

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462857

研究課題名(和文) 唾液腺腫瘍の生物学的態度に関わる因子の病理学的、分子生物学的解析

研究課題名(英文) Pathologic and molecular analysis of factors related to the biological behavior of salivary gland tumors

研究代表者

小川 郁子 (Ogawa, Ikuko)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号：70136092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多彩な組織像と多様な生物学的態度を示す唾液腺腫瘍の確定診断や悪性度判定に有用なタンパク、遺伝子の変化について融合遺伝子と免疫形質発現を検討し、臨床応用することを目的とした。粘表皮癌では非典型的組織像を呈する症例を対象としてCRTC1/3-MAML2融合遺伝子を調べ、確定診断への有用性が明らかとなった。腺様嚢胞癌ではMYBタンパク発現が多形腺腫との鑑別の補助として利用できる可能性があった。また、Reg の過剰発現とそれによるEGFRのリン酸化が転移と関連する傾向にあった。Runx3は、核内発現が低下し、細胞質内での発現が亢進しており、腺様嚢胞癌でも癌抑制遺伝子として作用していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Salivary gland tumors show a wide spectrum of histological features with varied biological behavior. To confirm the diagnosis and evaluate the clinical outcomes, the analysis of tumor type specific fusion genes and immunophenotypes was performed using formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissues. In mucoepidermoid carcinoma, CRTC1/3-MAML2 fusion genes were detected in not only typical cases, but also atypical histological cases. The fusion gene analysis using the routinely processed tissue materials might be useful tool for the differential diagnosis. MYB immunostaining may be supplemental tool for the differentiation between adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma. The overexpression of Reg which was associated pEGFR was related to the metastasis in adenoid cystic carcinoma. Runx3 expression was reduced in nucleus and found in cytoplasm, indicative of tumor suppressor function in adenoid cystic carcinoma.

研究分野：口腔病理学

キーワード：唾液腺腫瘍 病理診断 融合遺伝子 粘表皮癌 腺様嚢胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍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。唾液腺腫瘍は発生頻度は低いものの、全身諸臓器のなかでも病理診断の確定が困難な腫瘍とされている。その理由として、唾液腺腫瘍は多彩な組織像と多様な生物学的態度を示し、一般的な腫瘍で用いられる細胞異型の有無によって良性・悪性を判定するという基準が適用できない腫瘍型が存在すること、また、同一腫瘍でも悪性度が異なるものがあること、さらに一つの腫瘍内に悪性度の異なる組織像が重複してみられる例があることなどが挙げられている。我が国では、近年、病理診断医の不足と専門の細分化が進んでいることから、唾液腺腫瘍の病理診断にコンサルテーションを求めることがしばしばある。本研究の代表者、分担者は、日本病理学会の頭頸部、口腔領域のコンサルテーションシステムのメンバーであり、外部医療機関から多数の唾液腺腫瘍の診断について助言を依頼されている。

病理診断の場で、特に問題となるのは、治療方針の決定に直接関わる良性、悪性の確定と悪性度の判定である。形態学的所見を基本とし、免疫染色などで腫瘍細胞の分化を調べ、また、増殖マーカーKi-67陽性細胞率を参考にして確定診断を行うのが一般的であるが、多くの腫瘍型がある唾液腺腫瘍では、その生物学的態度を規定する因子も多彩であると推測され、特定の腫瘍型に特異的な変化の同定や、多角的な検討が必要である。また、シグナル伝達系も含めて解明することが診断のみならず、それをターゲットとする分子標的療法の可能性に繋がる可能性がある。

そこで、本研究では、従来の病理組織標本を基本とする組織学的と分子病理学的な解析を行い、唾液腺腫瘍の確定診断、生物学的態度や悪性度判定に役立つ因子の抽出を目指した。

## 2. 研究の目的

唾液腺腫瘍の病理診断の標準化、均てん化、さらに個々の症例の生物学的態度の推定に繋がる客観的な診断基準の策定を目的とし、主に臨床材料を用いて、融合遺伝子の形成、腫瘍細胞の増殖や浸潤・転移に係する可能性のある遺伝子やタンパクの変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 融合遺伝子の検討

