学位論文

唾液腺導管癌における遺伝子発現解析と発症機序に関する検討
（The study of gene expression of salivary duct carcinoma and its onset-mechanism）

2018 年 3 月

北海道大学

鈴木　崇祥

学位論文

唾液腺導管癌における遺伝子発現解析と発症機序に関する検討
（The study of gene expression of salivary duct carcinoma and its onset-mechanism）

2018 年 3 月

北海道大学

鈴木　崇祥

内容

A) 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表予定である。

Takayoshi Suzuki[1,2], Satoshi Kano[1], Kanako C. Hatanaka[2], Masanobu Suzuki[1], Shin-ichiro Yasukawa[1], Akira Nakazono[1], Takatsugu Mizumachi[1], Yutaka Hatanaka[2], Yoshihiro Matsuno[2] , Akihiro Homma[1]
[1]Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan,
[2]Department of Surgical Pathology, Hokkaido University Hospital, Sapporo, Japan.
Overexpression of VEGFA in salivary duct carcinoma derived from pleomorphic adenoma and its role for angiogenesis and activation of AKT/PI3K signaling pathway.
雑誌Cancer Researchに投稿中

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Takayoshi Suzuki[1,2], Satoshi Kano[1], Kanako C. Hatanaka[2], Yutaka Hatanaka[2], Tomohiro Sakashita[1], Takatsugu Mizumachi[1], Hiromitsu Hatakeyama[1], Yoshihiro Matsuno[2], Akihiro Homma[1]
[1]Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan,
[2]Department of Surgical Pathology, Hokkaido University Hospital, Sapporo, Japan.
Expression of PLAG1 in salivary duct carcinomas and its efficacy of the distinction of Carcinoma ex Pleomorphic Adenoma type and de novo type.
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017. Washington D.C., April 1-5, 2017.

B) 緒言

1 唾液腺導管癌

唾液腺腫瘍は多様な組織像を呈し、症例数が少ないことも相まって病理組織診断のみならず、疾患概念の把握や分類にも困難を伴う。その病態、発生、悪性化の機序に関してはほとんど解明されていないのが実情である。

唾液腺導管癌は Kleinsasser らによって 1968 年にはじめて報告された、病理組織学的に浸潤性乳管癌に類似した特徴を有する唾液腺癌の一亜型である [1]。唾液腺導管癌は従来、全唾液腺癌の約 10%を占めるとされてきたが、近年、疾患の認知度の高まりとともに唾液腺導管癌と診断される症例が増えている [2,3]。主に 60-70 歳男性に好発することが知られており [4-6]、耳下腺に好発し(75%)、そのほか、顎下腺、舌下腺、小唾液腺にも発症する [5]。非常に悪性度の高い腫瘍であり、急速に増大を示すことが多く、しばしば顔面神経麻痺を伴い、早期に局所再発や頸部リンパ節転移や遠隔転移を認めることが多い [2]。現在唾液腺導管癌に対する確立された薬物療法は存在せず、手術および術後放射線治療が標準治療とされているが、一般的に予後は不良であり、5 年以内に 55-65%が死亡すると報告されている [5-7]。

唾液腺導管癌は、浸潤性乳管癌と病理組織学的に多くの類似点を有するが、近年、乳癌と同様に、ヒト成長因子受容体 2 型(HER2)タンパク質の過剰発現が唾液腺導管癌においても高頻度に認められると報告されており [8]、さらに HER2 過剰発現例では、遠隔転移をきたやすく、生命予後不良であると報告される。[5,8-13] これらの報告は、唾液腺導管癌は組織形態学的にのみならず、タンパク質発現および遺伝子プロファイルレベルにおいても、浸潤性乳管癌と類似性を有することが示唆される。さらに近年、少数報告例ではあるが、HER2 抗体陽性唾液腺導管癌患者に対して抗 HER2 抗体トラスツズマブ(ハーセプチン®)を含んだ薬物療法の有用性が報告されている [14-18]。一方で、唾液腺導管癌の全ての症例が HER2 陽性ではなく、さらには HER2 抗体陽性例においても抗 HER2 抗体の治療効果は一様ではない。これらの知見は、唾液腺導管癌が単一の疾患で構成されているのではなく、複数の疾患群を包括した概念であることを示唆しており、そのことが疾患特異的な特徴の探索を困難にしている。乳癌領域においては、現在、HER2 およびエストロゲン、プロゲステロン受容体(*ER*/*PgR*)遺伝子発現などの分子生物学的プロファイルに基づき、複数のサブタイプに層別化され、予後予測や個別化治療に臨床応用されている [19-21]。唾液腺導管癌に関しても、近年、Di Palma らにより HER2 およびアンドロゲン受容体(AR)免疫染色ステータスに基づいたサブタイプ分類が提唱されているものの [22]、予後予測、個別化治療選択への応用は未だ行われていないのが現状である。

2 多形腺腫と多形腺腫由来癌

多形腺腫は、上皮性細胞の増殖に加え、粘液腫様組織や軟骨成分などが混在し、

同一腫瘍内でも多種多様な像を呈する腫瘍である[2]。全唾液腺腫瘍中、最も頻度の高い組織型で約 60%を占めるとされる[23]。年間発生率は、人口 100,000 人あたり 2.4-3.1 人と報告される[2]。若年者から高齢者まで幅広い年齢層で発症する[24]。 性比はわずかに女性優位である(1:1.59)[24,25]。発症部位は耳下腺 80%、顎下腺 10%、口腔、鼻副鼻腔、上気道および消化管の小唾液腺に 10%である[24]。

近年、多形腺腫に特異的な融合遺伝子として Pleomorphic adenoma gene 1(*PLAG1*)が発見された[26]。*PLAG1* 融合遺伝子より過剰産生される PLAG1 タンパク質は DNA 結合型転写因子として機能し腫瘍発生をもたらすと考えられており、PLAG1 免疫染色は多形腺腫に対する特異的マーカーとして有用であることが報告されている[27]。

また、多形腺腫は良性腫瘍であるが、術後再発することがあり、再発率は、術後5年で 3.4%、10 年で 6.8%と報告されている[28]。さらに一部の症例は悪性転化をきたす(6.2%)が[25]、その多くは広汎な浸潤傾向を呈し、外科的制御は困難であることが多い。現時点で術前に悪性転化する症例を予測する方法は存在しないため、多形腺腫の治療方針として基本的には手術を勧めざるを得ないのが現状である。しかし、手術には出血や感染のみならず、唾液漏、顔面神経麻痺などの術後合併症のリスクを伴う。とくに、顔面神経麻痺は整容性の観点から著しく患者の QOL を損なうため、しばしば手術拒否例も存在する。

唾液腺導管癌は、その発生母地により正常唾液腺組織より発生する de novo 型と既存の多形腺腫組織内より発生する多形腺腫由来型(Ca-ex-PA)の 2 パターンに分類され[2]、多形腺腫由来癌が約 60%を占めるとされる[13]。また多形腺腫由来癌の最多の癌腫は唾液管導管癌であるとされ[29]、多形腺腫由来癌と唾液腺導管癌の間には密接な関係があることが予想されるが、その発生機序は明らかにされていない。

3 本研究の目的

唾液腺導管癌に対しては、今後、上述のように抗 HER2 抗体を含む新規治療の開発ならびに臨床応用が大いに期待されるが、そのためには唾液腺導管癌の発生機序の解明が不可欠である。特に、先行病変としての多形腺腫を有する多形腺腫由来型の病態解明は、多形腺腫の悪性転化リスク評価を可能にし、実臨床上大きな恩恵をもたらすと考える。具体的には、悪性転化低リスク群に対しては手術の回避が可能となり、一方で悪性転化高リスク群に対しては治療の時期を逃すことなく、さらにより慎重な術後フォローアップを行うことが可能となる。しかし、前記の通り、唾液腺導管癌は単一の疾患で構成されているのではなく、複数の疾患群を包括した概念であることが想定され、そのことは疾患特異的な特徴の探索を困難にしている。

今回我々は、発生母地の違いに着目し、唾液腺導管癌症例における免疫染色プロファイルおよび遺伝子発現プロファイルの解析を行った。さらに、唾液腺導管癌の発生機序に関する考察を行った。

具体的には、自験例に対して以下の検証を行った。

1. 現行の診断基準に基づいて定義された発症様式(de novo 型/多形腺腫由来型)に関して、PLAG1 を用いて分子生物学的観点に基づいた発症様式の再定義を行った。
2. Di Palma 分類(免疫染色プロファイルに基づいた分類)を用いて唾液腺導管癌症例に対してサブタイピングを行った。各サブタイプにおける遺伝子発現プロファイルの評価、検討を行った。
3. 発症様式(de novo 型/多形腺腫由来型)ごとにおける免疫染色プロファイルおよび遺伝子発現プロファイルの探索を行った。
4. 上述の結果を踏まえて、唾液腺導管癌の発生機序に関して検討を行った。

C) 略語表

本文中、ならびに図中で使用した略語は以下のとおりである。

4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein
ADAM23	ADAM metallopeptidase domain 23
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
APC	Adenomatous polyposis coli
AR	Androgen receptor
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5
BRCA2	Breast cancer 2, early onset
Ca-ex-PA	多形腺腫由来型
CCNA1	Cyclin A1
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CDH13	Cadherin 13, H-cadherin
CK5/6	Cytokeratin 5/6
CTNNB1	Beta-catenin
CTSD	Cathepsin D
DAB	3'-Diaminobenzidine
DISH	Dual color in situ hybridization
Dll4	Delta like canonical Notch ligand 4
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
eLF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
eNOS	Endothelial nitric oxide
ER	Estrogen receptor
ERK	Extracellular signal–regulated kinase
ESR1	Estrogen receptor 1
FOXA1	Forkhead box protein A1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GATA3	GATA binding protein 3

GLI1	GLI family zinc finger 1
GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7
HER2(ERBB2)	Human epidermal growth factor receptor 2
HE	Hematoxylin–Eosin
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor-1 alpha
ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
IGF-II	Insulin-like growth factor 2
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein-3
KRT5	Keratin 5
KRT8	Keratin 8
KRT18	Keratin 18
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MMP2	Matrix metallopeptidase 2
MMP9	Matrix metallopeptidase 9
MMPs	Matrix metallopeptidases
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NO	Nitric oxide
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated
p53	Tumor protein p53
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PCR	Polymerase chain reaction
PgR	Progesterone Receptor
PIGF	Placental growth factor
PLAG1	Pleomorphic adenoma gene 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Rac1	Ras-related C3 botulinus toxin substrate 1

RARB	Retinoic acid receptor, beta
RB1	Retinoblastoma 1
RHEB	Ras homolog enriched in brain
RNA	Ribonucleic acid
ROBO4	Roundabout guidance receptor 4
RTU	Ready-to-use
SEM	Standard error of the mean
SLC39A6	Solute carrier family 39, member 6
SLIT2	Slit homolog 2
TSC1/2	Tuberous sclerosis 1/2
TFF3	Trefoil factor 3
TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
XBP1	X-box binding protein 1

D) 実験方法

1 実験材料

以下に本研究で用いた実験材料を示す。

＜1＞ サンプル

唾液腺導管癌症例 23 例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロック

＜2＞ 免疫染色抗体

表 1. 免疫染色抗体一覧

抗体	販売会社	製品名	クローン	希釈倍率
HER2	Ventana	Ventana Pathway HER2/neu (4B5)	4B5	Ready-to use
AR	Leica	Androgen Receptor	AR27	1:50
EGFR	Ventana	EGFR (3C6) Primary Antibody, CONFIRM	3C6	Ready-to-use
CK5/6	Dako	Cytokeratin 5/6	D5/16 B4	1:400
Ki-67	Dako	Ki-67	MIB-1	1:200
PLAG1	Abnova	PLAG1 monoclonal antibody (M02)	3B7	1:100

＜3＞ 自動免疫染色装置

Tissue-Tek® Prisma® Automated Slide Stainers (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)および PT Link 免疫組織化学染色用前処理システム

＜4＞ HER2/CEN17 Dual color in situ hybridization (DISH)

INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Kit (Ventana Medical Systems, CA)

＜5＞ HER2/CEN17 DISH 全自動染色システム

Benchmark ULTRA (Ventana Medical Systems, CA)

＜6＞ PCR キット

RNA 抽出キット: miRNeasy FFPE Kit #217504 (QIAGEN, Venlo, Netherlands)

PCR array キット: RT²Profiler™ PCR Array Human Breast Cancer PAHS-131ZC (QIAGEN, Venlo, Netherlands)

＜7＞ PCR 解析装置

StepOnePlus™ realtime PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

＜8＞ 統計解析ソフトウェア

R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

統計ソフトウェア R version 3.4.1 (2017-06-30)を用いて統計解析を行った。
遺伝子発現バープロット作成に関して “ggplot2”パッケージを、 Steel-Dwass 検定に関して “NSM3”パッケージを、ヒートマップ作成に関して “d3heatmap”パッケージを、ランダムフォレスト法に関して “randomForest”パッケージおよび “inTrees”パッケージを、それぞれ追加した。

2 実験方法

以下に本研究で施行した実験方法について示した。なお、臨床検体の採取、取り扱いは、北海道大学病院倫理委員会で承認された方法(「唾液腺腫瘍における病態解明に関する探索的研究」(自 016-0029))にて適切に行われた。

