

文 献

- 1) 森永謙二, 井内康輝・他: 石綿による健康被害に係る医学的診断に関する考え方報告書(石綿による石綿被害に係る医学的診断に関する検討会による), 平成18年2月
- 2) 森永謙二, 井内康輝・他: 悪性(胸膜)中皮腫に関するアンケート調査報告書(平成15年度厚生労働省がん研究助成金による), 2004年2月11日
- 3) 岸本卓己, 井内康輝・他: 中皮腫と職業性石綿ばく露に関する研究報告書(平成17年度厚生労働科学特別研究による), 平成18年3月
- 4) Kushitani K, Takeshima Y, Inai K, et al: Immunohistochemical panels for distinguishing between epithelioid malignant mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma. *Pathol Int*, 2007 (in press)
- 5) Kushitani K, Takeshima Y, Inai K, et al: Differential diagnosis between sarcomatoid mesothelioma and sarcoma, sarcomatoid carcinoma, (in submitted)
- 6) Churg A, Roggi V, Inai K, et al: Mesothelioma, in WHO Classification of Tumours, Pathology & Genetics, Tumours of the lung, pleura, thymus and heart (Edit. By Travis WD et al), *IARC Press*, Lyon, 128-136, 2004
- 7) Miettinen M, Limon J, Niezabitowski A, et al: Calretinin and other mesothelioma markers in synovial sarcoma. Analysis of antigenic similarities and differences with malignant mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 25: 610-617, 2001
- 8) US-Canadian mesothelioma reference panel: The separation of benign and malignant mesothelial proliferations. *Am J Surg Pathol* 24: 1183-1200, 2000
- 9) Inai K, et al: Pathology of malignant mesothelioma Ed, by Galateau-Salle F, Springer, Berlin, 2005
- 10) Churg A, Cagle PT, Roggli VL: AFIP Atlas of tumor pathology, Series 4, Tumors of the serosal membranes, ARP Press Silver Spring, Maryland, 83-101, 2006
- 11) Attanoos RL, Griffin A, Gibbs AR: The use of immunohistochemistry in distinguishing reactive from neoplastic mesothelium. A novel for desmin and comparative evaluation with epithelial membrane antigen, p53, platelet-derived growth factor-receptor, P-glycoprotein and Bcl-2. *Histopathology* 43: 231-238, 2003

■MOOK 肺癌の臨床 2007~2008 ■

中皮腫の遺伝子異常—マイクロアレイを用いた
網羅的解析

Amatya Vishwa Jeet 武島幸男 井内康輝

篠原出版新社

診断・治療 (中皮腫)

Diagnosis & Treatments

中皮腫の遺伝子異常—マイクロアレイを用いた網羅的解析

Amatya Vishwa Jeet, 武島 幸男, 井内 康輝

はじめに

中皮腫は悪性腫瘍のなかで、比較的頻度の低い腫瘍であるが、非常に予後の悪い腫瘍として知られる。種々の化学療法に対する感受性が低く、いまだに標準的な治療法は確立されていない。中皮腫の発生原因は石綿（アスベスト）曝露と深い関連があることが示されているが、約10～20%程度の例ではアスベストの曝露歴はないとされる¹⁾。SV40は、ハムスターに中皮腫を発生させることが可能なDNAウイルスであり、SV40の感染はヒトの中皮腫の発生や進展における補助因子になることが示されているが、その詳細な発生メカニズムは不明である。ヒトの線維芽細胞や上皮細胞は、SV40によって悪性細胞へ形質転換されることはまれであるが、中皮細胞は悪性細胞への形質転化を起こしやすく、アスベストは相乗的にこれを促すとされる。

近年、さまざまな分子生物学的な研究手法が開発され、中皮腫にみられる遺伝子の異常が、染色体の異常、遺伝子発現の異常やCpG領域のメチル化などの形で報告されており、正常の中皮細胞から中皮腫の発生までの長い期間の間に、多段階的に遺伝子異常が蓄積されていくことが推測される。本稿では、これまでに報告された中皮腫における遺伝子異常と、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子異常あるいは遺伝子発現異常について概説する。

1 中皮腫における染色体異常

中皮腫の発生および進展には複数の遺伝子異常の蓄積が必要なが示唆されている。中皮腫ではほとんどの染色体に異常があり、共通して認められる染色体異常はほとんどない。Sandberg & Bridge²⁾は、細胞遺伝学的手法、比較ゲノム交雑法 (CGH)、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH)、ヘテロ接合性の消失 (LOH) などを用いた染色体異常の報告をまとめ、とくに、4, 22番染色体の一染色体性、5, 7, 20番染色体の多染色体性、1q, 5p, 6p, 8q, 13q, 13, 3-14, 2, 14q24-qter, 22q領域の増幅や1p, 3p, 4q, 4p, 6q, 8p, 9p, 11p, 13q, 14q, 15q, 22q領域の欠失を報告している (表1)。

表1 中皮腫における染色体の増幅および欠失

方法と所見	異常のある染色体領域
細胞遺伝学的手法	
欠失	1p21-p22, 3p21, 4q, 4p, 6q15-q21, 9p21-p22, 11p11-13, 13q, 14q, 22q12, -22
増幅	+5, +7, +20
CGH	
欠失	1p, 4q31, 1-qter, 6q22-q24, 8p, 9p21-pter, 14q, 15q11, 1-q15
増幅	1q, 5p, 6p, 8q, 13q, 13, 3-14, 2, 14q24-qter, 22q
FISH	
欠失	+1, +3, +6, +7, +11, +17
LOH	
あり	1p22, 3p21, 4q, 6q, 9p21-p22, 13q, 14q, 17p13

2 中皮腫におけるがん抑制遺伝子の異常

中皮腫には染色体領域9p21の異常がよくみられるが、この領域にある代表的遺伝子はp14とp16である。p14とp16遺伝子のホモ接合性の欠失やプロモータ領域のメチル化による遺伝子発現の低下・消失が生じると、RB経路とp53経路の不活性化が起こる。p14蛋白は、p53蛋白を分解するMDM2遺伝子の活性を抑制することで、p53蛋白の機能を活性化する。p16蛋白はCDK4/6に結合することで、CDK4/6/cyclinDの触媒活性を阻害し、RB蛋白のリン酸化を阻止し、細胞周期をG1期で停止させる。Mustiら³⁾によれば、70~85%の中皮腫細胞にはp16遺伝子のホモ接合性の欠失が報告されている。Yangら⁴⁾は、中皮腫細胞株に、アデノウイルスを用いてp14遺伝子を外来性に発現させると、G1期の細胞停止およびアポトーシスが生じると報告している。中皮腫細胞株へのアデノウイルスによるp16遺伝子の強制発現も、細胞周期の停止、アポトーシスを引き起し、マウスでの中皮腫細胞の腫瘍原性の低下をもたらす。これらの結果は、p14およびp16蛋白の機能消失が中皮腫細胞の細胞周期の異常に強く関与していることを示すとともに、p14およびp16遺伝子の導入が、有効な中皮腫の治療法となることを示唆している。

肺癌など多くの腫瘍に認められる腫瘍抑制遺伝子の異常、RB遺伝子およびp53遺伝子の突然変異は中皮腫ではまれである。Coteら⁵⁾は、少数の中皮腫細胞株における17番染色体の異常、17p13のLOHやp53cDNAの突然変異を報告している。Carboneら⁶⁾は、25例の中皮腫組織を用いてp53遺伝子のexon5-6, 7, 8-9のPCR-SSCP解析を行い、2例のみに点突然変異があったことを報告している。このように中皮腫では、p53遺伝子の突然変異が少ないため、中皮腫の発癌過程においてはp53遺伝子の翻訳後の構造的な不活性化が想定されており、例えばMDM2との複合体を形成してp53蛋白の不活性化が起こることも考えられる⁷⁾。

