

厚生労働科学研究費補助金  
(がん対策推進総合研究事業(革新的がん医療実用化研究事業))  
分担研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」  
(希少・難治がんに対するウイルス療法の開発)

研究分担者・門脇 則光  
(京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学・准教授)

研究要旨

過半数のヒト造血器腫瘍細胞株およびprimaryの造血器腫瘍細胞にG47Δが感染しこれを殺傷したことから、造血器腫瘍がHSV-1ウイルス療法の対象になり得ることが明らかになった。

A. 研究目的

遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)の造血器腫瘍治療への応用を目指して、HSV-1による(1)造血器腫瘍細胞の直接的殺傷、(2)免疫系の活性化、(3)in vivoでの抗腫瘍作用の誘導、の3つが起こること、及びその機序を明らかにする。これにより、造血器腫瘍に対する複合的がん免疫療法の基盤となるウイルス療法を確立する。

B. 研究方法

In vitro, in vivoの実験により、造血器腫瘍に対するHSV-1ウイルス療法の抗腫瘍作用を細胞・分子・個体レベルで解析する。

- (1) 遺伝子組換えHSV-1 G47Δによる造血器腫瘍細胞の感染・殺傷
- (2) G47Δによる免疫系の活性化メカニズム
  - (1. 拡散センサーを介した免疫細胞の刺激、
  2. 腫瘍細胞のimmunogenic cell deathの誘導)

- (3) G47Δのリンパ腫皮下接種モデルへの腫瘍内投与による抗腫瘍作用とその免疫学的機序

(倫理面への配慮)

健常人末梢血や患者検体は、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して、京都大学倫理審査委員会の承認のもと、京都大学医学部学生または患者から書面でインフォームド・コンセントを得たうえで採取または使用する。被験者の個人情報は、連結可能匿名化により保護する。対応表は、鍵のかかる保管庫に管理し、鍵は応募者のみが保有する。以上の方法により、応募者の責任において個人情報を厳重に管理する。

遺伝子組換えHSV-1を用いた実験については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」により、第二種使用等「遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型を用いた腫瘍ウイルス療法」をする間に執る拡散防止措置を大臣確認申請し、すでに確認済である。また、組換

えDNA実験計画は、すでに京都大学の承認を得ている。

動物実験は、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に準拠して行う。

## C. 研究結果

### (1) G47Δによる造血器腫瘍細胞の感染・殺傷

G47Δは、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫を含むヒト造血器腫瘍細胞株10種類中6種類に感染し、これらを殺傷した。

また、G47Δは、さまざまな病型を含むヒト primary造血器腫瘍細胞10種類中6種類に感染し、これらを殺傷した。

細胞株へのG47Δの感染・殺傷は、HSV-1レセプターnectin-1の発現と関連した。

### (2) G47Δによる免疫系の活性化メカニズム

immunogenic cell deathにより細胞に表出される calreticulinの発現、及びATP, HMGB1の放出の有無を調べたところ、4細胞株中すべてでcalreticulinの発現がみられたが、ATP, HMGB1の放出がみられたのは1株のみだった。

マウスモデルを用いた実験はH26年度には施行していない。

## D. 考察

HSV-1が正常の血液細胞に感染しにくいことから、造血器腫瘍はHSV-1ウイルス療法の対象として考えられていなかったが、本研究により対象になり得ることが明らかになった。

HSV-1 entry receptorのうちnectin-1の発現が

G47Δの感染・殺傷と関連したが、実際にnectin-1がウイルスのentryに関わっているかどうかは、阻害抗体により検証する必要がある。

また、G47Δで死滅した造血器腫瘍細胞の免疫原性の有無は、樹状細胞の刺激能の有無という機能的なアッセイによっても検証する必要がある。

## E. まとめ (結論)

造血器腫瘍はHSV-1ウイルス療法の対象になり得る。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

① Kadowaki N, Guest editorial: immunotherapy for hematological malignancies: the quest to overcome tolerogenic drive. Int J Hematol 99(2): 105-106, 2014.

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金  
(がん対策推進総合研究事業 (革新的がん医療実用化研究事業))  
分担研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」  
(希少・難治がんに対するウイルス療法の開発)

研究分担者・海堀 昌樹  
(関西医科大学 外科学講座・准教授)

研究要旨

肝細胞がんの新たな治療法として、第3世代の制限増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型(T-01)を用いて、ヒト肝細胞がんに対する治療効果を検討した。T-01は様々な細胞株に対し高い殺細胞作用を示し、様々な動物モデルに対し腫瘍増殖を抑制した。ヒト肝細胞癌に対し、有効な新規治療法になりうる事が示唆された。前臨床実験にて有効性を確立し、基礎的データの集積することにより今後の治療への応用を目指す。

A. 研究目的

日本では、年間約 3 万人が新たに肝臓がん診断を受け、がん死の 3 位を占めている。肝臓がんにおいて、肝切除手術の可能な人は全体の約 30%にとどまり、肝臓がんが発見された時点で約 7 割の人は背景肝の肝硬変が悪化進行し手術できない状態である。こうした肝臓がん特有の問題を克服するために様々な治療法が研究・開発されている。しかし進行肝細胞がんは予後が悪く、ステージIV期において MST は 6 か月、門脈腫瘍塞栓を伴う再発肝細胞癌において MST は 2.7 か月であり、現在 sorafenib が使用されている。切除不能進行肝癌において、placebo 群 (MST7.9 か月) に対し sorafenib 群 (MST10.7 か月) の生存延長を認めるものの (SHARP study)、

臨床では無効例や副作用が強く中断する例が多く、次の治療法が存在しないのが現状である。

近年、癌治療法として、ウイルスの特性を利用したウイルス療法の研究が精的に進められている。我々は肝細胞癌に対する新規治療として、第三世代増殖型遺伝子組換え HSV-1 (T-01) によるウイルス療法の効果検討を行う。T-01 は(1) $\gamma$ 34.5 遺伝子の欠失、(2) ICP6 遺伝子の欠失と lacZ 遺伝子挿入、および(3) $\alpha$ 47 遺伝子欠失変異の三重変異を有する。欠失変異による高い治療効果と安全性を併せ持ち、更に抗腫瘍免疫の惹起力が増強している (図 1:ウイルスの増殖に伴う、ウイルスそのものの直接的な腫瘍に対する局所的な殺細胞効果に加え、抗腫瘍免疫

