



Expression of amphiregulin in mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: a molecular and clinicopathological study

Shinomiya, Hitomi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6783号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006783>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Expression of amphiregulin in mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: a molecular and clinicopathological study

大唾液腺粘表皮癌におけるアンフィレグリンの発現について
分子学的、臨床病理学的検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
耳鼻咽喉科頭頸部外科学
(指導教員：丹生 健一教授)

四 宮 瞳

目的

CRTC1-MAML2 キメラ遺伝子は粘表皮癌に特異的に発現し、予後良好な指標として近年知られている。EGFR のリガンドの1つであるアンフィレグリン(AREG)は、粘表皮癌細胞において *CRTC1-MAML2* の下流標的因子であり EGFR に結合し以下の経路が活性化されることで腫瘍生成・腫瘍生存をきたすと提唱されている。我々は、大唾液腺粘表皮癌における AREG と EGFR の発現の傾向について *CRTC1-MAML2* 陽性、陰性例での比較を行った。

材料・方法

対象は、耳下腺・顎下腺腫瘍で初回手術を行い病理組織学的検査で粘表皮癌であった 33 症例とした。RT-PCR 法による *CRTC1-MAML2*、*CRTC3-MAML2* の同定、免疫染色による AREG・EGFR 発現の評価を行った。免疫染色で AREG 高発現であった 3 例、低発現であった 3 例において AREG の定量 RT-PCR を行った。また、唾液腺癌で粘表皮癌以外の組織型について AREG 発現評価を行った。

結果・考察

対象症例は、平均年齢 55.2 歳、男性 12 例、女性 21 例であった。耳下腺原発が 26 例、顎下腺原発が 7 例であった。T 分類別では T1 10 例、T2 10 例、T3 8 例、T4a 5 例であった。N 分類では N0 30 例、N2b 3 例であった。Stage 別では StageI 10 例、StageII 10 例、StageIII 7 例、StageIV 6 例であった。AFIP 分類では低悪性 15 例、中悪性 9 例、高悪性 9 例であった。Brandwein 分類では低悪性 3 例、中悪性 10 例、高悪性 20 例であった。*CRTC1-MAML2* 陽性は 23 例、陰性は 10 例であった。*CRTC3-MAML2* は全症例で陰性であった。

免疫染色による AREG 発現は、染色の濃さ(Score0-3)×染色陽性細胞の割合(%)の合算とした。合計スコアが *CRTC1-MAML2* 陽性群で平均 234.13、*CRTC1-MAML2* 陰性群で平均 131 であった。Fisher 検定を用いて *CRTC1-MAML2* 陽性陰性両群間の AREG スコアを最も有意に分けるカットオフ値を求めたところ 200 であった。スコア 0~199 を AREG 低発現、200~300 を AREG 高発現とした。

免疫染色による EGFR 発現は、ASCO/CAP の乳癌のガイドラインに沿っておこない、Score0、1 を EGFR 低発現、Score2、3 を EGFR 高発現とした。

23 例の *CRTC1-MAML2* 陽性例のうち、AREG 高発現が 17 例(73.9%)、EGFR 高発現が 14 例(60.9%)であった。10 例の *CRTC1-MAML2* 陰性例のうち、AREG 高発現が 1 例(10%)、EGFR 高発現が 3 例(30%)であった。*CRTC1-MAML2* と AREG 高発現には統計学的に有意な相関があり($P<0.01$)、*CRTC1-MAML2* と EGFR 高発現には有意な相関はなかった。また、AREG 高発現例は低発現例より無病生存期間が有意に長かった($P=0.042$)。

AREG の定量 RT-PCR を免疫染色 AREG 高発現 3 例、低発現 3 例それぞれにおいて行った結果、2- $\Delta\Delta Ct$ スコアは 146、110、52 と 4.86、1.95、1 であった。免疫染色による AREG 発現と定量 RT-PCR の結果は相関していた。

