

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460457

研究課題名(和文) 中皮細胞のテロメア長の変動、特に石綿曝露による変化と悪性中皮腫発生との関連の解析

研究課題名(英文) Telomere length of mesothelial cells in pleural effusion, and its correlation with asbestos exposure and development of malignant mesothelioma

研究代表者

相田 真介 (AIDA, Shinsuke)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：10531387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胸水中の中皮細胞と腫瘍細胞のテロメア長(TL)を測定し、石綿曝露等との関連を検討した。非腫瘍性胸水(NN)35例、悪性中皮腫(MM)9例、肺腺癌(LA)8例を測定した。NN35例中15例は胸膜ブランクを有し、石綿曝露が示唆され(NNpp+)、20例はブランクなし(NNpp-)。テロメア長はQ-FISH法にて測定した。NNはMM及びLAよりTLが長かった($p<0.001$)。NNpp+は、NNpp-よりわずかにTLが短かった($p=0.047$)。中皮悪性マーカーEMA、GLUT1等の発現が、NNにも稀にみられ、TLが短い例に多かった。これらより、TL短縮の悪性中皮腫発生への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We estimated the telomere lengths (TLs) of mesothelial cells and neoplastic cells in pleural effusion and examined their correlation with asbestos exposure and expression of markers of mesothelial malignancy. Cell blocks of pleural effusion obtained from 35 cases of non-neoplastic disease (NN), 9 cases of malignant mesothelioma (MM) and 8 cases of lung adenocarcinoma (LA) were examined. 15 of 35 NN cases had pleural plaques (NNpp+) suggestive of asbestos exposure, and other 20 had no pleural plaques (NNpp-). TL was measured using tissue quantitative FISH method. NN had significantly longer TLs than MM ($p<0.001$) and LA ($p<0.001$). TLs in NNpp+ were slightly shorter than those of NNpp- ($p=0.047$). MM and LA showed almost the same TLs. NN with shorter TLs tended to show aberrant expression of EMA, CD146, GLUT1 and IMP3. These results suggest that telomere shortening and subsequent genetic instability play an important role in the development of MM.

研究分野：病理学

キーワード：中皮細胞 悪性中皮腫 テロメア 石綿 胸水

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫の多くが石綿曝露に関連していることが、統計的研究および動物実験による研究で示されているが、詳細なメカニズムは十分に解明されていない(1)。現在石綿の使用は全面的に禁止されているが、曝露から悪性中皮腫発生までの潜伏期間が20年以上と非常に長いため、現時点でも日本国内での悪性中皮腫患者は増加している(2)。悪性中皮腫は早期診断が困難で、有効な治療法に乏しく、予後不良である(3)。

2. 研究の目的

石綿非曝露状態、石綿曝露状態、悪性中皮腫などの各病態における中皮細胞のテロメア長の変化について、胸水中の中皮細胞のセルブロック組織切片を用いた Q-FISH 法を施行することにより明らかにして、中皮腫発生のメカニズムの解明、悪性中皮腫の早期診断、石綿曝露症例の悪性化の危険率や予後の推定への応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

非腫瘍性胸水(35例)、悪性中皮腫症例(9例)、肺腺癌による癌性胸水(8例)から細胞診検査用に提出された胸水を、患者の承諾を得たうえで、細胞診の診断完了後に研究材料として用いた。非腫瘍性胸水35例中15例は胸膜プラークを有し石綿曝露歴のある症例であった。提出された胸水のセルブロックを通常の方法で作成し、細胞診断・報告が終了後に、Quantitative-fluorescence in situ hybridization (Q-FISH)用の切片を作成し、Q-FISHを行って、中皮細胞、腫瘍細胞および対照培養細胞のテロメア長を測定した。各症例100個以上の中皮細胞および腫瘍細胞のテロメア長を測定した。テロメア長は、テロメア対セントロメア蛍光光度比(TCR)を測定し、さらに同一切片上に載せたテロメア長既知(8.64kbp)の培養細胞のセルブロック切片のTCRとの比(NTCR)を算出した。Q-FISH法によるテロメア長の測定の詳細は、我々が既に報告している方法に従った(4-9)。得られた測定データより、胸膜プラーク陰性例および胸膜プラーク陽性の石綿曝露例の非腫瘍性中皮細胞、悪性中皮腫および肺腺癌細胞のテロメア長の差異を検討した。また中皮細胞の悪性の指標とされている EMA, Glut1, CD146, IMP3 の免疫染色(10)も行い、これらの染色性とテロメア長の関連も検討した。

