

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

石橋 謙一郎

論文題目

ワルチン様粘表皮癌：新しいバリエーションの提唱

ワルチン腫瘍 (Warthin tumor: WT) は、多形腺腫に次いで2番目に頻度の高い唾液腺良性腫瘍で、無症候性で発育の緩慢な腫瘍である。典型的な WT は密なリンパ様間質成分をもち、嚢胞状や乳頭状構造を呈し oncocytic な上皮を認め、核が2層性に配列している特徴がある。

一方、粘表皮癌 (Mucoepidermoid carcinoma: MEC) は、約20%を占める最も多い唾液腺悪性腫瘍で、その50%以上に *CRTC1/3-MAML2* キメラ遺伝子 (chimeric gene: CG) が発現していることが報告されている。

近年、パラフィン包埋標本からの遺伝子診断法が確立されている。遺伝子診断法には、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 分析、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) や microRNA を用いた *in situ* hybridization (ISH) があるが、従来型の遺伝子診断法は、標本内の遺伝子異常を検出できるが、細胞レベルでの解析には適していなかった。そこで、我々は組織片全体を撮影するホールスライドイメージング (Whole slide image: WSI) 技術を FISH に適応することを試みた。

WT に関する研究において、この *CRTC1-MAML2* CG が化生 WT (metaplastic Warthin tumor: mWT) に発現していると報告があるものの、いまだに解明されてはいない。本研究では、CG 陽性 (CG+) 腫瘍の組織学的特徴、特性、診断について解明したいと考えた。様々な遺伝子診断法を用いて、これらの CG+ mWT 様腫瘍における CG+細胞の正確な局在性を求めるのと同時に、CG+ mWT 様腫瘍を CG 陰性 (CG-) mWT 様腫瘍、典型的 WT および CG+MEC

の標本群から区別するための臨床病理学的特徴を評価した。

II. 対象および方法

1. 対象症例

過去 26 年間に名古屋市立大学病院で切除された 107 例の WT を対象とした。

mWT 様腫瘍の診断基準は WHO に従って下記のように行った。mWT 様腫瘍は 1) 腺や嚢胞構造、2) 乳頭状嚢胞構成、3) 「化生」と判断していい腫瘍上皮、4) 少なくとも一部に存在する 2 層性腫瘍上皮 5) 高密度のリンパ球浸潤で構成されているもの、とした。HE 染色、ISH、FISH-WSI、p63 の免疫組織化学、および RNA 抽出を行うために各ホルマリン固定パラフィン包埋標本の連続切片を作成した。

2. *CRTC1/3-MAML2* キメラ遺伝子転写物への RT-PCR 解析

脱パラフィン操作を行った後、腫瘍組織部分を削出し、プロテアーゼ Kヌクレアーゼを不活化し、Trizol LS を用いて全 RNA を抽出した。増幅された DNA 断片内の break point を確認するために、direct sequence 法で塩基配列解析を行った。*CRTC1-MAML2* CG 変異体は、*CRTC1* および *CRTC3* のすべての exon の組み合わせについて nest-PCR 法を用いて検索した。

3. Micro RNA を用いた *in situ* hybridization (ISH) 解析

脱パラフィン後に 37°C10 分間プロテアーゼ K 処理を行い、*CRTC1-MAML2* CG

転写産物に対応した 22 塩基配列の 20nM LNA (Locked Nucleic Acid) probe と共に、62°Cの孵卵器中でオーバーナイトさせた。スライドを SSC の濃度を変え、62°Cで5分間ずつ洗浄した。ブロッキング処理を行い、DIG 抗体 (マウスモノクローナル) で室温 60 分間反応し、DAB 基質溶解液に 8 分間反応させた。蒸留水で洗浄後にヘマトキシリン染色を行い、封入した。

4. FISH 解析

脱パラフィン後に前処理として 0.1%-NP40/0.01 クエン酸緩衝液に浸漬し、0.03%Pepsin/0.01NH1 で表面蛋白分解処理した。変性液 (70%ホルムアミド) により 80°Cで5分間の熱変性し、脱水乾燥した。標本上に *MAML2* break-apart probe とバッファー混合液 4 μ l を滴下したのち、カバーガラスで覆い、ホットプレート上で 84°C 5 分間プローブの熱変性を行い、42°C 60 分間のマイクロウェーブ照射をしたのち、標本を湿潤箱にいれ 37°Cの孵卵器中で保温した。ハイブリダイゼーション後に SSC で洗浄、0.3%NP-40 溶液で 73°C 3 分間洗浄し、室温で 0.1%NP-40 溶液で冷却し、脱水風乾し、DAPI とともに封入した。