が増幅することによる転移病変への効果が期待出来る)。

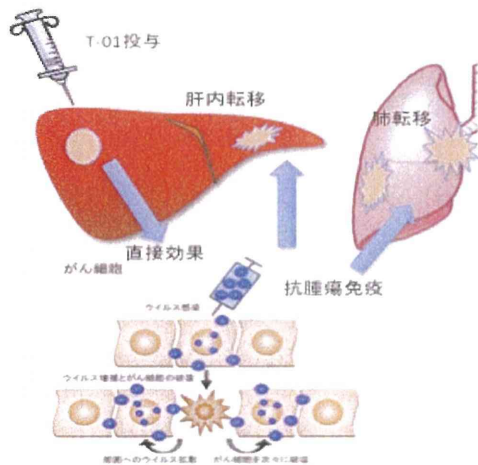


図1:T-01を用いた治療の概念

## B. 研究方法

① *In vitro*では、ヒト肝癌細胞株 (13種) を用いて、T-01の殺細胞効果および複製能を検討。② *In vivo*ではヒト肝癌細胞株 (肝炎由来など背景を分別し、4種を検討) を用いて、ヌードマウスの皮下腫瘍・同所腫瘍・腹膜播種モデルを作成し、T-01投与後の抗腫瘍効果や安全性を検討した。

### ① *In vitro*

#### 培養細胞上でのウイルス複製能の検討

- (1) 前日  $5.0 \times 10^5$  cells/2ml/well の各種ヒト肝がん培養細胞株をまく。
- (2) 各種培養細胞株を DPBS/1%IFCS で洗浄後、ウイルス希釈液 (MOI 0.01) を添加する。
- (3) 1 時間の初期感染後、ウイルス液を除去し培養液を加え、48 時間培養する。

(4) 48 時間後、ウイルスの感染した細胞及び上清を回収する。

(5) 回収したウイルスに対し Vero 細胞を用い、タイトルを測定する(ブランク法)。

#### ヒト肝細胞がん由来培養細胞株における T-01 の細胞障害性の検討

(1) 前日に 6 穴プレートに  $2.0 \times 10^5$  cells/2ml/well の各種ヒト肝がん培養細胞をまく。

(2) T-01 投与量を決定する。

(3) 各種培養細胞を、T-01 希釈液 (MOI 0.1 及び 0.01) で感染させる。

(4) 1 時間の初期感染後、ウイルス液を除去し、培養液を加え培養する。

(5) 1, 2, 3, 4 日目に残っている培養細胞の数をカウントする。

### ② *in vitro*

#### 皮下異種移植したヒト肝細胞がんに対する T-01 の腫瘍縮小効果の検討

(1) BALB/c ヌードマウスの皮下腫瘍を測定し、1 群あたりの匹数を決定する。

(2) T-01 投与量を決定し 10% glycerol/DPBS で希釈する。(1 匹あたり 20  $\mu$ l に調製)

(3) P2A 実験室の安全キャビネット内で麻酔後、腫瘍内にウイルスを投与する。

(4) 週 3 回、腫瘍径・体重等を観察する。

## 同所移植モデル/腹膜播種モデルでの T-01 の治療効

### 果の検討

(1)ヌードマウスにヒト肝細胞がん細胞株を異種移植、して、1群あたりの匹数を決定する。

(2)T-01の投与量を決定する。(1匹あたり20 $\mu$ lに調製)

(3)P2A実験室の安全キャビネット内で麻酔後、腫瘍内にウイルスを投与する(局注,静注)。

(4)生存率など抗腫瘍効果を検討する。

(倫理面への配慮)

腫瘍実験における動物の福祉に関する英国癌研究調整委員会(UKCCCR)指針に沿って実験を行った。

また平成23年10月4日付で文部科学大臣より遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の確認済みである。

### C. 研究結果

①T-01は11種の細胞株に対し、高い殺細胞作用を示した。②様々なモデルに対し腫瘍増殖を抑制し、明らかな副作用は認めなかった(図2:Huh-7同所モデルでの検討)。

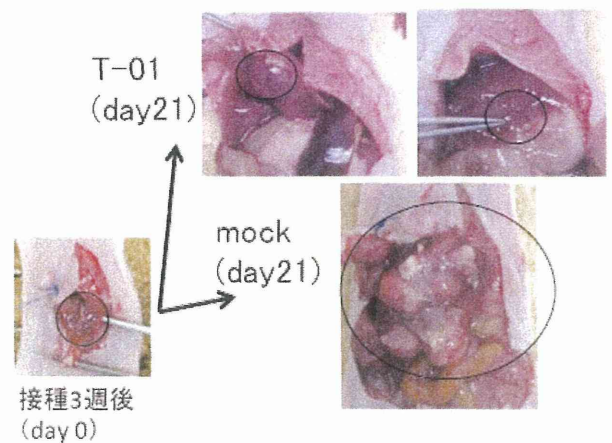


図2: 同所腫瘍モデル(Huh-7)に対する抗腫瘍効果の検討

腫瘍確認後、MockとT-01/1回投与群を投与21日目に開腹し腫瘍体積を比較した。T-01は抗腫瘍効果を示した。

### D. 考察

肝細胞癌に対し有効な新規治療法になりうる事が示唆された。

### E. 結論

現在T-01と同じ3つのウイルス遺伝子に変異を有するG47 $\Delta$ を用いて、他癌腫に対する複数の臨床試験が進行中である。今後、難治性モデル(肺転移など)に対する抗腫瘍効果や、ソラフェニブとの併用など、肝細胞癌への実用化を視野に入れた開発を行っている。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中原 寛和	臨床解剖 唾液腺疾患の疫学	柏木 伸夫	唾液腺疾患のMRI	メジカルビュー社	東京	2014	10-13, 22-23

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koyama-Nasu R, Hruta R, Nasu-Nishimura Y, Taniue K, Katou Y, Shirahige K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Matsui M, Takahashi R, Hoshino-Okubo A, Sugano H, Manabe E, Funato K, Akiyama T	The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells.	Oncogene	33(17)	2236-2244	2014
Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T	PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells.	Biochem Biophys Res Commun	441(1)	13-18	2014
Takai H, Masuda K, Hiraoka K, Echizen K, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Ogawa H, Kozuka-Hata H, Oyama M, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Toyoshima C, Shirahige K, Akiyama T	5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the methylome.	Cell Reports	9(1)	48-60	2014
Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MAE, Hayashi Y, Hamada JI, Hirao A	Strong therapeutic potential of $\gamma$ -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells.	J Neurooncol	121(2)	239-250	2014
Futamura G, Kawabata S, Siba H, Kuroiwa T, Suzuki M, Kondo N, Ono K, Tanaka M, Todo T, Miyatake S	A case of radiation-induced osteosarcoma treated effectively by boron neutron capture therapy.	Practical Radiation Oncology	9(1)	237	2014

