

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

齋田 昂佑

論文題目

唾液腺悪性腫瘍における遺伝子・免疫組織学的解析と  
その臨床病理学的意義

## I. 緒言

唾液腺悪性腫瘍の中で腺様嚢胞癌 (AdCC) と粘液表皮癌 (MEC) はその発生頻度の大部分を占める。近年、AdCC に特徴的な遺伝子異常である *MYB-NFIB*、*MYBL1-NFIB* 融合遺伝子は腫瘍発生に、MEC における *CRTC1/MAML2* 融合遺伝子は腫瘍発生や良好な患者予後に関わっていると考えられている。

これまで様々な腫瘍において上皮成長因子受容体 (EGFR) 経路における遺伝子異常が発癌や腫瘍の進行、薬剤への抵抗性などに関与していると報告されているが、AdCC における EGFR 経路の遺伝子異常やそれらの遺伝子異常の持つ臨床病理学的な意義は未だ不明である。

*Podoplanin* は I 型膜貫通型糖蛋白で、リンパ管内皮細胞を高感度で識別するマーカーとして広く使用されているが、近年、多種の悪性腫瘍において免疫組織化学染色で評価された *Podoplanin* 発現の程度が予後や浸潤性と一定の相関を示すことが報告されている。AdCC における *Podoplanin* の高発現が不良な予後と相関した報告はされているが、MEC における *Podoplanin* 発現の持つ臨床病理学的意義は未だ明らかにされていない。

本研究では唾液腺原発腺様嚢胞癌 (SAdCC) における *MYB*、*MYBL1*、*NFIB* 遺伝子異常の有無と EGFR 経路に変異ホットスポットを有する遺伝子 (*EGFR*、*RAS* ファミリー、*PIK3CA*、*BRAF*、および *AKT1*) の突然変異の有無を検索し、臨床病理学的因子及び患者予後と相関させることを目的とした。MEC においては *MAML2* 遺伝子異常の有無を Fluorescence in situ hybridization

(FISH) 法で、Podoplanin の発現性を免疫組織化学的に解析し、その臨床病理学的意義を明らかにすることを目的とした。

## II. 対象および方法

70 例の唾液腺原発腺様嚢胞癌 (SAdCC) と 30 例の MEC を研究対象とし、これらの症例のホルマリン固定・パラフィン包埋切片標本を用いた。FISH 法で SAdCC における *MYB*、*MYBL1*、*NFIB* 遺伝子異常と MEC における *MAML2* 遺伝子異常の検索を行った。SAdCC における EGFR 経路の遺伝子異常 [*EGFR*、*RAS* (*KRAS*、*HRAS*、*NRAS*)、*PIK3CA*、*BRAF*、*AKT1*] を検出するために、一塩基伸長法の一つである SNaPshot 法を用いて各々の遺伝子のホットスポットにおける点突然変異を検出した。*EGFR* exon 19 における欠失 (E746-A750del) の検索は PCR 法で行った。点突然変異は反対鎖から設計したプローブを用いて SNaPshot 法を行い、また、PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System) 法でも遺伝子変異を同定し、変異を確定した。

30 例の MEC に対して Podoplanin の免疫組織化学染色を行い、Etemad-Moghadam らの報告した評価方法を参考に染色性の評価を行った。

臨床病理学的因子として、年齢、性別、原発部位、腫瘍径、リンパ節転移の有無、臨床病期、組織型、神経浸潤、病理学的切除断端、術後補助療法の有無、経過観察期間、転帰の情報を収集し、これらの結果と臨床病理学的因子や患者予後との関連を統計学的に解析した。

## III. 結 果

52例の SAdCC の内 45例(86.5%)に *MYB*、*MYBL1*、*NFIB* いずれかの遺伝子分離を認めた。*MYB*、*MYBL1*、*NFIB* の遺伝子分離はそれぞれ 33、6、32例に検出された。遺伝子分離を認めた症例に対して融合相手遺伝子の確認を行い、*MYB-NFIB* 融合遺伝子、*MYBL1-NFIB* 融合遺伝子はそれぞれ 23例、4例が確認された。融合相手遺伝子が不明(-Xと定義)であった *MYB-X*、*MYBL1-X*、*NFIB-X* はそれぞれ 10例、2例、6例が確認された。残りの7例はいずれの遺伝子異常も認めなかった。

70例の SAdCC 中 13例に EGFR 経路の遺伝子変異が検出された。*EGFR* 変異は 1例(1.4%)、*RAS* 変異は 10例(14.3%) [*KRAS* 変異：6例(8.6%)、*HRAS* 変異：4例(5.7%)、*NRAS* 変異：0例]で、*PIK3CA* 変異は 5例(7.1%)に検出された。*BRAF* と *AKT1* 変異、*EGFR* の exon 19 における欠失は認めなかった。13例の EGFR 経路変異陽性症例の内 8例に判定可能な FISH シグナルが得られ、8例すべてに *MYB*、*MYBL1*、*NFIB* に関連した遺伝子異常を認めた。

30例の MEC の内、FISH 法によって *MAML2* 遺伝子の分離は 18例(60.0%)に認められた。30例の MEC に対して行った Podoplanin 免疫染色のスコア 0、1、2、3、はそれぞれ 0例(0%)、16例(53.3%)、12例(40.0%)、2例(6.7%)で Podoplanin 高発現は 14例(46.7%)であった。

