

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592599

研究課題名(和文) 高悪性度唾液腺癌における上皮間葉転換に基づく治療耐性機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of malignant potential in high-grade salivary carcinoma

研究代表者

白土 秀樹 (Shiratsuchi, Hideki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30398060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌における分子生物学的研究のターゲットはほとんどが扁平上皮癌であり、耳下腺癌をはじめとした高悪性度唾液腺癌はその盲点となっている。本腫瘍の生物学的悪性度は極めて高く、繰り返す再発・転移など、高度の“治療抵抗性”を有する。本研究は蛋白・遺伝子情報を解析することで、間質浸潤能の獲得に關与する上皮間葉転換(EMT)現象と、それに連なる再発転移機構を分析することを目的とした。EMCに關与する可能性のあるEGFR、Her2の分子機序について検討し、HER2,EGFRの遺伝子異常がMAML2キメラ遺伝子発現型低悪性度粘表皮癌の高悪性転化に關与していることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to investigate the molecular mechanisms underlying the development of mucoepidermoid carcinoma (MEC). In 31 cases, we examined the MAML2 fusion status using reverse transcriptase polymerase chain reaction, and HER2 and EGFR status using immunohistochemistry and chromogenic in-situ hybridization. Our results suggest that HER2 or EGFR gene abnormality could play an important role in the development of high-grade MEC, and also in the progression from MAML2 fusion-positive low-/ intermediate-grade to high-grade in a subset of MEC. Furthermore, we suggest that high-grade MEC comprises a heterogeneous group of tumours in terms of molecular pathogenesis, in particular MAML2 fusion status.

研究分野：外科病理学

キーワード：唾液腺腫瘍 高悪性度癌

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌のほとんどは扁平上皮癌でありその解析は他方面から進んでいるが、腺癌が主体の唾液腺癌は全頭頸部癌の3%程度であり、病理学的分類の複雑さと症例の集積の難しさから、分子生物学的解析に関してほとんど報告が無いのが現状である。さらに唾液腺癌の約4割を占める、高悪性度型腺癌に対する治療は極めて困難で、側頭骨浸潤、顔面神経の処理など解剖学的複雑さに起因する切除範囲決定の難しさと、放射線治療、化学療法などの既存の治療の有効性が低い現状を考えると、日常臨床の現場では大きな問題となっている。現に2年生存率は組織型によっては2割程度と、各種治療法の目覚ましい進歩にも関わらず高悪性度唾液腺癌の治療成績が10年前とほとんど変わっていない。主たる原因として化学療法、放射線療法への治療抵抗性が挙げられ、その克服は耳鼻咽喉科・頭頸部外科医師にとっての大きな課題と考える。特に腺様嚢胞癌、唾液腺管癌などの癌は神経浸潤、遠隔転移により最終的に治療不能となる例も多々存在し、全く新しい治療法の確立が強く待たれるところである。また、多形腺腫などの良性腫瘍の中にも被膜外浸潤を伴う、いわゆる invasive carcinoma ex pleomorphic adenoma など、いわゆる progression として生物学的な高悪性形質を獲得する側面もあり、その tumorigenesis の多彩さは際立っていることが、より治療を難しくしている。

代表研究者らは、従来から高悪性度唾液腺癌に対する研究を進めており、高悪性度粘表皮癌における高悪性化機序に Wnt signal が関与することを示した(図1、2)。

(Shiratsuchi et al, 2007)

近年、上皮間葉転換：Epithelial-Mesenchymal Transition(以下 EMT)という現象は、扁平上皮癌浸潤部など多

数の悪性腫瘍で指摘されている。EMT は癌の浸潤、転移に深く関与しており、Snail, twist などの転写因子が EMT に重要な働きをしていることが知られている。唾液腺と発生学的に類似した母体組織からなる乳癌、膵臓癌でも EMT が抗癌薬、放射線感受性、低酸素耐性、及び低栄養状態などのオンコジェニックストレス(Oncogenic stress)抵抗性に対していかに影響を及ぼすかは、先に述べた Wnt signal との相関とした報告、EMT の関与、治療後の幹細胞様腫瘍細胞の存在などの報告などが知られている(Peng et al, 2011)が、唾液腺高悪性度腫瘍に関する報告は存在しない。EMT 現象の解析を通じて新規治療に寄与できないかと考えた。