4. 研究成果

胸膜プラーク陰性の非腫瘍性中皮細胞(NNpp-)の平均NTCRは1.78、胸膜プラーク陽性の非腫瘍性中皮細胞(NNpp+)の平均NTCRは1.53、悪性中皮腫細胞(MM)の平均NTCRは1.05、肺腺癌細胞(LA)の平均NTCRは1.02であった。NNpp-及びNNpp+は、MM及びLAに対して有意にNTCRが大きく、非腫瘍性中皮細胞のテロメアは、悪性中皮腫や腺癌の腫瘍性細胞より

有意に長かった($p < 0.001$)。また NNpp+は NNpp-よりも有意にNTCRが小さく($p = 0.047$)、石綿曝露により中皮細胞のテロメアの短縮が起こることが示唆された(図1)。

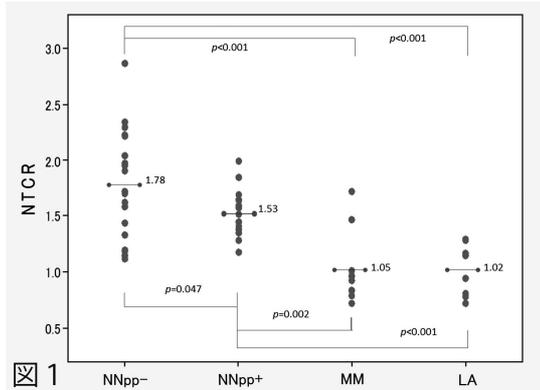


図1

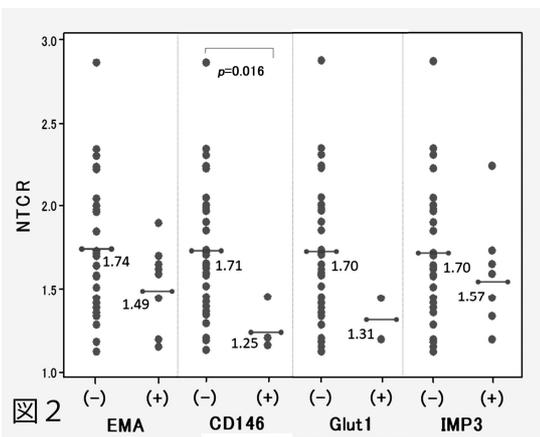


図2

EMA, CD146, Glut1, IMP3 はいずれも中皮細胞の悪性マーカーとされているが、非腫瘍性中皮細胞にも稀に発現がみられ、テロメアの短い症例に発現する傾向があった(図2)。

石綿曝露による中皮腫の発生の機序は、胸膜への石綿線維の沈着により慢性炎症が起こり、炎症性浸潤細胞より放出される活性酸素種や活性窒素種による DNA 損傷(11,12)、各種サイトカインや増殖因子による抗アポトーシス作用による遺伝子変異の蓄積(13,14)、石綿線維への発癌物質を含む各種化学物質の吸収・蓄積(15)などの多数の因子が関与する複雑なプロセスであると考えられている。今回の我々の研究により、石綿曝露により胸膜中皮細胞のテロメアの短縮が起こり、それによる遺伝子の不安定性が、悪性中皮腫の発生に重要な役割を担っていることが示唆された。また胸水中の中皮細胞のテロメア長の測定が、異型中皮細胞の良悪の判定、石綿曝露症例の悪性中皮腫発生の危険率の推定、悪性中皮腫の早期発見に役立つ可能性が考えられた。

<引用文献>

1. Yang H, Testa JR, Carbone M. Mesothelioma epidemiology, carcinogenesis, and pathogenesis. Current

treatment options in oncology. 2008;9(2-3):147-57.

2. 村山武彦：胸膜中皮腫による死亡数の将来予測事例. in 独立行政法人労働者健康福祉機構監修, 岸本卓巳 (編): 胸膜中皮腫診療ハンドブック. 中外医学社 2007:26-34

3. 藤本伸一、青江啓介、豊岡伸一、酒井文和、西英行、亀井敏昭、井内康輝、相田真介、他：胸膜中皮腫の臨床像と診断. in 独立行政法人労働者健康福祉機構監修, 岸本卓巳 (編): 胸膜中皮腫診療ハンドブック. 中外医学社 2007:35-130

4. Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, Kammori M, et al. Basal cells have longest telomeres measured by tissue Q-FISH method in lingual epithelium. *Exp Gerontol.* 2008;43(9):833-9. Epub 2008/07/02.

5. Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishii A, Ishikawa N, Honma N, et al. Telomere length variations in 6 mucosal cell types of gastric tissue observed using a novel quantitative fluorescence in situ hybridization method. *Hum Pathol.* 2007;38(8):1192-200. Epub 2007/06/26.

6. Kurabayashi R, Takubo K, Aida J, Honma N, Poon SS, Kammori M, et al. Luminal and cancer cells in the breast show more rapid telomere shortening than myoepithelial cells and fibroblasts. *Hum Pathol.* 2008;39(11):1647-55. Epub 2008/07/29.

7. Shiraishi H, Mikami T, Aida J, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Arai T, et al. Telomere shortening in Barrett's mucosa and esophageal adenocarcinoma and its association with loss of heterozygosity. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(5):538-44. Epub 2009/02/18.

8. Aida S, Aida J, Hasegawa K, Kumasaka T, Shimazaki H, Tamai S, et al. Telomere Length of Human Adult Bronchial Epithelium and Bronchogenic Squamous Cell Carcinoma Measured Using Tissue Quantitative Fluorescence in situ Hybridization. *Respiration.* 2015;90(4):321-6. Epub 2015/09/04.

9. Aida J, Yokoyama A, Izumiyama N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, et al. Alcoholics show reduced telomere length in the oesophagus. *J Pathol.* 2011;223(3):410-6. Epub 2010/12/21.

10. Minato H, Kurose N, Fukushima M, Nojima T, Usuda K, Sagawa M, et al. Comparative immunohistochemical analysis of IMP3, GLUT1, EMA, CD146, and desmin for distinguishing malignant mesothelioma from reactive mesothelial cells. *American journal of clinical pathology.* 2014;141(1):85-93. Epub 2013/12/18.

11. Choe N, Tanaka S, Kagan E. Asbestos

fibers and interleukin-1 upregulate the formation of reactive nitrogen species in rat pleural mesothelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 1998;19(2):226-36. Epub 1998/08/12.

12. Huang SX, Jaurand MC, Kamp DW, Whysner J, Hei TK. Role of mutagenicity in asbestos fiber-induced carcinogenicity and other diseases. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews.* 2011;14(1-4):179-245. Epub 2011/05/03.

13. Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, Elmishad AG, Chen Y, Liu Z, et al. TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(27):10397-402. Epub 2006/06/27.

14. Qi F, Okimoto G, Jube S, Napolitano A, Pass HI, Laczko R, et al. Continuous exposure to chrysotile asbestos can cause transformation of human mesothelial cells via HMGB1 and TNF-alpha signaling. *The American journal of pathology.* 2013;183(5):1654-66. Epub 2013/10/29.

15. Sekido Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis.* 2013;34(7):1413-9. Epub 2013/05/17.

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 1件)

1. 相田真介、津浦 幸夫. 高分化乳頭状中皮腫；その特徴と問題点. *診断病理* 33(2):131-5, 2016

[学会発表](計 4件)

1. 相田真介, 相田順子, 直井美穂, 森崎優也, 川口幹夫, 猪俣美和, 石綿仁深, 鈴木明美, 津浦幸夫. Q-FISH 法による胸水中皮細胞のテロミア長の測定とその意義の検討. 第56回日本臨床細胞学会総会, くにびきメッセ・松江テルサ, 松江市, 2015,6,12

2. Aida S, Aida J, Tsura Y, Kato M, Takubo K, Osamura Y. Telomere length of mesothelial cells in pleural effusion measured using Q-FISH method. 第105回日本病理学会総会, 仙台国際センター, 仙台市, 2016,6,12

3. Aida S, Aida J, Tsura Y, Naoi M, Takubo K, Osamura Y. Telomere length of mesothelial cells in pleural effusion measured using quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) method. 第

31回国際病理学会(XXXI IAP)国際会議, ケルンメッセ会議場, ドイツ/ケルン, 2016,9,27
4. Shinsuke Aida, Junko Aida, Miho Naoi, Mai Kato, Yukio Tsuura, Kaiyo Takubo.
Telomere length of mesothelial cells in pleural effusion measured using Q-FISH method. 第106回日本病理学会総会, 京王プラザホテル, 東京/新宿, 2017/4/27

6. 研究組織

(1)研究代表者

相田 真介 (AIDA Shinsuke)
国際医療福祉大学・大学病院・教授
研究者番号：10531387

(2)研究分担者

相田 順子 (AIDA Junko)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・専門副部長
研究者番号：80425678

(3)研究協力者

津浦 幸夫 (TSUURA Yukio)