

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591665
 研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫における肺内アスベスト濃度と遺伝子異常の関連について
 研究課題名(英文) Asbestos fiber concentration in lung tissues and mutation analysis of malignant pleural mesothelioma
 研究代表者
 横井 香平 (YOKOI KOHEI)
 名古屋大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：60378007

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫12例から細胞株を樹立し遺伝子変異解析を施行した結果、p16^{INK4A}遺伝子領域のホモザイガス欠失をほぼすべての細胞株で認め発癌過程に関与している可能性が示唆された。悪性胸膜中皮腫8例の手術標本から、肺内のアスベストの濃度を分析電子顕微鏡で解析した。暴露歴なし2例では低濃度であったが、暴露歴を有する6例中2例でも低濃度を示した。アスベストが消化され濃度測定時には健常者レベルに低下していた可能性もあるが、一方でアスベスト以外の発癌因子が関与している可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established twelve malignant pleural mesothelioma(MPM) cell lines from Japanese patients. We detected homozygous deletion of p16^{INK4A}/p14^{ARF} in all MPM cell lines. However, mutations of other tumor suppressor genes, including TP53, and protooncogenes, including KRAS, NRAS, BRAF, EGFR and HER2, were not found in these cell lines. Two women who had no history of asbestos exposure showed lower concentrations of chrysotile and amphibole asbestos than the control subject. On the other hand, most patients with a history of asbestos exposure had higher concentrations of chrysotile and amphibole asbestos than the control subject, but even in some patients with a history of asbestos exposure the low concentrations were observed. To elucidate the relation between the pulmonary asbestos fiber concentrations by fiber types and development of MPM, further investigations are necessary.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
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：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫、アスベスト、遺伝子変異、癌遺伝子、癌抑制遺伝子、肺内アスベスト濃度

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は、そのほとんどがアスベスト（石綿）の吸引により発生する。アスベスト鉱山労働者やアスベストを扱う労働者に限らず、鉱山や工場周辺の住民、あるいは、労働者の家族にも発生しており、近年、社会的問題となってきた。さらに 2006 年の Murayama らの報告によると、age-cohort モデルでの推計で 2000 年～2039 年の間に、患者数が 10 万人を越えることが予測されている。今後急増が予想されるこの悪性腫瘍に対する病態解明が急務であるが、未だその発生過程においてアスベストがどのように関与しているかについては明らかになっていない。加えて、治療や予防につながる分子標的の同定については、国内外共に十分な検討がなされていない状況にあり、分子腫瘍学的に悪性胸膜中皮腫のアスベストに関連した発生メカニズムを解析し、その増殖能、浸潤能および転移能の獲得に関与しているシグナル伝達経路を明らかにすることが、治療に寄与できる薬剤の開発や早期診断に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

悪性胸膜中皮腫患者由来の腫瘍組織を細胞生物学的・分子生物学的に解析し、中皮腫腫瘍細胞の特性の解明を試みる。また、患者胸水などを利用して細胞株樹立も行う。現時点において日本人由来の中皮腫細胞株は極めて少数であり、その細胞生物学的特性を解明するのに数多くの中皮腫細胞株の樹立を行うことは重要であると考えている。これらの細胞株を検体として、アレイ CGH などの網羅的解析手法を用い、悪性胸膜中皮腫特有の遺伝子異常の解析を行う。また、その知見をもとに予防・早期診断マーカーおよび新規治療に対する分子標的の探索を試みる。また、中皮腫組織および樹立細胞株から抽出した RNA で、網羅的遺伝子発現パターンの解析や、がん抑制遺伝子の不活化や細胞の分化異常に深く関与するエピジェネティクス異常の解析、さらには細胞培養上清を用いた質量分析法による解析等を有効に組み合わせることにより、予防や早期診断、悪性度判定のための新規バイオマーカーの探索などを行う。さらに、現在までに明らかにされている遺伝子異常についても、探索を行いその悪性胸膜中皮腫における役割を解析する。切除検体を用いて、その肺内のアスベストについて電子顕微鏡を用いてアスベストの種類と同定と濃度を詳細に測定し、そのデータと遺伝子異常の相関を検討する。

3. 研究の方法

(1) 悪性胸膜中皮腫患者の胸水あるいは腫

瘍片より細胞株の樹立を行う。さらに、細胞株が樹立できれば、その細胞株が患者本人由来であることを確かめるために、患者の白血球由来 DNA、細胞株由来 DNA をそれぞれ抽出し、それらを多種類の個人識別マーカーを用い、樹立細胞株が患者個人由来の細胞株であることを確認する。