粘表皮癌では *CRTC1/3-MAML2* 融合遺伝子、乳腺相似分泌癌では *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子を診断確定に用いるため、腫瘍の中性緩衝ホルマリン固定、パラフィン包埋組織を用いて検討を行った。RNAを抽出し、RT-PCRによりcDNAを作成して、特性を高めるためにNested PCR法で目的とする遺伝子配列を増幅させ、融合遺伝子の有無を検討した。

腺様嚢胞癌では *MYB-NFIB* 融合遺伝子の形成によって発現が上昇することが報告されている *MYB* タンパクに対する免疫染色を行った。対照として多形腺腫についても検討した。(2) 腺様嚢胞癌での転移との関連を有するタンパク発現の検討

腺様嚢胞癌の中性緩衝ホルマリン固定、パラフィン包埋組織を用いて、免疫染色よりRegの発現とそれに関係するリン酸化EGFR, survivin発現、また、MMP-7, Runx3の発現を調べた。ついて、それぞれと転移との関連性の有無を検討した。

### (3) 増殖活性の検討

腺様嚢胞癌、粘表皮癌、腺房細胞癌の中性緩衝ホルマリン固定、パラフィン包埋組織を用いてgemininについて免疫染色し、陽性細胞率と悪性度との関連を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 融合遺伝子について

唾液腺腫瘍では腫瘍型に特異的な融合遺伝子が相次いで見出され、その同定が診断確定に役立つことが報告されている。そこで、非特異的な組織像を示す粘表皮癌を対象として、RT-PCRで *CRTC1/3-MAML2* の発現を調べ、また、腺様嚢胞癌では *MYB-NFIB* 融合遺伝子同定の代わりとなる *MYB* タンパクに対する免疫染色を行った。この検討は、当初の研究計画には含まれていなかったが、組織所見のみでは粘表皮癌との確定は困難な例が多くあり、また、生検組織で多形腺腫と腺様嚢胞癌との鑑別がむずかしい症例もあるため、実施した。さらに、腺房細胞癌や低悪性篩状嚢胞腺癌との鑑別が問題となる乳腺相似分泌癌の症例についても *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子の検討による診断を実施している。

1) 非特異的組織像を示す粘表皮癌における融合遺伝子の診断への適用

24例中9例(37.5% *CRTC1-MAML2*:8例, *CRTC3-MAML2*:1例)に融合遺伝子が検出された。陽性症例には粘表皮癌の定型的組織像を示した3症例に加えて、嚢胞形成が目立ち、嚢胞腺腫との鑑別が必要であった症例やオンコサイト、明細胞が主体を占める症例、あるいは明らかな角化を示し、扁平上皮癌との鑑別を要する症例など、非定型的な組織像を示すものも含まれ、小さな生検組織でも検出可能であった。臨床経過の確認できた症例では、融合遺伝子のみられた例はすべて生存しており、これまでの報告と同様に融合遺伝子と予後との関係が示唆された。顎骨に発生した2症例では、組織学的には腺様嚢胞癌からの発生が疑われたが、融合遺伝子の検索により、1例は全体が粘表皮癌であり、他の1例は腺性嚢胞癌から粘表皮癌が発生したことを確認できた。

2) 腺様嚢胞癌における *MYB* タンパク発現の診断への適用

*MYB-NFIB* 融合遺伝子の形成によって発現が上昇する *MYB* タンパクに対する免疫染色

を行い、鑑別診断で問題となる多形腺腫での発現と比較した。

正常唾液腺組織では腺房や導管上皮に MYB の発現はなかったが、筋上皮が陽性となるものがあつた。腺様嚢胞癌では核に明瞭な陽性反応がみられ、胞巣外層あるいは偽嚢胞腔を囲む腫瘍性筋上皮/基底細胞様細胞で強く発現される傾向があつた。これまでの報告例を参考に、5%以上の細胞の核に明瞭な発現がみられる症例を陽性とした。検討した 25 例中 11 例 (44%) が陽性で、管状、篩状、充実性胞巣で染色性に大きな違いはなかった。同一切片でも場所によって染色性が異なる症例があり、切片の縁が陽性になりやすい傾向があつたことから速やかにホルマリン固定された部分で抗原性が保たれている可能性が考えられ、免疫染色での検討には固定条件が重要であることが示唆された。なお、多形腺腫 10 例では 3 例に弱い反応がみられたが、陽性と判定できる症例はなかった。