中皮腫では、突然変異および22番染色体長腕「22q12.2」の欠失による神経線維腫症2型(NF2)遺伝子の高頻度の不活性化が認められている。Mustiら³⁾、Whitsonら⁸⁾によれば、40~50%の中皮腫細胞株および腫瘍組織ではNF2遺伝子の突然変異がみられ、LOH解析では22q12の「NF2」領域の消失は72~100%にみられると報告されている。NF2遺伝子の突然変異あるいはNF2発現の異常があるすべての中皮腫においてLOHが認められることから、NF2遺伝子の不活性化が2ヒットメカニズムで起こることが示唆されている。

中皮腫には11番染色体p11-p13の領域の消失が報告されており、11p13領域に存在する癌抑制遺伝子WT1との関連が疑われる。Parkら⁹⁾は、マウスの中胚葉由来の多くの組織でWT1が高く発現していることを示している。また、ヒト腹膜中皮腫ではWT1のホモ接合性点突然変異(Homozygous point mutation)が報告され、WT1遺伝子の不活性化による中皮細胞の腫瘍性増殖が報告されている。Kumar-Singhら¹⁰⁾は、42例の中皮腫組織と中皮腫細胞株3株のなかでは2例の腫瘍でしか突然変異が認められなかったものの、免疫組織化学的にはWT1蛋白の発現が96%にみられることを報告している。免疫組織化学的染色では、上皮型中皮腫におけるWT1の発現をその診断に用いることの有用性が報告されている¹¹⁾。

3 Simian Virus 40 (SV40) 感染による中皮腫の遺伝子異常

中皮細胞へのSV40感染によって早期にテロメラーゼが活性化され、短い継代時間で不死化されることから、SV40によるテロメラーゼの活性化が中皮腫の発生に関与していると推測されている。テロメラーゼの活性化はSV40由来のT抗原(SV40T-Ag)の量と相関し、中皮細胞の形質転換と関連するとされるが、SV40由来のt抗原(SV40t-Ag)もテロメラーゼの活性化を引き起こすのに重要な役割を担っている。また、SV40T-Agの発現は、p53およびRB遺伝子の不活性化も起こす。SV40T-Agは中皮腫細胞において、プロモータ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。またSV40t-Agにより仲介される蛋白質ホスファターゼ2A(PP2A)の機能の低下がERKキナーゼを抑制し、SV40による中皮腫発生

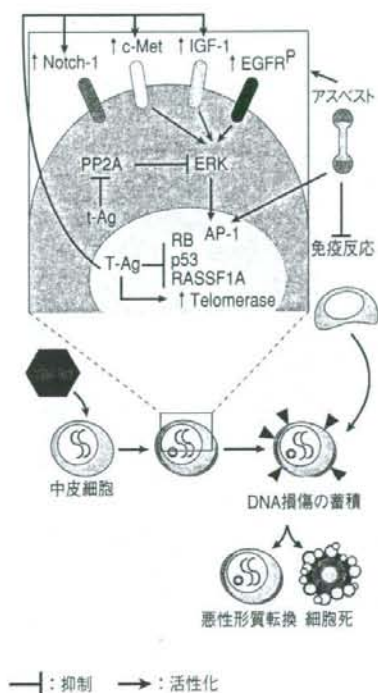


図1 SV40と中皮腫の発生

文献13 Gazdar AF, Butel JS, Carbone M. SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* 2: 957-964, 2002より翻訳

を促進すると考えられる。クロシドライトはEGFRを活性化し、同様なカスケードでAP-1を活性化する。さらに、アスベストは局所または全身の免疫能を傷害するので、SV40により形質転換された中皮細胞は、免疫応答を逃れ、悪性細胞として増殖していくことが可能となる^{1,12,13)} (図1)。

4 中皮腫における増殖因子の異常

増殖因子は、細胞の増殖および浸潤において重要な働きをしていると考えられる。正常の中皮細胞は、多数の増殖因子、血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン様増殖因子 (IGF)、血管増殖因子 (VGF)、上皮増殖因子 (EGF)、トランスホーミング増殖因子 (TGF)、腫瘍壊死因子 (TNF) などによって増殖するが、中皮腫にみられる増殖因子の異常は表2のように要約される。

5 中皮腫におけるアポトーシス調節因子

腫瘍増殖は、抑制されていない細胞増殖の結果だけでなく、細胞増殖と生存能力のバランスによるものと考えられる。生存能力は、アポトーシスの率によって強く影響され、アポトーシスは異なる機能をもつ多数のタンパク質によって調節される。中皮腫にはアポトーシス抑制因子Bcl-2の発現の低下がみられ、その発現の有無は、中皮腫と反応中皮細胞との鑑別に役立つと考えられている²³⁾。さらに中皮腫では、Bcl-X, mcl-1, Baxの発現が高度であり、アポトーシスの程度は中皮腫の予後と相関しているとも報告されている²⁴⁾。

表2 中皮腫における増殖因子の異常

増殖因子	中皮腫における異常
PDGF ^{8,12,14-17)}	正常中皮細胞株および中皮腫細胞株では →PDGF- α と β mRNAの発現↑ 正常中皮細胞株では →PDGF- α receptor mRNAと蛋白の発現↑ 中皮腫細胞株では →PDGF- β receptor mRNAと蛋白の発現↑
IGF ^{8,12)}	正常中皮細胞株および中皮腫細胞株では →IGF-1, IGF-2がオートクライン増殖因子として機能 中皮腫細胞株では →IGF-1 receptorとIGF-2R発現↑ SV40感染 →IGF-1とIGF-1RmRNA発現↑ IGF-1R抑制剤 (NVP-AEW41) が中皮腫細胞のviabilityを抑制 IGF結合蛋白 (IGFBP1-6) のなかで、中皮腫では、IGFBP 2, 4, 5が存在
VEGF ^{8,12)}	SV40感染 →VEGFの発現↑ 中皮腫細胞株では →VEGF, そのレセプター (Flt-1とKDR) の共発現 Recombinant human VEGF →Flt-1, KDRのチロシンリン酸化 →中皮腫細胞の増殖↓ 中皮腫では →VEGF-Cとその受容体VEGFR-3発現 →VEGF-Cをターゲットとした治療が有効であることを示唆 VEGF蛋白, mRNA発現は微小血管密度と有意な相関 上皮型中皮腫>二相型および肉腫型 →VEGF発現↑
EGF ^{8,12,18,19)}	アスベスト曝露 →中皮細胞のEGF受容体 (EGFR) の自己リン化 中皮腫によるEGFR発現 →腫瘍の増殖, 浸潤↑ チロシンキナーゼ抑制剤, 抗EGFR抗体によるEGFRの抑制 →EGFR陽性腫瘍細胞の増殖↓ →新生血管形成↓ (VEGFの誘導によって) EGFRを標的とする治療では →脈管形成の増殖因子の発現↓ →血管内皮細胞のアポトーシス↑ 免疫組織化学的染色におけるEGFR発現 →予後良好因子
TNF- α ²⁰⁾	アスベスト曝露 →炎症反応 →TNF- α とともにTNF- α receptor発現↑ TNF- α →NF- κ B →アスベストの細胞毒性↓
TGF ^{21,22)}	TGF- β 1とTGF- β 2 (とくに, TGF- β 1) →PDGF- α receptor mRNA↑ →中皮腫を増殖 TGF- β specific antisenseオリゴヌクレオチド →中皮腫細胞の増殖↓

