

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592593

研究課題名(和文) 唾液腺腫瘍の分子遺伝学的診断に関する研究

研究課題名(英文) Molecular genetic diagnosis of head and neck tumor

研究代表者

海沼 和幸 (KAINUMA, Kazuyuki)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30334907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、穿刺吸引細胞診と同様の手技で得られた微量検体からの、遺伝学的アプローチによる診断手法を確立し、現状ではなかなか術前の正確な診断が困難な頭頸部腫瘍に対する分子生物学的補助診断を、従来の画像診断、病理組織診断と組み合わせることにより、正診率を向上させることを目的に、5種類の組織型(病理診断)の頭頸部腫瘍の計20例の腫瘍組織よりtotal RNAを抽出し、cDNAマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現パターンにより腫瘍を区別可能であることを明らかにした。また、穿刺細胞吸引により得られた極微量検体からRNAを抽出し遺伝子発現量を計測する手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to developed molecular genetic diagnosis systems of head and neck tumor. We extracted mRNA from 20 head and neck tumore patients with 5 different types. By using the cDNA microarray analysis to investigate the gene expression patterns to clustered each cell type of tumor.

As a results, we can clearly showed the molecular characteristics of head and neck tumors (Adenoid cystic carcinoma, Mucoepidermoid carcinoma, Acinic cell carcinoma, Salivary duct carcinoma, Adenocarcinoma, not otherwise specified) by using clustering analysis on the basis of gene expression patterns.

We also developed the molecular diagnostic system for quit small samples obtained from fine needle biopsy. In our system, we can also separate all 5 cell type of head and neck tumor based on the gene expression profiles of 22 selected genes.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部腫瘍 遺伝子 分子遺伝学 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

良性、悪性に関係なく唾液腺腫瘍の有効な治療法は未だ手術のみである。最も頻度の多い耳下腺腫瘍に関しては、その予後（再発）の問題とともに術後合併症である顔面神経麻痺のリスクは患者にとっては切実な問題であり、術式の選択（特に顔面神経の処理）は非常に重要な問題であるため、術前診断の精度は非常に重要である。

しかし唾液腺腫瘍は病理学的に非常に多彩な腫瘍であり、画像診断、穿刺吸引細胞診を用いても術前に診断確定ができないことが多い。この場合、術中迅速病理診断の結果にて術式を決定することになるが、組織学的に **low grade malignancy** 等の場合は、術中迅速診断でも悪性と診断されず、術後の永久病理診断の結果によっては再手術を余儀なくされることもあり、臨床上大きな問題となっている。

また一般的に耳下腺腫瘍に対する生検は腫瘍細胞播種の危険のため禁忌（最も高頻度の多形腺腫では厳禁）とされているが、悪性が強く疑われる場合は行わざるをえない。このように、唾液腺腫瘍は術前の確定診断が容易でないため、術式を含めた治療方針の決定が困難である。

また、耳下腺腫瘍で用いられる穿刺吸引細胞診は、術前に必要不可欠であり、細胞播種の危険も低い安全な検査である。超音波ガイド等の穿刺方法の工夫や病理医との密な連携で正診率の経時的向上は認めるものの、組織型によっては十分な正診率が得られずその精度に限界がある状況であった。

近年各領域の腫瘍において、遺伝学的アプローチを用いた正確な診断と治療法の選択、予後推定が試みられている。我々の研究室では従来より頭頸部腫瘍を対象に遺伝子発現パターンに基づいた腫瘍の分類を試み、腫瘍関連遺伝子の発現解析が頭頸部腫瘍の予後推定に有用であることを報告してきた。また、唾液腺腫瘍に関しては、多形腺腫とワルチン腫瘍が遺伝子学的アプローチで分類可能である事、さらに多形腺腫については組織学的 **3 亜型 (cellular-type, classic-type, myxoid-type)** も分類可能なことを報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、穿刺吸引細胞診と同様の手技で得られた微量検体からの、遺伝学的アプローチによる診断手法を確立し、現状ではなかなか術前の正確な診断が困難な頭頸部腫瘍に対する分子生物学的補助診断を、従来の画像診断、病理組織診断と組み合わせることにより、正診率を向上させることを目的とした。

本研究の成果により、悪性腫瘍の播種によ

る転移のリスクの比較的少ない穿刺細胞吸引で得られた微量検体の遺伝子解析に、従来の検査と組み合わせる事により、より正確な術前評価が可能となり、適切な術式決定に寄与できると考えられる。