## 2. 研究の目的

### 1) 高悪性度癌組織型の再分類と、EMT 関連因子、EGFR, Her2 の発現解析

代表研究者らは、まず高悪性度唾液腺癌の代表例である唾液腺管癌(SDC)、高悪性型腺様嚢胞癌(ACC)、多形腺腫内癌(Ca ex pleo)、腺癌(NOS)の4つの代表的組織型について EMT 及び EGFR, Her2 発現を解析する事で、高悪性化の typing を行い、分子標的治療の可能性を探ることを目的とした。

### 2) SDC における EMT に関わる腫瘍間質の浸潤性解析、低酸素/好気性環境下の浸潤性比較検討

SDC は comedo-necrosis という特徴的浸潤様式をとり、低酸素下条件下の増殖浸潤過程をとる。Hif-1 などの発現は EMT を介してより浸潤性に寄与すると考えられており、その発現は放射線化学療法に対する抵抗性を増強することが報告されている。我々が行った microarray による網羅的遺伝子解析でも正常組織と比較して SDC では Hif1 family 関連遺伝子の高発現を認めた。(Wakasaki et al, unpublished data) EMT に関与する治療耐性のメカニズム候補として低酸素/好酸素条

件下の浸潤性を比較検討することを考えた。

### 3. 研究の方法

九州大学および関連施設で治療した、高悪性度唾液腺腫瘍症例の標本を用いて、免疫組織化学的および分子生物学的解析を行った。

RNA は miRNeasy FFPE Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いて、パラフィン包埋標本から抽出し、一本鎖 cDNA は Superscript III Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて合成した。CRTC1, CRTC2, CRTC3-MAML2 融合遺伝子検出のために、以前の報告と同じプライマーとサイクル数で RT-PCR を施行した。PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、ABI Prism 310 sequence analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で、ダイレクトシークエンス法でシークエンスを行った。

### HER2 と EGFR 蛋白の免疫組織化学染色の染色方法と評価

ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を使用し、HER2 と EGFR の免疫組織化学染色を行った。HER2 蛋白発現は Dako HercepTest (Dako) の基準や最近のアメリカ臨床腫瘍学会 (ASCO) / アメリカ病理学会 (CAP) のガイドラインに従い、細胞膜上の染色性で発現を評価した。

### HER2 と EGFR 遺伝子の chromogenic *in situ* hybridization の方法と評価

通常の明視野顕微鏡を用いて組織構造と特定の遺伝子異常を比較するために、chromogenic *in situ* hybridization を行った。HER2 CISH は、乳癌の ASCO/CAP ガイドラインに従って評価した。EGFR 遺伝子増幅は、EGFR と第 7 番染色体のセントロメアとの比で計測し、HER2 の基準を用いて評価した。

### EGFR, BRAF, KRAS, HRAS, EGFR variant III の遺伝子変異解析

ゲノム DNA は、QIAampDNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いてパラフィン標

本から抽出した。EGFR exon18、EGFR exon 19、EGFR exon 21、BEAF exon15、KRAS exon1、HRAS exon2 の変異解析は、以前の報告通りのプライマーとサイクル数で PCR を行った。

### 4. 研究成果

頭頸部癌における分子生物学的研究のターゲットはほとんどが扁平上皮癌であり、耳下腺癌をはじめとした高悪性度唾液腺癌はその盲点となっている。本腫瘍の生物学的悪性度は極めて高く、繰り返し再発・転移など、高度の“治療抵抗性”を有する。本研究は蛋白・遺伝子情報を解析することで、再発転移機構を分析することを目的とした。

#### MAML2 融合遺伝子

CRTC1-MAML2 融合遺伝子は、解析可能であった 26 例中 14 例 (53.8%) で検出された (表 2)。CRTC3-MAML2 融合遺伝子は 26 例中 1 例 (3.8%) のみで検出された。合計で、MAML2 融合遺伝子は 26 例中 15 例 (57.7%) で検出された。悪性度別での MAML2 融合遺伝子の頻度は、低悪性度 MEC の 16 例中 11 例 (68.8%)、中悪性度 MEC の 4 例中 2 例 (50%)、高悪性度 MEC の 6 例中 2 例 (33.3%) であった。残りの 11 例はいずれも MAML2 融合遺伝子は検出されなかった。PCR 産物のシークエンスにて、CRTC1 exon1 もしくは CRTC3 exon1 と MAML2 exon2-5 の融合を確認した。この 2 つのタイプの融合遺伝子は相互排他的であった。同じ組織学的悪性度の中で、MAML2 融合遺伝子の有無による組織学的な違いは認めなかった。