Fujimura T, Yamada Y, Sugihara T, Azuma T, Suzuki M, Fukuhara H, Nakagawa T, Kume H, Igawa Y, Homma Y	Nocturia in men is a chaotic condition dominated by nocturnal polyuria.	Int J Urol		in press	2015
Taguchi S, Fukuhara H, Kakutani S, Takeshima Y, Miyazaki H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Igawa Y, Kume H, Homma Y	Risk factors for clinical metastasis in men undergoing radical prostatectomy and immediate adjuvant androgen deprivation therapy.	Asian Pac J Cancer Prev	15	10729-33	2014
Teshima T, Takahashi S, Nagamoto S, Miyazaki H, Nakagawa T, Fujimura T, Fukuhara H, Kume H, Homma Y	Intrascrotal dedifferentiated leiomyosarcoma originating from dartos muscle.	Case Rep Urol		in press	2014
Kanatani A, Nakagawa T, Kawai T, Naito A, Sato Y, Yoshida K, Nozaki K, Nagata M, Yamada Y, Azuma T, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Nishimatsu H, Kume H, Igawa Y, Homma Y	Adjuvant Chemotherapy Is Possibly Beneficial for Locally Advanced or Node-Positive Bladder Cancer.	Clin Genitourin Cancer		in press	2014
Ito H, Aizawa N, Fujita Y, Suzuki M, Fukuhara H, Homma Y, Kubota Y, Ito M, Andersson KE, Igawa Y.	Long-term caloric restriction in rats may prevent age-related impairment of in vitro bladder function.	J Urol		in press	2014
Kakutani S, Fukuhara H, Taguchi S, Nagata M, Niimi A, Hattori M, Miyazaki H, Fujimura T, Nakagawa T, Kume H, Igawa Y, Homma Y	Combination of docetaxel, ifosfamide and cisplatin (DIP) as a potential salvage chemotherapy for metastatic urothelial carcinoma.	Jpn J Clin Oncol		in press	2014
Taguchi S, Fukuhara H, Azuma T, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Ishikawa A, Kume H, Igawa Y, Homma Y	Ultra-early versus early salvage androgen deprivation therapy for post-prostatectomy biochemical recurrence in pT2-4N0M0 prostate cancer.	BMC Urol	14	81-86	2014
Yamada D, Matsushita H, Azuma T, Nakagawa T, Nagata M, Yamada Y, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Kume H, Homma Y, Kakimi K	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor as a predictor of the response of metastatic renal cell carcinoma to tyrosine kinase inhibitor therapy.	Mol Clin Oncol	2(6)	1023-1027	2014



Mukaiyama Y, Suzuki M, Morikawa T, Mori Y, Takeshima Y, Fujimura T, Fukuhara H, Nakagawa T, Nishimatsu H, Kume H, Homma Y	Multiple primary malignant neoplasms of the glottis, renal pelvis, urinary bladder, oral floor, prostate, and esophagus in a Japanese male patient: a case report.	World J Surg Oncol	12	294	2014
Aizawa N, Ito H, Sugiyama R, Fujimura T, Suzuki M, Fukuhara H, Homma Y, Igawa Y	Selective inhibitory effect of imidafenacin and 5-hydroxymethyl tolterodine on capsaicin-sensitive C-fibers of the primary bladder mechanosensitive afferent nerves in the rat.	J Urol		in press	2014
Sugihara T, Yasunaga H, Horiguchi H, Matsui H, Fujimura T, Nishimatsu H, Fukuhara H, Kume H, Yu C, Kattan MW, Kiyohide F, Homma Y	Robot-assisted versus other types of radical prostatectomy: population-based safety and cost comparison in Japan, 2012-2013.	Cancer Sci	105(11)	1421-1426	2014
Nishimatsu H, Kitamura Y, Yamada D, Nomiya A, Niimi A, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Nakagawa T, Enomoto Y, Kume H, Igawa Y, Homma Y	Improvement of symptoms of aging in males by a preparation LEOPIN ROYAL containing aged garlic extract and other five of natural medicines - comparison with traditional herbal medicines (Kampo).	Ageing Male	17(2)	112-116	2014
Sato YT, Fukuhara H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Nishimatsu H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y	Long-term results of radical prostatectomy with immediate adjuvant androgen deprivation therapy for pT3N0 prostate cancer.	BMC Urol	14	13-18	2014
Kamei J, Nishimatsu H, Nakagawa T, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Igawa Y, Kume H, Homma Y	Risk factors for septic shock in acute obstructive pyelonephritis requiring emergency drainage of the upper urinary tract.		46(3)	493-497	2014
Kadowaki N	Guest editorial: immunotherapy for hematological malignancies: the quest to overcome tolerogenic drive.	Int J Hematol	99(2)	105-106	2014

M R I o f t h e S a l i v a r y G r a n d

# 唾液腺疾患の

# MRI

編集

柏木伸夫

近畿大学医学部放射線医学教室講師

# 執筆者一覽

## ◆ 編集

---

**柏木伸夫** 近畿大学医学部放射線医学教室講師

## ◆ 執筆者(掲載順)

---

**中原寛和** 近畿大学医学部歯科口腔外科准教授

**渡口真史** 近畿大学医学部放射線医学教室

**柏木伸夫** 近畿大学医学部放射線医学教室講師

**原田博史** 生長会府中病院病理診断科副部長

**寺尾恭一** 近畿大学医学部耳鼻咽喉科准教授

**土井勝美** 近畿大学医学部耳鼻咽喉科主任教授

**北野睦三** 近畿大学医学部耳鼻咽喉科講師

**酒井美緒** 大阪府立成人病センター放射線診断科副部長

**池田耕士** 関西医科大学放射線科学講師

# 臨床解剖

中原寛和

唾液腺は唾液の産生、分泌を担う外分泌腺であり、左右に一对ずつある3つの大唾液腺(耳下腺, 顎下腺, 舌下腺)と小唾液腺に分かれている。小唾液腺は口腔内、中咽頭に多数、広汎に分布している<sup>1)</sup>(図1)。

