

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 中 智昭

学位論文題名

胸膜悪性中皮腫の新規分子診断マーカーの探索および評価に関する研究：希少症例の病理組織検体からの探索アプローチ

(Identification of novel diagnostic markers for malignant pleural mesothelioma by gene expression profiling analysis of an unique case)

【背景と目的】悪性胸膜中皮腫 (MPM) は比較的まれな疾患であるが、本疾患による死亡者数は今後増加するものと考えられている。MPM の日常病理診断においては、原発性肺腺癌 (PAC) や他の悪性腫瘍との鑑別に難渋することが少なくない。近年、MPM の鑑別診断マーカーの開発が進み、MPM の診断精度向上には免疫組織化学 (IHC) 的検索が不可欠となっているが、現行の診断マーカーのみでは不十分であり、いまだ改善の余地が残されている。本研究では、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織検体を用いた網羅的遺伝子発現プロファイリング (GEP) 解析に着目した。GEP 解析に基づく MPM と PAC の比較については、これまでほとんど検討されておらず、また、MPM/PAC の同時性重複腫瘍からの解析についての報告は未だない。MPM/PAC の同時性重複腫瘍という希少単一症例の FFPE 組織検体を用いた GEP 解析を行い、今後増加が見込まれる MPM の新規分子診断マーカーを探索し、その診断有用性を明らかにするとともに、希少単一症例の FFPE 組織検体の利用における探索アプローチの可能性と問題点について考察することを、本研究の課題とした。

【対象と方法】アスベスト曝露歴と重喫煙歴を有する 77 歳男性に発生した MPM/PAC 同時性重複腫瘍の FFPE 組織検体を用い、遺伝子コピー数多型 (CNA) 解析、マルチプレックス遺伝子変異解析および GEP 解析を行った。GEP 解析には 3D-Gene human Oligo chip 25k (Toray) を用いた。発現亢進が見られた 9 遺伝子について、特異抗体を用いて、上記症例の FFPE 組織検体に対する IHC 染色を施行した。このうち *PHGDH* と *TRIM29* について上記症例の FFPE 組織検体からの抽出 RNA を用いて、qRT-PCR 解析により mRNA 発現を検討した。また、培養ヒト MPM 細胞株 (MESO-4 および MESO-1) と PAC 細胞株 (A549 および H1299) を用いた *PHGDH* と *TRIM29* の mRNA 発現解析も行った。*PHGDH* と *TRIM29* の IHC 染色による評価には、北海道大学病院ならびに広島大学病院の病理診断部門で 1994 年 1 月から 2010 年 12 月に診断された MPM 48 症例、および PAC 20 症例の計 68 症例の FFPE 組織検体を用い、calretinin も同時に染色し比較した。

【結果】CNA 解析の結果、PAC 領域では多くの染色体でコピー数が増加していたのに対し、MPM 領域においては、8 番染色体におけるコピー数増加が認められるにとどまった。また、MPM 領域では 9p21.2-3 でコピー数減少が見られた。遺伝子変異解析の結果、MPM 領域に

における体細胞遺伝子変異として ATM (G2706A), PAC 領域における体細胞遺伝子変異として ERBB4 (300fs, 301fs) と STK11 (E65G) を認めた. GEP 解析の結果, 949 遺伝子に RNA の発現差が認められた. このうち, 718 の遺伝子は PAC 領域に比較して MPM 領域で発現が亢進し, 残りの 231 遺伝子は発現が減弱していた. 発現亢進が見られた 9 遺伝子について, IHC 染色を施行したところ PHGDH と TRIM29 において, MPM の腫瘍細胞に明瞭な陽性反応が認められた. 今回解析した重複腫瘍, およびヒト MPM 細胞株と PAC 細胞株の qRT-PCR 解析では, MPM は PAC に比較して, PHGDH と TRIM29 共に, 顕著な発現亢進を認めた. MPM および PAC, 計 68 症例を用いた IHC 染色の結果, 上皮型 MPM の大多数は, PHGDH と TRIM29 に陽性を示した. 一方, 肉腫型 MPM や PAC には, PHGDH や TRIM29 の陽性所見はほとんど確認できなかった. PHGDH と TRIM29 は, calretinin と比較して概ね同等の感度 (50%と 46%, 63%), 特異度 (95%と 100%, 100%) を示した. これに加えて, 23 症例の上皮型 MPM のうち, calretinin 陰性であった 3 症例いずれにおいても, 腫瘍細胞が TRIM29 陽性を示す所見が確認できた. 非腫瘍性の肺組織および胸膜組織における PHGDH, TRIM29 と CK5/6 の IHC 染色を確認したところ, 形態学的に正常と思われる気管支の基底細胞と胸膜中皮細胞は, いずれも PHGDH, TRIM29 と CK5/6 に陽性を示した.

【考察】一般的に, GEP 解析において信頼できる結果を得るためには多数の症例を対象とすることが多く, 疾患群と対照群間での集団の均一性について検討が必要となり, その研究を阻む一因となっている. 同一個体の同一臓器に発症した腫瘍が各々典型的な性質を有するものであれば, 両者を比較することによって, 解析群内の個体間のバラツキを考慮することなく, 最小のコホート/サンプルサイズで遺伝子発現の変動について研究することが可能と考えられる. 本研究では, MPM/PAC 同時重複腫瘍から GEP 解析を行い, 新規 MPM マーカー候補分子である PHGDH と TRIM29 を同定した. PHGDH と TRIM29 は IHC 染色において calretinin と同等の感度, 特異度を示し, とくに calretinin 陰性症例の診断に有用性を発揮できる診療上重要なマーカーと思われた. 加えて GEP 解析では MPM の診断マーカーとして報告されている CK5, calretinin, podoplanin, fibulin-3, CD44 をコードする遺伝子も抽出されたことは, 希少単一症例からの探索アプローチの有用性を裏付けるものと考えられた. 本研究においては, 形態学的に正常と考えられる中皮細胞, ならびに気管支基底細胞において, PHGDH と TRIM29 は CK5/6 と同様の染色性を示すことが確認された. 以上より, PHGDH と TRIM29 は CK5/6 との関係性が示唆されたが, 本研究においてはその機序や生物学的意義の解明には至らず, 今後の検討を要する.

【結論】本研究では, 希少単一症例の FFPE 組織検体を用いた GEP 解析を行い, MPM の新規分子診断マーカーである PHGDH と TRIM29 を探索し, その診断有用性を明らかにした. 本研究手法は MPM/PAC 同時性重複腫瘍に限定されずに, 広くその他の腫瘍の診断マーカー探索にも応用可能と考えられる.