

REVIEW ARTICLE

早期悪性胸膜中皮腫
—病理診断の問題点と対策—

辻村 亨¹・佐藤鮎子¹・鳥井郁子¹・玉置知子²・吉川良恵³・
福岡和也³・田中文啓⁴・長谷川誠紀⁴・中野孝司³

Issues and Their Resolution in the Pathological Diagnosis
of Malignant Pleural Mesothelioma in the Early Stage

Tohru Tsujimura¹; Ayuko Sato¹; Ikuko Torii¹; Tomoko Hashimoto-Tamaoki²; Yoshie Yoshikawa³;
Kazuya Fukuoka³; Fumihiko Tanaka⁴; Seiki Hasegawa⁴; Takashi Nakano³

¹Division of Molecular Pathology, Department of Pathology, ²Department of Genetics, ³Division of Respiratory Medicine,
Department of Internal Medicine, ⁴Department of Thoracic Surgery, Hyogo College of Medicine, Japan.

ABSTRACT — **Objectives.** Differential diagnosis of pleural mesothelioma in the early stage and reactive mesothelial hyperplasia is important to determine therapeutic strategy, but the morphological discrimination between them is very difficult. It has been reported that the p16^{INK4A} and NF2 genes are frequently deleted in malignant pleural mesothelioma in the advanced stage. In this study, we examined whether these gene abnormalities are useful to discriminate between pleural mesothelioma in the early stage and reactive mesothelial hyperplasia. **Method.** Cases of malignant pleural mesothelioma in the advanced stage (16), pleural mesothelioma in the early stage (2), and reactive mesothelial hyperplasia (3) were selected based on morphological and immunohistochemical examinations and their tissues were analyzed for the p16^{INK4A} and NF2 genes by real-time PCR. **Results.** The p16^{INK4A} gene was deleted in all cases (16/16) and the NF2 gene was deleted in most cases (15/16) of advanced stage malignant pleural mesothelioma, whereas all cases (3/3) of reactive mesothelial hyperplasia retained these genes. As for early stage pleural mesothelioma, the p16^{INK4A} gene was deleted in both cases (2/2), one of which (1/2) showed the deletion of the NF2 gene. **Conclusion.** The gene diagnosis of p16^{INK4A} and NF2 locus may be useful for the discrimination of early stage pleural mesothelioma and reactive mesothelial hyperplasia.

(JLCC. 2009;49:376-379)

KEY WORDS — Malignant pleural mesothelioma, Reactive mesothelial hyperplasia, p16^{INK4A} gene, NF2 gene, Gene deletion

要旨 — **目的.** 早期中皮腫病変 (EM) と反応性中皮過形成 (RM) との鑑別は治療方針を決定する上で極めて重要であるが、これらの病変を形態的に鑑別することは難しい。我々は悪性胸膜中皮腫 (MPM) では p16^{INK4A} 遺伝子や NF2 遺伝子が高頻度に欠失することに着目し、これらの遺伝子異常が EM と RM の鑑別に有用であるのかどうかを検討した。 **方法.** 形態的特徴に免疫組織化学染色を加えて評価し、MPM (16 例)、RM (3 例)、EM (2 例) を選別した。これらの症例について p16^{INK4A} 遺伝子と NF2 遺伝子の欠失領域のプライマーを作製し、ゲ

ノム DNA を鋳型にしたリアルタイム PCR により遺伝子欠失の有無を検討した。 **結果.** 全ての RM 症例で p16^{INK4A} 遺伝子と NF2 遺伝子はともに保存されていたのに対して、MPM の全ての症例で p16^{INK4A} 遺伝子が欠失するとともに NF2 遺伝子も高頻度に欠失していた。また、EM の 2 症例で p16^{INK4A} 遺伝子の欠失がみられ、その内の 1 例は NF2 遺伝子も欠失していた。 **結論.** p16^{INK4A} と NF2 の遺伝子診断は、EM と RM の鑑別に極めて有用であると考えられる。

索引用語 — 悪性胸膜中皮腫, 反応性中皮過形成,

兵庫医科大学¹病理学 (分子病理部門), ²遺伝学, ³内科学 (呼吸器・RCU 科), ⁴呼吸器外科.

