

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590437

研究課題名(和文)細胞接着分子CD146に着目した悪性胸膜中皮腫の早期診断と病態の解明

研究課題名(英文)Role of CD146, a cell adhesion molecule, in early diagnosis and pathogenesis of malignant pleural 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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞接着分子CD146は、85%の悪性胸膜中皮腫において発現が認められたのに対して、反応性中皮では発現がみられなかった。また、胸水における可溶性CD146濃度は、胸膜炎などの良性疾患と比較して、悪性胸膜中皮腫において有意に高値であった。さらに、悪性胸膜中皮腫患者のCD146高発現群は、低発現群と比較して術後全生存期間が有意に短く予後不良であった。CD146は悪性胸膜中皮腫の早期診断マーカーであるとともに、悪性度と相関する分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：CD146, a cell adhesion molecule, was expressed in 85% of malignant pleural mesothelioma but not in reactive mesothelium. The level of soluble form of CD146 was significantly higher in pleural effusions of malignant pleural mesothelioma than those of benign diseases such as pleuritis. In addition, the postoperative overall survival of patients with high expression of CD146 in malignant pleural mesothelioma was significantly shorter than that with low expression of CD146. These results suggest that CD146 is useful in early diagnosis and associated with poor prognosis of malignant pleural mesothelioma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 CD146 早期診断 予後因子

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難治性腫瘍である。我が国では、アスベストの大量消費と関連して 2025 年に中皮腫発症のピークを迎えると推定されており、早期診断法の確立と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、胸水検体に着目した早期診断法の確立が重要と考えられる。中皮腫診断では、免疫染色やバイオマーカーが補助診断に用いられているが、単独で診断精度の高いマーカー分子は同定されていない。

CD146 は、免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、悪性黒色腫において、その発現強度と腫瘍の悪性度に相関性が報告されている。我々は、細胞相互封入や多核細胞などの悪性中皮腫に特徴的な細胞像の形成において、細胞接着分子が重要な役割を果たしている可能性に着目し、胸水中の反応性中皮細胞では CD146 の発現を認めないのに対して、中皮腫細胞では CD146 が強く発現していることを明らかにした (Sato et al, Mod Pathol, 2010)。胸水細胞診において見出した CD146 の特異的な発現パターンは、中皮細胞の腫瘍化に伴って発現する CD146 の早期診断マーカーとしての有用性と、生物学的機能の重要性を示唆する。

2. 研究の目的

細胞接着分子 CD146 は、胸水細胞診における悪性胸膜中皮腫と反応性中皮との鑑別診断に有用なマーカーであることを示した。本研究においては、病理組織標本を用いて種々の進行段階の悪性胸膜中皮腫における CD146 の発現パターンを調べるとともに、膜貫通性糖タンパク質である CD146 から産生される可溶性 CD146 (sCD146) が、中皮腫診断における新たなバイオマーカーとなる可能性を検証して、中皮腫の早期診断における CD146 の有用性を確立する。さらに、悪性胸膜中皮腫の悪性度と CD146 発現との関連を調べることによって、悪性胸膜中皮腫における CD146 の生物学的機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 悪性胸膜中皮腫組織における 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 20 例と、反応性中皮 14 例を対象として、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて CD146 免疫染色を行った。細胞膜における染色強度を、4 段階 (0: 陰性、1: 弱陽性、2: 中等度陽性、3: 強陽性) で評価・スコア化した。胸膜表層において単層から数層に配列する異型中皮細胞が認められる症例においては、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を行い、*CDKN2A* 遺伝子欠失の有無

を調べた。

(2) 悪性胸膜中皮腫における可溶性 CD146 (sCD146) の解析

病理組織学的に診断が確定された悪性胸膜中皮腫および胸膜炎などの良性疾患について、胸水中の sCD146 濃度を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法で測定した。また、悪性胸膜中皮腫の組織検体における膜型 CD146 の発現と、胸水 sCD146 濃度の相関性を調べた。

(3) 悪性胸膜中皮腫の手術症例における CD146 発現と術後予後の解析

化学療法後に胸膜肺全摘術が施行された悪性胸膜中皮腫 45 例を対象として、これらの手術検体を用いて CD146 免疫染色を行った。CD146 発現と術後全生存期間との関連について検討した。

