

REVIEW ARTICLE

悪性胸膜中皮腫の早期発見への糸口
—中皮腫の細胞学的特徴を分子レベルで考える—

辻村 亨¹・佐藤鮎子¹・鳥井郁子¹・
亀井敏昭²・長谷川誠紀³・中野孝司⁴

Clues to the Early Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma
—Evaluation of Cytological Features at the Molecular Level—

Tohru Tsujimura¹; Ayuko Satou¹; Ikuko Torii¹;
Toshiaki Kamei²; Seiki Hasegawa³; Takashi Nakano⁴

¹Division of Molecular Pathology, Department of Pathology, Hyogo College of Medicine, Japan; ²Division of Pathology, Yamaguchi Grand Medical Center, Japan; ³Department of Thoracic Surgery, ⁴Division of Respiratory Medicine, Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine, Japan.

ABSTRACT — **Objective.** Cytological features of malignant pleural mesothelioma (MPM) in the pleural effusion cytology are cyanophilic thick cytoplasm, cell-in-cell engulfment, and multinucleated cells. There is a possibility that intermediate filaments are involved in the formation of cyanophilic thick cytoplasm, and cell adhesion molecules, which trigger cell fusion, play an important role in the formation of cell-in-cell engulfment and multinucleated cells. We examined the expression of intermediate filaments and cell adhesion molecules in MPM and reactive mesothelium (RM). **Methods.** The gene expression profiling of MPM and RM was analyzed by Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array. The expression of intermediate filaments in MPM was compared with that in RM. In addition, immunocytochemistry of CD146 was performed on cytological specimens of MPM and RM using 2 clones of CD146 antibody. **Results.** Various intermediate filaments were expressed in MPM at higher levels than those in RM. MPM were positive for CD146 by either clone, whereas RM were negative for both clones. **Conclusion.** The high expression of intermediate filaments in MPM may play a role in the formation of cyanophilic thick cytoplasm. CD146 and other cell adhesion molecules may participate in the formation of cell-in-cell engulfment and multinucleated cells.

(JLJC. 2012;52:196-200)

KEY WORDS — Malignant pleural mesothelioma, Reactive mesothelium, CD146, Cell adhesion molecule, Intermediate filament

Reprints: Tohru Tsujimura, Division of Molecular Pathology, Department of Pathology, Hyogo College of Medicine, 1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8501, Japan (e-mail: tohru@hyo-med.ac.jp).

要旨 — **目的.** 悪性胸膜中皮腫 (MPM) の胸水細胞診では、細胞質に重厚感がみられ、細胞封入像や多核細胞が高頻度に出現する。細胞質の重厚感には中間径フィラメントが関与し、細胞封入や多核細胞の形成には細胞融合を促す細胞接着分子が重要な役割を果たしている可能性がある。そこで、我々は、MPM と反応性中皮 (RM) における中間径フィラメント及び細胞接着分子の発現を比較した。**方法.** MPM と RM の遺伝子発現プロファイル

を Affymetrix Array により取得し、中間径フィラメントの発現を検討した。MPM と RM の細胞診標本を作製して、細胞接着分子 CD146 に対する抗体 (2 種類のクローン) を用いて免疫染色を行った。**結果.** MPM では、RM に比較して、種々の中間径フィラメントが強く発現していた。CD146 免疫染色では、MPM はどちらかのクローンに対して陽性を示したのに対して、RM はいずれのクローンに対しても陰性であった。**結論.** MPM にお

¹兵庫医科大学病理学 (分子病理); ²山口県立総合医療センター病理科; 兵庫医科大学 ³呼吸器外科学, ⁴内科学 (呼吸器・RCU 科).
別刷請求先: 辻村 亨, 兵庫医科大学病理学 (分子病理), 〒663-

8501 兵庫県西宮市武庫川町 1-1 (e-mail: tohru@hyo-med.ac.jp).

※第 51 回日本肺癌学会総会イブニングシンポジウム「中皮腫診断と細胞診」.