※第 48 回日本肺癌学会総会シンポジウム「悪性中皮腫の克服に向けて」.

p16^{INK4A} 遺伝子, NF2 遺伝子, 遺伝子欠失

はじめに

悪性胸膜中皮腫 (malignant pleural mesothelioma, 以下 MPM) は, 壁側胸膜から発生し, 呼吸困難などの自覚症状と原因不明の胸水貯留で発見されることが多い.¹ 腫瘍細胞が胸膜に浅く広がっていく段階では, リンパ節転移や遠隔転移をきたしておらず, 外科治療 (胸膜肺全摘術, extrapleural pneumonectomy, 以下 EPP) により根治が期待されるが, そのような初期病変の診断の困難さと腫瘍の進行の早さのために, 確定診断時には腫瘍細胞が胸壁や横隔膜に既に深く浸潤して, 根治手術の時期を逸してしまう症例が少なくない. また, EPP では, 胸膜剥離面から腫瘍細胞が露出・播種することを防ぐために胸膜と肺を一塊として摘出する必要がある, 術中に胸腔を開窓して迅速診断を行うことは一般的に禁忌である. 従って, 術前に早期病変を見出すことが胸膜中皮腫の治療戦略の鍵を握り, 予後を決める重要な因子になる. 一方, MPM の病理診断において, 反応性中皮細胞の過形成と MPM の早期病変との鑑別は極めて難しい. 炎症に反応した中皮細胞が, 異型を呈しながら単細胞や小集塊として滲出物の器質化組織の中に取り込まれることがあ

り, このような所見が真の中皮腫細胞の浸潤であるのか否かの判断を難しくしている. このため, MPM の病理診断では, 壁側胸膜の生検組織において, 腫瘍細胞が線維性に肥厚した胸膜深部あるいは胸壁の脂肪組織などへの浸潤を重要な指標にしている.² しかし, この指標を取り入れて病理診断を行うと, MPM と確定診断された時点では, 腫瘍細胞が胸壁や横隔膜に既に深く浸潤して, 大部分の症例が根治手術の時期を逸してしまうことになる.

このような背景から, 我々は MPM から樹立された培養細胞株^{3,4} や MPM 症例⁵⁻⁹ で癌抑制遺伝子である p16^{INK4A} 遺伝子や NF2 遺伝子が高頻度に欠失すること (Figure 1) に着目し, これらの遺伝子異常が反応性中皮過形成と早期中皮腫病変の鑑別に有用であるのかどうかを検討した.

方法

当施設で経験した胸膜病変の 21 症例について, ビデオ補助胸腔鏡下生検の組織診断と胸水細胞診の形態的特徴に, 中皮腫マーカー (calretinin, D2-40, WT1), 肺腺癌マーカー (TTF-1, napsin A, CEA), 良悪性補助診断マ