本研究では、期間中に達成する目標を2点定めて検討を行った。

(1) 異なる種類（組織学的亜型）の頭頸部腫瘍を区別可能な、分子遺伝学的診断を行う際にマーカーとなる遺伝子の同定（バイオマーカーの同定）。

(2) 穿刺細胞吸引により得られた微量検体からの RNA の抽出、遺伝子発現量の解析手法の確立。

3. 研究の方法

(1) 異なる種類（組織学的亜型）の頭頸部腫瘍を区別可能な、分子遺伝学的診断を行う際にマーカーとなる遺伝子の同定（バイオマーカーの同定）。

本研究では、頭頸部腫瘍摘出術を施行する症例に対して、十分な説明の上、書面で同意を取得して腫瘍組織からの RNA の抽出を行った。

異なる種類（組織学的亜型）の頭頸部腫瘍を区別可能な、分子遺伝学的診断を行う際にマーカーとなる遺伝子の同定（バイオマーカーの同定）を目的に、手術により摘出した腫瘍組織より QIAGEN 社の RNeasy mini kit を用いて Total RNA を抽出した。用いた腫瘍は下記に示す5種類の組織型（病理診断）の症例の計20例である。

Adenoid cystic carcinoma (AdCC) : 4例

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) : 4例

Acinic cell carcinoma (ACC) : 4例

Salivary duct carcinoma (SDC) : 5例

adenocarcinoma, not otherwise

specified (AdCA) : 3例

抽出された total RNA のクオリティを Agilent 社の BioAnalyzer 2100+RNA pico 6000 kit を用いて検討するとともに定量を行った。また、定量は LifeTechnologies 社の Qubit RNA BR quantification kit を用いて行い、いずれか低い値を濃度として採用した。クオリティチェックを行った Total RNA を用いて逆転写を行い、得られた cDNA を Cy3 でラベリングした。得られた cDNA プローブを SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K v2 にハイブリダイズさせ、Cy3 の蛍光を測定した（1色法）

SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K v2 には 50,599 遺伝子 (lincRNA 含む) のプローブが容易されており、全ての遺伝子の発現量を網羅的に解析可能である。

(2) 穿刺細胞吸引により得られた微量検体からの RNA の抽出、遺伝子発現量の解析手法の確立。

(1)と同様に、頭頸部腫瘍摘出術を施行する症例に対して、十分な説明の上、書面で同意を取得して研究を実施した。手術室で摘出した腫瘍組織に対して穿刺細胞吸引診で用いるのと同じ太さの注射針およびシリンジを用いて穿刺細胞吸引を行った。採取した微量検体から mRNA を抽出し、全転写産物増幅法により、転写産物の増幅を行い qRT-PCR 法により遺伝子発現量の解析を行うことにしたが、得られる検体が極微量であるため、QIAGEN 社の RNeasy mini kit を用いた通常の RNA 抽出を行い、逆転写反応を行う手法と、シングルチューブで直接細胞を溶解液に入れ、RNA 抽出と逆転写を行う微量検体用のサンプル調整 Kit の比較検討を行った。細胞溶解液からそのままダイレクトに逆転写を行う方法には、Takara Bio 社の CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit および LifeTechnologies 社の TaqMan Fast Cells-to-CT™ Kit を用いた。

得られた cDNA を用いて、(1) で同定した腫瘍の組織型の特徴となる遺伝子 (特に組織型ごとに特異的な発現を示す遺伝子 (例: Salivary duct carcinoma における androgen receptor (AR) や gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15) など) に対する TaqMan Probe を用意しリアルタイム PCR を用いて遺伝子発現解析を行い、穿刺細胞吸引診により得られた微量検体からの分子遺伝学的補助診断手法を確立するとともに、その有効性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 異なる種類 (組織学的亜型) の頭頸部腫瘍を区別可能な、分子遺伝学的診断を行う際にマーカーとなる遺伝子の同定 (バイオマーカーの同定)。

Adenoid cystic carcinoma (AdCC) : 4 例
 Mucoepidermoid carcinoma (MEC) : 4 例
 Acinic cell carcinoma (ACC) : 4 例
 Salivary duct carcinoma (SDC) : 5 例
 adenocarcinoma, not otherwise specified (AdCA) : 3 例

のサンプルを用いて cDNA マイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現解析を実施した後に、組織型ごとに有意かつ 2 倍以上の遺伝子発現の異なる遺伝子をピックアップした。その結果、5 種類の腫瘍において遺伝子発現量が 2 倍以上異なる遺伝子は 822 種類認められた。次に、この 822 種類の遺伝子発現データを用いて、クラスター解析を行い、遺伝子発現パターンから、腫瘍の組織型を分類可能か

