

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590438

研究課題名(和文)悪性胸膜中皮腫の進展・浸潤メカニズムの解析：病理診断への応用と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms by which malignant pleural mesothelioma grows and invades: application to pathological diagnosis and development of a new therapy

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は、胸腔内を埋め尽くすように増殖し胸壁をびまん性に浸潤する特徴を持ち、予後不良である。悪性中皮腫における胸腔内進展や胸壁浸潤のメカニズムの解明を目指して、その遺伝子発現プロファイルを中皮細胞と比べると、発現が増強していた遺伝子の中に、エピジェネティクスに働くEZH2が見出された。siRNA導入法により、EZH2発現を抑制した悪性中皮腫細胞では、細胞増殖能が低下した。悪性中皮腫におけるEZH2発現を免疫染色で調べると、EZH2を強く発現する悪性中皮腫の患者ほど全生存率は低かった。悪性中皮腫の胸腔内進展や胸壁浸潤などの生物学的特性にエピジェネティクス機構が深く関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma is characterized by diffuse growth in the thoracic cavity and invasive proliferation in the chest wall, leading to poor prognosis. To clarify the mechanism by which malignant mesothelioma develops these features, we compared the gene expression profiling between malignant mesothelioma and mesothelial cells. We found that EZH2, which contributes to epigenetic silencing of target genes, was expressed at higher levels in malignant mesothelioma than in mesothelial cells. When EZH2 expression in mesothelioma cells was suppressed by the introduction of EZH2-siRNA, proliferation of these cells decreased. Immunohistochemical analysis of EZH2 expression in surgical specimens of malignant mesothelioma revealed correlation between higher expression of EZH2 and shorter overall survival of patients. It seems that epigenetics participates in biological characteristics of malignant mesothelioma, such as the growth in the thoracic cavity and the invasion into the chest wall.

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：悪性胸膜中皮腫 上皮間葉転換 浸潤 Polycomb遺伝子群 EZH2

### 1. 研究開始当初の背景

我が国では、悪性胸膜中皮腫の発生は、1970年～1990年にアスベストを大量に使用した影響を受けて増加の一途を辿っている(N Engl J Med, 353:1591-1603, 2005)。悪性胸膜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、細胞形態的に中皮腫と反応性中皮は似ており、悪性胸膜中皮腫を発見するための優れたバイオマーカーも皆無に近いために、早期に正確な診断を行うことは極めて難しい(Arch Pathol Lab Med, 133:1317-1331, 2009)。我々は、こうした問題の解決を目指して、細胞接着分子 CD146 が悪性胸膜中皮腫に強く発現し、CD146 が中皮腫と反応性中皮とを鑑別する有用な診断マーカーになることを見出した(感度:90%以上、特異度:100%)(Mod Pathol, 23:1458-1466, 2010)。

悪性胸膜中皮腫は、急速に胸腔内をびまん性に進展し胸壁を浸潤性に増殖する特徴を持つ。悪性胸膜中皮腫の胸腔内進展や胸壁浸潤のメカニズムは不明のままであり、その進展や浸潤を制御する有効な治療法は開発されておらず、悪性胸膜中皮腫の予後は極めて悪い。こうした背景を受けて、悪性胸膜中皮腫の胸腔内進展や胸壁浸潤のメカニズムは、早急に解明しなければならない重要な課題になっている。

### 2. 研究の目的

悪性胸膜中皮腫の胸腔内進展や胸壁浸潤のメカニズムの解明を目指し、悪性胸膜中皮腫細胞株、培養中皮腫細胞、培養中皮細胞などを用いて、悪性胸膜中皮腫の胸腔内進展や胸壁浸潤を担う分子を同定し、その生物学的特性および病理診断への応用を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 上皮型中皮腫と肉腫型中皮腫における遺伝子発現の解析：  
同意の得られた患者の胸水あるいは腫瘍組織を、10%ウシ胎児血清を含む -MEM 培地で6ヶ月間以上培養することにより、悪性中皮腫細胞株を樹立した。また、胸水あるいは腫瘍組織を、10%ウシ胎児血清を含む -MEM 培地で短期間培養して、培養中皮腫細胞を得た。悪性中皮腫細胞株や培養中皮腫細胞から RNA を抽出し、それぞれの細胞の遺伝子発現プロファイルを Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 array により取得し、上皮型中皮腫と肉腫型中皮腫の遺伝子発現プロファイルを比較した。

