

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

伊藤 洋平

論文題目

唾液腺乳腺相似分泌癌における臨床病理学的・分子学的検討：*ETV6* 遺伝子の融合相手遺伝子検索

## I 緒言

近年、新たに提唱された乳腺相似分泌癌 (Mammary analogue secretory carcinoma; 以後 MASC) は、乳腺分泌癌と形態的、遺伝子的に類似した特徴を示す唾液腺腫瘍である。MASC は全唾液腺悪性腫瘍の約 10%程とされ、年齢層は広く、男女比には諸説がある。約 70%が耳下腺に発生し、小唾液腺にも発生する。予後は比較的良好であるが、少数例ながら、高度の悪性化を示す予後不良な症例も報告され、真の腺房細胞癌よりは予後不良傾向があるとされている。病理組織学的には、分葉状に増殖し、微小嚢胞型、充実型、嚢胞乳頭型、嚢胞型といった組織型が混在した組織像を呈する。腫瘍細胞の核異型は軽度で、細胞質は好酸性で空胞化を伴い、核分裂像、壊死像は稀である。鑑別診断としては、腺房細胞癌、粘表皮癌等の低悪性度唾液腺腫瘍があげられている。特に、非腺房型腺房細胞癌とは HE 標本のみでの鑑別は困難で、特異的な融合遺伝子の検出が鑑別の決め手とされている。その為、MASC にみられる染色体転座  $t(12;15)(p13;q25)$  を形成する *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子は重要である。造血器腫瘍では、*ETV6* 遺伝子に対し *NTRK3* 遺伝子を含む約 30 の融合相手があり、これが分子的な特徴とされている。一方、MASC では融合相手は *NTRK3* 遺伝子のみと考えられているが、新規の融合相手が存在することも示唆される。そこで我々は、本研究において、MASC の 14 症例の臨床病理学的及び分子病理学的検討を行った。

## II 症例と方法

## 1 研究症例の選択

対象は名古屋市立大学臨床病態病理学講座と東京医科大学解剖病理学講座の病理情報から、一旦は異型腺房細胞癌と診断したものの、再確認後に MASC が疑われた 36 例が中心である。これに名古屋市立大学病院及び愛知学院大学歯学部附属病院で採取された 43 例の唾液腺腫瘍（粘表皮癌 11 例、腺様嚢胞癌 10 例、唾液腺導管癌 7 例、多形腺腫由来癌 3 例、上皮筋上皮癌 2 例、腺房型腺房細胞癌 2 例、多形腺腫 8 例）を加えて計 79 例を検討した。本研究は愛知学院大学及び名古屋市立大学の施設内倫理委員会の承認を得て実施した。

## 2 MASC と *ETV6* 遺伝子再構成

Skalova らが *ETV6* 遺伝子の split が MASC に特異的であることを報告しており、我々の症例でも同様であるか否かと MASC の診断のため、79 例で fluorescence in situ hybridization (以後 FISH) 法を行い、*ETV6* 遺伝子の split を確認した。

## 3 MASC 症例の臨床情報

本研究で収集した臨床情報は、年齢、性別、原発部位、腫瘍の大きさ、所属リンパ節への転移、治療、生命予後情報とした。

## 4 MASC の免疫組織化学染色 ; S-100 とマンマグロビン

MASC の 14 例のパラフィン切片に S-100 とマンマグロビンに対する免疫組織化学検査を行った。

## 5 Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による *ETV6* 遺伝子の融合相手遺伝子解析

FISH 解析は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を 4  $\mu$ m に薄切した切片で行った。FISH のプローブには *ETV6*、*NTRK3*、*NTRK1*、*NTRK2* 遺伝子の split ならびに、*ETV6-NTRK3*、*ETV6-NTRK1*、*ETV6-NTRK2* の fusion を検出するものを用いた。検体の加熱処理、タンパク分解酵素処理、再固定、プローブのハイブリダイズを行った後、蛍光顕微鏡下に蛍光シグナルを観察撮影し、重複のない核を持つ細胞を選んで遺伝子の split 及び fusion を解析した。

## 6 Reverse transcription polymerase chain reaction, nested RT-PCR による *ETV6-NTRK3* 融合転写産物解析

*ETV6-NTRK3* 融合遺伝子の有無を標本から全 RNA を抽出し、cDNA に変換後、RT-PCR 法及び nested RT-PCR 法により検出した。使用した primer は、outer primer として *ETV6A* と *NTRK3A* を、inner primer として *ETV6B* と *NTRK3B* を用いた。増幅条件は、first PCR で初期変性処理を 95°C、10 分行い、熱変性を 95°C、1 分、アニーリングを 55°C、1 分、伸長反応を 72°C、1 分で 45 サイクルとし、nested PCR ではアニーリングを 65°C、サイクル数を 40 に変更し行った。RT-PCR 陽性例は、direct sequence 法を行い塩基配列と切断点を確認した。

## 7 Quantitative real-time RT-PCR による *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子発現レ

## ベル

RT-PCR 陽性の MASC 症例のうち、特に first PCR 陽性症例に対して定量的 real-time RT-PCR 法を行い融合転写物の発現レベルを調べた。増幅条件は、初期変性処理を 95°C、10 分間、熱変性を 95°C、30 秒、アニーリング/伸長反応を 60°C、30 秒で 45 サイクルとした。ETV6-NTRK3 融合転写物の発現レベルは、比較デルタ Ct 法を用いて解析した。なお、全ての反応を 3 回繰り返し実験の正確性を期した。

