

機関番号：34519

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590377

研究課題名 (和文) 悪性中皮腫の早期診断法の開発：

分泌型および膜結合型蛋白質の網羅的解析

研究課題名 (英文) Development of early diagnosis of malignant mesothelioma:

Comprehensive analysis of secretory and membrane proteins

研究代表者

辻村 亨 (TSUJIMURA TOHRU)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20227408

研究成果の概要 (和文)：悪性中皮腫細胞株を免疫源に用いてモノクローナル抗体を作製し、肺腺癌には反応しないが悪性中皮腫の表面分子に反応するクローンを得た。このクローンによる免疫染色では、悪性中皮腫に強いシグナルが認められた。また、細胞接着分子群の中から、胸水中の中皮腫細胞に発現するが反応性中皮細胞に発現が認められない分子を同定した。本研究により得られた抗体クローンと同定した細胞接着分子は、悪性中皮腫の早期診断に有用であると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：We made monoclonal antibodies by using a malignant mesothelioma cell line as an immunogen, and obtained a clone of monoclonal antibody which reacts with a surface molecule of malignant mesothelioma, but not that of pulmonary adenocarcinoma. This clone showed strong immunoreactivity for malignant mesothelioma. In addition, we identified a cell adhesion molecule, which was expressed in malignant mesothelioma cells, but not reactive mesothelial cells, in pleural effusion. The clone of monoclonal antibody and the cell adhesion molecule may be useful for early diagnosis of malignant mesothelioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理、中皮腫

1. 研究開始当初の背景

近年、アスベスト (石綿) と関連が深いとされる悪性中皮腫の発症の増加が著しい。これは 1970 年～1990 年にアスベストを大量使用した影響であり、悪性中皮腫の発生は 2025 年にピークを迎えると推定されている。実際、我が国の悪性中皮腫による年間死者数は、1995 年では 500 人であり、その後ほぼ一貫し

て増え続けて 2006 年には過去最多の 1050 人に昇り、アスベスト使用の影響が顕在化している。また、悪性中皮腫は、これまでアスベストを取り扱った労働者に発症する腫瘍と考えられてきたが、最近、アスベスト工場の周辺住民においても高頻度に発症していることが報告され、検診体制や早期診断法の確立が急務になっている。一方、悪性中皮腫の

確定診断は病理診断に基づいて行われているが、その組織像は上皮様形態（上皮型）から肉腫様形態（肉腫型）に至るまで多彩であり、免疫組織化学染色を行っても抗体の感度や特異度が十分で無く、その病理診断に問題が生じている。加えて、悪性中皮腫の早期病変を発見するための優れたバイオマーカーは皆無に近い。

悪性中皮腫の発症は、我々が所属する医療機関（兵庫医科大学）の位置する地域に多くみられ、2006年の悪性中皮腫による都道府県別の死者数では、大阪府が103人で第1位、兵庫県が102人で第2位を占める。兵庫医科大学では、悪性中皮腫に特化した「中皮腫・アスベスト疾患センター」を早くから開設して、その治療に当たり、同センターには数多くの症例が集まっている。また、我々は、悪性中皮腫の包括的な研究の基盤ツールを構築するために、同意が得られた患者の腫瘍組織や胸水などの体腔液に含まれる腫瘍細胞を培養し、悪性中皮腫・培養細胞株（中皮腫細胞株）の樹立を試みている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が樹立した日本人由来の中皮腫細胞株を用いて悪性中皮腫に発現する分泌型および膜結合型蛋白質を探索し、優れた悪性中皮腫の診断マーカーを開発して、その早期診断法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) モノクローナル抗体の作製：

中皮腫細胞株をマウスに免疫し、そのマウスの脾臓リンパ球と hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase 酵素欠損のミエロマ細胞株をポリエチレングリコールで融合した後、HAT培地で培養してハイブリドーマを選択した。限界希釈法により、ハイブリドーマをクローン化した後、個々の培養上清を用いてフローサイトメトリーを行い、中皮腫細胞株の表面分子に対するモノクローナル抗体を産生しているクローンを選択した。これらの中から、再度フローサイトメトリーにより、肺腺癌細胞株に反応しない抗体を産生するクローンをスクリーニングした。