(2) 悪性中皮腫における遺伝子発現の解析：  
同意の得られた患者の胸水あるいは腹水を、10%ウシ胎児血清を含む -MEM 培地で培養して、培養中皮細胞を得た。悪性中皮腫細胞株、培養中皮腫細胞、培養中皮細胞から RNA を抽出し、それぞれの細胞の遺伝子発現プロファイルを Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 array により取得し、悪性中皮腫(悪性

中皮腫細胞株および培養中皮腫細胞)と中皮細胞(培養中皮細胞)の遺伝子発現プロファイルを比較した。

### (3) タンパク質発現の解析：

悪性中皮腫細胞株、培養中皮腫細胞、培養中皮細胞の全タンパク質を、SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、分離されたタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。転写されたタンパク質を、1次抗体で反応させた後、ペルオキシダーゼ(HRP)で標識された二次抗体および蛍光試薬を用いて、目的とするタンパク質を検出した(ウエスタンブロット法)。

(4) エピジェネティクス関連遺伝子の解析：  
悪性中皮腫(悪性中皮腫細胞株および培養中皮腫細胞)と中皮細胞(培養中皮細胞)の遺伝子発現プロファイルを比較し、エピジェネティクスに関連する遺伝子の発現を検討した。悪性中皮腫において、中皮細胞よりも発現が増強していたエピジェネティクス関連遺伝子である EZH2 遺伝子については、胸膜生検、肺部分切除(あるいは肺葉切除)の病理組織標本を用いて免疫染色を行い、悪性中皮腫の病理検体における発現の増強を検討した。

### (5) EZH2 の生物学的作用の解析：

piLenti-siRNA-GFP ベクターを用いて、悪性中皮腫細胞株に EZH2-siRNA を導入して、EZH2 遺伝子の発現を抑制した悪性中皮腫細胞株を作製した。EZH2-siRNA を導入した悪性中皮腫細胞株において、EZH2 mRNA の発現が抑制されていることを確認するために、リアルタイム PCR 法を行った。EZH2 タンパク質の発現が抑制されていることを確認するために、ウエスタンブロット法を行った。EZH2 発現抑制細胞株と親細胞株の細胞増殖能を in vitro アッセイで比較し、悪性中皮腫の増殖における EZH2 の生物学的作用について検討した。

### (6) EZH2 の臨床病理学的検討：

胸膜肺全摘術により摘出された腫瘍組織(悪性胸膜中皮腫)の病理組織標本を用いて、EZH2 免疫染色を行った。悪性胸膜中皮腫における EZH2 発現の強度および局在と臨床病理学的所見(特に予後)との関連性について統計的に検討した。

### 4. 研究成果

(1) 悪性中皮腫細胞株および培養中皮腫細胞を用いて、上皮型中皮腫と肉腫型中皮腫の遺伝子発現プロファイルを比較すると、肉腫型中皮腫では上皮型中皮腫よりも、上皮間葉転換の鍵分子である E-cadherin (CDH1) の発現が有意に低下し、E-cadherin の発現を抑制する bHLH 型転写因子である twist1 の発現が増強していた。悪性中皮腫の多様な組織像(上皮型～肉腫型)には、上皮間葉転換

(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) が深く関与していると考えられる。また、肉腫型中皮腫は上皮型中皮腫に比べて、胸壁浸潤が強く予後が悪いことが知られており、E-cadherin の減少や Twist1 などの上皮間葉転換誘導因子の増強は、癌の場合と同じように、悪性中皮腫の進展・浸潤にも深く関わっている可能性がある。

(2) 悪性中皮腫（悪性中皮腫細胞株および培養中皮腫細胞）と中皮細胞（培養中皮細胞）の遺伝子発現プロファイルと比較すると、悪性中皮腫では中皮細胞よりも、leukocyte homing-associated cell adhesion receptor (CD44) が強く発現していた。癌細胞に CD44 を強制発現させると、上皮間葉転換が誘導されることから (Int J Oncol. 41:211-218, 2012)、悪性中皮腫における CD44 の高発現も、癌の場合と同じように、上皮間葉転換を誘導して、悪性中皮腫の進展・浸潤に関わっている可能性がある。

(3) 悪性中皮腫細胞株と培養中皮細胞における Twist1 の発現をウエスタンブロット法で調べると、悪性中皮腫細胞株は培養中皮細胞よりも Twist1 が強く発現していた。悪性中皮腫に強く発現する Twist1 は、上皮間葉転換を誘導して浸潤能を高めるばかりでなく、中皮細胞の悪性化にも関与している可能性がある。

