

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462605

研究課題名(和文) 唾液腺がんの免疫組織学的特徴及び特異的遺伝子変化の探索

研究課題名(英文) Exploratory analyses of immunohistochemistry pattern and genetic alterations for salivary gland cancer

研究代表者

清田 尚臣 (Kiyota, Naomi)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40515037

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)：唾液腺腺癌の中には唾液腺導管癌と免疫組織学的に類似したアンドロゲン陽性唾液腺腺癌が存在し予後不良であった。また、AR陰性唾液腺腺癌はAR陽性唾液腺腺癌及び唾液腺導管癌とは全く異なる免疫組織学的特徴を有し、遺伝子学的特徴も全く異なる疾患であることが見いだされた。また、アンドロゲン陽性唾液腺腺癌はHER2陽性例が多く、唾液腺導管癌と共に今後はこうアンドロゲン療法や抗HER2療法の対象として治療開発を行えることが見いだされた。さらには、唾液腺腺癌の中にはflt3やRETのような既存の分子標的薬で治療可能な遺伝子変異が存在することも判明し今後症例数を増やして検討を進める。

研究成果の概要(英文)：Salivary adenocarcinoma was divided into two categories. One is androgen receptor positive adenocarcinoma (APA) and the other is androgen receptor negative adenocarcinoma (ANA). Immunohistochemistry and genetic analysis revealed that APA was almost similar to salivary duct carcinoma (SDC) and ANA was quite different from both of ANA and SDC. Moreover, APA often harbored HER2 amplification similar to SDC. Thus, the development of therapeutic drugs for APA and SDC should be done simultaneously. And we found flt-3 mutation and RET mutation in salivary gland cancer. We already have targeting agents correspond to these mutations. So we will confirm this result in a larger cohort and investigate the clinical applicability of these novel mutation in salivary gland cancer.

研究分野：頭頸部がん

キーワード：唾液腺がん 遺伝子変異 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

(1)我が国における頭頸部がんの罹患数は年間約2万人であるが、唾液腺がんはその3-6%に過ぎない(600-1200人/年)。また、唾液腺がんは30種類以上の組織型が存在し、形態学的診断が非常に困難であることでも知られている。さらに、疾患特異的な遺伝子異常に関する確定的な知見が存在しない。以上のような理由から、唾液腺がんは診断法も治療法も確立されていない。それは同時に、研究者主導で新たな診断法と治療標的の開発を行うべき領域であることを意味している。

(2)唾液腺がんの中でも予後不良な組織型である唾液腺導管癌は、免疫組織化学染色(IHC)による検討が進んでおり、AR(androgen receptor)やHER2(human epidermal growth factor receptor type2)の陽性例が比較的高率に存在することが知られている。それぞれ抗アンドロゲン療法や抗HER2療法が有効であることも報告されている。唾液腺腺癌(NOS)においても、AR陽性で唾液腺導管癌と同様の臨床的特徴(予後不良)を有することが報告されている。

2. 研究の目的

唾液腺導管癌および唾液腺腺癌において免疫組織学的な類似性の有無を確認し、腫瘍特異的な遺伝子変化についても類似性の有無を確認する。これらの検討から新たな診断法の確立と新たな治療標的候補の抽出を目指す。

3. 研究の方法

(1)当科所有の唾液腺がんデータベース(連結可能匿名化、臨床情報登録済)より、病理学的再検討な唾液腺導管癌(15例)と唾液腺腺癌(15例)を用いた。

(2)保存されている病理組織標本を用いて、EGFR(epidermal growth factor receptor), HER2, ER(estrogen receptor), PgR(progesterone receptor), AR, PSA(prostate specific antigen), PRL(prolactin), GCDFP-15(gross cystic disease fluid protein 15), p53の免疫組織学的検討を神戸大学医学部附属病院病理部先端組織染色センターに依頼して行った。

(3)保存されている病理組織標本を用いて、次世代シーケンサーによる既知のがん関連遺伝子型およびコピー数の検索を近畿大学医学部・ゲノム生物学教室に依頼して行った。

(4)免疫組織学的検討結果および腫瘍特異的な遺伝子変化と、すでに作成されている臨床情報を含むデータベースとを合わせて解析し、新たな治療標的候補を検討した。

4. 研究成果

(1)免疫組織学的検討

唾液腺導管癌(15例)と唾液腺腺癌(15例)の病理組織標本を用いて、IHCによる検

討を行った。表1に示すように、唾液腺導管癌では既報と同様にARやGCDFP-15の陽性率が高く、ERやPgR、PSAの陽性率は低かった。PRLは全例陰性であった。また、唾液腺腺癌のうち、AR陽性9例のIHCパターンは唾液腺導管癌と類似していたが、AR陰性のIHCパターンはEGFRを除いて完全に異なっていた。

HER2-FISHが測定可能であった26例を用いて、HER2-IHCとの一致率を両組織型で検討した。表2に示すように、FISH陽性適中率はIHC 3+:100%(8/8)、IHC 2+:17%(1/6)、IHC 1+/0:0%(0/12)であり、乳癌や胃癌の既報と同程度であった。

