

【MOOK 肺癌の臨床 2008-2009】

中皮腫発生に関わるエピジェネティクス

河野秀和 Amatya Vishwa Jeet 武島幸男 井内康輝

株式会社 篠原出版新社

診断・治療 [中皮腫・胸膜, 縦隔腫瘍]

中皮腫発生に関わるエピジェネティクス

河野 秀和, Amatya Vishwa Jeet, 武島 幸男, 井内 康輝

はじめに

中皮腫患者の大半はアスベストへの曝露歴を持つことから、中皮腫はアスベストによるがんとされているが、遺伝子レベルからみた発がんの機序については不明といわざるをえない。他のがんで明らかとなりつつある特異的な遺伝子の欠失や点突然変異が中皮腫においては少ない。すなわち、これまでの報告をみると、p16遺伝子のhomozygous deletionやNF2遺伝子の変異が見い出される率が高いものの、ras, p53, Rbなど他のがんにおいて高率に見い出される遺伝子異常は中皮腫ではきわめて低率である。したがってgeneticな異常についてはマイクロアレイ法などを用いた遺伝子発現の網羅的解析を行って、中皮腫の発生・増殖・進展に関わる特異的な変化を見出す必要があるが、加えてepigeneticな遺伝子発現の制御の立場からも検討することが重要と考えられる。

腫瘍において、epigeneticな遺伝子発現制御の立場からその異常を検討されている因子としては、DNAメチル化に関わる酵素、メチル化DNA結合蛋白質やヒストン蛋白質の修飾酵素などがある。しかしその他にも、クロマチンや染色体本来の機能が発揮されるためにはインスレーターやnon-coding RNAなどにより正確なタイミングでクロマチンの構造変換が起こる必要があることから、DNA、ヌクレオソーム、クロマチン、染色体というそれぞれの視点から染色体ゲノムの制御機構を把握の必要性も指摘されている。

こうした知見を踏まえて本稿では、これまでに報告された中皮腫におけるepigeneticな異常、とくにDNAプロモーター領域の異常メチル化について焦点をあてて概説し、さらに、われわれの行った研究の成果も紹介したい。

1 DNAメチル化に関わる分子

DNAのメチル化による修飾は、遺伝子の塩基配列を変えることなく、すなわち、遺伝子のコードするアミノ酸配列情報を変えることなく、その発現を制御することができる¹⁾。生じたメチル化は安定して次世代の細胞に受け継がれるが、一方でメチル化は、必要に応じてメチル基がはずされるという可塑性という特徴を持つ¹⁾。

真核生物では一部の例外を除いて、DNAのシトシン塩基(C)の5位がメチル化修飾を受ける(図1)¹⁾。動物では、脊椎動物への進化を遂げた際にゲノムの塩基配列が増加したが、時を同じくしてDNA中のシトシン塩基のメチル化の割合が増えたといわれる¹⁾。脊椎動物では、シトシン塩基に次いでグアニン塩基のメチル化の程度が高く、マウスのゲノムでは、CpG配列の約80%がメチル化修飾を受けているといわれる。

メチル化の機序は、S-アデノシル-L-メチオニンからDNAメチルトランスフェラーゼの働きでメチル基が転移される¹⁾。マウスのゲノムをみると、G+C含量が相対的に高い領域が島状に存在し、多くの場合、ハウスキープ遺伝子のプロモーターとなり低メチル化状態にある。一般に、転写されている遺伝子のプロモーター領域は低メチル化状態にあり、不活性な遺伝子のプロモーター領域は高度にメチル化されている。プロモーター領域に存在する転写因子がメチル化されると、ほとんどの転写因子はDNAに結合できなくなる。また、メチル化されたDNAを特異的に認識して結合する蛋白質が存在し、このメチル化DNA結

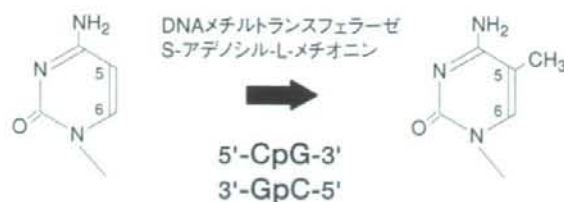


図1 シトシン塩基のメチル化修飾 (文献1より翻訳・転載)

真核生物のゲノムDNAは、シトシン塩基の5位の炭素はDNAメチルトランスフェラーゼの働きでメチル化修飾を受ける。脊椎動物ではメチル化修飾の標的塩基配列はCpGとなっている。

合蛋白質を介して転写が阻害されている場合がある²⁾。

メチル化の役割としては、DNAメチル化に先だつて転写が抑制されることがしばしば観察されることから、遺伝子発現の抑制にDNAのメチル化は二次的なものであり、長期的に遺伝子をサイレンシングするための一種の記憶として機能していると考えられている²⁾。

2 がんにおける遺伝子のepigeneticな異常

がんにおけるepigeneticな異常には、DNAメチル化の異常、ヒストン修飾の異常、ゲノムインプリンティングの異常などがあげられる³⁾。DNAメチル化の異常としては、高メチル化状態と低メチル化状態があげられるが(表1)⁴⁾、高メチル化は遺伝子発現抑制に、低メチル化は遺伝子発現増加につながる。がんにおけるDNAメチル化異常の特徴としては、ゲノムワイドな低メチル化を示す一方、ある特定の遺伝子プロモーターのCpGアイランドにおける部分的な高メチル化がしばしば認められる。前者は染色体不安定性を引き起こすと考えられ⁵⁾、後者は高メチル化した遺伝子のmRNAへの転写を抑制することにより遺伝子の不活化を引き起こすとされる⁶⁾。

ヒストン修飾の異常としては、ヒストンの脱アセチル化、すなわちHistone deacetylase inhibitor (HDACI) により中皮腫細胞株のアポトーシスが誘導されることがよく検討されている^{6,7)}。

ゲノムインプリンティングの異常とは、例えば、細胞増殖の促進に働くIGF2 (insulin-like growth factor) 遺伝子は、正常では父親由来のアレルのみが発現するが、本来発現しないはずの母親由来のアレルが活性化され、IGF2の発現量が増加することとなる。このようにインプリンティングを受けて本来は発現しないアレルからも遺伝子発現が起こり、両アレル性発現となることをインプリンティングの消失 (loss of imprinting: LOI) といい、Beckwith-Wiedemann症候群などのインプリンティング疾患に加え、ウイルス腫瘍、大腸癌、肺癌、卵巣癌などさまざまな腫瘍でIGF2のLOIがみられる⁸⁾。

がんにおけるこうした異常はがん治療のターゲットとしても注目されている。高メチル化により不活化された遺伝子は、DNAメチル化阻害剤たとえば5-Aza-2'-deoxycytidineで遺伝子発現を正常に回復させることが可能であり、また、ヒストンの脱アセチル化についても、Histone deacetylase inhibitor (HDACI) により同様の効果が期待できる。この点が、geneticな異常との大きな違いである。

3 発がん過程におけるDNA異常メチル化の役割

発がん過程においては、さまざまな遺伝子が、異常メチル化により不活化されていることが知られてい

表1 がんにおけるDNAメチル化の変化

ゲノム全体の低メチル化	
ゲノム全体の低メチル化	→ レトロトランスポジションの増加?
プロモーター領域CpGアイランドの低メチル化	→ がん抗原, がん遺伝子の発現
メチル化可変領域の低メチル化	→ LOIの誘発
部分的な高メチル化	
プロモーター領域CpGアイランドの高メチル化	→ がん抑制遺伝子の遺伝子サイレンシング, 非特異的な遺伝子サイレンシング, 使われていない遺伝子のDNAメチル化
非プロモーター領域CpGアイランドの高メチル化	→ 意義は不明
メチル化可変領域の高メチル化	→ LOIの誘発

(文献4より転載)