悪性中皮腫や肺癌などの病理標本を用いて免疫染色を行い、得られたクローンが産生する抗体の病理診断における有用性について検討した。

(2) 膜結合型蛋白質の検討：

種々の抗体を用いたフローサイトメトリーにより、中皮腫細胞株の表面に発現する分子を探索した。中皮腫細胞株に発現が確認できた分子については、悪性中皮腫や肺癌などの胸水細胞診標本を用いて免疫染色を行い、診断マーカーとしての有用性について検討

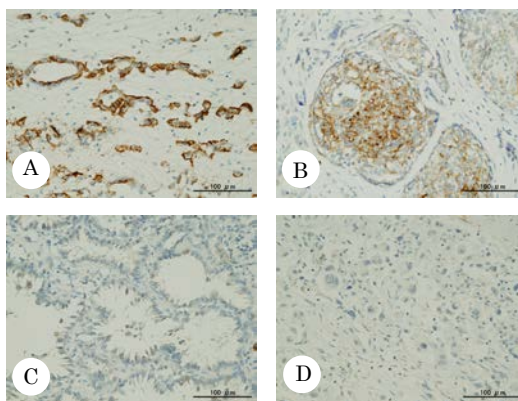
した。

(3) 同所移植モデルによる検証：

中皮腫細胞株をヌードマウスの胸腔内に移植して、同所移植モデルを作製した。このモデルを用いて、同定された分子が悪性中皮腫と反応性中皮との鑑別に有用であるのかどうかを調べた。

4. 研究成果

我々は、同意が得られた患者の腫瘍組織や胸水などの体腔液に含まれる腫瘍細胞を培養して、中皮腫細胞株を樹立した。これらの中皮腫細胞株を免疫源に用いて、モノクローナル抗体を作製すると、肺腺癌細胞株には反応しないが、中皮腫細胞株の表面抗原に反応する抗体クローンを見出した。悪性中皮腫や肺腺癌などの病理標本を用いて、この抗体クローンによる免疫染色を行うと、悪性中皮腫でシグナルを認めたが、肺腺癌では明らかなシグナルを認めなかった。この抗体クローンを用いた免疫染色は、悪性中皮腫と肺腺癌との鑑別に有用であると考えられる。



抗体クローンによる免疫染色

- (A)；悪性中皮腫（上皮型、高～中分化）
- (B)；悪性中皮腫（上皮型、中～低分化）
- (C)；肺腺癌（乳頭型）
- (D)；肺腺癌（混合型）

悪性中皮腫でシグナルを認める。一方、肺腺癌ではシグナルは認められない。

種々の抗体を用いて、悪性中皮腫の表面に発現する分子を調べたところ、細胞接着分子群に属する1つの分子が中皮腫細胞株に発現することを見出した。胸水細胞診標本を用いて、悪性中皮腫細胞と反応性中皮細胞における発現を免疫染色で調べると、この細胞接着分子は中皮腫細胞に発現していたが、反応性中皮細胞には発現していなかった。また、中皮腫細胞株をヌードマウスの胸腔内に移植して同所移植モデルを作製し、免疫染色を行うと、移植したヒトの中皮腫細胞には明らかなシグナルを検出したが、マウス由来の反応性中皮細胞にはシグナルを検出できな

った。以上より、この分子は、悪性中皮腫と反応性中皮との鑑別に有用なマーカーになると考えられる。

他の細胞接着分子についても解析を進め、グリコシル-ホスファチジルイノシトール結合型シアロ糖蛋白質 (GPI アンカー型膜蛋白質) に属する1つの細胞接着分子が、反応性中皮に比較して悪性中皮腫において強く発現していることを見出している。この分子も悪性中皮腫の診断マーカーとして有用になる可能性があるが、今後の課題である。

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 14 件)

