

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590547

研究課題名（和文） 悪性胸膜中皮腫の発症機構の解明

研究課題名（英文） Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma

研究代表者

氏名（ローマ字）：廣島 健三（ヒロシマケンゾウ）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：80218833

研究成果の概要：

早期の胸膜中皮腫は腫瘍細胞が胸膜表面に一層性あるいは乳頭状に認められ、壁側胸膜と臓側胸膜の両方に腫瘍が進展している。中皮腫は早期に腫瘍を摘出しても過半数は3年以内に死亡する。5年以上生存した症例はいずれも上皮型であり、desmoplasia や壊死を認めず、腫瘍細胞の細胞増殖能は低く、癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化の頻度は低い。このような特徴をもつ中皮腫が胸膜肺全摘術の適応になる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：中皮腫, 壁側胸膜, 臓側胸膜, mesothelioma in situ, epithelial membrane antigen (EMA), GLUT-1, 2時元電気泳動, 2-D DIGE

## 1. 研究開始当初の背景

中皮腫による年間死亡数は1995年には日本全体で500人であったが、2004年は953人、2005年には911人と、この10年間で約2倍に増加している。2005年に関西の石綿工場の近隣の住民に中皮腫が多発することが報道されて以来、工場周辺のみならず、公共施設、一般住宅でも環境曝露としてアスベストは大きな社会問題となった。

中皮腫は胸膜、腹膜、心嚢および精巣鞘膜から発生する悪性腫瘍で、予防、早期発見が難しいため、診断された時点で進行しており、中間生存期間は半年から1年半と極めて予後

が悪い。外科療法、化学療法（cisplatinあるいはcarboplatinとgemcitabinの併用化学療法）、放射線療法などが行われているが、現在のところ、有効な治療法はない。

## 2. 研究の目的

中皮腫は発症機構が不明であり、有効な治療方がなく、予後が不良である。早期の中皮腫の病態を解明することは、早期診断法、治療法の確立につながる。

本研究では、早期の中皮腫の病態、中皮腫の発症に関係する蛋白質の発現、分子生物学的変化について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 早期の中皮腫の病態

我々の施設および千葉胸膜腫瘍研究会で中皮腫として胸膜肺全摘術を行い病理学的検討を行った16例のうち、腫瘍の厚さが5mm以下のものを早期の中皮腫とし、その他の症例は進行した中皮腫とすると、8例が早期の中皮腫であった。

これらの症例の組織学的特徴を検討する。また、早期の中皮腫と反応性中皮との鑑別に重要なEMA, Glut-1, desminの発現を免疫染色で検討する。

#### (2) 予後が良好な中皮腫の特徴

中皮腫は予後が不良で、多くは診断されてから1年以内に死亡する。近年、胸膜肺全摘術に化学療法と放射線療法を加えた治療により、長期生存例が報告されている。我々の施設でも、胸膜肺全摘術を行った症例のうち手術後5年以上生存した症例7例を経験した。これら長期生存症例(LS)7例と非長期生存例(SS)17例の中皮腫標本の病理学的所見、Ki-67標識率を検討する。また、プロモーター領域のメチル化をmethylation specific PCRで検討する。

##### ①Ki-67標識率

4μmに薄切した切片に一次抗体として抗Ki-67抗原(MIB-1)(希釈済み抗体, DAKO)抗体を反応させ、4度で一晩反応させる。二次抗体としてHistofine Simple Stain Kit(Nichirei)を用いる。顕微鏡で腫瘍細胞を1,000個観察し、そのうちの陽性細胞の比率をKi-67標識率とする。

##### ②Methylation-specific PCR

DNAはパラフィン切片から腫瘍部分をmicrodissectionし、Proteinase Kと一晩反応させる。反応液の一部をsodium bisulfiteと反応させ、メチル化のおきていないcytocineをuracilに変換させる。p16, p14, p15, RASSF1A, IGFBP-3の各遺伝子のプロモーター領域を、メチル化がおきているためcytocineがuracilに変換しなかったDNAに対するプライマーと、メチル化がおきておらずcytocineがuracilに変換したDNAに対するプライマーを用いて、PCRで増幅する。

