

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07425

研究課題名(和文) NF2遺伝子変異に着目した悪性中皮腫の診断法および治療法の確立

研究課題名(英文) NF2 genetic alterations in diagnosis of malignant mesothelioma

研究代表者

佐藤 鮎子 (Sato, Ayuko)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20419823

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)：悪性中皮腫で認められるNF2遺伝子異常に着目し、その遺伝子産物Merlinに対する免疫染色の病理診断における有用性について検討した。NF2遺伝子異常を有する中皮腫細胞株を用いて、NF2遺伝子異常の有無がMerlin染色性に反映される免疫染色法を見出した。この手法を用いて、日本人悪性胸膜中皮腫の腫瘍組織や胸水から得られた培養細胞や臨床検体を解析すると、全エクソーム解析やFISH法で示されるNF2遺伝子の情報とMerlin染色性に相関が認められたことより、Merlin免疫染色は悪性中皮腫におけるNF2/Merlinの不活化を調べるスクリーニング法として有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異型中皮細胞の良悪性の判定においては、悪性中皮腫に特徴的ながん抑制遺伝子の異常の検出が有用であり、CDKN2AおよびBAP1遺伝子の異常については日常の病理診断に取り入れられるようになってきたが、NF2遺伝子についてはほとんど解析されてこなかった。本研究成果により、NF2遺伝子異常の有無を予測する簡便な手法としてMerlin免疫染色の有用性が示されたことより、NF2/Merlin不活化が発症に関与する中皮腫を見出し、適切な治療法の選択に繋がるのが期待される。

研究成果の概要(英文)：The NF2 gene is often altered in malignant mesothelioma. The utility of immunostaining against Merlin, a protein coded by the NF2 gene, in pathological diagnosis was investigated. By using mesothelioma cell lines with the mutated NF2 gene, we found an immunohistochemical method in which Merlin immunostaining properties were concordant with the mutation status of the NF2 gene. In cultured mesothelioma cells and clinical specimens obtained from tumor tissues or pleural effusions of Japanese patients with malignant pleural mesothelioma, Merlin immunostaining properties were correlated with the mutation status of the NF2 gene identified by whole exome sequencing or NF2 FISH analysis. These results suggested that Merlin immunostaining is a useful screening method to investigate the inactivation of NF2/Merlin in malignant mesothelioma.

研究分野：病理学

キーワード：悪性中皮腫 NF2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、アスベスト曝露に起因して発生する難治性腫瘍であり、高度成長期のアスベスト大量使用の影響を受けて、発症数の増加が続いている。診断技術の向上により、比較的早期に発見される症例も徐々に増えているが、現在行われている集学的治療による延命効果は十分ではなく、有効な治療法の確立が求められている。しかし、悪性中皮腫では分子標的治療のターゲットとなり得る活性型のがん遺伝子変異や融合遺伝子などのドライバー遺伝子変異は見出されておらず、その発症や病態には、がん抑制遺伝子の不活化変異が深く関与すると考えられている。悪性中皮腫で高頻度に異常が認められるがん抑制遺伝子として、cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)、BRCA1-associated protein-1 (BAP1)、Neurofibromatosis type 2 (NF2) などが報告されており、これらの遺伝子異常の検出は、早期症例の診断で問題となる中皮細胞の良悪性の判定に有用である。このうち CDKN2A 遺伝子の欠失を調べる FISH 法、またはその近傍遺伝子がコードする methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) の免疫染色による代替法や、BAP1 遺伝子の変異を免疫染色によって調べる手法は、その有用性が確立されたことにより、日常の病理診断に取り入れられるようになった。一方、悪性中皮腫の約 40% で変異が認められる NF2 遺伝子は、その遺伝子産物 Merlin が Hippo シグナル伝達経路などの増殖制御機構と密接に関わる因子であるため治療標的となる可能性があるが、中皮細胞の良悪性の判定を目的に NF2 遺伝子異常が調べられる機会は少ない。最近、NF2 FISH 法による hemizygous 欠失の検出が悪性中皮腫の診断に有用であることが報告されたが、FISH 法による解析が可能な施設は限られており、NF2 遺伝子に着目した効率的な診断法の普及や有効な治療法の確立には至っていない。

2. 研究の目的

悪性中皮腫に特徴的な遺伝子異常のうち、CDKN2A や BAP1 の遺伝子異常の検出は日常の病理診断に取り入れられるようになったが、NF2 遺伝子異常についてはほとんど解析されていない。本研究においては、適切な患者選択に基づく新たな治療戦略の確立に向けて、NF2 遺伝子異常を効率的に検出可能な病理学的手法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

