

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592107

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫における診断および治療の標的となる腫瘍関連遺伝子の探索

研究課題名(英文) Research of tumor-associated genes of target for the diagnosis and treatment in malignant pleural mesothelioma (MPM).

研究代表者

竹中 賢 (TAKENAKA, Masaru)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：80620351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫(MPM)は石綿曝露に起因する予後不良の疾患であり、今後も増加することが予想される。本研究ではMPMにおける早期発見及びより良い治療方法の探索のための病態の解明を目的とした。MPMにおける診断マーカーとしてGene XとTHBS2の有用性を検討し、THBS2は早期診断のマーカーとして有用であったが、予後との相関は認めなかった。また、MPMにおける上皮間葉移行(EMT)関連マーカーについて検討を行った結果、個々のマーカーはMPMの進行に寄与しない可能性があり、 β -catenin発現陰性かつTwist発現陽性症例は予後不良の可能性あることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a poor prognosis disease caused by asbestos exposure, and is expected to increase in the future. In this study, we intended the early detection of MPM and the elucidation of the pathology for the search of better treatment method. We reviewed the usefulness of Gene X and THBS2 as a diagnostic marker in MPM. THBS2 was useful marker for early diagnosis, but correlation with prognosis was not observed. In addition, we examined the epithelial-mesenchymal transition (EMT) related markers in MPM. Although each marker may not contribute to the progression of MPM, β -catenin expression-negative and twist expression-positive patients have poor prognosis.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 バイオマーカー THBS2 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は石綿曝露に起因する予後不良の疾患であり、日本社会全体の環境問題となっている。1997年には中皮腫による死亡者数は597名であったのに対して、2007年には、1068名と増加している。中皮腫発症までの潜伏期間は平均30-50年と非常に長いこと、我が国での石綿の全面使用禁止が2004年であったこと、現時点から2040年にかけて建築物解体の時期を迎えること、地震などの災害時には建造物からのアスベスト飛散が指摘されていることなどから、さらに今後とも増加することが予想される。

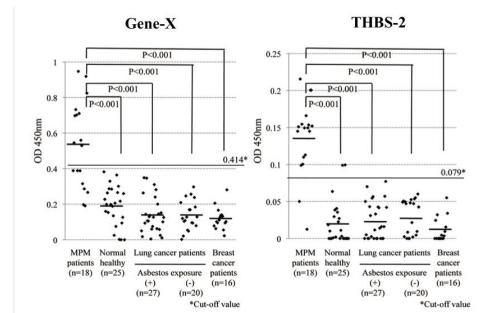
その上、胸膜中皮腫は早期発見することは困難であり、有効な治療法が未だ確立されていない。外科的治療法は、根治を目指して胸膜肺全摘術がなされる場合が多いが、侵襲の大きな手術である上に、外科治療単独にて生存期間を有意に延長できたという報告はない。手術、放射線療法、化学療法が悪性胸膜中皮腫の治療の中心ではあるが、いずれの治療も単独では有意な延命効果は得られていないのが現状である。

悪性胸膜中皮腫の診断および治療を考える上で、分子生物学手法を用いることにより、その分子標的を明らかにして、疾患の制御を試みることは、治療成績の向上を目指す上で極めて重要な課題である。

これまでに当教室では、悪性胸膜中皮腫、肺癌、食道癌に対して、免疫学的手法を用いて、腫瘍関連抗原の探索を続けてきた。すなわち、腫瘍に浸潤するB細胞に着目し、この腫瘍浸潤B細胞の産生する抗体をプローブとして、SEREX(serological identification of antigens by recombinant expression cloning)法により癌関連遺伝子を同定してきた。これまでに、悪性胸膜中皮腫においてThrombospondin、Gene X、肺癌においてはADAMTS遺伝子、UOEH-LC-1など、食道癌においては、14-3-3などの腫瘍関連遺伝子を同定してきた(Shigematsu et al. Malignant mesothelioma-associated antigens recognized by tumor-infiltrating B cells and the clinical significance of the antibody titers. *Cancer Sci.* 2009 100: 1326-34.、Mizukami et al. Antitumor effect of antibody against a SEREX-defined antigen (UOEH-LC-1) on lung cancer xenotransplanted into severe combined immunodeficiency mice. *Cancer Res.* 2007 67: 8351-7.)