### 4. 研究成果

#### (1) 早期の中皮腫の病態

早期の中皮腫は、病変が主に壁側胸膜に見られるが、病変は臓側胸膜にも存在した。6例が高分化の上皮型で、2例が二相型であった。上皮型は胸膜に異型性を示す中皮の単層性増殖や乳頭状増殖を示した。病変は壁側胸膜(図1)、臓側胸膜(図2)にも同様に認められたが、その症例で最も大きな病変は壁側胸膜に認められた。極めて早期の中皮腫症例では、肉眼的には病変を認めず、組織学的に

乳頭状増殖を壁側胸膜に認め、臓側胸膜の変化はわずかであった。二相型のうち肉腫様成分は、紡錘形細胞が膨張性に増殖し、小さな結節を多数形成していた。中皮腫の早期の病変は不連続的で、多発性であった。また、壁側胸膜と臓側胸膜の間の胸腔に線維素が析出し、その中に中皮腫細胞を認め(図3)、胸腔内を中皮腫細胞が浮遊することにより、病変がびまん性に進展することが推測される。以上、早期の中皮腫症例を観察することにより、中皮腫の発症は図4のように進展することが推測される。

早期の中皮腫症例の1年、2年、3年生存率はそれぞれ100%, 67%, 44%であり、進行した中皮腫症例よりも良好であった。

EMAは早期の病変では陽性で、反応性中皮は陰性であり、生検標本における中皮腫の診断の補助的手段として有用である。一方、GLUT-1は早期の中皮腫では発現しておらず、早期例の診断には有用ではない。

#### (2) 予後が良好な中皮腫の特徴

LSは全例、高分化上皮型で、乳頭状、管状、微小嚢胞状増殖を示した。核分裂像は少なく、Ki-67標識率は10%以下であった。Myxoidな間質を認めたが、desmoplasticな間質は見られなかった。壊死は見られなかった。病期分類はIbが4例、IIIが2例、IVが1例であった。SSのKi-67標識率は2-50%であった。

p16, p14, p15, RASSF1A, IGFBP-3のメチル化はそれぞれ20%, 10%, 53%, 10%, 26%に認められた。65%の症例はいずれかにメチル化を認めた(図5)。

非長期生存例にはメチル化が認められるのに対して、長期生存例ではメチル化はまれであった(図6)。

いずれかの遺伝子にメチル化を認める症例は全くメチル化を認めない症例よりも予後が不良であった(図7)。p16にメチル化を認める症例はp16にメチル化を認めない症例よりも予後が不良であった(図8)。p14, p15, RASSF1A, IGFBP-3におけるメチル化の有無と予後の間に関係は認められなかった。

メチル化は中皮腫の発生に関係している。中皮腫には予後良好群が存在する。これらの症例に対して、胸膜肺全摘術を行い、化学療法、放射線療法を加えることにより、良好な予後が期待できる。

