

原 著

## 胸膜中皮腫における免疫組織化学的検討

<sup>1</sup>東京女子医科大学医学部病理学（第一）<sup>2</sup>東京女子医科大学病理診断科ヒロイ アツコ ヤマモト トモコ シバタ ノリユキ カトウヨウイチロウ  
廣井 敦子<sup>1,2</sup>・山本 智子<sup>1,2</sup>・柴田 亮行<sup>1,2</sup>・加藤陽一郎<sup>1</sup>  
ニシカワ トシオ サワダ タツオ コバヤシ マキオ  
西川 俊郎<sup>2</sup>・澤田 達男<sup>1,2</sup>・小林 槇雄<sup>1,2</sup>

（受理 平成22年12月3日）

## Immunohistochemical Analysis of Malignant Mesothelioma

Atsuko HIROI<sup>1,2</sup>, Tomoko YAMAMOTO<sup>1,2</sup>, Noriyuki SHIBATA<sup>1,2</sup>, Yoichiro KATO<sup>1</sup>,  
Toshio NISHIKAWA<sup>2</sup>, Tatsuo SAWADA<sup>1,2</sup> and Makio KOBAYASHI<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine<sup>2</sup>Department of Surgical Pathology, Tokyo Women's Medical University

Mesotheliomas are uncommon neoplasms with very poor prognosis. The mechanism of the carcinogenesis has not been fully determined, and it is sometimes difficult to differentiate from other lesions including lung cancer. The expression of Aurora A, Aurora B, Kallikrein 11, Uroplakin III, which are suggested to be expressed in mesotheliomas by gene expression profiling study, were examined by an immunohistochemical method in 9 mesotheliomas and 10 lung adenocarcinomas. Aurora A, Aurora B and Kallikrein 11 were expressed in both mesotheliomas and lung adenocarcinomas, but Uroplakin III was not. A positive rate of Aurora A was significantly higher in epithelioid mesotheliomas than in sarcomatoid mesotheliomas, and that of Aurora B was significantly higher in epithelioid mesotheliomas than in sarcomatoid mesotheliomas and lung adenocarcinomas. Kallikrein 11 did not show any significant difference. The higher expression of Aurora B in epithelioid mesothelioma may be useful for differentiation from lung adenocarcinoma. Moreover, Aurora A, Aurora B, and Kallikrein 11 may be involved in the carcinogenesis of the mesothelioma, and Aurora A and Aurora B might be candidates for potential therapeutic targets.

**Key Words:** mesothelioma, lung cancer, Aurora A, Aurora B, Kallikrein 11

## 緒 言

中皮腫は胸膜、腹膜など漿膜に発生する稀な悪性腫瘍で、中皮細胞や、間質の未分化な間葉細胞に由来すると考えられており、予後不良な疾患である。確定診断は病理組織化学的検索により行われるが、組織学的に多様性がみられるため、その診断は時として困難で、特に上皮型の胸膜中皮腫においては、肺腺癌との鑑別が問題となる。また、中皮腫は、アスベスト暴露から多段階的な遺伝子異常が蓄積され発症すると推測されているが、癌関連遺伝子の異常の特徴がいまだ把握されていない。本研究では、胸膜中皮腫99例のmRNAを用いて行われたmicro-

array法による解析<sup>1)</sup>で発現が報告された遺伝子のうち、Aurora A, Aurora B, Kallikrein 11, Uroplakin IIIに関して、蛋白の発現の有無を免疫組織化学的に検討し、肺腺癌との相違についても検討する。

## 対象および方法

## 1. 対象

2000～2006年までの本学病理学（第一）教室の剖検例と、2002～2007年までの当院病理診断科において、胸膜中皮腫、肺腺癌と診断された外科材料それぞれ9例、10例を対象とした（Table 1）。