5. HE 染色、p63 免疫組織化学、FISH の whole slide imaging

HE 染色および p63 免疫組織化学を行った切片を、ホールスライドスキャナを用いて、FISH 画像は、IN Cell Analyzer 2000 を用いてデジタル化した。

得られた FISH 画像タイルをワークステーションコンピュータで、画像解析ソフトでステッチングし、連続した合成画像とした。

6. 統計解析

2つのグループからのデータの統計的評価は、Fischer' s exact test および Student' s t-test で行い、両側検定し、P 値<0.05 を統計学的に有意とみなした。

III. 結果

1. 組織学および p63 免疫組織化学

検索した 107 症例の WT のうちに、mWT 様腫瘍は 15 例あった。mWT 様腫瘍では goblet 様細胞と squamoid 細胞を伴った腫瘍上皮の変性を認めた。2層性上皮は限局的で、細胞の丈は低く、oncocytic ではなかった。「化生」腫瘍上皮には常に軽度の核異型を伴っていた。「化生」上皮における p63 の発現は、多層化を示す squamoid 細胞および 2 層性腫瘍上皮において基底側細胞で陽性であった。goblet 様細胞では p63 の発現は陰性であった。

2. *CRTC1/3-MAML2* キメラ遺伝子転写物への RT-PCR 解析

RT-PCR 解析では 15 症例中の 5 症例の mWT 様腫瘍が *CRTC1-MAML2* CG 転写産物に陽性で、*CRTC3-MAML2* CG 転写産物は陰性であった。ダイレクトシーク

エンスで、挿入や欠失のような非定型的な転写産物ではないことを確認した。

3. Micro RNA を用いた *in situ* hybridization (ISH) 解析

RT-PCR 解析で *CRTC1-MAML2* CG 転写物が陽性、陰性に関わらず、15 症例の mWT 様腫瘍の腫瘍上皮、リンパ性細胞、間質組織すべてで、*CRTC1-MAML2* CG 転写物に対応した Micro RNA が陽性であった。

4. *MAML2* スプリットによる FISH 解析と whole slide imaging

15 症例の mWT 様腫瘍のうち、*MAML2* スプリットシグナル陽性症例は 5 例で、これは RT-PCR 解析の結果と一致していた。WSI 解析で、*MAML2* スプリットシグナルは CG+腫瘍症例 (n = 5) ですべての腫瘍上皮細胞に陽性であった。これら 5 症例中の 2 例は、MEC を併発し、mWT 様腫瘍としての「化生」腫瘍上皮と MEC としての癌性腫瘍細胞のいずれでも *MAML2* スプリットシグナルは陽性で、間質組織要素には陰性であった。RT-PCR 解析による *CRTC1/3-MAML2* CG 転写産物について陰性であった残りの 10 症例の腫瘍では、FISH-WSI において *MAML2* スプリットシグナルは、組織切片のすべての上皮および非上皮で陰性であった。CG+ mWT 様腫瘍は、squamoid や goblet 様の「化生」腫瘍上皮、異型を伴う 2 層性上皮を伴い、WT に典型的な 2 層性上皮は全く認めなかった。対照的に、CG- mWT 様腫瘍では、「化生」腫瘍上

皮や異型を伴う 2 層性上皮は認めるものの、WT に典型的な oncocytic な 2 層性上皮が腫瘍組織内に必ず存在していた。WT に典型的な 2 層上皮の有無が、CG の陽性と陰性 mWT 様腫瘍を識別するうえで有用な特徴であった。