＜1＞ 対象症例

北海道大学病院耳鼻咽喉科にて 1989 年から 2015 年までの間に初回治療を行った唾液腺導管癌 23 症例を対象とした。

＜2＞ 免疫組織染色

対象症例 23 例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックに対してミクロトームを用いて厚さ 4 μm に薄切し切片作製した。PT Link 免疫組織化学染色用前処理システムにて脱パラフィン、賦活化処理を行った。

[HER2, AR, EGFR, Ki-67, CK5/6]

各抗体の添付プロトコールを遵守し、Tissue-Tek® Prisma® Automated Slide Stainers を用いて自動染色を行った。

[PLAG1]

脱パラフィン処理、抗原賦活化処理後、Peroxidase-Blocking, 200 μl, 5 min にてブロッキングを行った。PLAG1 monoclonal antibody (M02) 3B7 (1:100)にて一次抗体反応を行った(30 min, shake)。Rabbit LINKER にてリンカー処理(15 min, shake), Envision FLEX HRP にてリンカー処理(15 min, shake)後、 DAB

標識二次抗体反応を行った(10 min)。最後に HE 染色にて対比染色を行い、マリノール封入し標本を完成させた。

< 3 > HER2/CEN17 Dual color in situ Hybridization

対象症例 23 例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックに対してミクロトームを用いて厚さ 4 μm に薄切し切片作製した。添付プロトコールを遵守し、Benchmark ULTRA (Ventana Medical Systems, CA) を用いて自動染色を行った。

評価方法

[HER2]

ASCO-CAP HER2 Test Guideline Recommendations 2013 に準じて、腫瘍細胞の細胞膜に関して染色評価を行った[30](表 2、 3、 図 1)。

表 2. HER2 免疫染色判定方法

IHC スコア	染色パターン	判定
0	細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞≦10%	陰性
1+	ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色がある癌細胞>10%	陰性
2+	弱～中程度の完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞>10%	判定保留
3+	強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞>30%	陽性

表 3. HER2-DISH 判定方法

評価	染色パターン
陰性	HER2/CEN17 比 ＜2.0 かつ 1細胞あたり平均 HER2 コピー数 ＜4.0
判定保留	HER2/CEN17 比 ＜2.0 かつ 4.0 ≤ 1細胞あたり平均 HER2 コピー数 ＜6.0
陽性	HER2/CEN17 比 ≥2.0 もしくは 1細胞あたり平均 HER2 コピー数 ≥6.0

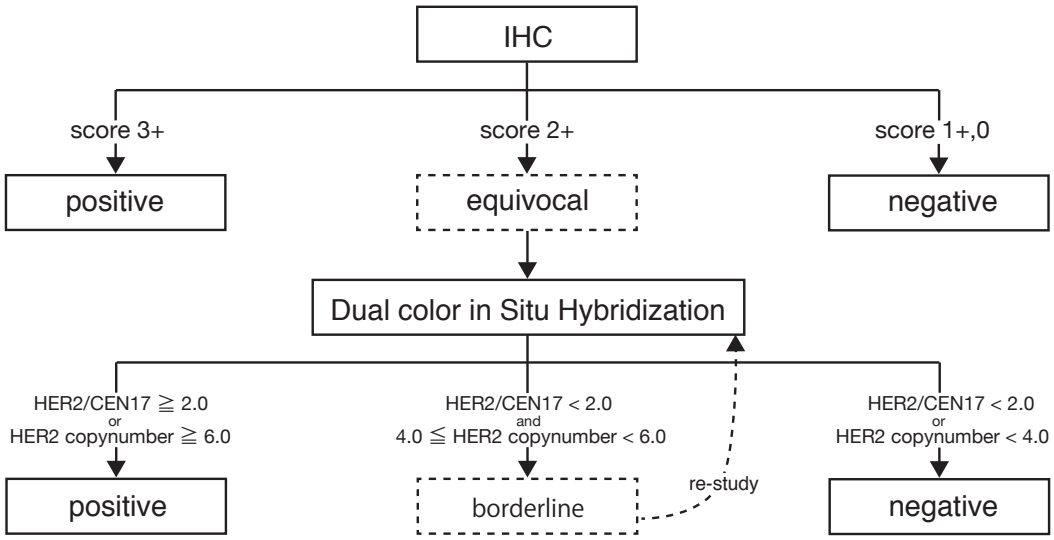


図 1. HER2 スコアリングアルゴリズム

ASCO-CAP HER2 Test Guideline Recommendations 2013 の HER2 スコアリングアルゴリズムを用いて、HER2 スコアリングを行った。

[EGFR]

既報文献に準じて以下の診断基準を用いて、腫瘍細胞の細胞膜に関して染色評価を行った[31-33](表 4)。本研究では 1+以上を陽性と判定した。

表 4. EGFR 免疫染色判定方法

IHC スコア	染色パターン	判定
0	細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある癌細胞≦10%	陰性
1+	ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色がある癌細胞>10%	陽性
2+	弱～中程度の完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞>10%	陽性
3+	強い完全な細胞膜の陽性染色がある癌細胞>30%	陽性

[AR]

全腫瘍細胞に対して核内染色を評価し、陽性細胞数を計測した。ASCO/CAP ER and PgR Guideline Recommendations に準じて、全腫瘍細胞 1%以上に核内染色像を認めるものを陽性と判定した。

[Ki-67]

全腫瘍細胞に対して核内染色を評価し、陽性細胞数を 10%間隔で計測した。

[CK5/6]

全腫瘍細胞に対して細胞質染色を評価し、陽性細胞数を計測した。既報文献に準じて 10%以上を陽性と判定した[34]。

HER2, AR, Ki-67, CK5/6 に関しては、Di Palma らにより提唱された分類法に準じて、HER2-positive 群(HER2 + / any AR / any Ki-67 or CK5/6)、Luminal-AR 群(HER2 - / AR + / any Ki-67 or CK5/6)、Basal-like 群(HER2 - / AR - / any Ki-67 or CK5/6)の 3 群に分類を行った[22](表 5)。

表 5. Di Palma 分類 (Modified from Di Palma et al, 2012.文献 22)

	HER2	AR	CK5/6 or EGFR
HER2-positive	＋	any	any
Luminal-AR	－	＋	any
Basal-like	－	－	any

[PLAG1]

唾液腺導管癌 23 例(de novo 型: 9 例、多形腺腫由来型: 14 例)に対して、上皮系細胞(de novo 型癌腫領域: 9 サンプル、多形腺腫由来型癌腫領域: 14 サンプル、多形腺腫由来型非癌領域: 9 サンプル)、非上皮系細胞(de novo 型: 9 サンプル、多形腺腫由来型: 14 サンプル)における PLAG1 発現を評価した(図 2)。核内染色を陽性所見とし、各細胞において陽性細胞数を計測し、10%以上を陽性と判定した。

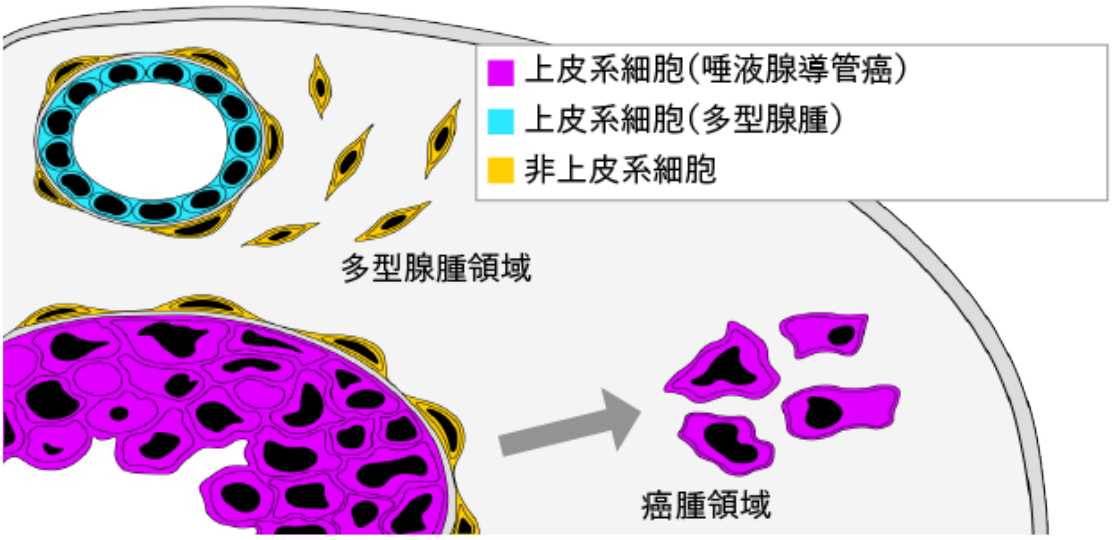


図 2. 多形腺腫由来型唾液腺導管癌のシェーマ
唾液腺導管癌 23 例に対して、上皮系細胞(癌腫領域・多形腺腫由来型非癌領域)および非上皮系細胞の核内における PLAG1 発現を評価した。

< 4 > quantitative realtime-PCR array®

対象症例 23 例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックに対してミクロトームを用いて厚さ 10 μm に薄切し切片作製した。そしてマイクロダイセクション法にて腫瘍部位を回収した。まず、RNeasy FFPE Kit®を用いてトータル RNA 精製を行った。RNA 精製後、吸光度比による RNA クオリティーチェックを行い、23 例中 4 例を除外した。残る対象症例 19 例に対して、RT² SYBR® Green ROX qPCR MasterMix を用いて cDNA 合成した。次に、RT²Profiler™ PCR Array Human Breast Cancer キットを用いて quantitative-realtime-PCR を施行、インターカレーション法(SYBR green)にて検出を行った。cDNA 逆転写反応および PCR 生成物の検出、解析に関しては StepOnePlus™ realtime PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用した。

各遺伝子の転写レベルに関しては *GAPDH*(Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)で標準化を行い、相対的 mRNA 発現量に関しては ΔΔCt 法に基づき計算を行った。一連の手順に関しては添付プロトコールを遵守した。全 19 症例分のうち半数以上に欠損値のみられた 6 遺伝子(*ADAM23*(ADAM metallopeptidase domain 23), *BIRC5*(Baculoviral IAP repeat containing 5), *BRCA2*(Breast cancer 2, early onset), *CCNA1*(Cyclin A1), *RARB*(Retinoic acid receptor, beta), *TWIST1*(Twist homolog 1))を除外し、19 症例 78 遺伝子を解析対象とした。

PCR Array キットに登録され、かつ解析可能であった 14 のサブタイピングマーカー遺伝子(HER2-positive 群:*ERBB2(HER2)*, *GRB7*(Growth factor receptor-bound protein 7)、Luminal-AR 群:*AR*, *ESR1*(Estrogen receptor 1), *FOXA1*(Forkhead box A1), *GATA3*(GATA binding protein 3), *KRT8*(Keratin 8), *KRT18*(Keratin 18), *SLC39A6*(Solute carrier family 39, member 6), *TFF3*(Trefoil factor 3), *XBP1*(X-box binding protein 1)、Basal-like 群:*EGFR*, *KRT5*(Keratin 5), *NOTCH1*)に関して、Di Palma 分類間における遺伝子発現の比較を行った。

< 5 > ヒートマップ作成とクラスター解析

クラスター解析において、距離測定方法としてユークリッド距離、群平均法を用いた。ヒートマップ作図およびクラスター解析に関しては、R パッケージ "d3heatmap" を用いた。

< 6 > ランダムフォレスト法*

Di Palma 分類間および発症様式分類(多形腺腫由来型/de novo 型)間における特徴遺伝子マーカーの検出を目的にランダムフォレスト法を用いた。本研究においては、決定木作成にあたって、はじめに全 19 サンプル中 19 サンプル(重複を含む)を抽出した(非抽出群は Out-Of-Bag 群として後の分類器精度の評価に用いられる)。各決定木ごとに 78 遺伝子の中から 8 遺伝子を無作為抽出し、分類器として最適化された決定木を 1000 本作成した。作成された 1000 本の決定木を用いて、ある入力が行われた時に各決定木より得られた出力の統合を行い予測分類結果を出力する、分類器(forest)を作成する。その際に、各遺伝子の正確な分類への寄与度を重要度 MeanDecreaseGini という概念を用いて評価した。ランダムフォレスト解析に関しては、R パッケージ "randomForest" および "inTrees" を用いた。

＊ ランダムフォレストは、Leo Breiman によって提案された機械学習のアルゴリズムであり、分類、回帰、クラスタリングに用いられる [35]。決定木(decision tree)を弱識別器(weak classifier)とする集団学習アルゴリズムであり、この名称は、ランダムサンプリングされたトレーニングデータによって学習した多数の決定木を使用することによる。ランダムフォレストは、複数の木(tree)を用いて森(forest)を構成して識別を行う機械学習アルゴリズムである。ここでいう木は決定木のことであり、個々の決定木は必ずしも高い識別性能を持つわけではないが、それらを複数用いてそれぞれの結果を補うことによって高い予測性能を得ることが一つの特徴である。これは機械学習の分野ではアンサンブル学習(ensemble learning)と呼ばれており、個々の決定木がアンサンブル学習における弱識別器に相当している。ランダムフォレストの特色として、膨大な説明変

数を扱えること、データや変数の前提条件の制約を受けにくいこと、他の説明変数の影響（交絡）の除外が可能であること、分類に寄与した説明変数の重要度の推定、などがあげられる。