一方、胸膜中皮腫のアポトーシスの低下の要因としては、Bcl-2とBaxの発現変化よりsurvivinの発現の増加が重要であるとされている²⁵⁾。Narasimhanら²⁶⁾は中皮腫細胞株では、アポトーシス抑制因子Bcl-2でなく、Baxのアポトーシス促進効果を軽減させる他のメカニズムで、アポトーシスの異常は説明されるとしている。正常の中皮細胞から中皮腫へのsurvivinの蓄積は、この遺伝子が中皮細胞の腫瘍化において重要な役割を果たすことを示唆している。

6 DNAマイクロアレイを用いた中皮腫の遺伝子の網羅的解析

国際的な共同研究、すなわちHuman Genome Projectによりヒトゲノムの完全な配列解読は2003年に完了したが、それらの遺伝子の80%以上においてその機能や発現調節は明らかになっていない。核酸レベルの機能情報は、シーケンシングアプローチまたは遺伝子の発現パターンの決定によって知ることができる。分子生物学の従来の方法では、一つの実験で一つの遺伝子を調べる形で行われてきたため効率が悪く、遺伝子機能の全体像がつかみにくい。全体像の把握には、細胞内のすべての遺伝子の発現の理解が必要で、そのためにSAGE法、atac-PCR法などさまざまな方法が開発されつつあるが、やはり数万種類の遺伝子発現を調べるためには難点がある。現在、より簡便で直接的な方法として、DNAマイクロアレイを用いた解析法が注目されている。マイクロアレイ法は、スライドガラス上に数千から数万個のDNAスポットを作成し、

表3 マイクロアレイを用いた中皮腫文献のまとめ

報告者	マイクロアレイ(製造業者)	遺伝子数	対象とした細胞・組織(数)
Rihn BH, 2000 ²⁸⁾	Incyte Pharmaceutical Array (Genome Systems, Inc.)	3,962	中皮細胞株 (1) 中皮腫細胞株 (1)
Kettunen E, 2001 ²⁹⁾	Atlas Human Cancer cDNA Array (Clontech)	588	胸膜中皮細胞株 (2) 胸膜中皮腫細胞株 (4)
Mohr S, 2004 ³⁰⁾	Human UnigemV Array (Incyte Genomics)	9,984	中皮細胞株 (1) 中皮腫細胞株 (1) 胸膜中皮腫凍結組織 (2)
Hoang CD, 2004 ³¹⁾	MicroMax Human cDNA Microarray (Perkin Elmer LifeScience)	4,800	胸膜中皮腫凍結組織 (4) 中皮細胞株 (1) 中皮腫細胞株 (10)
Pass HI, 2004 ³³⁾	Human Genome U95Av2 Array, (Affymetrix)	12,625	胸膜中皮腫凍結組織 (21)
Singhal S, 2003 ³⁴⁾	GF211 GeneFilters Microarray, (Research Genetics)	4,132	胸膜中皮腫凍結組織 (16) 正常胸膜中皮凍結組織 (5)
Sun X, 2005 ³⁵⁾	Human cancer G110 oligonucleotide array (Affymetrix)	1,201	上皮型中皮腫細胞株 (1) 繊維芽細胞様中皮腫細胞株 (1)
Mohr S, 2004 ³⁶⁾	MWG Pan Human 10K Array, MWG-Biotech AG	9,850	胸膜中皮腫凍結組織 (1) 胸膜凍結組織 (1)
Kettunen E, 2004 ³⁷⁾	Atlas Human Cancer cDNA Array (Clontech)	588	IFN- γ -sensitive胸膜中皮腫細胞株 (2) IFN- γ -resistant胸膜中皮腫細胞株 (2)
Kettunen E, 2005 ³⁸⁾	Atlas Human Cancer cDNA Array (Clontech)	588	胸膜中皮腫細胞株 (2) 胸膜中皮腫凍結組織 (16)
Gordon GJ, 2002 ³⁹⁾	Human Genome U95Av2 Array (Affymetrix)	12,625	肺癌凍結組織 (150) 胸膜中皮腫凍結組織 (31)
Gordon GJ, 2005 ⁴⁰⁾	Human Genome U133A Array (Affymetrix)	14,500	胸膜中皮腫凍結組織 (40) 正常肺および胸膜中皮凍結組織 (9) 中皮細胞株 (1) 中皮腫細胞株 (4)
Lopez-Rios F, 2006 ⁴²⁾	Human Genome U133A Array (Affymetrix)	14,500	腹膜中皮腫凍結組織 (99) 上皮型69例, 肉腫型10例, 二相型20例
Borcuk AC, 2006 ⁴³⁾	Human Genome U95Av2 Array (Affymetrix)	12,625	腹膜中皮腫凍結組織 (16) 上皮型8例, 二相型8例
Davidson B, 2006 ⁴⁴⁾	Human Genome U133A Plus 2.0 Array (Affymetrix)	54,675	腹膜中皮腫凍結組織 (5) 漿液性卵巣癌凍結組織 (6) 原発性腹膜癌凍結組織 (4)

解析するRNAから調整したターゲットをハイブリダイゼーションさせ、ハイブリッド形成の強度を指標にして、各遺伝子の転写量を測定する方法であり、生物の持つすべての遺伝子の動的挙動を効率的に、また定量的に計測する手法である。1995年にSchenら²⁷⁾によりDNAマイクロアレイという技術が発表されてから10年が経ち、生命科学のあらゆる分野においてマイクロアレイを用いた研究が進んでいる。その多くは病変に特徴的に発現する遺伝子を探索し、遺伝子的診断や鑑別診断、遺伝子レベルでの予後因子の発見、新しい低毒性薬物の発見、癌抑制遺伝子のメチル化などの探索に応用されている。

このマイクロアレイ法を用いた中皮腫の遺伝子の発現解析の報告は、2000年以降では数論文に限られている(表3)。細胞株を使った研究では、非腫瘍中皮細胞株と中皮腫細胞株の遺伝子発現の比較、上皮型中

皮腫細胞株と線維芽細胞様中皮腫細胞株における遺伝子発現の相違、IFN- γ に対するsensitiveあるいはresistantな中皮腫の遺伝子発現の相違などを目的とした研究が行われている。また、細胞株と外科的に摘出された中皮腫の凍結組織の遺伝子発現のプロファイリングを行った報告もある。凍結組織を使った研究では、中皮腫の上皮型、肉腫型、二相型での異なる遺伝子発現、肺癌と胸膜中皮腫の遺伝子発現の相違、腹膜中皮腫と漿液性卵巣癌や原発性腹膜癌の遺伝子発現の相違などを目的とした研究が行われている。

Rihnら²⁹¹は、中皮細胞株と比べて中皮腫細胞株において、209遺伝子での2倍以上の発現増加と84遺伝子での減少、とくに高分子安定 (macromolecular stability)、細胞接着と認識、細胞浸潤、分裂に関連している遺伝子の発現増加や減少していると報告している。Kettunenら²⁹²は、26遺伝子での発現増加、12遺伝子での発現減少、とくに細胞周期、増殖因子、DNA傷害修復、細胞接着、運動性、浸潤に関連した遺伝子が発現増加や減少していると報告している。また、Kettunenら²⁹³は、RT-PCR法によって、JNK1、NIK、JAGGED1、JAGGED2、Ku-80の発現増加、tenascin-C、TGF- β 3、CyclinD2の発現減少を報告している。また、Mohrら³⁰¹は、2例の中皮腫組織も含めた研究によって、約700遺伝子の発現増加や減少を認め、これらの遺伝子のクラスター化によって、ヒト中皮腫の特異な浸潤性、抗癌剤への抵抗性遺伝子のパターンを報告している。彼らはこれらの遺伝子発現のパターンによって、中皮腫の診断、予後の推測や治療の適確さを改善できると考えている。Hoangら³¹¹は10例の中皮腫細胞株と4例の中皮腫組織の遺伝子発現の解析を行い、matriptase、IGF-1、PAX6遺伝子の発現の増加、IGFBP5遺伝子の発現の減少を明らかにしている。また、上皮型、肉腫型と二相型中皮腫の間で180遺伝子が異なる発現を示すことを述べている。