EGFR 経路における遺伝子変異群と臨床病理学的因子との統計学的な関連は認めなかったが、*RAS* 変異陽性群は病理学的切除断端陽性群 ( $p=0.036$ )

と有意に相関した。*MYB/MYBL1* の遺伝子分離陽性群は、組織学的グレードⅢ群 ( $p=0.023$ )、病理学的切除断端陽性群 ( $p=0.008$ )、神経浸潤陽性群 ( $p=0.037$ ) と有意に相関した。

MEC において、Podoplanin の高発現群 ( $n=14$ ) と相関する臨床病理学的因子は認めなかったが、T 3 / 4 群と相関傾向を認めた ( $p=0.072$ )。*MAML2* キメラ遺伝子陽性群は T 1 / 2 群 ( $p=0.026$ )、リンパ節転移陰性群 ( $p=0.009$ )、臨床病期 I / II 群 ( $p=0.009$ ) と有意に相関し、組織学的低悪性度群 ( $p=0.063$ ) と相関傾向があった。

SAdCC の 5 年及び 10 年の無病生存率 (DFS) はそれぞれ 57.9%、31.4% で、全生存率 (OS) はそれぞれ 94.7%、72.7% であった。DFS において、T 3 / 4 群 ( $p=0.006$ )、臨床病期Ⅲ/Ⅵ群 ( $p=0.006$ )、組織学的グレードⅢ群 ( $p=0.009$ )、病理学的切除断端陽性群 ( $p=0.013$ )、EGFR 経路変異陽性群 ( $p=0.011$ )、*RAS* 変異陽性群 ( $p=0.01$ ) は再発までの期間が有意に短かった。

OS において、組織学的グレードⅢ群 ( $p<0.0001$ )、病理学的切除断端陽性群 ( $p=0.023$ )、EGFR 経路変異陽性群 ( $p=0.049$ )、*RAS* 遺伝子変異陽性群 ( $p=0.024$ ) は有意に生存期間が短かった。*MYB-NFIB* 陽性群、*MYB* 遺伝子分離陽性群、*MYB/MYBL1* 遺伝子分離陽性群は無病生存、全生存ともに予後との関連は認めなかった。

MEC における 5 年無病生存率は 70.5% であった。DFS において、T 3 / 4 群 ( $p=0.024$ )、リンパ節転移陽性群 ( $p=0.044$ )、臨床病期Ⅲ/Ⅵ群 ( $p=0.015$ )、

Podoplanin 高発現群 ( $p=0.031$ ) は再発までの期間が有意に短かった。また、*MAML2* 遺伝子異常群と患者予後との関連は認めなかった。MEC に関しては死亡例数が少なかったため OS の解析は行わなかった。

### Ⅲ. 考 察

本研究における重要な知見は SAdCC 症例における *RAS* 変異が 14.3% と比較的高値を示したことである。セツキシマブやパニツムマブなどの抗 EGFR 抗体薬は頭頸部癌の分子標的治療薬として臨床応用されている。*RAS* 変異を有する大腸腺癌は抗 EGFR 抗体薬に対し治療抵抗性を示すことが知られている。今後、*RAS* 変異を有する SAdCC に対する抗 EGFR 抗体薬が治療効果を有するかどうかを検討する必要がある。

本研究におけるもう一つの重要な知見は、SAdCC における EGFR 経路の変異群および *RAS* 変異群は有意に DFS と OS が不良であったことである。本研究で SAdCC の約 90% に検出された *MYB*、*MYBL1*、*NF1B* を含む遺伝子異常は腺様嚢胞癌の発がんに関与していると考えられており、*RAS* 変異は腫瘍の進展に関与している可能性が示唆された。

本研究において、粘表皮癌における Podoplanin 高発現群は有意 DFS が不良であった。この Podoplanin の高発現は腫瘍の進行や再発・転移に関与する可能性がある。近年、癌細胞に特異的に反応するヒトポドプラニンモノクローナル抗体 (chLpMab-7) が開発され、神経膠芽腫や肺癌、悪性中皮腫、卵巣腫瘍などのヒトポドプラニン発現腫瘍の細胞株を用いた *in vivo*

の研究において、腫瘍の増殖と遠隔転移を抑制したと報告されている。今後、粘表皮癌における Podoplanin の発現性の持つ意義を明らかにするための大規模症例解析が望まれる。Podoplanin を高発現させた粘表皮癌の細胞株が実際に強い浸潤能や転移能を有するかどうか、さらにはこれらの細胞株に対する Podoplanin モノクローナル抗体の腫瘍抑制効果などを検証することが、将来的な anti-Podoplanin 抗体の臨床応用に向けて重要であると考えている。

#### IV. 結 論

70 例の SAdCC の EGFR 経路における変異は 18.6%の患者に検出され、その中で RAS 変異が多く (14.3%) これらの変異群はともに不良な無病生存と全生存に関連していた。これらの知見はこの難治性腫瘍に対する新規治療の発展において有用である可能性が見出された。

30 例の粘表皮癌の 46.7%に podoplanin の高発現を認めた。Podoplanin 高発現群は DFS が不良であり、MEC の予後不良を推定するマーカーの一つとなる可能性が見出された。