

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10280

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫と反応性中皮細胞でのアンチエイジングKlotho遺伝子の役割

研究課題名(英文) Klotho: A helpful marker for the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma from reactive mesothelium

研究代表者

加藤 靖文 (Kato, Yasufumi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：70424489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、未だ満足の行く治療成績を得られていない悪性胸膜中皮腫の診断精度の向上を目的としている。現在、反応性中皮と悪性胸膜中皮腫の鑑別のための確たる免疫組織学的診断マーカーが存在しないため、反応性中皮と悪性胸膜中皮腫の鑑別を簡便かつ、迅速にできるようにすることが急務である。そこで中皮細胞の悪性度に「不老・不死化」に関与するアンチエイジング遺伝子Klotho発現がどのように関与し、癌の浸潤、転移(EMT)にどのように影響を与えるか分子生物学的に検討する。今回の研究結果より、Klotho蛋白が消失することにより、悪性中皮中皮腫と反応性中皮細胞の鑑別診断補助になり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The differential diagnosis of benign reactive mesothelium (RM) from malignant pleural mesothelial proliferations by morphology can be a major challenge. However, up to present, there exists no immunohistochemical marker which confidently allows for the separation of RM and malignant pleural mesothelioma (MPM). Klotho is originally discovered as an anti-aging gene and recently identified as a tumor suppressor in various human cancers. Recent studies have demonstrated aberrant expression of Klotho in a number of cancers, including lung cancer. Klotho was shown to suppress the epithelial-mesenchymal transition (EMT). The purpose of the present study was to evaluate the diagnostic utility of Klotho expression in the differential diagnosis between MPM and RM.

Klotho expression is useful and helpful for an immunohistochemical marker enabling differential diagnosis of RM from MPM.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：悪性胸膜中皮腫 反応性中皮 Klotho蛋白

1. 研究開始当初の背景

全世界において、アスベスト(石綿)による中皮腫発生という健康被害が勤労者のみならず、地元住民にも波及するなど社会的に大きな問題となっている。わが国ではアスベスト被曝による悪性胸膜中皮腫は今後、急速に増加すると考えられている。2006年胸膜中皮腫の死亡者数は1050人であったが、アスベストが全面禁止となった時期から、中皮腫発生までの潜伏期間を考慮すると今後患者は急激に増加し、40年間で10万人以上に達すると予想されている。しかし、悪性胸膜中皮腫は手術療法や化学療法を施行しても現在のところ治療成績は不良である。そのため、早期発見、診断、そして、適切な治療の確立が必要不可欠であり、また、時代の要請として、急務であり、また、患者の個別治療の基礎データを集積検討する必要がある。

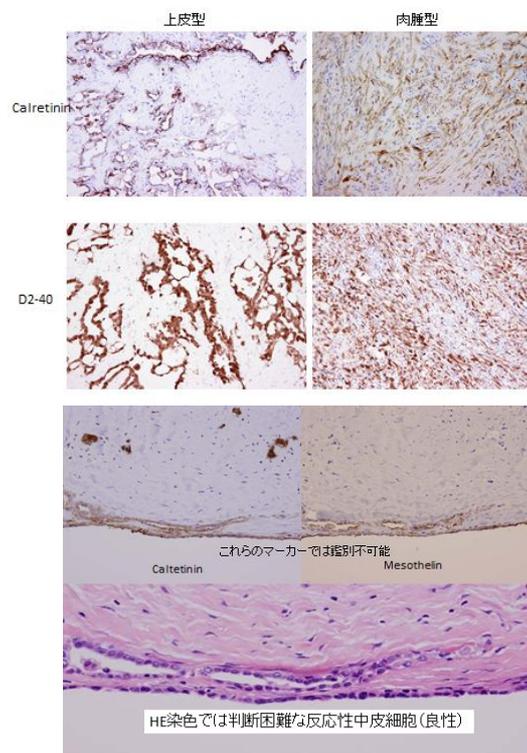
今日の悪性胸膜中皮腫の確定診断は組織診もしくは細胞診である。胸水貯留は胸膜中皮腫の最初の所見であり、細胞診は初めに行われる検査であるが、確定診断は組織の検体をもって、初めて、診断が得られることが多く、胸水からの診断や微小検体だと診断に苦慮することをしばしば、临床上、経験する。21世紀になり、気管支鏡の進歩により、超音波を使用することで今まで透視で映らなかった病変やリンパ節の確定診断も可能になった。それとともに肺癌の確定診断は治療法の変化により、病理組織検査や遺伝子検査を正確に行うことが求められ、更に微小検体でも確実に診断なされることが求められる。悪性胸膜中皮腫ガイドラインでも組織もしくは細胞診は治療開始前に行うように強く勧められる。その方法としては、経皮的針生検、胸腔鏡下生検、開胸生検などがある(グレードA)。ガイドラインでは、左上図のように中皮腫と癌腫との鑑別は、組織像により適切な抗体を選択し、陽性抗体2種、陰性抗体2種を検討し、前者のいずれかが陰性、後者