表2 DNAメチル化により不活化される遺伝子の例

VHL	腎がん (19%)
RB	散発性網膜芽腫 (14%)
p16	非小細胞肺癌 (26%), 乳がん (31%), 大腸がん (40%), 膀胱がん (67%), 神経膠腫 (23%), 多発性骨髄腫 (75%), 非ホジキンリンパ腫 (15~21%)
p15	急性骨髄性白血病 (67~88%), 急性リンパ性白血病 (41~71%), 多発性骨髄腫 (67%)
BRCA1	散発性乳がん (29%)
E-cadherin	肝がん (67%), 乳がん (42%)
hMLH1	大腸がん (22%), 胃がん (74%)
DAPK	非ホジキンリンパ腫 (84%), 非小細胞肺癌 (25~44%)
FHIT	食道がん (14%)
APC	胃がん (83%), 大腸がん (18%), 乳がん (36%)
RASSF1A	非小細胞肺癌 (40%)
TSLC1	非小細胞肺癌 (83%)
SFRP1	大腸がん (85%), 子宮がん (12%), 膀胱がん (18%)
HIC1	乳がん (67%)

(文献3より翻訳・改変)

る(表2)³⁾。家族性腫瘍の原因遺伝子として同定されたがん抑制遺伝子の多くが、散発性の腫瘍においても異常メチル化により不活化されている。さらに、細胞周期調節遺伝子、アポトーシス関連遺伝子など、がん化において重要ながん関連遺伝子が異常メチル化により不活化されることも報告されている。RLGS (restriction landmark genomic scanning) や、メチル化阻害剤により発現が誘導される遺伝子をcDNAマイクロアレイにより解析した結果から、がんにおいては、全遺伝子のうち数%は異常メチル化により不活化されていると推定されている^{8,9)}。また、メチル化される遺伝子にはメチル化を受けやすい、いわゆる感受性が存在するとも考えられている¹⁰⁾。感受性の高いがんはCpG island methylation phenotype (CIMP)を有し、CIMPは散発性腫瘍におけるマイクロサテライト不安定性の原因として重要であるばかりでなく、家族歴を伴う大腸癌で高率に認められることから、メチル化を制御する遺伝子の異常あるいはメチル化異常を引き起こす環境要因の関与している可能性がある¹¹⁾。

表3 DNAプロモーター領域のメチル化についての文献のまとめ

報告者	方法	遺伝子	対象とした中皮腫組織・細胞(数)
Murthy SS, 2000 ⁽¹³⁾	Southern blot	GPC3	細胞株 (22)
Toyooka S, 2001 ⁽¹⁴⁾	MSP	RASSF1A, RAR β , CDH13, GSTP1, MGMT, p16, APC	凍結組織 (66)・細胞株 (6)
Toyooka S, 2002 ⁽¹⁵⁾	MSP	RASSF1A, RAR β , CDH13, GSTP1, MGMT, p16, APC	細胞株 (1)
Hirao T, 2002 ⁽¹⁶⁾	MSP	p16, p14	凍結組織 (45)
Wong L, 2002 ⁽¹⁷⁾	MSP	p16	パラフィン包埋組織 (7)・凍結組織 (4)・細胞株 (10)
Lee AY, 2004 ⁽¹⁸⁾	MSP	SFRP1, SFRP4, SFRP5	凍結組織 (21)・細胞株 (2)
Suzuki M, 2005 ⁽¹⁹⁾	MSP	DcR1, DRM/Gremlin, RRAD, DCR2, HPP1, CyclinD2, RASSF1A, HIC-1, RIZ1, CRBP1, TMS1, NORE1A	凍結組織 (63)・細胞株 (6)
Tsou JA, 2005 ⁽²⁰⁾	MethyLight	MTHFR, MGMT, RASSF1, PGR, CALCA, PTGS2, MYOD1, ESR1, CDH1, ESR2, APC, TIMP3, CDKN2A, GSTP1	凍結組織 (6)・細胞株 (10)
He B, 2005 ⁽²¹⁾	MSP	SFRP4	細胞株 (1)
Batra S, 2006 ⁽²²⁾	MSP	WIF-1	凍結組織 (12)・細胞株 (4)
Fischer JR, 2006 ⁽²³⁾	MSP	APC1A, APC1B, RASSF1A, DAPK, E-cadherin, FHIT, p16, p14, RAR β	血清 DNA (43)
Tomii K, 2006 ⁽²⁴⁾	MSP	IGFBP-3	凍結組織 (56)・細胞株 (5)
Szlosarek PW, 2006 ⁽²⁵⁾	MSP	AS	細胞株 (5)
Pu RT, 2007 ⁽²⁶⁾	Real-time MSP	RAR β 2, TERT, CDKN2A, GPC3, CCND2	パラフィン包埋組織 (41)
Tsou JA, 2007 ⁽²⁷⁾	MethyLight	APC, ATM, CDH1, CDH13, CDKN2A, CDKN2B, CDX2, CHFR, CYP1B1, ESR1, HMGA1, HOXA1, LZTS1, MGMT, MTIA, MT2A, OPCML, PGR, PTEN, RASSF1, SFRP1, SFRP4, SFRP5, SLC6A20, SOCS4, SYK, TWIST1, VHL	凍結組織 (52)
Destro A, 2007 ⁽²⁸⁾	MSP	p15, p16, RASSF1A, Nore1A	パラフィン包埋組織 (79)

4 中皮腫におけるDNAプロモーター領域のメチル化

中皮腫のDNAプロモーター領域のメチル化の報告は、2000年以降では数論文に限られている(表3)。それら論文のほとんどでは、方法としてmethylation-specific PCR (MSP)法を用いているが、MSP法は定量性が乏しく、結果の判定が困難な場合があることから、2005年頃より、PCRとTaqManプローブを用いるMethyLight法が用いられるようになった^{20,27)}。研究の標的となる遺伝子としては、RASSF1Aのプロモーター領域のメチル化を対象としている論文が多い。Toyookaら^{14,15)}は66例の中皮腫と40例の肺腺癌を対象とし、前者では後者と比較して、RASSF1A (33% vs 43%)とGSTP1 (5% vs 8%)以外の、p16 (2% vs 30%: $p<0.01$)、RAR β (10% vs 30%: $p=0.02$)、APC (0% vs 55%: $p<0.01$)、CDH13 (8% vs 45%: $p<0.01$)、MGMT (3% vs 20%: $p<0.01$)のメチル化の頻度が有意に低いことを報告している。加えて、上皮型中皮腫では肉腫型中皮腫と比較してRASSF1A (35% vs 0%: $p=0.047$)のメチル化の頻度が有意に高いこと、さらに、肺腺癌ではSV40のゲノムシークエンスを認める例はなく、SV40ゲノムシークエンスを見出す中皮腫では見出せない中皮腫と比較して、RASSF1A (48% vs 15%: $p=0.022$)のメチル化の頻度が有意に高いことも報告している。Suzukiら¹⁹⁾は63例の中皮腫凍結組織と6例の中皮腫細胞株を用いて、SV40ゲノムシークエンスを認める中皮腫では認めない中皮腫に比べ、RASSF1A (48% vs 16%: $p=0.007$)、RRAD (71% vs 41%: $p=0.02$)、HPP1 (52% vs 19%: $p=0.009$)、CyclinD2 (52% vs 19%: $p=0.009$)、TMS1 (13% vs 0%: $p=0.05$)のメチル化の頻度が有意に高く、SV40が中皮腫の発生に関与していると述べている。SV40と中皮腫発生との関連については、SV40T抗原は中皮腫細胞において、プロモーター領域のメチル化によりRASSF1Aの発現を抑制し、細胞膜の肝細胞増殖因子(HGF)の受容体であるc-Met、ヒト細胞の形質転換に関与すると考えられるNotch-1、さらにIGF-1R受容体を活性化する。これらの受容体チロシンキナーゼのリン酸化後に、共通のカスケードとしてERKがリン酸化を受けて活性化され、それに引き続き転写因子AP-1が活性化されることにより細胞分裂が促進されると考えられている^{29,30,31)}。