これらの腫瘍関連遺伝子のうち、Thrombospondinは血管新生に、ADAMTSファミリー遺伝子は細胞外マトリックス分解な

らびに腫瘍の浸潤に關与することが予想される。また、14-3-3は、アポトーシスに關する役割を担っている。また、Gene X遺伝子は、機能不明の遺伝子であるが、Gene X遺伝子は、そのコードする蛋白に対する抗体が悪性中皮腫の患者の血清にて高率に検出されることより、悪性胸膜中皮腫の診断のマーカーとなることが期待される。(下図)



また、UOEH-LC-1遺伝子も機能不明の遺伝子であるが、細胞外領域を有する腫瘍関連抗原であり、UOEH-LC-1に対する抗体は、抗腫瘍効果を有することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、悪性胸膜中皮腫における上記腫瘍関連遺伝子の役割を解明すると共に、診断のマーカーとなり得るかを明らかにし、これらの分子の発現やシグナルを制御することによる治療の可能性を探索する。

さらに、兵庫医科大学との共同研究として、当施設および兵庫医科大学の悪性胸膜中皮腫の症例の血清における、Thrombospondin、Gene Xの血清抗体価を測定し、血清診断マーカーとしての意義を明らかにする。

3. 研究の方法

< 現状 >

(1) 悪性胸膜中皮腫細胞株の樹立

2006年より悪性胸膜中皮腫症例において外科的手術を行った症例より悪性胸膜中皮腫の組織を採取し、細胞培養液(RPMI)を加え碎屑後、37℃、5%CO₂下で培養を行い、2株の悪性胸膜中皮腫株を得た。

(2) 悪性胸膜中皮腫細胞の切除組織および患者血清のバンク

手術時・生検時に得られた胸膜中皮腫組織を-80℃で凍結保存した。また、HE染色や各種抗体による免疫組織化学染色を行うための標本(ホルマリン、パラフィン固定)

を作製している。

(3) 悪性胸膜中皮腫に浸潤する B 細胞の産生する抗体の採取

悪性胸膜中皮腫に浸潤する B 細胞の産生する抗体を得るために、腫瘍組織を免疫不全(SCID)マウスの側腹部に移植し、2週間毎に血清を採取する。マウス血清中のヒト型 IgG を ELISA 法にて、IgG 濃度を確認する

< 研究計画 >

(1) 腫瘍内浸潤 B 細胞が産生する抗体の認識する腫瘍抗原の同定

腫瘍浸潤 B 細胞由来のヒト型 IgG は、癌特異性の高いものであると考え、悪性中皮腫に浸潤する B 細胞由来のヒト型抗体をプローブとして、SEREX 法 (Serological identification of antigens by recombinant expression cloning) にて、スクリーニングを行い、悪性胸膜中皮腫関連抗原の同定を行う。

(2) 悪性胸膜中皮腫の血清学的診断の有用性の検討

当研究室および兵庫医科大学における悪性胸膜中皮腫血清において、同定した抗原に対する抗体が、胸膜中皮腫症例での血清中に検出される頻度を ELISA 法で検出する。また、抗体価の推移と臨床経過 (手術、化学療法などの) の相関を検討し、腫瘍マーカーとしての意義を検討する。

健常人や肺癌患者の血清中にも同定された抗原に対する抗体が検出されるかを調べ、同定された抗原が悪性胸膜中皮腫に特異的なものかを検討する。

(3) 同定した抗原遺伝子の発現解析

単離した腫瘍関連遺伝子の胸膜中皮腫組織における発現を RT-PCR 法またはリアルタイム PCR 法で調べ、その遺伝子の発現頻度の検討を行う。また、正常組織 (正常肺、気管、甲状腺、筋肉、全脳、肝臓、心臓など) での抗原遺伝子の発現の分布を解析し、腫瘍特異性を検討する。

血清中の当該遺伝子の検出
近年、癌細胞など疾患の原因細胞に由来する DNA の断片が血液中に浮遊していることが知られるようになってきている。そこで、当研究室および兵庫医科大学における悪性胸膜中皮腫血清において、同定した抗原遺伝子が、胸膜中皮腫症例での血清中に検出される頻度を PCR 法で検出する。また、抗体価の推移と臨床経過 (手術、化学療法

など) の相関を検討し、当該遺伝子の腫瘍マーカーとしての意義を検討する。

(4) 同定した抗原遺伝子を標的とした治療法の探索

同定 腫瘍関連遺伝子の機能を解析するために、悪性胸膜中皮腫細胞株を用いて、それぞれの遺伝子を標的として、siRNA によりロックアウトさせ、胸膜中皮腫細胞株の増殖能、浸潤能の変化を解析する。細胞増殖は、³H-thymidine uptake もしくは MTT assay で行う。浸潤能はマトリゲルアッセイで行う。