Passら^{32,33}はSerial analysis of gene expression (SAGE)法を用い、中皮腫にはintelectin遺伝子の発現の増加があり、さらにGeneChipを用いた研究によって中皮腫の存続 (viability) や進行 (progression) を遺伝子発現のプロファイルから予期できるとしている。Singhalら³⁴は、16例の胸膜中皮腫と4例の正常胸膜組織を用いて行った遺伝子解析によって、166遺伝子の発現の増加、26遺伝子の発現の減少があったとしている。これらの遺伝子は主に、糖代謝経路、細胞骨格の再構成経路、mRNAの翻訳による蛋白の統合経路に関連する遺伝子である。Sunら³⁵は、線維芽細胞様中皮腫において56遺伝子、上皮細胞様中皮腫において46遺伝子の発現増加を認めている。Mohrら³⁶は、Laser Capture Microdissection法を用いて遺伝子発現を検討し、中皮腫組織では、胸膜の中皮組織と比べて302遺伝子 (BF、FTL、IGFBP7、RARRES1、RARRES2、RBP1、SAT、TXNを含む) の発現増加、160遺伝子 (ALOX5AP、CLNS1A、EIF4A2、ELK3、REQ、SYPL含む) の発現減少があることを明らかにしている。Kettunenら³⁷は、中皮腫細胞ではIFN- γ の抗増殖効果がJAK2の活性化およびSTAT1のリン酸化を含むシグナリング経路によって仲介されることを示している。すなわち、IFN- γ -resistantおよびIFN- γ -sensitiveな中皮腫細胞株に、recombinant human IFN- γ (500IU/mL) を加えて6時間あるいは72時間培養した結果、それぞれの遺伝子発現のプロファイリングによって、JAK/STAT1-deficient細胞でもIFN- γ によって細胞増殖および細胞接着にかかわる多数の遺伝子が抑制されていることが明らかとなったと報告している。cDNAマイクロアレイ法とRT-PCRの結果をあわせてみると、CDC2、PLK1、IGFBP4はIFN- γ -resistantな細胞と比較してIFN- γ -sensitiveな細胞で特異的に調節されているという。16例の胸膜中皮腫組織と2つの培養中皮細胞の遺伝子発現のプロファイリングでは、中皮細胞と比べて中皮腫ではCOL1A2、INP10、P-cadherin、ITGB4、tPA、ITGB4遺伝子の発現が明らかに増加しているとされる。また中皮腫の組織型別にみると、上皮型中皮腫ではSEMA3C、ITGB4、CDH3、肉腫型中皮腫ではMMP9、tPA、二相型中皮腫ではLICAM、INP10遺伝子の発現増加を認めている³⁸。このような遺伝子の発現解析から、中皮腫では、特異的な遺伝子の発現がその発生、増殖、進展に関わっていることを考えられ、これらの研究が将来的に中皮腫の発生メカニズムの解明や治療の開発に役立つことが示唆される。

中皮腫や肺腺癌の治療選択は正しい病理組織学的診断によって決まる。そこで、胸膜では中皮腫と肺癌の鑑別が重要であり、そのためにそれぞれの遺伝子発現のプロファイルをみるが行われている。Gordonら³⁹は31例の中皮腫と150例の肺癌の遺伝子発現のプロファイリングを行い、中皮腫では肺腺癌と比較して、calretinin、VAC- β 、MRC OX-2、PTGIS、KIAA0977の発現増加、TACSTD1、caludin-7、TTF-1

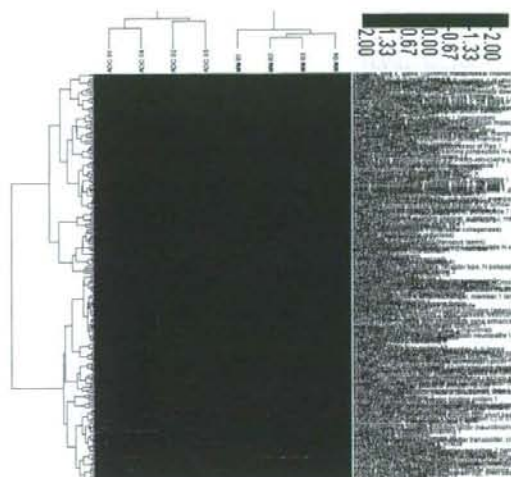


図2 中皮腫と肺腺癌のクラスター解析
ADC:肺腺癌 MM:中皮腫

の発現減少が有意にみられると報告している。これらの発現増加と発現減少を中皮腫および肺腺癌と比較して、calretinin:caludin-7の比およびVAC- β :TACSTD1の比をみることで肺腺癌と中皮腫を鑑別するのに重要であるとしている。また、遺伝子発現の比率は、中皮腫患者の予後予測を可能にするとされている^{39,40}。さらに、遺伝子発現のプロファイリングから、多くの中皮腫は2つのサブクラスに分けることができ、それらの遺伝子のpathway解析を行うことによって、12の病態生理学的経路と関連していることがあったと報告している⁴¹。Lopez-Riosら⁴²は99例の胸膜中皮腫の遺伝子発現の解析を行い、上皮型と肉腫型では1,039遺伝子の発現において差違を認めている。上皮型中皮腫に高発現を示したuroplakin 1B, 3Bとkallikrein 11の発現は、免疫組織学的にも確認されている。遺伝子発現プロファイルからみると、aurora kinase A, Bと機能的に関連する分裂および細胞周期制御関連遺伝子が高発現する中皮腫は、悪性度が高いと報告している。ただし、Lopez-Riosら⁴²は、中皮腫の予後関連遺伝子の発現は、研究報告ごとに異なることを指摘している。すなわち、予後に関わる遺伝子いわゆるprognostic geneとして、Passら³³の発表した27遺伝子、Gordonらの発表した7⁴⁰および22⁴³遺伝子とLopez-Riosら⁴²の発表した29遺伝子とは全く異なっている。このことは、遺伝子発現の解析が研究方法によって、またアレイチップや腫瘍細胞、組織によって変わるかもしれないことを示している。また、多くの癌と同じく中皮腫でも、人種による違いがある可能性がある。このことは、日本人の中皮腫において遺伝子の特異的な発現プロファイルや予後に関係する異なる遺伝子が存在するかもしれない。

腹膜中皮腫は、胸膜中皮腫に比べて発生は少なく、腹膜中皮腫の発癌メカニズムは胸膜中皮腫とは違うことも予想される。また、中皮腫に高度に発現するWT-1, calretinin, D2-40などは、腹腔では腹膜中皮腫以外の卵巣や腹膜の漿液性乳頭腺癌にも発現することから、それらの鑑別に使うことが難しい。Borcukら⁴⁴は、上皮型と比べて、二相型腹膜中皮腫にはubiquitin-proteasome経路に関連する遺伝子の発現が増加し、Cytotoxicityの実験でも、上皮型中皮腫細胞株より二相型中皮腫細胞株では、proteasome抑制剤のbortezomibがoxaliplatinと相乗効果を示していると報告している。この経路の遺伝子の発現増加によってアポトーシスが高度にみられることから、二相型腹膜中皮腫にはubiquitin-proteasome経路に関連する遺伝子の関与があると考えられる。腹膜中皮腫と卵巣漿液性腺癌/腹膜漿液性腺癌の鑑別を目的として行ったDavidsonら⁴⁵の遺伝子発現解析では、189遺伝子において統計学的に有意な発現の差を認め、腹膜中皮腫には68遺伝子(calretinin, vitronectin, claudin15, α 4Laminin, HAS1, cadhrin 11, RAB7, v-mafなど)

