

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592086

研究課題名(和文)悪性胸膜中皮腫における肺内アスベスト濃度と遺伝子異常との関連と新規マーカーの開発

研究課題名(英文)Asbestos fiber concentration in lung tissues and mutation analysis of malignant pleural mesothelioma and development of new marker

研究代表者

横井 香平 (YOKOI, KOHEI)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60378007

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)：悪性胸膜中皮腫から細胞株を樹立しアレイCGHで高頻度に異常を認めた遺伝子領域を同定した。その結果、種々の領域の遺伝子欠失および増幅を認めた。今回、3p21領域にホモ接合欠失に着目し、その中のBAP1遺伝子について解析を行った。ウェスタンブロットにてBAP1タンパク発現を確認後、発現低下細胞株で、RT-PCR分析を行ったところ、一細胞株において著明なmRNA発現低下を認めた。PCRでその細胞株にexon13-17のホモ接合欠失を認めた。BAP1欠失を認めた悪性胸膜中皮腫組織ではBAP1は染色されなかった。これらの結果より、BAP1が中皮腫発症に関してキーとなる遺伝子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established some malignant pleural mesothelioma (MPM) cell lines from Japanese patients. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization (CGH) analysis of MPMS was performed to identify regions that display DNA copy number alterations. Regions of genomic aberrations observed in > 20% of individuals were 1p36.33, 1p36.1, 1p21.3, 3p21.3, 4q22, 4q34-qter, 6q25, 9p21.3, 10p, 13q33.2, 14q32.13, 18q, and 22q of losses. The 3p21 region contained a gene, BAP1, and we further demonstrated expression of BAP1 with real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis. The established cell line which the BAP1 protein manifestation fell, the expression of mRNA level was depression. Genomic PCR analysis detected homozygous deletion of exon 13-17 in one cell line and shorter fragment in another cell line. One cell line with BAP1 homozygous deletion shows a lack of BAP1 nuclear expression and weak cytoplasmic BAP1 staining. From these results, BAP1 might be a key gene for MPM development.

研究分野：医歯薬学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 アスベスト 遺伝子変異 癌遺伝子 癌抑制遺伝子 肺内アスベスト濃度

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は、そのほとんどがアスベスト(石綿)の吸引により発生する。悪性胸膜中皮腫は、アスベスト鉱山労働者やアスベストを扱う労働者に限らず、鉱山や工場周辺の住民、あるいは労働者の家族にも発生している。2005年6月、大手機械メーカーのクボタが「兵庫県尼崎市のクボタ旧神崎工場の従業員74人がアスベスト関連病で過去に死亡し、工場周辺に住む中皮腫で治療中の住民3人に見舞金を出す」と公表した、いわゆる「クボタショック」をきっかけとして、2006年3月に石綿被害者救済法(石綿新法)が施行された。

2006年にMurayamaらは、日本の悪性胸膜中皮腫の罹患患者数は推計で2000年~2039年の間に、10万人を越えると報告したが、現在のところ発症に至る可能性を有する人口は具体的には想定できない状況にある。先に述べた「クボタショック」では、職業暴露の可能性のある人のみならず、アスベストを扱っていた工場周辺の住民にまで悪性胸膜中皮腫が、発症したことは、この疾患への医学的解決の必要性をさらに高めていると考える。

残念ながら、悪性胸膜中皮腫に対し劇的な効果が期待される治療法は未だ確立されていない。

術前抗癌剤投与、外科的切除、術後放射線照射を行うTrimodality Therapyによる臨床試験が進行しているが、その効果は全くと言ってよい程満足できるものではない。

悪性胸膜中皮腫に対する有効な治療方法の開発には、本疾患に対する病態解明が急務であり、またその発生過程においてどのようにアスベストが関与しているかについても明らかにする必要がある。

我々は、これまでに主として悪性胸膜中皮腫の患者より採取した胸水から希少な細胞株を樹立し、種々の癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異解析を行ってきた。その結果、癌抑制遺伝子であるp16^{INK4A}に高頻度にホモ接合欠失を認めることを見出し、悪性胸膜中皮腫の発癌過程にこの遺伝子が関与していることを報告した。

