

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790362

研究課題名（和文）悪性中皮腫の悪性度および発育進展に関与する細胞接着分子の解析

研究課題名（英文）Analysis of cell adhesion molecules involved in progression 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

研究成果の概要（和文）：悪性胸膜中皮腫における細胞接着分子の発現解析を行い、胸水中の悪性中皮腫細胞では細胞接着分子 CD146 の発現が強く認められるのに対して、反応性中皮細胞では認められないことを見出した。悪性胸膜中皮腫の同所移植モデルにおいても、マウス胸腔内で発育進展する悪性中皮腫細胞では CD146 の発現が認められるが、非腫瘍性のマウス中皮細胞ではその発現は認められなかった。CD146 は中皮細胞の腫瘍化に伴って発現し、悪性中皮腫細胞に特徴的な細胞像の形成に関与する可能性が示唆された。また、CD146 は、胸水細胞診において悪性胸膜中皮腫と反応性中皮とを鑑別し得る免疫染色マーカーであり、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 evaluated the expression of cell adhesion molecules in malignant pleural mesothelioma, and found that CD146 was strongly expressed in mesothelioma cells but not in reactive mesothelial cells, in pleural effusion fluids. Using an orthotopic implantation model of malignant pleural mesothelioma, we showed that CD146 was expressed in diffusely growing thoracic tumors, but not in murine mesothelial cells. Our results suggest that CD146 is up-regulated upon malignant transformation of mesothelial cells, and might be involved in manifestation of cytopathological features of malignant mesothelioma cells. We propose that CD146 is an effective immunostaining marker enabling discrimination between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium in effusion cytology, and 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
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：悪性中皮腫、細胞接着分子、CD146、胸水細胞診

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、体腔を覆う中皮細胞に発生

する極めて予後不良な悪性腫瘍である。その発症にはアスベスト曝露が深く関与し、日本

においても、20 世紀後半のアスベスト使用を原因とする中皮腫発症が急増している。また、アスベストを取り扱ったことによる職業曝露だけでなく、その近隣の居住者における中皮腫の発症が明らかになったことで問題はさらに拡大し、2025 年と推定される発症のピークを前に、早期診断法の確立や有効な治療法の開発が急務となっている。

悪性胸膜中皮腫は最も発生頻度の高い悪性中皮腫であり、その約 85%が胸水貯留で発症することから、胸水検査が診断の第一歩として重要な役割を担う。しかし、胸水細胞診では細胞形態学的に悪性中皮腫細胞と反応性中皮細胞とを鑑別することが困難な場合があり、また両者を鑑別し得る特異的な診断マーカーも確立されていない。この問題の解決が悪性中皮腫の早期診断に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

胸水細胞診で認められる悪性中皮腫細胞の形態的特徴として、細胞相互封入所見や多核細胞の出現などが挙げられる。これらの細胞像の形成には、細胞同士の接着を引き金とする細胞融合が関与すると考えられることから、悪性中皮腫細胞に発現する細胞接着分子が重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、これまでに診断や治療に結びつく有力な細胞接着分子は同定されていない。

本研究では、悪性胸膜中皮腫において、その発生や病態への関与が予想される細胞接着分子の発現を解析し、反応性中皮との鑑別診断マーカーとしての有用性や、中皮腫の発育における機能の解明を目的とする。その候補分子の一つとして、悪性黒色腫や前立腺癌などにおいて、その発現の強度と腫瘍の悪性度に関連性が示されている細胞接着分子 CD146 に着目する。

3. 研究の方法

(1) 胸水細胞診における CD146 の発現解析

病理組織学的に診断が確定された悪性胸膜中皮腫 23 例と、反応性中皮 28 例の合計 51 例を対象とした。これらの症例の細胞診標本を用いて、CD146 に対する異なる 2 クローンの抗体 (OJ79 および EPR3208) を用いて免疫染色を行い、免疫染色強度を 4 段階 (0-3) で半定量的に評価・スコア化した。

(2) 悪性胸膜中皮腫モデルを用いた検討

①悪性中皮腫細胞株の樹立

本学倫理委員会の承認のもとに、同意が得られた悪性中皮腫患者の腫瘍組織および胸水から培養細胞株を樹立し、増殖能やマーカー発現、in vivo での造腫瘍能などの特性を