根治手術が施行されたpStage / の25例について予後解析を追加した。図1,2に示す通り、全生存期間はAR陽性唾液腺腺癌では唾液腺導管癌(全例AR陽性)やAR陰性唾液腺腺癌と比べて、またHER2陽性例はHER2陰性例と比べて、それぞれ予後不良であった。

上記1-3の結果より、AR陽性唾液腺腺癌はIHCパターンや予後が唾液腺導管癌に類似しており、AR陰性唾液腺腺癌と臨床的上区別することが重要であることが判明した。これは、本研究の新規性の一つである。

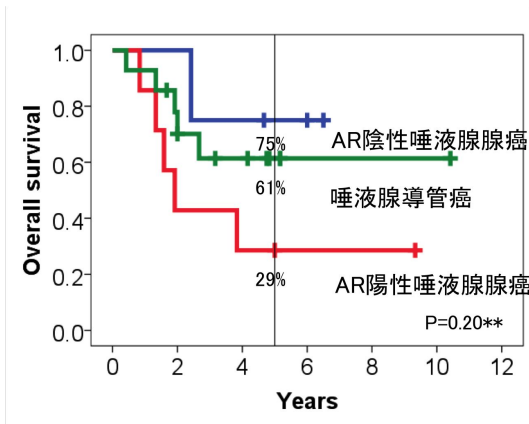
また、AR陽性唾液腺腺癌において、唾液腺導管癌のように抗アンドロゲン療法や抗HER2療法が新たな治療選択肢となる可能性があり、これも今後の治療開発に影響を与える知見である。

	唾液腺導管癌 (N=15)	AR陽性唾液腺腺癌 (N=9)	AR陰性唾液腺腺癌 (N=6)
ER > 2	14%	11%	0%
PgR > 2	21%	33%	0%
AR > 2	100%	100%	0%
GCDFP-15 +	93%	88%	0%
PSA +	0%	0%	0%
PRL +	0%	0%	0%
HER2-IHC ≥ 2+	53%	88%	0%
HER2-FISH ≥ 2.0	33%	44%	0%
EGFR ≥ 2+	60%	100%	83%

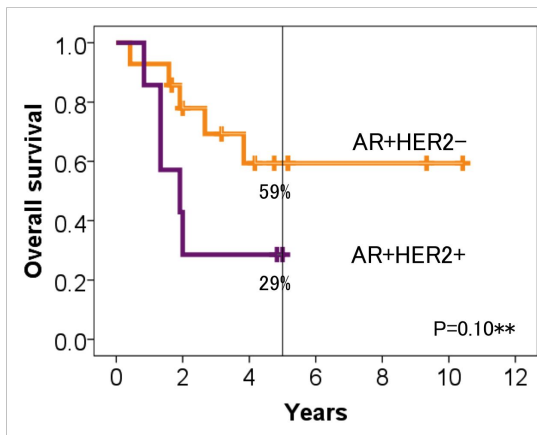
<表1: IHC陽性率の比較>

	IHC 3+	IHC 2+	IHC 1+	IHC 0
FISH ≥ 2.0	8(5+3)	1(0+1)	0	0
FISH < 2.0	0	5(3+2)	3(2+1)	9(4+5)

<表2: 唾液腺導管癌および唾液腺腺癌におけるHER2-IHCとHER2-FISHの一致率>



< 図 1 : Kaplan-Meier 曲線 1 >



< 図 2 : Kaplan-Meier 曲線 2 >

(2)次世代シーケンサーによる遺伝子解析
唾液腺導管癌（10例）と唾液腺腺癌（10例）の病理組織標本より、DNAを抽出し、次世代シーケンサーによる既知のがん関連遺伝子型およびコピー数の検索を行った。対象は表3に示すcancer hotspot panel（50遺伝子）と、本研究用にデザインしたfocused panel（ESR1, ESR2, AR, PGR, EGFR, ERBB2, KIT）の計57遺伝子である。

表4に示すように、TP53、ERBB2(=HER2)、PI3K/AKT/mTOR passway(=PIK3CA/AKT1/PTEN)、Ras-Raf-MEK passway(=BRAF/HRAS/NRAS)が比較的高頻度に検出された。FLT3やRETのように、対応する分子標的薬の存在する遺伝子変異が検出される例も少数ながら存在した。特に唾液腺がんにおけるFLT3の遺伝子変異の報告は本研究が初である。また、AR陰性唾液腺腺癌の遺伝子解析結果のパターンはAR陰陽性唾液腺腺癌及び唾液腺導管癌のそれとは異なっていた。

唾液腺導管癌とAR陽性唾液腺腺癌でHER2の遺伝子増幅が確認されたことは、前述の免疫組織学的検討の結果と一致していた。なお、前述の免疫組織学的検討で陽性率が高かったARであるが、本検討では一例も確認されず、ARは蛋白発現レベルでの変動であると考えられた。