さらに、切除検体を用いて、標本内のアスベスト線維の種類および濃度を測定し、アスベスト濃度と悪性胸膜中皮腫発症の関連性の検討を行ってきた。

しかしながら、治療や予防につながる分子標的の同定については十分に検討ができておらず、分

子腫瘍学的に悪性胸膜中皮腫の発生メカニズムをさらに解析し、その増殖能、浸潤能および転移能の獲得に関与しているシグナル伝達経路を明らかにすることが重要と考える。

2. 研究の目的

悪性胸膜中皮腫患者由来の腫瘍組織を細胞生物学的・分子生物学的に解析し、その特性の解明を行うことを目的とした。

また、現時点において日本人由来の中皮腫細胞株は未だに少数であり、その細胞生物学的特性を解明するためには、より多くの悪性胸膜中皮腫株の樹立が不可欠であるため、患者胸水および切除検体などを用いて、細胞株樹立を行う。これらの細胞株を検体として、アレイCGH法などの網羅的解析手法を用い、さらなる悪性胸膜中皮腫特有の遺伝子異常の解析を行う。

さらに、それらの知見をもとに予防・早期診断マーカーおよび新規治療に対する分子標的の探索を試みる。さらに、悪性胸膜中皮腫組織および樹立細胞株から抽出したRNAで、網羅的遺伝子発現パターンの解析、がん抑制遺伝子の不活化や細胞の分化異常に深く関与するエピジェネティクス異常の解析、さらには細胞培養上清を用いた質量分析法による解析等を有効に組み合わせることにより、予防や早期診断、悪性度判定のための新規バイオマーカーの探索などを行う。

3. 研究の方法

(1)悪性胸膜中皮腫患者の胸水あるいは腫瘍片より細胞株の樹立を行う。さらに、細胞株樹立後、その細胞株が患者本人由来であることを確かめるために、患者の白血球由来DNA、細胞株由来DNAをそれぞれ抽出し、それらを多種類の個人識別マーカーを用い、樹立細胞株が患者個人由来の細胞株であることを確認する。

(2)切除検体および細胞株由来のDNAを用い、悪

性胸膜中皮腫における PI3K/AKT 経路の解析を行う。AKT、AKT によってリン酸化される Mdm2、ユビキチンリガーゼとして働く E2F1 についても検討を加える。

- (3) 癌抑制遺伝子として、NF2 とその下流にある Merlin、LATS を Direct Sequence 法による変異解析を行う。ナンセンス変異を検出した場合は、免疫染色法などでタンパク質レベルでの発現解析を行う。
- (4) 樹立した悪性胸膜中皮腫細胞株を免疫不全マウスに移植(皮下、腹腔、胸腔)し、その着生の有無を見る。さらに、このマウスに新規抗癌剤や分子標的治療薬、血管新生因子阻害剤などを投与し、その効果を検討する。悪性胸膜中皮腫細胞株に蛍光色素 DsRed を組み込み、in vivo で薬物の効果を観察する。実験後はサクリファイスし、組織での薬剤効果や遺伝子異常の発現の有無を検討する。

4. 研究成果

- (1) 悪性胸膜中皮腫細胞株の樹立とその細胞生物学的解析
細胞株樹立：悪性胸膜中皮腫手術症例から胸水および組織片を採取し細胞株を樹立し得た(図1)