ける中間径フィラメントの高発現が、細胞質の重厚感を生み出していると考えられた。CD146などの細胞接着分子の高発現が、細胞封入や多核細胞の形成に関与してい

ることが示唆された。

索引用語——悪性胸膜中皮腫、反応性中皮、CD146、細胞接着分子、中間径フィラメント

はじめに

悪性胸膜中皮腫 (malignant pleural mesothelioma, 以下 MPM) は胸水貯留で発症することが多く、胸水検査が診断の第一歩になる。MPM では初期病変から胸水中に MPM 細胞が遊離して胸水細胞診が陽性になることが多く、胸水細胞診は MPM の早期診断に重要な役割を担っている。MPM の胸水細胞診では、細胞質の重厚感や細胞封入像が特徴的で、2核以上の多核細胞も高頻度に出現する。¹ このような細胞学的特徴は、癌細胞で集積された悪性細胞としての特徴 (核の大型化や核形の不整) とは大きく異なっている。

中間径フィラメントは、細胞骨格を構成する線維であり、Type I: 酸性ケラチン, Type II: 塩基性ケラチン, Type III: ビメンチン, デスミン, グリア線維性酸性蛋白質, ペリフェリン, Type IV: ニューロフィラメント, インターネキシン, シネミン, シンコイリン, Type V: ラミン, Type VI: ネスチンに分類される。² MPM 細胞は

ケラチンばかりでなくビメンチンも発現し、癌細胞よりも中間径フィラメントが発達していることから、MPM 細胞の細胞質が重厚感を来す機序に、中間径フィラメントの関与が考えられる。また、MPM では2核細胞や多核細胞に加えて細胞封入像を高頻度に認めることから、多核細胞の形成には細胞分離不全よりも細胞融合が深く関与すると考えられ、細胞融合は細胞接着を第一歩として始まることを考え合わせると、多核細胞の形成には細胞接着分子が重要な役割を果たしている可能性がある。そこで、我々は、MPM と反応性中皮 (reactive mesothelium, 以下 RM) における中間径フィラメント及び細胞接着分子の発現を比較し、MPM の細胞学的特徴を分子レベルで検討した。

方法

1) 遺伝子発現プロファイル

MPM (16例) と RM (2例) を対象とした。生検された腫瘍組織及び体腔液に含まれる細胞を短期培養するこ

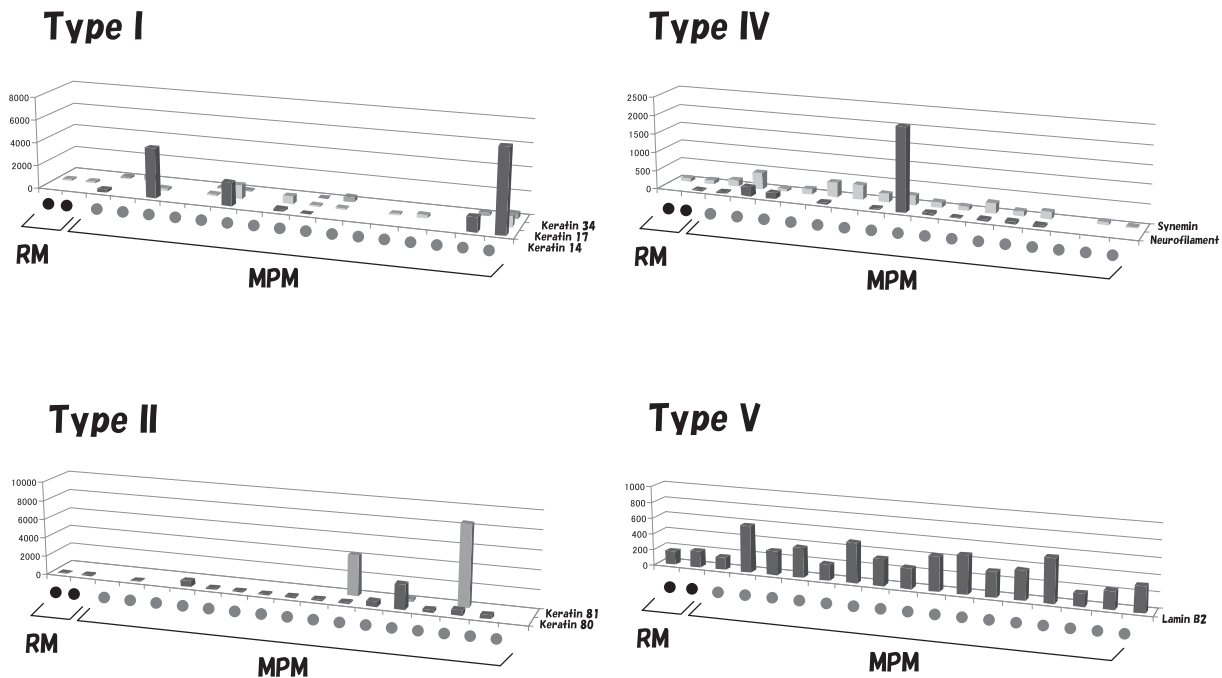


Figure 1. Expression of intermediate filaments in MPM. Various intermediate filaments, such as keratin 14, keratin 80, synemin, and lamin B2, are up-regulated in MPM, as compared with RM, at the mRNA level. A closed circle indicates each RM case, and a hatched circle each MPM case.