のいずれかが陽性である場合は、更に別の抗体を検討することが推奨されている。

一方、反応性中皮と中皮腫の鑑別はこれらのマーカーでは診断困難で診断に苦慮することを経験する。

2. 研究の目的

本研究は、未だ満足に行く治療成績を得られていない悪性胸膜中皮腫の診断精度の向上を目的としている。現在、確たる免疫組織学的診断マーカーが存在しない反応性中皮と悪性胸膜中皮腫の鑑別を簡便かつ、迅速に



できるようにすることにある。そこで中皮細胞の悪性度に「不老・不死化」に関与するアンチエイジング遺伝子 Klotho 発現がどのように関与し、癌の浸潤、転移(EMT)にどのように影響を与えるか分子生物学的に検討する。これらを検討することにより、治療に有効な診断法の確立し、コスト削減・診断の簡便化・迅速性の図り、ひいては、“難治性である悪性胸膜中皮腫の個別化治療”の確立のために診断方法の開発・基礎的検討を行う。

3. 研究の方法

悪性胸膜中皮腫(MPM)47検体、反応性中皮

(RM)42検体を対象とし、免疫組織学的検査 (IHC)を用いて、Klotho蛋白の発現について、検討した。

MPM検体の内訳は17例の胸膜肺全摘(EPP)と1例の胸膜全摘(P/D)の18例の手術検体のホルマリン固定標本と検体量の多い胸膜生検17例と12例の針生検のホルマリン固定標本を用いた(表1)。

表1 MPMの患者背景

年齢	62 (44-82)
男/女	42/ 5
右/左	16/ 28
術式	17/1/17/12
EPP-P/D-胸膜生検-針生検	
組織型	
Epithelial type	32
Biphasic type	8
Sarcomatoid type	2
Desmoplastic type	5

組織型はEpithelial type 32例、Biphasic type 8例、Desmoplastic type 5例、sarcomatoid type 2例であった。

RM検体は自然気胸に伴うBullaの切除標本42例を用い、破裂Bullaの修復過程、反応で増加した胸膜上の中皮細胞の観察が容易な標本を抽出した(表2)。

表2 反応性中皮症例の患者背景

Age	29 (16-76)
Gender (Man/woman)	40 2
Side (Right/Left)	29 13
Bullectomy	42

全例、予後で他臓器を含め、悪性疾患の発症のない症例を抽出した。

免疫組織学的染色(IHC)の評価方法は1-25%を弱陽性(weak)、26-50%を中等度(Moderate)m 51%以上を強陽性(strong)とし、1%満たないときを陰性(negative)とした。

4. 研究成果

MPMでKlotho蛋白発現なしのが7例、弱発現が

37例、中等度発現が3例で強発現は0例であった。RMでは0が0例、1+が34例、2+が8例で3+は0例であった(表3)。

表3 MPMとRMのKlotho蛋白染色結果

Expression level	MPM	RM	
Negative	7	0	7
Weak	37	34	71
Moderate	3	8	11
Strong	0	0	0
	47	42	89