(2) 腺様嚢胞癌における転移との関係を有するタンパクについて

腺様嚢胞癌は、唾液腺腫瘍では中悪性に位置付けられ、長期の経過で再発や転移を来し、最終的には予後不良の腫瘍である。そこで、悪性腫瘍での転移や予後と関連することが報告されているタンパクについて検討した。

1) Reg (regenerating islet-derived family member 4)

Reg は、EGFR と Akt のリン酸化を起こし、腫瘍での過剰発現は、細胞の増殖と生存、細胞接着やアポトーシス抵抗性などに関わり、癌の進展や予後と関連することが報告されている。Reg の消化器癌での過剰発現は、良く知られているが、唾液腺腫瘍での報告は少ない。そこで、腺様嚢胞癌を対象として、免疫染色により発現を調べ、転移との関係を検討した。Reg は、唾液腺組織では腺房細胞に発現はなかったが、介在部ならびに線条部導管上皮と筋上皮細胞の細胞質に陽性を呈した。腺様嚢胞癌では 10%以上の腫瘍細胞が発現している症例を陽性とした。39 例中 18 例 (46.2%) が陽性であり、腺上皮細胞の細胞質が強い染色性を示したが、腫瘍性筋上皮/基底細胞様細胞にも陽性を示すものがあつた。Reg 陽性例では 10 例 (55.6%) に転移があり、一方、陰性例での転移は 5 例 (23.8%) であり、Reg の発現と転移との間に相関性がみられた。また、再発例では Reg の発現が原発と比較して亢進している傾向があつた。次に Reg と EGFR のリン酸化との関連を調べた結果、Reg 陽性例では EGFR のリン酸化も陽性である症例が多く (12/18 例 66.7%) 腺様嚢胞癌でも Reg による EGFR のリン酸化が生じている可能性が示唆された。

アポトーシスに関しては survivin 発現との関連を調べたが、Reg 陽性例、陰性例で差はなかった。

2) MMP-7 (マトリアライシン)

MMP-7 は、細胞外基質分解酵素のひとつで、消化器癌での過剰発現と浸潤、転移や予後との関係が報告されている。唾液腺腫瘍においても少数の報告例があるが、予後推測因子としての有用性は明らかではない。そこで、腺様嚢胞癌での発現と転移との関連を検討した。正常唾液腺では主に導管上皮の細胞質が陽性となった。腺様嚢胞癌では、すべての症例で、細胞質に強い染色がみられ、浸潤性格に関わっている可能性はあるが、転移との関連はみられなかった。なお、粘表皮癌では全体に染色性が弱く、悪性度との関連は明らかではなかった。

3) Runx3 (Runt related transcription factor 3)

Runx3 は、がん抑制に関わることが知られている TGF- $\beta$  シグナル伝達系の構成因子の一つである。その欠失やプロモーター領域のメチル化によるタンパクの消失・減少、また、タンパクの細胞質への移動によって、機能が不活性することが胃癌などの様々な悪性腫瘍で報告され、癌抑制遺伝子としての働きを有することが明らかにされている。そこで、腺様嚢胞癌での発現と局在について検討した。その結果、正常唾液腺では核内に陽性反応がみられるのに対して、腺様嚢胞癌では核内での発現低下が 20 例 (51.3%) に認められ、一方で、細胞質内での発現が強くなっており、核内局在による癌抑制遺伝子としての役割が変化している可能性が示唆された。

(3) 増殖活性について

腫瘍の増殖活性の評価には Ki-67 が汎用されているが、Ki-67 は、細胞周期の G0 以外のすべての段階の細胞が陽性となる。それに対して、DNA 再複製阻害因子である geminin は、S, G2, M 期に発現されており、増殖との関連性がより強く、増殖活性の評価には Ki-67 よりも適することが報告されている。そこで、腺様嚢胞癌、粘表皮癌、腺房細胞癌での陽性細胞率を Ki-67 と比較し、検討した。その結果、低悪性粘表皮癌 15 例と腺房細胞癌 3 例では geminin 陽性細胞率は Ki-67 陽性細胞率よりも低かった (粘表皮癌 geminin 陽性細胞率 3.4%, Ki-67 陽性細胞率 6.3%、腺房細胞癌 geminin 陽性細胞率 1.3%, Ki-67 陽性細胞率 2.3%)。高悪性型の粘表皮癌 2 例でも、Ki-67 よりも陽性細胞率が低かったが、その差は少なかった (geminin 陽性細胞率 12.5%, Ki-67 陽性細胞率 15.3%)。腺様嚢胞癌 27 例では、geminin 陽性細胞率 6.5%、Ki-67 陽性細胞率 13.5% で、充実性胞巣の割合が多い症例は、geminin と Ki-67 陽性細胞率との差が少ない傾向にあつた。