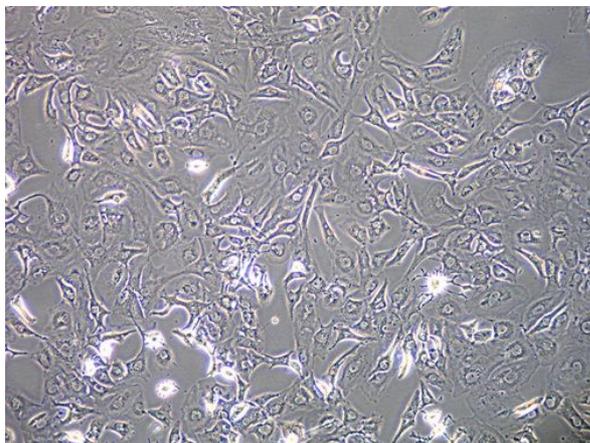


図1 樹立した細胞株

遺伝子変異解析: 樹立した細胞株から DNA を

抽出し、アレイ CGH を行い、より頻度の高い遺伝子欠失領域を同定した(図2)。この中で最近注目されている遺伝子である BAP1 について解析を行うこととした。

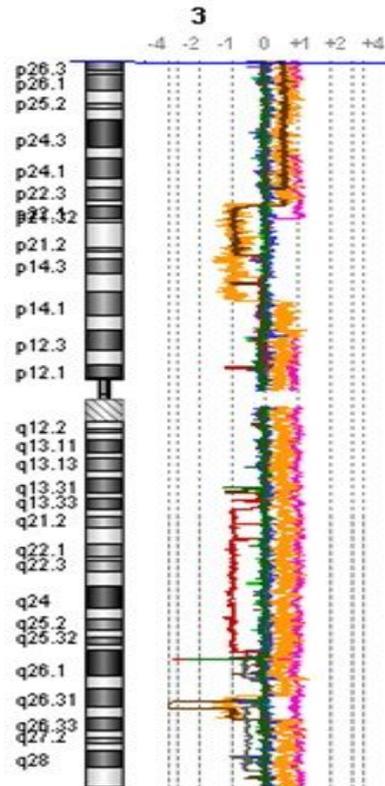


図2 アレイ CGH(3p21 領域に幅広いホモ接合欠失領域を認める)

- (2) BAP1 遺伝子の発現解析
ウェスタンブロットにて BAP1 タンパク発現を確認後、発現低下細胞株で、RT-PCR 分析を行ったところ、一細胞株において著明な mRNA 発現低下を認めた(図3)。

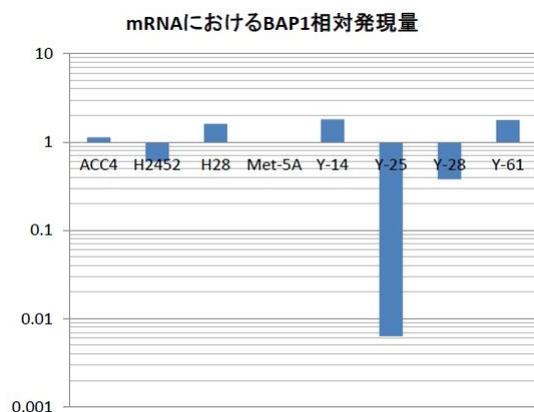


図3 mRNA における BAP1 相対発現量

PCR でその細胞株に exon13-17 のホモ接合欠失を認めた (図 4)。

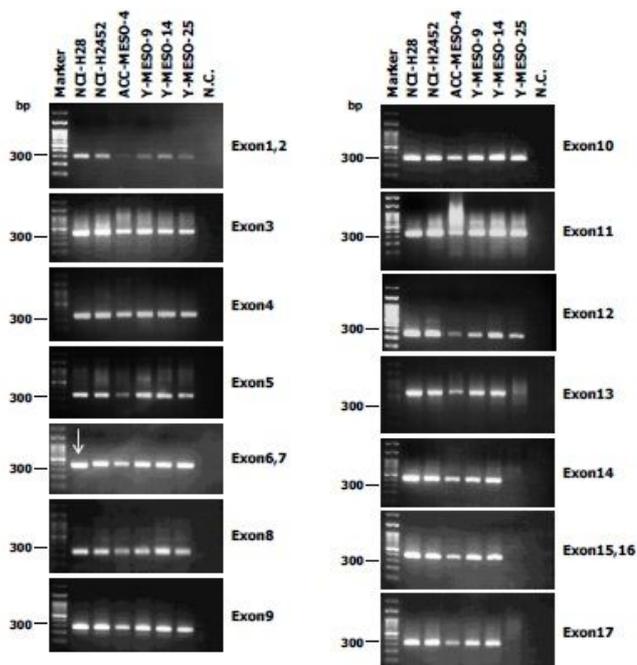


図 4 PCR

BAP1 欠失を認めた悪性胸膜中皮腫組織では BAP1 は染色されなかった (図 5)。BAP1 遺伝子は 1998 年にがん抑制遺伝子として報告され、一部の肺癌症例に変異は見つかったものの、その後がん抑制遺伝子としてはやや懐疑的に見なされていた遺伝子であるが、BAP1 はヒストン H3 のユビキチン化に係わり、多くの遺伝子の発現レベルに關与する。BAP1 が中皮腫発症に關してキーとなる遺伝子である可能性が示唆された。