4. 研究成果

(1) 悪性胸膜中皮腫組織における CD146 の発現解析

悪性胸膜中皮腫 20 例と反応性中皮 14 例の標本を用いて CD146 免疫染色を行った。17 例 (85%) の悪性胸膜中皮腫が CD146 陽性を示した。一方、反応性中皮では全例が陰性であった (図 1)。

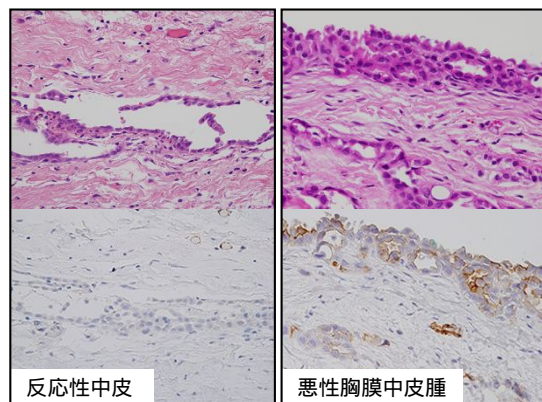


図 1. 悪性胸膜中皮腫組織における CD146 の発現。

悪性胸膜中皮腫のうち 5 例では、胸膜表層において単層から数層に配列する異型中皮細胞が認められ、これらの細胞においても CD146 の発現が認められた (図 2 上)。悪性胸膜中皮腫においては、染色体 9p21 領域に存在する *CDKN2A* 遺伝子のホモ接合性欠失が高頻度に認められることより、その診断指標としての有用性が報告されている。そこで、これらの 5 例について fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を行うと、胸膜表層に配列する異型中皮細胞においても、9p21 領域 (*CDKN2A* 遺伝子) のホモ接合性欠失が検出された (図 2 下)。CD146 は悪性胸膜中皮腫の早期診断マーカーとして有用であると考えられた。

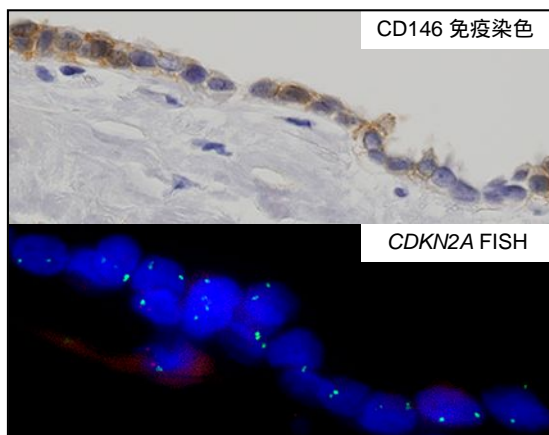


図 2. 胸膜表層に配列する異型中皮細胞における CD146 発現 (上) と、*CDKN2A* 遺伝子のホモ接合性欠失 (下)。

(2) 悪性胸膜中皮腫における可溶性 CD146 (sCD146) の解析

細胞接着分子 CD146 は膜貫通性糖タンパク質であるが、可溶性 CD146 (sCD146) も産生されることが知られている。可溶性タンパク質は、有用な診断バイオマーカーとなる可能性がある。悪性中皮腫細胞において CD146 が高発現することに着目して胸水中の sCD146 濃度を調べると、胸水 sCD146 濃度は、胸膜炎などの良性疾患と比較して悪性胸膜中皮腫において有意に高値を示した ($p < 0.001$)。また、悪性胸膜中皮腫の組織検体における膜型 CD146 の発現と、胸水 sCD146 濃度の相関性を調べると、膜型 CD146 を高発現する悪性胸膜中皮腫症例の胸水 sCD146 濃度は高値を示し、両者の間に有意な相関性が認められた ($\gamma = 0.720, p < 0.001$)。胸水 sCD146 濃度は悪性胸膜中皮腫の早期診断において有用なバイオマーカーになると考えられた。