表4 中皮腫における細胞機能経路の遺伝子の異常

経路	異常 遺伝子数	発現増加 遺伝子数	発現減少 遺伝子数	チップを含む 遺伝子数
Neuroactive ligand-receptor interaction	38	9	29	249
Cytokine-cytokine receptor interaction	32	3	29	221
Calcium signaling pathway	24	5	19	141
Cell adhesion molecules (CAMs)	21	0	21	95
Focal adhesion	21	1	20	150
Wnt signaling pathway	21	2	19	109
Complement and coagulation cascades	18	1	17	65
MAPK signaling pathway	17	3	14	221
Natural killer cell mediated cytotoxicity	17	0	17	96
Jak-STAT signaling pathway	16	3	13	125
Antigen processing and presentation	15	0	15	62
Hematopoietic cell lineage	13	0	13	80
Leukocyte transendothelial migration	13	1	12	91
T cell receptor signaling pathway	13	1	12	77
ECM-receptor interaction	12	0	12	57
Tight junction	12	1	11	88
Gap junction	11	1	10	76
Glycan structures - biosynthesis 2	11	1	10	47

の高発現、卵巣漿液性腺癌/腹膜漿液性腺癌では121遺伝子 (IGF-II, IGF-IIBP2, cyclin E1, MUC-4, endothelin-1, CD24, claudin 3, 4, 6, MMP-7など) の高発現があるとされている。

われわれは、4例の中皮腫、4例の高分化型肺癌と、2例の非腫瘍性肺組織のHuman Genome Focus Array (ヒト全ゲノムの8,500遺伝子を含む) を用いた遺伝子発現解析を行った。(Data Not Published)。その結果、中皮腫と肺癌の遺伝子発現のクラスター化 (図2) を行うと、231遺伝子で発現の有意な差がみられた。これらの遺伝子のうち中皮腫にはNDRG-1, RARRES1, HAS-1遺伝子のmRNAの発現の増加があり、real-time RT-PCR法でも確認された。また、中皮腫に表4に示すような細胞機能経路の遺伝子の異常を認めた。そのうちWnt-signaling pathway (図3) を調べると、多くの遺伝子の発現減少 (Wnt inhibitory factor 1, matrix metalloproteinase 7, β -catenin 1) と、CaM kinase, Nemo-like kinaseの発現増加を認めた。

まとめ

DNAマイクロアレイを用いた遺伝子解析から中皮腫における遺伝子異常の情報が明らかになってきたが、そのうちの多くは、胸膜中皮腫と肺癌、また腹膜中皮腫と卵巣癌との鑑別など中皮腫の鑑別診断のために有用なものである。今後、中皮腫の発生過程や生物学的な悪性度や予後因子を知るとともに中皮腫の遺伝子診断、遺伝子治療の開発のために、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子研究が今後益々必要となると思われる。

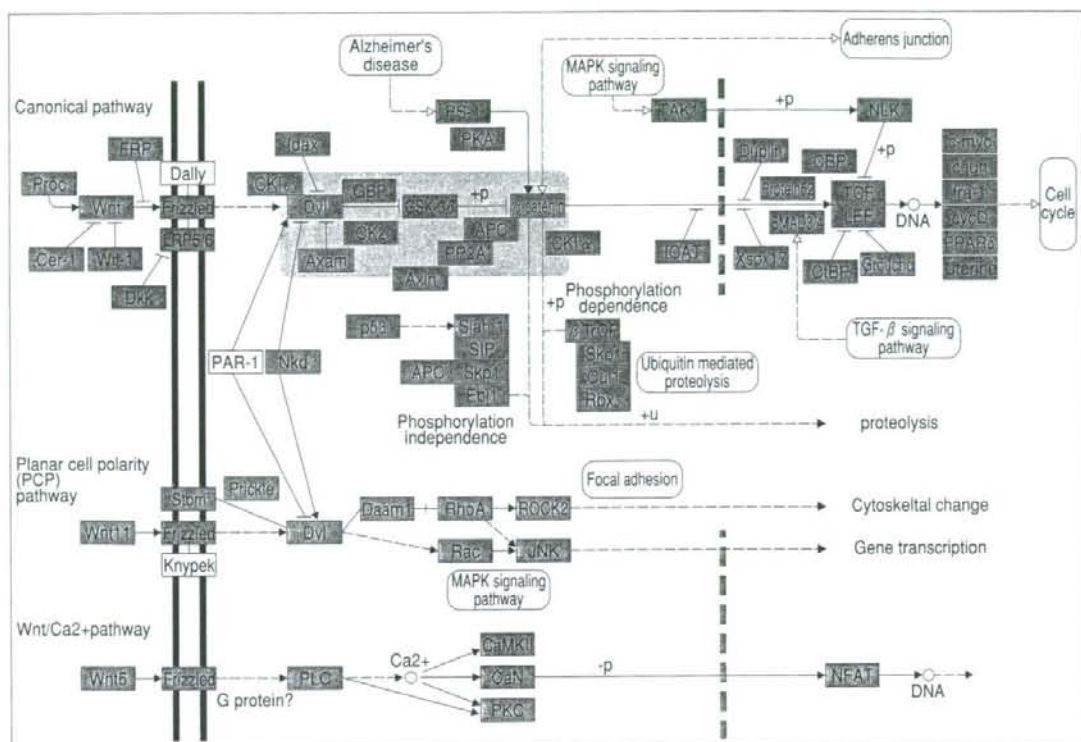


図3 中皮腫と WNT-Signaling Pathway の異常

緑のBoxはGeneChipに含む遺伝子, 赤い文字は中皮腫で異常を示す遺伝子. WIF-1, Dkkなどの発現減少によって Wnt-Signaling Pathwayの活性化が起こり, 腫瘍細胞は細胞周期に入り増殖することが想定される。

文献

- 1) Carbone M, Kratzke RA, Testa JR: The pathogenesis of mesothelioma. *Semin Oncol* 29: 2-17, 2002
- 2) Sandberg AA, Bridge JA: Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 127: 93-110, 2001
- 3) Musti M, Kettunen E, Dragonieri S, et al: Cytogenetic and molecular genetic changes in malignant mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 170: 9-15, 2006
- 4) Yang CT, You L, Yeh CC, et al: Adenovirus-mediated p14(ARF) gene transfer in human mesothelioma cells. *J Natl Cancer Inst* 92: 636-641, 2000
- 5) Cote RJ, Jhanwar SC, Novick S, et al: Genetic alterations of the p53 gene are a feature of malignant mesotheliomas. *Cancer Res* 51: 5410-5416, 1991
- 6) Carbone M, Rizzo P, Grimley PM, et al: Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nat Med* 3: 908-912, 1997
- 7) Segers K, Backhovens H, Singh SK, et al: Immunoreactivity for p53 and mdm2 and the detection of p53 mutations in human malignant mesothelioma. *Virchows Arch* 427: 431-436, 1995
- 8) Whitson BA, Kratzke RA: Molecular pathways in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Lett* 239: 183-189, 2006
- 9) Park S, Schalling M, Bernard A, et al: The Wilms tumour gene WT1 is expressed in murine mesoderm-derived tissues and mutated in a human mesothelioma. *Nat Genet* 4: 415-420, 1993
- 10) Kumar- Singh S, Segers K, Rodeck U, et al: WT1 mutation in malignant mesothelioma and WT1 immunoreactivity in relation to p53 and growth factor receptor expression, cell-type transition, and prognosis. *J Pathol* 181: 67-74, 1997