解析した。

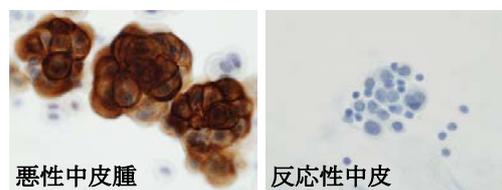
②同所移植による悪性胸膜中皮腫モデルの作製

樹立した悪性中皮腫細胞株を、免疫不全マウス (BALB/c-nude) の胸腔内に同所移植することによって、ヒト悪性胸膜中皮腫を再現する病態モデルの作製を試みた。移植後から継時的にマウスの組織を採取して病理学的に解析した。ヒト悪性胸膜中皮腫の病理学的特性を再現するモデルを用いて、CD146 の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 胸水細胞診における CD146 の発現解析

悪性胸膜中皮腫 23 例および反応性中皮 28 例の細胞診標本における CD146 の発現を、2 種類の抗 CD146 モノクローナル抗体を用いた免疫染色によって検討した。抗 CD146 マウスモノクローナル抗体 (OJ79) を用いた場合、悪性胸膜中皮腫の症例では 16 例中 15 例 (94%) において CD146 の発現が認められた (免疫染色スコア中央値 3)。また、大部分の症例が中皮腫細胞の細胞膜に強陽性を示し、細胞同士が相接する細胞接着部位において、しばしば強い発現が認められたことから、中皮腫細胞に特徴的な細胞像の形成への関与が示唆された。これに対して、反応性中皮の症例では 11 例全てにおいて、CD146 の発現は認められなかった (免疫染色スコア中央値 0)。同様に、抗 CD146 ウサギモノクローナル抗体 (EPR3208) を用いた検討を行った結果、悪性胸膜中皮腫の症例では 21 例中 19 例 (90%) において CD146 の発現が認められた (免疫染色スコア中央値 2)。これに対して、反応性中皮の症例では 21 例全てにおいて、CD146 の発現は認められなかった (免疫染色スコア中央値 0) (下図)。



免疫染色スコアは、悪性胸膜中皮腫において反応性中皮と比較して有意に高値を示した ($P < 0.001$)。悪性胸膜中皮腫に対する感度は 90%以上、特異度は 100%であったことから、胸水細胞診における CD146 免疫染色が、悪性胸膜中皮腫と反応性中皮の鑑別に極めて有用であると考えられた (Sato A et al., Mod Pathol 2010)。

(2) 悪性胸膜中皮腫モデルを用いた検討

同意が得られた患者の腫瘍組織および胸水から悪性中皮腫細胞株を6株樹立した。BALB/c-nude マウスへの皮下移植および胸腔内への同所移植によって、3株が造腫瘍能を示した。このうちの1株では、胸腔内への同所移植によって、胸腔内に多数の腫瘍が形成され、胸水貯留、胸壁浸潤、遠隔転移も観察された。腫瘍における中皮腫関連マーカーの発現は保たれており、また、マウス胸壁に沿って慢性に増殖する悪性胸膜中皮腫に特徴的な進展様式が認められた。したがって本マウスは、ヒト悪性胸膜中皮腫の発育進展様式を病理学的にも再現する有用な実験モデルであると考えられた。本マウスの胸壁組織を用いてCD146免疫染色を行うと、胸腔内で増殖する細胞や、胸壁に沿って進展する細胞などの、移植由来の腫瘍細胞はCD146陽性であるのに対して、マウス壁側胸膜の中皮細胞においては、CD146の発現は検出されなかった(Sato A et al., Cancer Sci, 2011)。

本研究により、CD146は中皮細胞の腫瘍化に伴って発現する細胞接着分子であり、悪性中皮腫細胞に特徴的な細胞像の形成に関与する可能性が示唆された。また、CD146は胸水細胞診での悪性胸膜中皮腫と反応性中皮の鑑別に有用な免疫染色マーカーであり、中皮腫の早期診断において重要な役割を担うと考えられた。

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6件)