E) 実験結果

1. PLAG1 免疫染色による de novo 型と多形腺腫由来型の生物学的再分類（図 3、表 6）

唾液腺導管癌 23 例（de novo 型： 9 例、多形腺腫由来型： 14 例）に対して、上皮系細胞（de novo 型癌腫領域： 9 サンプル、多形腺腫由来型癌腫領域： 14 サンプル、多形腺腫由来型非癌領域： 9 サンプル）、非上皮系細胞（de novo 型： 9 サンプル、多形腺腫由来型： 14 サンプル）における PLAG1 発現を評価した。その結果、de novo 型において上皮系細胞と非上皮系細胞ともに PLAG1 陽性を示す症例は 1 例も存在しなかった。一方で、多形腺腫由来型では、上皮系細胞に PLAG1 発現は見られなかったが、非上皮系細胞においては全例で PLAG1 陽性細胞を認めた。

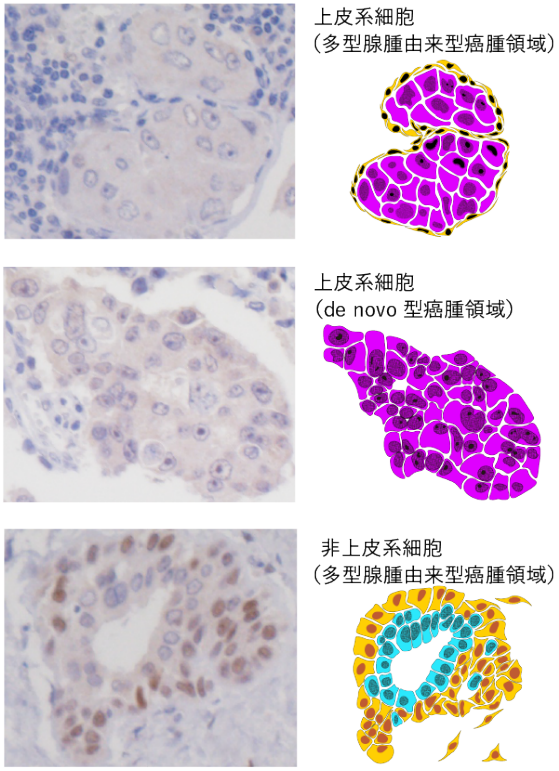


図 3. PLAG1 免疫染色（×200）

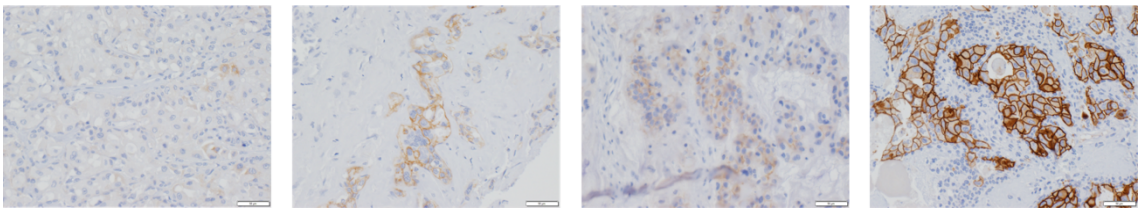
多形腺腫由来型の非上皮系細胞において PLAG1 陽性所見を認めた。一方、上皮系細胞においては、多形腺腫由来型/de novo 型の別を問わず、PLAG1 陽性所見を認めなかった。

表 6. **PLAG1 免疫染色結果**

	癌腫領域 (de novo 型)	癌腫領域 (多型腺腫由来型)	多型腺腫領域 (多型腺腫由来型)
上皮系細胞	0/9 (0%)	0/14 (0%)	0/9 (0%)
非上皮系細胞	0/9 (0%)	14/14 (100%)	

2. 免疫染色、Dual in Situ Hybridization、スコアリング

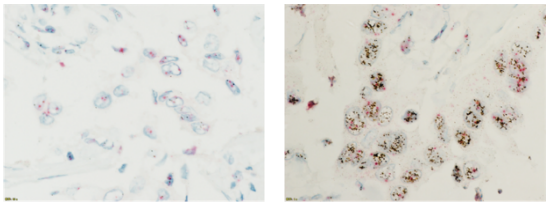
HER2 に関しては、IHC にて 3+: 10 例(43.5%)、2+: 5 例(21.7%)、1+: 1 例(4.3%)、0: 7 例(30.4%)であった。DISH においては、22 例中 9 例で陽性と判定され、陽性症例はすべて IHC で 3+であった(1 例に関しては、検体サンプル中に CEN17 signal を認めず評価対象より除外した)。上述の HER2 スコアリング基準に準じて、IHC 3+の 10 例(43.5%)を HER2 陽性と判定した(図 4、 5、 表 7)。



HER2 : 0　　HER2 : 1+　　HER2 : 2+　　HER2 : 3+

図 4. HER2 免疫染色所見(×200)

上述の HER2 スコアリング基準(表 2)に準じて、IHC 0, 1+を HER2 陰性、IHC 3+を HER2 陽性と判定した。IHC 2+に関しては、HER2-DISH による評価を追加した。



HER2-DISH : (−)　HER2-DISH : (+)

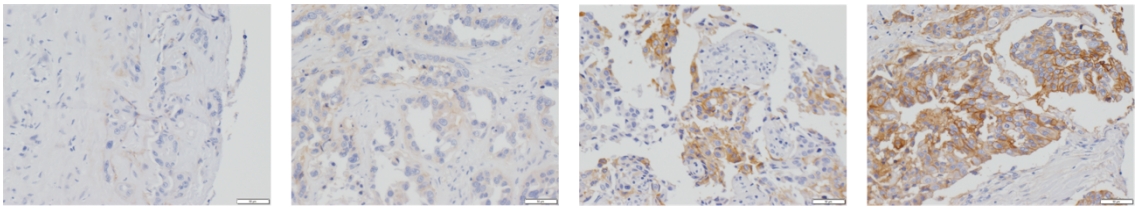
図 5. HER2-DISH 所見(×600)

HER2-スコアリング基準(表 3)に準じて、HER2-DISH による追加評価を行い、IHC 2+および HER2-DISH(+)を陽性と判定した。

表 7. HER2-免疫染色-DISH 対応表

	HER2-IHC			
HER2-DISH	3+	2+	1+	0
陽性	9	0	0	0
陰性	1	5	1	6

EGFR は、3+: 2 例(8.7%)、2+: 9 例(39.1%)、1+: 6 例(26.1%)、0: 6 例(26.1%)であった。EGFR 陽性例は 17 例(73.9%)であった(図 6)。

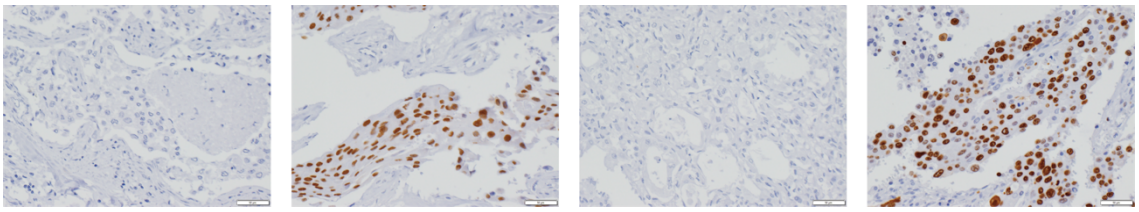


EGFR : 0　EGFR : 1+　EGFR : 2+　EGFR : 3+

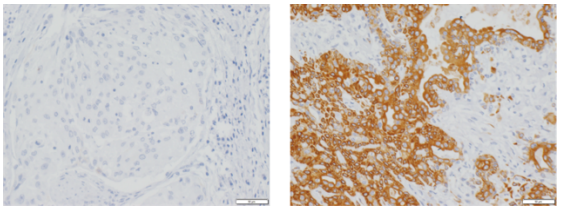
図 6. EGFR 免疫染色所見(×200)

EGFR スコアリング基準(表 2)を用いて EGFR 評価を行い、IHC 1+以上を EGFR 陽性と判定した。

AR 陽性細胞の割合は二峰性分布を呈し、中央値は 80%(1st-quantile: 20.0, 3rd-quantile: 85.0, IQR: 65.0)であった。17 例(73.9%)が AR 陽性であった。Ki-67 陽性細胞の割合は正規様分布を呈した。Ki-67 陽性細胞割合の平均±標準偏差は 38.7±22.0%であった。CK5/6 は CK5/6 陽性例は 6 例(26.1%)であった(図 7)。



AR : (−)　　AR : (+)　　Ki-67 : 0%　　Ki-67 : 80%



CK5/6 : (−)　　CK5/6 : (+)

図 7. AR、 Ki-67、 CK5/6 の免疫染色所見(×200)

AR、Ki-67 は核内染色所見を認め、CK5/6 は細胞質に染色所見を認めた。

3. quantitative realtime-PCR array®

遺伝子発現解析を 19 症例に施行した。クラスター解析では、多形腺腫由来型/de novo 型に関して、クラスター間での有意な分布の偏りを認めた(Fisher's exact test: p-value = 0.046)(図 8)。唾液腺導管癌全体では、*VEGFA*(Vascular endothelial growth factor A) , *CDKN1A*(Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), *CTSD*(Cathepsin D), *AKT1*(V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1), *MMP2*(Matrix metallopeptidase 2)などで高発現を認め、*APC*(Adenomatous polyposis coli), *SLIT2*(Slit homolog 2), *CDH13*(Cadherin 13, H-cadherin), *FOXA1*, *ID1*(Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein)などは低発現であった(図 9)。

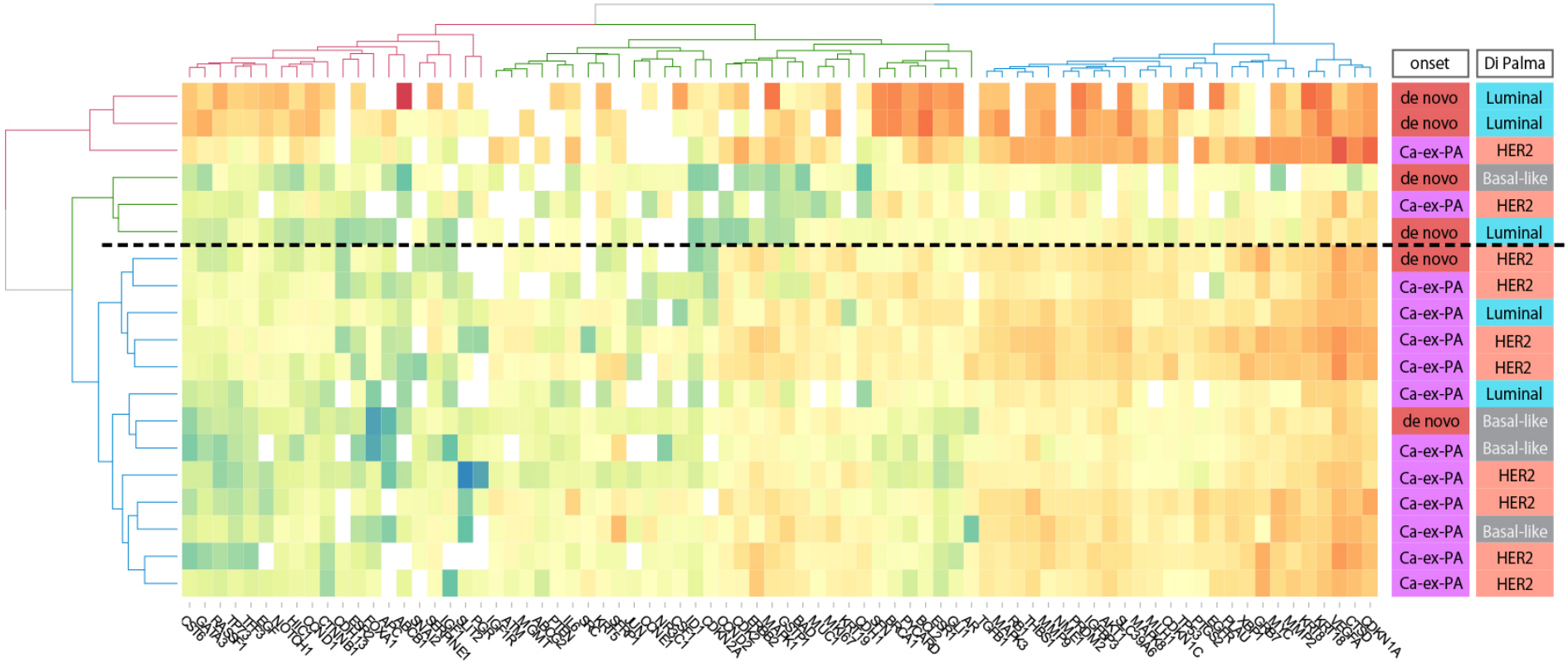


図 8. 遺伝子発現ヒートマップとクラスタリング

“緑”・“黄”・“赤”・“白”はそれぞれ、低発現・中等度発現・高発現・欠損値を表す。サンプルに関するクラスター解析では、“緑”枝−非“緑”枝間において、“緑”枝に有意に多形腺腫由来型が多い結果であった。（Fisher’s exact test: p-value = 0.046）