#### HER2 蛋白過剰発現と HER2 遺伝子増幅

IHC で、HER2 蛋白過剰発現を MEC 31 例中 4 例 (12.9%) に認め、内訳は中悪性度 MEC 5 例中 1 例 (20%) と高悪性度 MEC 8 例中 3 例 (37.5%) であった。HER2 IHC 陽性症例において、HER2 の発現は扁平上皮様細胞や中間細胞の細胞膜に発現を認めたが、粘液細胞への発現は認めなかった。さらに、低悪性度 MEC

や、唾液腺正常組織の腺房細胞や導管細胞には、HER2 蛋白過剰発現は認めなかった。*HER2* 遺伝子増幅は、CISH 判定可能であった MEC 28 例中 4 例 (14.3%) に認め、内訳は中悪性度 MEC 4 例中 1 例 (25%) と高悪性度 MEC 7 例中 3 例 (42.9%) であった。*HER2* 遺伝子増幅があった 4 例で、*HER2/CEP17* 比は 3.21 から 7.32 であった (中央値 : 5.02)。この 4 例で、扁平上皮様細胞と中間細胞の間での *HER2* 遺伝子増幅の差は認めなかった。また、CISH 標本での粘液細胞の同定は困難であった。正常唾液腺組織に *HER2* 遺伝子増幅は認めなかった。

*HER2* 蛋白過剰発現は、*HER2* 遺伝子増幅を識別するための高い感度 (100%) と特異度 (100%) を示し、*HER2* 蛋白過剰発現と *HER2* 遺伝子増幅は強い関連を認めた。さらに、*HER2* 蛋白過剰発現と *HER2* 遺伝子増幅の両方とも組織学的悪性度との関連を認めた ( $P=0.0432$  と  $P=0.0376$ )。

#### EGFR 蛋白過剰発現と EGFR 遺伝子コピー数増加

正常唾液腺組織において、EGFR 蛋白の細胞膜発現は介在部導管細胞、線条部導管細胞、排出管細胞には部分的に認めたが、腺房細胞には認めなかった。EGFR 蛋白過剰発現を MEC 31 例中 19 例 (61.3%) に認め、内訳は低悪性度 MEC 18 例中 10 例 (55.6%)、中悪性度 MEC 5 例中 3 例 (60%) と高悪性度 MEC 8 例中 5 例 (62.5%) であった。EGFR IHC 陽性症例において、扁平上皮様細胞と中間細胞の細胞膜に全周性に発現を認め、さらに腫瘍胞巣の反内腔側の細胞もしくは基底細胞にも発現を認めたが、粘液細胞に発現は認めなかった。CISH 判定が可能であった 28 例中、第 7 番染色体の 2 倍体が 15 例 (53.6%)、第 7 番染色体の低ポリソミー/3 倍体は 9 例 (32.1%)、第 7 番染色体の高ポリソミーは 4 例 (14.3%) に認めた。高ポリソミーを認めた 4 例は全て高悪性度 MEC であった。*EGFR* 遺伝子コピー数の

増加は、第 7 番染色体の高ポリソミーと一致していた。また、*EGFR* 遺伝子コピー数の増加は扁平上皮様細胞と中間細胞には認めた。しかし、CISH 標本での粘液細胞の同定と評価は困難であった。*EGFR* 遺伝子増幅はいずれの症例にも認められなかった。正常唾液腺組織では、*EGFR* 遺伝子コピー数の変化は認めなかった。

EGFR 蛋白過剰発現は、*EGFR* 遺伝子コピー数の増加を識別するための高い感度 (100%) を示すが、特異度や陽性的中率は低値であった (45.8%、23.5%)。*EGFR* 遺伝子コピー数の増加は組織学的悪性度と相関を認めたが ( $P=0.0017$ )、EGFR 蛋白過剰発現は組織学的悪性度との相関は認めなかった ( $P=1.00$ )。