これら遺伝子のプロモーター領域のメチル化のプロファイルが、中皮腫と肺癌の鑑別を行う際に有用か否かの検討も行われている。Tsouら²⁰⁾は、6例の中皮腫と7例の肺腺癌の組織および10例の中皮腫の細胞株を用いてDNAプロモーター領域のメチル化のプロファイリングを行い、中皮腫組織と中皮腫細胞株では、それぞれ肺腺癌と比較して、CDH1 (80% vs 63%: $p=0.02$)、(83% vs 29%: $p=0.003$)のメチル化頻度の有意な増加、APC (40% vs 88%: $p=0.0003$)、(50% vs 100%: $p=0.0003$)のメチル化頻度の有意な減少がみられると報告している。同時に、11例の非腫瘍部肺組織との比較も行い、中皮腫では、RASSF1、PGR1、ESR1、CDH1のメチル化頻度の有意な増加とAPCのメチル化頻度の有意な減少があり、肺腺癌では、ESR1、PGR1、RASSF1のメチル化頻度の有意な増加がみられると報告し、APCとCDH1のメチル化の有無をみるのが中皮腫と肺腺癌の鑑別に有用であるとしている。また、中皮腫と非腫瘍部肺組織および肺腺癌と非腫瘍部肺組織の鑑別には、CDH1、APCに加えてRASSF1、ESR1、PGRのメチル化の有無をみるのが重要であるとも述べている。さらに、Tsouら²⁷⁾は、52例の中皮腫と38例の非腫瘍部肺組織を対象にして28遺伝子のDNAプロモーター領域のメチル化のプロファイリングを行い、中皮腫では非腫瘍部肺組織と比べて、ESR1 (71% vs 32%: $p=0.0002$)、SLC6A20 (46% vs 10%: $p=0.0022$)、SYK (67% vs 22%: $p=0.0003$)のメチル化頻度の有意な増加がみられるとも報告している²⁷⁾。Tomiiら²⁸⁾は16例の日本人中皮腫組織と40例のアメリカ人中皮腫組織と比較すると、IGFBP-3 (75% vs 15%: $p<0.0001$)のメチル化は日本人に有意に多いことから、IGFBP-3のメチル化には人種差が関連している可能性があることを推測している。

中皮腫のepigeneticな異常に関する研究報告の多くは、凍結組織、パラフィン包埋組織および細胞株を使用しているが、Fischerら²³⁾は、がん由来のDNAを含むと考えられる中皮腫患者の血清(43例)を対象にして9遺伝子のDNAプロモーター領域のメチル化のプロファイリングを行い、RAR β 、DAPK、RASSF1Aの3遺伝子にメチル化を認めた症例は、9遺伝子のどれか一つあるいはメチル化のなかった症例と比較して、生存期間が有意に短いとし、これらの遺伝子のメチル化の検討は予後推測に役立つと報告している。

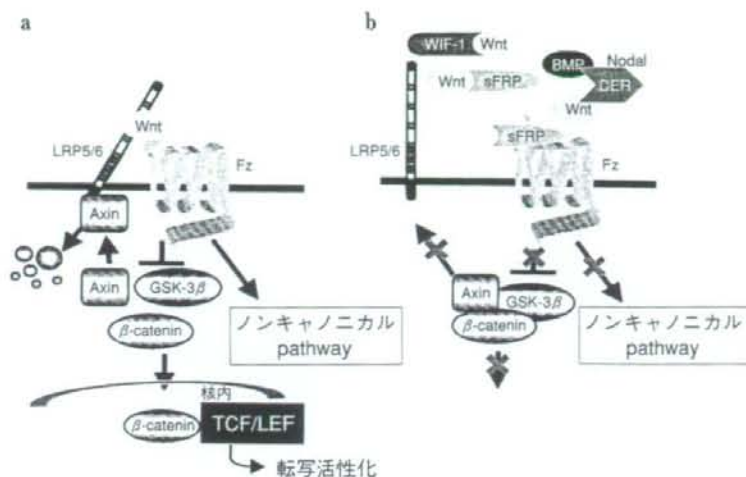


図2 中皮腫におけるWntシグナル経路の役割 (文献32より翻訳・改変)

- a : 中皮腫においては、 β -catenin自体のリン酸化を妨げる変異、あるいはAxinの変異などによって β -catenin蛋白が蓄積して核へ移行し、 β -catenin-TCF転写活性能が高まる。
- b : 正常細胞において、増殖の必要がないときにはWntシグナルはSFRP、WIF-1によって制御されている。 β -cateninはAPC/Axin/GSK3 β 複合体によってリン酸化され、ユビキチン化を受ける。そのため β -cateninの核への移行は起きず、TCF転写活性は抑制されている。

5 中皮腫におけるWnt経路の異常

大腸癌などでしばしばみられるWnt経路の異常には、epigeneticな異常も関与している。Wntの負の調節因子であるSFRP (secreted frizzled-related protein)、WIF-1 (wnt inhibitory factor-1)が、中皮腫において高率に、プロモーター領域のメチル化により不活化されることが報告されている(図2)^{18,21,22,33)}。SFRPが発現していない中皮腫細胞は脱メチル化によりSFRPが発現されることにより、TCF/ β -cateninの転写活性能を抑制できるだけでなく、アポトーシスが誘導される^{18,21)}。

われわれは、24例の中皮腫、12例の非腫瘍肺組織のパラフィン包埋組織よりMSPを用いたDNAのプロモーター領域のメチル化の検討を行った。その結果、中皮腫では非腫瘍肺組織と比較して、WIF-1 (81% vs 25%; $p=0.0028$)のメチル化頻度の有意な増加がみられ、メチル化を認めた中皮腫の65%で免疫組織化学的にWIF-1蛋白の発現が低下していた。これらは、WIF-1のメチル化によりWIF-1がサイレンシングしている可能性を示唆した。

まとめ

中皮腫におけるDNAメチル化異常は、WIF-1、SFRP、RASSF1Aについて高頻度に認められることが報告され、さらに、APC、CDH1のメチル化は肺腺癌との鑑別に、RAR β 、DAPK、RASSF1Aのメチル化は予後推測に有用であることが指摘されている。しかしこれらメチル化異常が発がんのどの過程で生じるかなど、今後検討すべきことは多い。われわれはWnt経路に注目し、中皮腫ではWIF-1のメチル化の異常の頻度が高いことを見出ししているが、中皮腫の早い増殖・進展を説明できるか否かは今後の課題である。