## 2. 免疫組織化学的検討

免疫組織化学的検索は、ホルマリン固定パラフィ

**Table 1** Clinicopathological characteristics of pleural mesothelioma and lung adenocarcinoma

	Pleural mesothelioma	Lung adenocarcinoma
Number of patients	9 (autopsy 2)	10 (autopsy 0)
Age	Mean 57.6 (23-73)	Mean 65.7 (44-81)
Pathological diagnosis	Monophasic 6 Epithelioid 3 Sarcomatoid 3 Biphasic 3	Papillary 5 Mixed subtype 5

**Table 2** Primary antibody for immunohistochemistry

Antigen	Clone	Source	Dilution	Anitigen retrieval
Aurora A	Polyclonal	Abcam, Cambridge, USA	1 : 700	—
Aurora B	MAbcam 3609	Abcam, Cambridge, USA	1 : 20	Citrate buffer pH6.0, microwave
Kallikrein 11	Polyclonal	R & D Systems, Mineapolys, USA	1 : 500	—
Uroplakin III	AU1	PROGEN, Heidelberg, Germany	1 : 50	Citrate buffer pH6.0, microwave

ン包埋組織切片において、特異抗体を用いて ABC 法により検討した。使用した一次抗体を Table 2 に示した。陽性率は、明瞭な染色性を示した細胞を陽性とし、標本上の病変全体の面積に対する陽性細胞の占める割合を、光学顕微鏡観察にて、0~100% まで 10% 刻みで判定した。二相型胸膜中皮腫の陽性率は、上皮型の部分、肉腫型の部分それぞれについて判定した。これらの判定は、二人の病理医 (A.H., T. Y.) が独立して行った。

### 3. 統計学的処理

肺腺癌、上皮型胸膜中皮腫、肉腫型胸膜中皮腫の 3 群に分けて検討した。群間の比較は、Mann-Whitney's U-test を用いて分析し、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 結 果

Aurora A は、上皮型中皮腫の 6/6 例、肉腫型中皮腫の 3/6 例、肺腺癌の 8/10 例において、核、細胞質に陽性であった (Fig. 1A)。Aurora B は、上皮型中皮腫の 6/6 例、肉腫型中皮腫の 3/6 例、肺腺癌の 3/10 例において、細胞質に陽性であった (Fig. 1B, Fig. 2A, B)。Kallikrein 11 は、上皮型中皮腫の 6/6 例、肉腫型中皮腫の 4/6 例、肺腺癌の 8/10 例において、細胞質に陽性を示した (Fig. 1C)。Uroplakin については、胸膜中皮腫、肺腺癌とも陽性細胞はみられなかった (Fig. 1D)。

