

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460452

研究課題名(和文) 胸膜肉腫型中皮腫の網羅的遺伝子発現解析に基づく病理鑑別診断への応用

研究課題名(英文) Application for pathological diagnosis of pleural sarcomatoid mesothelioma based on comprehensive gene expression analysis

研究代表者

武島 幸男 (Yukio, Takeshima)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：70236462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胸膜肉腫型中皮腫は、肺癌、特に肺肉腫様癌との病理学的鑑別診断が困難な疾患である。本研究では、肉腫型中皮腫と肺肉腫様癌から抽出したmRNAについてGeneChip法による網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、肉腫型中皮腫では肺肉腫様癌と比較すると優位にMUC4 mRNAの発現が低下していることが明らかとなった。MUC4に対する市販の抗体を用いて、肉腫型中皮腫と肺肉腫様癌の免疫染色を行うと、前者は陽性例は皆無であったのに対して、後者は70%程度の症例で陽性となった。これらの結果から、胸膜肉腫型中皮腫と肺肉腫様癌の鑑別診断には抗MUC4抗体の応用が有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pathological diagnosis of pleural sarcomatoid mesothelioma is difficult, especially differentiating from pulmonary sarcomatoid carcinoma. In this study, We conducted a comprehensive gene expression analysis extracted from formalin-fixed paraffin embedded tissue by GeneChip technology. At the result, MUC4 mRNA expression in mesothelioma was significantly lower than that of carcinoma. Then we analyzed MUC4 expression in sarcomatoid mesotheliomas and sarcomatoid carcinomas by immunohistochemistry. As the result, mesotheliomas showed no MUC4 expression, however, approximately 70% cases of sarcomatoid mesotheliomas show positive for MUC4 antibody. From these result, MUC4 might be useful for differential diagnosis between sarcomatoid mesothelioma and pulmonary pleomorphic carcinoma

研究分野：病理学

キーワード：中皮腫 病理診断 免疫染色 抗体

1. 研究開始当初の背景

従来から悪性中皮腫の病理診断は、胸・腹水の細胞診、生検、胸腔鏡下生検などの検体を用いて行われてきたが、形態像・組織像が多様であり、かつ、鑑別を要する疾患が極めて多く存在することから、その診断精度に大きな問題があることが指摘されており、病理組織診断における難題の一つとなっている。実際、日本の中皮腫死亡例の臨床病理学的再検討を行った我々の結果では、約 15% の例が中皮腫の病理診断に疑義があることがわかった。(Takeshima Y et al. *Lung Cancer* 66: 191-197, 2009.)

近年、悪性中皮腫に対する免疫組織化学的染色を用いた鑑別診断が行われ、さまざまな診断のための抗体が報告されてきたが、中皮腫と他疾患を鑑別する為の特異度や感度が 100% となる抗体は今のところない。特に肉腫型中皮腫と肺肉腫様癌の鑑別診断に関する有用なマーカーは現在のところ明確にされておらず、中皮腫診断の上での大きな問題となっている。発現プロファイルの全貌を俯瞰することにより、分子レベルでの新規の癌の分類、診断、治療への反応性および予後に関する、より正確な予測にもとづいた治療法の選択も可能になりつつある。このような試みは乳癌や肺癌ですで行われつつある。

このような背景から、難治とされる悪性中皮腫を網羅的な遺伝子発現解析を応用して正しい病理診断を行うことは、中皮腫の予後改善、個別化治療のためにはきわめて重要な事項と考えられる。

2. 研究の目的

悪性中皮腫と鑑別を要する諸疾患の内、特に肉腫型中皮腫との鑑別診断が困難な肺肉腫様癌について、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、病理組織学的診断において肉腫型中皮腫の鑑別診断に有用な特異的マーカーを明らかにし、病理組織学的な鑑別診断への応用・実用化を計る。

3. 研究の方法

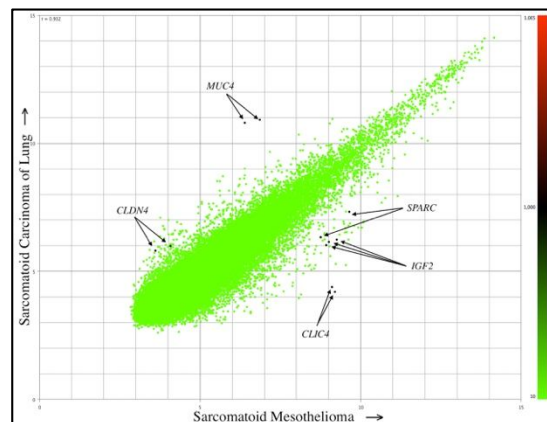
肉腫型中皮腫 6 例、肺肉腫様癌 6 例のホルマリン固定パラフィン包埋材料から mRNA を抽出し、これを、AFFYMETRIX 社の The Almac Xcel Array GeneChip を用いて、約 97,000 の転写産物の発現を解析し、その後、Gene Expression Console Software を用いて、両