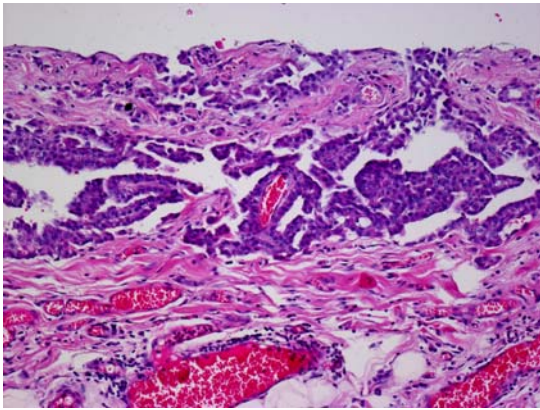


図1. 早期の胸膜中皮腫（壁側胸膜）

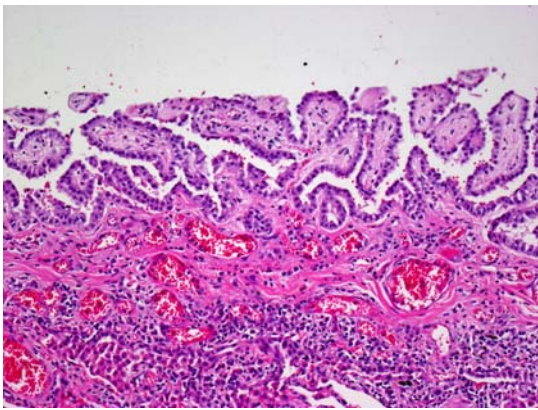


図2. 早期の胸膜中皮腫（臓側胸膜）

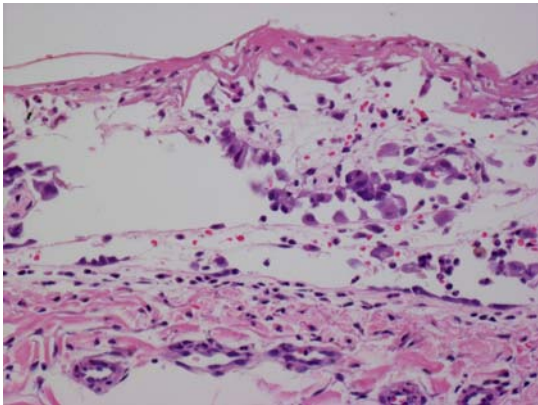


図3. 臓側胸膜表面に線維素が析出し、その中に中皮腫細胞が浮遊している。

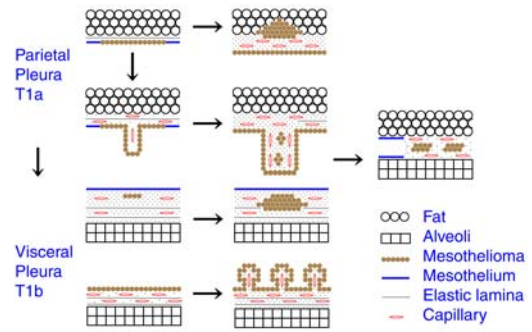


図4. 中皮腫発生の模式図。

中皮腫は壁側胸膜に発生し、はじめは一層性だが、すぐに胸膜下組織に浸潤をおこす。また、胸膜表面に乳頭状増殖をおこす。臓側胸膜は表面に一層性に腫瘍細胞が配列する場合と、表面には腫瘍細胞がなく、胸膜内に腫瘍細胞が増殖する場合がある。壁側胸膜と臓側胸膜の腫瘍はそれぞれ大きくなり、肥厚した壁側胸膜と臓側胸膜は癒着をおこし、胸膜全体を腫瘍が覆うようになる。