文 献

- 1) Tajima S, Suetake I: Regulation and function of DNA methylation in vertebrates. *J Biochem* **123**: 993-999, 1998
- 2) Bird A: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**: 6-21, 2002
- 3) Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet* **3**: 415-428, 2002
- 4) 牛島俊和, 大河内江里子, 金田篤志: エピジェネティクス, (佐々木裕之・編), Springer, 東京, 191-201, 2004
- 5) Eden A, Gaudet F, Waghmare A, et al: Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* **300**: 455, 2003
- 6) Cao XX, Mohuiddin I, Ece F, et al: Histone deacetylase inhibitor Down regulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Bio* **125**: 562-568, 2001
- 7) Neuzil J, Swettenham E, Gellert N: Sensitization of mesothelioma to TRAIL apoptosis by inhibition of histone deacetylase: role of Bcl-xL down-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **314**: 186-191, 2003
- 8) Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, et al: Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns. *Nature Genet* **24**: 132-138, 2000
- 9) Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, et al: A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature Genet* **31**: 141-149, 2002
- 10) Feinberg AP, Tycko B: The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **2**: 143-153, 2004
- 11) Feltus FA, Lee EK, Costello JF, et al: Predicting aberrant CpG island methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 12253-12258, 2003
- 12) Frazier ML, Xi L, Zong J, et al: Association of the CpG island methylation phenotype with family history of cancer in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* **63**: 4805-4808, 2003
- 13) Murthy SS, Shen T, De Rienzo A, et al: Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. *Oncogene* **19**: 410-416, 2000
- 14) Toyooka S, Pass HI, Shivapurkar N, et al: Aberrant methylation and simian virus 40 tag sequences in malignant mesothelioma. *Cancer Res* **61**: 5727-5730, 2001
- 15) Toyooka S, Carbone M, Toyooka KO, et al: Progressive aberrant methylation of the RASSF1A gene in simian virus 40 infected human mesothelial cells. *Oncogene* **21**: 4340-4344, 2002
- 16) Hirao T, Bueno R, Chen CJ, et al: Alterations of the p16INK4 locus in human malignant mesothelial tumors. *Carcinogenesis* **23**: 1127-1130, 2002
- 17) Wong L, Zhou J, Anderson D, et al: Inactivation of p16INK4a expression in malignant mesothelioma by methylation. *Lung Cancer* **38**: 131-136, 2002
- 18) Lee AY, He B, You L, et al: Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* **23**: 6672-6676, 2004
- 19) Suzuki M, Toyooka S, Shivapurkar N, et al: Aberrant methylation profile of human malignant mesothelioma and its relationship to SV40 infection. *Oncogene* **24**: 1302-1308, 2005
- 20) Tsou JA, Shen LY, Siegmund KD, et al: Distinct DNA methylation profiles in malignant mesothelioma, lung adenocarcinoma, and non-tumor lung. *Lung Cancer* **47**: 193-204, 2005
- 21) He B, Lee AY, Dadfarmay S, et al: Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in beta-catenin-deficient human mesothelioma cells. *Cancer Res* **65**: 743-748, 2005
- 22) Batra S, Shi Y, Kuchenbecker KM, et al: Wnt inhibitory factor-1, a Wnt antagonist, is silenced by promoter hypermethylation in malignant pleural mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun* **342**: 1228-1232, 2006
- 23) Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, et al: Promoter methylation of RASSF1A, RARBeta and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma. *Lung Cancer* **54**: 109-116, 2006
- 24) Tomii K, Tsukuda K, Toyooka S, et al: Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers. *Int J Cancer* **120**: 566-573, 2007
- 25) Szlosarek PW, Klabatsa A, Pallaska A, et al: In vivo loss of expression of argininosuccinate synthetase in malignant pleural mesothelioma is a biomarker for susceptibility to arginine depletion. *Clin Cancer Res* **12**: 7126-7131, 2006
- 26) Pu RT, Sheng ZM, Michael CW, et al: Methylation profiling of mesothelioma using real-time methylation-specific PCR: a pilot study. *Diagn Cytopathol* **135**: 498-502, 2007
- 27) Tsou JA, Galler JS, Wali A, et al: DNA methylation profile of 28 potential marker loci in malignant mesothelioma. *Lung Cancer* **58**: 220-230, 2007

- 28) Destro A, Ceresoli GL, Baryshnikova E, et al: Gene methylation in pleural mesothelioma: Correlations with clinico-pathological features and patient's follow-up. *Lung Cancer*, 2007 (in press)
- 29) Mossman BT, Gruenert DC: SV40, growth factors, and mesothelioma: another piece of the puzzle. *Am J Respir Cell Mol Bio* 126: 167-170, 2002
- 30) Gazdar AF, Butel JS, Carbone M: SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* 2: 957-964
- 31) Carbone M, Kratzke RA, Testa JR: The pathogenesis of mesothelioma. *Semin Onco* 129: 2-17, 2002
- 32) Kawano Y, Kypta R: Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *J Cell Sci* 6: 2627-2634, 2003

■MOOK 肺癌の臨床 2007~2008 ■

胸膜中皮腫の免疫組織化学的染色による確定診断

井内 康輝

篠原出版新社

診断・治療 (中皮腫)

Diagnosis & Treatments

胸膜中皮腫の免疫組織化学的染色による確定診断

井内 康輝

はじめに

2005年7月のいわゆるクボタショック（尾崎市のクボタ神崎工場の周辺住民における中皮腫の発生）によって、従来の労働災害に加え、一般生活環境下でのアスベスト曝露による中皮腫の発生が改めて浮彫りとなった。これを受けて従来の労災補償制度では救えないアスベストによる健康被害者救済のための新たな法律（石綿による健康被害の救済に関する法律）が制定され、2006年3月に施行された。労災補償制度では、アスベストによる疾病として、石綿肺、肺がん、中皮腫、良性石綿胸水、びまん性胸膜肥厚が対象となっているが、この新しい救済制度での対象となる疾患は、中皮腫と肺がんに限定されている。その理由としては、悪性腫瘍が生命に関わる重大な疾病であり患者の救済が急務であることと、労災と異なり一般生活環境下でのアスベスト曝露では石綿肺など症状を伴う肺や胸膜の線維化は起こりにくいと考えられていることがあげられる。

そのうち中皮腫については、その多くがアスベスト曝露に起因すると考えられることから、中皮腫の診断の確かさが担保されれば、アスベスト曝露によって発生したものと判定する¹⁾。すなわち、アスベスト曝露の有無やその程度の判断は必要がないとされている。したがって、中皮腫については臨床所見や画像所見のみの診断では不十分で、病理組織学的検査にもとづく確定診断が求められている。このことによつて中皮腫の病理学的診断は、単に医学的側面から重要であるだけでなく、患者の救済の適否を左右することになり、日本全国のいずれの医療機関においても確度の高い診断が等しく行われなければならない状況に至った。

そこで本稿では、われわれの行ってきた中皮腫の確定診断のための免疫組織化学的染色の有用性に関する知見を紹介し、これが実際に中皮腫の患者救済の基準として用いられていることを紹介したい。

1 中皮腫の病理診断の難しさ

2003年（平成15年度）に厚生省がん研究助成金の研究班（森永班）で行った病理医へのアンケートによつて、1995年から2002年に生検・手術・剖検にて中皮腫と診断された837例についての検討を行ったが²⁾、その中で各施設のご協力で組織ブロックを提供いただいた例116例について、われわれの施設で改めて免疫組織化学的染色を行い、一部は施設外の病理医を含めた検討会（中皮腫パネル）によつて診断を再検討した。対象となった116例の中皮腫の年齢、性別、材料、発生部位及び組織型を表1に示す。

この診断の再検討によつて116例中11例（9.5%）は中皮腫の診断が妥当ではないと判断された。それらの一覧を表2に示すが、胸膜の7例のうち4例は胸膜炎、1例は非小細胞肺癌、1例は滑膜肉腫、1例は癌肉腫と診断される。4例の胸膜炎はいずれも生検材料であり、少量の生検材料での病理診断の困難さがうかがわれる。一方、手術材料を用いても、肉腫型中皮腫と真の肉腫、二相型中皮腫と癌肉腫などの鑑別が難しいことが分かる。

さらに、2003年（平成15年）の全国の中皮腫での死亡例のうち、遺族および医療機関から検索の合意が得られた111例を再検討する機会を得た³⁾。検討した材料の内訳を表3に示すが、これによると細胞診のみ

表1 病理医へのアンケート調査 (1995-2002年) にもとづいた病理診断の見直し例

年齢	性別	材料	発生部位	組織型(オリジナル診断)				
17歳-94歳 (平均63歳)	男性	90例 (77.6%)	生検・手術	76例 (65.5%)	胸膜	98例 (84.5%)	上皮型	72例 (62.1%)
	女性	25例 (21.6%)	剖検	40例 (34.5%)	腹膜	12例 (10.3%)	肉腫型	24例 (20.7%)
	不明	1例 (1.9%)			心膜	3例 (2.6%)	二相型	20例 (17.2%)
					精巣鞘膜	2例 (1.7%)		
					不明	2例 (1.7%)		
計		116例	計 116例		計 116例 (1例は重複)		計 116例	