## ● 耳下腺

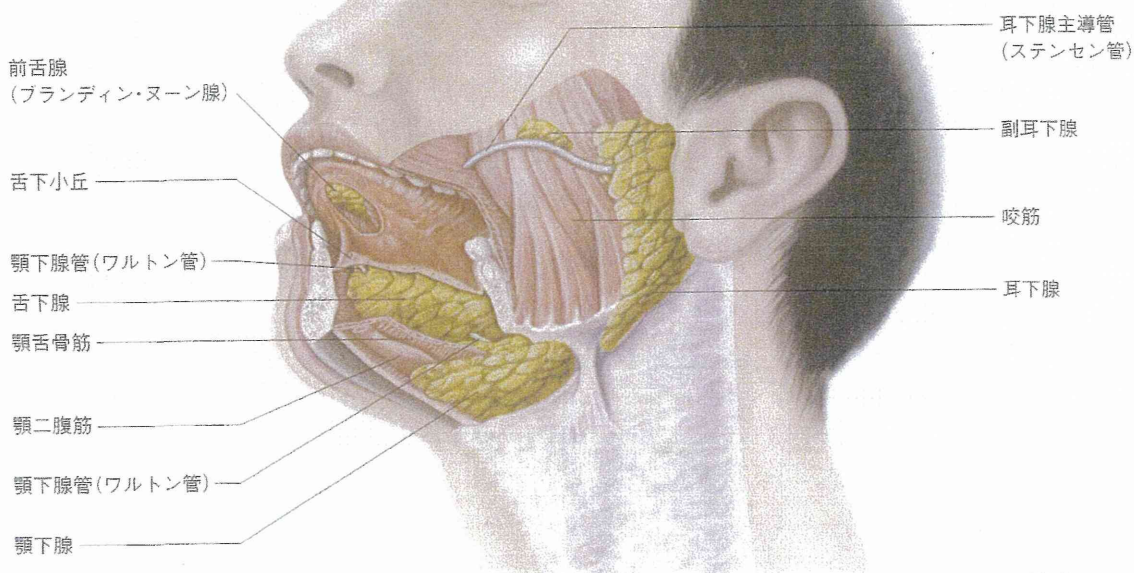
### ◆ 位置

耳下腺は最大の大唾液腺で、外耳孔前下方の皮膚直下に拡がっており、浅葉と深葉に分かれている。浅葉は外耳道、頬骨弓の高さから下顎角外側を越えて胸鎖乳突筋前縁の皮膚直下に存在している。深葉は、浅葉の深部に広がり内面は咬筋から下顎枝後縁、さらには内側翼突筋、傍咽頭隙に接している(図1, 2)。

### ◆ 耳下腺管

耳下腺の主導管(ステンセン管, Stensen's duct)は腺の前上部から出て、頬骨弓下の咬筋直上を横走し、その前縁で内側に曲がり、頬筋、頬粘膜を貫き、上顎第二大臼歯付近の頬粘膜の耳下腺乳頭に開口する(図1~3)。副耳下腺が、主導管の周囲に存在することがある(図1)。

図1



(文献2より改変引用)

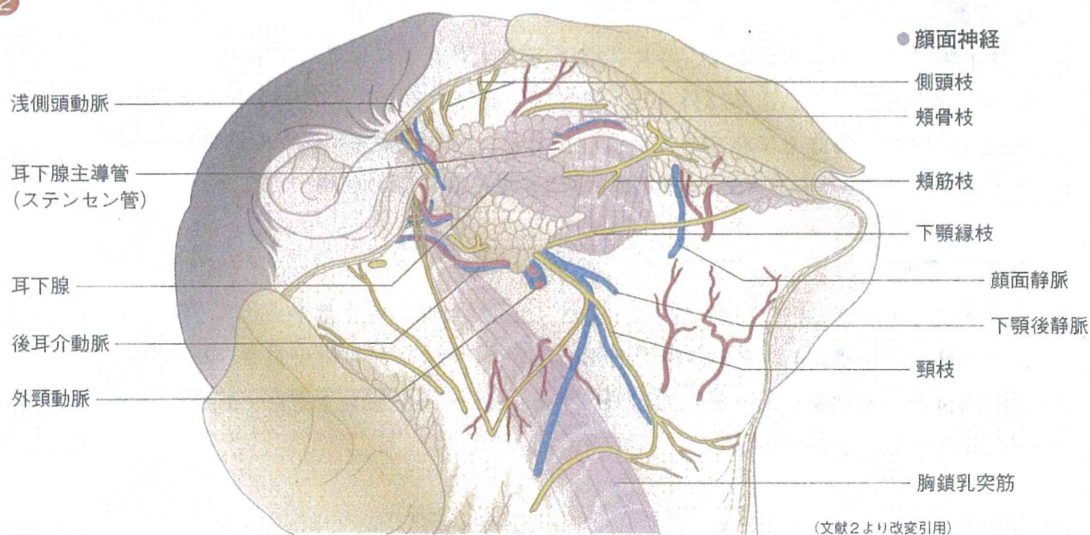
◆ 顔面神経との位置関係

顔面神経主幹は茎乳突孔から出て、耳下腺の皮膜に覆われ腺内に入る(図2, 4, 5)。顔面神経は腺内で分枝・吻合し、耳下腺神経叢を形成しており、耳下腺神経叢の外側の浅葉、内側の深葉に分けられている(図2, 5)。耳下腺神経叢より末梢は耳下腺の上縁から側頭枝、頬骨枝が、前縁から頬筋枝と下顎縁枝が、下縁付近より顎枝が分枝している(図2, 5)。

◆ 耳下腺の脈管

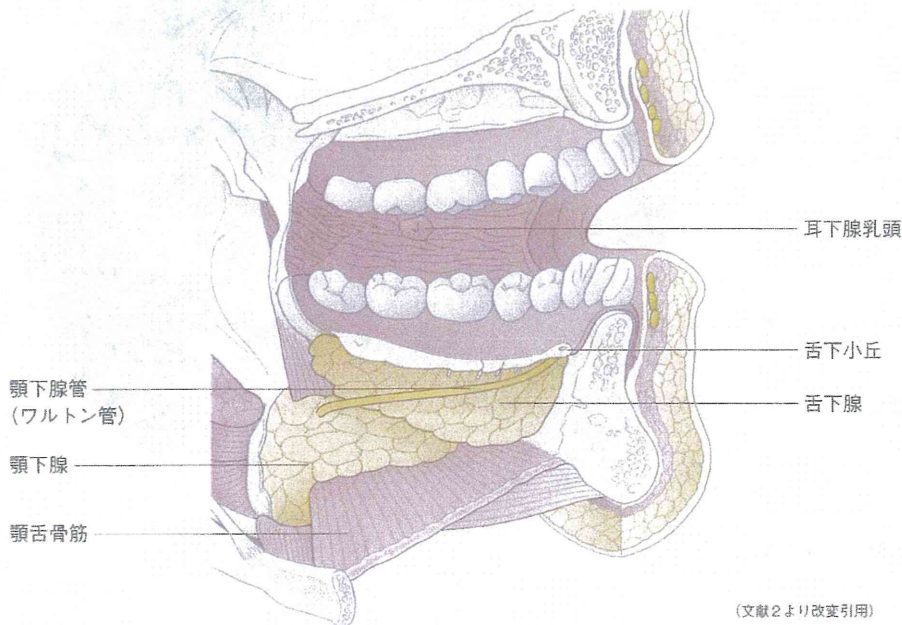
耳下腺の栄養は外頸動脈の枝が担っている。腺深葉内側を走る外頸動脈は、まず後耳介動脈を分枝し、次に腺内で顎動脈と浅側頭動脈の2終枝に分かれる。これらの血管から耳下腺枝が分布している。耳下腺の静脈血は下顎後静脈に集められ、顔面静脈と吻合する(図2)。