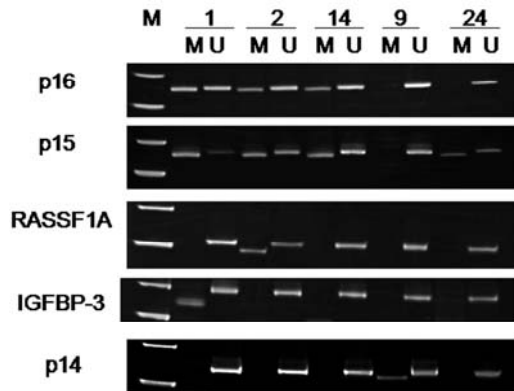


図5. 電気泳動の結果

Sodium bisulfiteにより処理したのちに、PCRを行った。メチル化がおきていると、Mの列にバンドがみられる。

### Hypermethylation patterns of genes

Case	Prognosis	Subtype	p16	p15	IGFBP-3	RASSF1A	p14
1	SS	mesothelial	Black	Black	White	White	White
2	SS	mesothelial	Black	Black	White	White	White
3	SS	mesothelial	Black	Black	White	White	White
4	SS	mesothelial	Black	Black	White	White	White
5	SS	mesothelial	Black	Black	White	White	White
6	SS	mesothelial	Black	Black	White	White	White
7	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
8	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
9	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
10	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
11	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
12	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
13	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
14	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
15	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
16	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
17	SS	lymphoid	White	White	White	White	White
18	LS	lymphoid	White	White	White	White	White
19	LS	lymphoid	White	White	White	White	White
20	LS	lymphoid	White	White	White	White	White
21	LS	lymphoid	White	White	White	White	White
22	LS	lymphoid	White	White	White	White	White
23	LS	lymphoid	White	White	White	White	White
24	LS	lymphoid	White	White	White	White	White

Black boxes, methylation, White boxes, unmethylation. SS: short-term survivor, LS: long-term survivor.

図6. メチル化のパターン。  
長期生存例(LS)はメチル化の頻度が低く、予後不良群(SS)はメチル化が高頻度におきている。

### Overall survival in methylated and unmethylated MPM

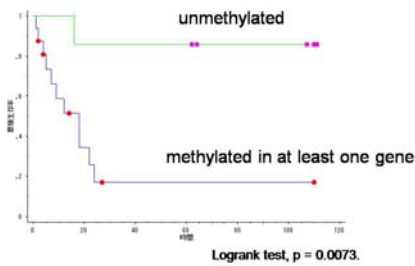


図7. いずれかの遺伝子にメチル化がある症例は予後が悪い。

### Overall survival in p16 methylated and unmethylated MPM

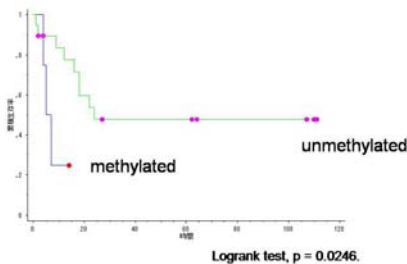


図8. p16 にメチル化がある症例は予後が悪い。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 37 件)

1. Hiroshima K, Yusa T, Kameya T, Ito I, Kaneko K, Kadoyama C, Kishi H, Saitoh Y, Ozaki D, Itami M, Iwata T, Iyoda A, Kawai T, Yoshino I, Nakatani Y. Malignant pleural mesothelioma: A clinicopathological study of sixteen extrapleural pneumonectomy cases with special reference to early stage features. Pathol Int. 2009 (in press) 査読有り
2. Amin RM, Hiroshima K, Miyagi Y, Kokubo T, Hoshi K, Fujisawa T, Nakatani Y. Role of the PI3K/Akt, mTOR, and STK11/LKB1 pathways in the tumorigenesis of sclerosing hemangioma of the lung. Pathol Int. 2008;58:38-44. 査読有り
3. Suzuki M, Mohamed S, Nakajima T, Kubo R, Tian L, Fujiwara T, Suzuki H, Nagato K, Chiyo M, Motohashi S, Yasufuku K, Iyoda A, Yoshida S, Sekine Y, Shibuya K, Hiroshima K, Nakatani Y, Yoshino I, Fujisawa T. Aberrant methylation of CXCL12 in non-small cell lung cancer is associated with an unfavorable prognosis. Int J Oncol. 2008;33:113-119. 査読有り
4. 廣島健三, 由佐俊和, 篠原也寸志. 石綿曝露の病理学的評価. 肺癌 2008;49:48-57. 査読有り
5. 廣島健三. 悪性中皮腫の病理診断. 日本臨床 2008;66(Suppl 6):374-378. 査読なし

[学会発表] (計 111 件)