NF2 遺伝子異常が同定されている入手可能な中皮腫培養細胞株を用いて、種々の Merlin 抗体を用いた免疫染色法を検討し、Merlin 染色性と NF2 遺伝子異常の有無が一致する手法を同定した。日本人悪性胸膜中皮腫の腫瘍組織および胸水中の細胞から得られた培養細胞を用いて、全エクソーム解析によって明らかになった NF2 遺伝子の情報と Merlin 免疫染色の結果を比較し、NF2 遺伝子異常の詳細と Merlin 染色性の相関を調べた。悪性胸膜中皮腫症例の胸水セルブロック標本および組織標本を対象に、NF2 FISH 法による NF2 遺伝子解析の結果と、Merlin 免疫染色の結果を比較し、病理診断において NF2 遺伝子異常の有無を予測する上での Merlin 免疫染色の有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) NF2 遺伝子異常の有無が報告されている入手可能な中皮腫培養細胞株についてセルブロックを作製し、NF2 遺伝子産物 Merlin に対する免疫染色法を検討した。対照として、正常中皮細胞株 Met-5A を用いた。Met-5A 細胞および NF2 遺伝子に異常を認めない中皮腫細胞株 (3 株) では、細胞膜および細胞質に陽性を示した。一方、NF2 遺伝子に変異を有する細胞株 (3 株) では、明らかな陽性像は認められなかった (図 1) また、NF2 遺伝子に異常を認めないが、Merlin タンパク質の発現抑制が報告されている中皮腫細胞株 (1 株) においても、Merlin の発現は認められなかった。

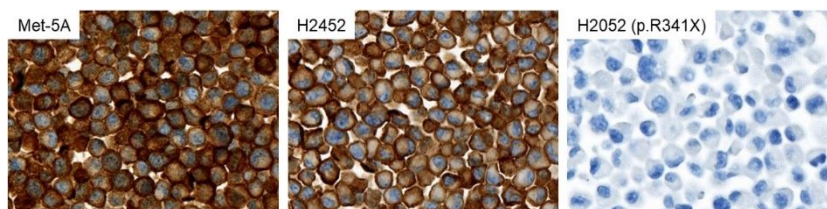


図 1. 中皮腫培養細胞株における Merlin 免疫染色法の検討

(2) 日本人悪性胸膜中皮腫の腫瘍組織および胸水中の細胞から得られた培養細胞を用いて、全エクソーム解析によって明らかになった NF2 遺伝子の情報と Merlin 免疫染色の結果を比較した。全エクソーム解析の結果、17 例中 12 例 (70.6%) では NF2 遺伝子に異常が認められず、5 例 (29.4%) で NF2 遺伝子の異常が認められた。これらの培養細胞を用いて Merlin 免疫染色を行うと、NF2 遺伝子に異常が認められなかった細胞では 12 例中 11 例 (91.7%) が Merlin 陽性を示したのに対して (図 2、MM165 および MM200)、NF2 遺伝子に異常が認められた 5 例においては、全例 (100%) で Merlin 免疫染色での発現消失を認めた (図 2、MM57 および MM244)。全エクソーム解析による NF2 遺伝子異常の検出と、Merlin 発現消失の全体一致率は 94.1% であり、NF2 遺伝子異常の予測には Merlin 免疫染色が有用であると考えられた。