(4) Polycomb 遺伝子群 (PcG) はクロマチン構造を変化させ、遺伝子の発現を抑制する遺伝子群であり、polycomb repressive complex (PRC) を形成して機能する。PRC2 の構成分子である EZH2 は、ヒストン H3 のメチル化を促進して様々な遺伝子の発現を抑制し、エピジェネティクスを担う重要な分子である。中皮腫細胞（悪性中皮腫細胞株および培養中皮腫細胞）と中皮細胞（培養中皮細胞）の遺伝子発現プロファイルを用いて、エピジェネティクス関連遺伝子の発現を比較すると、多くの悪性中皮腫は中皮細胞よりも EZH2 の発現が増強していた。

悪性中皮腫細胞株と培養中皮細胞における EZH2 の発現をウエスタンブロット法で調べると、悪性中皮腫細胞株は培養中皮細胞よりも EZH2 の発現が亢進していた。また、胸膜生検、肺部分切除（あるいは肺葉切除）の病理組織標本を用いて、悪性胸膜中皮腫および反応性中皮における EZH2 の発現を免疫染色で調べると、多くの悪性胸膜中皮腫は反応性中皮よりも EZH2 が強く発現していた。

EZH2 は、中皮細胞の悪性化に関与している可能性があり、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。

(5) リアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法により、EZH2-siRNA を導入した悪性中皮腫細胞は、親細胞株に比べて、EZH2 の発

現抑制されていることが確認された。このような EZH2 の発現が抑制された悪性中皮腫細胞株は、親細胞株に比べて、細胞増殖能が低下していた。悪性中皮腫に強く発現する EZH2 は、H3K27 トリメチル化修飾によるエピジェネティクス機構を介して種々の遺伝子の発現を制御し、悪性中皮腫の増殖を促進させていると考えられる。

(6) 胸膜肺全摘術により摘出された腫瘍組織の病理組織標本を用いて、悪性胸膜中皮腫における EZH2 発現の強度および局在と臨床病理学的所見（生物学的特性）との関連性について検討した。EZH2 発現の強い症例ほど全生存率は低く、EZH2 が腫瘍の辺縁部（間質浸潤部）に強く発現する症例ほど死亡率が高かった。

悪性中皮腫に強く発現する EZH2 は、悪性胸膜中皮腫の進展・浸潤に関与していると考えられ、EZH2 を分子標的にした新規治療法を開発することにより、悪性中皮腫の予後改善が期待される。

## 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11件)

Tanaka I, Sato A, Tsujimura T et al (全11名, 10番目) LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. *Oncogene*. 査読有. 16. 2013. doi: 10.1038/onc.2013.528.

Yoneda K, Sato A, Tsujimura T et al (全15名, 10番目) Circulating tumor cells (CTCs) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *Ann Surg Oncol*. 査読有. 4. 2013. doi: 10.1245/s10434-012-2506-0.

Okazaki Y, Tsujimura T, Toyokuni S et al (全7名, 6番目) CD146 and insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 predict prognosis of asbestos-induced rat mesothelioma. *Cancer Sci*. 査読有. 104. 2013. 989-995. doi: 10.1111/cas.12185.

Matsumoto S, Nabeshima K, Tsujimura T et al (全10名, 10番目) Morphology of 9p21 homozygous deletion-positive pleural mesothelioma cells analyzed using fluorescence in situ hybridization and virtual microscope system in effusion cytology. *Cancer Cytopathol*. 査読有. 121. 2013. 415-422. doi: 10.1002/cncy.21269.

Yoneda K, Sato A, Tsujimura T et al (全15名, 11番目) Circulating endothelial cell (CEC) as a diagnostic and prognostic marker in malignant pleural

mesothelioma (MPM). *Ann Surg Oncol*. 査読有. 19. 2012. 4229-4237.

doi: 10.1245/s10434-012-2506-0.

Tsujimura T, Torii I, Sato A et al (全7名, 1番目) Pathological and molecular biological approaches to early mesothelioma. *Int J Clin Oncol*. 査読有. 17. 2012. 40-47.

doi: 10.1007/s10147-011-0369-1.

Fujii M, Tsujimura T, Sekido Y et al (全14名, 12番目) TGF- synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med*. 査読有. 209. 2012. 479-494.

doi: 10.1084/jem.20111653.

Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T et al (全15名, 3番目) Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. *Cancer Sci*. 査読有. 103. 2012. 868-874.

doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02223.x.

Hasegawa S, Torii I, Tsujimura T et al (全14名, 13番目) Practical approaches to diagnose and treat for T0 malignant pleural mesothelioma: a proposal for diagnostic total parietal pleurectomy. *Int J Clin Oncol*. 査読有. 17. 2012. 33-39.

doi: 10.1007/s10147-011-0368-2.

Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T et al (全14名, 3番目) Frequent deletion of 3p21.1 region carrying semaphorin 3G and aberrant expression of the genes participating in semaphorin signaling in the epithelioid type of malignant mesothelioma cells. *Int J Oncol*. 査読有. 39. 2011. 1365-1374.

doi: 10.3892/ijo.2011.1158.

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. 648-655.

doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01827.x.

[学会発表](計11件)

工藤朝雄、佐藤鮎子、鳥井郁子、辻村亨 他 (全7名, 7番目) 悪性胸膜中皮腫における組織レベルの3次元形態解析法の構築 浸潤形態と腫瘍微小環境の関連性、第54回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2013年9月27日、航空会館(東京)

佐藤鮎子、鳥井郁子、辻村亨 他(全5名, 5番目) 悪性胸膜中皮腫における可溶性CD146の診断バイオマーカーとしての有用性、第102回日本病理学会総会、2013年6月7日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館(札幌)

辻村亨、鳥井郁子、佐藤鮎子 他(全6名, 1番目) 悪性胸膜中皮腫の病理診断における胸水細胞診の現状と問題点、第54回日本臨床細胞学会総会 春期大会、2013年6月1日、グランドプリンスホテル新高輪・国際館パミール(東京)

辻村亨、鳥井郁子、佐藤鮎子 他(全8名, 1番目) 胸水細胞診で早期中皮腫を診断するにあたり知っておくべき問題点、第51回日本臨床細胞学会秋期大会、2012年11月9日、朱鷺メッセ、新潟コンベンションセンター(新潟)

Yoneda K, Sato A, Tsujimura T et al (全15名, 11番目) Circulating tumor cell (CTC) as a significant clinical marker in epithelioid-type malignant pleural mesothelioma (MPM). 2012 Annual Meeting, American Society of Clinical Oncology. 2012年6月2日。(Chicago)

Tsujimura T. Differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium in pleural effusion cytology -molecular biological approach, The 19th Thai-Japanese Workshop in Diagnostic Cytopathology. 2012年1月18日. Sukhothai Treasure Resort & Spa. Thailand (Sukhothai)

吉川良恵、佐藤鮎子、辻村亨 他(全8名, 6番目) 悪性中皮腫細胞における3p21.1領域の欠失およびセマフォリン3ファミリー遺伝子の発現抑制、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日、名古屋国際会議場(名古屋)

鳥居良貴、石田誠実、辻村亨 他(全9名, 9番目) 肉腫型悪性胸膜中皮腫の細胞学的検討、第50回日本臨床細胞学会秋期大会、2011年10月23日、京王プラザホテル(東京)

Tanaka F, Tsujimura T, Nakano T et al (全11名, 9番目) Circulating tumor cell (CTC) as a clinical marker in malignant pleural mesothelioma (MPM). 2011 Annual Meeting, American Society of Clinical Oncology. 2011年6月3-7日。(Chicago)

Yoneda K, Sato A, Tsujimura T et al (全15名, 10番目) Circulating endothelial cell (CEC), a surrogate of tumor angiogenesis, as a diagnostic and prognostic marker in malignant pleural mesothelioma (MPM). 2011 Annual Meeting, American Society of Clinical Oncology. 2011年6月3-7日。(Chicago)

佐藤鮎子、鳥井郁子、辻村亨 他(全6名, 6番目) 悪性中皮腫の鑑別診断におけるCD146免疫染色の有用性、第100回日本病理学会総会、2011年4月28日、パシフィコ横浜(横浜)

[図書](計2件)

辻村亨、佐藤鮎子 他、医薬ジャーナル社、胸膜全書 胸膜疾患のグローバルスタン

ダード、2013、105-112  
辻村亨、鳥井郁子、佐藤鮎子 他、中山書店、癌診療指針のための病理診断プラクティス、2011、247-58

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・准教授  
研究者番号：70207661

佐藤 鮎子 (SATO, AYUKO)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20419823