- ① Sato A, Torii I, Tao LH, Song M, Kondo N, Yoshikawa Y, Hashimoto-Tamaoki T, Hasegawa S, Nakano T, and Tsujimura T. Establishment of a cell line from a Japanese patient useful for generating an in vivo model of malignant pleural mesothelioma. Cancer Sci. 102(3): 648-655, 2011. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01827.x 査読有
 - ② Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, Morinaga T, Fukuoka K, Yamada S, Murakami A, Kondo N, Matsumoto S, Okumura Y, Tanaka F, Hasegawa S, Hashimoto-Tamaoki T, and Nakano T. 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. 39(6):1365-74, 2011. DOI: 10.3892/ijo.2011.1158 査読有
 - ③ Sato A, Torii I, Okamura Y, Yamamoto T, Nishigami T, Kataoka TR, Song M, Hasegawa S, Nakano T, Kamei T, and Tsujimura T. Immunocytochemistry of CD146 is useful to discriminate between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium. Mod. Pathol. 23: 1458-1466, 2010. DOI:10.1038/modpathol.2010.134 査読有
- [学会発表] (計22件)
- ① 佐藤鮎子. 悪性胸膜中皮腫の病理学的解析: 病態モデルの作製と診断マーカーの開発 (平成22年度日本病理学会近畿支部学術奨励賞公募部門受賞講演). 第53回日本病理学会近畿支部学術集会, 兵庫医科大学, 2011.5.14
 - ② 佐藤鮎子, 鳥井郁子, 中野孝司, 長谷川誠紀, 亀井敏昭, 辻村 亨. 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, パシフィコ横浜, 2011.4.28-30
 - ③ 辻村 亨, 佐藤鮎子, 鳥井郁子, 亀井敏昭, 長谷川誠紀, 中野孝司. 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. (シンポジウム) 第51回日本肺癌学会総会, 広島国際会議場・ANAクラウンプラザホテル広島, 2010.11.3-4
 - ④ 佐藤鮎子, 鳥井郁子, 片岡竜貴, 長谷川誠紀, 中野孝司, 辻村 亨. 体腔液細胞診での悪性中皮腫と反応性中皮の鑑別診断におけるCD146の有用性. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪, 2010.9.22-24
 - ⑤ 辻村 亨, 佐藤鮎子, 鳥井郁子, 片岡竜貴, 長谷川誠紀, 中野孝司. 早期中皮腫の体腔液細胞診におけるp16INK4A遺伝子解析の有用性. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪, 2010.9.22-24
 - ⑥ Tsujimura T, Sato A, Torii I, Kataoka TR, Nishigami T, Yoshikawa Y, Hashimoto-Tamaoki T, Hasegawa S, and Nakano T. Diagnostic significance of p16INK4A loss in molecular cytology of early malignant pleural mesothelioma. 10th International Conference of the International Mesothelioma Interest

Group, Kyoto, 2010. 8. 31-9. 3

- ⑦ Sato A, Torii I, Okamura Y, Yamamoto T, Nishigami T, Kataoka TR, Hasegawa S, Nakano T, and Tsujimura T.
Immunocytochemistry of CD146 is useful for discrimination between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium in effusion cytology. 10th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, Kyoto, 2010. 8. 31-9. 3
- ⑧ Tsujimura T, Sato A, Torii I, Kataoka TR, Nishigami T, Yoshikawa Y, Hashimoto-Tamaoki T, Hasegawa S, and Nakano T. Usefulness of gene diagnosis of the p16INK4A locus in molecular cytology of early malignant pleural mesothelioma. 17th International Congress of Cytology, Edinburgh, 2010. 5. 16-20
- ⑨ 佐藤鮎子, 鳥井郁子, 西上隆之, 片岡竜貴, 中野孝司, 長谷川誠紀, 辻村 亨.
悪性胸膜中皮腫モデルマウスの作製と病理学的解析. 第99回日本病理学会総会, 京王プラザホテル, 2010. 4. 27-29

[図書] (計1件)

- ① 辻村 亨、鳥井郁子、佐藤鮎子. 中皮腫の初期病変. 癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌. 4章 胸膜腫瘍疾患の概要と鑑別診断, 247-258, 中山書店, 2011

6. 研究組織

(1) 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