

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790356

研究課題名(和文) 粘表皮癌に関連した変異遺伝子の分子病理学的解析と新病理診断基準構築への検討

研究課題名(英文) Pathological study of new diagnostic criteria and molecular analysis of mucoepidermoid carcinoma

研究代表者

宮部 悟 (Miyabe, Satoru)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40534582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺粘表皮癌の特異的遺伝子異常であるCRTC1-MAML2およびCRTC3-MAML2キメラ遺伝子の臨床病理学的特徴を明らかにするため、これまでとは異なる遺伝子異常検索方法であるFISH解析を行った。この結果、これらの遺伝子異常を検出する方法論として、RT-PCR法に比べ、FISHによる検出が比較的感度が良いことは示唆された。(Clinicopathological significance of MAML2 gene split in mucoepidermoid carcinoma. Cancer Sci. 2013 Jan;104(1):85-92. )

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the clinic pathologic features of CRTC1MAML2 and CRTC3MAML2, we analyzed them by the another method, FISH analysis. As a result, we suggested FISH higher sensitive detects about these gene abnormalities, compared to RT-PCR method. We reported these results to then paper. <Clinicopathological significance of MAML2 gene split in mucoepidermoid carcinoma. Cancer Sci. 2013;104:85-92>

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：分子病理

### 1. 研究開始当初の背景

粘表皮癌は唾液腺悪性腫瘍の中で最も頻度の高い腫瘍であり、我々はこれまでに、新規遺伝子異常 CRTC1-MAML2 および CRTC3-MAML2 キメラ遺伝子が、この腫瘍に特異的であり、予後良好と関連する重要な分子生物学的マーカーであることを世界に先駆けて報告した。

キメラ遺伝子による腫瘍発生機序として cAMP 関連シグナル経路を異常化するとされるが、その詳細は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

申請者は本キメラ遺伝子による腫瘍発生機序、その他の遺伝子異常、現在用いられている分子標的治療剤への応用の可能性を明らかにし、キメラ遺伝子を利用した新しい粘表皮癌悪性度評価法の構築と、世界標準となる新診断基準の制定を目指して研究を立案した。

### 3. 研究の方法

(1) その他の MAML2 関連遺伝子異常のスクリーニングと同定：各キメラ遺伝子陰性症例において当方に保存している凍結材料、パラフィン材料を用いて 2 色蛍光間期 fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて t(11:19)、第 11 番、第 19 番染色体の splitting を検索した。

プローブは SPECT(11;19), dual color break apart probe (ZytoLight) を用いた。薄切標本は脱パラフィンおよび蛋白分解酵素処理 (プロテナーゼ K) を行い、プローブと切片を 90 10 分間、denature した後、42 度で overnight し、ハイブリダイゼーションを行った。

蛍光顕微鏡で得られたシグナルは高感度カメラに撮影後、解析を行った。カットオフ値は正常唾液腺 20 例を用い、平均 + 3 標準偏差から求めた。

(2) 新たに報告された新規キメラ遺伝子 EWSR1-POU5F1 の分子病理学的解析：

CRTC1-MAML2 キメラ遺伝子陰性症例において、当方に保存している凍結材料、パラフィン包埋組織材料から fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて t(6:22)、第 6 番、第 22 番染色体の splitting を検索した。

プローブは EWSR1 break apart FISH probe (Vysis) を用いた。さらに RT-PCR 法と direct sequencing 法を併用して break point を確認した。EWSR1-POU5F1 陽性症例について臨床病理学因子との関連を解析した。