- (2) 手術検体、細胞株由来の DNA を用い、癌遺伝子に関しては RAS シグナル伝達系の KRAS, NRAS さらに BRAF などの遺伝子の変異解析を Direct Sequence 法を用いて行う。また、MYC, MDM2, CyclinD1 については FISH 法による遺伝子増幅の有無を調査する。
- (3) 癌抑制遺伝子に関しては、NF2, p53 を Direct Sequence 法で変異解析を行う。ナンセンス変異を検出した場合は、免疫染色法などでタンパク質レベルでの発現解析を行う。
- (4) 樹立した悪性胸膜中皮腫細胞株を免疫不全マウスに移植（皮下、腹腔、胸腔）し、その生着の有無を見る。さらに、このマウスに新規抗癌剤や分子標的治療薬、血管新生因子阻害剤などを投与し、その効果を検討する。以前に研究分担者がパイロット的に樹立した悪性胸膜中皮腫細胞株のマウス皮下移植実験の写真を貼付する。
- (5) 胸膜肺全摘術等による根治的切除標本を用い、その背景肺内のアスベストの種類と濃度について、分析電子顕微鏡を使って詳細に検討する。

4. 研究成果

- (1) 悪性胸膜中皮腫細胞株の樹立とその細胞生物学的解析
 - ① 細胞株樹立：悪性胸膜中皮腫手術症例 12 例から胸水を採取し細胞株を樹立し得た。
 - ② 遺伝子変異解析：樹立した細胞株から DNA を抽出し、癌遺伝子については KRAS, NRAS, BRAF, TP53 の遺伝子変異を解析したが明らかな遺伝子変異を認めなかった。一方、癌抑制遺伝子の候補である p16^{INK4A} 遺伝子領域のホモザイガス欠失をほぼすべての細胞株で確認した。悪性胸膜中皮腫に発癌過程において p16^{INK4A} 遺伝子の欠失が関与している可能性が示唆された（図 1）。

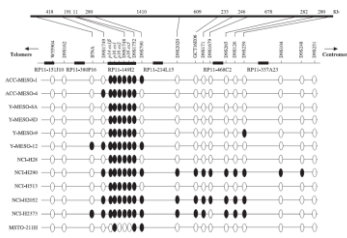


図1 9p21領域のホモザイガス欠失

(2) 悪性胸膜中皮腫切除症例における肺内アスベスト濃度測定

- ① 分析電子顕微鏡による肺内アスベスト線維の種類同定と濃度測定：悪性胸膜中皮腫 8 例の胸膜肺全摘術切除標本から、腫瘍内および肺内のアスベスト、具体的には蛇紋石族（クリソタイル）と角閃石族（アモサイトやクロシドライトなど）の濃度を分析電子顕微鏡で解析した（図2）。臨床背景を表1に示す。その結果、腫瘍内にはアスベストはほとんど含まれていないことが確認できた。また、肺内アスベスト濃度の検討により、発症リスクが高いと言われているクロシドライト（青石綿）やアモサイト（茶石綿）を高濃度に認めた症例がある一方、アスベスト濃度が職業的暴露の無い標準的な都市生活者の平均値と同程度の症例も認めた（図3,4）。アスベストが消化され濃度測定時には健常者レベルに低下していた可能性もあるが、一方でアスベスト以外の発癌因子が関与している可能性も示唆された。

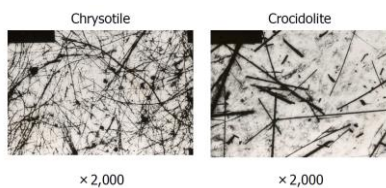


図2 分析電子顕微鏡によるアスベスト

	Age	Sex	Asbestos exposure	cStage	Operation	Histology	pStage
case 1	50	H	yes	cT2N0M0, II	right EPP	Biphasic	pT3N2M0, III
case 2	54	H	yes	cT2N0M0, II	left EPP	Biphasic	pT2N0M0, II
case 3	56	H	yes	cT3N2M0, III	left EPP	Epithelial	pT4N0M0, IV
case 4	65	H	yes	cT3N2M0, III	right EPP	Epithelial	pT3N2M0, III
case 5	46	F	no	cT1N0M0, I	left EPP	Epithelial	pT3N2M0, III
case 6	70	F	no	cT1N1M0, III	left EPP	Epithelial	pT2N1M0, III
case 7	65	H	yes	cT3N0M0, III	right EPP	Epithelial	pT4N2M0, IV
case 8	60	H	yes	cT3N2M0, III	right EPP	Biphasic	pT3N0M0, III