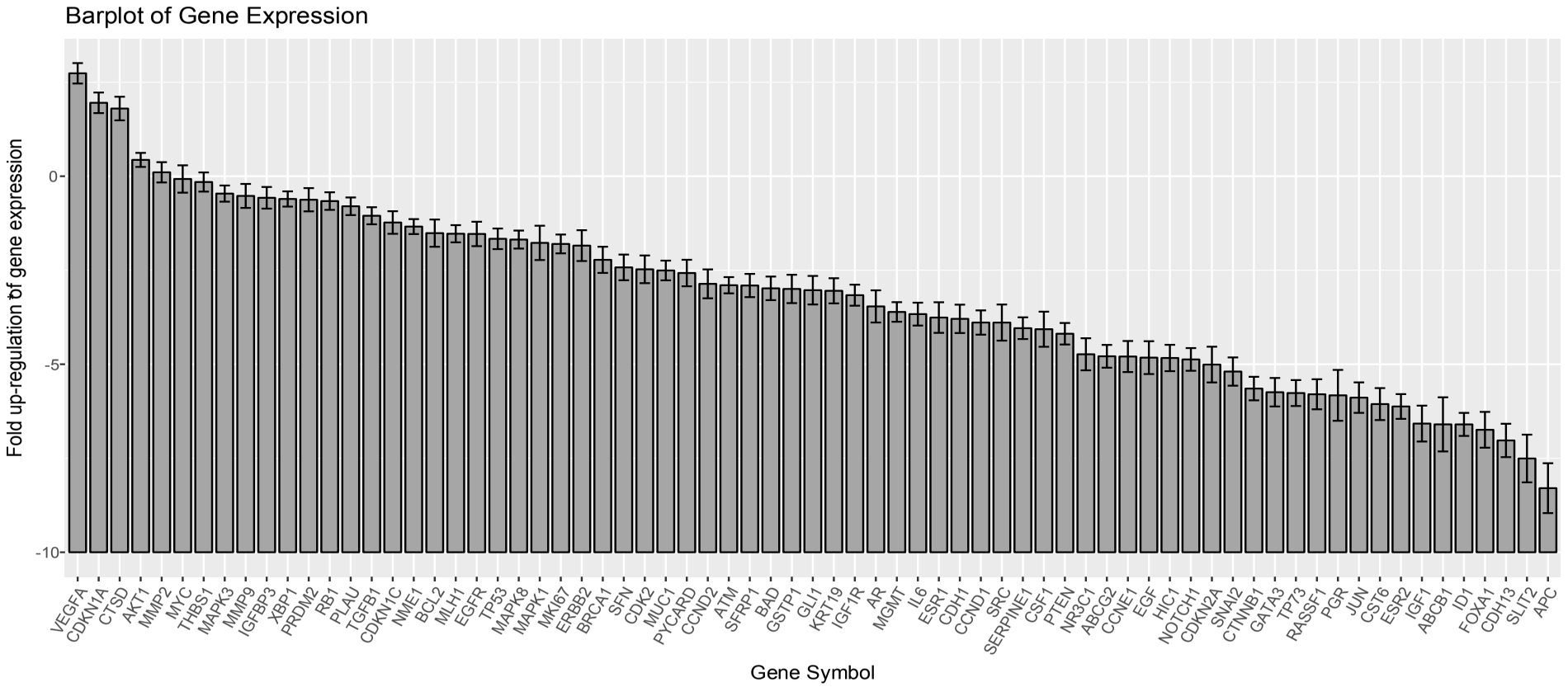


図 9. 唾液腺導管癌における遺伝子発現

全唾液腺導管癌症例における各遺伝子の発現を示す。エラーバーは、±2×SEM（標準誤差）を表す。

唾液腺導管癌全体では、*VEGFA, CDKN1A, CTSD, AKT1, MMP2*などで高発現を認め、*APC, SLIT2, CDH13, FOXA1, ID1*などは低発現であった。

4. 免疫染色に基づいた唾液腺導管癌の新分類とその妥当性の検討

Di Palma らの分類に準じて、唾液腺導管癌 23 症例の分類を行ったところ、HER2-positive 群: 10 例(43.5%)、Luminal-AR 群: 7 例(30.4%)、Basal-like 群: 6 例(26.1%)であった(表 8)。続いて、各群における発症様式(多形腺腫由来型/de novo 型)の傾向を検討した。その結果、多形腺腫由来型においては非 HER2-positive 群に比して HER2-positive 群が有意に多く見られ(Fisher's exact test: p-value = 0.029)、多形腺腫由来型/de novo 型間における発症機序に関して HER2 および HER2 関連遺伝子の関与の可能性が示唆された。

表 8. 当科症例における Di Palma 分類と発症様式間の内訳

	多形腺腫由来型	de novo 型
HER2-positive	9	1
Luminal-AR	3	4
Basal-like	2	4

次に、免疫染色(HER2, AR, EGFR, CK5/6)を用いた Di Palma 分類間で対応する遺伝子の発現を比較することで、免疫染色マーカーが遺伝子発現プロファイルを適切に反映させているかについて検討を行った(表 9)。その結果、サブタイピングマーカー遺伝子計 14 遺伝子のうち、9 つの遺伝子 *AR, ERBB2, ESR1, GATA3, GLI1, GRB7, KRT8, KRT19*(Keratin 19), *SLC39A8, TFF3, VEGFA, XBP1* で Di Palma 分類間(HER2-positive 群, Luminal-AR 群, Basal-like 群)における遺伝子発現の有意差を認めた。このことは、唾液腺導管癌に関して、免疫染色を用いた Di Palma 分類が遺伝子発現プロファイルを適切に反映している可能性が示唆される。

さらに、我々は、ランダムフォレスト法を用いて、Di Palma 分類に寄与した説明変数の重要度の推定を通して、遺伝子発現レベルにおける Di Palma 分類の免疫染色マーカーに対応する遺伝子(*ERBB2, AR* 等)の分類マーカーとしての妥当性について検討した。その結果、変数重要度の上位2遺伝子は *HER2, AR* であった(Out-Of-Bag error rate: 0.368%付近に収束)(図 10)。ランダムフォレストは決定木を用いた分類モデルであることを考えると、上記結果は Di Palma 分類アルゴリズムと合致するものであり、Di Palma 分類が遺伝子発現プロファイルを適切に反映することを強く支持する結果と考えられた(図 11)。

表 9. Di Palma 分類間における遺伝子発現の比較検定

Classification Marker	Statistical test method	p-value in subtypes	post-hoc test method	p-value in H vs B	p-value in L vs B	p-value in L vs H	significant status of gene expression
HER2-positive							
ERBB2	Oneway-ANOVA	**< 0.001**	TukeyHSD	**0.003**	0.822	**0.002**	HER2-positive > Basal-like, HER2-positive > Luminal-AR
GRB7	Oneway-ANOVA	**0.011**	TukeyHSD	**0.049**	0.961	**0.027**	HER2-positive > Basal-like, HER2-positive > Luminal-AR
Luminal-AR							
AR	Oneway-ANOVA	**0.022**	TukeyHSD	**0.018**	0.152	0.789	HER2-positive > Basal-like
ESR1	Oneway-ANOVA	**0.04**	TukeyHSD	0.568	**0.041**	0.107	Luminal-AR > Basal-like
FOXA1	Kruskal-Wallis	0.302					
GATA3	Oneway-ANOVA	**0.042**	TukeyHSD	0.422	**0.037**	0.154	Luminal-AR > Basal-like
KRT8	Oneway-ANOVA	0.087					
KRT18	Oneway-ANOVA	**0.013**	TukeyHSD	0.065	**0.01**	0.325	Luminal-AR > Basal-like
SLC39A6	Oneway-ANOVA	**0.019**	TukeyHSD	0.188	**0.015**	0.162	Luminal-AR > Basal-like
TFF3	Oneway-ANOVA	**0.036**	TukeyHSD	0.69	**0.043**	0.076	Luminal-AR > Basal-like
XBP1	Oneway-ANOVA	**0.023**	TukeyHSD	0.083	0.985	**0.04**	HER2-positive > Basal-like, HER2-positive > Luminal-AR
Basal-like							
EGFR	Kruskal-Wallis	0.433					
KRT5	Oneway-ANOVA	0.523					

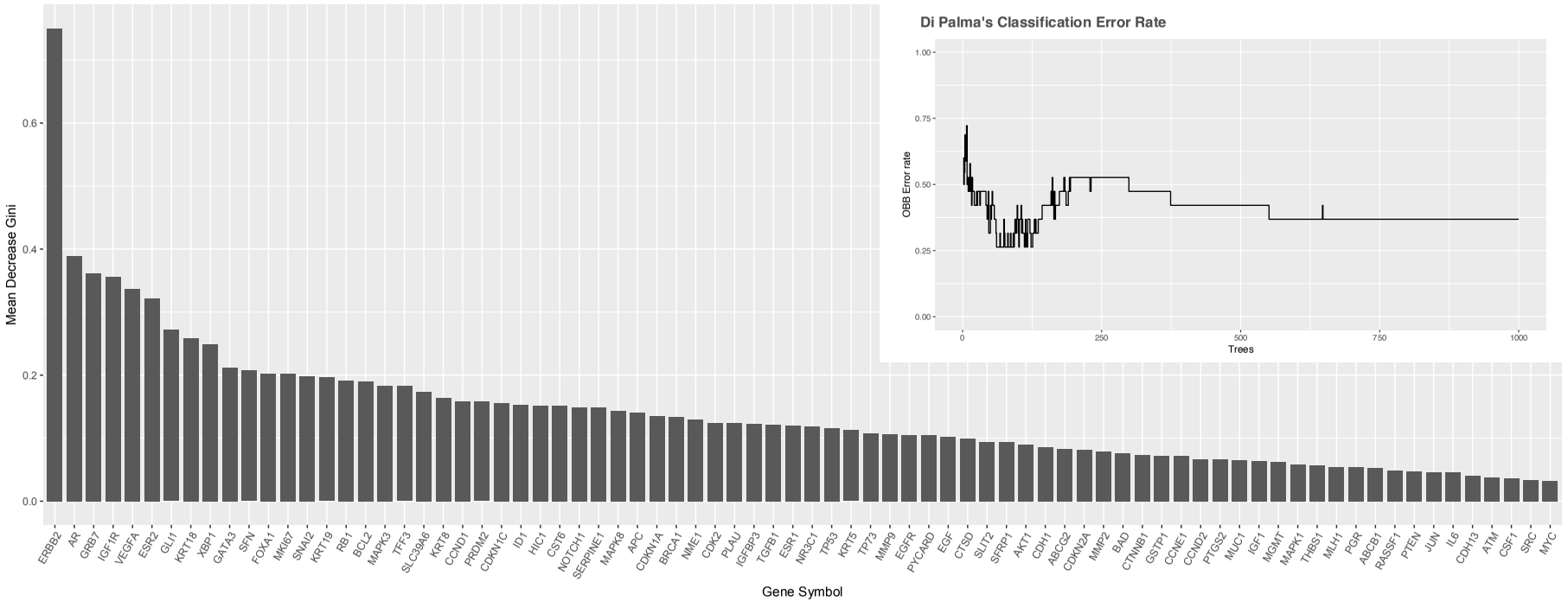


図 10. ランダムフォレスト法による変数重要度（Out-Of-Bag エラー率）

遺伝子発現レベルにおける Di Palma 分類の免疫染色マーカーに対応する遺伝子（*ERBB2, AR* 等）の分類マーカーとしての妥当性について検討した。その結果、変数重要度の上位2遺伝子は *HER2, AR* であった。（Out-Of-Bag error rate： 0.368%付近に収束）

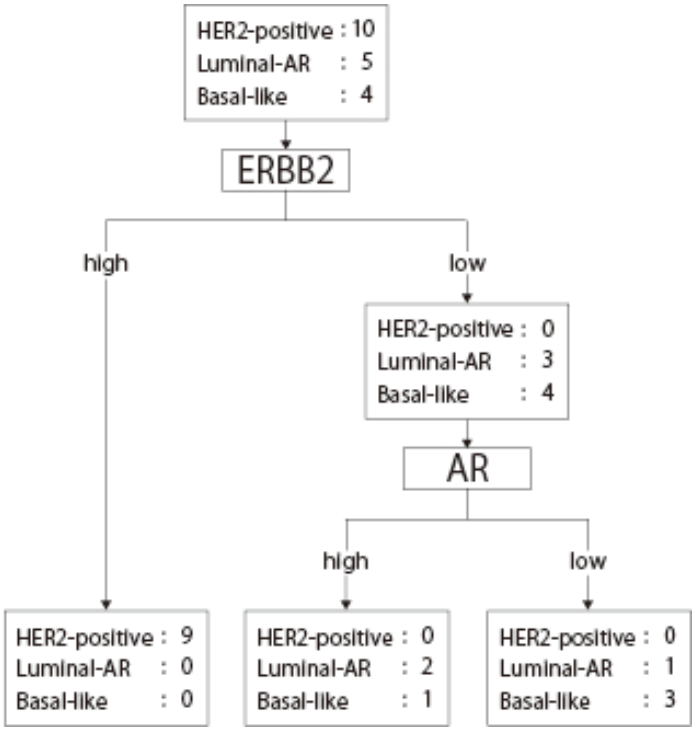


図 11. ランダムフォレストによる推定決定木

ランダムフォレスト法により抽出された、重要度上位 2 遺伝子(*HER2, AR*) を用いた推定決定木モデルによる分類が、Di Palma 分類と概ね合致することが示され、このことは Di Palma 分類が遺伝子発現プロファイルを適切に反映することを強く支持する結果と考えられる。