粘表皮癌以外の組織型での AREG 高発現は、腺様嚢胞癌 2 例(15 例中)、唾液腺導管癌 7 例

(9 例中)、多形腺腫由来癌 2 例(12 例中)、腺癌 NOS 0 例(4 例中)、腺房細胞癌 6 例(9 例中)であった。組織型ごとに高発現の率は異なるため、各組織型における AREG の重要性は異なるものと考えた。

結論

CRTC1-MAML2 は *CRTC1* の CREB-binding domain と *MAML2* の transcriptional activation domain 部で結合して構成されている。この融合遺伝子により CREB 経路が持続的に活性化されている。*AREG* は CREB 標的遺伝子の 1 つであり、EGFR 経路を活性化して粘表皮癌細胞の生成、生存に関与すると in vitro と in vivo の実験で報告されている。

AREG 蛋白はまず pro-AREG という膜貫通前駆タンパク質として生成される。pro-AREG はその細胞外ドメインで切断されて soluble AREG となり、この soluble AREG が EGFR に結合して EGFR シグナルが活性化される。最近の論文で pro-AREG の細胞内ドメインが細胞分裂の G2 期から M 期の移行を促進しているとの報告がある。

今回の研究で、AREG 高発現例は *CRTC1-MAML2* キメラ遺伝子陽性例で有意に多くみられたため、AREG は *CRTC1-MAML2* キメラ遺伝子の代替マーカーになりうると考えられた。また、*CRTC1-MAML2* 陽性例は従来 of 報告どおり予後良好例が多かった。

また、AREG 高発現、低発現群における無病生存期間に有意差がでたため、粘表皮癌において AREG 高発現は予後良好の指標になる可能性が示唆された。

CRTC1-MAML2 と AREG には有意な相関を認めたが、*CRTC1-MAML2* と EGFR には相関関係がなかった。諸家の報告で粘表皮癌において EGFR タンパク発現率(58~79%)と EGFR コピー数増加(12.9~18.6%)の不一致は指摘されており原因不明であるが、高悪性粘表皮癌のほうがより EGFR シグナルは活性化されているといわれている。

CRTC1-MAML2 と EGFR に相関関係を認めなかった理由として 3 点考えた。1: EGFR 以下のシグナルが *CRTC1-MAML2* 陽性群ではあまり活性化されていない、2: EGFR を介さない AREG による腫瘍生成経路がある、3: *CRTC1-MAML2* 陰性群では複数の遺伝子異常により多彩なシグナル経路があり EGFR 経路がより活性化されている。

他癌において AREG 高発現例への EGFR を標的とした分子標的薬治療の効果は有効~効果不良と様々である。*CRTC1-MAML2* 陽性の粘表皮癌では EGFR を介さない経路での腫瘍生成の可能性があるため、今後 AREG を直接標的とした治療法が選択肢になりうるかもしれない。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2644 号	氏 名	四宮 瞳
論文題目 Title of Dissertation	Expression of amphiregulin in mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands : a molecular and clinicopathological study 大唾液腺粘表皮癌におけるアンフィレグリンの発現について 分子学的、臨床病理学的検討		
審査委員 Examiner	主 査 市 森 孝 英 Chief Examiner 副 査 榎 崎 亮 Vice-examiner 副 査 寺 崎 浩 人 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

研究目的

CRTC1-MAML2 キメラ遺伝子は粘表皮癌に特異的に発現し、予後良好な指標として近年知られている。EGFR のリガンドの1つであるアンフィレグリン(AREG)は、粘表皮癌細胞において CRTC1-MAML2 の下流標的因子であり EGFR に結合し以下の経路が活性化されることで腫瘍生成・腫瘍生存をきたすとされている。申請者らは、大唾液腺粘表皮癌における AREG と EGFR の発現の傾向について CRTC1-MAML2 陽性、陰性例での比較を行った。

対象および方法

対象は、耳下腺・顎下腺腫瘍で初回手術を行い病理組織学的検査で粘表皮癌であった33症例とした。RT-PCR 法による CRTC1-MAML2、CRTC3-MAML2 の同定、免疫染色による AREG・EGFR 発現の評価を行った。免疫染色で AREG 高発現であった3例、低発現であった3例において AREG の定量 RT-PCR を行った。また、唾液腺癌で粘表皮癌以外の組織型について AREG 発現評価を行った。