抗体療法の標的としての可能性の検討として、同定した腫瘍抗原について、胸膜中皮腫における発現頻度、正常細胞における発現分布を検討する。細胞外領域を持つ抗原に対して、モノクローナル抗体を作製し、抗体依存性細胞介在性障害活性 (ADCC) や補体依存性細胞障害活性 (CDC) が認められるか否かを検討する。

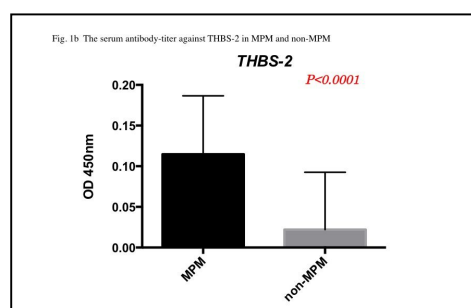
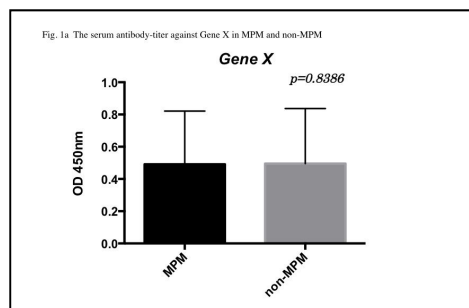
4. 研究成果

(1) 悪性胸膜中皮腫における GeneX と THBS2 の診断マーカーとしての有用性の検討

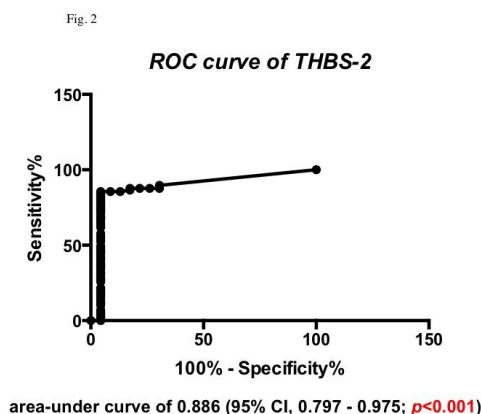
当科にて液性免疫の手法 (SEREX 法) を用いて同定した悪性中皮腫の腫瘍関連遺伝子の Thrombospondin2 (THBS2) および Gene-X についてその正当性を検討した。

兵庫医科大学との共同研究として、中皮腫患者血清 97 例、胸膜炎など非中皮腫患者血清 23 例の血清を用いて THBS-2 及び Gene-X の診断マーカーとしての有用性について ELISA 法を用いて検討した。

その結果、Gene-X は中皮腫と非中皮腫との鑑別に有用とはならなかったが、THBS-2 は有意差を持って中皮腫患者血清において高値であった。



THBS-2 の診断能は ROC 曲線解析の結果から AUC-ROC=0.886 ($p<0.001$)、感度 86%、特異度 96%と良好な結果が得られた。これにより、悪性胸膜中皮腫患者血清中の THBS-2 値が早期診断のマーカーとなる可能性があることが示された。



しかし、この血清中 THBS-2 値は悪性胸膜中皮腫の clinical stage 及び組織型とは有意な相関は認めなかった。

(2) 悪性胸膜中皮腫における上皮間葉転換関連マーカーの臨床的意義における検討

MPM における EMT 関連マーカーの発現と臨床病理学的因子および予後との関係を検討した。

1998 年～2012 年までに当科で MPM の診断が得られた 33 例を対象とし、EMT 関連マーカー (E-cadherin、 β -catenin、vimentin、fibronectin、Twist、YB-1) 発現の有無は免疫組織化学染色法を用いて評価した。

E-cadherin、 β -catenin、vimentin、fibronectin、Twist、YB-1 の陽性発現はそれぞれ 25 人、14 人、21 人、1 人、19 人、18 人の患者で観察された。EMT 関連マーカーと臨床背景に関連は認めなかった。EMT 関連マーカーと組織型に関しては β -catenin の発現頻度は上皮型で高い傾向にあり、逆に肉腫型では低い傾向にあった。肉腫型において vimentin と Twist と YB-1 の発現頻度が高い傾向にあり、Twist に関しては上皮型と比較して有意差をもって発現頻度が高かった。

生存分析では各 EMT 関連マーカーの発現の有無で有意差は認めなかったが、 β -catenin 発現陰性かつ Twist 発現陽性で予後不良の傾向が認められた。特に上皮型では、 β -catenin 発現陰性かつ Twist 発現陽性症例で有意差を持って予後不良であった。EMT 関連マーカーの発現は MPM 患者において一般的に見られるが、個々のマーカーは MPM の進行に寄与しない可能性があり、