図2



(文献2より改変引用)

図3



(文献2より改変引用)

### ◆ 耳下腺のリンパ節

耳下腺表面および腺内にリンパ節は豊富に存在する。耳介前リンパ節は浅葉の上方で、耳介の前方にあり、耳下腺リンパ節は胸鎖乳突筋前縁の耳下腺下極にある。腺内にも浅リンパ節および深リンパ節がある。

## ● 顎下腺

### ◆ 位置

顎下腺は顎二腹筋の前腹と後腹および下顎骨下縁でつくられる顎下三角に位置しており、表面は広顎筋、内面は顎舌骨筋に接している(図1, 3)。

### ◆ 顎下腺管

顎下腺管(ワルトン管, Wharton's duct)は腺中層より出て顎舌骨筋の後縁を回って口腔底を前方に走り、舌下小丘に開口する(図1, 3, 6)。

### ◆ 顎下腺の脈管

顎下腺には顔面動脈の直接枝が分布している。さらに顔面動脈の枝であるオトガイ下動脈や上行口蓋動脈の枝、舌動脈の枝が分布している場合もある。

## ● 舌下腺

### ◆ 位置

舌下腺は舌下粘膜の直下であり、下顎骨と舌筋の間で顎舌骨筋上に位置している(図1, 3, 6)。

### ◆ 舌下腺管

導管は顎下腺管と合流して舌下小丘に開口する(図1, 3, 6)。

### ◆ 舌下腺の脈管

舌下腺は主に舌動脈の直接枝および舌動脈の枝の舌下動脈と舌深動脈の枝、顔面動脈の枝のオトガイ下動脈の枝が分布する(図6)。

## ● 小唾液腺

大唾液腺以外の小唾液腺として、上唇、下唇に分布する口唇腺、舌尖部に分布する前舌腺(別名ブランディン・ヌーン腺)(図1)、有郭乳頭および葉状乳頭付近の粘膜下にあるエブネル腺、分界溝より後部の後舌腺、頬粘膜の粘膜下に存在する頬腺、口蓋腺、臼歯腺がある。

図4 顔面神経の分布

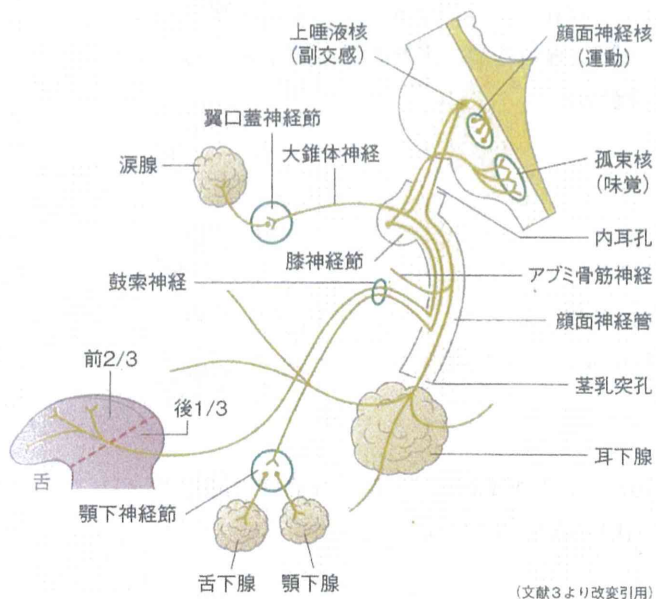
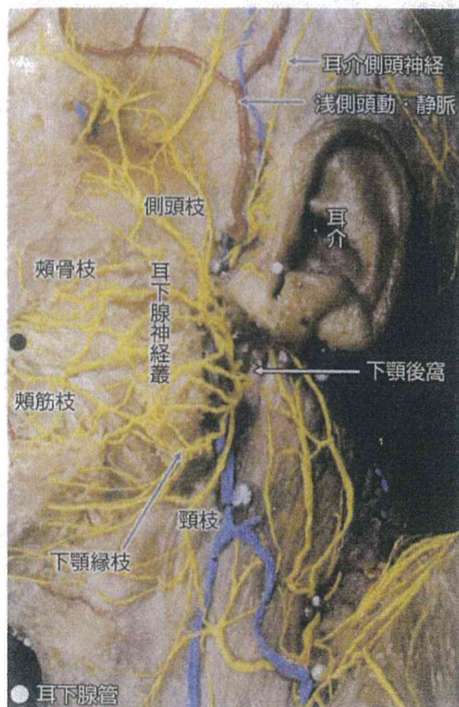
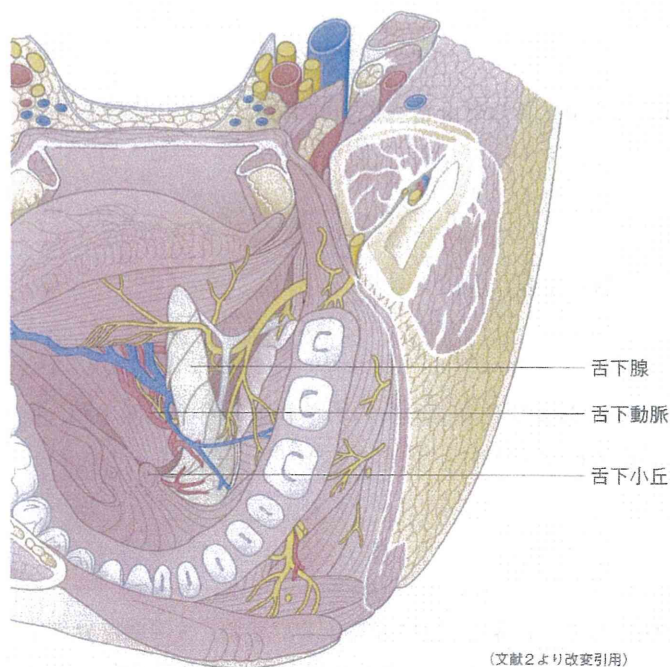


