

令和元年6月7日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05264

研究課題名(和文) 包括的免疫機能解析による悪性中皮腫予防診断スコアの構築

研究課題名(英文) Comprehensive immunological-analyses for patients with malignant mesothelioma and diffuse pleural thickening

研究代表者

西村 泰光 (NISHIMURA, YASUMITSU)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90360271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：石綿関連良性疾患であるびまん性胸膜肥厚(DP)患者と悪性中皮腫患者(MM)の末梢血を用いた包括的免疫機能解析を行った。解析結果は、Tヘルパー細胞および細胞傷害性T細胞機能(CTL)における差異が特徴的であった。MMでは制御性T細胞機能指標であるGITR発現量が高値である一方、CTLにおけるperforin発現量がDPに比べて低く、免疫機能抑制とMMとの関連を示唆する。また、因子分析より抽出された2因子によりDPとMMは明確に区別された。また重回帰分析より導かれた2数式によるスコア値は何れも良好にMMを判別するAUC高値なROC曲線を示し、免疫学的予防診断指標構築の可能性を示す事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫は石綿曝露後約40年後に発症することが知られており今後我が国では中皮腫患者の一層の増加が見込まれ、また災害や管理不良な解体作業に起因する石綿曝露は今後も継続的に予想され、中皮腫を早期に診断する、あるいは予見することが社会的に喫緊に要請されている状況にある。本研究結果は、石綿曝露の免疫機能影響という我々独自の視点に基づく内容を中皮腫患者およびびまん性胸膜肥厚患者末梢血の免疫機能解析に発展させることで悪性中皮腫と免疫機能の関わりを解明に迫る学術的意義を持つと共に、その結果を基に免疫学的中皮腫予防診断指標の構築の可能性を実証したという社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Our present study comprehensively examined immune functions in patients with diffuse pleural thickening (DP) and malignant mesothelioma (MM) by using peripheral blood from them. The results obtained from it showed characteristic differences in T helper cells (Th) and cytotoxic T lymphocytes (CTL). MM showed high cell surface expression of GITR on Th and low transcriptional expression level of perforin in CTL compared with DP, which together with our previous findings supports the idea that suppressed immune functions might contribute to development of MM following exposure to asbestos. In addition, factor analysis for the results extracted two factors, 2D plot of which clearly distinguished MM from DP. Furthermore, multiple regression analysis led the two kind of formulae to predict MM, which showed good ROC curves with high AUC values, meaning the probability of predictive-diagnostic score based on immunological analyses for MM.

研究分野：衛生学，免疫学，免疫毒性学

キーワード：悪性中皮腫 石綿 免疫 産業衛生 予防

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は石綿の毒性影響により引き起こされていると一般的に説明されている。しかし、長い潜伏期間や、石綿曝露者の一部で且つ比較的低濃度曝露者で多いことなどの知見は、石綿曝露と悪性中皮腫の関係がより複雑であることを示唆する。これまでに我々は、石綿曝露による免疫機能影響の解析に取り組み、T・NK細胞の特徴的機能低下を明らかにしてきた。また、胸膜プラーク陽性非担癌者とMMの包括的免疫機能解析を行い、MMにおいて制御性T細胞(Treg)機能指標と炎症性サイトカイン血中濃度の上昇を明らかにした。

2. 研究の目的

そこで、石綿関連良性疾患であるびまん性胸膜肥厚(DP)患者とMM患者について包括的免疫機能解析を行い比較し、MMに特徴的な免疫動態の解明を試みた。また、解析結果からMM診断に寄与する予防診断スコアの構築を試行した。

3. 研究の方法

MM・DPの方々より末梢血の提供を受けた。血漿分離後、PBMCを調製し、CD4+T細胞(Th)・CD8+T細胞(CTL)・NK細胞(NK)・単球(Mo)上の各種細胞表面受容体発現量をフローサイトメトリー(FCM)で測定した。FCMで各細胞集団を単離し、一部はそのまま、残りは1日培養後に凍結保存し、Realtime PCRによりmRNA量を測定した。Mo以外はPMA/inonomycin刺激下で培養した。血漿中の29種のサイトカイン濃度をluminexで測定した。測定結果についてSPSSを用いて因子分析(最尤法, Promax Rotation)を行った。また重回帰分析によりMM予測式を抽出し、予測式スコア値の予防診断スコアとしての可能性を探った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

