

アスベスト関連疾患研究会 (2014.Nov 17)

開催日時：12/27 (土) 2:00 – 5:30pm

場所：(公財)がん研究会がん研究所 吉田富三記念講堂

世話人：石川雄一 ((公財)がん研究会がん研究所)、岸本卓巳 (岡山労災病院)

司会：

三浦溥太郎、廣島健三

演者と演題名:(敬称略) 20分講演、5分質疑

第1部 アスベストと腫瘍

井内康輝 (広島大名誉教授)：

“悪性中皮腫 - 病理学的視点から”

高田礼子 (聖マリアンナ医科大学・予防医学)：

“アスベストの物理化学的特性とその発がん性”

豊國伸哉 (名古屋大学・病理)：

“アスベスト誘発中皮腫発がんモデルの解析から予防および治療へ”

石川雄一 (がん研究所)：

“喫煙肺癌とアスベスト肺癌は区別できるか?”

第2部 CD26による悪性中皮腫の治療

森本幾夫 (順天堂大学・免疫病・がん先端治療学)：

“CD26分子の悪性中皮腫の病態における役割および新規治療法開発”

山田健人 (慶應大・病理)：

“悪性中皮腫・肺癌におけるCD26の発現と機能”

岸本卓巳 (岡山労災病院)：

“CD26発現と胸膜中皮腫の治療効果”

呼びかけ先：

石綿中皮腫研究会，環境省委員会，化学療法に興味のある医師

聴衆：医師 (内科、化学療法科など)、研究者、その他興味ある一般市民

参加費： 無料

懇親会： なし

主催： 石綿中皮腫研究会

後援： 日本産業科学研究所

悪性中皮腫—病理学的視点から

広島大学名誉教授
井内康輝

石綿への曝露に関連する疾患のなかで、とくに悪性中皮腫は予後が悪く、治癒が望める有効な治療がない。中皮腫は漿膜を有する体腔に生じるが、その80～90%は胸膜に発生し、腹膜に10%、心膜に2～3%、精巣鞘膜にはごく少数が発生する。石綿への曝露から中皮腫の発生までは20～40年という長い期間を要するため、日本においては1960～1990年代における大量の石綿消費の影響が2004年頃から中皮腫の発生数の顕著な増加となってあらわれた。そのため、以前よりあった労災補償に加えて、2005年のクボタショック以降、生活環境の中での石綿曝露による中皮腫の発生が考えられるとして、新たな救済制度が2006年に発足した。しかし1995年から2012年までの中皮腫の発生を男女別、部位別にみると、男性の胸膜発生例が増加の主たる要因であることが分かる。

2015年に出版されるWHOの新しい胸膜腫瘍分類では、肉眼的にびまん型と限局型に分け、組織学的に上皮型、肉腫型、二相型に分ける。その他には、高分化型乳頭状中皮腫とアデノマイド腫瘍がこの中に含まれる。中皮腫の診断においては、画像診断や血液マーカー診断が不確実であるので、確定診断のためには病理診断が求められる。その際、他の多くの腫瘍との鑑別が必要なため、適切な抗体を用いた免疫組織化学的染色を行うことが必須であるが、中皮腫の分化度などによる陽性所見の違いが大きく、その判定には慎重を要する。

有効な治療をはかるため、可能な限り早期診断が必要であるが、反応性の中皮腫細胞過形成と早期の上皮型中皮腫、線維性胸膜炎と線維形成型中皮腫の鑑別が重要となる。治療としては、手術療法の改善、新たな化学療法剤の開発に加え、肺癌などで有効な治療法として用いられている分子標的治療の開発が、中皮腫についても今後求められる。

アスベストの物理化学的特性とその発がん性

聖マリアンナ医科大学・予防医学 高田 礼子

アスベストは、アスペクト比（長さとの幅の比）が3以上の繊維状のけい酸塩鉱物であり、蛇紋石族のクリソタイル（白石綿）と角閃石族のアモサイト（茶石綿）、クロシドライト（青石綿）、アンソフィライト、トレモライト、アクチノライトの計6種類がある。アスベストは、耐熱性、耐摩擦性、耐薬品性などの工業的に優れた特質を有し、主に建材（吹付け材、耐火被覆材、保温・断熱材、外壁・内装・屋根（スレート）材など）、摩擦材（ブレーキライニング、クラッチフェーシング）、シール材（ガスケット、ジョイントシートなど）として幅広い用途に利用されてきた。しかし、肺がん、中皮腫といった発がん性の問題から、わが国でも2006年9月から一部の代替困難なシール材等を除くアスベストの製造・使用などが禁止され、非アスベスト製品への代替化が全て可能となった2012年3月にはアスベストの製造・使用などが全面禁止された。