β -catenin 発現陰性かつ Twist 発現陽性症例は予後不良の可能性があることが示唆された。

(3) 悪性胸膜中皮腫に対する血清診断マーカーの探索の前試験としての非小細胞肺癌における血清オステオポンチンの予後因子としての意義の検討

オステオポンチン (OPN) は細胞外マトリックスにもサイトカインにも分類される糖蛋白で、炎症、免疫調節、組織リモデリング、癌転移などに関わるといわれ、胸膜中皮腫における血清診断マーカーの意義が示唆されている。今回、悪性胸膜中皮腫に対する血清診断マーカーの探索の前試験としての非小細胞肺癌における血清オステオポンチンの予後因子としての意義について検討した。

2004 年から 2007 年において当科で完全切除を施行した非小細胞肺癌患者 326 例のうち術前血清を評価し得た 244 例を対象とし、血清中 OPN の濃度測定は ELISA 法を用いて測定した。

244 例のうち組織型別には腺癌 172 例、扁平上皮癌 49 例、その他 23 例であった。244 例の術前血清 OPN の平均値は 87.6ng/ml であり、90ng/ml を超える群を higher group とした。患者背景としては男性、扁平上皮癌の症例においてそれぞれ有意に血清中 OPN 値は高かった。術後 5 年生存率については血清 OPN 値 higher group は 62.5%、lower group は 81.7%と有意に予後不良であった ($p<0.001$)。病理学的胸膜浸潤、血管浸潤、リンパ管浸潤の検討では、胸膜浸潤陽性例・血管浸潤陽性例では有意に血清 OPN 値が高値であった ($p=0.002$, $p=0.039$)。また、術後生存における予後因子について多変量解析を行ったが、血清中 OPN higher group は男性例 ($p=0.004$)、N 因子陽性例 ($p<0.001$) とともに独立した予後不良因子であった ($p=0.010$)。

以上より、非小細胞肺癌切除症例において術前血清中 OPN 高値例は予後不良であり、OPN 高値例は胸膜浸潤、血管浸潤が高度であった。

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 5 件)

- Hanagiri T, Fukumoto M, Tanaka F. Regulatory T-cells and micrometastasis in lymph nodes of stage NSCLC. Anticancer Res, 査読有、34 巻、2014、7185-7190
- Iwanami T, Uramoto H, Tanaka F. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition-associated markers in malignant pleural mesothelioma. Oncology, 査読有、86 巻、2014、109-116
- Hanagiri T, Takenaka M, Oka S、

Shigematsu Y, Nagata Y, Shimokawa H, Uramoto H, Tanaka F. Clinical significance of the frequency of regulatory T cells in regional lymph node lymphocytes as a prognostic factor for non-small-cell lung cancer. Lung Cancer、査読有、81 巻、2013、475-479
Hanagiri T, Takenaka M, Oka S, Shigematsu Y, Nagata Y, Shimokawa H, Uramoto H, Tanaka F. Clinical significance of expression of cancer/testis antigen and down-regulation of HLA class- in patients with stage non-small cell lung cancer. Anticancer Res、査読有、33 巻、2013、2123-2128
Takenaka M, Hanagiri T, Shinohara S, Yasuda M, Chikaishi Y, Oka S, Shimokawa H, Nagata Y, Nakagawa M, Uramoto H, So T, Yamada S, Tanaka F. Serum level of osteopontin as a prognostic factor in patients who underwent surgical resection for non-small-cell lung cancer. Clin lung Cancer、査読有、14 巻、2013、288-294

重松 義紀 (SHIGEMATSU, Yoshiki)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：10546469

花桐 武志 (HANAGIRI, Takeshi)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：30299614

〔学会発表〕(計2件)

Takenaka M, Tanaka F, Shigematsu Y, Hanagiri T, et al. Novel malignant-mesothelioma-associated antigens (Gene-X and THBS-2) in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma (MPM). 11th International conference of the International Mesothelioma Interest Group (IMIG)、2012年9月11-14日、ボストン市(米国)
竹中賢、重松義紀、花桐武志、田中文啓ら、非小細胞肺癌における血清オステオポンチンの予後因子としての意義、第29回日本呼吸器外科学会、2012年5月17-18日、秋田県民会館(秋田市千秋明德町)

〔その他〕

ホームページ情報：下記に掲載
http://www.uoeh-hospital.jp/hospital/introduction/sec_fac/006.html
または
http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/2geka/intro_j.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹中 賢 (TAKENAKA, Masaru)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：80520351

(2)研究分担者

田中 文啓 (TANAKA, Fumihiro)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：10283673