また FISH 法にて splitting を検出した症例は 5' RACE 等を用いて新たな切断点や EWSR1 のパートナー遺伝子について検索した。

(3) CRTC1/3-MAML2 キメラ遺伝子の臨床病理学的意義の確定を目的とした多施設共同前方視的研究：これまで申請者らが行ってきた後方視的研究において、CRTC1/3-MAML2 キメラ遺伝子は、1) 粘表皮癌症例の約 40% に関与する、2) 他の唾液腺腫瘍には関与しない、3) キメラ遺伝子陽性症例の多くは予後良好である、ことを示してきた。しかし過去における本キメラ遺伝子検出率についての報告では 27-81% と当方やアメリカなどの施設間で差を認め (Martins C, J Mol Diagn, 2004 and Tirado Y, Genes Chromosomes Cancer, 2007)、キメラ陽性症例の予後も各々である。これらのキメラ遺伝子の検出報告はいずれも後方視的に行われており、交絡因子などのバイアスを可及的に減らした前方視的検討の必要性が重要とされる。粘表皮癌の発生頻度は 0.1 人/10 万人であり、申請者の研究施設のある自治体 (愛知県) と共同研究施設の症例を合わせて 2 年間で 10 例弱の症例獲得を見込めると考えられ、これらの前方視的解析結果から CRTC1/3-MAML2 キメラ遺伝子の臨床病態病理学的意義が明らかにされるもの

と期待される。

#### 4. 研究成果

(1) 我々は粘表皮癌 95 例を用い、FISH 法を用いた *MAML2* 関連キメラ遺伝子スプリットの検索を行い、臨床病理学的検討を行った。結果、*MAML2* 遺伝子スプリットが良好な臨床病理学的特徴と、良好な確定生存率および無病生存率と関連する重要な遺伝子マーカーであることを実証した。FISH 法はパラフィン切片を用いて容易に行えるため、FISH 法を用いた *MAML2* 遺伝子スプリットの検出は、臨床においても予後良好な粘表皮癌の特定など、有用となる可能性があると考えられた。また *CRTC1/3-MAML2* キメラ遺伝子の RT-PCR 法による解析は、FISH 法に加え、さらなる粘表皮癌の特徴づけに用いることができると考えられた。

これまで報告されている *MAML2* 関連と考えられる遺伝子異常 (*CRTC1-MAML2* および *CRTC3-MAML2* キメラ遺伝子) 以外の遺伝子異常を検索するため、3'RACE, 5'RACE 法を用いて未知の '*MAML2* 遺伝子と融合している遺伝子検索'を行った(3'RACE, 5'RACE 法で用いた PCR primer を table 1 示す)。

Table 1. Sequences of primers

Primer	Sequence (5'-3')
CRTC1A (outer)	tcgctgcaaatcagaag
CRTC1B† (inner)	gaggtcatgaaggacctgag
CRTC3A (outer)	tcgctgcaacgcagaga
CRTC3B (inner)	cagagacagccgaggagac
MAML2A (outer)	ggtcgtgctgctgtgacag
MAML2B† (inner)	ttgctgtggcaggagatag

†Primers used for quantitative RT-PCR. CRTC 1, cAMP response element-binding protein (CREB)-regulated transcription coactivator 1 (CRTC1); MAML2, mastermind-like gene 2.

結果は negative であった。当初予想されていた問題点として、パラフィン切片から抽出した mRNA 試料を用いていることから RACE 法に反応していない可能性が考えられたため、その他の検索法として、*MAML2* break apart FISH probe を用いて、当研究チームが有している 120 例の粘表皮癌について検索を行ったが、同様に新規遺伝子異常は検出されなかつ

た。検出された *MAML2* 遺伝子異常について、陽性群と陰性群について以下患者の臨床因子について、検討を行った (table.2)。

Table 2. Patients' characteristics

Clinical findings		
Age (years)	Mean	53.7
	>60	35
	<60	60
Sex	Male	51
	Female	44
Tumor site	Major	37
	Minor	58
Tumor size	>2 cm	53
	<2 cm	42
Nodal status	Positive	19
	Negative	76
Clinical stage	I, II	74
	III, IV	21
Histological findings		
Histological grade	Low	67
	Intermediate	9
	High	19
Cystic component	>20%	46
	<20%	49
Neural invasion	Positive	8
	Negative	87
Necrosis	Positive	18
	Negative	77
Mitoses	>4/10 HPF	19
	<3/10 HPF	76
Anaplasia	Positive	30
	Negative	65

遺伝子異常の臨床病理学的特徴は、これまで当研究チームが報告してきた内容と矛盾しないものであったが、RT-PCR 法による検出と FISH 法による検出には差異を認めた。

FISH 法による検出の様子を示す (Fig.3)。

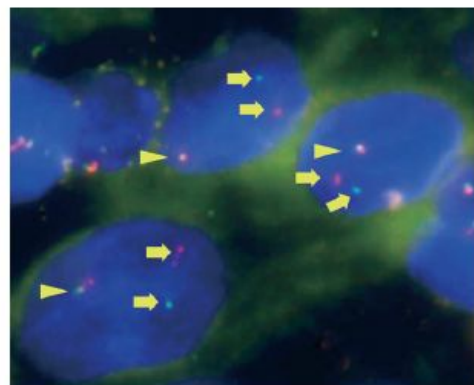


Fig. 3. FISH analysis for the *MAML2* gene split. Arrows indicate split signals. Arrowheads indicate unsplit *MAML2* genes.

