

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591830

研究課題名（和文） 石綿関連肺癌に対する腫瘍抗原の探索と診断及び治療への応用

研究課題名（英文） Identification of a tumor associated antigen in lung cancer patients with asbestos exposure and its potential for diagnosis application

研究代表者

安田 学（YASUDA MANABU）

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：50352307

研究成果の概要（和文）：石綿関連肺癌患者血清中の抗体が認識する腫瘍抗原遺伝子を探索し、石綿関連肺癌診断のための新しいバイオマーカーの確立および石綿による肺癌発症のメカニズムの解明に繋げることを目的とした。石綿関連肺癌症例の血清中 IgG 抗体が認識する腫瘍抗原を SEREX 法にて検索し、5種類の抗原遺伝子を単離した。その中で Annexin A2 (AnxA2) は、自己正常肺組織に比較して肺癌組織で高発現を認め、肺癌細胞株では10種類中5細胞株、中皮腫細胞株で5種類中3細胞株に AnxA2 の高発現を認めた。AnxA2 に対する血清反応を ELISA 法にて検討したところ、石綿曝露肺癌症例において15例中9例、悪性胸膜中皮腫15例中8例において、抗体価が陽性であった。以上より、AnxA2 は石綿関連腫瘍肺癌で高発現し、さらに石綿関連悪性腫瘍患者の液性免疫応答に認識されていると考えられ、石綿関連肺癌患者の選別に寄与する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study analysed the humoral immune response in lung cancer patients with asbestos exposure in order to identify new surrogate markers of the carcinogenic risk in populations exposed to asbestos. A serological analysis identified five distinct antigens reactive with IgG derived from a lung cancer patient with high asbestos exposure. In one of the isolated antigens, quantitative RT-PCR indicated that annexin A2 (AnxA2) was overexpressed in lung cancer tissues and normal lung from patients with high asbestos exposure. Antibody against AnxA2 was detected in 9/15 (60%) of lung cancer patients with high asbestos exposure; however, in only 1/12 (8%) of lung cancer patients with low asbestos exposure. AnxA2 was also overexpressed in malignant mesothelioma cells, and the antibody was also positive in 9/15 (60%) of patients with malignant mesothelioma. Furthermore, this study also focused on the clinical significance of pre-operative serum levels of Osteopontin (OPN) in patients with NSCLC who underwent a complete resection. The pre-operative serum OPN level of each patient was a useful predictor of an unfavorable prognosis, however, it was not associated with previous asbestos exposure. In conclusion, the antibody titer against AnxA2 may be a potentially useful new diagnostic surrogate marker for asbestos-related lung cancer and malignant mesothelioma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：アスベスト、肺癌、腫瘍抗原、Annexin A2、SEREX

### 1. 研究開始当初の背景

石綿関連肺癌は、発癌リスクを2倍以上に高めるとされている量の石綿を曝露した肺癌症例と定義されている。つまり、画像による胸膜プラーク所見に加え、一定程度以上の肺線維化所見を認めること、または石綿計測により「乾燥肺 1g あたり 200 万本以上の石綿繊維、5,000 本以上の石綿小体、気管支肺胞洗浄液(BALF) 1ml 当たり 5 本以上の石綿小体」と規定されている(中央環境審議会答申)。ところが、現状ではこの基準は満たさないが職業あるいは環境による石綿曝露が強く疑われる肺癌症例(乾燥肺 1g あたり 1,000-5,000 本の石綿小体が検出される症例)についての考え方、また石綿曝露による肺癌発症ハイリスク群の選別や早期発見のための手段については十分議論されていない。さらに発症メカニズムや他の塵肺症との違いについての解明も進んでいないのが現状である。

### 2. 研究の目的

石綿関連肺癌患者血清中の抗体が認識する腫瘍抗原遺伝子を探索し、石綿関連肺癌診断のための新しいバイオマーカー確立のみならず、石綿による肺癌発症のメカニズム解明に繋げることを目的とする。

