

論 文 内 容 要 旨

Identification of DAB2 and Intelectin-1 as Novel Positive Immunohistochemical Markers of Epithelioid Mesothelioma by Transcriptome Microarray Analysis for Its Differentiation From Pulmonary Adenocarcinoma

(網羅的遺伝子発現解析から同定した DAB2 と Intelectin-1 は上皮型悪性中皮腫と肺腺癌の鑑別診断に有用な免疫組織化学的染色の陽性マーカーである)

American Journal of Surgical Pathology,
41(8): 1045-1052, 2017.

主指導教員：末田 泰二郎教授
(医歯薬保健学研究科 外科学)

副指導教員：武島 幸男教授
(医歯薬保健学研究科 病理学)

副指導教員：大毛 宏喜教授
(医歯薬保健学研究科 感染症学)

倉岡 正嗣

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景と目的】

悪性中皮腫は主に胸膜や腹膜の中皮細胞から発生する予後不良の悪性腫瘍であり、その発生にはアスベスト曝露が関連している。悪性中皮腫の組織亜型には上皮型、肉腫型、線維形成型、二相型があり、多彩な組織像を呈することから病理診断に苦慮することが多く、特に胸膜原発の悪性中皮腫では原発性肺癌との鑑別が問題となる。悪性中皮腫の確定診断は臨床情報や画像診断、病理診断により総合的に行われ、病理診断では中皮細胞由来の腫瘍であること（陽性マーカー；Calretinin, D2-40, WT-1, CK5/6 など）と他臓器由来の腫瘍でないこと（陰性マーカー；CEA, TTF-1, NapsinA, p40, MOC-31, Claudin-4 など）を免疫組織化学的に検討することが必須である。しかしながら、悪性中皮腫の陽性マーカーである Calretinin, D2-40 は肺腺癌症例においても陽性を示す場合があることから、既存の陽性マーカーよりも優れた特異度・感度を有する新規陽性マーカーの発見が望まれている。今回の研究の目的は、まず上皮型悪性中皮腫と肺腺癌を対象としてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、発現が異なる遺伝子を同定したのちに、同定された遺伝子産物の抗体を用いて免疫組織化学的検討を行い、その有用性を検討することである。

【対象と方法】

まず、上皮型悪性中皮腫と肺腺癌間で発現に差が認められる遺伝子を同定するためマイクロアレイを用いてmRNAの網羅的発現解析を行った。ホルマリン固定パラフィン包埋組織の上皮型中皮腫6例と肺腺癌6例を用いて、Maxwell RSC RNA FFPE Kit (Promega KK, Tokyo, Japan)を用いてRNAを抽出したのち、44699個のタンパクコード遺伝子と22829個のタンパク非コード遺伝子のプローブを有するHuman Transcriptome 2.0 GeneChip Array (Affymetrix, Santa Clara, CA)を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。発現に差があった遺伝子に関して、Real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(Real-time RT-PCR)とWestern BlottingにてmRNA発現とタンパク発現の確認を行った。最後に、発現に差が認められた遺伝子に対する抗体を用いて、上皮型中皮腫75例と肺腺癌67例について免疫組織化学的検討を行った。

【結果】

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析では、上皮型悪性中皮腫症例で肺腺癌症例よりも遺伝子の発現量が1.3倍以上高い遺伝子を有意に発現の高い遺伝子と評価した。その結果、上皮型悪性中皮腫症例において肺腺癌症例よりも発現量が有意に高い遺伝子としてdisabled homolog 2 (DAB2)とIntelectin-1が同定された。上記の網羅的遺伝子解析で使用した上皮型悪性中皮腫6例と肺腺癌6例で行ったReal-time RT-PCRにおいても上皮型悪性中皮腫の方が肺腺癌よりも有意にDAB2, Intelectin-1のmRNA発現が高かった。また、celllysis protein extraction reagent (Cell-LyEX1 kit, TOYOB-Net, Tokyo, Japan)を用いて抽出したタンパクで行ったWestern Blottingでは5種類の中皮腫株(ACC-MESO-1, CRL-5915, ACC-MESO-4, CRL-5946,

HMMME)すべてにおいて抗DAB2抗体, 抗Intelectin-1抗体にて予想される位置に単一のバンドが確認された。

次に上皮型中皮腫75例と肺腺癌67例を用いて、抗DAB2抗体 (rabbit polyclonal, catalog #HPA028888, 1:200; Sigma-Aldrich)と抗Intelectin-1抗体(mouse monoclonal, 3G9, 1:1000; Immuno-Biological Laboratories), calretinin (rabbit monoclonal, SP65, prediluted; Roche Diagnostics), podoplanin (mouse monoclonal, D2-40, Prediluted; Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan), Wilms' tumor gene product (WT1) (mouse monoclonal, 6F-H12, 1:25; Dako, Glostrup, Denmark)による免疫組織化学的検討を行った。自動免疫染色装置はVentana ultraView Universal DAB Detection Kitを使用した。スコアリングは陽性を示す腫瘍細胞の数に応じて、0(0%:陰性)、1+(<10%)、2+(10%~50%)、3+(>50%)として評価した。Calretininは上皮型中皮腫75例中74例(98.7%)陽性、肺腺癌67例中17例(25.4%)陽性、Podoplanin(D2-40)は上皮型中皮腫75例中71例(94.7%)陽性、肺腺癌67例中7例(10.4%)陽性、WT1は上皮型中皮腫75例中62例(82.7%)陽性、肺腺癌67例中0例(0%)陽性であった。DAB2は上皮型中皮腫75例中60例(80%)陽性、肺腺癌67例中2例(3%)陽性であり、Intelectin-1は上皮型中皮腫75例中57例(76%)陽性、肺腺癌67例中0例(0%)陽性であった。肺腺癌のDAB2陽性例は2症例ともにごく一部に陽性を示すScore:1+であり、Calretinin, Podoplanin(D2-40)に見られるScore:2+の症例は認められなかった。感度と特異度はDAB2が80%と97%、Intelectin-1が76%と100%であった。

【結論】上皮型悪性中皮腫と肺腺癌においてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により検出されたDAB2とIntelectin-1は上皮型悪性中皮腫と肺腺癌の鑑別診断に有用な免疫組織化学染色における新規の陽性マーカーであることが示された。