びまん性胸膜肥厚患者(DP)と悪性中皮腫患者で末梢血リンパ球の特徴が大きく異なることが分かった。DPに比べ、MMではTh上の(a)GITR (b)CD69発現量が高く、CTL上の(c)CXCR3 (d)CD69発現量は高値であった。Th中の(e)RORC、NK中の(f)c-Rel mRNAレベルはMMで高値であった。他方、DPはTh中の高い(g)GATA-3、CTL中の高い(h)PRF1(perforin) mRNAレベルを示した。一方で、サイトカイン濃度に有意差は見られなかった。

また、DPとMMのTh機能的差異への転写因子の関与を示唆する所見を捉えた。Th上のGITRとCTLA-4発現量は正相関性を示した。GATA-3 mRNA量は細胞表面CTLA-4、GITR量と負相関性を、RORC mRNAは細胞表面GITRと正相関性を示した。Foxp3 mRNA量の群間差、およびGATA-3とRORC間の相関性は無かったが、RORC/Foxp3比はMMで有意に高くGATA-3と負に相関した。

と合わせて以上の結果は、中でもDPと比較しMMではTreg機能の亢進(GITR, CTLA-4増加)とCTL機能低下(perforin発現低下)が顕著であることを示し、両転写因子の発現量変動によるTreg機能亢進を示唆する。

更に因子分析結果はDPとMMとの免疫学的差異をより明示した。の(a)から(h)の8測定項目について因子分析を行ったところ2因子が抽出され、(a), (c), (d), (e), (f)は因子1で高い因子負荷量を示し、(g), (h)は正に(b)は負に高い負荷量を因子2に示した。2因子の二次元プロットにおいてMM集団とDP集団は明瞭に異なる分布を示した。

加えて、DPとMMを区別する複数のスコア式を得ることが出来た。重回帰分析により(a)(b)また(e)(g)を独立変数とする数式1および2を算出し、代入により得られるスコア値1(ROC曲線AUC=0.838)および2(ROC曲線AUC=0.939)はMMとDPを明瞭に区別した。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

悪性中皮腫は胸膜中皮や腹膜中皮の腫瘍疾患であり石綿の吸入曝露により引き起こされるが、石綿曝露はびまん性胸膜肥厚という胸膜中皮の良性疾患も引き起こす。我々はこれまでに石綿曝露非担癌者である胸膜プラーク陽性者と悪性中皮腫患者の免疫機能解析を行い、両者の差異を明らかにしてきた。しかしながら、胸膜プラークは石綿曝露指標であるものの腫瘍に繋がる前癌病変でもなければ炎症を伴うわけでもなく健康人に近い状態であるため、悪性中皮腫と良性石綿関連疾患との比較が待たれていた。びまん性胸膜肥厚は悪性中皮腫と同様に石綿が正常中皮細胞に何らかの傷害作用を与えているはずである。従って、今回の研究成果により明らかになった中皮腫患者における免疫学的特徴は、石綿の中皮細胞への傷害作用以外の機序として悪性中皮腫に関連する免疫機能動態を照らしていると考えられる。我々はこれまでに細胞株や一次末梢血細胞の培養実験により石綿曝露がTreg機能を亢進する一方、CTLの細胞傷害機能の抑制に働くことを実証してきた。今回明らかとなった中皮腫患者の特徴であるTreg細胞機能の亢進とCTL機能の低下はそれら過去の知見とも一致し、得られた本研究成果は石綿曝露による抗腫瘍免疫機能の抑制作用が悪性中皮腫の一助となっていることを示し、中皮腫の予見・早期発見・治療戦略において大きな意味を持つ。更に免疫学的特徴を元に算出した2種のスコア式値が実際にMMとDPを良好に判別することを示したことは、悪性中皮腫の免疫学的予防診断指標の有効性を強く示唆し、今後益々の増加が予想される悪性中皮腫の予防医学にとって大きな福音であると言える。