図5



[上島幸枝, 北村清一郎: 顔面, 鍼灸師・柔道整復師のための局所解剖カラーアトラス (北村清一郎, 熊本賢三編) 改訂第2版, p34, 2012, 南江堂より許可を得て改変し転載]

図6



◇ 文献

- 1) Barnes L, et al: WHO Classification Head and Neck Tumours. Oxford Univ. Press UK 2005; 212-4.
- 2) Ferner H: 臨床応用局所解剖図譜Pernkopf Atlas der topographischen und angewandten Anatomie des Menschen. 第1巻頭部・頸部第2版, 医学書院, 東京, 1980.
- 3) 清木勘治: 小解剖学書改訂第3版. 金芳堂, 東京, 1983.
- 4) 北村清一郎編著: 臨床家のための口腔顎顔面解剖アトラス. 医歯薬出版株式会社, 東京, 2009.

# 唾液腺疾患(腫瘍)の疫学

中原寛和

## ●— 唾液腺腫瘍の頻度

全世界における年間の唾液腺腫瘍の頻度は人口10万人あたり0.4～13.4人で、唾液腺悪性腫瘍の頻度は人口10万人あたり0.4～2.6人とされている<sup>1)</sup>。米国では、頭頸部癌の6%が唾液腺悪性腫瘍であり、全悪性腫瘍中の0.3%を占めている<sup>1)</sup>。

## ●— 大唾液腺、小唾液腺別頻度および悪性腫瘍の比率

唾液腺腫瘍の大唾液腺、小唾液腺別の頻度については64～80%が耳下腺に発生し、続いて顎下腺、小唾液腺に多く、舌下腺の発生頻度は1%以下となっている(表1)。唾液腺腫瘍は良性腫瘍の比率が高いが、全唾液腺腫瘍のなかで悪性腫瘍の比率は21～46%となっている。各々の腺においては、舌下腺では70～90%と悪性腫瘍の比率が高く、顎下腺、小唾液腺と比率は低下し、耳下腺では11～32%と最も低いと報告されている<sup>1)</sup>。わが国では全唾液腺腫瘍の悪性腫瘍の比率は15.8～43.7%と施設によって異なっている<sup>2-5)</sup>。わが国においても耳下腺より顎下腺、舌下腺のほうが悪性腫瘍の頻度が高いとの報告が多い<sup>2-5)</sup>。

表1  
唾液腺腫瘍の頻度と悪性腫瘍の比率

	腫瘍の腺別頻度	悪性腫瘍の比率
耳下腺	64～80%	11～32%
顎下腺	7～11%	41～45%
舌下腺	1%以下	70～90%
小唾液腺	9～23%	50%
全体		21～46%

(文献1より引用)

## ●— 唾液腺腫瘍の性差、患者平均年齢

唾液腺腫瘍患者の平均年齢は良性では46歳、悪性では47歳となっているが、60～70歳台に分布のピークがある<sup>1)</sup>。頻度の高い多形腺腫、粘表皮癌、腺房細胞癌は30～40歳台に多い。組織型により若干の性差があるとされている<sup>1)</sup>。わが国においても年齢分布は中年層に多くみられるとの報告が多い<sup>2-5)</sup>。全唾液腺腫瘍として性差はないとされているが、良性腫瘍は女性に、悪性腫瘍は男性に多いとする報告も認められる<sup>2-4)</sup>。



## ● 組織型別頻度

最も発生頻度の高い腫瘍は多形腺腫で全唾液腺腫瘍の50%を占める。続いてワルチン腫瘍が多い。悪性腫瘍では粘表皮癌の発生頻度が最も高いという報告が多い<sup>1)</sup>。わが国でも組織別の発生頻度ではほとんどの報告で多形腺腫が最も発生頻度が高いとしている<sup>2-5)</sup>。良性腫瘍の組織型は多形腺腫とワルチン腫瘍がほとんどであり、その他の組織型はまれとされている<sup>3)</sup>。悪性では粘表皮癌、腺様嚢胞癌、多形腺内癌、腺癌と報告されているものの施設によってばらつきがある<sup>2-5)</sup>。悪性腫瘍のなかでは腺様嚢胞癌が最も多いとする報告もある<sup>4)</sup>。

### ◇ 文献

- 1) Barnes L, et al: WHO Classification Head and Neck Tumours. Oxford Univ. Press UK, 2005: 212-4.
- 2) 安田大栄ほか: 唾液腺腫瘍の臨床統計. 耳鼻臨床 2004; 97: 611-4.
- 3) 川野真太郎ほか: 唾液腺腫瘍 151 例の臨床統計的検討. 日口外誌 2005; 52: 393-400.
- 4) 堀之内康文ほか: 唾液腺腫瘍 160 例の臨床統計的検索. 日口外誌 1990; 36: 1730-7.
- 5) 山中康嗣ほか: 唾液腺腫瘍 90 例の臨床統計的検討. 口腔腫瘍 1999; 11: 1-10.

## 唾液腺疾患のMRI

2014年10月1日 第1版第1刷発行

---

■編集 柏木伸夫 かしわぎのぶお

---

■発行者 鳥羽清治

---

■発行所 株式会社メジカルビュー社

〒162-0845 東京都新宿区市谷本村町2-30

電話 03(5228)2050(代表)

ホームページ <http://www.medicalview.co.jp/>

---

営業部 FAX 03(5228)2059

E-mail [eigy@medicalview.co.jp](mailto:eigy@medicalview.co.jp)

---

編集部 FAX 03(5228)2062

E-mail [ed@medicalview.co.jp](mailto:ed@medicalview.co.jp)

---

■印刷所 図書印刷株式会社

---

ISBN978-4-7583-1581-4 C3047

---

©MEDICAL VIEW, 2014. Printed in Japan

---

・本書に掲載された著作物の複写・複製・転載・翻訳・データベースへの取り込みおよび送信(送信可能化権を含む)・上映・譲渡に関する許諾権は、(株)メジカルビュー社が保有しています。