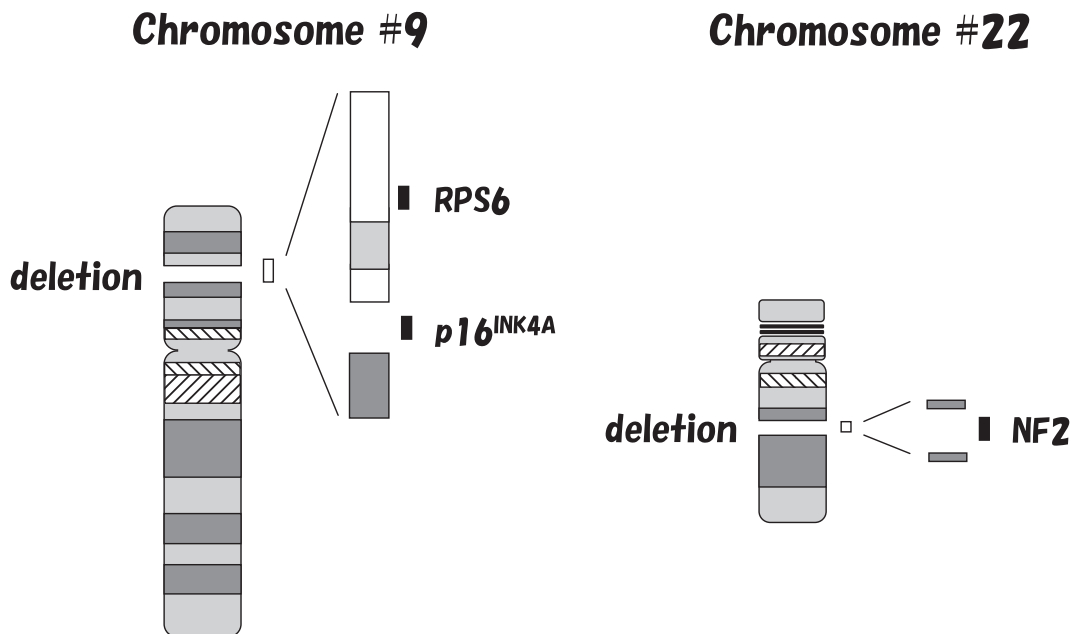


Figure 1. The deletion of p16^{INK4A} and NF2 genes in MPM. Both p16^{INK4A} and RPS6 genes are located on chromosome 9, and the NF2 gene on chromosome 22. The RPS6 gene was used as a control for real-time PCR analysis.

Table 1. Primers Used in This Study

Gene	Forward-primer	Reverse-primer	Product (bp)
p16 ^{INK4A}	5'-cgggcgactctggaggacgaagtt	5'-agatctgtacgcgcgtggctcctc	188
NF2	5'-acctcttgatttggtgtgccgga	5'-gtccatttgagccaggccactg	101
RPS6	5'-ggtttcccatgaagcagggtgtc	5'-gagaacgctcagatttgcattccac	150

Table 2. Genomic Copy Number of p16^{INK4A} and NF2 Genes

Case	Genes				
	RPS6	p16 ^{INK4A}		NF2	
RM1	1.00	1.00	(NC)	0.99	(NC)
RM2	1.00	0.74	(NC?)	1.36	(NC)
RM3	1.00	1.24	(NC)	0.84	(NC)
MPM1	1.00	0.01	(HD)	0.53	(D)
MPM2	1.00	0.04	(HD)	0.96	(NC)
MPM3	1.00	0.04	(HD)	0.39	(D)
MPM4	1.00	0.03	(HD)	0.53	(D)
MPM5	1.00	0.03	(HD)	0.00	(HD)
MPM6	1.00	0.03	(HD)	0.52	(D)
MPM7	1.00	0.00	(HD)	0.00	(HD)
MPM8	1.00	0.00	(HD)	0.57	(D)
MPM9	1.00	0.00	(HD)	0.22	(D)
MPM10	1.00	0.00	(HD)	0.35	(D)
MPM11	1.00	0.00	(HD)	0.59	(D)
MPM12	1.00	0.00	(HD)	0.69	(D?)
MPM13	1.00	0.24	(HD)	0.59	(D)
MPM14	1.00	0.15	(HD)	0.65	(D)
MPM15	1.00	0.47	(HD)	0.62	(D?)
MPM16	1.00	0.15	(HD)	0.73	(D?)
EM1	1.00	0.18	(HD)	0.44	(HD?)
EM2	1.00	0.42	(HD)	1.19	(NC)

RM, reactive mesothelial hyperplasia; MPM, malignant pleural mesothelioma in the advanced stage; EM, mesothelioma in the early stage; NC, not change; NC?, suspicious for not change; HD, homologous deletion; HD?, suspicious for homologous deletion; D, heterologous deletion; and D?, suspicious for heterologous deletion.