(3)今後の展望

我々はこれまでに石綿曝露の免疫機能影響と悪性中皮腫患者の免疫学的特徴に関して多数の事柄を明らかにしてきた。同時に、末梢血の免疫機能解析が中皮腫の予防診断指標となる可能性を示してきた。しかし一方で、石綿が免疫細胞の何(標的分子、遺伝子)に対して影響しているのかという核心的問いに未だ答えを持たない。また同時に、これまで示してきた免疫学的予防診断スコアは複数の測定機器を必要とする手法であり、社会実装へのハードルは高い。今後のそれらに焦点を当てた研究課題は悪性中皮腫の機序解明および治療・予防医学へ寄与すると予想され、発展が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計16件)

- 1) 西村泰光, 武井直子, 吉留敬, 松崎秀紀, 李順姫 and 大槻剛巳. アスベスト曝露と中皮腫発症の免疫学的スクリーニングマーカーの探索. 繊維状物質研究 5: 102-6, 2018.
- 2) 李順姫, 松崎秀紀, 武井直子, 吉留敬, 西村泰光 and 大槻剛巳. 制御性 T 細胞の機能および細胞周期へのアスベスト曝露の影響. 繊維状物質研究 5: 130-5, 2018.
- 3) Maeda M, Matsuzaki H, Yamamoto S, Lee S, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Min Y, Sada N, Nishimura Y and Otsuki T. Aberrant expression of FoxP3 in a human T cell line possessing regulatory T cell-like function and exposed continuously to asbestos fibers. *Oncol Rep* 40(2): 748-58, 2018. DOI: 10.3892/or.2018.6481
- 4) Kumagai-Takei N, Yamamoto S, Lee S, Maeda M, Masuzaki H, Sada N, Yu M, Yoshitome K, Nishimura Y and Otsuki T. Inflammatory Alteration of Human T Cells Exposed Continuously to Asbestos. *Int J Mol Sci* 19(2): 1-12, 2018. DOI: 10.3390/ijms19020504
- 5) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K and Otsuki T. Decrease in Intracellular Perforin Levels and IFN- γ Production in Human CD8+ T Cell Line following Long-Term Exposure to Asbestos Fibers. *J Immunol Res* 2018: 1-10, 2018. DOI: 10.1155/2018/4391731
- 6) Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Maeda M, Yu M, Sada N, Yoshitome K, Nishimura Y and Otsuki T. Skewing T helper cells exposed to asbestos fibers toward reduction of tumor immunity or activation of autoimmunity. *Kawasaki Med J* 44(1): 33-40, 2018. DOI: 10.11482/KMJ-E44(1)33
- 7) 武井直子, 西村泰光, 松崎秀紀, 李順姫, 吉留敬, 幡山圭代, 山本祥子, 池田美穂 and 大槻剛巳. アスベスト曝露と細胞傷害性顆粒. *臨床環境医学* 26(1): 31-7, 2017.
- 8) Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Lee S, Maeda M, Sada N, Hatayama T, Yamamoto S, Ikeda M, Yoshitome K, Min Y, Nishimura Y and Otsuki T. Search for biomarkers of asbestos exposure and asbestos-induced cancers in investigations of the immunological effects of asbestos. *Environ Health Prev Med* 22(1): 53, 2017. DOI: 10.1186/s12199-017-0661-4
- 9) Maeda M, Chen Y, Lee S, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Matsuzaki H, Yamamoto S, Hatayama T, Ikeda M, Nishimura Y and Otsuki T. Induction of IL-17 production from human peripheral blood CD4+ cells by asbestos exposure. *Int J Oncol*: 2017. DOI: 10.3892/ijo.2017.3991
- 10) Lee S, Matsuzaki H, Maeda M, Yamamoto S, Kumagai-Takei N, Hatayama T, Ikeda M, Yoshitome K, Nishimura Y and Otsuki T. Accelerated cell cycle progression of human regulatory T cell-like cell line caused by continuous exposure to asbestos fibers. *Int J Oncol* 50(1): 66-74, 2017. DOI: 10.3892/ijo.2016.3776
- 11) 李順姫, 前田恵, 松崎秀紀, 武井直子, 山本祥子, 幡山圭代, 吉留敬, 西村泰光 and 大槻剛巳. ヒト T 細胞株への白石綿・青石綿継続曝露に伴う細胞特性の変化. *日本予防医学雑誌* 10(3): 119-25, 2016.
- 12) 大槻剛巳, 李順姫, 前田恵, 林宏明, 松崎秀紀, 武井直子, 吉留敬 and 西村泰光. 珪酸粒子・アスベスト繊維の免疫影響. *日本繊維状物質研究* 3: 4-11, 2016.
- 13) Otsuki T, Matsuzaki H, Lee S, Kumagai-Takei N, Yamamoto S, Hatayama T, Yoshitome K and Nishimura Y. Environmental factors and human health: fibrous and particulate substance-induced immunological disorders and construction of a health-promoting living environment. *Environ Health Prev Med* 21(2): 71-81, 2016. DOI: 10.1007/s12199-015-0499-6
- 14) Matsuzaki H, Lee S, Maeda M, Kumagai-Takei N, Nishimura Y and Otsuki T. FoxO1 regulates apoptosis induced by asbestos in the MT-2 human T-cell line. *J Immunotoxicol* 13(5): 620-7, 2016. DOI: 10.3109/1547691X.2016.1143539
- 15) Maki Y, Nishimura Y, Toyooka S, Soh J, Tsukuda K, Shien K, Furukawa M, Muraoka T, Ueno T, Tanaka N, Yamamoto H, Asano H, Maeda M, Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Otsuki T and Miyoshi S. The proliferative effects of asbestos-exposed peripheral blood mononuclear cells on mesothelial cells. *Oncol Lett* 11(5): 3308-16, 2016. DOI: 10.3892/ol.2016.4412
- 16) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Hayashi H and Otsuki