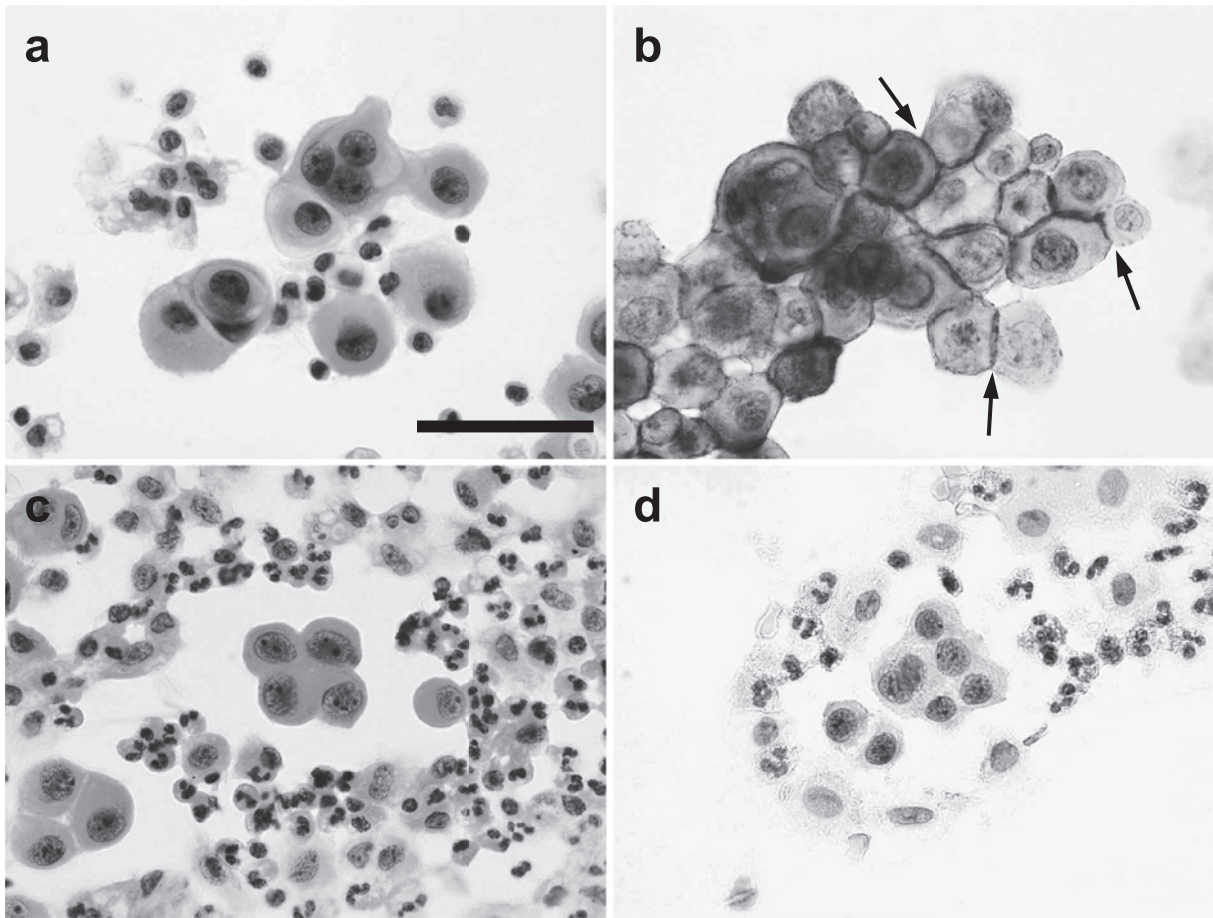


Figure 2. Expression of CD146 detected by clone OJ79 in MPM, but not in RM. **a, b:** MPM. **c, d:** RM. **a, c:** Papanicolaou stain. **b, d:** immunostaining with OJ79. MPM showed membranous immunostaining with strong signals at the apposing surfaces of cell-cell interactions (arrows) (**b**), but RM showed no or faint expression of CD146 (**d**). Scale bar indicates 50 μ m (Modification from Reference 5).