5. 唾液腺導管癌の発症様式(de novo 型/多形腺腫由来型)間の遺伝子発現プロファイルの相違に関する検討

クラスター解析(ヒートマップ)による分類においては、発症様式(de novo 型/多形腺腫由来型)間で遺伝子発現プロファイルの相違が示唆された(Fisher's exact test: p-value = 0.046)(図 8)。各遺伝子の de novo 型、多形腺腫由来型間比較検討では、*ERBB2, IGF1R* (Insulin-like growth factor 1 receptor), *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog), *RB1* (Retinoblastoma 1), *SLIT2, VEGFA, XBP1* で遺伝子発現の有意差を認めた。*ERBB2, IGF1R, RB1, VEGFA, XBP1* は、多形腺腫由来型優位に遺伝子発現を認め、*PTEN, SLIT2* は de novo 型優位の遺伝子発現であった(表 10)。有意差の見られた遺伝子は主に血管新生および AKT/PI3K(Phosphoinositide 3-kinase)シグナルに関与する遺伝子である(血管新生: *VEGFA, ERBB2, PTEN, SLIT2*、AKT/PI3K シグナル: *ERBB2, IGF1R, PTEN*)(図 12)。血管新生に関しては、*VEGFA, ERBB2* は促進的に関与し、*PTEN, SLIT2* は抑制的に作用することが知られている。また AKT/PI3K シグナルに関しては *ERBB2, IGF1R* は促進的に関与し、 *PTEN* は抑制的に作用することが知られている。このことより、多形腺腫由来型は de novo 型に比して AKT/PI3K シグナルおよび血管新生のパスウェイが活性化されている可能性が示唆される。さらには、ランダムフォレスト解析においても、MeanDecreaseGini 係数において *VEGFA* は相対的高値を示しており、発症様式(de novo 型/多形腺腫由来型)間相違において *VEGFA* が重要な役割を担っている可能性が示唆される(図 13)。

表 10. 発症様式間(多形腺腫由来型 vs de novo 型)における遺伝子発現の比較検定

Onset Classification	Statistical test method	p-value in subtype	features of gene expression patterns
ERBB2	student's T	**0.030**	Ca-ex-PA > de novo
IGF1R	student's T	**0.043**	Ca-ex-PA > de novo
PTEN	student's T	**0.044**	de novo > Ca-ex-PA
RB1	student's T	**0.026**	Ca-ex-PA > de novo
SLIT2	student's T	**0.046**	de novo > Ca-ex-PA
VEGFA	student's T	**0.034**	Ca-ex-PA > de novo
XBP1	student's T	**0.037**	Ca-ex-PA > de novo

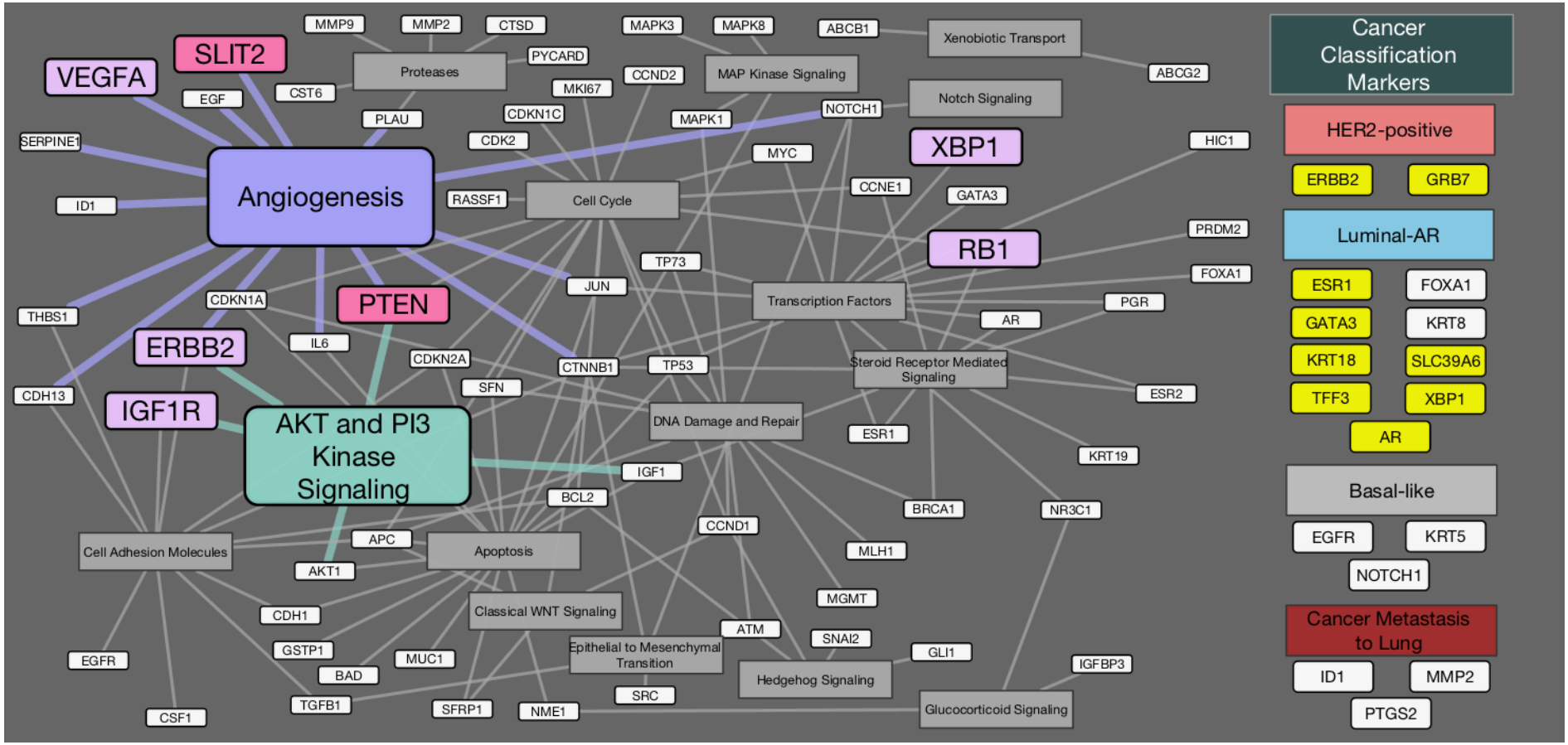


図 12. PCR array にて評価した遺伝子一覧とその機能との関係図

図の右側の“Cancer Classification Markers”において、 Di Palma 分類および遠隔転移因子に対応する遺伝子を示している。黄色で塗り潰された遺伝子は、Di Palma 分類間での遺伝子発現差が有意差であることを示す。図の左側においては、遺伝子とその機能の関係を図示している。紫色で塗り潰された遺伝子はその遺伝子が多形腺腫由来型で有意に高発現を認めることを示し、淡紅色で塗り潰された遺伝子は、その遺伝子が de novo 型で有意に高発現を認めることを示す。発症様式間（多形腺腫由来型/de novo 型）での有意差の認めた遺伝子は、“AKT/PI3K シグナルパスウェイ”と“血管新生”のグループに集中していた。（Fisher’s test: p-value = 0.025 and 0.004, respectively）

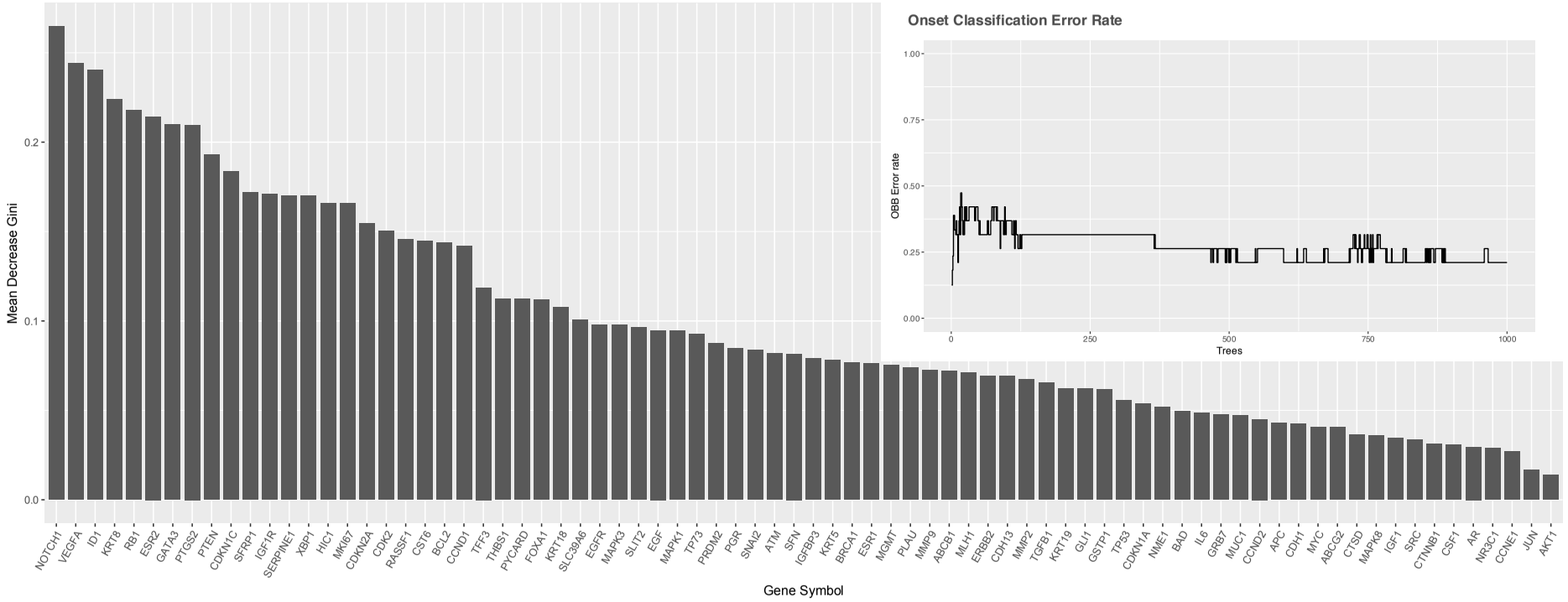


図 13. ランダムフォレスト法による変数重要度（Out-Of-Bag エラー率）

MeanDecreaseGini 係数において *VEGFA* は高値を示す結果が得られた（Out-Of-Bag error rate：0.210%付近に収束）。

6. 結果のまとめ

1) PLAG1 免疫染色による de novo 型と多形腺腫由来型の生物学的再分類

全例において多型腺腫由来型非上皮系細胞に PLAG1 陽性所見を認めた。上皮系細胞には PLAG1 陽性所見は認める症例は見られなかった（表 6）。

2) 免疫染色・Dual in Situ Hybridization に基づいた唾液腺導管癌の新分類

Di Palma 分類に準じて唾液腺導管癌 23 症例を分類したところ、HER2-positive 群：10 例（多型腺腫由来型：9 例、de novo 型：1 例）、Luminal-AR 群：7 例（多型腺腫由来型：3 例、de novo 型：4 例）、Basal-like 群：6 例（多型腺腫由来型：2 例、de novo 型：4 例）であった。多形腺腫由来型においては非 HER2-positive 群に比して HER2-positive 群が有意に多く認められた（Fisher's exact test: p-value = 0.029、表 8）。

3) 唾液腺導管癌における遺伝子発現

唾液腺導管癌全体では、*VEGFA*, *CDKN1A*, *CTSD*, *AKT1*, *MMP2* などで高発現を認め、*APC*, *SLIT2*, *CDH13*, *FOXA1*, *ID1* などは低発現であった（図 8）。

4) Di Palma 分類（HER2−positive 群・Luminal−AR 群・Basal−like 群）と遺伝子発現プロファイルとの関係

サブタイピングマーカー遺伝子計 14 遺伝子のうち、9 つの遺伝子（*AR*, *ERBB2*, *ESR1*, *GATA3*, *GLI1*, *GRB7*, *KRT8*, *KRT18*, *SLC39A8*, *TFF3*, *VEGFA*, *XBP1*）で Di Palma 分類間における遺伝子発現の有意差を認め、Di Palma 分類が遺伝子発現プロファイルを適切に反映することを支持する結果であった（表 9）。

5) 唾液腺導管癌の発症様式（de novo 型/多形腺腫由来型）間の遺伝子発現プロファイルの相違に関する検討

ERBB2, *IGF1R*, *PTEN*, *RB1*, *SLIT2*, *VEGFA*, *XBP1* において、de novo 型および多形腺腫由来型間で遺伝子発現の有意差を認めた（表 10）。*ERBB2*, *IGF1R*, *RB1*, *VEGFA*, *XBP1* においては多形腺腫由来型優位の遺伝子発現を認め、*PTEN*, *SLIT2* においては de novo 型優位の遺伝子発現を認めた。

F) 考察

1. 多形腺腫由来型および de novo 型の分類に関する PLAG1 を用いた生物学的再定義と鑑別

唾液腺導管癌は、その発生母地により、正常唾液腺組織より発生する de novo 型と既存の多形腺腫組織内より発生する多形腺腫由来型の2パターンに分類される [2]。現行の臨床病理診断学的分類においては、多形腺腫由来型は、臨床病理診断学的に、(a) 癌種と多形腺腫が混在する、もしくは、(b) 以前に多形腺腫を切除した部位に癌種が再発する、のいずれかの要件を満たすこと、と定義されている [36](図 14)。