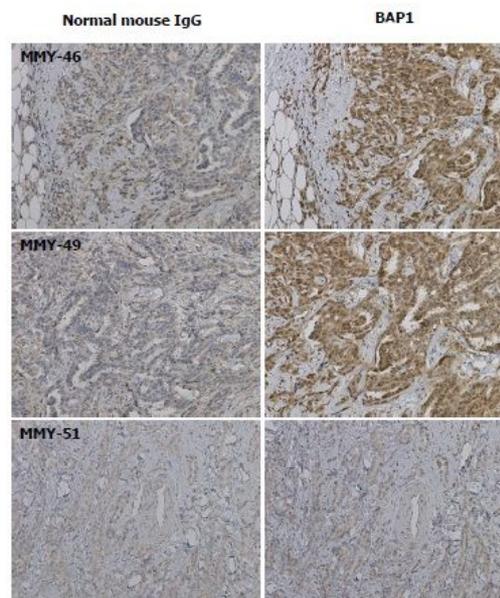


図 5 免疫染色

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 20 件) すべて査読有り

Inoue M, Okumura M, Sawabata Y, Miyaoka E, Asamura H, Yoshino I, Tada H, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Kobayashi H, Yokoi K. Clinicopathological characteristics and surgical results of lung cancer patients aged up to 50 years: the Japanese Lung Cancer Registry Study 2004. *Lung Cancer*. 2014; 82:246-251.

Sakurai H, Asamura H, Miyaoka E, Yoshino I, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata Y, Okumura M, Yokoi K. Differences in the prognosis of resected lung adenocarcinoma according to the histologic subtypes: a retrospective analysis of Japanese Lung Cancer Registry data. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014;45:100-107.

Nakamura S, Fukui T, Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Ishiguro F, Hirakawa A, Yokoi K. Prognostic impact of the tumor size eliminating the ground glass opacity component: modified

clinical T descriptors of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2013;8:1551-1557.

Iwano S, Yokoi K, Taniguchi T, Kawaguchi K, Fukui T, Naganawa S. Planning of segmentectomy using three-dimensional computed tomography angiography with a virtual safety margin: technique and initial experience. *Lung Cancer.* 2013;81:410-415.

Watanabe S, Asamura H, Miyaoka E, Okumura M, Yoshino I, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Yokoi K. Results of T4 surgical cases in the Japanese Lung Cancer Registry Study: Should mediastinal fat tissue invasion really be included in the T4 category? *J Thorac Oncol.* 2013;8:759-765.

Matsuguma H, Oki I, Nakahara R, Suzuki H, Kasai T, Kamiyama Y, Igarashi S, Mori K, Endo S, Yokoi K. Comparison of three parameters on computed tomography for the prediction of less-invasiveness in patients with clinical stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2013;95:1878-1884.

Kawase A, Yoshida J, Miyaoka E, Asamura H, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Okumura M, Yokoi K. Visceral pleural invasion classification in non small cell lung cancer in the 7th Edition of the TNM Classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2013;8:606-611.

Shimokawa M, Hasegawa S, Fukuoka K, Okada M, Yokoi K, Tanaka F, Yamanaka T, Daimon T, Nakano T. A feasibility study of induction pemetrexed plus cisplatin followed by pleurectomy/decortication aimed at macroscopic complete resection. *Jpn J Clin Oncol.* 2013;43:575-578.

Mizuno T, Taniguchi T, Ishikawa Y, Kawaguchi K, Fukui T, Ishiguro F, Nakamura S, Yokoi K. Pulmonary metastasectomy for osteogenic and soft

tissue sarcoma: Who really benefits from surgical treatment? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2013;43:795-799.