アスベストは、粉碎すると、縦に裂ける劈開により径が極めて細くなり、繊維長が長くても肺胞に到達可能な吸入性繊維となりやすい。これまでにアスベストおよび代替繊維に関する動物実験等の研究報告から、繊維状物質の発がん性には吸入ばく露量のほかに、繊維のサイズや溶解性、体内滞留性などの物理化学的特性が関わることが明らかとなっている。とくに細くて長い繊維形状、溶解性が低いこと、マクロファージの不完全貪食が生じる長繊維（長さ20 μm 以上）の肺内滞留性が高いことが重要な要因として挙げられる。また、繊維状物質の発がん機序は十分に解明されていないが、繊維の標的細胞に対する直接的作用だけでなく、マクロファージや好中球などの炎症細胞を介した間接的な作用が重要な役割を果たしている。とくに、炎症細胞から持続的に発生する活性酸素種・活性窒素種によるDNA傷害、細胞増殖因子等の作用が関与していると考えられている。

このような繊維状物質の生体影響に関わる物理化学的特性は、今後使用される種々のアスベスト代替繊維のリスク評価においても重要な情報となる。本講演では、アスベストの発がん性に関わる物理化学的特性について、アスベスト代替繊維等の研究報告をもとに概説する。

アスベスト誘発中皮腫発がんモデルの解析から予防および治療へ

名古屋大学大学院医学系研究科生体反応病理学 豊國 伸哉

「クボタショック」は以前から存在したアスベストによる中皮腫問題を社会的に大きく浮き彫りにし、これを契機としてアスベストの使用全面禁止やすべての中皮腫患者あるいは家族への給付金の交付など法的な措置がとられた。2025年が発生ピークとなる中皮腫の予防法の開発のため、動物発がん実験に取り組んでいる。アスベスト腹腔内投与モデルは結果的にヒト中皮腫とほとんど同じ遺伝子変化が発生することが判明し、優れたモデルである。白石綿で最も早い発生がみられ、青石綿・茶石綿を含めたすべての石綿において、鉄の触媒性をあげるニトリロ三酢酸の投与で発生が早くなった。また、主要標的遺伝子は *Cdkn2a/2b* であることも併せ、3種の石綿による中皮腫の発生には鉄過剰病態が重要であり(J Pathol 2012)、予防標的となると考えられた。鉄過剰機構として、異物に対する炎症反応に加え、白石綿は局所で著明な溶血をおこすことが判明した。アスベスト繊維全般にヒストン・アクチン・ヘモグロビンを吸着しやすいことも、その中皮細胞の染色体傷害性に寄与している(Cancer Sci 2011)。鉄キレート剤の予防的投与による除鉄により、悪性度のより低い上皮型の割合を増やすことに成功した(Cancer Prev Res 2013)。さらに、発現マイクロアレイ解析により肉腫型を規定する遺伝子として、connective tissue growth factor (*Ctgf; Ccn2*)を見いだした。*Ctgf* は分泌タンパク質であり、LRP6 を主要な受容体、その下流のβカテニンを転写因子として、悪循環を形成していることが明らかになった(J Pathol 2014)。血清にも分泌されており、今後、特に肉腫型中皮腫の診断マーカー・治療標的分子として期待される。

また、アスベストに形状が類似し、生体内でほとんど分解されない多層カーボンナノチューブの毒性・発がん性にも取り組んでいる。カーボンナノチューブ(CNT)は日本で開発された新規ナノ素材であり剛性・電導性・熱伝導性が優れているため、すでに商品化も進んでいる。その繊維の太さが中皮細胞傷害性を規定しており、CNTの中皮腫発がんに関わる最重要因子であることを示した。CNTによる中皮腫では、アスベストによる中皮腫とほとんど同じ遺伝子変化が発生した。直径50 nm付近のCNTは腹腔内投与による中皮腫発がん性が最も高いため、製造工程での注意が必要である(PNAS 2011)。2014年秋に初めてIARCがCNTの発がん性評価を報告したが、上記のデータも引用され直径が50 nm程度のCNTはGroup 2Bに分類された。

(石川雄一)

CD26 分子の悪性中皮腫の病態における役割および新規治療法開発

森本幾夫

CD26 分子は DPPIV 酵素活性を含む T 細胞共刺激分子で、我々は単クローン CD26 抗体の開発、CD26cDNA の単離を世界に先駆けて行い、現在もその基礎的研究から臨床応用の研究を行っている。