表1 臨床背景

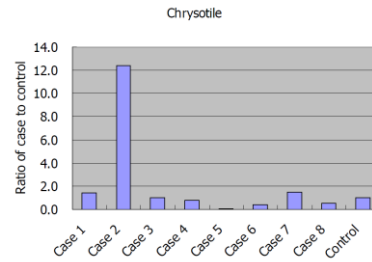


図3 肺内アスベスト濃度（クリソタイル）

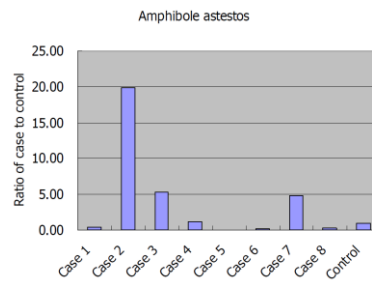


図4 肺内アスベスト濃度（角閃石族）

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12件）

- ① Kawaguchi K, Taniguchi T, Usami N, Yokoi K. Intrapulmonary solitary fibrous tumor. Gen Thorac Cardiovasc Surg 査読有 2011;59:61-64.
- ② Usami N, Yokoi K, Hasegawa Y, Taniguchi H, Shindo J, Yamamoto M, Suzuki R, Imaizumi K, Kondo M, Shimokata K. Phase II study of carboplatin and gemcitabine as adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: a report from the Central Japan Lung Study Group, CJLSG 0503 trial. Int J Clin Oncol 査読有 2010;15:583-587.
- ③ Usami N, Iwano S, Mizuno T, Taniguchi T, Yokoi K. Three-dimensional angiography of aberrant segmental vein of right upper lobe. Asian Cardiovasc Thorac Ann 査読有 2010;18:398.
- ④ Sakakura N, Usami N, Taniguchi T, Kawaguchi K, Okagawa T, Yokoyama M, Yokoi K. Assessment of long-term postoperative pain in open

- thoracotomy patients: pain reduction by the edge closure technique. Ann Thorac Surg 査読有 2010;89:1064-1070.
- ⑤ Sakakura N, Tateyama H, Usami N, Yokoi K. Thymic basaloid carcinoma with pleural dissemination that developed after a curative resection: report of a case. Surg Today 査読有 2010;40:1073-1078.
- ⑥ Okasaka T, Usami N, Taniguchi T, Kawaguchi K, Okagawa T, Suzuki H, Matsuo K, Yokoi K. Can non-performance of radical systematic mediastinal lymphadenectomy be justified in elderly lung cancer patients? An evaluation using propensity-based survival analysis. Eur J Cardiothorac Surg 査読有 2010;38:27-33.
- ⑦ Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Yokoi K. Good syndrome accompanied by pure red cell aplasia. Interact Cardiovasc Thorac Surg 査読有 2009;9:750-752.
- ⑧ Kawaguchi K, Murakami H, Taniguchi T, Fujii M, Kawata S, Fukui T, Kondo Y, Osada H, Usami N, Yokoi K, Ueda Y, Yatabe Y, Ito M, Horio Y, Hida T, Sekido Y. Combined inhibition of MET and EGFR suppresses proliferation of malignant mesothelioma cells. Carcinogenesis 査読有 2009;30:1097-1105.
- ⑨ Kawaguchi K, Mori S, Usami N, Fukui T, Mitsudomi T, Yokoi K. Preoperative evaluation of the depth of chest wall invasion and the extent of combined resections in lung cancer patients. Lung Cancer 査読有 2009;64:41-44.
- ⑩ Ishikawa Y, Matsuguma H, Nakahara R, Suzuki H, Ui A, Kondo T, Kamiyama Y, Igarashi S, Mori K, Kodama T, Yokoi K. Multimodality therapy for patients with invasive thymoma disseminated into the pleural cavity: the potential role of extrapleural pneumonectomy. Ann Thorac Surg 2009;88:952-957.
- ⑪ Okasaka T, Usami N, Mitsudomi T, Yatabe Y, Matsuo K, Yokoi K. Stepwise examination for differential diagnosis of primary lung cancer and breast cancer relapse presenting as a solitary pulmonary nodule in patients after mastectomy. J Surg Oncol 査読有 2008;98:510-514.
- ⑫ Matsuguma H, Nakahara R, Ishikawa Y, Suzuki H, Inoue K, Katano S, Yokoi K.

Postoperative radiotherapy for patients with completely resected pathological stage IIIA-N2 non-small cell lung cancer: focusing on an effect of the number of mediastinal lymph node stations involved. Interact Cardiovasc Thorac Surg 査読有 2008;7:573-577.

[学会発表] (計4件)

- ① Noriyasu Usami、Asbestos fiber concentration in lung tissues resected for malignant pleural mesothelioma、The 9th international conference of the International Mesothelioma Interest Group、2010/9/2、Kyoto、Kyoto International Conference Center
- ② Noriyasu Usami、3D-CT Volumetry of the Lung for Predicting Residual Pulmonary Function in Patients after Lung Resection、17th European Conference on General Thoracic Surgery、2009/6/1、Poland
- ③ Noriyasu Usami、Asbestos fiber concentration in lung tissues resected for malignant pleural mesothelioma、The 9th international conference of the International Mesothelioma Interest Group、2008/9/25、Amsterdam
- ④ Tetsuo Taniguchi、Establishment and characterization of new malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients、The 9th international conference of the International Mesothelioma Interest Group、2008/9/25、Amsterdam

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 香平 (YOKOI KOHEI)
名古屋大学・医学研究科・准教授
研究者番号：60378007

(2) 研究分担者

宇佐美 範恭 (USAMI NORIYASU)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30378179
谷口 哲郎 (TANIGUCHI TETSUO)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：20378186
(H20→H21：研究分担者)

(3) 連携研究者

なし