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 2 件)

1. 大林真理子, 長崎敦洋, 水田邦子, 小川郁

子, 高田 隆, *CRTC1-MAML2* 融合遺伝子を検出した嚢胞状粘表皮癌の1例, 診断病理, 32巻, 査読有, 2015, pp8-12

2. Sentani Kazuhiro, Ogawa Ikuko, Uraoka Naohiro, Ikeda Masayuki, Hayashi Naoki, Hattori Takuya, Hattori Yui, Oue Naohide, Takata Takashi, Yasui Wataru, High-grade epithelial-myoepithelial carcinoma of the parotid gland with mucous cell differentiation, Pathology International, 65, 査読有, 2015, pp490-494

〔学会発表〕(計8件)

1. 小川郁子, 安藤俊範, 長崎敦洋, 岡本康正, 谷 亮治, 小西 勝, 高田 隆, 口蓋腫瘍(粘表皮癌, 明細胞型), 第119回日本病理学会中国四国支部学術集会スライドカンファレンス, 2016年2月6日, 宇部市

2. 長崎敦洋, 小川郁子, 大内知之, 長尾俊孝, 高田 隆, 粘表皮癌の確定診断における融合遺伝子検索の有用性, 第60回日本唾液腺学会, 2015年12月5日, 東京

3. Ogawa Ikuko, New entities of salivary gland neoplasm, Update Meeting 2015, 1-2 Aug 2015, Kuala Lumpur, Malaysia

4. Ogawa Ikuko, Sclerosing polycystic adenosis and ectomesenchymal chondromyxoid tumor, Oro-Maxillofacial Pathology Seminar 2015, 3 August 2015, Kuala Lumpur, Malaysia

5. Nagasaki Atsuhiro, Ando Toshinori, Obayashi Mariko, Ogawa Ikuko, Takata Takashi, Significance of fusion gene analysis for differential diagnosis of mucoepidermoid carcinoma, 17<sup>th</sup> International Congress on Oral Pathology and Medicine, 25-30 May 2014, Istanbul, Turkey

6. 小川郁子, 悪性唾液腺腫瘍の病理学的診断, 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2014年10月18-19日, 千葉

7. 小川郁子, 榎谷 桂, 阪本哲彦, 高田 隆, 口蓋に発生した signet-ring cell adenocarcinoma の一例, 第59回日本唾液腺学会, 2014年12月6日, 東京

8. 小川郁子, 鈴木理樹, 柳沢俊良, 長崎敦洋, 大久保康彦, 阪本洋右, 太田 聡, 中谷行雄, 長尾俊孝, 高田 隆, *CRTC1-MAML2* 融合遺伝子の同定により診断を確定した顎骨中心性粘表皮癌の1例, 第103回日本病理学会総会, 2014年4月24-26日, 広島

〔図書〕(計2件)

1. 小川郁子, 腫瘍病理鑑別診断アトラス 頭頸部腫瘍 唾液腺腫瘍, 明細胞癌, NOS, pp50-53, 文光堂, 2015

2. 小川郁子, 腫瘍病理鑑別診断アトラス 頭頸部腫瘍 唾液腺腫瘍, 明細胞からなる唾液腺腫瘍の鑑別診断, pp180-186, 文光堂, 2015

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 郁子 (IKUKO OGAWA)

広島大学・病院・講師

研究者番号: 70136092

### (2) 研究分担者

高田 隆 (TAKASHI TAKATA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 10154783

### (3) 研究分担者

北川 雅恵 (MASAE KITAGAWA)

広島大学・病院・助教

研究者番号: 10403627

### (4) 研究分担者

宮内 睦美 (MUTSUMI MIYAUCHI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号: 50169265