解析するとRMは全例陽性を示していた。一方、MPMは7例にKlotho蛋白発現の消失を認めた。以上より、Klotho蛋白の発現消失は悪性所見の証明となりえる可能性が示唆された。

Klotho蛋白の陰性化することを目的としたスクリーニング検査(表4)

表4 MPMとRMのKlotho蛋白の発現の有無

Klotho expression	MPM	RM	
Loss of expression	7	0	7
Ecexpression	40	42	82
	47	42	89

とすると感度14.9%ながらも特異度は100%で陽性的中率も100%、陰性的中率は51.2%であった。MPMのKlotho蛋白発現には明らかにRMに比べ、減少傾向を認め、Klotho蛋白ががんの浸潤に関わる最近の知見と矛盾ない結果であった。Klotho蛋白発現消失の7例の内訳を解析する(表5)

表5 MPMでKlotho蛋白発現消失の詳細

Method	Side	Staging	Histological type
Needle biopsy	Rt	cT4N2M0	Epithelial type
Pleural biopsy	Lt	cT4N2M0	Biphasic type
Pleural	Rt	cT2N2M0	Sarcomatoid

biopsy			type
EPP	Lt	pT2N0M0	Epithelial type
EPP	Rt	pT2N0M0	Epithelial type
EPP	Lt	pT3N0M0	Epithelial type
EPP	Lt	pT3N0M0	Desmoplastic type

とT2以上の局所浸潤性而非切除であった2例を含んでいることから、悪性度に関わりがある可能性が示唆された。一方、Klotho蛋白発現が維持されていた中等度発現症例の3例を解析すると(表6)

表6 . MPMで中等度発現症例の詳細

Method	Side	Stageing	Histological type
Pleural biopsy	Rt	cT2N0M0	Desmoplastic type
EPP	Rt	pT2N0M0	Epithelial type
EPP	Lt	pT2N0M0	Epithelial type

T2N0症例で局所浸潤がT2まででリンパ節転移なしであるため、こちらからも進行度・悪性度に関わる可能性が示唆された。また、完全消失にならなかった理由に検体が手術標本と生検標本が混在していたため、MPMのstaging(進行度)にも差があるためかと考察されたが、統計学的な傾向は証明されなかった(表7)。

(表7) 手術検体での検討

IHC level	Staging	Histological type
Moderate	T2N0M0	Epithelial type
Weak	T1N0M0	Epithelial type
Weak	T2N0M0	Epithelial type
Weak	T3N3M0	Biphasic type
Weak	T4N0M0	Biphasic type
Weak	T3N2M0	Biphasic type
Weak	T2N0M0	Epithelial type
Weak	T3N0M0	Epithelial type
Weak	T3N0M0	Desmoplastic type
Weak	T4N0M0	Epithelial type
Weak	T3N1M0	Epithelial type

Weak	T3N2M0	Biphasic type
0	T3N2M0	Biphasic type
0	T2N0M0	Epithelial type
0	T2N0M0	Epithelial type
0	T3N0M0	Epithelial type
0	T3N0M0	Desmoplastic type

症例数の少なさと古い検体が含まれていることもかもしれないと推測される。今回の研究成果より、Klotho蛋白が消失することにより、悪性中皮細胞の診断補助になり得る可能性が示唆された。この結果を2018年10月10日の第38回欧州腫瘍外科学会において、発表予定(accept済み)で、日本では2018年11月日本肺癌学会(抄録登録済)での発表準備中である。現在、論文作成中である。

これらの結果を踏まえ、MPM手術例5例とRM5例を抽出し、未知なる蛋白の消失、出現の同定のため、プロテオーム解析を施行した。現在、結果解析中で2018年度中に解析結果が判明するため、結果判明次第、学会発表と論文作成予定である。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
 発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 靖文 (Kato Yasufumi)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：70424489

(2) 研究分担者

松林 純 (Matsubayashi Jun)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00338790

吉田 浩一 (Yoshida Koichi)
東京医科大学・医学部・客員講師
研究者番号：00424490

大平 達夫 (Ohira Tatsuo)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：40317847

池田 徳彦 (Ikeda Norihiko)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：70246205

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()