結果および考察

対象症例は、平均年齢 55.2 歳、男性 12 例、女性 21 例であった。耳下腺原発が 26 例、顎下腺原発が 7 例であった。T 分類別では T1 10 例、T2 10 例、T3 8 例、T4a 5 例であった。N 分類では N0 30 例、N2b 3 例であった。Stage 別では StageI 10 例、StageII 10 例、StageIII 7 例、StageIV 6 例であった。AFIP 分類では低悪性 15 例、中悪性 9 例、高悪性 9 例であった。Brandwein 分類では低悪性 3 例、中悪性 10 例、高悪性 20 例であった。CRTC1-MAML2 陽性は 23 例、陰性は 10 例であった。CRTC3-MAML2 は全症例で陰性であった。

免疫染色による AREG 発現は、染色の濃さ(Score0-3)×染色陽性細胞の割合(%)の合算とした。合計スコアが CRTC1-MAML2 陽性群で平均 234.13、CRTC1-MAML2 陰性群で平均 131 であった。Fisher 検定を用いて CRTC1-MAML2 陽性陰性両群間の AREG スコアを最も有意に分けるカットオフ値を求めたところ 200 であった。スコア 0～199 を AREG 低発現、200～300 を AREG 高発現とした。

免疫染色による EGFR 発現は、ASCO/CAP の乳癌のガイドラインに沿っておこない、Score0、1 を EGFR 低発現、Score2、3 を EGFR 高発現とした。

23 例の CRTC1-MAML2 陽性例のうち、AREG 高発現が 17 例(73.9%)、EGFR 高発現が 14 例(60.9%)であった。10 例の CRTC1-MAML2 陰性例のうち、AREG 高発現が 1 例(10%)、EGFR 高発現が 3 例(30%)であった。CRTC1-MAML2 と AREG 高発現には統計学的に有意な相関があり(P<0.01)、CRTC1-MAML2 と EGFR 高発現には有意な相関はなかった。また、AREG 高発現例は低発現例より無病生存期間が有意に長かった(P=0.042)。

AREG の定量 RT-PCR を免疫染色 AREG 高発現 3 例、低発現 3 例それぞれにおいて行った結果、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ スコアは 146、110、52 と 4.86、1.95、1 であった。免疫染色による AREG 発現と定量 RT-PCR の結果は相関していた。

粘表皮癌以外の組織型での AREG 高発現は、腺様嚢胞癌 2 例(15 例中)、唾液腺導管癌 7 例(9 例中)、多形腺腫由来癌 2 例(12 例中)、腺癌 NOS 0 例(4 例中)、腺房細胞癌 6 例(9 例中)であった。組織型ごとに高発現の率は異なるため、各組織型における AREG の重要性は異なるものと考えられた。

今回の研究で、AREG 高発現例は CRTC1-MAML2 キメラ遺伝子陽性例で有意に多くみられたため、AREG は CRTC1-MAML2 キメラ遺伝子の代替マーカーになりうると考えられた。また、CRTC1-MAML2 陽性例は従来の報告どおり予後良好例が多かった。

加えて、AREG 高発現、低発現群における無病生存期間に有意差がでたため、粘表皮癌において AREG 高発現は予後良好の指標になる可能性が示唆された。

CRTC1-MAML2 と AREG には有意な相関を認めたが、CRTC1-MAML2 と EGFR には相関関係がなかった。

CRTC1-MAML2 と EGFR に相関関係を認めなかった理由としては以下の 3 点を考えている。1 : EGFR 以下のシグナルが CRTC1-MAML2 陽性群ではあまり活性化されていない、2 : EGFR を介さない AREG による腫瘍生成経路がある、3 : CRTC1-MAML2 陰性群では複数の遺伝子異常により多彩なシグナル経路があり EGFR 経路がより活性化されている。

結論

本研究は、粘表皮癌におけるアンフィレグリンについて、その分子学的および臨床病理学的特徴を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったその発現の詳細と予後との関連について重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。