者間に発現の優位な差のある mRNA を同定する。

同定された遺伝子産物に対する抗体を用いて、肉腫型中皮腫 31 例、肺肉腫様癌 29 例に対して免疫組織学的染色を行って、両腫瘍における肉腫様形態を示す部分の陽性率を半定量的にスコアリングする。また、従来から中皮腫、肺がんの診断に有用とされる、calretinin, Podoplanin (D2-40), WT1, Cytokeratin (AE1/AE3, CAM5.2), p40, TTF-1, Claudin-4 についても染色を行い、これらマーカーとの感度、特異度、正診率を求めて、鑑別診断に最も有用な抗体を明らかにする。

4. 研究成果

GeneChip を用いた遺伝子発現解析の結果、肉腫型中皮腫と肺肉腫様癌の間で 5 倍以上の mRNA の発現の差が見られた遺伝子は、高発現していたものとして 156 個、低発現のものとして 46 個の遺伝子が同定された。



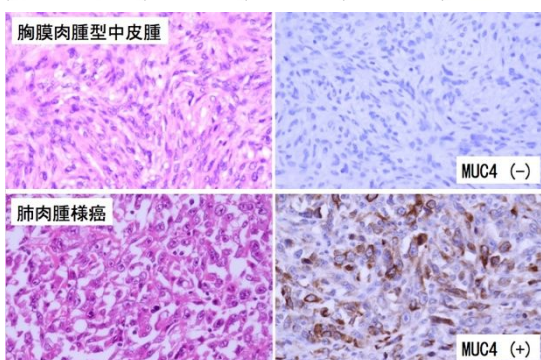
MUC4 mRNA は肺肉腫様癌で、IGF2 mRNA は肉腫型中皮腫でより高い発現を示す。

この内、リアルタイム RT-PCR を用いた MUC4 mRNA の定量的解析によりバリデーションを行うと、6 例の肉腫型中皮腫での発現は殆ど無視できる程度の量しか発現していなかったのに対して、肺肉腫様癌では 6 例中 5 例では高発現していることが確認された。また、IGF2 mRNA はすべての肉腫型中皮腫で発現が見られたが、肺肉腫様癌では 6 例中 3 例しか発現は見られなかった。これらの結果を踏まえ、MUC4 を肉腫型中皮腫と肺肉腫様癌の鑑別マーカーのターゲットとして捉え、抗 MUC4 抗体を用いて両者に免疫組織化学的染色を行った。

その結果、肉腫型中皮腫では 0% (0/31) であるのに対して、肺肉腫様癌では 72% (21/29) が陽性となり、MUC4 の陰性マーカーとしての感度、特異度、正診率はそれぞれ 100%, 72%, 87% となった。

他のマーカーの感度、特異度、正診率は、それぞれ、カルレチニン(+) 74%, 55%, 65%, D2-40 (+) 71%, 69%, 70%、WT-1 (+) 19%, 97%, 57%, AE1/AE3 (+)94%, 0%, 48%, CAM5.2 (+) 90%, 3%, 48%, TTF-1 (-) 100%, 52%, 77% (-), p40 (-) 94%, 21%, 58%, Claudin-4 (-) 100%, 45%, 73%となり、MUC4を用いた鑑別診断が最も正診率が高い結果となった。

抗体	感度	特異度	正診率	p-value
MUC4(-)	100%	72.4%	86.7%	<0.001
Calretinin(+)	74.2%	55.2%	65.0%	0.034
D2-40(+)	71.0%	69.0%	70.0%	0.004
WT1(+)	19.4%	96.6%	56.7%	0.104
AE1/AE3(+)	93.5%	0%	48.3%	0.492
CAM5.2(+)	90.3%	3.4%	48.3%	0.613
p40(-)	93.5%	20.7%	58.3%	0.14
TTF-1(-)	100%	51.7%	76.7%	<0.001
Claudin-4(-)	100%	44.8%	73.3%	<0.001
p40/TTF-1(-)	93.5%	65.5%	80.0%	<0.001