この研究過程で悪性中皮腫株及び悪性中皮腫病理組織に CD26 が高発現していることを発見し、治療を目指してヒト化 CD26 抗体を開発した。本抗体は *in vitro* で悪性中皮腫細胞株の増殖を抑制し、中皮腫株移植マウスで腫瘍縮小と生存延長をきたし、正常中皮では発現のない CD26 が悪性中皮腫特に上皮型では約 8 割に発現していることを見出し、本抗体が悪性中皮腫の新規治療法として有望な可能性が示唆された。

フランスにて治療抵抗性悪性中皮腫及びその他 CD26 陽性腫瘍をターゲットにして **First in Man** 第 1 相臨床試験をスタートしていたが本年 9 月半ばに無事終了した。

本講演では CD26 分子の悪性中皮腫細胞における機能、第 1 相臨床試験の成績及びヒト化 CD26 抗体と化学療法剤との併用効果などについて報告する予定である。

悪性中皮腫・肺がんにおけるCD26の発現と機能

山田健人

悪性中皮腫は、アスベストにより長い時間を経て発症する極めて難治性のがんであり、最も有効な抗がん剤による治療を施行しても、その平均生存期間は12.1ヶ月である。この中皮腫は、その発生機構が他のがんと異なり特異であるとともに、その浸潤・増殖態度にも特徴があり、胸腔に瀰漫性に広がり、さらに肺や胸壁に浸潤性増殖を示す。そこで、この特徴を再現する中皮腫の疾患モデルを作成すべく、まず中皮腫症例より新たにヒト中皮腫細胞株KMES-1を樹立した。本細胞を免疫不全NOGマウス胸腔あるいは腹腔内へ移植すると、興味深いことにCD26発現が高い細胞ほど、マウス胸腔表面に瀰漫性に広がる増殖・浸潤を示すことが明らかとなった。このCD26は、C末端にセリンプロテアーゼの一つであるDipeptidyl Peptidase-4を持ち、別の領域では細胞外基質であるファイブロンectinやコラーゲン、あるいはアデノシンデアミナーゼと結合し、さまざまな細胞内情報伝達を調節すると考えられている。このCD26は、正常組織ではTリンパ球、血管内皮細胞、腎尿細管上皮、肝細胞等に発現しているが、多くの癌（腎癌、肝癌、前立腺癌等）でも発現が認められることが明らかになってきた。そこで中皮腫症例におけるCD26発現を免疫染色により検討したところ、85%の症例が陽性であった。このCD26の中皮腫細胞における細胞内局在について免疫電子顕微鏡による観察を行ったところ、CD26は細胞膜表面、細胞質（おもにリソソーム）そして核内に認められた。中皮腫組織でのCD26染色パターンは、細胞質と細胞膜が全体に染色される症例や細胞膜が強く染色されるものなど、様々であった。中皮腫の組織型別では、上皮型で90%、肉腫型で40%が陽性であった。

肺非小細胞癌におけるCD26発現を検討したところ、全体の68%（腺癌74%）が陽性であった。これらの肺癌におけるCD26発現と様々な臨床パラメーターや生存期間との相関を解析したが、いずれも有意な相関は見出されなかった。

前演者・森本幾夫博士が述べているように、ヒト化抗CD26モノクローナル抗体は、ADCCやCDCなどの免疫学的機序だけではなく、中皮腫細胞への直接的な抗腫瘍作用があることが推測された。そこで*in vitro*において本抗体による中皮腫細胞の増殖への影響を検討したところ、濃度依存性に増殖抑制能が認められ、細胞周期のG1→S期およびG2→M期の遅延が認められた。この細胞周期の遅延は、それぞれp27^{kip1}発現誘導およびcdc25とcdc2リン酸化促進によるものであった。さらに抗体による細胞増殖抑制の分子機構を詳細にするために、抗体処理後のCD26の挙動を観察したところ、処理後1時間をピークに細胞膜CD26が抗体とともに細胞質さらには核内に移行することが明らかになった。そこで、核内におけるCD26の機能を解析する目的で、抗体処理後の細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行い、核内CD26の標的遺伝子RNA polymerase 2を同定した。この結果から中皮腫細胞を本抗体で処理すると核内に移行したCD26がRNA polymerase 2遺伝子発現を転写レベルで抑制することで、細胞増殖阻害が引き起こされることが明らかとなった。