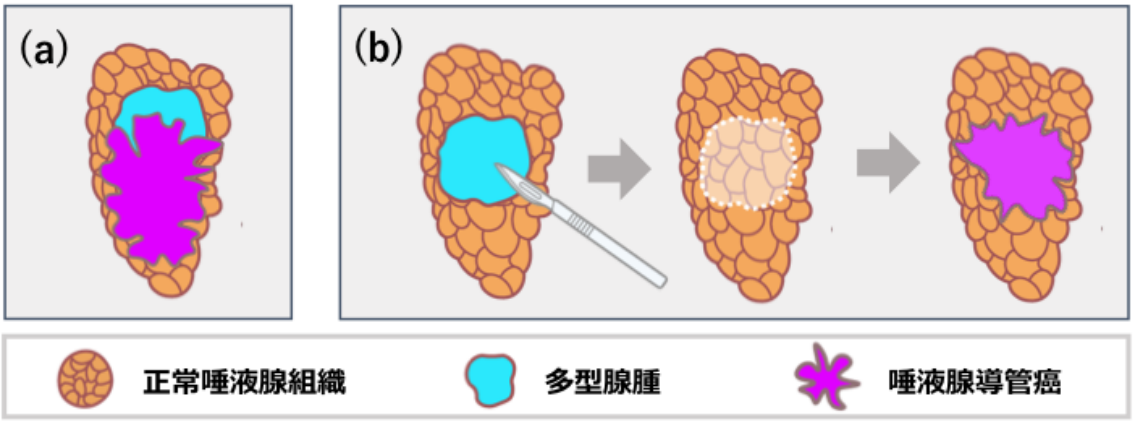


図 14. 多形腺腫由来癌の現行の定義
(a) 癌種と多形腺腫が混在する、(b) 以前に多形腺腫を切除した部位に癌種が再発する

ただし、現行の診断基準では、多形腺腫由来型と de novo 型を“生物学的”に鑑別することは必ずしも容易ではない。例えば、先行病変の多形腺腫領域(良性)が、多形腺腫より発生した唾液腺導管癌(悪性)の浸潤によって完全に置換された場合には、病理組織学的に多形腺腫の存在を証明できないため、多形腺腫由来型を de novo 型と誤診する可能性がある(図 15-i)。一方で、正常唾液腺組織より発生した de novo 型唾液腺導管癌が、偶然にその近傍に存在する多形腺腫に直接浸潤をきたした場合には、de novo 型を多形腺腫由来型と誤診する可能性がある(図 15-ii)。

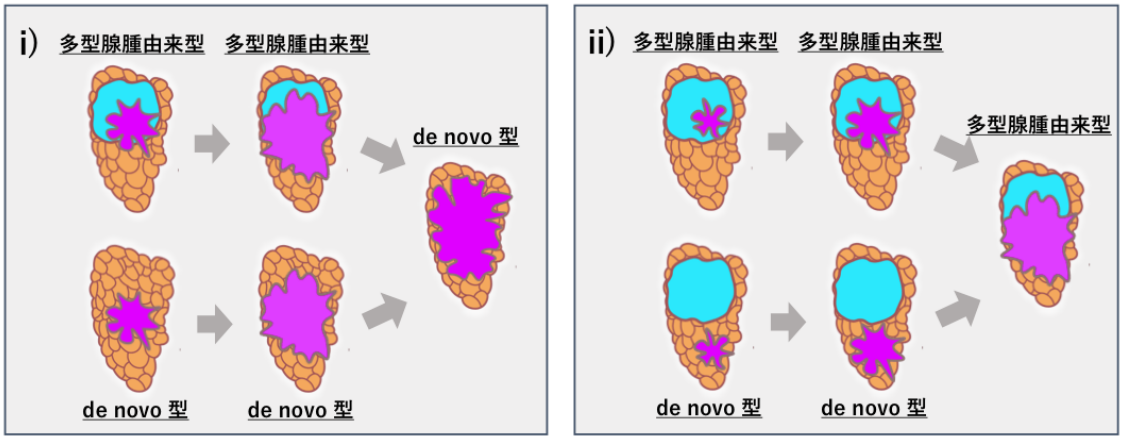


図 15. 現行の診断基準による“生物学的”な発生様式の誤診の可能性

i） 先行病変の多形腺腫領域（良性）が、多形腺腫より発生した唾液腺導管癌（悪性）の浸潤によって完全に置換された場合には、病理組織学的に多形腺腫の存在を証明できないため、多形腺腫由来型を de novo 型と誤診する可能性がある。 ii） 正常唾液腺組織より発生した de novo 型唾液腺導管癌が、偶然にその近傍に存在する多形腺腫に直接浸潤をきたした場合には、de novo 型を多形腺腫由来型と誤診する可能性がある。

近年、多形腺腫に特異的な融合遺伝子として *PLAG1* が発見された[26]。*PLAG1* 融合遺伝子より過剰産生される PLAG1 タンパク質は DNA 結合型転写因子として機能し腫瘍発生をもたらすと考えられている。さらに *PLAG1* 融合遺伝子は多形腺腫のみならず多形腺腫由来癌においても同様に認められることが報告されている[37]。Bahrami らは多形腺腫由来癌 22 症例に対して検討を行い、多形腺腫由来型唾液腺導管癌 4 例中 2 例に PLAG1 陽性細胞を認めたと報告し[38]、de Brito らは、多形腺腫由来癌 40 例につき検討した結果、唾液腺導管癌 13 例中 2 例で PLAG1陽性所見を示したと報告している[39]。Katabi らは多形腺腫由来型唾液腺導管癌 9 例中 5 例に PLAG1 陽性細胞を認めた一方で、de novo 型唾液腺導管癌 3 例には PLAG1 陽性細胞を認めなかったと報告している[27]。これらの結果より、我々は多形腺腫由来型/de novo 型を腫瘍発生に基づいて生物学的に鑑別する際に、PLAG1 免疫染色が有用ではないかと考えた。

その結果、多形腺腫由来型/de novo 型双方の唾液腺導管癌上皮系細胞成分には PLAG1 陽性細胞を認めなかった。しかし、多形腺腫由来型の全 14 例において、非上皮系細胞成分に PLAG1 陽性細胞の存在を認めた一方で、de novo 型において、非上皮系細胞成分に PLAG1 陽性所見を示した症例は認めなかった。このことから、多形腺腫由来型/de novo 型間の分類に関しては、非癌細胞成分の PLAG1 陽性所見の有無により、腫瘍発生の観点に基づいた鑑別が可能であった。本検討においては de novo 型/多形腺腫由来型の分類に関して、既存の診断基準と PLAG1 を用いた生物学的診断基準との間に不一致はなかった。しかし、唾液腺導管癌上皮細胞成分に PLAG1 陽性細胞を認めなかったことから、PLAG1 の発現を用いて図 15-i、 ii で示した誤診を避けることは困難であると考えられた。

2. 多形腺腫由来型の発症機序に関する考察

AKT-PI3K-VEGFA シグナルパスウェイとフィードバックループ（図 16）

AKT/PI3K シグナルパスウェイは、種々の癌種において高頻度に活性化される細胞内シグナル伝達経路であり[40]、血管新生ならびに増殖、接着、移動、浸潤、代謝および生存を含む多数の細胞機能において重要な役割を果たすことが知られている[41]。また、VEGFA は種々の癌において AKT/PI3K/VEGFA 経路を介して自律的増殖を

引き起こすとされ、「自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループ」として報告されている[42-44]。本研究においても、唾液腺導管癌（de novo 型/多形腺腫由来型）双方で *VEGFA, AKT1* の高い遺伝子発現レベルが観察されており、このことは唾液腺導管癌においても「自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループ」の可能性を示唆している。さらに多形腺腫由来型においては、de novo 型に比して有意に *ERBB2* の高発現を認めることより、より一層「自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループ」が亢進している可能性がある。

PTEN は種々の癌において高頻度に DNA 変異が認められ、*p53* と並ぶがん抑制遺伝子の代表格に位置づけられ、PI3K/AKT シグナル伝達経路に対して負の調節を行う[45,46]。 また、血管新生に対しても抑制的に作用し、PTEN 欠損内皮細胞は血管新生および腫瘍形成の増加を示すと報告される[47]。本研究においては、PTEN 欠損は多形腺腫由来型に有意に観察された。このことは、多形腺腫由来型において血管新生が誘導されやすい環境が整えられていることを示唆する。

＊ VEGF ファミリーは血管新生を誘導する最も重要な因子と考えられている[48]。VEGF ファミリーは、VEGF A, B, C, D および血管内皮細胞増殖因子（placental growth factor: PIGF）で構成される。とりわけ VEGFA は、VEGF 受容体 2 型 (VEGFR2)を介して、血管内皮細胞に対して、血管透過性の増強、血管新生の誘発、脈管形成および内皮細胞増殖の誘導、細胞遊走の促進およびアポトーシスの阻害等、血管新生において主要な役割を担うとされている。また、VEGF はこれまでに数多くの癌腫において高発現が報告されており[49]、非小細胞肺癌や腎細胞癌では、VEGF 高発現が再発、転移、生命予後と相関すると報告されている[50,51]。

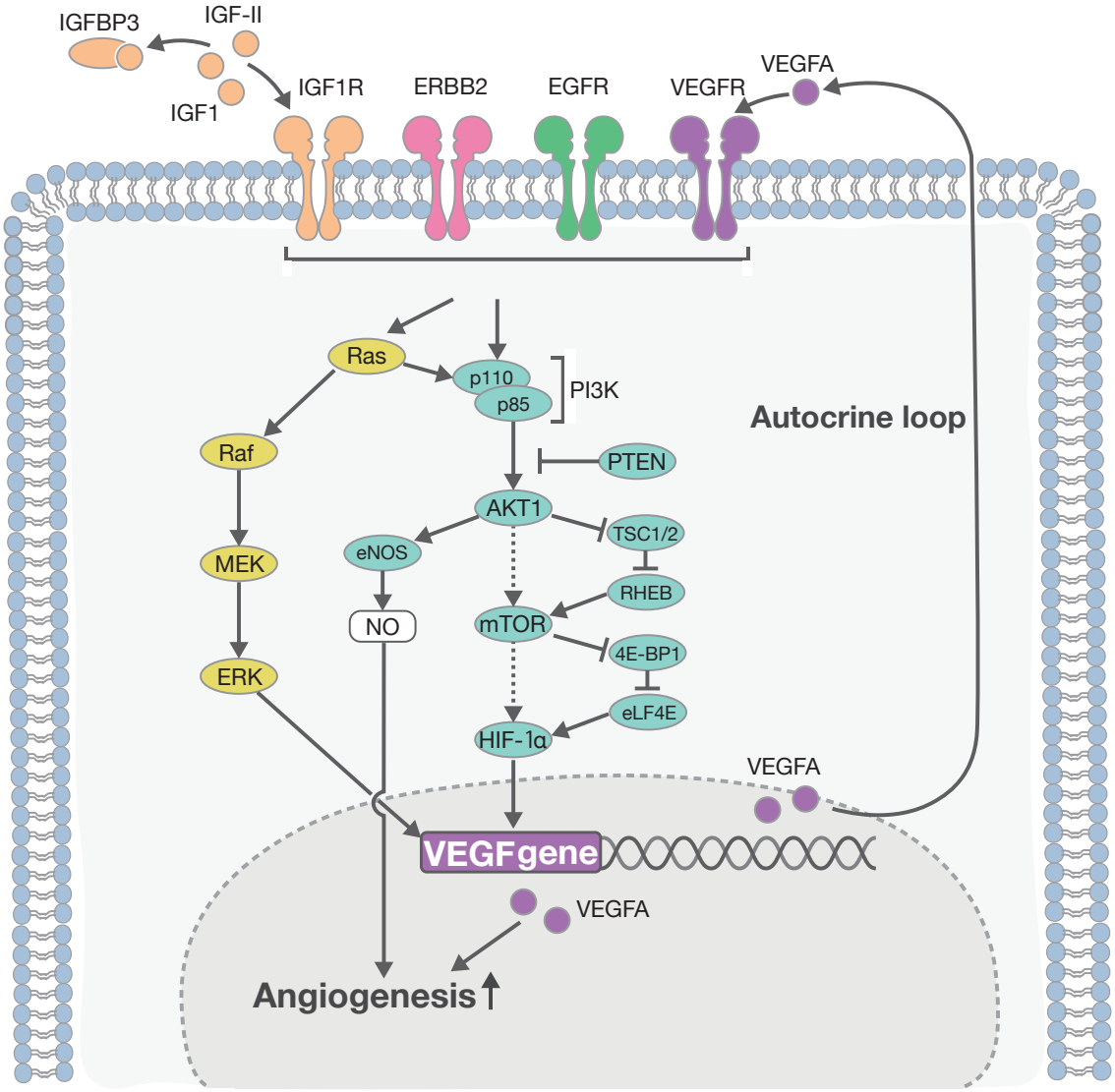


図 16. AKT/PI3K/VEGFA シグナルパスウェイと自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループの経路図