MUC4 は肉腫型中皮腫では発現していないが、肺肉腫様癌では発現している。

また、MUC4を含めた他のマーカーとの組み合わせによる正診率を算出すると、MUC4を含めた場合、90%以上となり、MUC4の鑑別診断における陰性マーカーとしての有用性が示された。

本研究で明らかとなった、MUC4は肉腫型中皮腫の陰性マーカーとして従来のマーカーよりもその優位性が示され、今後の中皮腫の正確な診断の際に加えるべき新規のマーカーであるといえる。

今後、MUC4の中皮腫診断における有用性について対象症例を増やして明らかにするとともに、本研究で明らかとなった中皮腫と肺がんが発現の異なる他の遺伝子についても検討して、さらなる新規マーカーの探索し、中皮腫病理診断の精度向上に資する知見を明らかにしたい。

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 4 件)

Amatya VJ, Kushitani K, Mawas AS, Miyata Y, Okada M, Kishimoto T, Inai K, Takehima Y. MUC4, a novel immunohistochemical marker identified by gene expression profiling, differentiates pleural sarcomatoid mesothelioma from lung sarcomatoid carcinoma. *Modern Pathology* 2017 Feb 27. [Epub ahead of print] doi: 10.1038/modpathol.2016.181(査読有り)

Amatya VJ, Mawas AS, Kushitani K, Mohi El-Din MM, Takehima Y. Differential microRNA expression profiling of mesothelioma and expression analysis of miR-1 and miR-214 in mesothelioma. *International Journal of Oncology*; 2016; 48(4):1599-1607. DOI: 10.3892/ijo.2016.3358 (査読有り)

Kushitani K., Amatya V.J., Mawas A.S., Miyata Y., Okada M., Takehima Y. Use of Anti-Noxa Antibody for Differential Diagnosis between Epithelioid Mesothelioma and Reactive Mesothelial Hyperplasia. *Pathobiology* 83(1): 33-40, 2016. doi: 10.1159/000442092(査読有り)

武島幸男、榎谷 桂、Amatya V.J.、井内康輝 中皮腫 病理と臨床 - 免疫組織化学診断と治療選択の指針, 32(臨時増刊) : 154-159, 2014. (査読なし)

〔学会発表〕(計 4 件)

Amatya V.J.、Mawas A.S.、櫛谷 桂、武島幸男
MUC4 is novel markers to differentiate sarcomatoid mesothelioma from sarcomatoid carcinoma of lung
第 57 回日本肺癌学会学術集会 示説 2016 年 12 月 19 日～12 月 21 日 福岡市

Amatya V.J. , (線田智之, 高木祐基) ,
Mawas A.S. , 櫛谷 桂 , 武島幸男
Gene expression microarray analysis of sarcomatoid mesothelioma and sarcomatoid carcinoma of lung.
第 105 回日本病理学会総会 演説 2016 年 5 月 12 日～5 月 14 日 仙台市

武島幸男、Amatya VJ、櫛谷 桂
肉腫型中皮腫の病理診断における免疫組織化学的染色の有用性と諸問題 第 22 回石綿・中皮腫研究会 シンポジウム「肉腫型中皮腫の病理診断の問題点」 演説
2015 年 10 月 31 日 川崎市

武島幸男
免疫組織化学的染色を用いた中皮腫の細胞・組織診断 第 53 回 日本臨床細胞学会秋期大会 2014 年 11 月 1 日 下関市

〔図書〕(計 3 件)

武島幸男、櫛谷 桂、Amatya VJ、井内康輝
通常型中皮腫の病理 石綿関連疾患の病理とそのリスクコミュニケーション, 井内康輝 編著 篠原出版新社 p39-56, 2015.

武島幸男 悪性中皮腫
病理と臨床-病理診断クイックリファレンス 文光堂 33(臨時増刊) : p38, 2015.

武島幸男、櫛谷 桂、Amatya V.J.、井内康輝
上皮型中皮腫、肉腫型中皮腫(線維形成型中皮腫を含む)、二相型中皮腫
腫瘍病理鑑別診断アトラス 縦隔腫瘍・胸膜腫瘍, 文光堂 p202-212, 2014.

〔その他〕

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/byouri2/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

武島 幸男 (TAKESHIMA YUKIO)
広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授
研究者番号 : 70236462

(2) 研究協力者

Amatya V. Jeet (AMATYA V. JEET)
広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・講師
研究者番号 : 90403625

櫛谷 桂 (KUSHITANI KEI)
広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教
研究者番号 : 00508179