また *MAML2* 遺伝子異常の定量目的に行った real-time PCR の結果を以下に示す (Fig.2)。

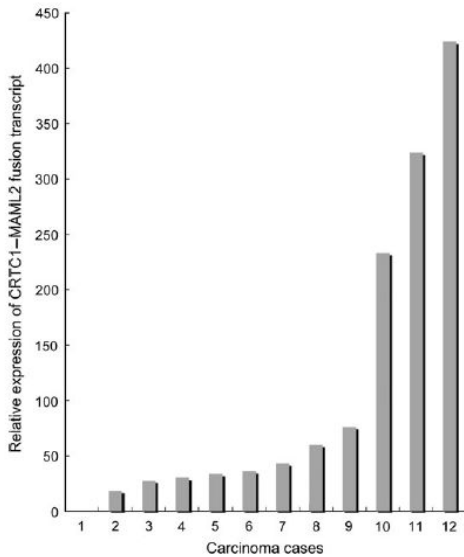


Fig. 2. Relative expression of the CRTC1-MAML2 fusion transcript in quantifiable tumor cases (n = 12).

以上の結果から、当方で解析した粘表皮癌について、RT-PCR 結果と FISH 法の結果の相違から、Fig.4 に示すがごとき、4 群に分類されることを示した。今後 Fig.4 の ' No detectable MAML2 abnormalities (MAML2 split-negative) (n=33) ' 群の詳細な解析が必要であることを示した。

CRTC1-MAML2 (n = 37)	CRTC3-MAML2 (n = 6)	No detectable MAML2 abnormalities (MAML2 split-negative) (n = 33)
	X-MAML2 (n = 19)	

Fig. 4. Mucoepidermoid carcinoma cases (n = 95) are divided into four groups using RT-PCR assays for CRTC1/3-MAML2 fusions and FISH analysis for the MAML2 gene split. The X-MAML2 group may include mucoepidermoid carcinoma cases with non-CRTC1/3 fusion partners and those with low fusion transcript expression.

さらに、現在新たな遺伝子異常検索方法をすでに策定し、パラフィン標本で解析が可能な様に検出工夫している。結果がまとまり次第、順次報告予定である。

(2) 新規キメラ遺伝子 EWSR1-POU5F1 の分子病理学的解析として、fluorescence in situ hybridization (FISH)法を用いて t(6:22)、第 6 番、第 22 番染色体の splitting を検索

した。プローブは EWSR1 break apart FISH probe (Vysis)を用いた。CRTC1/3-MAML2キメラ遺伝子陰性の 50 例の粘表皮癌について検討を行ったが、いずれの症例にも明かな EWSR1-POU5F1 split を認めなかった。今後 RT-PCR 法を併用して、追加検討を行い、報告する予定である。

(3) 本キメラ遺伝子の臨床病理学的意義の確定を目的とした多施設共同前方視的研究として、当研究チームの所在する名古屋医療圏に於ける大規模唾液腺腫瘍治療施設から、唾液腺腫瘍症例をこれまでの粘表皮癌 120 例に加え 20 例の計 140 例、およびその他の唾液腺腫瘍も約 80 例について症例収集を行った。臨床情報、パラフィンブロック薄切標本その他はすでに収集予定であり、今後順次論文として経過、内容を報告予定である。

## 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 1 件 )

Noda H1, OkumuraY, NakayamaT, Miyabe S,  
Fujiiyoshi Y, Hattori H, Shimozato K, Inagaki H.,  
Clinicopathological significance of MAML2 gene split in mucoepidermoid carcinoma.CancerSci.  
2013 Jan;104(1):85-92. doi: 10.1111

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮部 悟 (MIYABE, Satoru)

名古屋市立大学医学研究科・研究員

研究者番号 : 40534582