表2 表1で示した症例の中で中皮腫の診断が妥当でないとした例

発生部位	材料	組織型(オリジナル診断)	検討後診断
1. 胸膜	VATS生検	二相型	Pleuritis
2. 胸膜	穿刺生検	二相型	Pleuritis
3. 胸膜	VATS生検	二相型	NSCLC
4. 胸膜	穿刺生検	上皮型	Pleuritis
5. 胸膜	開胸生検	上皮型	Pleuritis
6. 胸膜	手術	二相型	Carcinosarcoma
7. 胸膜	手術	肉腫型	Synovial sarcoma
8. 腹膜	剖検	上皮型	Adenocarcinoma, metastatic
9. 腹膜	手術	上皮型	Serous papillary adenocarcinoma of ovary
10. 腹膜	剖検	上皮型	Serous papillary carcinoma of peritoneum
11. 心膜	剖検	上皮型	Acute pericarditis with carcinoma emboli

表3 平成15年(2003年)死亡例のうち遺族および医療機関から合意の得られた標本の再検討

検討材料	例数
1. 細胞診標本のみ	12例 (11%)
2. 組織標本(HE染色)のみ	9例 (8%)
3. 組織標本(HE染色)+細胞診標本	2例 (2%)
4. 組織標本(HE染色)+細胞診標本+免疫染色標本	3例 (3%)
5. 組織標本(HE染色)+免疫染色標本	19例 (17%)
6. 組織標本(HE染色)+免疫染色標本+広島大学での免疫染色標本	6例 (5%)
7. 組織標本(HE染色)+広島大学での免疫染色標本	54例 (49%)
8. 組織標本(HE染色)+細胞診標本+広島大学での免疫染色標本	6例 (5%)
計	111例

で診断されている例が約11%、免疫染色を行わないで病理組織診断が下されている例が10%程度あることが分かる。この診断の再検討の結果をまとめると表4となる。中皮腫診断の確かさを5段階で表現すると、14例(12%)は中皮腫との診断が不適切であると判断され、それらの再検討後の診断は、腺癌5例、胸膜炎4例、反応性中皮細胞過形成2例となる。

以上の結果からは、従来行われてきた中皮腫の病理診断については、10%程度は診断が不適切である可能性が高いといわざるを得ない。逆に、肺がんあるいは肉腫、胸膜炎とつけられた例の中に中皮腫が存在

表4 表3で示した症例の病理診断の見直し

1. 中皮腫の診断の確実度	
Definite (確実)	62例 (56%)
Probable (たぶん確実)	23例 (21%)
Possible (可能性が高い)	12例 (11%)
Unlikely (考えにくい)	6例 (5%)
Definitely not (明らかに誤り)	8例 (7%)
2. Unlikelyあるいはdefinitely notとした例の見直し診断	
Adenocarcinoma	5例
Pleuritis	4例
Reactive mesothelial hyperplasia	2例
Solitary fibrous tumor	1例
Malignant lymphoma	1例
Rhabdomyosarcoma	1例

表5 胸膜中皮腫の鑑別診断

組織型	鑑別すべき疾患・病変
上皮型中皮腫	腺癌(肺原発) 転移性肺癌(腺癌, 低分化癌) 反応性中皮細胞過形成
肉腫型中皮腫	肉腫(胸膜, 胸壁あるいは肺原発) 肉腫様肺癌(sarcomatoid carcinoma)
線維形成型中皮腫	線維性胸膜炎
二相型中皮腫	癌肉腫(肺原発) 肺芽腫 滑膜肉腫(二相型)

している可能性もあり、中皮腫の病理診断全体についていえば、10~20%の例が適切に診断できていないとも考えられる。これは適切な抗体の選択にもとづく免疫組織化学的染色が行われていない以前の状況のもとでは不可避であったかもしれない。さらに、小さな生検材料のみで病理診断をつけることを求める傾向が臨床医に強く、これに応えざるを得なかった病理側の事情もあると考えられる。

胸膜中皮腫については、鑑別が必要な疾患は表5のようにまとめられる。今後の中皮腫の病理診断においては、上皮型、肉腫型、線維形成型、二相型のそれぞれの組織型別に鑑別疾患を念頭においた上で、適切な抗体の選択による免疫組織化学的染色を行うことが強く望まれる。

2 上皮型中皮腫と肺腺癌との鑑別

図1には定型的な上皮型中皮腫の所見を示す。免疫組織化学的染色では、calretininとWT1は核に陽性、サイトケラチン(CAM5.2, AE1/AE3など)は細胞質に陽性、D2-40, mesothelin, thrombomodulinは細胞膜に陽性である。

図2には肺原発の低分化腺癌が上皮型中皮腫と診断されていた例を示す。この例では中皮腫の陽性マーカーであるcalretininが散在性に陽性所見を示すが、肺腺癌の陽性マーカーであるCEAがより多くの腫瘍細胞で陽性となる。表6にわれわれの検討による主要な抗体を用いた免疫組織化学的所見の陽性率を示す⁹⁾。これらの感度、特異度から、中皮腫としての陽性マーカーとしてcalretinin, WT1, thrombomodulinを、陰性マーカーとしてCEAを用いることを奨めている。しかし図2の例のように、肺腺癌の33.3%の例でcalretininが陽性となることを念頭におき、必ず陽性マーカーと陰性マーカーの組み合わせによって総合的に判断することが必要である。

また、免疫組織化学的染色に頼る前に、画像所見や肉眼所見において肺内の腫瘍の有無を確認すべきである。図2の例でも肺内に腫瘍が存在している。

3 肉腫型中皮腫と肉腫との鑑別

図3には、肉腫型中皮腫を、図4には肉腫型中皮腫とされていた横紋筋肉腫の所見を示す。上皮型中皮腫と異なり、肉腫型中皮腫ではcalretininやWT1は陽性率は低くはないが腫瘍のなかで陽性細胞の占める割合が低い。一方、肉腫でのcalretininやWT1の陽性率は高いことから、むしろCAM5.2およびAE1/AE3で示

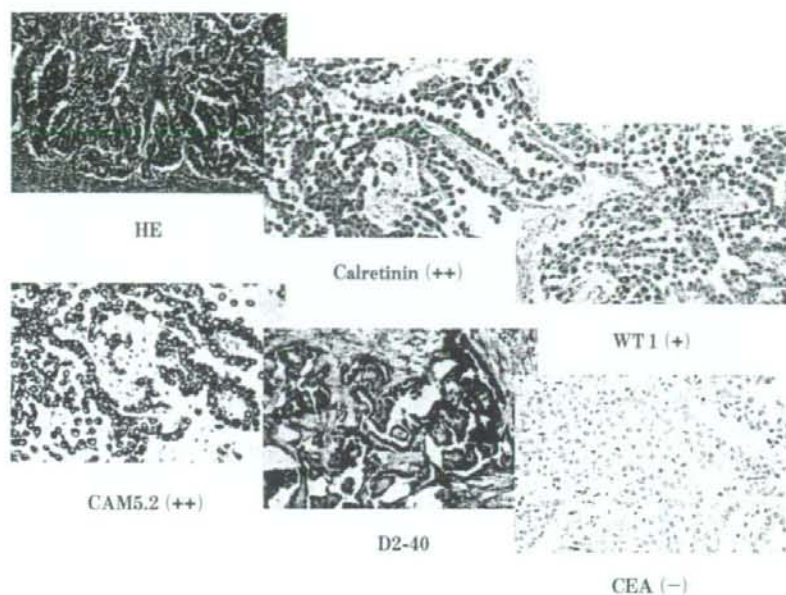


図1 上皮性中皮腫の組織所見 (HE染色および免疫染色)

