて網羅的に測定する。

腫瘍組織: 手術で切除された標本のうち、病理へ診断目的で提出するものとは別に、穿刺吸引細胞診の材料を液状検体で保存し、針生検の検体と腫瘍組織の一部を本研究のため凍結保存

する。

2. miRNA と融合遺伝子の解析

1) miRNA: 血液から得られた miRNA プロファイルを元にターゲットとなる miRNA を調べる。また腫瘍組織と正常耳下腺組織においても miRNA プロファイルの作成を行い血液から得られた miRNA と相違や相同性について検討を行う。高発現 miRNA もしくは低発現の miRNA を同定し変化量について計測し癌発生もしくは癌の抑制に関わる候補となる miRNA を同定する。

2) 融合遺伝子: 液状検体で保存された FNA の材料、凍結保存した針生検の組織と腫瘍組織から RNA を抽出し、RT-PCR 法で既知の唾液腺腫瘍に特異的な遺伝子の有無を検出する。

2021 年度以降

腫瘍組織から同定された miRNA に関して採取血液を用いて RT-PCR で増幅し検出量を定量化する。有意に上昇している場合には腫瘍マーカーや再発・転移のバイオマーカーとしての使用可能性について検討する。また有意な低下見られた場合、がん抑制への関与について検討を行い、治療薬への応用に関しても耳下腺がん培養細胞を用いて検証する。

4. 研究成果

耳下腺腫瘍の穿刺吸引細胞診や針生検で得られた検体から病理組織型に特異的な融合遺伝子の検出法を開発し、唾液腺癌の術前分子病理診断法やバイオマーカーの確立することを主目的とした。本研究は耳下腺癌患者の腫瘍側と健側耳下腺から流出する外頸静脈内の血液中に存在するマイクロ RNA (miRNA) および代謝産物の情報を取得し、両側耳下腺付近の血液内の検出量を比較検討することで、耳下腺腫瘍に特異的な新規バイオマーカーを探索し、さらに再発・転移に関わる予測因子や新たな治療法の開発につながるターゲットの同定を目的とした。また血液中の miRNA と腫瘍組織内の miRNA 発現についても合わせて検討することとした。

健側耳下腺および悪性腫瘍が占拠する耳下腺から血液と組織を採取し約 2500 種類の既知の miRNA を網羅的に解析した。その結果、悪性腫瘍が占拠する耳下腺由来の血液と正常耳下腺由来の血液でプロファイルの異なる 3 種類の miRNA (未発表のため miR-12xx, miR-67yy, miR-68zz とする) を同定した。正常耳下腺経由の血液中よりも悪性腫瘍占拠側の耳下腺由来の血液中にこの 3 種の miRNA は多く遊離しており、一方で悪性腫瘍組織中には正常耳下腺組織と比較してこれらの

miRNA は低く発現していることがわかった。研究途中でコロナ窩になり、登録症例増加や研究継続が困難となった。耳下腺癌症例が稀少な疾患であることも原因の一つであるが、想定以上に登録症例が少なく、研究期間内にこれらの miRNA のプロファイルを作成することが困難であった。しかしながら、本研究期間に該当された候補と成り得る未発表 miRNA の有用性については研究継続を行っていく方針であり、症例を蓄積していくことでバイオマーカーや標的遺伝子としての有用性について検討を行うこととしている。

図 1. 耳下腺経由血清中の miRNA 相対量

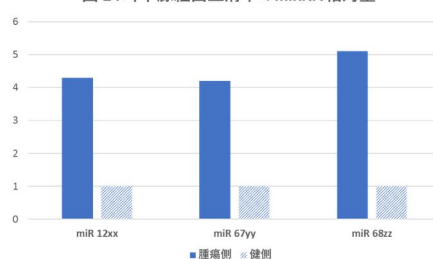
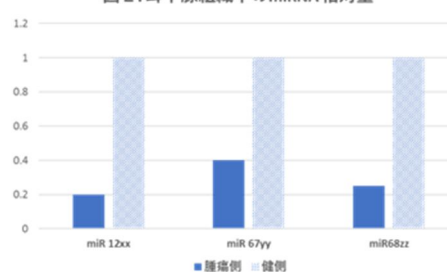


図 2. 耳下腺組織中の miRNA 相対量



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