・**JCOPY** (社)出版者著作権管理機構 委託出版物

本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に、(株)出版者著作権管理機構(電話 03-3513-6969, FAX 03-3513-6979, e-mail: [info@jcopy.or.jp](mailto:info@jcopy.or.jp))の許諾を得てください。

・本書をコピー、スキャン、デジタルデータ化するなどの複製を無許諾で行う行為は、著作権法上での限られた例外(「私的使用のための複製」など)を除き禁じられています。大学、病院、企業などにおいて、研究活動、診察を含み業務上使用する目的で上記の行為を行うことは私的使用には該当せず違法です。また私的使用のためであっても、代行業者等の第三者に依頼して上記の行為を行うことは違法となります。

ORIGINAL ARTICLE

# The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells

R Koyama-Nasu<sup>1</sup>, R Haruta<sup>1</sup>, Y Nasu-Nishimura<sup>1</sup>, K Taniue<sup>1</sup>, Y Katou<sup>2</sup>, K Shirahige<sup>2</sup>, T Todo<sup>3</sup>, Y Ino<sup>3</sup>, A Mukasa<sup>3</sup>, N Saito<sup>3</sup>, M Matsui<sup>1</sup>, R Takahashi<sup>1</sup>, A Hoshino-Okubo<sup>1</sup>, H Sugano<sup>1</sup>, E Manabe<sup>1</sup>, K Funato<sup>1</sup> and T Akiyama<sup>1</sup>

Increasing evidence suggests that brain tumors arise from the transformation of neural stem/precursor/progenitor cells. Much current research on human brain tumors is focused on the stem-like properties of glioblastoma. Here we show that anaplastic lymphoma kinase (ALK) and its ligand pleiotrophin are required for the self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem cells (GSCs). Furthermore, we demonstrate that pleiotrophin is transactivated directly by SOX2, a transcription factor essential for the maintenance of both neural stem cells and GSCs. We speculate that the pleiotrophin-ALK axis may be a promising target for the therapy of glioblastoma.

*Oncogene* (2014) 33, 2236–2244; doi:10.1038/onc.2013.168; published online 20 May 2013

**Keywords:** ALK; cancer stem cell; glioblastoma; kinase; pleiotrophin; SOX2

## INTRODUCTION

Glioblastoma is one of the most aggressive human cancers with a median survival of around 1 year.<sup>1</sup> Increasing evidence suggests that glioblastoma may arise from the transformation of neural stem/precursor/progenitor cells.<sup>2</sup> Consistent with this idea, glioblastoma cells cultured in serum-free media, which favor the growth of neural stem cells (NSCs), maintain stem-like properties and tumorigenicity.<sup>3</sup> However, when grown in the presence of serum, they undergo irreversible differentiation and lose their tumorigenicity.<sup>3</sup> This finding raises the possibility that differentiation therapy might be effective for glioblastoma.<sup>4</sup>

Almost all cell proliferative signaling involves phosphotransfer cascades, and accordingly protein kinases have been intensely pursued as drug targets. Indeed, a number of small-molecule inhibitors and antibodies targeting kinases are currently being used for cancer treatment.<sup>5</sup> Therefore, one approach to developing differentiation-inducing therapies for glioblastoma would be to identify kinases that regulate their stem-like properties.

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) is a receptor tyrosine kinase that is bound by the growth factor pleiotrophin or the closely related midkine.<sup>6,7</sup> ALK was initially discovered as a protein fused to nucleophosmin (NPM) in an anaplastic large cell lymphoma (ALCL). This fusion was shown to cause the ligand-independent autophosphorylation and activation of ALK. Studies using mouse models further showed that this NPM-ALK fusion is a primary driver of oncogenesis in ALCL.<sup>8</sup> Moreover, oncogenic fusions or mutations of ALK have also been described in various other cancers, including inflammatory myofibroblastic tumors, non-small cell lung cancer (NSCLC), diffuse large B-cell lymphoma, squamous cell carcinoma of the esophagus and neuroblastoma.<sup>7</sup> Importantly, the ALK inhibitor crizotinib has recently been approved for the treatment of ALK-positive NSCLC.<sup>9,10</sup> In addition, an anti-ALK antibody has been shown to repress the invasive capacity of the glioblastoma cell line U87 (Stylianou *et al.*<sup>11</sup>).

The Sry-related transcription factor SOX2 was identified as a partner of Oct3/4 in embryonic stem cells (ESCs) and is known to be essential for pluripotent cell development.<sup>12–14</sup> SOX2 is also expressed in NSCs and has an important role in neural development and homeostasis of the adult central nervous system.<sup>14,15</sup> On the other hand, it has also been shown that SOX2 is overexpressed in glioblastoma.<sup>16</sup> Furthermore, it has been reported that knockdown of SOX2 by RNA interference (RNAi) suppresses the tumorigenicity of glioblastoma stem cells (GSCs) xenografted into immunodeficient mice.<sup>17</sup>

In the present study, we show that the pleiotrophin-ALK axis is activated by SOX2 and is required for the self-renewal and tumorigenicity of GSCs.

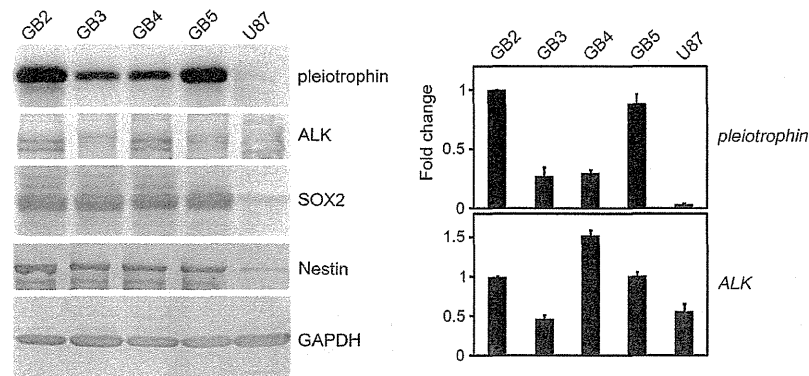
## RESULTS

ALK and its ligand pleiotrophin are required for the self-renewal and stem-like properties of GSCs