Calretinin, WT1は核に陽性, cytokeratinは細胞質に陽性, D2-40は細胞膜に陽性, CEAは陰性である。

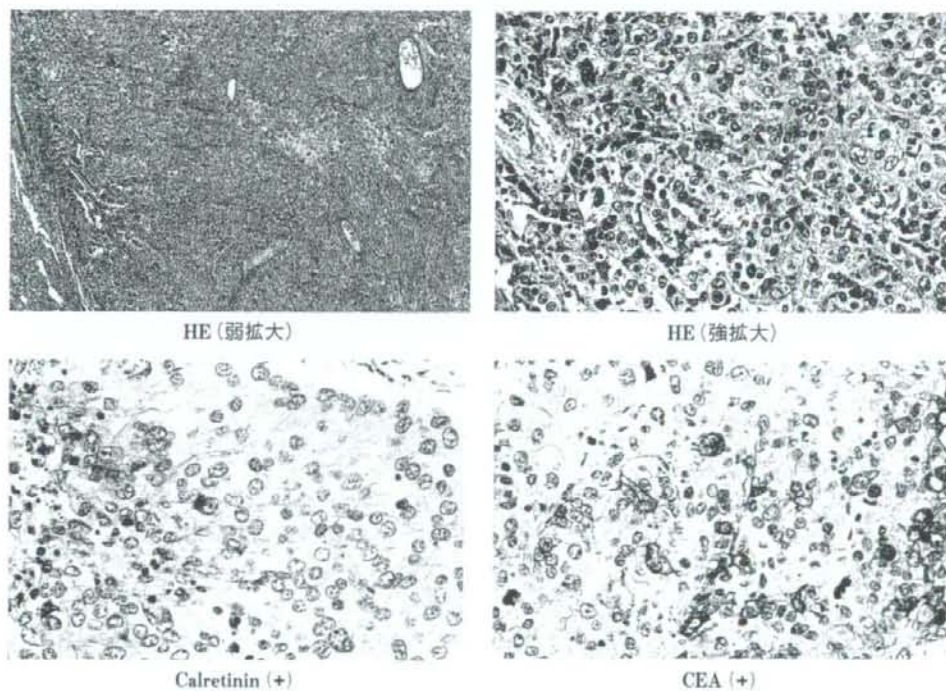


図2 上皮性中皮腫と誤診された肺原発の低分化腺癌の組織所見 (HE染色および免疫染色)

Calretininの細胞質での陽性細胞を散見するが, CEA陽性細胞の方が数が多い。

表6 上皮型中皮腫と肺腺癌の免疫組織化学的染色所見の比較

抗体	陽性例/対象例 (%)		P値 (カイニ乗検定)
	上皮型中皮腫	肺腺癌	
Calretinin	83/87 (95.4)	17/51 (33.3)	<0.001
WT1	82/84 (97.6)	8/51 (15.7)	<0.001
AE1/AE3	88/88 (100)	51/51 (100)	—
CAM5.2	84/87 (96.6)	51/51 (100)	0.18
Cytokeratin 5/6	54/78 (69.2)	21/51 (41.2)	0.0016
Vimentin	80/88 (90.9)	24/51 (47.1)	<0.001
EMA	84/88 (95.5)	51/51 (100)	0.12
Thrombomodulin	57/84 (67.9)	10/51 (19.6)	<0.001
Mesothelin	64/83 (77.1)	36/51 (68.6)	0.31
CEA	6/86 (7.0)	50/51 (98.0)	<0.001
CA19-9	7/40 (17.5)	37/51 (72.5)	<0.001
CA125	34/40 (85)	41/51 (80.4)	0.57

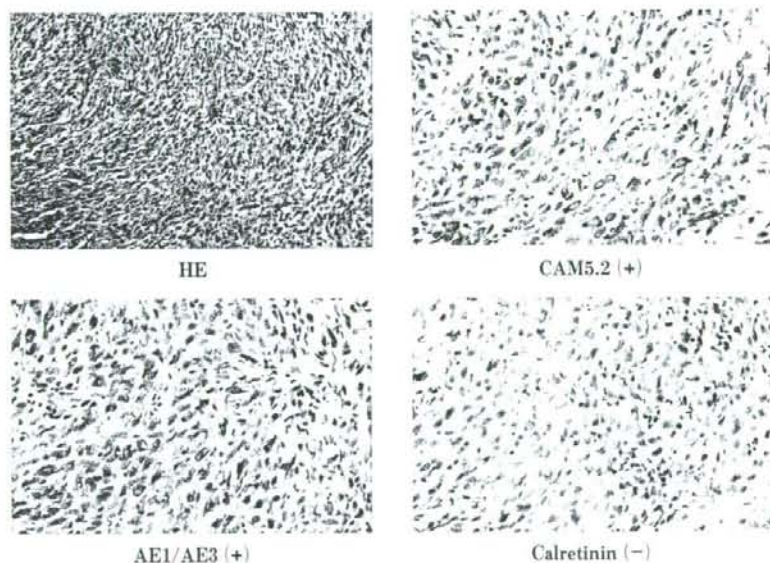


図3 肉腫型中皮腫の組織所見 (HE染色および免疫染色)

CAM5.2およびAE1/AE3陽性で示されるcytokeratinが細胞質に認められる。Calretininは陰性である。

されるcytokeratinが陽性マーカーとしては推奨される。肉腫におけるcytokeratinの陽性率は低い。陰性マーカーとしては、腫瘍の示す組織像から疑われる肉腫それぞれに特異的なマーカーを選ぶことが奨められる。図4で示すように、HE染色では多形型 (pleomorphic type) の横紋筋肉腫が疑われる例ではdesmin, myoglobin, myoD1などの抗体を用いた染色を行うことが必要である。この例ではcalretininが陽性であることが誤った診断を招くことになったと考える。表7にはわれわれの行った肉腫型中皮腫の検討結果を示すが⁵⁾、ここで示すように、calretininは29.8%の肉腫で陽性となる。

肉腫型中皮腫と肉腫との鑑別のフローチャートを図5に示す。CAM5.2, AE1/AE3, WT1の組み合わせによって100%診断は可能である。

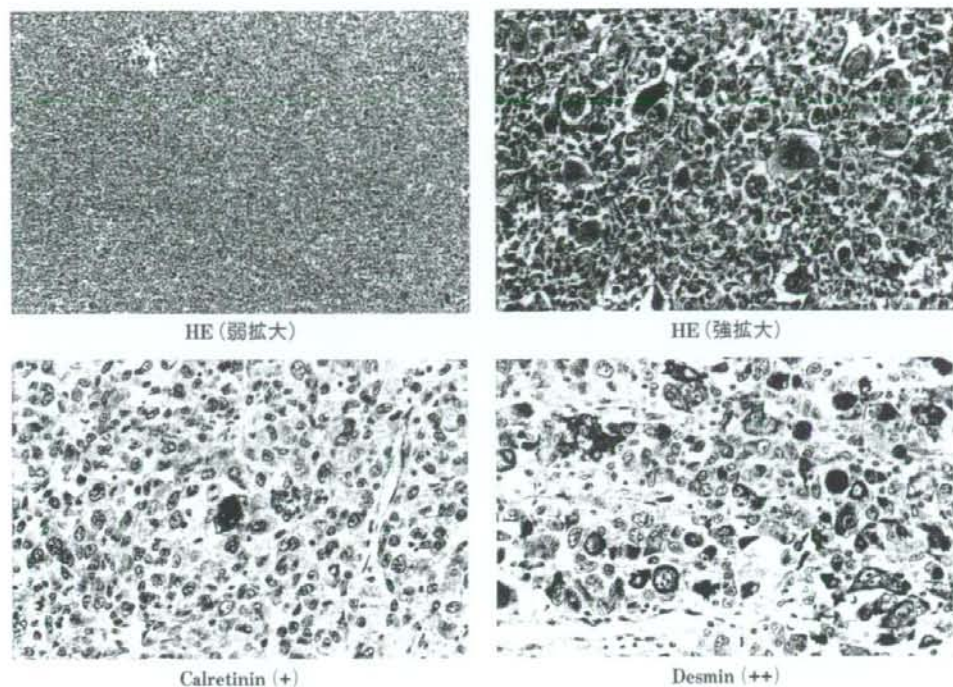


図4 肉腫型中皮腫と誤診された横紋筋肉腫の組織所見(HE染色および免疫染色)
Calretininは少数の細胞に陽性であるが, desmin, myoglobinなど横紋筋肉腫のマーカーが広く陽性である。