T. The Suppressed Induction of Human Mature Cytotoxic T Lymphocytes Caused by Asbestos Is Not due to Interleukin-2 Insufficiency. J Immunol Res 2016: 10, 2016. DOI: 10.1155/2016/7484872

〔学会発表〕(計 18 件)

- 1) 西村泰光, 他. 活性化 CD4+T リンパ球由来因子による石綿曝露下の中皮細胞増殖抑制への干渉, 第 89 回日本衛生学会. 2019.
- 2) Nishimura Y, et al. Difference in Immunological Characteristics between Patients with Malignant Mesothelioma and Diffuse Pleural Thickening, The 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, March 11-15, 2018.
- 3) 西村泰光. 包括的免疫機能解析によるアスベスト曝露影響の解明と中皮腫予防指標の構築 (シンポジウム 17: がん予防研究の最前線), 第 88 回日本衛生学会学術総会 2018.
- 4) 西村泰光, 他. 悪性中皮腫患者とびまん性胸膜肥厚患者の包括的免疫機能解析.
- 5) Nishimura Y, et al. Scores predictive for asbestos exposure, malignant mesothelioma and pleural plaque on the basis of comprehensive immunological analysis. ICOH 2018, 2018.
- 6) Nishimura Y, et al. Augmented proliferation of mesothelial cells caused by secretory factors derived from immune cells upon exposure to asbestos. ICOH 2018, 2018.
- 7) 西村泰光, 他. アスベスト関連良性疾病との比較に基づく悪性中皮腫患者の免疫学的特徴の分析. 第 91 回日本産業衛生学会 2018
- 8) 西村泰光. アスベストと悪性中皮腫 -抗腫瘍免疫機能の減弱(トキシコロジスト・ブラッシュアップセミナー: “肺・呼吸器の毒性変化を考える”). 第 19 回日本毒性学会生涯教育講習会 2018.
- 9) 西村泰光, 他. 免疫細胞由来因子により引き起こされるヒト中皮細胞増殖阻の石綿耐性. 第 87 回日本衛生学会学術総会 2017
- 10) Nishimura Y, et al. The immunological screening devices for human malignant mesothelioma and asbestos exposure. The 27th Japan Korea China Conference on Occupational Health, 2017
- 11) 西村泰光. 末梢血の包括的免疫機能解析に基づく悪性中皮腫スクリーニングデバイスの構築. 第 20 回 癌と免疫セミナー 2017
- 12) 西村泰光, 他. びまん性胸膜肥厚患者と悪性中皮腫患者の免疫学的差異. 第 24 回日本免疫毒性学会学術年会 2017
- 13) 西村泰光, 他. 包括的免疫機能解析による悪性中皮腫とびまん性胸膜肥厚との判別指標の探索. 第 24 回石綿・中皮腫研究会. 2017
- 14) Nishimura Y, et al. Secretory factors produced by immune cells upon exposure to asbestos facilitate proliferation of mesothelial cells. 第 46 回日本免疫学会学術集会. 2017
- 15) 西村泰光, 他. 免疫機能分子指標群の多変量解析による悪性中皮腫診断スコア式の構築. 第 15 回分子予防環境医学研究会 2016
- 16) 西村泰光, 他. 悪性中皮腫スクリーニングデバイスとしての免疫学的スコア式の開発. 第 89 回日本産業衛生学会 2016
- 17) 西村泰光, 他. アスベスト曝露と中皮腫発症の免疫学的スクリーニングマーカーの探索法. 第 4 回日本繊維状物質研究学術集会 2016
- 18) 西村泰光, 他. アスベスト曝露と悪性中皮腫に関わる免疫学的特徴の解析とスクリーニングデバイスの開発. シンポジウム「微小粒子による肺生体影響評価とその社会実践」. 第 23 回日本免疫毒性学会学術年会 2016.