について検討を行った。

その結果、図 1 に示すように AdCA 1 例を除いて腫瘍の組織型毎にクラスターが形成され、822 種類の遺伝子発現パターンから腫瘍を区別することが可能であることが明らかとなった。

発現が2倍以上変化した822遺伝子でクラスタリング

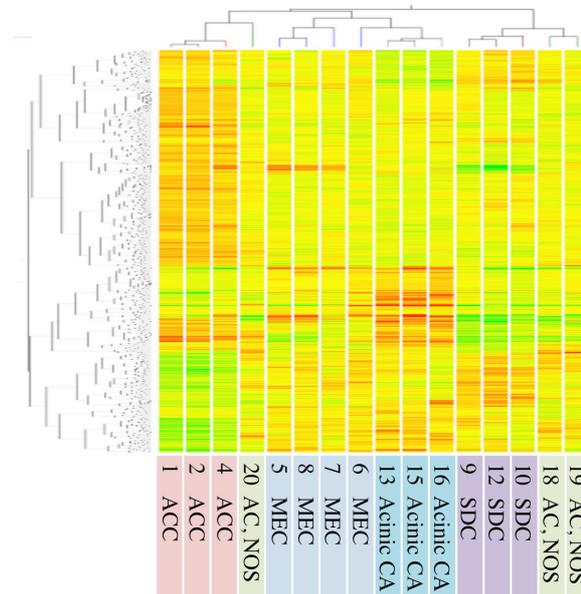


図 1 遺伝子クラスタリング解析の結果 症例番号 20 番を除き全ての腫瘍が組織型毎にクラスタリングされていることが分かる。

このように、腫瘍の組織型において発現パターンが異なることが明らかとなったが、穿刺細胞吸引で得られる極微量の検体から 822 遺伝子の発現量を調べることは困難であるため、①遺伝子発現量が多く解析しやすい、②有意差が大きく区別しやすい、③遺伝子発現の差 (倍率) が異なるために区別しやすいの 3 条件により遺伝子数を減らしてクラスタリ

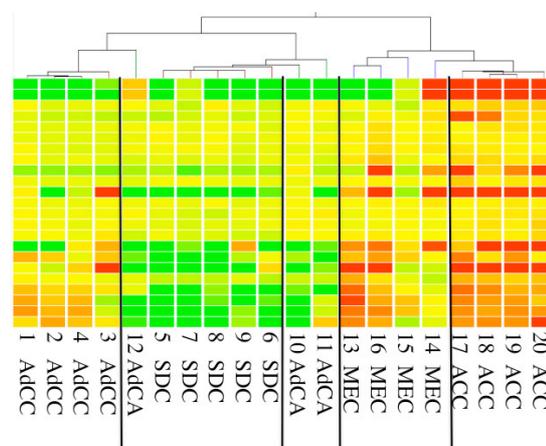


図 2 遺伝子クラスタリング解析の結果 遺伝子数を 22 まで減らしても同様にクラスタリングされていることが分かる。

ング解析を繰り返す手法により、腫瘍を区別するために必要な遺伝子数の絞り込みを行った。その結果、図2に示すように22遺伝子まで絞り込んでも、図1と同じクラスター分類が形成される遺伝子を明らかにすることが出来た。

(2) 穿刺細胞吸引により得られた微量検体からのRNAの抽出、遺伝子発現量の解析手法の確立。

(1)と同じ20検体を用いて、手術室で摘出した腫瘍組織に対して穿刺細胞吸引診で用いるのと同じ太さの注射針およびシリンジを用いて穿刺細胞吸引を行い、採取した微量検体からmRNAを抽出し、全転写産物増幅法により、転写産物の増幅を行いqRT-PCR法により遺伝子発現量の解析を行った。

その結果、QIAGEN社のRNeasy mini kitを用いた通常のRNA抽出を行い、逆転写反応を行う手法により作成したcDNAでは、候補遺伝子のみならず、ハウスキーピング遺伝子であるACTBやGAPDHの発現も検出することが出来なかった。

一方、シングルチューブで直接細胞を溶解液に入れ、RNA抽出と逆転写を行う微量検体用のサンプル調整Kitの比較検討を行った。細胞溶解液からそのままダイレクトに逆転写を行う方法には、Takara Bio社のCellAmp Whole Transcriptome Amplification KitおよびLifeTechnologies社のTaqMan Fast Cells-to-CT™ Kitを用いた場合には、いずれの場合にもハウスキーピング遺伝子であるACTBやGAPDHの発現を確認することができた。