Sakakura N, Tateyama H, Nakamura S, Taniguchi T, Usami N, Ishikawa Y, Kawaguchi K, Yokoi K. Diagnostic reproducibility of thymic epithelial tumors using World Health Organization classification: note for thoracic clinicians. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;61:89-95.

Matsuguma H, Mori K, Nakahara R, Suzuki H, Kasai T, Kamiyama Y, Igarashi S, Kodama T, Yokoi K. Characteristics of ground-glass opacity nodules of the lung which show growth during follow-up with computed tomography. *Chest.* 2013;143:436-443.

Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. Membranous expression of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) contribute to poor prognosis and malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. *J Surg Res.* 2013;179:24-32.

Fukumoto K, Taniguchi T, Ishikawa Y, Kawaguchi K, Fukui T, Kato K, Matsuo K, Yokoi K. Utility of 18F-FDG PET-CT in thymic epithelial tumors. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012;42:e152-e156.

Nakamura S, Tateyama H, Taniguchi T, Ishikawa Y, Kawaguchi K, Fukui T, Mizuno T, Ishiguro F, Yokoi K. Multilocular thymic cyst associated with thymoma: a clinicopathologic study of 20 cases with emphasis on pathogenesis of cyst formation. *Am J Surg Pathol.* 2012;36:1857-1864.

Ishikawa Y, Iwano S, Usami N, Yokoi K. Anomalous segmental vein of the left upper lobe of the lung: preoperative identification by three-dimensional computed tomography pulmonary angiography. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2012;15:512-513.

Kawaguchi K, Miyaoka E, Asamura H, Nomori H, Okumura M, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Yokoi K. Modern surgical results of lung cancer involving neighboring structures: a retrospective analysis of 531 pT3 cases in a Japanese Lung Cancer Registry Study. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012;144:431-437.

Kaneda M, Yokoi K, Ito S, Niwa H, Takao M, Kondo R, Arimura T, Saito Y. The value of pleural lavage cytology examined during surgery for primary lung cancer. Eur J Cardiothorac Surg. 2012;41:1335-1341.

Yoshino I, Yoshida S, Miyaoka E, Asamura H, Nomori H, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Okumura M, Yokoi K. Surgical outcome of Stage IIIA- cN2/pN2 non-small cell lung cancer patients in Japanese Lung Cancer Registry Study in 2004. J Thorac Oncol. 2012;7:850-855.

Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) promotes malignant phenotypes of malignant mesothelioma. J Thorac Oncol, 2012;7:890-9.

Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Tanaka I, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle promoting genes. Oncogene. 2012;31:5117-1122.

[学会発表](計6件)

谷口哲郎 「講演」 悪性胸膜中皮腫切除症例の検討：長期生存例と短期再発・死亡例との比較 第55回 日本肺癌学会総会 2014年11月13日～15日 於 京都府京都市、国立京都国際会館

谷口哲郎 「ワークショップ」 隣接臓器浸潤肺癌切除症例の検討 第54回 日本肺癌学会総会 2013年11月21日～22日 於 東京千代田区、ホテルニューオータニ東京

谷口哲郎 「シンポジウム」 局所進行非小細胞肺癌に対する術前治療 第113回 日本外科学会定期学術集会 2013年4月11日～13日 於 福岡県福岡市、福岡国際会議場

横井香平 「ディベート」 局所進行肺癌に対する治療戦略：手術+周術期療法 第113回 日本外科学会定期学術集会 2013年4月11日～13日 於 福岡県福岡市、福岡国際会議場

谷口哲郎 「ワークショップ」 進行および再発胸腺腫に対する治療 第53回 日本肺癌学会総会 2012年11月8日～9日 於 岡山県岡山市、岡山コンベンションセンター

谷口哲郎 「シンポジウム」 抗凝固療法施行中の原発性肺癌切除症例の検討 第29回 日本呼吸器外科学会総会 2012年5月17日～18日 於 秋田県秋田市、秋田県民会館

6. 研究組織

(1)研究代表者

横井 香平 (YOKOI KOHEI)
名古屋大学・医学研究科・教授
研究者番号：60378007

(2)研究分担者

谷口 哲郎 (TANIGUCHI TETSUO)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20378186

川口 晃司 (KAWAGUCHI KOJI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：10402611