表7 肉腫型中皮腫と種々の肉腫の免疫組織化学的染色所見の比較

抗体	陽性例/対象例(%)		P値 (カイ二乗検定)
	肉腫型中皮腫	真の肉腫	
Calretinin	39/44 (88.6)	14/47 (29.8)	<0.001
WT1	39/44 (88.6)	20/47 (42.6)	<0.001
AE1/AE3	38/44 (86.4)	2/47 (4.3)	<0.001
CAM5.2	41/44 (93.2)	3/47 (6.4)	<0.001
EMA	22/44 (50)	5/47 (10.6)	0.001
Desmin	5/44 (11.4)	25/47 (53.2)	<0.001
α -SMA	24/42 (57.1)	28/47 (59.6)	0.81
S-100p	18/41 (43.9)	17/47 (36.2)	0.46
CD34	2/37 (5.4)	20/47 (42.6)	0.0001
KP-1	27/41 (65.9)	38/47 (80.9)	0.11

4 肉腫型中皮腫と肺肉腫様癌(Sarcomatoid carcinoma)との鑑別

肉腫様癌 sarcomatoid carcinoma (2004, WHO分類)とは、いずれかの部分で肉腫様組織像を示す肺癌をさし、このうち多形癌 pleomorphic carcinomaとは、いずれかの部分に腺癌 adenocarcinomaや扁平上皮癌 squamous cell carcinomaの所見をみる例をいう。紡錘細胞癌 spindle cell carcinomaとは紡錘形細胞のみからな

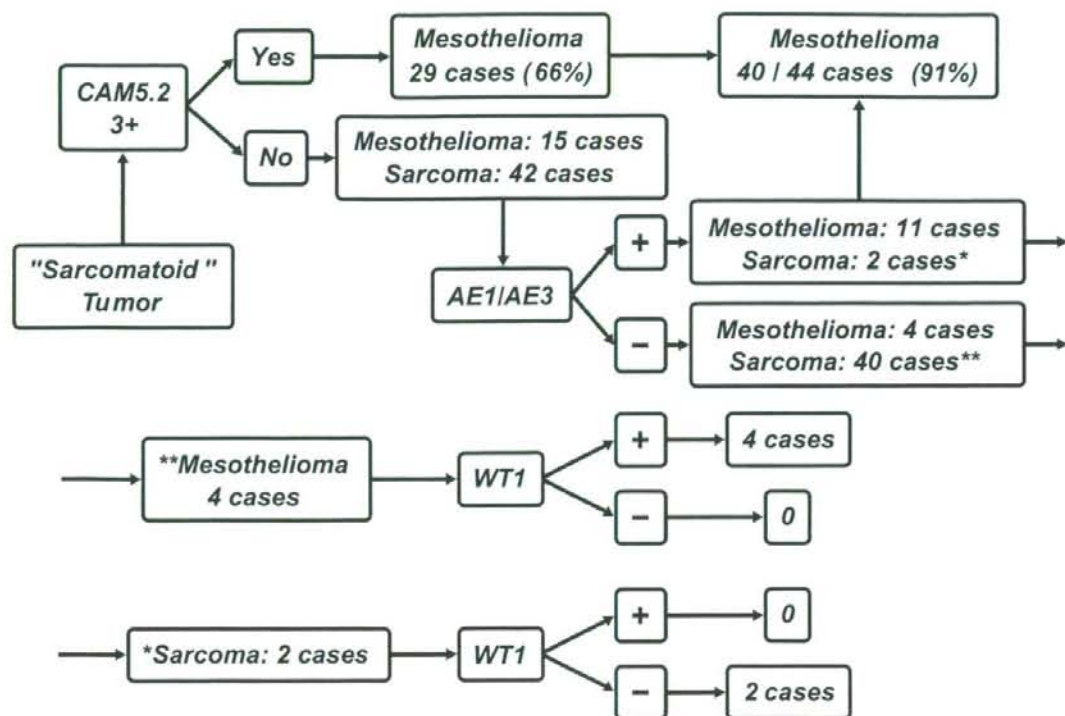


図5 肉腫型中皮腫と肉腫の免疫組織化学的染色による鑑別診断のフローチャート
CAM5.2, AE1/AE3, WT1の順に評価していくと100%の鑑別が可能となる。

る肺癌であり、巨細胞癌giant cell carcinomaとは多核を含めた大型細胞のみからなる肺癌をさす⁶⁾。

これらのカテゴリーに入る自験例9例の肺癌の免疫組織化学的染色の結果⁵⁾をまとめると表8のようになるが、これらで陽性率の高いAE1/AE3, CAM5.2, EMAは肉腫型中皮腫との鑑別には役立たない。肉腫型中皮腫で陽性率の高いcalretinin, WT1も肉腫様癌の50%程度の例で陽性である。したがって現在用いられる抗体による免疫組織化学的染色では、両者を完全に鑑別することはできない。

こうした結果から現時点では両者の鑑別においては肺内腫瘍があるか否かをみるのが最も重要であり、画像所見や肉眼所見からの鑑別が免疫組織化学的染色より重要視されるべきと考える。

5 二相型中皮腫と他の二相性腫瘍との鑑別

上皮型、肉腫型中皮腫の成分が少なくとも10%以上含まれる中皮腫を二相型中皮腫とよぶ。二相型中皮腫と鑑別すべき二相性を示す胸腔内腫瘍としては、肺の癌肉腫、肺芽腫、胸膜の二相型滑膜肉腫があげられる。癌肉腫や肺芽腫はその特徴的な組織像とともに肺内の腫瘍の有無によって鑑別は可能である。二相型滑膜肉腫では組織学的にも上皮様部分にcalretininが陽性となり誤って診断されることがあるが⁷⁾、鑑別に迷う場合は融合遺伝子SYT-SSX1あるいはSYT-SSX2の存在を証明することが診断に有用となる。

表8 肺の肉腫様癌の免疫組織化学的染色所見

抗体	陽性例/対象例 (%)	陽性の程度			
		0	1+	2+	3+
Calretinin	6/9 (66.7)	3	4	1	1
WT1	4/9 (44.4)	5	1	1	2
AE1/AE3	8/9 (88.9)	1	2	0	6
CAM5.2	7/9 (77.8)	2	1	0	6
EMA	8/9 (88.9)	1	5	0	3
Desmin	0/9 (0)	9	0	0	0
α -SMA	5/9 (55.6)	4	2	1	2
S-100p	6/9 (66.7)	3	4	1	1
CD34	0/9 (0)	9	0	0	0
CD68	9/9 (100)	0	0	1	8

6 線維形成型中皮腫 (desmoplastic mesothelioma) と線維性胸膜炎との鑑別

線維形成型中皮腫とは、腫瘍の50%以上の部分が肉芽様あるいは癒痕様の細胞密度の低い線維性結合組織からなり、一部に高細胞密度や細胞異型性、胸膜外の脂肪・筋肉組織や肺への浸潤、壊死の存在などで示される悪性所見をみる例と定義される。したがって、腫瘍の一部しか得られない小さな穿刺生検材料のみで診断することは不可能であり、少なくともVATSや開胸で得られた大きな生検材料で診断しない限り、確定的な診断を下すべきではない。

HE染色において胸膜炎とする根拠としては、zonation (層状構造) の存在 (図6) が重要である⁸⁾。すなわち、表層側 (胸腔側) では小血管の増殖や炎症細胞浸潤とともに紡錘形細胞が高い細胞密度を示す。フィブリンを含む滲出物の混在やその器質化像をみることも多い。深部 (胸壁側) になるにつれ細胞密度は低下し、膠原線維は密となり硝子化も伴う。また、表層側で胸膜表面に垂直で細長い毛細血管が多数認められる。この所見をみることは胸膜炎の診断につながるが、中皮腫の周囲に炎症を伴う場合では、運悪く生検においてこの所見のみが得られてくる可能性もあることを念頭において、より慎重な判断を下すように心がけるべきであろう。