5. mWT 様腫瘍症例の臨床的特徴

4 つの腫瘍群 (典型的な WT、*CRTC1-MAML2* CG+、CG- mWT 様腫瘍、CG+ MEC) の比較解析で、CG+ mWT 様腫瘍例はすべて女性で、この男女比は CG- mWT 様腫瘍 (7:3、 $P=0.025$) と典型的 WT (79:13、 $P=0.0001$) の男女比とは有意に異なり、CG+ MEC (18:22) とは近似していた。CG+ mWT 様腫瘍症例の平均年齢 (39 歳) は、CG- mWT 様腫瘍症例 (62 歳、 $P=0.0038$)、典型的 WT 症例の平均年齢 (62 歳、 $P<0.0001$) よりも有意に低かったが、CG+ MEC 症例の平均年齢 (53 歳) とは近似していた。CG+ WT 様腫瘍での併発 MEC の発生率 (2/5 症例、40%) が、CG- mWT 様腫瘍の場合 (0/10 症例、0%) よりも高い傾向にあり ($P=0.095$)、と典型的 WT と比較し有意に高かった ($P=0.0021$)。

IV. 考察

CRTC1-MAML2 CG が、mWT 様腫瘍の組織標本でどのように発現しているかを明らかにするため、組織標本内の CG+細胞の局在を腫瘍上皮、リンパ性細胞、間質組織で、細胞レベルで解析する必要性があった。RT-PCR 解析は、

元来、CG+細胞の正確な局在を知ることはできず、Micro RNA を用いて ISH ではハイブリット化するための十分な条件を設定できなかった。また、従来型 FISH 法は細胞レベルで CG の発現の有無を確認できるが、従来型 FISH 法では狭い視野内の一部の細胞しか解析できず、細胞の局在を知るための HE 染色や免疫組織化学などと細胞レベルでの比較を広範囲に行うことはできない。そのため、FISH-WSI を開発し、*MAML2* スプリットシグナルと p63 発現を伴った細胞の比較が可能とし、「化生」腫瘍上皮や 2 層性の oncocytic な腫瘍上皮、間質やリンパ性細胞における CG の発現を明らかにできるようにした。

CRTC1-MAML2 CG+ mWT 様腫瘍の組織学的特徴は、典型的 WT と同様に反応性リンパ球の高密度浸潤を伴っているものの、腫瘍上皮は「化生」か、もしくは oncocytic ではない異型 2 層性上皮であった。CG+ mWT 様腫瘍は WT に典型的な oncocytic な 2 層性上皮を欠く点は、HE 染色のみで CG+ と CG- mWT 様腫瘍を識別するうえで有用であった。

臨床病理学的特徴としては、CG+ mWT 様腫瘍は CG+ MEC と同様に女性に多く、年齢は CG+ MEC 症例と近似し CG- mWT 様腫瘍や典型的 WT よりやや若年で罹患している傾向があった。

これらの組織学および臨床病理学的特徴から、CG+ mWT 様腫瘍が WT より CG+ MEC に類似した特徴を多く認めた。そこで、CG+ mWT 様腫瘍は MEC の同族として考えると、「化生」腫瘍上皮に代表される squamoid や goblet の

所見は、それぞれ低悪性度 MEC の中間細胞や粘液産生細胞として解釈し得る。次に、本研究での CG+ mWT 様腫瘍患者はすべて予後良好で、リンパ節転移や遠隔転移もなく、malignant potential を証明できないが、CG+ MEC が以前の報告からも予後良好であること、さらに mWT 様腫瘍の MEC 併発症例はすべて CG+ mWT 様腫瘍であることから、CG+ mWT 様腫瘍は CG+ MEC と同様の malignant potential を有すると考えられる。これらの点から、われわれは CG+ mWT 様腫瘍を MEC の新たなバリエーションで、WT 様 MEC と提唱できると考えている。mWT と MEC の病理診断は、臨床的に重要であるが、mWT での *CRTC1-MAML2* CG の有無についてはこれまでの報告で議論的になっているにもかかわらず、組織学的特徴が十分に示されてこなかった。本研究では、WSI を用いて、初めて組織学的特徴を解明するに至った。

今回われわれは WSI と組み合わせた最新の FISH 技術で mWT 様腫瘍を分析し、WT 様 MEC という MEC の新規バリエーションを提言した。この発生率はかなり高く、われわれの研究において mWT 様腫瘍の 5/15 症例 (33%) に、WT の 5/107 症例 (4.7%) にあった。WT 様 MEC の診断には、組織学的特徴を踏まえ、適切な遺伝子検査を併用すべきであるといえる。今後、WT 様 MEC という新たな概念は、WT と MEC の診断に大きな影響を与えると思われる。