(3) 悪性胸膜中皮腫の手術症例における CD146 発現と術後予後の解析

CD146 は悪性黒色腫において、その発現強度と腫瘍の悪性度に相関性が報告されているが、悪性胸膜中皮腫の悪性度と CD146 発現との関連は明らかでない。そこで、化学療法後に胸膜肺全摘術が施行された悪性胸膜中皮腫 45 例の手術検体を用いて CD146 発現を免疫染色で調べた。悪性胸膜中皮腫患者の CD146 低発現群 (スコア 0-1) と高発現群 (スコア 2-3) の術後全生存期間を比較すると、CD146 高発現群が有意に予後不良であった ($p = 0.0076$)。CD146 は悪性胸膜中皮腫の悪性度と相関する予後予測因子として有用であると考えられた。

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 7 件)

Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T et al (他 5

名, 2 番目). Biallelic germline and somatic mutations in malignant mesothelioma: Multiple mutations in transcription regulators including mSWI/SNF genes. *Int J Cancer*. 査読有, 136(3):560-571, 2015

Yoneda K, Sato A, Tsujimura T et al (他 12 名, 9 番目). Circulating Tumor Cells (CTCs) in Malignant Pleural Mesothelioma (MPM). *Ann Surg Oncol*. 査読有, 21 Suppl:S472-80, 2014

Matsumoto K, Nabeshima K, Tsujimura T et al (他 7 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(8):415-422, 2013.

Okazaki Y, Nagai H, Tsujimura T et al (他 4 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(8):989-995, 2013.

[学会発表] (計 18 件)

Tsujimura T, Sato A, Torii I, Shimizu S, Shinohara Y, Kudo T, Hasegawa S, Nakano T. CD146 expression is associated with prognosis of malignant mesothelioma. 12th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, Oct.23, 2014, Cape Town, South Africa

辻村 亨, 鳥井郁子, 佐藤鮎子, 篠原義康, 工藤朝雄, 清水重喜. 胸水を用いた悪性中皮腫の鑑別診断. 第 55 回日本臨床細胞学会総会春期大会, 2014.6.7, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

佐藤鮎子, 鳥井郁子, 篠原義康, 工藤朝雄, 中野孝司, 長谷川誠紀, 辻村 亨. 悪性胸膜中皮腫における CD146 発現の免疫組織化学的検討. 第 103 回日本病理学会総会, 2014.4.25, 広島国際会議場 (広島県・広島市),

辻村 亨, 鳥井郁子, 佐藤鮎子, 鳥居良貴, 鍋島一樹, 亀井敏昭. 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 2013.6.1, グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール (東京都・港区)

佐藤鮎子, 鳥井郁子, 中野孝司, 長谷川誠紀, 辻村 亨. 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, 2013.6.7, ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

辻村 亨, 鳥井郁子, 佐藤鮎子, 宋美紗, 長谷川誠紀, 中野孝司, 鍋島一樹, 亀井敏昭. 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 2012.11.9

朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター（新潟県・新潟市）

Tsujimura T, Sato A, Torii I, Song M, Matsumoto S, Nabeshima K, Hasegawa S, Nakano T. The p16^{INK4A}/p14^{ARF} deletion in atypical mesothelial cells localized on the serosal surface or within the submesothelial fibrous tissues of the parietal pleura. 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, Sep.12, 2012, Boston, USA

〔図書〕(計 2 件)

辻村 亨, 佐藤 鮎子, 鳥井 郁子 . 1. 胸膜生検, 細胞診セルブロック . 2. 手術材料の取り扱い . 腫瘍病理鑑別診断アトラス 縦隔腫瘍・胸膜腫瘍 [胸膜腫瘍] 第 1 部 検鏡前の確認事項 . II. 病理標本の扱い方 . 184-197, 文光堂, 2014

辻村 亨, 佐藤 鮎子 . 中皮細胞過形成と中皮腫細胞増殖 . 胸膜全書 胸膜疾患のグローバルスタンダード 第 4 章 胸水診断学 . 105-112, 医薬ジャーナル社, 2013

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

(2) 研究分担者

辻村 亨 (TSUJIMURA, Tohru)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：20227408