#### EGFR、HRAS、KRAS、BRAF 遺伝子変異解析

*EGFR* exon18、exon19、exon21 そして *EGFR* variant III の遺伝子変異は全症例で認めなかった。*KRAS* そして *BRAF* の遺伝子変異も認めなかった。1 例のみに *HRAS* のコドン 12 とコドン 13 に点突然変異を認めた。コドン 12 は GGC から GGT への変異 (アミノ酸変化はなし) で、コドン 13 は GGT から AGT への変異 (グリシンからセリンへの変異) であった。この症例は、低悪性度、*CRTC1-MAML2* 融合遺伝子陽性、*HER2* IHC 陰性、*EGFR* IHC 陰性であった。

#### 組織学的悪性度、MAML2 融合遺伝子、HER2、EGFR の包括的分析

低悪性度 MEC 内では、*MAML2* 融合遺伝子は 11/16 例 (68.8%) に認めるが、*HER2* もしくは *EGFR* の遺伝子コピー数の変化は認めなかった。中悪性度 MEC 内では、*MAML2* 融合遺伝子 2/4 例 (50%) に認めるが、*EGFR* の遺伝子コピー数の変化は認めず、*HER2* 遺伝子増幅は *MAML2* 融合遺伝子陰性の 1 例のみに認めた。高悪性度 MEC 内では、*MAML2* 融合遺伝子は 2/6 例 (33.3%) に認め、また *HER2* 遺伝子増幅は

3/7 例 (42.9%) に、そして *EGFR* の遺伝子コピー数増加は 4/7 例 (57.1%) に認められた。このように、*HER2* もしくは *EGFR* 遺伝子コピー数の増加は、CISH の判定が可能であった 7 例の高悪性度 MEC の全症例に認め、このうち 2 例が *MAML2* 融合遺伝子陽性で、4 例が *MAML2* 融合遺伝子陰性、残りの 1 例は融合遺伝子検出にはサンプル不適切であった。*HER2* 遺伝子増幅と *EGFR* 遺伝子コピー数増加は相互排他的であった。

また、*MAML2* 融合遺伝子有無という点で見ると、*MAML2* 融合遺伝子陽性 15 例中で、*EGFR* と *HER2* 遺伝子コピー数増加はそれぞれ 1 例認め (6.7%、6.7%)、そのいずれも高悪性度 MEC であった。一方で、*MAML2* 融合遺伝子陰性の 11 例中で、*EGFR* 遺伝子コピー数増加は 2 例 (18.2%)、*HER2* 遺伝子増幅は 3 例 (27.3%) に認められた。この 5 例の MEC の中で、4 例が高悪性度 MEC で、1 例が中悪性度 MEC であった。

### MEC の原発巣と再発巣での *HER2* と *EGFR* の分析

再発は 7 例 (22.6%) に認め、内訳は 2 例が高悪性度 MEC、3 例が中悪性度 MEC、2 例が低悪性度 MEC であった。再発巣の組織形態は基本的に原発巣と同じ、つまり原発巣と再発巣の間での核分裂像や細胞退形成に違いは認めなかった。*HER2* の IHC と CISH の結果は、両方とも原発巣と転移巣との間で基本的に保たれていた。再発巣の標本が入手可能であった 6 例中 2 例で、IHC での *EGFR* 蛋白発現が増加していた。この 2 例中で、1 例は原発巣も転移巣も CISH で *EGFR* は陰性であり、もう 1 例は原発巣と転移巣のいずれも CISH では評価不能であった。残りの 4 例は、*EGFR* の IHC や CISH の変化は認めなかった。

### 組織学的悪性度、*MAML2* 融合遺伝子、*HER2*、*EGFR* と予後

全例で、組織学的悪性度と全生存率の低

下には有意な相関を認めた。検討可能であった 26 例で、*MAML2* 融合遺伝子陽性症例は陰性症例と比較して予後良好の傾向は認められたが、統計学的有意差は認めなかった。データの得られた 28 例で、*EGFR* 遺伝子コピー数増加のある症例は、増加のない症例と比較して有意な全生存率の低下を認めた。高悪性度 MEC の 7 例中で、*EGFR* 遺伝子コピー数増加陽性症例は *HER2* 遺伝子増幅陽性症例よりも生存期間が短い傾向を認められたが、統計学的有意差は認めなかった。*HER2* 蛋白過剰発現、*HER2* 遺伝子増幅、もしくは *EGFR* 蛋白過剰発現と全生存率との相関は認めなかった ( $P=0.5788$ 、 $P=0.555$ 、 $P=0.2156$ )。