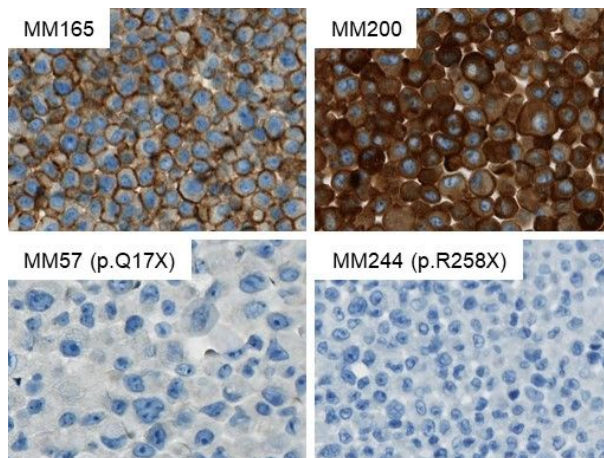


図 2 . 日本人悪性胸膜中皮腫より得られた中皮腫培養細胞における Merlin 免疫染色

(3) 悪性胸膜中皮腫の胸水セルブロック標本 (20 症例) を対象として、FISH 法による NF2 遺伝子解析と Merlin 免疫染色の結果を比較した。FISH 法による検討の結果、悪性中皮腫の診断に有用とされている NF2 遺伝子の hemizygous 欠失が 20 例中 10 例 (50%) で認められた。一部の細胞集団が明らかに Merlin 陰性を示す場合も発現消失と判定すると、FISH 法によって NF2 遺伝子に異常が認められなかった 10 例中の 7 例 (70%) では細胞膜あるいは細胞質に Merlin 陽性を示した (図 3、症例 1 および 2)。一方、NF2 遺伝子の hemizygous 欠失が示された 10 例では、全例 (100%) で Merlin 免疫染色での発現消失が認められた (図 3、症例 3 および 4)。FISH 法で示される NF2 遺伝子の hemizygous 欠失と Merlin 発現消失の全体一致率は 85% であり、胸水セルブロック標本を用いた検討においても、NF2 遺伝子異常の予測に Merlin 免疫染色が有用であることが示された。

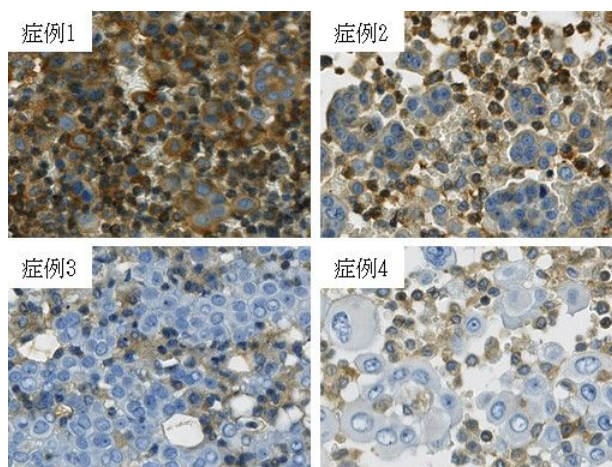
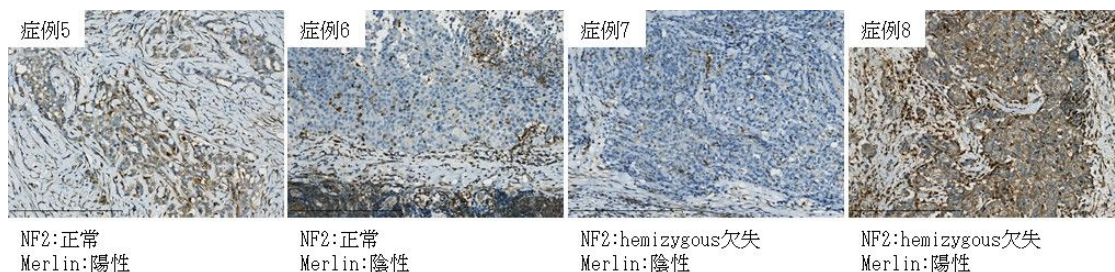


図 3 . 悪性胸膜中皮腫症例の胸水セルブロック標本における Merlin 免疫染色

(4) 悪性胸膜中皮腫の組織検体 (13 例) を対象として、FISH 法による NF2 遺伝子解析と Merlin 免疫染色の結果を比較した。症例の組織型は、上皮型 10 例、二相型 2 例、肉腫型 1 例であった。FISH 法による検討の結果、NF2 遺伝子の hemizygous 欠失が 13 例中 9 例 (69.2%) で認められた。FISH 法によって NF2 遺伝子の異常が認められなかった 4 例中の 2 例 (50%) が細胞膜あるいは細胞質に Merlin 陽性を示したが (図 4、症例 5)、2 例では Merlin の明らかな陽性像は認められなかった (図 4、症例 6)。一方、NF2 遺伝子の hemizygous 欠失が認められた 9 例のうち、7 例