このヒト化抗CD26モノクローナル抗体の臨床試験については、森本博士より報告されるが、この治験における中皮腫での標的分子CD26の発現を評価する方法（免疫染色）を確立した。入手可能なさまざまな抗体を試した結果、1）正常組織でのCD26発現の評価、2）各種がんにおけるCD26発現の評価、3）ロット間の差異のないこと、4）抗原特異性、などを総合的に判断し、ポリクローナル抗体を用いることとした。このポリクローナル抗体を用いた標的分子CD26発現評価に際して、抗原賦活化の至適条件の検討や発色方法の選定を通じて、最終的に多施設のパラフィン・ブロックにおいても安定した結果が得られる免疫染色のプロトコールが完成した。一方、本抗体療法におけるCD26発現評価において、ホルマリン固定パラフィン切片で使用できるモノクローナル抗体が求められており、波多野良博士がその開発を行った。その結果、上記のポリクローナル抗体と同等の染色性を示すクローンが得られ、上皮型中皮腫では90%、さらに肉腫型においても80%の陽性率を示すことが明らかとなった。

CD26 発現と胸膜中皮腫の治療効果

岡山労災病院 岸本卓巳

(目的)

CD26 の細胞表面における発現が胸膜中皮腫の治療効果とどのように関連しているかの検討をした。

(方法と対象)

胸膜中皮腫患者から腫瘍組織を採取し、CD26 polyclonal 抗体により免疫染色を行い臨床経過や治療効果と比較検討した。また、細胞株を用いて CD26 の発現と腫瘍増殖の関係を *in vitro* で解析した。さらに、マイクロアレイを用いて CD26 発現とどのような機能が関連しているかの確認を行った。対象は胸膜中皮腫 79 例、男性が 72 例、年齢中央値は 65 才である。組織型では上皮型、二相型、肉腫型がそれぞれ 49 例、18 例、11 例である。臨床病期は大半が PS0 あるいは 1 で、PS4 の症例は含まれていない。治療内容は胸膜外肺全摘術(EPP)施行例が 32 例、何らかの形で化学療法が行われた症例が 56 例、BSC のみの症例は 17 例であった。免疫組織染色では CD26 の細胞表面の膜に於ける発現で 0 から 3 までの 4 段階に分けて検討した。

(結果)

細胞膜での CD26 発現レベルと化学療法に対する効果を比較したところ、PR に注目してみるとその多くは CD26 高発現で、逆に PD に注目してみると陰性症例で PD を呈する症例が多い傾向にあった。

細胞膜での CD26 発現の有無と臨床的パラメーターの関係では、性別、年齢、病期、PS、治療法で差は認められなかったが、組織型では上皮型で高発現しており、肉腫型はすべて陰性であった。CD26 発現の有無とそのほかの臨床的パラメーターで Kaplan-Meier 法による生存期間の検討を行ったところ、年齢、組織型、臨床病期、PS、治療法では生存期間に有意の差が認められたが、CD26 の発現の有無、性別では生存期間に統計学的に有意な差は認められなかった。

79 例全例を CD26 発現の有無で比較すると生存期間に差は認められなかったが、化学療法を受けた症例でのみ比較すると CD26 陽性、陰性それぞれの群の生存期間中央値は 18.6 ヶ月と 10.7 ヶ月で有意差が認められた。さらに、化学療法で PEM を含む群と含まない群でそれぞれ CD26 発現と生存期間を検討すると PEM を含まない群で差が顕著であった。これらのことから、細胞膜における CD26 発現は化学療法の効果やその後の生存期間に影響する可能性があることが確かめられた。

その機序を考察するために細胞株を用いた追加実験を行なった。Meso-1 細胞株を用いて CD26 高発現の集団と陰性の集団で増殖曲線を比較してみると、CD26 高発現の集団の増殖が旺盛であることがわかった。

またマイクロアレイを用いた検討では、薬剤感受性、細胞周期の調整、アポトーシス等に関わる遺伝子の発現が CD26 の発現と関連していることが確かめられた。

(まとめ)

CD26 の発現の有無で生存期間に差は認められなかった。化学療法に対する効果は、CD26 高発現で良い傾向があった。化学療法を行った中皮腫で検討すると CD26 発現群は生存期間が延長していた。PEM を含まない症例でその差は顕著であった。

In vitro での検討では、CD26 高発現した中皮腫細胞の増殖能が高いこと、CD26 発現が増殖、細胞周期調整、アポトーシス、化学療法耐性と密接な関連が示唆された。