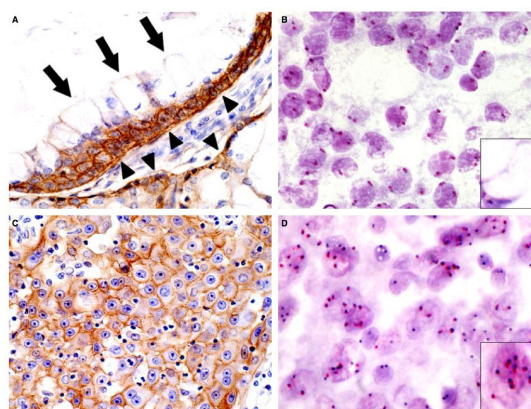


図 1 *EGFR* 蛋白発現 (矢印は陽性所見)

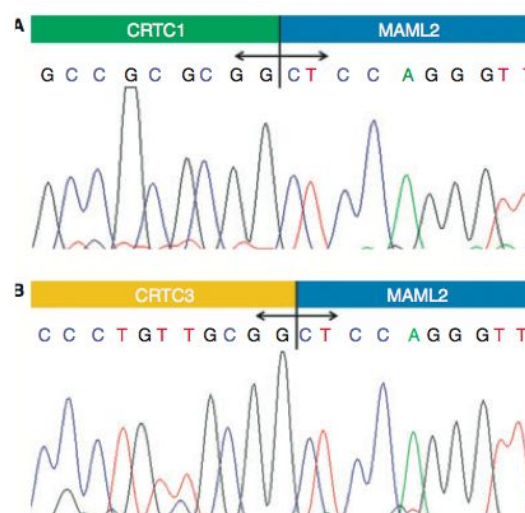


図 2 : 粘表皮癌における *MAML2* キメラ遺伝子

### 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 5件)

1. Nakano T, Yamamoto H, Hashimoto K, Tamiya S, Shiratsuchi H, Nakashima T, Nishiyama K, Higaki Y, Komune S, Oda Y. HER2 and EGFR gene copy number alterations are predominant in high-grade salivary mucoepidermoid carcinoma irrespective of MAML2 fusion status. *Histopathology*. 2013 Sep;63(3):378-92.

2. Yamauchi M, Nakano T, Nakashima T, Yasumatsu R, Hashimoto K, Toh S, Shiratsuchi H, Oda Y, Komune S. Interferon Inducible IFI16 Expression in p16 Positive Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx. *ISRN Otolaryngol*. 2013 Jul 11;2013:263271.

3. Segawa Y, YZU asumatsu R, Shiratsuchi H, Tamae A, Noda T, Yamamoto H, Komune S. Inflammatory pseudotumor in head and neck. *Auris Nasus Larynx*. 2013 Dec 17. pii: S0385-8146(13)00210-1.

4. Yonezawa M, Yabuuchi H, Matsuo Y, Kamitani T, Shiratsuchi H, Yamamoto H, Honda H. Spindle-cell carcinoma of the hypopharynx presenting with a pedunculated appearance: CT and MR features. *Jpn J Radiol*. 2013 Mar;31(3):211-4. 10.1111/his.12183. Epub 2013 Jul 16.

5. Hashimoto K, Yamamoto H, Shiratsuchi H, Nakashima T, Tamiya S, Nishiyama K, Higaki Y, Komune S, Tsuneyoshi M, Oda Y. HER-2/neu gene amplification in carcinoma ex pleomorphic adenoma in relation to progression and prognosis: a chromogenic in-situ hybridization study. *Histopathology*. 2012 May;60(6B):E131-42

〔学会発表〕(計 2 件)

唾液腺癌症例における EGFR 症例の検討

白土秀樹他 日本頭頸部外科学会 2015.1 大阪

唾液腺腫瘍における再発様式の臨床病理学的検討

白土秀樹他 日本耳鼻咽喉科学会 2014.5 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

1)研究代表者

白土 秀樹 ( HIDEKI SHIRATSUCHI )  
九州大学 医学研究科 研究員  
研究者番号: 30398060

(2)研究分担者

中島 寅彦 ( TORAHIKO NAKASHIMA )  
九州大学 医学研究科 准教授  
研究者番号: 00284505

(3)連携研究者 なし