また、腫瘍を区別するためのバイオマーカーとなる遺伝子の発現に関して検討を行ったところ、cDNAマイクロアレイの結果と同様に差を検出することが可能であることが明らかとなった(図3)。

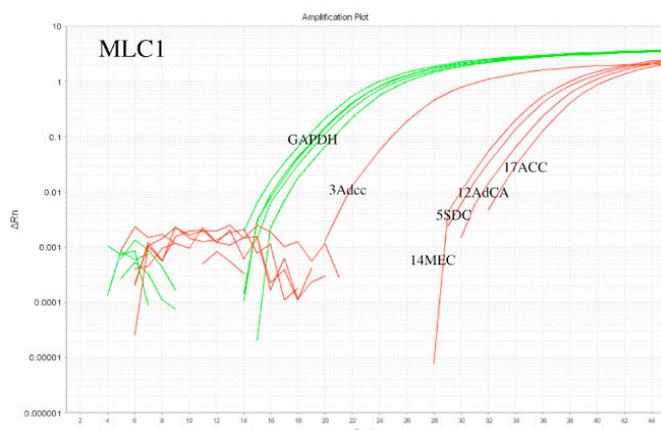


図3 穿刺細胞吸引で得られた極微量試料を用いた遺伝子発現解析
 穿刺細胞吸引で得られた極微量試料を用いた遺伝子発現解析の一例としてMLC1遺伝子の発現を示す。ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現はいずれの腫瘍でも同レベル

であるのに比べ、MLC1 遺伝子の発現は Adenoid cystic carcinoma (AdCC) においては、他の種類の腫瘍と比べ非常に高発現であることが見てとれる。

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 2 件)

- ① Kainuma K, Yano T, Kitoh R, Naito T, Usami S. Prevalence of level V metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. Acta Otolaryngol. 133(2):218-224. 2013 査読あり
- ② 海沼和幸、矢野卓也、内藤武彦、鬼頭良輔、工 穰、宇佐美真一. 頭頸部扁平上皮癌における健側頸部リンパ節転移の検討. 頭頸部外科. 23 (2) :241-248. 2013 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

- ① 矢野卓也, 鬼頭良輔, 北野友裕, 海沼和幸, 宇佐美真一. Mohs 軟膏併用化学放射線療法により病変の制御に至った中咽頭癌巨大頸部リンパ節転移例第 38 回日本頭頸部癌学会 2014. 6. 12-13 東京
- ② 矢野卓也, 佐野健司, 上原剛, 鬼頭良輔, 内藤武彦, 海沼和幸, 宇佐美真一. 唾液腺導管癌 13 症例における HER2 の発現および臨床的検討. 第 25 回信州頭頸部腫瘍研究会 2014. 2. 18. ホテルブエナビスタ (松本)
- ③ 鬼頭良輔, 矢野卓也, 吉村豪兼, 岩佐陽一郎, 内藤武彦, 海沼和幸, 宇佐美真一. 耳下腺腫瘍におけるエラストグラフィの利用について. 第 37 回 日本頭頸部癌学会 2013. 6. 13~14. 京王プラザ (東京)
- ④ 矢野卓也, 鬼頭良輔, 海沼和幸, 宇佐美真一. 当科における化学放射線治療 (CRT) に関する検討. 第 37 回 日本頭頸部癌学会 2013. 6. 13~14. 京王プラザ (東京)
- ⑤ 海沼和幸, 鬼頭良輔, 西尾信哉, 宇佐美真一. 唾液腺癌の分子遺伝学的術前補助診断に関する試み. 第 37 回 日本頭頸部癌学会 2013. 6. 13~14. 京王プラザ (東京)
- ⑥ 吉村豪兼, 鬼頭良輔, 海沼和幸, 宇佐美真一. 当科における化学放射線治療 (CRT) に関する検討. 第 24 回信州頭頸部腫瘍研究会 2013. 2. 5 . ホテルブエナビスタ (松

本)

- ⑦ 海沼和幸 頭頸部扁平上皮癌のレベル5への転移頻度の検討 第23回日本頭頸部外科学会総会 2013. 1. 24～25. 城山観光ホテル (鹿児島)
- ⑧ 海沼和幸、鬼頭良輔、西尾信哉、宇佐美真一. 唾液腺腫瘍の分子遺伝学的診断に関する研究第1回 耳鼻咽喉科フロンティアカンファレンス 2012. 9. 15 旭川グランドホテル
- ⑨ 海沼和幸. 耳下腺と甲状腺に発生した同時性重複癌の1例. 第36回 日本頭頸部癌学会. 2012. 6. 7-6. 8. 島根県民会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海沼 和幸 (KAINUMA, Kazuyuki)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30334907