とにより MPM 細胞あるいは RM 細胞を単離した。これらの細胞から mRNA を抽出し、その遺伝子発現プロファイルを Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array により取得した。このプロファイルをもとに、MPM に発現する中間径フィラメントを検討した。

2) CD146 免疫染色

MPM (23 例) と RM (28 例) を対象とした。これらの細胞診標本 (47 例: 塗抹標本, 4 例: 細胞転写標本) を作製して、細胞接着分子 CD146 に対する 2 種類の抗体 (抗 CD146 マウスモノクローナル抗体, Invitrogen 社, クローン OJ79 と抗 CD146 ウサギモノクローナル抗体, Epitomics 社, クローン EPR3208) を用いて免疫染色を行った。抗 CD146 抗体 (クローン EPR3208) を使用する場合は、抗原賦活用緩衝液 (DAKO 社, S1700) に浸漬し、温浴槽を用いて 98°C で 20 分間の前処理を行った。検出には ChemMate ENVISION キット / HRP (DAB) (DAKO 社, K5007) を用いた。

免疫染色強度を、4 段階 (陰性 = 0, 弱陽性 = 1, 中等度陽性 = 2, 強陽性 = 3) で半定量的に評価・スコア化し、Mann-Whitney U 検定により統計学的に解析した。

結 果

1) 中間径フィラメントの発現

MPM (16 例) と RM (2 例) の遺伝子発現プロファイルを比較すると、MPM において種々の中間径フィラメントの mRNA 発現が亢進していた (Figure 1)。

2) CD146 の発現

抗 CD146 抗体 (クローン OJ79) による免疫染色では、MPM の 94% (15/16) に CD146 の発現を認めた。CD146 の発現は、MPM の細胞膜に認め、特に細胞同士が相接する細胞接着部位において強かった。一方、RM の全例 (11/11) に CD146 の発現はみられなかった (Figure 2)。また、抗 CD146 抗体 (クローン EPR3208) による免疫染色においても、MPM の 90% (19/21) に CD146 の発現を認め、

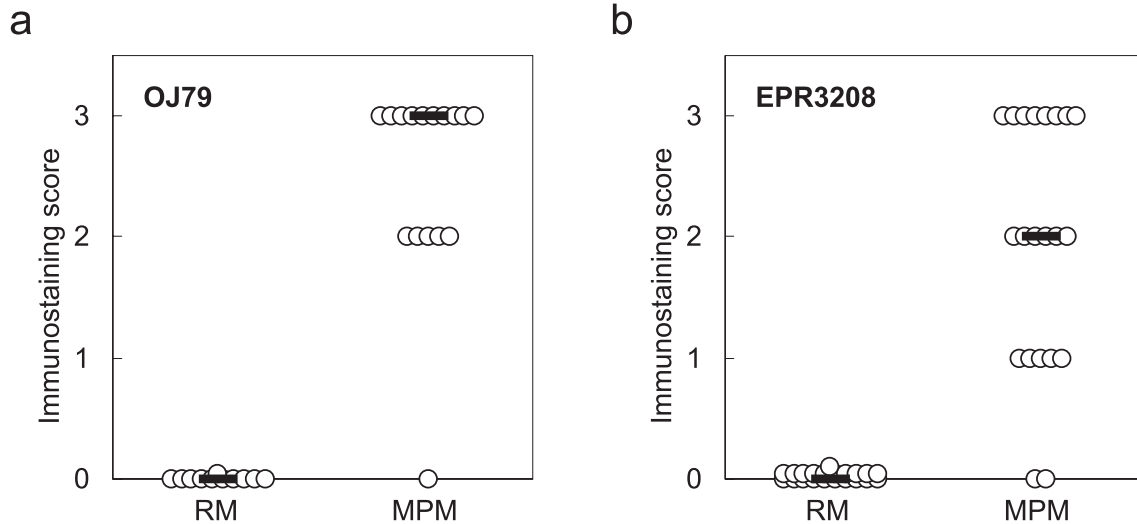


Figure 3. Distributions of CD146 immunostaining score. **a:** score of OJ79. **b:** score of EPR3208. Circles represent immunostaining scores and the horizontal bars indicate the median value. CD146 expression detected by both clones, OJ79 and EPR3208, in MPM was significantly higher than that in RM ($p < 0.001$) (Modification from Reference 5).