カー (EMA, p53) を用いた免疫組織化学染色を加えて評価し, MPM (16 例), 反応性中皮過形成 (3 例), 早期中皮腫病変 (2 例) を選別した. MPM は明らかな異型中皮腫細胞の胸壁脂肪組織への浸潤を認めた症例とし, 胸膜炎に伴う中皮細胞の増生を反応性中皮過形成とした. 胸壁脂肪組織への浸潤は確認できないものの異型中皮細胞が胸膜表層で増殖し間質へ微小浸潤を認めた 1 例と, 胸壁脂肪組織への浸潤は確認できないものの細胞診で多核細胞や細胞集塊の出現を認めた 1 例を早期中皮腫病変とした.¹⁰⁻¹²

これらの症例の組織から, マイクロダイセクションを

用いて中皮腫細胞や中皮細胞を採取してゲノム DNA を抽出した. また, 胸水中の中皮腫細胞や中皮細胞を単離してゲノム DNA を抽出した. p16^{INK4A} 遺伝子と NF2 遺伝子の欠失領域のプライマーを作製し (Table 1), ゲノム DNA を鋳型にしたリアルタイム PCR 法を施行して遺伝子欠失の有無を調べた. 各領域のゲノム DNA のコピー数は, RPS6 遺伝子の増幅度を基準にして算出した (Table 2). 理論的には, 算出値が 1.0 であれば遺伝子は保存されており, 0.5 であればヘテロ欠失, 0.0 であればホモ欠失と考えられる.

結果

反応性中皮過形成の 3 症例において, p16^{INK4A} 遺伝子のコピー数は 0.74~1.24, NF2 遺伝子のコピー数は 0.84~1.36 と算出され, それぞれの遺伝子のコピー数は保存されていると考えられた. 一方, MPM の 16 症例では, p16^{INK4A} 遺伝子のコピー数は 0.00~0.47 と算出され, 全ての症例で p16^{INK4A} 遺伝子はホモ欠失すると考えられた. また, NF2 遺伝子のコピー数は 0.96 と算出された 1 症例を除く 15 症例において 0.00~0.73 と算出され, NF2 遺伝子に欠失の存在が示唆された. 早期中皮腫病変の 2 症例では, p16^{INK4A} 遺伝子のコピー数は 0.18 および 0.42 と算出され, 2 症例ともに p16^{INK4A} 遺伝子はホモ欠失すると考えられた. その内の 1 例は, NF2 遺伝子のコピー数は 0.44 と算出され, ホモ欠失の存在が示唆された (Table 2).

考察

p16^{INK4A} 遺伝子と NF2 遺伝子は, 反応性中皮過形成において保存されているのに対して, 明らかな胸壁脂肪組織への浸潤を認めた MPM に加えて, 早期中皮腫と考えられるような病変においても高頻度に欠失していた. p16^{INK4A} 遺伝子と NF2 遺伝子に欠失が存在するか否かを検討することは, 早期中皮腫病変と反応性中皮過形成の鑑別に極めて有用であると考えられる. 特に, p16^{INK4A} 遺伝子のホモ欠失は, 胸壁脂肪組織への浸潤を認めた MPM と早期中皮腫病変の全例に検出され, 中皮細胞の悪性化に対する診断的意義を有すると思われる. また, MPM が多段階発癌すると仮定すると, 早期中皮腫病変に p16^{INK4A} 遺伝子のホモ欠失が見出されたことか

