

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	倉岡 正嗣
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査教授	有廣 光司	印	
審査委員教授	岡田 守人		
審査委員教授	服部 登		
〔論文審査の結果の要旨〕			
【背景と目的】			
<p>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。</p>			
【対象と方法】			
<p>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</p>			

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。

以上の結果から、本論文は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が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を明らかとした。

よって審査委員会委員全員は、本論文が 倉岡正嗣 に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	倉岡 正嗣
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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）			
最終試験担当者			
主査教授	有廣 光司	印	
審査委員教授	岡田 守人		
審査委員教授	服部 登		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年2月1日の第73回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年2月6日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
1 中皮腫陽性マーカーとしての DAB2 と Intelectin-1 の新規性 2 DAB2 と Intelectin-1 の使用方法（実際の病理診断への応用方法） 3 DAB2 と Intelectin-1 の機能について 4 免疫組織化学的検討の際の染色スコアリングの意義について 5 新規陽性マーカーの免疫組織化学的染色の至適反応条件の設定法について			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			