NF2: 正常
Merlin: 陽性

NF2: 正常
Merlin: 陰性

NF2: hemizygous 欠失
Merlin: 陰性

NF2: hemizygous 欠失
Merlin: 陽性

図 4 . 悪性胸膜中皮腫症例の胸膜組織標本における Merlin 免疫染色

(77.8%)でMerlin発現消失が認められたが(図4、症例7)、2例では細胞膜あるいは細胞質にMerlinの陽性像を認めた(図4、症例8)。

胸水セルブロック標本での解析結果と併せると、悪性胸膜中皮腫の臨床検体を用いた検討において、FISH法で示されるNF2遺伝子のhemizygous欠失とMerlin発現消失の陽性一致率は89.5%、陰性一致率は64.3%、全体一致率は78.8%であった。

悪性中皮腫におけるNF2/Merlinの不活化は、遺伝子レベルでの変異や欠失などの異常に加えて、タンパク質レベルでの発現抑制も報告されている。本研究においても、FISH解析では異常が認められないのに対して、免疫染色ではMerlinの染色性が低下している症例が存在し、このような腫瘍においては、Merlinタンパク質の発現抑制によってNF2/Merlinの機能が不活化されていることが示唆された。また、全エクソーム解析によって示されたNF2遺伝子の情報との一致率と比較して、FISH法によって示されたhemizygous欠失との一致率が低かったことより、FISH法では検出されないような異常がタンパク質発現に影響している可能性や、特に胸膜組織における解析では、腫瘍のheterogeneityが判定に影響する点に注意が必要と考えられた。したがって、Merlin免疫染色において発現消失が認められた場合、確定診断を目的としたNF2遺伝子の欠失の確認が必要な症例については、シーケンス解析やFISH法などの詳細な検討の追加が望ましい場合もあるが、NF2/Merlinの不活化を調べるスクリーニング法として、Merlin免疫染色は簡便で有用な方法であると考えられた。今後の研究によりNF2遺伝子異常を標的とした効果的な治療法が確立されれば、NF2遺伝子異常が発症に関与する中皮腫症例が効率的に見出されることにより、適切な治療法の選択に繋がることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kinoshita Y, Hamasaki M, Matsumoto S, Yoshimura M, Sato A, Tsujimura T, Kamei T, Kawahara K, Iwasaki A, Nabeshima K	4. 巻 129
2. 論文標題 Fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 22 monosomy in pleural effusion cytology for the diagnosis of mesothelioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Cytopathology	6. 最初と最後の頁 526-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cncy.22409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oyama Y, Hamasaki M, Matsumoto S, Sato A, Tsujimura T, Nabeshima K	4. 巻 22
2. 論文標題 Short 57 kb CDKN2A FISH probe effectively detects short homozygous deletion of the 9p21?locus in malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.13074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimura M, Hamasaki M, Kinoshita Y, Matsumoto S, Sato A, Tsujimura T, Iwasaki A, Nabeshima K	4. 巻 70
2. 論文標題 Utility of highly expressed EZH2 in pleural effusion cytology for the diagnosis of mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 831-833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita Y, Hamasaki M, Matsumoto S, Yoshimura M, Sato A, Tsujimura T, Kamei T, Kawahara K, Nabeshima K	4. 巻 70
2. 論文標題 Genomic based ancillary assays offer improved diagnostic yield of effusion cytology with potential challenges in malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 671-679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto M, Yuki M, Nakamichi T, Nakamura A, Kuroda A, Matsumoto S, Kondo N, Sato A, Tsujimura T, Hasegawa S. Haigan	4. 巻 60
2. 論文標題 A Retrospective Single-Institutional Analysis of the Usefulness of Pleural Effusion-Cell Block for Diagnosing Malignant Pleural Mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haigan	6. 最初と最後の頁 972-978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2482/haigan.60.972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto M, Sato A, Kuroda A, Nakamura A, Nakamichi T, Kondo N, Yuki M, Nabeshima K, Tsujimura T, Hasegawa S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical feature of diagnostic challenging cases for pleural biopsy in patient with malignant pleural mesothelioma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gen Thorac Cardiovasc Surg.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11748-020-01295-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamasaki M, Kinoshita Y, Yoshimura M, Matsumoto S, Kamei T, Hiroshima K, Sato A, Tsujimura T, Kawahara K, Nabeshima K.	4. 巻 75