ら、このような欠失は発癌過程の初期に起こっている可能性が高い。早期中皮腫病変が疑われた場合、p16^{INK4A}とNF2の遺伝子診断を積極的に取り入れることで、早期中皮腫病変の診断精度が向上すると期待される。

p16^{INK4A} 遺伝子により作られる蛋白質は、細胞の癌化に深く関与するサイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase : CDK)4 の生理的阻害酵素であり、p16 蛋白質を発現しない細胞では CDK4 が活性化して細胞周期が刺激される。p16^{INK4A} 遺伝子を欠失して活発に増殖する細胞に p16^{INK4A} 遺伝子を導入して正常な p16 蛋白質を発現させると、その増殖が抑制されることが報告されている。¹³⁻¹⁵ 従って、p16 蛋白質と同じ作用を持つ CDK4 キナーゼ阻害剤を開発すれば、p16^{INK4A} 遺伝子を欠失した MPM の画期的な治療になりうる可能性がある。p16 蛋白質を標的にした治療の開発は、今後の重要な課題である。

結 語

早期悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別に、p16^{INK4A} と NF2 の遺伝子診断を導入することにより、早期悪性胸膜中皮腫の診断精度が向上すると期待される。

REFERENCES

1. 中野孝司. 胸膜中皮腫. 坪田紀明, 中野孝司, 編集. 呼吸器腫瘍学ハンドブック. 東京: 医事出版社: 2002:203-206.
2. Churg A, Colby TV, Cagle P, Corson J, Gibbs AR, Gilks B, et al. The separation of benign and malignant mesothelial proliferations. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:1183-1200.
3. Usami N, Fukui T, Kondo M, Taniguchi T, Yokoyama T, Mori S, et al. Establishment and characterization of four malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. *Cancer Sci*. 2006;97:387-394.
4. Taniguchi T, Karnan S, Fukui T, Yokoyama T, Tagawa H, Yokoi K, et al. Genomic profiling of malignant pleural mesothelioma with array-based comparative genomic hybridization shows frequent non-random chromosomal alteration regions including JUN amplification on 1p32. *Cancer Sci*. 2007;98:438-446.
5. Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee WC, Altomare DA, et al. p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res*. 1994;54:5547-5551.
6. Xio S, Li D, Vijg J, Sugarbaker DJ, Corson JM, Fletcher JA. Codeletion of p15 and p16 in primary malignant mesothelioma. *Oncogene*. 1995;11:511-515.
7. Ladanyi M. Implications of P16/CDKN2A deletion in pleural mesotheliomas. *Lung Cancer*. 2005;49(Suppl 1):S95-S98.
8. Bianchi AB, Mitsunaga SI, Cheng JQ, Klein WM, Jhanwar SC, Seizinger B, et al. High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10854-10858.
9. Pylkkänen L, Sainio M, Ollikainen T, Mattson K, Nordling S, Carpén O, et al. Concurrent LOH at multiple loci in human malignant mesothelioma with preferential loss of NF2 gene region. *Oncol Rep*. 2002;9:955-959.
10. Whitaker D, Henderson DW, Shilkin KB. The concept of mesothelioma in situ: implications for diagnosis and histogenesis. *Semin Diagn Pathol*. 1992;9:151-161.
11. Henderson DW, Shilkin KB, Whitaker D. Reactive mesothelial hyperplasia vs mesothelioma, including mesothelioma in situ: a brief review. *Am J Clin Pathol*. 1998;110:397-404.
12. Cagle PT, Churg A. Differential diagnosis of benign and malignant mesothelial proliferations on pleural biopsies. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129:1421-1427.
13. Yang CT, You L, Lin YC, Lin CL, McCormick F, Jablons DM. A comparison analysis of anti-tumor efficacy of adenoviral gene replacement therapy (p14ARF and p16^{INK4A}) in human mesothelioma cells. *Anticancer Res*. 2003;23:33-38.
14. Frizelle SP, Rubins JB, Zhou JX, Curiel DT, Kratzke RA. Gene therapy of established mesothelioma xenografts with recombinant p16^{INK4a} adenovirus. *Cancer Gene Ther*. 2000;7:1421-1425.
15. Piperno-Neumann S, Oudar O, Reynier P, Briane D, Cao A, Jaurand MC, et al. Transfer into a mesothelioma cell line of tumor suppressor gene p16 by cholesterol-based cationic lipids. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1611:131-139.