- 11) Ordonez NG: Value of thyroid transcription factor-1, E-cadherin, BG8, WT1, and CD44S immunostaining in distinguishing epithelial pleural mesothelioma from pulmonary and nonpulmonary adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 24: 598-606, 2000
- 12) Mossman BT, Gruenert DC: SV40, growth factors, and mesothelioma: another piece of the puzzle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 167-170, 2002
- 13) Gazdar AF, Butel JS, Carbone M: SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* 2: 957-964, 2002
- 14) Whitson BA, Jacobson BA, Frizelle S, et al: Effects of insulin-like growth factor-1 receptor inhibition in mesothelioma. Thoracic Surgery Directors Association Resident Research Award. *Ann Thorac Surg* 82: 996-1001; discussion 1001-1002, 2006
- 15) Versnel MA, Claesson-Welsh L, Hammacher A, et al: Human malignant mesothelioma cell lines express PDGF beta-receptors whereas cultured normal mesothelial cells express predominantly PDGF alpha-receptors. *Oncogene* 6: 2005-2011, 1991
- 16) Langerak AW, De Laat PA, Van Der Linden-Van Beurden CA, et al: Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptors in human malignant mesothelioma *in vitro* and *in vivo*. *J Pathol* 178: 151-160, 1996
- 17) Gerwin BI, Lechner JF, Reddel RR, et al: Comparison of production of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor by normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines. *Cancer Res* 47: 6180-6184, 1987
- 18) Edwards JG, Swinson DE, Jones JL, et al: EGFR expression: Associations with outcome and clinicopathological variables in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* 54: 399-407, 2006
- 19) Dazzi H, Hasleton PS, Thatcher N, et al: Malignant pleural mesothelioma and epidermal growth factor receptor (EGF-R). Relationship of EGF-R with histology and survival using fixed paraffin embedded tissue and the F4, monoclonal antibody. *Br J Cancer* 61: 924-926, 1990
- 20) Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, et al: TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 10397-10402, 2006
- 21) Marzo AL, Fitzpatrick DR, Robinson BW, et al: Antisense oligonucleotides specific for transforming growth factor beta2 inhibit the growth of malignant mesothelioma both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 57: 3200-3207, 1997
- 22) Langerak AW, van der Linden-van Beurden CA, Versnel MA: Regulation of differential expression of platelet-derived growth factor alpha- and beta-receptor mRNA in normal and malignant human mesothelial cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1305: 63-70, 1996
- 23) Segers K, Ramael M, Singh SK, et al: Immunoreactivity for bcl-2 protein in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium. *Virchows Arch* 424: 631-634, 1994
- 24) Soini Y, Kinnula V, Kaarteenoja-Wiik R, et al: Apoptosis and expression of apoptosis regulating proteins bcl-2, mcl-1, bcl-X, and bax in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 5: 3508-3515, 1999
- 25) Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, et al: Quantitative evaluation of the apoptosis regulating genes Survivin, Bcl-2 and Bax in inflammatory and malignant pleural lesions. *Lung Cancer* 48: 211-216, 2005
- 26) Narasimhan SR, Yang L, Gerwin BI, et al: Resistance of pleural mesothelioma cell lines to apoptosis: relation to expression of Bcl-2 and Bax. *Am J Physiol* 275: L165-171, 1998
- 27) Schena M, Shalon D, Davis RW, et al: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470, 1995
- 28) Rihn BH, Mohr S, McDowell SA, et al: Differential gene expression in mesothelioma. *FEBS Lett* 480: 95-100, 2000
- 29) Kettunen E, Nissen AM, Ollikainen T, et al: Gene expression profiling of malignant mesothelioma cell lines: cDNA array study. *Int J Cancer* 91: 492-496, 2001
- 30) Mohr S, Keith G, Galateau-Salle F, et al: Cell protection, resistance and invasiveness of two malignant mesotheliomas as assessed by 10K-microarray. *Biochim Biophys Acta* 1688: 43-60, 2004
- 31) Hoang CD, D'Cunha J, Kratzke MG, et al: Gene expression profiling identifies matriptase overexpression in malignant mesothelioma. *Chest* 125: 1843-1852, 2004
- 32) Wali A, Morin PJ, Hough CD, et al: Identification of intelectin overexpression in malignant pleural mesothelioma by serial analysis of gene expression (SAGE). *Lung Cancer* 48: 19-29, 2005
- 33) Pass HI, Liu Z, Wali A, et al: Gene expression profiles predict survival and progression of pleural mesothelioma. *Clin*

- Cancer Res* 10: 849-859, 2004
- 34) Singhal S, Wiewrodt R, Malden LD, et al: Gene expression profiling of malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 9: 3080-3097, 2003
 - 35) Sun X, Wei L, Liden J, et al: Molecular characterization of tumour heterogeneity and malignant mesothelioma cell differentiation by gene profiling. *J Pathol* 207: 91-101, 2005
 - 36) Mohr S, Bottin MC, Lannes B, et al: Microdissection, mRNA amplification and microarray: a study of pleural mesothelial and malignant mesothelioma cells. *Biochimie* 86: 13-19, 2004
 - 37) Kettunen E, Vivo C, Gattacceca F, et al: Gene expression profiles in human mesothelioma cell lines in response to interferon-gamma treatment. *Cancer Genet Cytogenet* 152: 42-51, 2004
 - 38) Kettunen E, Nicholson AG, Nagy B, et al: L1CAM, INP10, P-cadherin, tPA and ITGB4 over-expression in malignant pleural mesotheliomas revealed by combined use of cDNA and tissue microarray. *Carcinogenesis* 26: 17-25, 2005
 - 39) Gordon GJ, Jensen RV, Hsiao LL, et al: Translation of microarray data into clinically relevant cancer diagnostic tests using gene expression ratios in lung cancer and mesothelioma. *Cancer Res* 62: 4963-4967, 2002
 - 40) Gordon GJ, Rockwell GN, Godfrey PA, et al: Validation of genomics-based prognostic tests in malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res* 11: 4406-4414, 2005
 - 41) Gordon GJ, Rockwell GN, Jensen RV, et al: Identification of novel candidate oncogenes and tumor suppressors in malignant pleural mesothelioma using large-scale transcriptional profiling. *Am J Pathol* 166: 1827-1840, 2005
 - 42) Lopez-Rios F, Chuai S, Flores R, et al: Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: overexpression of aurora kinases and P16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction. *Cancer Res* 66: 2970-2979, 2006
 - 43) Gordon GJ, Jensen RV, Hsiao LL, et al: Using gene expression ratios to predict outcome among patient with mesothelioma. *J Natl Cancer Inst* 95: 598-605, 2003
 - 44) Borczuk AC, Cappellini GC, Kim HK, et al: Molecular profiling of malignant peritoneal mesothelioma identifies the ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target in poor prognosis tumors. *Oncogene* 26: 610-617, 2007
 - 45) Davidson B, Zhang Z, Kleinberg L, et al: Gene expression signatures differentiate ovarian/peritoneal serous carcinoma from diffuse malignant peritoneal mesothelioma. *Clin Cancer Res* 12: 5944-5950, 2006

3. 中皮腫の病理

井内 康輝 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学)

1 • 中皮腫の肉眼像

中皮腫は正常で中皮細胞の存在する漿膜，すなわち胸膜，腹膜，心膜，精巣鞘膜から発生し，それぞれの部位の発生例の占める割合は表1のように胸膜が圧倒的に多い。

発生初期の肉眼像については，これまでの報告でも知見が少ないが，最も経験の多い胸膜例でみると，主として壁側胸膜に小結節が生じ，早い段階で周囲に播種性に拡がり，これらの進展と癒合によって早晩，壁側と臓側の胸膜が癒着し，進行期で特徴的にみられる肺を囲繞するような肉眼像を形成する(図1)。進行期の腹膜例では，腸間膜や大網に大きな結節をつくる例が多い。心膜例では心膜の肥厚によって心嚢腔が消失する。