免疫組織化学的所見からの鑑別も難しい。線維形成型中皮腫でも線維性胸膜炎でもCAM5.2あるいはAE1/AE3で示されるcytokeratinは紡錘形細胞に陽性である。すなわち、これらは腫瘍細胞であるなしに拘わらず中皮細胞への分化があると考えられる⁹⁾。しかし、胸膜炎では紡錘形細胞はdesmin (図6) および α -smooth muscle actin (SMA) が陽性となることが多く、一方、線維形成型中皮腫では腫瘍性紡錘形細胞はdesmin、 α -SMAでは陰性でcalretininが陽性となることが多い。一つの腫瘍内でも部位による差があるので、この免疫組織化学的染色のみに頼ることは危険であるが、良悪性の鑑別の際に参考となる所見である (表9)。

7 早期の上皮型中皮腫と反応性中皮細胞過形成との鑑別

近年の中皮腫への関心の高まり、胸腔鏡診断の普及などによって、中皮腫の早期像あるいは初期像が病理学的に診断される機会が少しずつ増えつつある。線維性あるいは浮腫性に肥厚した胸膜の表面に異型性を伴う中皮細胞を認める場合、これを腫瘍性とするか否かは最も判断が難しい。一般的には腫瘍か否かは浸潤の深さで決めることが奨められるが (図7)、小さな生検材料しか与えられない場合は浸潤の有無は判断できない。浸潤を欠き表層のみに異型性のある中皮細胞が存在する場合は“atypical mesothelial prolifer-

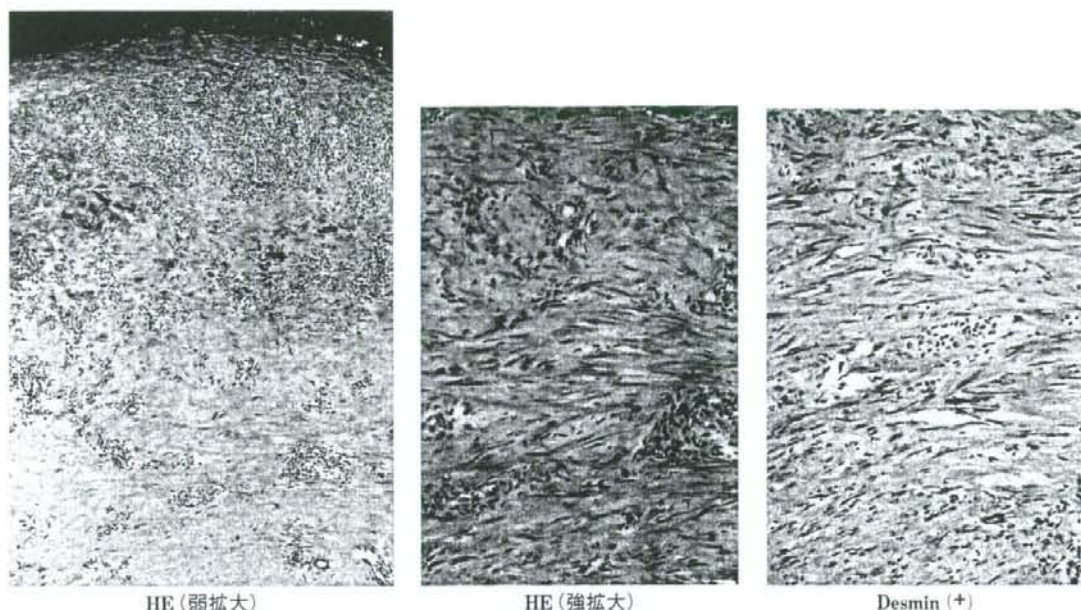


図 6 線維形成型中皮腫の組織所見 (HE染色および免疫染色)

HE染色ではいわゆるzonation (層状構造) をみる。表層側で増殖する紡錘形細胞はdesmin陽性である。

表 9 中皮腫と非腫瘍性病変との鑑別に有用な免疫組織化学的染色

抗体	線維形成型中皮腫	線維性胸膜炎
Cytokeratin (CAM5.2 or AE1/AE3)	+	++
Desmin	-	++
α -SMA	- or +	++
Calretinin	+	+ or -

抗体	上皮型中皮腫	反応性中皮細胞過形成
EMA	+ (97.2%)	- (5.6%)
p 53 protein	+ (52.9%)	- (5.6%)
Desmin	- (5.6%)	+ (73%)

ation”として良悪性の判断を避けるべきだとする意見もある¹⁰⁾。

われわれの検討した免疫組織化学的染色による鑑別点としては、中皮腫ではEMA、p53の陽性率が高くdesminが陰性であり、過形成ではその逆となる、これのみに頼ることは難しいが、参考とすべき所見と考える¹¹⁾ (表9)。

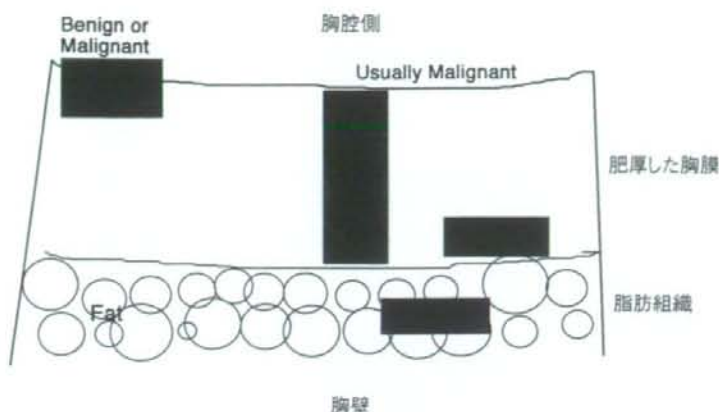


図7 肥厚した胸膜における中皮細胞の分布による良悪性の鑑別
(文献8, p1,185より改変して引用)

表10 中皮腫の鑑別診断のために推奨している免疫組織化学的染色に用いる抗体

	陽性マーカー(抗体)	陰性マーカー(抗体)
上皮型	calretinin WT1 thrombomodulin D2-40	CEA TTF-1 Naspin A
肉腫型	CAM5.2(cytokeratin) AE1/AE3(cytokeratin)	Variable (本文参照)

まとめ

筆者は現在、中央環境審議会石綿健康被害判定部会に所属しており、平成18年10月までにおよそ550件の中皮腫か否かの判定に関わってきた。そのうち約62%の例は中皮腫と判定され、中皮腫ではないとされた例は約4%にすぎないが、残る34%の例は中皮腫とする根拠が少なく判定保留とされた。これら判定保留とされた例には、画像所見上中皮腫とは考えにくく病理診断との間に乖離がある例、細胞診のみで中皮腫とされているが腺癌との鑑別ができていない例、病理組織学的所見(診断書のコピーなどが提出されるのが通常であり、プレパラートの鏡検は書面での判断が難しい例に限られる)に加えて適切な免疫組織化学的染色の結果が記載されていない例、などが含まれる。前述のように、中皮腫には多彩な組織型があり、かつ鑑別すべき疾患や病変が数多くあることから、現時点では適切な抗体を用いた免疫組織化学的染色が不可欠であると考え、細胞診についても明らかな中皮腫の所見を示さない場合、すなわち腺癌との鑑別が必要な場合は、細胞診標本での免疫組織化学的染色を行うことが奨められる。

現在、判定委員会で確定診断のために求めている免疫組織化学的染色における抗体は表10に示すものであり、中皮腫の病理診断に際しては、ぜひともこれらの抗体を用いた染色を実施されることを望んでやまない。