- ① Sato A, Torii I, Tsujimura T et al (全 10 名、10 番目) Establishment of a cell line from a Japanese patient useful for generating an in vivo model of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci.* 査読有. 102. 2011.
- ② Sato A, Torii I, Tsujimura T et al (全 11 名、11 番目) Immunocytochemistry of CD146 is useful to discriminate between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium. *Mod Pathol.* 査読有. 23. 2010. 1458-1466.
- ③ Satoh T, Tsujimura T, Akira S et al (全 18 名、14 番目) The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol.* 査読有. 11. 2010. 936-944.
- ④ Takamatsu H, Tsujimura T, Kumanogoh A et al (全 19 名、14 番目) Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol.* 査読有. 11. 2010. 594-600.
- ⑤ Satoh T, Tsujimura T, Takeuchi O et al (全 10 名、7 番目) LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有. 107. 2010. 1512-1517.
- ⑥ Torii I, Sato A, Tsujimura T et al (全 17 名、17 番目) Well-differentiated papillary mesothelioma with invasion to the chest wall. *Lung Cancer.* 査読有. 67. 2010. 244-247.
- ⑦ Tanaka F, Tsujimura T, Hasegawa S et al (全 14 名、10 番目) Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res.* 査読有. 15. 2009. 6980-6986.
- ⑧ Kawagoe T, Tsujimura T, Akira S et al (全 7 名、6 番目) TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling

and is critical for the prevention of autoimmune nephritis. *Nat Immunol.* 査読有. 10. 2009. 965-972.

- ⑨ Okabe M, Tsujimura T, Miyajima A et al (全 9 名、7 番目) Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development.* 査読有. 136. 1951-1960.
- ⑩ Matsushita K, Tsujimura T, Akira S et al (全 11 名、9 番目) Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature.* 査読有. 458. 2009. 1185-1190.
- ⑪ Torii I, Sato A, Tsujimura T et al (全 10 名、10 番目) Perivascular epithelioid cell tumor of the rib. *Virchows Arch.* 査読有. 452. 2008. 697-702.
- ⑫ Saitoh T, Tsujimura T, Akira S et al (全 15 名、13 番目) Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature.* 査読有. 156. 2008. 264-268.
- ⑬ Yoshikawa R, Tsujimura T, Fujiwara Y et al (全 9 名、7 番目) Hedgehog signal activation in oesophageal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy. *Br J Cancer.* 査読有. 98. 2008. 1670-1674.
- ⑭ Uematsu S, Tsujimura T, Akira S et al (全 14 名、8 番目) Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol.* 査読有. 9. 2008. 769-776.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Tsujimura T, Diagnosis of malignant pleural mesothelioma in effusion cytology -Discrimination between mesothelioma and reactive mesothelium-, 9th Japan Korea Cytology Meeting, 2010 年 11 月 6 日, STX Resort (Mungyeong)
- ② 辻村亨, 佐藤鮎子, 鳥井郁子, 中野孝司 (全 6 名、1 番目) 中皮腫診断と細胞診 悪性胸膜中皮腫の早期診断への糸口 中皮腫の細胞学的特徴を分子レベルで考える、第 51 回日本肺癌学会総会、2010 年 11 月 3 日、広島国際会議場・ANAクラウンプラザホテル 広島 (広島)
- ③ Tsujimura T, Sato A, Torii I, Nakano T et al (全 9 名、1 番目) Diagnostic significance of p16INK4A loss in molecular cytology of early malignant pleural mesothelioma, The 10th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group (IMIG2010), 2010 年 9 月 1 日, 国立京都国際会館 (京都)
- ④ Tsujimura T, Sato A, Torii I, Nakano T

et al (全9名、1番目) Usefulness of gene diagnosis of the p16INK4A locus in molecular cytology of early malignant pleural mesothelioma, 17th International Congress of Cytology, 2010年5月16-20日, Edinburgh International Conference Centre (Edinburgh)

⑤ 辻村亨、鳥井郁子、佐藤鮎子、中野孝司他(全10名、1番目) 中皮腫細胞の形態を科学する 中皮腫細胞診断の現状と問題点 胸水細胞診から科学する早期中皮腫の病態と細胞像、第48回日本臨床細胞学会 秋季大会、2009年10月30日、JALリゾートシーホークホテル福岡(福岡)

⑥ Yoneda K, Tsujimura T, Nakano T et al (全11名、9番目) Circulating tumor cells (CTCs) and endothelial cells (CECs) in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma (MPM): a single institutional prospective stud, 2009 ASCO Annual Meeting, 2009.5.29, Orlando.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻村 亨 (TSUJIMURA TOHRU)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：20227408

(2) 研究分担者

鳥井 郁子 (TORII IKUKO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：70207661
佐藤 鮎子 (SATO AYUKO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：20419823