2 • 中皮腫の組織像と亜型分類

中皮腫の組織像は多彩である。すなわち腺癌との鑑別が必要な上皮型(図2)，軟部組織などに発生する肉腫との鑑別が必要な肉腫型(図3)，肉腫型の亜型として線維性胸膜炎との鑑別が必要な線維形成型(図4)，上皮型と肉腫型のそれぞれが10%以上混在する二相型(図5)の4型が基本型である。これに加えて

表1 中皮腫の発生部位

	2003年 死亡統計 (878例)	1995~2002年 アンケート調査 (837例)
胸膜	64.5%	77.4%
腹膜	9.7%	13.1%
心膜	0.5%	2.9%
精巣鞘膜	—	0.6%
その他	2.1%	—
不明	23.3%	11.7%

*アメリカ 胸膜：腹膜=男9：1，女2：1
イギリス 胸膜：腹膜=5：1

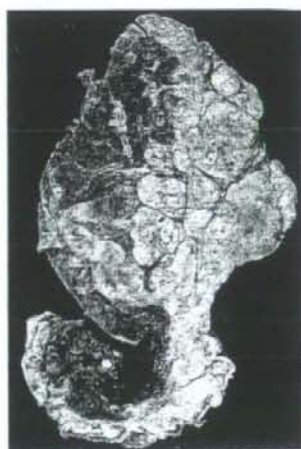


図1 胸膜中皮腫の肉眼像
灰白色の腫瘍は肺を囲繞する進展を示し，一部は肺実質へも浸潤する。

表2 中皮腫の組織型

1. 上皮型中皮腫	Epithelioid mesothelioma
2. 肉腫型中皮腫	Sarcomatoid mesothelioma
1) 線維形成型中皮腫	Desmoplastic mesothelioma
3. 二相型中皮腫	Biphasic mesothelioma
4. 特殊型	Variants
1) 退形成性中皮腫	Anaplastic mesothelioma
2) リンパ組織球様中皮腫	Lymphohistiocytoid mesothelioma
3) 脱落膜様中皮腫	Deciduoid mesothelioma
4) 高分化乳頭型中皮腫	Well differentiated papillary mesothelioma
5) その他	Others



図2 上皮型中皮腫の組織所見 (HE 染色・中拡大)
腫瘍細胞は乳頭腺管状の増殖を示す。

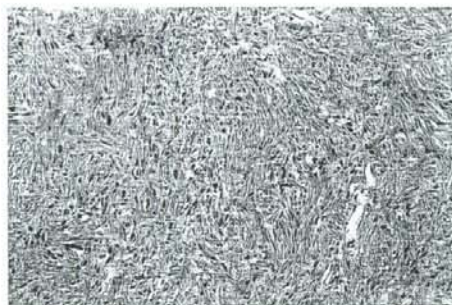


図3 肉腫型中皮腫の組織所見 (HE 染色・中拡大)
異型性を示す紡錘形細胞の増殖を示す。



図4 線維形成型中皮腫の組織所見 (HE 染色・弱拡大)
細胞密度の低い線維性結合組織の脂肪組織への浸潤性増殖をみる。

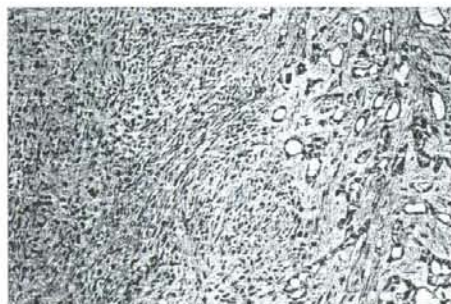


図5 二相型中皮腫の組織所見 (HE 染色・中拡大)
上皮型中皮腫 (右側) と肉腫型中皮腫 (左側) の混在をみる。

多くの特殊型があり、多彩な組織像をとることが知られるが (表2)、特殊型の中では、低分化な上皮性腫瘍としかいえない退形成性中皮腫、リンパ腫を疑わせるリンパ組織球様中皮腫、細胞質の豊富な大型細胞からなる脱落膜様中皮腫などが多い。高分化乳頭型中皮腫は予後のよい特殊型と位置づけられる。わが国におけるこれらの組織型の占める割合は、わが国では病理医による診断基準が異なることを反映してこれ

表3 中皮腫の組織型別割合

組織型	1995~2002年 アンケート調査例 (837例)	1995~2002年 再検討例 (116例)	フランス 中皮腫パネル
上皮型	47.9%	62.1%	60%
肉腫型	18.4%	20.7%	9%
線維形成型			1.2%
二相型	22.0%	17.2%	16.5%
その他			9%
不明	11.7%		

表4 上皮型中皮腫と肺腺癌の免疫組織化学的染色の比較

抗体	陽性例/検討例 (%)		p-value (χ^2 検定)
	上皮型中皮腫	肺腺癌	
Calretinin	83/87 (95.4)	17/51 (33.3)	<0.001
WT-1	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

までさまざまに報告されてきたが、近年の見直し作業によって、欧米で報告される割合と近似してきたといえる (表3)。

3 • 中皮腫の鑑別診断

上皮型で分化のよい場合は、上皮様細胞が特徴的な乳頭腺管状配列を示すが、低分化になると充実性増殖が主体で一部に腺管様の配列をみるのみである。後者の場合、腺癌との鑑別に関する判断が病理医間で異なると思われるが、こうした場合、免疫組織化学的染色が、胸膜原発の上皮型中皮腫と肺腺癌の鑑別に有用である。両者の比較を表4に示すが、感度、特異度の面から calretinin (図6), WT1, thrombomodulin の有用性がとくに高い¹⁾。逆に肺腺癌に陽性度が高く上皮型中皮腫としては陰性マーカーとなる抗体としては、CEA, TTF-1, Napsin Aなどがあげられる。腹膜原発の上皮型中皮腫は卵巣原発の serous papillary adenocarcinoma あるいは腹膜原発の serous papillary carcinoma との鑑別が必要となるが、卵巣癌で陽性となる Ber EP-4 および MOC-31 は、腹膜の上皮型中皮腫ではまったく染色されない。

肉腫型は線維肉腫、悪性線維性組織球腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫あるいは単相型滑膜肉腫などの軟部組織などに発生する肉腫の他に、近年中皮腫から別の概念の腫瘍として分けられた solitary (localized) fibrous tumor との鑑別が必要である。これらの肉腫と肉腫型中皮腫の免疫組織化学的染色の比較を表5に示す。肉腫型中皮腫では上皮型中皮腫と異なり、calretinin や WT1 の染色陽性度は低く、CAM5.2 (図7) あるいは AE1/AE3 で染色されるサイトケラチンの方が感度、特異度の面で肉腫との鑑別に陽性マーカーとして有用である²⁾。これに HE 染色の所見から疑われる肉腫のそれぞれに特異的なマーカーを、肉腫型中皮腫にとっては陰性マーカーとして用いるとよい。ただし S-100 蛋白のように、神経鞘腫瘍の陽性マーカーとしてよく使われるが、肉腫型中皮腫でも陽性となる割合が高く、特異度は低いマーカーもある。