We established four GSC lines under serum-free conditions, GB2–5, and found that they are of the proneural type.<sup>18,19</sup> These cell lines exhibited enrichment for GSCs as they maintained sphere-forming ability and expressed high levels of the NSC markers, SOX2 and Nestin, as reported previously<sup>3</sup> (Figure 1). The GB2 cell line possesses the highest tumorigenic activity among our GSC lines, and we used these cells to perform an unbiased kinome-wide RNAi screen. We transfected GB2 cells that had been maintained in serum-free medium with a library of small interference RNAs (siRNAs) that target each of 704 kinases and kinase-related genes and then measured the expression levels of the stem cell markers *CD133*<sup>20</sup> and *Lgr5*.<sup>21</sup> We found 15 kinase genes whose suppression affected *CD133* or *Lgr5* expression, including 4 kinases known to be involved in the proliferation of GSCs<sup>22</sup> (Table 1 and Supplementary Table S1). One of these top 15 genes, ALK was also previously reported to be involved in

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular and Genetic Information, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Laboratory of Genome Structure and Function, Center for Epigenetic Disease, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan and <sup>3</sup>Department of Neurosurgery, The University of Tokyo Hospital, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan. Correspondence: Professor T Akiyama, Laboratory of Molecular and Genetic Information, Institute for Molecular and Cellular Bioscience, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan. E-mail: akiyama@iam.u-tokyo.ac.jp

Received 27 June 2012; revised 23 March 2013; accepted 25 March 2013; published online 20 May 2013



**Figure 1.** Expression levels of ALK and pleiotrophin in GSCs. GB2–5 cells were maintained in serum-free medium. U87 cells were maintained in serum-containing medium. Cell lysates were subjected to immunoblotting with antibodies to the indicated proteins (left). The mRNA levels of *ALK* or *pleiotrophin* were evaluated by quantitative RT-PCR and shown as the fold change over mRNA levels in GB2 cells (right). Error bars represent the s.d. ( $n = 3$ ).

**Table 1.** Kinome-wide RNAi screen in GSCs

	Gene symbol	CD133	Lgr5	Average
1	TSSK6	0.55	0.50	0.52
2	GRK4	0.49	0.81	0.65
3	FRK	0.58	0.76	0.67
4	CDC42BPA*	0.45	0.89	0.67
5	PICK1	0.71	0.70	0.71
6	TAL1	0.78	0.64	0.71
7	DVL3	0.80	0.62	0.71
8	PCTK2	0.78	0.65	0.71
9	MARK1	0.70	0.73	0.72
10	OXSRI*	0.75	0.70	0.72
11	FYN*	0.53	0.91	0.72
12	DYRK2	0.76	0.70	0.73
13	MAPKAPK3*	0.68	0.80	0.74
<b>14</b>	<b>ALK</b>	<b>0.69</b>	<b>0.80</b>	<b>0.75</b>
15	ETNK2	0.89	0.60	0.75

Abbreviations: GSC, glioblastoma stem cell; RNAi, RNA interference. Note: Average fold changes in the top 15 genes whose knockdown resulted in the greatest change in CD133 and/or Lgr5 expression. ALK data are indicated in bold and the asterisks indicate genes identified in a similar RNAi screen.<sup>22</sup> The entire results are shown in Supplementary Table S1.

glioblastomagenesis.<sup>11,23</sup> However, these studies mainly analyzed the commonly used glioblastoma cell line U87, which does not exhibit any stem-like properties.<sup>3,24</sup> Furthermore, although U87 cells are highly tumorigenic, U87-derived tumors do not show any glioblastoma-specific features.<sup>3,24</sup> We therefore set out to study the role of ALK in the tumorigenicity of GSCs. Lentiviral introduction of a short hairpin RNA (shRNA) targeting ALK resulted in a decrease in both sphere formation and stem cell marker expression (Figures 2a and b). Although the levels of *nestin* mRNA were downregulated, the levels of Nestin protein did not change drastically, probably due to the stability of the Nestin protein in GB2 cells.

We next examined whether the ALK ligand pleiotrophin is required for the stem-like properties of GSCs. We found that pleiotrophin was expressed at high levels in GB2–5 cells compared with U87 cells and mainly as an 18-kDa protein (Figure 1). When pleiotrophin expression was knocked down by shRNA, both sphere formation and expression levels of the stem cell markers examined were suppressed (Figures 2a and b). We found that GSCs infected with a lentivirus expressing an shRNA targeting ALK or pleiotrophin had increased levels of the neural marker mitogen-activated protein kinase 2 (*MAP2*;

Supplementary Figure S1A). By contrast, knockdown of either ALK or pleiotrophin resulted in decreased expression of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (*GFAP*) and the oligodendrocyte marker *Olig2* (Supplementary Figure S1A). We observed that knockdown of either ALK or pleiotrophin did not cause apoptosis (Supplementary Figure S1B) or any drastic morphological change (Supplementary Figure S1C). In addition, knockdown of pleiotrophin resulted in a decrease in ALK protein and mRNA levels, suggesting that pleiotrophin stimulates not only ALK kinase activity but also *ALK* gene expression. These results suggest that ALK and pleiotrophin are important for the self-renewal and stem-like properties of GSCs.

ALK and pleiotrophin activate the Myc and ESC-like transcriptional programs in GSCs

To study the role of the pleiotrophin-ALK axis in GSCs, we investigated the gene expression profiles of GB2 cells in which either ALK or pleiotrophin expression had been suppressed by siRNA. DNA microarray analyses revealed that the MAP kinase, phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase) and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription factor (JAK/STAT) pathways are activated in GSCs (Figure 2c and Supplementary Tables S2–S4). Pleiotrophin, but not ALK, was also found to activate the Wnt signaling pathway. We found about a 30% overlap in the genes whose expression was reduced by suppression of ALK and pleiotrophin (Figure 2d and Supplementary Tables S2–S4). Furthermore, we found that downstream target genes of ALK and pleiotrophin overlap with those enriched in ESCs, which are known to be overexpressed in poorly differentiated tumors, including glioblastoma<sup>25</sup> (Figure 2d, upper panel and Supplementary Tables S2–S4). It had been previously reported that the NPM-ALK fusion protein induces Myc expression.<sup>26</sup> We also found that ALK and pleiotrophin target genes overlap those targeted by Myc and its related proteins, the Myc module, which has been reported to account for most of the similarity between ESCs and cancer cells<sup>27</sup> (Figure 2d, lower panel and Supplementary Tables S2–S4). These results suggest that ALK and pleiotrophin may confer a more aggressive oncogenic phenotype to glioblastomas by activating the Myc and ESC-like transcriptional programs.

ALK and pleiotrophin are critical for the tumorigenicity of GSCs

It has been suggested that the stem-like properties of GSCs are indispensable for their tumorigenicity.<sup>3,28</sup> We therefore attempted to clarify the involvement of the pleiotrophin-ALK axis in the tumorigenicity of GSCs. We took GB2 cells containing a