上記2-3より、次世代シーケンサーによって新たな治療選択肢を提案できる可能性

が広がったといえる。再発転移唾液腺がんを対象としたSorafenibやSunitinibの第Ⅲ相試験も存在するが、RETあるいはFLT3への阻害作用を期待した試験ではなく、適切な対象の絞り込みにより治療成績が改善する可能性がある。

ABL1	EGFR	GNAS	KRAS	PTPN11
AKT1	ERBB2	GNAQ	MET	RB1
ALK	ERBB4	HNF1A	MLH1	RET
APC	EZH2	HRAS	MPL	SMAD4
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1	SMARCB1
BRAF	FGFR1	JAK2	NPM1	SMO
CDH1	FGFR2	JAK3	NRAS	SRC
CDKN2A	FGFR3	IDH2	PDGFRA	STK11
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA	TP53
CTNNB1	GNA11	KIT	PTEN	VHL

< 表 3 : Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 におけるターゲット遺伝子 >

	唾液腺導管癌 (N=10)	AR陽性唾液腺腺癌 (N=7)	AR陰性唾液腺腺癌 (N=3)
TP53	30%	29%	67%
ERBB2	30%	14%	0%
PI3K-AKT-mTOR passway	30%	29%	0%
Ras-Raf-MEK passway	30%	0%	0%
APC	10%	14%	0%
HNF1A	10%	14%	0%
CDKN2A	10%	0%	0%
KDR	10%	0%	0%
MLH1	10%	0%	0%
ESR2	0%	14%	0%
FLT3	0%	14%	0%
RET	0%	0%	33%

< 表 4 : 次世代シーケンサーによる遺伝子解析結果 >

(3)得られた成果の位置づけ・インパクト

免疫組織学的検討（特にARやGCDPF-15）は日本人の唾液腺導管癌の診断にも有益であることが確認された。

唾液腺腺癌のうち、AR陽性例は唾液腺導管癌に類似のIHCパターンならびに遺伝子変異パターンを示し予後不良であった。また、AR陽性例にHER2陽性例が集中していた。これらは予後予測因子である可能性が本研究で示されており、臨床上有意と考える。

AR陰性唾液腺腺癌は、AR陽性唾液腺腺癌や唾液腺導管癌とは全く異なる臨床病理遺

伝子学的特徴を有する疾患であることを見出した。

免疫組織学的検討ならびに遺伝子解析により、形態学的組織診断に拘らず新たな治療選択肢を提案できる可能性が広がった。

唾液腺がんにおける FLT3 遺伝子変異の存在を明らかにした。本成果は新規臨床試験を組むための理論的根拠となる。

(4)今後の展望

次世代シーケンサーによる遺伝子解析の症例数を増やし、予後解析を追加した上で最終的な研究結果をまとめる。本研究成果は国際学会ならびに論文投稿、ホームページを通じて社会・国民に広く公表する(直近1年以内に実施する)。

研究成果をもとに臨床試験を計画・実施できるか、院内ならびに研究代表者がグループ事務局である JCOG 頭頸部がんグループで検討する。

一方で唾液腺がんにおける疾患特異的遺伝子変化の頻度は低く、その恩恵をうける患者は少ない。一方で近年注目を集めている免疫チェックポイント阻害薬はむしろ driver gene が無い腫瘍に効果を発揮することが多く、引き続き唾液腺がん免疫チェックポイント阻害薬をテーマにトランスレーショナル・リサーチを継続する。

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0件)

[学会発表](計1件)

今村 善宣、清田 尚臣、他、Comparative analysis of the clinicopathological features of salivary duct carcinoma and salivary gland adenocarcinoma, not otherwise specified. 第12回日本臨床腫瘍学会、福岡国際センター(福岡県), 2014.7.18.

[図書](計1件)

清田 尚臣、他 頭頸部がん薬物療法ガイドランス page 1-78、公益社団法人日本臨床腫瘍学会編、2015年、金原出版株式会社
清田 尚臣、今村 善宣 他、頭頸部癌診療ガイドライン 2017年度版、金原出版株式会社、in press

[産業財産権] 該当なし。

[その他] 該当なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

清田 尚臣 (KIYOTA, Naomi)
神戸大学医学部附属病院・腫瘍・血液内

科・助教

研究者番号：40515037

(2)研究分担者

今村 善宣 (IMAMURA, Yoshinori)
神戸大学医学部附属病院・腫瘍・血液内科・医員
研究者番号：80796160

(3)連携研究者

(4)研究協力者

大月直樹 (Naoki, Otsuki)
神戸大学大学院医学研究科外科系講座耳鼻咽喉科頭頸部外科学分野・准教授
研究者番号：40343264

伊藤智雄 (ITO, Tomoo)
神戸大学医学部附属病院病理部・教授
研究者番号：20301880

平井千浦子 (Chihoko, Hirai)
神戸大学大学院
大学院生

西尾 和人 (NISHIO, Kazuto)
近畿大学医学部・ゲノム生物学教室・教授
研究者番号：10208134

坂井 和子 (SAKAI, Kazuko)
近畿大学医学部・ゲノム生物学教室・助教
研究者番号：20580559