図6 上皮型中皮腫における calretinin の免疫組織化学的所見 (強拡大)
核に強く、細胞質にやや弱い陽性所見をみる。

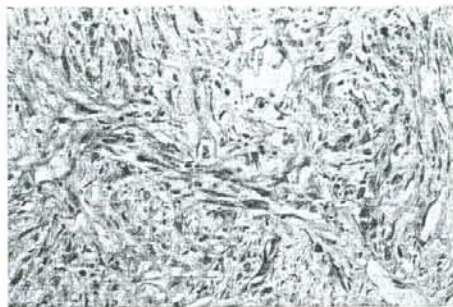


図7 肉腫型中皮腫における CAM5.2 の免疫組織化学的所見 (強拡大)
一部の紡錘形細胞の細胞質に陽性所見をみる。

表5 肉腫型中皮腫と種々の肉腫の免疫組織化学的染色の比較

抗体	陽性例/検討例 (%)		p-value (χ^2 検定)
	肉腫型中皮腫	種々の肉腫	
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

肉腫型中皮腫の陽性マーカーを CAM5.2, AE1/AE3 という抗サイトケラチン抗体とした場合に問題となるのは、肉腫様の形態を示す肺癌 (肉腫様癌) との鑑別である。肺癌であるので、CEA が陽性となれば鑑別は可能であるが、肉腫様癌では CEA の陽性率は低い。したがって、肺内での腫瘍形成の有無、胸腔内での進展形式などの肉眼的所見および画像所見の情報を大いに参考にして診断を下す必要がある。

二相型は中皮細胞が本来もつ上皮様細胞と紡錘形細胞にともに分化しうる能力をもつ細胞であることを具現した組織型といえることができるので、二相性をとる腫瘍は中皮腫という診断を下されやすい。しかし、この二相性をとる腫瘍として、胸腔では肺原発の癌肉腫、肺芽腫の他に胸膜発生の二相型の滑膜肉腫も存在する。腹腔では、卵巣や子宮原発 (ミューラー管由来) の癌肉腫などがあり、これらとの鑑別を慎重に行う必要がある。

現時点で鑑別診断において最も大きな問題は、線維形成型中皮腫と線維性胸膜炎の鑑別である。線維形成型中皮腫はその 50% 以上が肉芽様あるいは瘢痕様の線維性結合組織からなり、いずれかの部位に悪性所見 (細胞密度の高さ、壊死の存在など) を示す例と定義されているので、小さな生検材料で診断を求められた場合、両者の鑑別に苦慮することは多い。こうした場合に参考にする所見としては、線維性胸膜炎では HE 染色標本で zonation (層状構造)、すなわち胸腔側で細胞密度が高く、胸腔面に垂直な細い毛細血管を数多く認め、深部 (胸壁側) になるに従って紡錘形細胞の細胞密度は低くなり、ときにリンパ球浸潤を伴うという所見をみることである³⁾。これに加え、紡錘形細胞の免疫組織化学的染色によって、紡錘形細胞が desmin と α -SMA に陽性である場合は線維性胸膜炎であり、紡錘形細胞で desmin が陰性であると中皮腫の可能性が高くなる⁴⁾。

また、胸膜炎などに伴って上皮様中皮細胞が過形成を示す場合、上皮型中皮腫、とくに初期の中皮腫との鑑別が必要となる。HE 染色標本で炎症性のフィブリンとこれら上皮様中皮細胞が混在してみられる場

合は胸膜炎であること、また、過形成では一定の深さ以上に中皮細胞の増殖巣は達しないことが判断の材料となる。免疫組織化学的染色では、上皮型中皮腫では EMA と p53 蛋白が陽性、desmin が陰性であるが、過形成ではこの逆であることが鑑別に有用である⁴⁾。

中皮腫の診断に有利な所見として、ヒアルロン酸を主体とする酸性粘液多糖類の存在がある。上皮型中皮腫において、しかも分化のよい例では、腫瘍細胞はヒアルロン酸を産生し、主として細胞膜表面を被うように存在する。細胞質内に小空胞としてみられたり、腫瘍細胞のつくる腔内に粘液が貯留したり、間質への沈着を示す。こうした場合は胸水中のヒアルロン酸の高値が臨床診断として有用である。しかし、上皮型中皮腫でも低分化な場合や肉腫型中皮腫ではヒアルロン酸の産生は乏しい。一般に腫瘍の間質にはヒアルロン酸を含む酸性粘液多糖類が存在するので、肉腫と肉腫型中皮腫の鑑別に間質におけるヒアルロン酸の存在を指標とすることはできない。

電子顕微鏡的観察も中皮腫の診断に用いることができる。上皮型中皮腫では細くて長い microvilli が密在するが⁵⁾、分化度の低い上皮型中皮腫では必ずしもこの所見はみられない。肉腫型中皮腫でもこの microvilli がみられるのは上皮様の細胞が混在した場合である。電子顕微鏡的観察には多くの労力と時間が必要であることを考えると、すべての医療機関で行えるルーティンの診断方法とはいえない。

4 • 中皮腫の分子生物学的知見

これまでに報告された中皮腫細胞の遺伝子・分子レベルの異常は表6のようにまとめられる。多くの研究にもかかわらず、特徴的な所見はいまだ見出されていない。また、DNA microarray を用いた検討は、数多くの遺伝子の発現の情報を一時に把握できる利点があり、これまでにこの方法を用いた報告がいくつかなされているが、一定の見解を得るに至っていない。

われわれも DNA microarray を用いた中皮腫の遺伝子異常の検討を行いつつある。Preliminary な検討では、高発現している遺伝子は 128 に及びその中には *calretinin* や *WT1* に加えて *RARRES1*, *HAS1*, *NDRG1* などが含まれる⁶⁾。今後のこれら手法を用いた検討を詳細にすすめることによって、早期発見のための診断マーカーや分子標的治療薬の開発がなされることが望まれる。

表6 中皮腫細胞の分子生物学的知見

1. 癌遺伝子	K-ras, N-ras, CDK → 変異なし <i>β</i> -catenin (核への移行, transcription factor の coactivator) → mutation の報告あり
2. 癌抑制遺伝子	TP53 → 変異なし pRB → 変異なし p16/CDKN2A → しばしば不活性化 (deletion) アスベスト曝露マウスでは不活性化 NF2 → しばしば不活性化 アスベスト曝露マウスでは LOH
3. 成長因子	PDGF → 直接あるいは hyaluronan/CD44 を介して 中皮腫細胞では PDGF-A, PDGF-B が高発現 IGF-1 → IGF-binding protein 3 についても同時に mRNA 産生 HGD/SF VEGF
4. サイトカイン	TGF- β , IL-6, IL-8, GM-CSF, (G)-CSF, (M)-CSF の発現あり

■文献

- 1) Kushitani K, Takeshima Y, Inai K, et al : Immunohistochemical panels for distinguishing between epithelioid malignant mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma. *Pathology International* **57** : 190-199, 2007
- 2) Kushitani K, Takeshima Y, Inai K, et al : Differential diagnosis between sarcomatoid mesothelioma and sarcoma-usefulness of immunohistochemistry. *Pathology International* (in press)
- 3) US-Canadian Mesothelioma Reference Panel : The separation of benign and malignant mesothelial proliferation. *Am J Surg Pathol* **24** : 1183-1200, 2000
- 4) Attanoos RL, Griffin A, Gibbs AR : The use of immunohistochemistry in distinguishing reactive from neoplastic mesothelium. A novel use for desmin and comparative evaluation with epithelial membrane antigen, p53, platelet-derived growth factor-receptor, P-glycoprotein and BCl-2. *Histopathology* **43** : 231-238, 2003
- 5) 小武家俊博, 米原修治, 井内康輝, 他 : 悪性中皮腫, とくに肉腫型の診断ならびに上皮型中皮腫と腺癌との鑑別. *病理と臨床* **5** : 1290-1299, 1987
- 6) Amatya VJ, Takeshima Y, Inai K, et al : Gene expression profiling of malignant mesotheliomas using genechip array. (in submitted)

■MOOK 肺癌の臨床 2007~2008 ■

PET 検診は是か非か

寺内隆司 柿沼龍太郎 森山紀之

篠原出版新社