1. 廣島健三, 由佐俊和, 柴崎正巳, 兼子耕, 岸宏久, 齊藤忠, 伊藤以知郎, 山川久美, 前澤直樹, 伊丹真紀子, 尾崎大介, 亀井敏昭, 吉野一郎, 中谷行雄. 中皮腫の克服を目指して 基礎と臨床の最前線 肉眼的に腫瘍を認めない早期胸膜中皮腫の検討. 第47回日本臨床細胞学会総会(秋期大会). 2008.11.15. 東京
2. Hiroshima K, Yusa T, Tanizawa T, Yonemori Y, Oide T, Kameya T, Ito I, Kaneko K, Kishi H, Ozaki D, Itami M, Kawai T, Nakatani Y. Microscopic malignant pleural mesothelioma. 27th International Congress of the International Academy of Pathology. 2008.10.16. ギリシア, アテネ
3. Hiroshima K, Yusa T, Kameya T, Kadoyama C, Saitoh Y, Iwata T, Tada Y, Shimada H, Tagawa M, Nakatani Y. Early

detection of malignant pleural mesothelioma. 9th International Mesothelioma Interest Group Conference. 2008.9.25. オランダ, アムステルダム

4. Hiroshima K, Yusa T, Kameya T, Ito I, Kawai T, Kaneko K, Kadoyama C, Kishi H, Fujisawa T, Nakatani Y. Pathological study of malignant pleural mesothelioma resected with extrapleural pneumonectomy. 12th World Conference on Lung Cancer. 2007.9.3. 韓国, ソウル

5. Hiroshima K, Yusa T, Kaneko K, Kadoyama C, Kishi H, Itami M, Fujisawa T, Nakatani Y. Pathological study of malignant pleural mesothelioma resected with extrapleural pneumonectomy. United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting 2007. 2007.3.27. アメリカ合衆国, サンディエゴ

〔図書〕(計9件)

1. Hiroshima K. Pathological distinction of pulmonary large cell carcinoma from small-cell lung carcinoma using immunohistochemistry. General Methods and Overviews, Lung Carcinoma and Prostate Carcinoma. In: Method of cancer diagnosis, therapy and prognosis. Hayat MA ed., Vol. 2, Springer, 2008;349-361.
2. 廣島健三, 由佐俊和. 井内康輝監修. 早期中皮腫の特徴. 画像と病理像から学ぶ中皮腫アトラス. 篠原出版新社 2008;271-277.
3. 廣島健三. 悪性胸膜中皮腫の早期病変. 加藤治文, 西條長宏, 福岡正博, 小林紘一, 海老原善郎, 井内康輝, 早川和重監修. MOOK 「肺癌の臨床」2008-2009. 篠原出版新社 2008;337-343.
4. 廣島健三. 亀井敏昭, 石川雄一, 三浦溥太郎, 井内康輝, 森永謙二編. アスベストと中皮腫. 石綿関連疾患の病理. 石綿関連の非腫瘍性疾患の病理. 篠原出版新社 2007;193-198.
5. 廣島健三. 工藤翔二監修. 呼吸器 common disease の診療. 肺癌のすべて. 前癌病変. 文光堂 2007;68-73.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣島 健三 (HIROSHIMA KENZO)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 80218833

(2) 研究分担者

中谷 行雄 (NAKATANI YUKIO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 20137037

朝長 毅 (TOMONAGA TSUYOSHI)  
医薬基盤研究所・基盤的研究部プロテオームリサーチプロジェクト・プロジェクトリーダー  
研究者番号: 80227644

谷澤 徹 (TANIZAWA TOHRU)  
千葉大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 00227232

鈴木 実 (SUZUKI MAKOTO)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号: 80312940

大出 貴士 (OIDE TAKASHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号: 00422246

米盛 葉子 (YONEMORI YOKO)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号: 10422247

(3) 連携研究者

伊豫田 明 (IYODA AKIRA)  
北里大学・医学部・講師  
研究者番号: 10302548