VEGFA は AKT/PI3K 経路を介して VEGFA 自身の誘導を促進し、「自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループ」を形成する。本研究においても、唾液腺導管癌（de novo 型/多形腺腫由来型）双方で *VEGFA, AKT1* の高い遺伝子発現レベルが観察され、特に多形腺腫由来型は、de novo 型に比して有意に *ERBB2* の高発現を認め、「自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループ」の亢進が示唆される。

VEGFA を中心とした血管新生の機序（図 17）

前項に示した通り、VEGFA は血管新生において中心的な役割を担う。組織内血管は通常、静止状態にあり血管新生が起こることは稀である。しかし、血管内皮細胞は血管新生シグナルへの感知および応答能力を保持しており、特に癌組織においては亢進している [52]。近年の研究により新生血管の分岐に関する分子生物学的機序が徐々に明らかにされつつある [53-56]。

本検討では、唾液腺導管癌（de novo 型/多形腺腫由来型）において *VEGFA, MMP2, MMP9*（Matrix metallopeptidase 9）の高発現を認めた。通常の静止状態において、基底膜は血管内皮細胞と壁細胞の間に位置しており、血管内皮細胞が細胞外基質へ逸脱することを防止しているが、MMPs（MMP2, MMP9）は VEGFA とともに基底膜退行を促進し、血管内皮細胞の細胞外基質への侵入・血管新生を容易にすることが知られている[57]。

また、唾液腺導管癌（de novo 型/多形腺腫由来型）において VEGFA の高発現を認めた。血管新生に働く tip 細胞（細胞外基質へ侵入し新生血管を発達させる）と stalk 細胞（tip 細胞を支持する）は、ともに血管内皮細胞より誘導され、その選択的誘導に関しては、VEGF-VEGFR-delta like canonical Notch ligand 4 (Dll4)-NOTCH-VEGFR フィードバックループが促進的に関与していることが知られている。VEGFA 高発現は、血管内皮細胞（tip 細胞/stalk 細胞）に対し持続的な VEGFA 暴露を介して、VEGF-VEGFR-Dll4-NOTCH-VEGFR フィードバックループの異常亢進を引き起こす可能性が示唆される。

さらには、多形腺腫由来型においては de novo 型に比して有意な *SLIT2* 発現抑制を認めた。SLIT2 は tip 細胞/stalk 細胞の細胞膜上の ROBO4（Roundabout guidance receptor 4）受容体を介して、VEGFR2 および NOTCH1 に対して抑制的に作用し、VEGF-VEGFR-Dll4-NOTCH-VEGFR フィードバックループに対して“ブレーキ”の役割を果たすとされている[58,59]。このことは、多形腺腫由来型において SLIT2-ROBO4 機構による VEGF-VEGFR-Dll4-NOTCH-VEGFR フィードバックループへの負の制御が無効になっている可能性がある。実際に、癌組織において VEGFA-VEGFR 持続的亢進および SLIT2-ROBO4 機構により VEGF-VEGFR-Dll4-NOTCH-VEGFR フィードバックループの破綻の結果、血管新生の異常亢進が引き起こされ、さらに新たに生成された血管は脆弱性や不安定性を伴うことが知られている[52,60]。

以上より、唾液腺導管癌においては、MMPs の高発現など血管新生をサポートする環境が整えられており、かつ多形腺腫由来型においては有意に *SLIT2* 発現が抑制され、VEGF-VEGFR-Dll4-NOTCH-VEGFR フィードバックループの制御機構の無効化により、さらに血管新生が亢進されると考えられた。

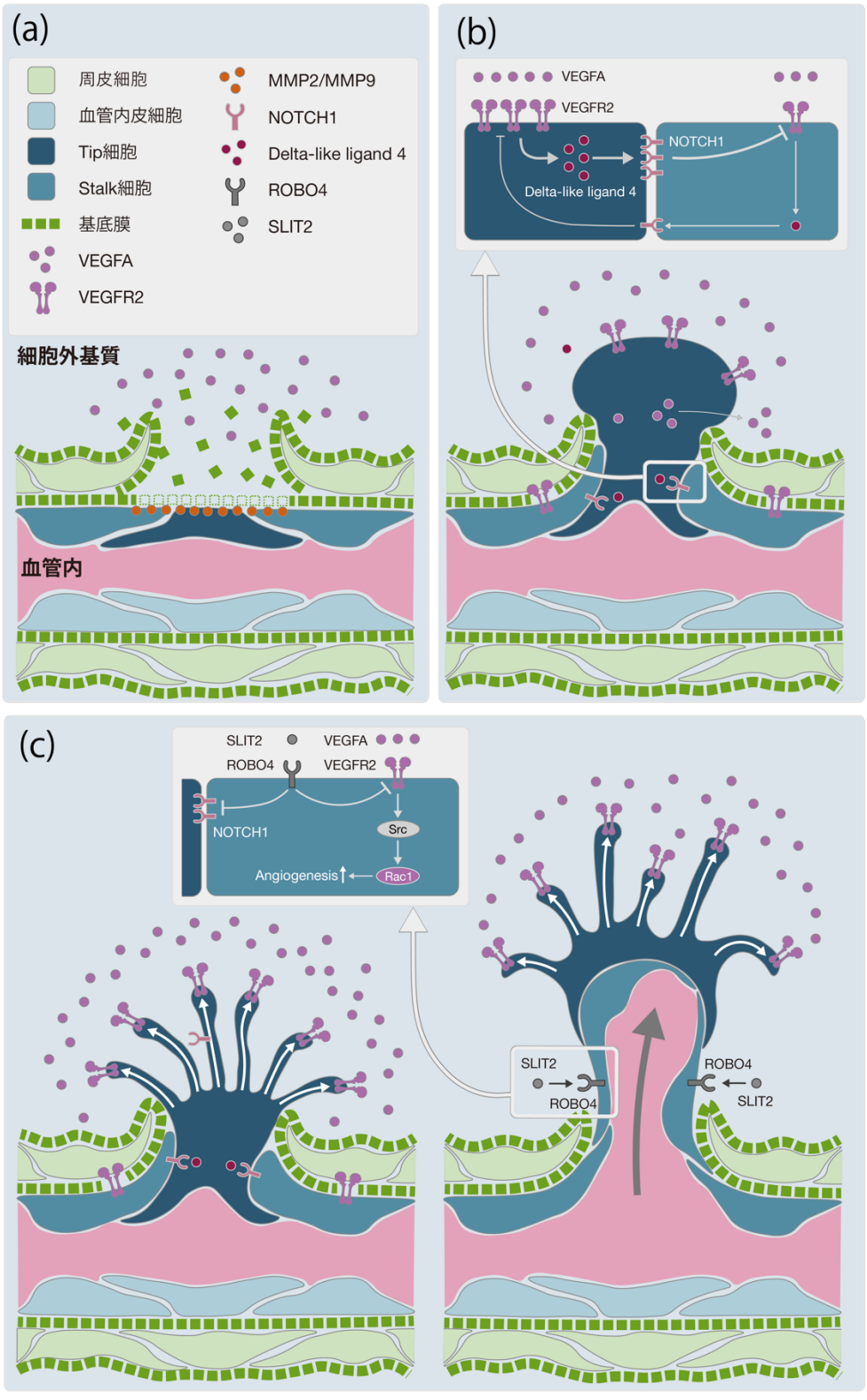


図 17. 血管新生に関する機序のシェーマ

(a) MMPs(MMP2, MMP9)による基底膜退行作用、(b) VEGF-VEGFR-Dll4-NOTCH-VEGFR フィードバックループ、(c) SLIT2-ROBO4 機構による VEGF-VEGFR-Dll4-NOTCH-VEGFR フィードバックループへの負の制御

腫瘍発生における PLAG1 の役割

我々は、本検討において、「多形腺腫由来型および de novo 型の分類に関する PLAG1 を用いた生物学的再定義と鑑別」の項で述べたように、腫瘍発生の観点より多形腺腫由来型および de novo 型の分類に関して生物学的な再定義を行うため、PLAG1 免疫染色を行った。その結果、当初の我々の想定に反して、腫瘍細胞自体に PLAG1 タンパク質の発現は認められなかった。その一方で、多形腺腫間質成分の細胞に PLAG1 タンパク質の発現が認める結果が得られた。

PLAG1 は、IGF-II (Insulin-like growth factor 2)の P3 プロモーター結合を介して、細胞増殖、増殖、遊走、分化および生存の調節に関与する IGF-II の発現を誘導することが明らかにされている [61-63]。また、PLAG1 が IGF-II 発現誘導を介して Ras-Raf-MAPK および PI3K-AKT シグナル伝達経路を活性化することにより腫瘍形成に影響を及ぼすとされている [62,64,65]。さらに、Voz らは 12000 個のヒト遺伝子を含むマイクロアレイを用いて、正常唾液腺および多形腺腫で発現された転写物をスクリーニングし、PLAG1 を過剰発現する HEK293 細胞の発現プロファイルを正常唾液腺および多形腺腫と比較し、PLAG1 により有意なレベルで *VEGFA* 遺伝子発現が誘導されることを明らかにしている [66]。

これらの知見は、腫瘍細胞自体ではなく、間質に存在する多形腺腫から放出される IGF-II および VEGFA といった因子が血管新生や悪性転化のトリガーとして作用する可能性があることを示唆している。すなわち、多形腺腫由来の PLAG1 タンパク質により誘導された IGF-II および VEGFA を介して、①自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループの亢進による(ERBB2)-AKT-PI3K-VEGFR シグナル経路の活性化、②MMPs との協調による血管基底膜退行作用、VEGF-VEGFR-Dll4-NOTCH-VEGFR フィードバックループ亢進(SLIT2-ROBO4 経路の抑制)による血管新生の促進等が腫瘍発生に関して重要な役割を果たす可能性を秘めていると考えられる。

3. 治療応用への展望

本研究にて、我々は、唾液腺導管癌多形腺腫由来型において、HER2 タンパク質および遺伝子の高発現および VEGFA 遺伝子高発現を認める結果を得た。そして、腫瘍の発生、増殖に関しては「自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループの亢進」、「AKT-PI3K シグナル経路の活性化」などのメカニズムが備わっている可能性につき言及した。

乳癌においても同様の機序が推定され、基礎研究レベルでの検証が行われている。ヒト乳癌細胞株 T47D において HER2 過剰発現は、VEGF 増幅と関連があり [67]、HER2 陽性乳癌症例において VEGF 過剰発現は予後不良因子となるとの報告がある [68]。さらに、HER2 陽性局所再発および転移乳癌に対してトラスツズマブとドセタキセルの併用に抗 VEGF 抗体であるベバシズマブを追加する有用性を検討した第 III 相試験（AVEREL 試験）にて無増悪生存期間（PFS）の有意に改善を認める報告があり [69]、抗 HER2 抗体、抗 VEGF 抗体併用療法に関しては実臨床への応用が期待される。また乳癌以外の癌腫に関しても、進行性悪性腫瘍遠隔転移症例 94 例（うち HER2 陽性唾液腺導管癌1例を含む）に対するトラスツズマブ・ラパチニブ・ベバシズマブ3剤併用療法第 I 相試験にて、癌種を問わず、その安全性・忍容性について確認されている [70]。そして、症例報告レベルではあるが、実際に HER2 陽性唾液腺導管癌多発肺転移症例に対するトラスツズマブ・ラパチニブ・ベバシズマブ3剤併用療法奏功例も報告されている [71]。

以上の知見、報告より、HER2 陽性唾液腺導管癌（特に多形腺腫由来型）に関しても、抗 HER2 抗体および抗 VEGF 抗体を併用したレジメンが有効である可能性は十分に考えられる。特に多形腺腫由来型に関しては、医療機関受診時には既に広汎な腫瘍浸潤を呈しており外科的制御が困難であることも少なくないため、新たな薬物治療の開発は患者に利益をもたらすと考えられる。唾液腺導管癌は希少疾患のため、症例数の確保の困難が予想されるが、今後唾液腺導管癌症例単独に対する抗 HER2 抗体、抗 VEGF 抗体等を含む複数治療薬を併用した臨床試験による検証が待たれるところである。

G) 総括および結論

1 得られた新知見

1. 免疫染色、PCR array による機能的網羅遺伝子発現解析により、乳癌と同様、唾液腺導管癌においても複数の entity（HER2-positive 群、Luminal-AR 群、Basal-like 群）に分類することができた。
2. 発症様式の違いにより免疫染色、遺伝子発現プロファイル間で相違している傾向（de novo 型：Luminal-AR 群・Basal-like 群、多形腺腫由来型：HER2-positive 群）があった。
3. 唾液腺導管癌、とくに多形腺腫由来型に関して以下の腫瘍発生メカニズムの関与が示唆された。

- 自己分泌 VEGFA シグナル伝達ループの亢進による（ERBB2/VEGFR)-AKT-PI3K-VEGFR シグナル経路の活性化
- MMPs との協調による血管基底膜退行作用、VEGF-VEGFR-Dll4-Notch-VEGFR フィードバックループ亢進（SLIT2-ROBO4 経路の抑制）による血管新生促進
- 多形腺腫で発現した PLAG1 が VEGFA 等を介して腫瘍発生、悪性転化のトリガーとなっている可能性