〔図書〕(計 6 件)

- 1) Kumagai-Takei N, Lee S, Yoshitome K, Sada N, Nishimura Y and Otsuki T. Immune alteration caused by fibrous and particulate environmental substances, In Environmental Factors affecting Human Health: Uher I, editors. IntechOpen, London: ppin press, 2019.
- 2) Matsuzaki H, Lee S, Kumagai-Takei N, Min Y, Sada N, Yoshitome K, Nishimura Y, Maeda M and Otsuki T. Cytotoxicity caused by asbestos fibers and acquisition of resistance by continuous exposure in human T cells, In Cytotoxicity: Celik TA, editors. IntechOpen, London: pp9-20, 2017.
- 3) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Yamamoto S, Ikeda M, Hatayama T, Maeda M and Otsuki T. Alteration of perforin status caused by asbestos exposure in CTL and NK cells, In Advances in Medicine and Biology: Berhardt LV, editors. NOVA publisher, New York: pp107-21, 2017.
- 4) Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Maeda M, Matsuzaki H, Lee S, Yamamoto S, Hatayama T, Yoshitome K and Otsuki T. Suppressive effects of asbestos exposure on the human immune surveillance system, In Allergy and Immunotoxicology in Occupational Health: Otsuki

- T, Di Gioacchino M and Petrarca C, editors. Springer Japan, Tokyo: pp1-14, 2016.
- 5) Matsuzaki H, Lee S, Kumagai-Takei N, Yamamoto S, Hatayama T, Yoshitome K, Hayashi H, Maeda M and Otsuki T. Immunological risks caused by fibrous and particulate substances, In Environmental Health Risks: Larramendy M and Soloneski S, editors. IntechOpen, Rijeka: pp211-30, 2016.
- 6) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Yamamoto S, Hatayama T, Maeda M and Otsuki T. Reduction of anti-tumor immunity caused by asbestos exposure, In Asbestos: Risk Assessment, Health Implications and Impacts on the Environment: Simmons DL, editors. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, New York: pp45-62, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

川崎医科大学衛生学ホームページ
<https://m.kawasaki-m.ac.jp/hygiene/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大槻 剛巳

ローマ字氏名：OTSUKI TAKEMI

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：40160551

(2)研究分担者

研究分担者氏名：武井 直子

ローマ字氏名：KUMAGAI-TAKEI NAOKO

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：00509276

(3)研究分担者

研究分担者氏名：李 順姫

ローマ字氏名：LEE SUNI

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：70414026

(4)研究分担者

研究分担者氏名：松崎 秀紀

ローマ字氏名：MATSUZAKI HIDENORI

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：80335463

(5)研究分担者

研究分担者氏名：吉留 敬

ローマ字氏名：YOSHITOME KEI

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：40304307

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。