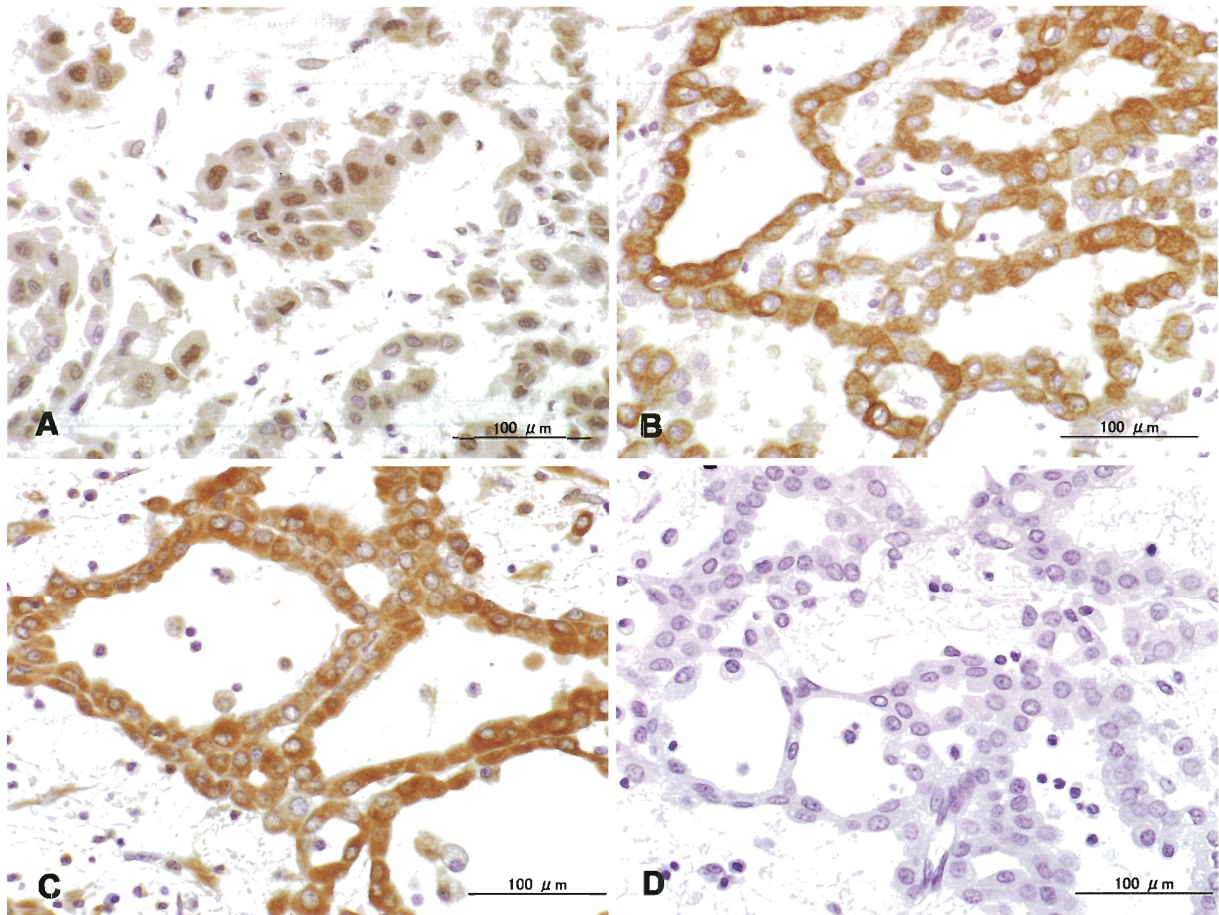
陽性率の比較では、Aurora A は上皮型中皮腫において、肉腫型中皮腫に比し有意に高値で ( $p = 0.039$ )、上皮型中皮腫と肺腺癌、肉腫型中皮腫と肺腺癌の比較では、有意差はみられなかった (Fig. 3A)。

Aurora B は、上皮型中皮腫において、肺腺癌、肉腫型中皮腫に比し有意に高値であった (上皮型中皮腫 vs 肺腺癌  $p = 0.003$ , 上皮型中皮腫 vs 肉腫型中皮腫  $p = 0.022$ )。肉腫型中皮腫と肺腺癌の比較では、有意差はみられなかった (Fig. 3B)。Kallikrein 11 は、いずれの群間においても有意差はみられなかった (Fig. 3C)。