### III 結果

#### 1 MASC の臨床病理学的解析

一旦、異型腺房細胞癌と診断したが、再検により MASC が疑われた 36 症例のうち、14 例は ETV6 遺伝子の split を認め MASC と再診断した。この 14 例の MASC 症例の男女比は 6 : 8 とわずかに女性に多かった。患者年齢に特徴はなく、平均年齢は 43.6 歳、中央値は 39 歳であった。腫瘍の原発部位は、10 例が大唾液腺、残り 4 例が小唾液腺であった。腫瘍の大きさは、平均値 2.6 cm、中央値 2.5 cm であった。

#### 2 MASC の病理組織学的解析

MASC 症例は、病理組織学的には線維性隔壁によって分けられた分葉状増殖を示し、管状型、微小嚢胞型、充実型、鉤くぎ型、乳頭型、嚢胞型の形態が観察され、多くの症例で 2 つ、または 3 つの組織型が混在していた。腫瘍の核は類円形で、核分裂像や壊死像は稀であった。免疫組織化学検査

では、全 MASC 例で S-100 とマンマグロビンが陽性であった。14 例中の 2 例で、厚い線維性隔壁形成とともに、浸潤が認められ、うち 1 例では腫瘍の顕著な神経周囲浸潤を認め、もう 1 例では血管侵襲を認めた。

### 3 MASC における *ETV6* 遺伝子の特異性と融合相手遺伝

MASC でない唾液腺腫瘍 43 例で *ETV6* 遺伝子の split は陰性であり、MASC における *ETV6* 遺伝子の分断、再構成が特異的あることが再確認された。MASC を疑った 36 例中、MASC と再診断した 14 例を融合相手遺伝子検索のため更に詳細に分析した。14 例中 12 例では、*NTRK3* 遺伝子の split と *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子の存在を確認した。*NTRK3* 遺伝子の split が陰性の 2 例では *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子がないことを確認し、この 2 例は *ETV6* 遺伝子の融合相手が *NTRK3* 遺伝子ではないことが確認された。この症例で融合相手となる可能性のある遺伝子として、NTRK family に属する *NTRK1* と *NTRK2* 遺伝子の関与を調べたが、これらに split は検出されなかった。

### 4 症例の経過観察情報

経過観察情報は、14 人中 5 人の患者から得られたのみであったが、それら全例が最後の経過観察時点で生存していた。

### 5 MASC における *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子発現レベル

Real-time PCR 法を用い、5 症例の MASC で *ETV6-NTRK3* 融合転写産物の発現を定量化できた。*ETV6-NTRK3* 融合転写産物の相対的発現レベルは 1 から 5.8 の範囲で変動した。

## 6 融合相手遺伝子検索に対する FISH 法と RT-PCR 法の検出感度

MASC が疑われた 36 症例で、FISH 法と RT-PCR 法による *ETV6* 遺伝子異常の検出感度を比較したところ、FISH 法により MASC と診断された 14 例のうち 6 症例で RT-PCR 法または nested RT-PCR 法によっても MASC と診断し得た。

### IV 考察

本研究では、MASC の 14 症例で *ETV6* 融合遺伝子における新規の相手遺伝子の検索を行った。MASC の 14 症例中で、FISH 法によって *ETV6* 遺伝子の split、*NTRK3* 遺伝子の split、*ETV6-NTRK3* 融合遺伝子が証明された典型的な *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子を持つものは 12 例で、そのうち 6 例では RT-PCR 法によっても *ETV6-NTRK3* 融合転写産物が確認された。しかし、残りの 2 例は FISH 法で *ETV6* 遺伝子の split が陽性であったものの、*NTRK3* 遺伝子の split と *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子は陰性かつ、RT-PCR 法で *ETV6-NTRK3* 融合転写産物が陰性であった。これらの結果から、後者の 2 例は、*ETV6* 遺伝子が未知の相手遺伝子と融合している *ETV6-X* 症例の可能性が考えられた。

本 MASC 症例は臨床病理学的に従来の MASC 症例のものと類似し、典型的な *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子を有する症例の病理組織像も類似した組織像を示した。一方で、*ETV6-X* 症例は著明な間質の線維化と腫瘍の神経、脈管侵襲を認め、低悪性度の組織像を有する従来の MASC 症例に比べて、より

aggressive な組織像を示し、*ETV6-X* 融合遺伝子は腫瘍の高悪性度化と関連するものと考えられる。

本研究では、FISH 法と RT-PCR 法との間で診断症例数に解離が生じ、これは一致しなかった症例が、新規の融合遺伝子、あるいは、*ETV6-NTRK3* 融合遺伝子の切断点が違う variant の可能性であると考えられる。従って、MASC の病理診断や *ETV6* 遺伝子の融合相手遺伝子検索においては FISH 法の方がより感度の高い解析手法として推奨されることが考えられる。実際に、既存の BAC クローンを用いて split 及び fusion プローブを作成し解析することで、*ETV6-X* 融合遺伝子を検出し得た。このように FISH 法を応用することで、多くの融合遺伝子検出の可能性が広がり、分子標的治療に貢献すると考えられる。

*ETV6* の融合相手遺伝子の検索では、*NTRK3* 遺伝子の属する NTRK family 内の *NTRK1* と *NTRK2* 遺伝子の関与を検討したが、これらの関与は確認できず、*ETV6* 遺伝子の融合相手は検出できなかった。

*ETV6-NTRK3* 融合転写産物の発現レベルと腫瘍との関連性は、*ETV6-NTRK3* 融合転写産物の発現レベルは様々であるものの、症例間で臨床病理学的な違いはほとんどなく、融合転写産物の発現レベルが癌の生存発育と関連しない可能性を示すものと考えられる。

今後は、*ETV6-NTRK3* 融合遺伝子及び *ETV6-X* 融合遺伝子が臨床病理学的所見と関連しているか否かを明確にするために、更なる分子病理学的検討が



(論文内容の要旨)

No. ....8.....

愛知学院大学

なされる必要がある。

平成27年12月16日