RMの全例(21/21)にCD146の発現はみられなかった。さらに、MPMの免疫染色スコアは、RMの免疫染色スコアと比較して、有意に高かった(Figure 3)。

考 察

胸水細胞診では、MPM細胞は、孤立散在性のものからマリモ状、乳頭状、球状などの細胞集塊を形成して出現するものがみられ、出現様式は多彩である。大きな細胞集塊が出現することはMPMの胸水細胞診における特徴の1つであるが、MPMの細胞学的特徴は、孤立散在性細胞や小さな細胞集塊にみられることが多い。MPM細胞の細胞質は、比較的豊富でライトグリーン好性を示し、核の周囲から辺縁部にかけて重厚感が増し、同心円状に層が形成されたように観察される。MPMにおいて、種々の中間径フィラメントのmRNA発現がRMよりも亢進していたことは、核を囲むように籠状に発達した中間径フィラメントが細胞質に重厚感をもたらす成因の1つであることを支持する。電子顕微鏡の観察によれば、MPM細胞の細胞質内に豊富な中間径フィラメントが認められている。^{3,4}

RMでは細胞接着分子CD146の発現が認められないのに対して、多くのMPMにはCD146の発現が確認された。体腔液細胞診におけるCD146免疫染色では、MPMに対して感度90%以上、特異度100%を示し、CD146はMPMとRMとの鑑別に極めて有用なマーカーになると考えられる。^{5,6} 従来、MPMとRMとの鑑別には、epithelial membrane antigen,⁷ デスミン,⁸ glucose

transporter-19などが用いられてきたが、CD146を加えることで、MPMの診断精度は向上すると期待される。最近、MPMにはCD146と相同性がある細胞接着分子CD166(activated leukocyte cell adhesion molecule)が発現することが報告された。¹⁰ また、MPMの腫瘍マーカーとして注目されているメソテリンも細胞接着分子として機能する。¹¹ CD146の発現がMPM細胞の接着部位に強くみられることから、中皮細胞の腫瘍化に伴って細胞膜に発現するようになったCD146などの細胞接着分子が、細胞融合の引き金となり、細胞封入や多核細胞などのMPMに特徴的な細胞所見を生み出している可能性がある。

結 語

MPMの細胞学的特徴を分子レベルで検討した。MPMに特徴的な細胞形態の変化をもたらす分子異常が明らかになれば、その分子をマーカーに用いた補助診断を導入することにより、MPMの診断精度が向上すると期待される。

本論文内容に関連する著者の利益相反：中野孝司〔企業の職員・法人の代表〕特定非営利活動法人日本中皮腫研究機構

REFERENCES

1. 亀井敏昭, 岡村 宏, 洪田秀美. 中皮腫の細胞診断(1)細胞学的特徴と免疫組織化学. 亀井敏昭, 石川雄一, 三浦溥太郎, 井内康輝, 森永謙二, 編集. アスベストと中皮腫.

- 東京：篠原出版新社；2007:256-266.
2. Prasad S, Soldatenkov VA, Srinivasarao G, Dritschilo A. Intermediate filament proteins during carcinogenesis and apoptosis (Review). *Int J Oncol*. 1999;14:563-570.
 3. Sakuma N, Kamei T, Ishihara T. Ultrastructure of pleural mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma in malignant effusions as compared with reactive mesothelial cells. *Acta Cytol*. 1999;43:777-785.
 4. Dardick I, Jabi M, McCaughey WT, Deodhare S, van Nostrand AW, Srigley JR. Diffuse epithelial mesothelioma: a review of the ultrastructural spectrum. *Ultrastruct Pathol*. 1987;11:503-533.
 5. Sato A, Torii I, Okamura Y, Yamamoto T, Nishigami T, Kataoka TR, et al. Immunocytochemistry of CD146 is useful to discriminate between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium. *Mod Pathol*. 2010;23:1458-1466.
 6. Sato A, Torii I, Tao LH, Song M, Kondo N, Yoshikawa Y, et al. Establishment of a cell line from a Japanese patient useful for generating an in vivo model of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci*. 2011;102:648-655.
 7. Wolanski KD, Whitaker D, Shilkin KB, Henderson DW. The use of epithelial membrane antigen and silver-stained nucleolar organizer regions testing in the differential diagnosis of mesothelioma from benign reactive mesothelioses. *Cancer*. 1998;82:583-590.
 8. Hurlimann J. Desmin and neural marker expression in mesothelial cells and mesotheliomas. *Hum Pathol*. 1994;25:753-757.
 9. Kato Y, Tsuta K, Seki K, Maeshima AM, Watanabe S, Suzuki K, et al. Immunohistochemical detection of GLUT-1 can discriminate between reactive mesothelium and malignant mesothelioma. *Mod Pathol*. 2007;20:215-220.
 10. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule is involved in motility and invasion of malignant pleural mesothelioma. In: *The 10th international conference of the International Mesothelioma Interest Group*. Kyoto: 2010.
 11. Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:136-140.