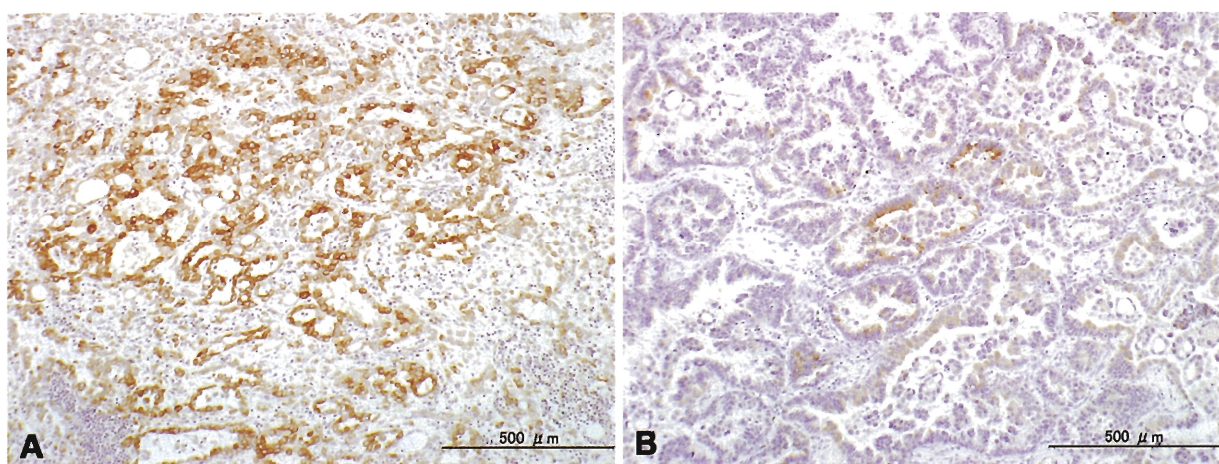
### 考 察

Aurora kinase は、細胞分裂期に活性化し、分裂期キナーゼと総称されるセリン・スレオニンキナーゼの一種で、哺乳類細胞には Aurora A, B, C のホモログが存在する。Aurora A, B は増殖するすべての細胞に発現しているが、Aurora C は精巢特異的に発現する。Aurora A は主に中心体の成熟、分離、両極性紡錘体の形成などに関わり、Aurora B は、染色体の形成、分配、細胞質分裂に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている<sup>2)3)</sup>。Aurora A, B は多くの悪性腫瘍で過剰発現していることが知られており、中皮腫、非小細胞性肺癌においても、mRNA レベルや、蛋白レベルの過剰発現が報告されている<sup>1)4)5)</sup>。本研究においても、免疫染色にて、Aurora A, B とも上皮型中皮腫、肉腫型中皮腫、肺腺癌で陽性となり、蛋白レベルでの発現が確認された。

中皮腫、肺腺癌における Aurora A, B 発現の意義について検討すべき点として、①組織学的鑑別診断に有用か否か、②予後や悪性度との関連、③細胞の悪性化のメカニズムへの関与、等があげられる。①については、Aurora kinase は種々の組織に発現す



**Fig. 1** Immunohistochemical expression of proteins in epithelioid mesothelioma  
 A, Nuclear and cytoplasmic expression of Aurora A.  
 B, Cytoplasmic expression of Aurora B.  
 C, Cytoplasmic expression of Kallikrein 11.  
 D, Negative staining of Uroplakin III.



**Fig. 2** Immunohistochemical analysis of Aurora B in epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma  
 A, Many cells were immunopositive in epithelioid mesothelioma (positive rate 70%).  
 B, Few cells were immunopositive in lung adenocarcinoma (positive rate 20%).