2. 論文標題 Cytoplasmic MTAP expression loss detected by immunohistochemistry correlates with 9p21 homozygous deletion detected by FISH in pleural effusion cytology of mesothelioma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 153-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.13872	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 4件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤 鮎子, 篠原 義康, 結城 美智子, 辻村 亨
2. 発表標題 悪性中皮腫細胞におけるアノイクス抵抗性の解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川 良恵, 江見 充, 米田 和恵, 大村谷 昌樹, 橋本 昌樹, 近藤 展行, 佐藤 鮎子, 長谷川 誠紀, 辻村 亨
2. 発表標題 デジタルMLPAで検出される悪性中皮腫のゲノムコピー数変化と患者予後との関連解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 鮎子, 結城 美智子, 篠原 義康, 竹下 純平, 油谷 浩幸, 関戸 好孝, 辻村 亨
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫におけるNF2遺伝子異常の解析
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠原 義康, 佐藤 鮎子, 結城 美智子, 辻村 亨
2. 発表標題 悪性中皮腫細胞株におけるNDN(Neccdin)の発現と細胞増殖についての検討
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 結城 美智子, 篠原 義康, 佐藤 鮎子, 辻村 亨
2. 発表標題 悪性中皮腫と類上皮細胞肉芽腫が併発した1例
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻村 亨, 結城 美智子, 隅田 安由美, 佐藤 鮎子, 篠原 義康, 鍋島 一樹, 橋本 昌樹, 長谷川 誠紀
2. 発表標題 胸部CT・胸腔鏡で所見の乏しい中皮腫の病態、治療および予後 レントゲンのT0 長期生存中皮腫症例の臨床病理学的所見
3. 学会等名 第61回日本臨床細胞学会総会春期大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱崎 慎, 木下 義晃, 松本 慎二, 佐藤 鮎子, 辻村 亨, 亀井 敏昭, 河原 邦光, 鍋島 一樹
2. 発表標題 中皮腫診断におけるBAP1・MTAP等を用いた良悪判定の実際と問題点 悪性胸膜中皮腫における遺伝子異常に基づく診断とその問題点
3. 学会等名 第59回日本臨床細胞学会秋期大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱崎 慎, 木下 義晃, 松本 慎二, 佐藤 鮎子, 辻村 亨, 岩崎 昭憲, 鍋島 一樹
2. 発表標題 中皮腫と反応性中皮増殖の鑑別におけるNF2 FISHの有用性
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤鮎子, 結城美智子, 篠原義康, 竹下純平, 油谷浩幸, 辻村 亨
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫におけるTRAF7遺伝子変異の解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原義康, 佐藤鮎子, 結城美智子, 辻村 亨
2. 発表標題 悪性中皮腫細胞株におけるp62/SQSTM1の機能解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小畑有未, 結城美智子, 佐藤鮎子, 篠原義康, 辻村 亨
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫の早期発見 胸水セルブロックを用いた免疫染色の有用性
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鍋島一樹, 濱崎 慎, 木下義晃, 吉村雅代, 松本慎二, 佐藤鮎子, 辻村 亨, 亀井敏昭, 岩崎昭憲
2. 発表標題 臓器病理学の最近の進歩 胸部腫瘍性疾患のアップデート, Sarcomatoid mesotheliomaのアップデート
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsujimura T, Sato A, Yuki M, Shinohara Y, Takeshita J, Aburatani H, Sekido Y.
2. 発表標題 Malignant pleural mesothelioma with TRAF7 gene mutation.
3. 学会等名 31st European Congress of Pathology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻村 亨, 結城美智子, 篠原義康, 隅田安由美, 佐藤鮎子
2. 発表標題 中皮腫アップデート 早期診断を目指して
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会秋期大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱崎 慎, 木下義晃, 松本慎二, 佐藤鮎子, 辻村 亨, 河原邦光, 廣島健三, 亀井敏昭, 鍋島一樹
2. 発表標題 呼吸器 (ヨーロッパ細胞学会の内容から) 中皮腫の細胞診診断update 中皮腫の遺伝子変異に基づく補助診断法
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本昌樹, 中道 徹, 中村晃史, 黒田鮎美, 松本成司, 近藤展行, 結城美智子, 佐藤鮎子, 辻村 亨, 長谷川誠紀
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫診断における胸水セロボック法の有用性についての単一施設後ろ向き研究
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tsujiura T, Yuki M, Shinohara Y, Sato A	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 352
3. 書名 Malignant Pleural Mesothelioma. Advances in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatments	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	辻村 亨 (Tsujiura Tohru) (20227408)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	結城 美智子 (Yuki Michiko) (60467587)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	
研究分担者	篠原 義康 (Shinohara Yoshiyasu) (60723509)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	削除：2021年3月8日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関