2 新知見の意義

今回の新知見は、唾液腺導管癌の発癌に関連するバイオマーカーの選定に関する重要な意義はもとより、他領域で既に汎用される分子標的治療の唾液腺導管癌（特に多形腺腫由来型）への応用に直結する可能性を秘めており、唾液腺導管癌に対する外科的治療（放射線治療）以外の、新たな治療オプションの提示を可能にすると考えられる。

3 今後の研究展開と課題

本研究により導かれた結果に基づいて、分子標的治療薬（抗HER2抗体、抗VEGF抗体等）の臨床応用への基礎的データの裏付けを得るべく、以下の研究展開を検討している。

1. 以下の項目についての免疫染色での VEGFA の検証

- 免疫染色による評価が *VEGFA* 遺伝子発現を適切に評価しうるか？（分子標的治療施行の際に全症例に対して遺伝子発現の評価に関しては、現時点においては、検査の煩雑さとコストの観点より非現実的と思われるため、免疫染色が遺伝子発現の代用マーカーとなりうるかを評価する）
- 他の免疫染色マーカーとの関連について比較検討
- 予後との関連に関する検討

2. トランスフェクションによる目的遺伝子（*ERBB2, VEGFR, PLAG1* など）の導入もしくはノックダウン細胞を用いた、ほかの遺伝子およびタンパク質発現変動の評価と解析

3. 標的遺伝子に対応する分子標的治療薬の投与による遺伝子発現およびタンパク質発現の変動の評価と解析

2.以降の基礎研究においては培養細胞が必要となるが、唾液腺導管癌の細胞株は、疾患の希少性のため市場には出回っておらず、一般に入手困難である。当科は唾液腺導管癌に対して豊富な症例を有し、かつヒト唾液腺細胞初代培養のノウハウも既に習得済であり、ヒト唾液腺導管癌細胞の初代培養確立を含め基礎実験の準備を引き続き進めていきたいと考えている。

H) 謝辞

このような機会を与えてくださった北海道大学大学院医学研究院感覚器病学分野耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室福田諭名誉教授および本間明宏教授、北海道大学病院病理部松野吉宏教授に厚くお礼を申し上げます。学ばせていただいたさまざまなことを、今後活かしていきたいと思います。

また、病理部スタッフの皆様ならびに他科大学院生には、実験に関するさまざまなことを丁寧にご指導いただき、心より感謝申し上げます。

さらに、耳鼻咽喉科頭頸部外科学教室の教室員、特に加納里志助教には多大なるサポートを頂きました。実験結果に関しての議論、国内外での発表の場を与えて頂いたことを感謝しております。

2018 年 3 月

鈴木　崇祥

I) 引用文献

1 Kleinsasser, O., Klein, H. J. & Hubner, G. [Salivary duct carcinoma. A group of salivary gland tumors analogous to mammary duct carcinoma]. *Archiv fur klinische und experimentelle Ohren- Nasen- und Kehlkopfheilkunde* **192**, 100-105 (1968).

2 El-Naggar, A. K., Chan, J. K. C., Grandis, J. R., Takata, T. & Slootweg, P. J. *WHO classification of head and neck tumours*. 4th edition. edn.

3 Gnepp, D. R. *Diagnostic surgical pathology of the head and neck*. 2nd edn, (Saunders/Elsevier,, Philadelphia, PA, 2009).

4 Barnes, L. *Surgical pathology of the head and neck*. 3rd edn, (Informa Healthcare, 2009).

5 Jaehne, M. *et al.* Clinical and immunohistologic typing of salivary duct carcinoma: a report of 50 cases. *Cancer* **103**, 2526-2533 (2005).

6 Jayaprakash, V. *et al.* Survival rates and prognostic factors for infiltrating salivary duct carcinoma: Analysis of 228 cases from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Head Neck* **36**, 694-701 (2014).

7 Lim, C. M., Hobson, C., Kim, S. & Johnson, J. T. Clinical outcome of patients with carcinoma ex pleomorphic adenoma of the parotid gland: a comparative study from a single tertiary center. *Head Neck* **37**, 543-547 (2015).

8 Glisson, B. *et al.* HER2 expression in salivary gland carcinomas: dependence on histological subtype. *Clin Cancer Res* **10**, 944-946 (2004).

9 Skalova, A. *et al.* Expression of HER-2/neu gene and protein in salivary duct carcinomas of parotid gland as revealed by fluorescence in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* **42**, 348-356 (2003).

10 Cornolti, G. *et al.* Amplification and overexpression of HER2/neu gene and HER2/neu protein in salivary duct carcinoma of the parotid gland. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* **133**, 1031-

1036 (2007).

11 Williams, M. D. *et al.* Genetic and expression analysis of HER-2 and EGFR genes in salivary duct carcinoma: empirical and therapeutic significance. *Clin Cancer Res* **16**, 2266-2274 (2010).

12 Johnson, C. J., Barry, M. B., Vasef, M. A. & Deyoung, B. R. Her-2/neu expression in salivary duct carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* **16**, 54-58 (2008).

13 Takase, S. *et al.* Biomarker immunoprofile in salivary duct carcinomas: clinicopathological and prognostic implications with evaluation of the revised classification. *Oncotarget* **8**, 59023-59035 (2017).

14 Nabili, V., Tan, J. W., Bhuta, S., Sercarz, J. A. & Head, C. S. Salivary duct carcinoma: a clinical and histologic review with implications for trastuzumab therapy. *Head Neck* **29**, 907-912 (2007).

15 Kaidar-Person, O., Billan, S. & Kuten, A. Targeted therapy with trastuzumab for advanced salivary ductal carcinoma: case report and literature review. *Medical oncology (Northwood, London, England)* **29**, 704-706 (2012).

16 Nashed, M. & Casasola, R. J. Biological therapy of salivary duct carcinoma. *J Laryngol Otol* **123**, 250-252 (2009).

17 Prat, A. *et al.* Successful treatment of pulmonary metastatic salivary ductal carcinoma with trastuzumab-based therapy. *Head Neck* **30**, 680-683 (2008).

18 Nardi, V. *et al.* Detection of novel actionable genetic changes in salivary duct carcinoma helps direct patient treatment. *Clin Cancer Res* **19**, 480-490 (2013).

19 Romond, E. H. *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **353**, 1673-1684 (2005).

20 Smith, I. *et al.* 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised

controlled trial. *Lancet (London, England)* **369**, 29-36 (2007).

21 Vogel, C. L. *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **20**, 719-726 (2002).

22 Di Palma, S. *et al.* Salivary duct carcinomas can be classified into luminal androgen receptor-positive, HER2 and basal-like phenotypes. *Histopathology* **61**, 629-643 (2012).

23 Spiro, R. H. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. *Head & neck surgery* **8**, 177-184 (1986).

24 Eveson, J. W. & Cawson, R. A. Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *The Journal of pathology* **146**, 51-58 (1985).

25 Waldron, C. A., el-Mofty, S. K. & Gnepp, D. R. Tumors of the intraoral minor salivary glands: a demographic and histologic study of 426 cases. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* **66**, 323-333 (1988).

26 Kas, K. *et al.* Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nat Genet* **15**, 170-174 (1997).

27 Katabi, N. *et al.* PLAG1 immunohistochemistry is a sensitive marker for pleomorphic adenoma: a comparative study with PLAG1 genetic abnormalities. *Histopathology* (2017).

28 Hickman, R. E., Cawson, R. A. & Duffy, S. W. The prognosis of specific types of salivary gland tumors. *Cancer* **54**, 1620-1624 (1984).

29 Griffith, C. C. *et al.* Salivary duct carcinoma and the concept of early carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Histopathology* **65**, 854-860 (2014).

30 Wolff, A. C. *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* **31**, 3997-4013 (2013).

31 Takehana, T. *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor in gastric carcinomas. *Clinical gastroenterology and hepatology : the*

official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association **1**, 438-445 (2003).

32 Ooi, A. *et al.* Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* **17**, 895-904 (2004).

33 Suzuki, S. *et al.* Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Cancer* **103**, 1265-1273 (2005).

34 Martin-Castillo, B. *et al.* Cytokeratin 5/6 fingerprinting in HER2-positive tumors identifies a poor prognosis and trastuzumab-resistant basal-HER2 subtype of breast cancer. *Oncotarget* **6**, 7104-7122 (2015).

35 Breiman, L. Random Forests. *Machine Learning* **45**, 5-32 (2001).

36 Gnepp, D. R. Malignant mixed tumors of the salivary glands: a review. *Pathology annual* **28 Pt 1**, 279-328 (1993).

37 Katabi, N. *et al.* Consistent PLAG1 and HMGA2 abnormalities distinguish carcinoma ex-pleomorphic adenoma from its de novo counterparts. *Hum Pathol* **46**, 26-33 (2015).

38 Bahrami, A., Dalton, J. D., Shivakumar, B. & Krane, J. F. PLAG1 alteration in carcinoma ex pleomorphic adenoma: immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization studies of 22 cases. *Head Neck Pathol* **6**, 328-335 (2012).

39 de Brito, B. S. *et al.* Loss of expression of Plag1 in malignant transformation from pleomorphic adenoma to carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Hum Pathol* **57**, 152-159 (2016).

40 Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L. & Vogt, P. K. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* **5**, 921-929 (2005).

41 Karar, J. & Maity, A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience* **4**, 51 (2011).

42 Koch, K. R. *et al.* Autocrine impact of VEGF-A on uveal melanoma cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **55**, 2697-2704

(2014).

43 Ohba, T. *et al.* Autocrine VEGF/VEGFR1 signaling in a subpopulation of cells associates with aggressive osteosarcoma. *Mol Cancer Res* **12**, 1100-1111 (2014).

44 Ji, Y. *et al.* Upregulated autocrine vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor-2 loop prevents apoptosis in haemangioma-derived endothelial cells. *The British journal of dermatology* **170**, 78-86 (2014).

45 Li, J. *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science (New York, N.Y.)* **275**, 1943-1947 (1997).

46 Maehama, T. & Dixon, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* **273**, 13375-13378 (1998).

47 Hamada, K. *et al.* The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis. *Genes & development* **19**, 2054-2065 (2005).

48 Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. & Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 9-22 (1999).

49 Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* **9**, 669-676 (2003).

50 Sandler, A. *et al.* Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **355**, 2542-2550 (2006).

51 Brown, L. F. *et al.* Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* **143**, 1255-1262 (1993).

52 Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**, 873-887 (2011).

53 Adams, R. H. & Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 464-478

(2007).

54 Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298-307 (2011).

55 Eilken, H. M. & Adams, R. H. Turning on the angiogenic microswitch. *Nature medicine* **16**, 853-854 (2010).

56 Phng, L. K. & Gerhardt, H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Developmental cell* **16**, 196-208 (2009).

57 Fanjul-Fernandez, M., Folgueras, A. R., Cabrera, S. & Lopez-Otin, C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochimica et biophysica acta* **1803**, 3-19 (2010).

58 Li, G. J. *et al.* Slit2 suppresses endothelial cell proliferation and migration by inhibiting the VEGF-Notch signaling pathway. *Mol Med Rep* **15**, 1981-1988 (2017).

59 Weitzman, M., Bayley, E. B. & Naik, U. P. Robo4: a guidance receptor that regulates angiogenesis. *Cell adhesion & migration* **2**, 220-222 (2008).

60 Youngblood, V. *et al.* Elevated Slit2 Activity Impairs VEGF-Induced Angiogenesis and Tumor Neovascularization in EphA2-Deficient Endothelium. *Mol Cancer Res* **13**, 524-537 (2015).

61 Voz, M. L., Agten, N. S., Van de Ven, W. J. & Kas, K. PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. *Cancer Res* **60**, 106-113 (2000).

62 Hensen, K., Van Valckenborgh, I. C., Kas, K., Van de Ven, W. J. & Voz, M. L. The tumorigenic diversity of the three PLAG family members is associated with different DNA binding capacities. *Cancer Res* **62**, 1510-1517 (2002).

63 Declercq, J. *et al.* Salivary gland tumors in transgenic mice with targeted PLAG1 proto-oncogene overexpression. *Cancer Res* **65**, 4544-4553 (2005).

64 Van Dyck, F., Declercq, J., Braem, C. V. & Van de Ven, W. J. PLAG1, the prototype of the PLAG gene family: versatility in tumour development (review). *International journal of oncology* **30**, 765-774

(2007).

65 Samani, A. A., Yakar, S., LeRoith, D. & Brodt, P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine reviews* **28**, 20-47 (2007).

66 Voz, M. L. *et al.* Microarray screening for target genes of the proto-oncogene PLAG1. *Oncogene* **23**, 179-191 (2004).

67 Yen, L. *et al.* Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* **19**, 3460-3469 (2000).

68 Konecny, G. E. *et al.* Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **10**, 1706-1716 (2004).

69 Gianni, L. *et al.* AVEREL: A Randomized Phase III Trial Evaluating Bevacizumab in Combination With Docetaxel and Trastuzumab As First-Line Therapy for HER2-Positive Locally Recurrent/Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 1719-1725 (2013).

70 Falchook, G. S. *et al.* A phase I trial of combination trastuzumab, lapatinib, and bevacizumab in patients with advanced cancer. *Invest New Drugs* **33**, 177-186 (2015).

71 Falchook, G. S., Lippman, S. M., Bastida, C. C. & Kurzrock, R. Human epidermal receptor 2-amplified salivary duct carcinoma: regression with dual human epidermal receptor 2 inhibition and anti-vascular endothelial growth factor combination treatment. *Head Neck* **36**, E25-27 (2014).