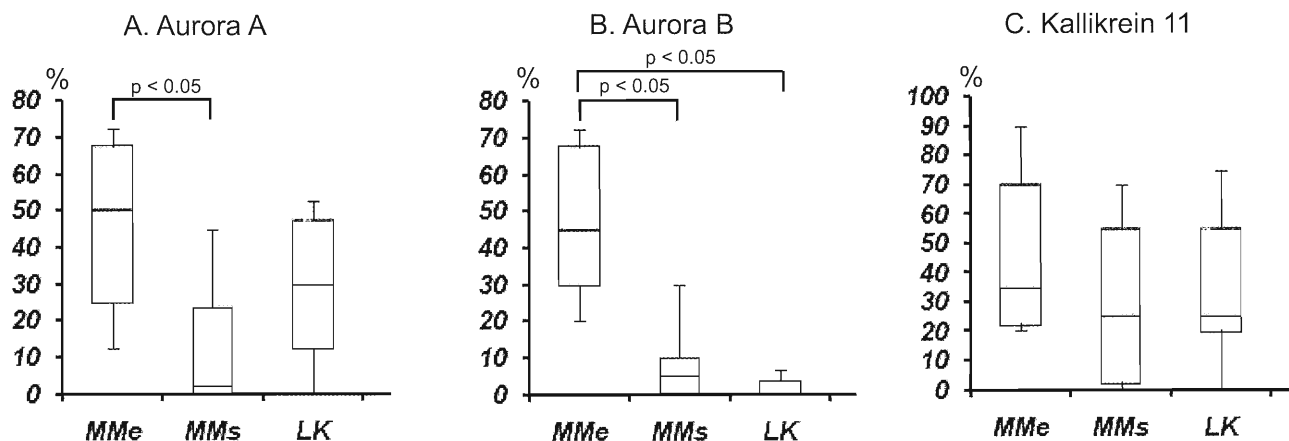


Fig. 3 Comparison of positive rate

A, Positive rate of Aurora A was significantly higher in epithelioid mesothelioma than in sarcomatoid mesothelioma.

B, Positive rate of Aurora B was significantly higher in epithelioid mesothelioma than in sarcomatoid mesothelioma and lung adenocarcinoma.

C, Positive rate of Kallikrein 11 did not show any significant difference.

MMe: malignant mesothelioma, epithelioid type, MMs: malignant mesothelioma, sarcomatoid type, LC: lung adenocarcinoma.

る分裂期キナーゼではあるが、今回、上皮型中皮腫における Aurora B の陽性率が、肺腺癌に比し有意に高率であり、組織学的鑑別診断の一助となる可能性も考えられる。②については、悪性腫瘍において、Aurora kinase の過剰発現は分裂異常を引き起こすことから、腫瘍細胞の増殖能や悪性度等と関連する可能性が考えられる。今回、予後との関係についての検討は行わなかったが、中皮腫や肺腺癌においても、Aurora A, B が細胞の増殖能や5年生存率、腫瘍の分化度と関連するという報告がなされており<sup>167)</sup>、今後の検討を要する。③については、Aurora kinase 単独の異常で細胞の悪性化が生じるかどうかの結論は出ていないが、動物モデル等を用いた研究では、Aurora kinase の異常に加え、p53 や Rb 経路等の異常が加わることにより、細胞の腫瘍化、悪性化が進行するものと推測されている<sup>3)</sup>。

今回、Aurora B の発現は、上皮型中皮腫と肺腺癌間に有意差がみられたが、Aurora B の発現は細胞質にみられ、核に発現しているとする従来の報告<sup>1)</sup>とは異なっていた。この原因として、症例数が少ない、抗体の clone が異なる、あるいは固定時間や死後時間の影響による染色性の変化等の可能性も考えられるが、免疫染色性はかなり明瞭であり、腫瘍化した細胞では、なんらかの機序により局在が変化する可能性が考えられる。また、細胞分裂期以外の細胞周期にある細胞においても陽性所見がみられることが

らは、不活化型の状態で細胞質に蓄積されている可能性も考えられる。腫瘍化の機序を考える上では、活性型か否かが重要な意味を持つが、外科病理診断の現場で肺腺癌との鑑別を行う上で、この細胞質陽性所見も、鑑別診断のための一助となりうると思われる。

Kallikrein 11 はセリンプロテアーゼである Kallikrein ファミリーに属する蛋白質である。前立腺癌のマーカーとして広く知られている prostate specific antigen (PSA) も Kallikrein ファミリーに属する。Kallikrein 11 は、正常では前立腺や胃、大腸、気管の粘膜の上皮細胞の細胞質の他、中皮細胞にも発現しており、前立腺癌や卵巣癌患者の血清で高値を示すことが報告されている<sup>89)</sup>。Lopez らは、上皮型中皮腫の 79% (48/61 例) に、免疫染色で発現が確認されたと報告しており、今回、上皮型、肉腫型中皮腫、肺腺癌のいずれにも発現がみられた。陽性率に有意差はみられず、上皮型中皮腫と肺腺癌との鑑別には有用とはいえないが、Kallikrein ファミリーの蛋白には、細胞の悪性化や転移能に関与していると報告されているものもあり、中皮腫の発生機序に Kallikrein 11 が関与している可能性も考えられる。

Uroplakin III は膜貫通型の糖蛋白で、その発現は移行上皮に特異的であるとされ、免疫染色での陽性所見は、移行上皮への分化を示すと解釈されている<sup>10)</sup>。Lopez らは、上皮型中皮腫の 42% (26/62 例)

に、免疫染色で発現が確認されたと報告しているが、今回、上皮型、肉腫型中皮腫、肺腺癌のいずれにも発現はみられなかった。この結果の解離は、症例数が少なかったこと等が原因として考えられる。Uroplakin は、物質透過の阻止、尿路上皮表面の安定化、膀胱拡張時の破裂防止等の機能があると考えられており、中皮腫において発現した場合の意義付けは不明で、今後の検討を要する。

Aurora kinase は、その阻害剤や、RNAi での抑制により、腫瘍細胞の増殖抑制や細胞死が顕著に誘導されること、間期にある正常細胞にはほとんどその活性や発現がみられないこと等から、分子標的治療の候補としての可能性が注目されている<sup>11)</sup>。複数の阻害剤が開発され、一部の阻害剤では、すでに固形がんを対象とした phase I 臨床試験が開始されている。今回の検討では、上皮型中皮腫の全例に Aurora A, B が共に発現しており、中皮腫において、分子標的治療の候補となりうる可能性が考えられる。中皮腫の cell line を用いた実験では、細胞の成長を抑制したり、細胞分裂が停止することが示されており<sup>12)</sup>、今後の臨床応用が期待される。

### 結 論

上皮型、肉腫型中皮腫のいずれにも、Aurora A, B, Kallikrein 11 の発現が確認され、中皮腫発症の機序に関与している可能性が考えられた。また、Aurora A, B については、分子標的治療の候補となりうる可能性が、Aurora B については上皮型中皮腫と肺腺癌との鑑別に有用である可能性が示唆された。

### 文 献

- 1) Lopez-Rios F, Chuai S, Flores R et al: Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: over-expression of aurora kinase and p16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction. *Cancer Res* **66**: 2970-2979, 2006
- 2) 浦野 健: 華麗なる Aurora 一族 クロマチン動態におけるプロテインキナーゼ Aurora の役割. *生化学* **77**: 253-269, 2005
- 3) 佐谷秀行: Aurora キナーゼの機能と発がんにおける役割. *生化学* **79**: 131-139, 2007
- 4) Crispi S, Faglierone C, Biroccio A et al: Antiproliferative effect of Aurora kinase targeting in mesothelioma. *Lung Cancer* 2010, doi: 10.1016/j.lungcan.2010.03.005 (accessed on Jul 20, 2010)
- 5) Zhang XH, Rao M, Loprieto JA et al: Aurora A, Aurora B and surviving are novel targets of transcriptional regulation by histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther* **7**: 1388-1397, 2008
- 6) Vischioni B, Oudejans JJ, Vos W et al: Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients. *Mol Cancer Ther* **5**: 2905-2913, 2006
- 7) Ogawa E, Takenaka K, Katakura H et al: Perimembrane Aurora—A expression is a significant prognostic factor in correlation with proliferative activity in non-small-cell lung cancer (NECLC). *Ann Surg Oncol* **15**: 547-554, 2008
- 8) Diamandis EP, Okui A, Mitsui S et al: Human Kallikrein 11: A new biomarker of prostate and ovarian carcinoma. *Cancer Res* **62**: 295-300, 2002
- 9) Petraki CD, Papanastasiou PA, Karavana VN et al: Cellular distribution of human kallikreins: immunohistochemical localization. *Biol Chem* **387**: 653-663, 2006
- 10) Xu X, Sun TT, Gupta PK et al: Uroplakin as a marker for typing metastatic transitional cell carcinoma on fine-needle aspiration specimens. *Cancer Cytopathol* **93**: 216-221, 2001
- 11) Keen N, Taylor S: Aurora-kinase inhibitors as anti-cancer agents. *Nat Rev Cancer* **4**: 927-936, 2004
- 12) Kim KW, Mutter RW, Subhawong TK et al: Inhibition of surviving and aurora B kinase sensitizes mesothelioma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **167**: 1519-1525, 2007