### 3. 研究の方法

石綿曝露歴または石綿曝露の可能性が高い職種に従事していた症例より、切除肺組織の検索(肺内石綿小体の有無)を行うことで石綿関連肺癌症例を選別する。これら症例の血清中 IgG 抗体が認識する腫瘍抗原を同定する(SEREX 法)ことで新たな石綿関連肺癌に特異的な腫瘍抗原を検索する。さらに、単離した抗原遺伝子のバイオマーカーとしての有用性の検討を行い、臨床応用への可能性(バイオマーカー・腫瘍特異的免疫療法)を追求する。

#### (1) 石綿関連肺癌症例の選別

当科で肺癌切除術を行った症例より石綿曝露歴・石綿曝露の可能性が高い職種(建設業、製造業)に従事していた症例、および術中所見にて胸膜プラークの存在した症例を選別し、切除肺組織の検索(肺内石綿小体の定量)を行う。

#### (2) SEREX 法による石綿肺癌遺伝子の単離

石綿関連肺癌と診断した症例の凍結腫瘍より mRNA を抽出し、分子生物学手法を用いて

cDNA ライブラリーを作製。腫瘍由来の cDNA を組み込んだ λファージを大腸菌に感染させ、産生されたタンパク質をニトロセルロース膜に転写した後、石綿関連肺癌患者血清中の抗体と反応させ、HRP 標識抗ヒト IgG 抗体で検出。陽性クローンを単クローンとし、挿入 cDNA の塩基配列を決定しデータベースによるホモロジー検索を行う。

#### (3) 石綿肺癌関連遺伝子に対する液性免疫応答の解析

単離した癌抗原遺伝子に対する石綿関連肺癌患者の術前術後の抗体価の変化を検討することにより、バイオマーカーとしての意義を検討する。また単離した癌抗原遺伝子の肺癌組織における発現を RT-PCR 法またはリアルタイム PCR 法で調べ、その遺伝子の発現頻度の検討を行う。さらに ELISA 法にて、石綿関連肺癌患者血清中に同定した抗原が高率に認められるかどうか、またその抗原量が腫瘍の進行度や患者の臨床経過と関連しているかどうか検討を行う。

### 4. 研究成果

選別した 27 症例中、石綿曝露を認めた肺癌症例(乾燥重量肺 1g あたり石綿小体を 1000 本以上検出した症例)は 15 例あり、最も多く石綿小体を検出した肺癌症例は乾燥重量肺 1g あたり石綿小体 58000 本認めた。同症例(症例 1)の血清を用いて SEREX 法にて 5 種類の抗原遺伝子を単離。遺伝子情報および文献からの検索ではこれら 5 種類の遺伝子と石綿の関連性の報告はなかった。しかし 5 種類の抗原遺伝子に対する血清反応を定性反応で比較検討したところ、Annexin A2 のみが石綿曝露歴のある肺癌症例のうち複数の症例で抗体反応を認めた。このため症例 1 における Annexin A2 の発現を Real time PCR 法を用いて検討したところ、症例 1 の癌組織では健常人の正常肺組織と比較して約 5 倍の Annexin A2 発現を認めた。さらに症例 1 の肺組織においても約 3 倍の Annexin A2 発現を認めた。また免疫染色では、症例 1 の癌部および非癌部でも、Annexin A2 高発現を認めた。以上の結果より、Annexin A2 が石綿関連肺癌に高発現することにより、石綿関連肺癌患者の液性免疫応答に認識されている可能性が示唆された。次に Real time PCR 法にて正常組織および腫瘍細胞で Annexin A2 の発現を検討した。20 種類の正常組織で検討したところ、心臓と胎盤で正常肺と比較し

て約1.3倍の発現を認めた。この1.3倍をカットオフラインとして腫瘍細胞株でのAnnexin A2の発現を比較検討したところ、肺癌細胞株では10種類中5細胞株、中皮腫細胞株で5種類中3細胞株にAnnexin A2高発現を認めた。次にELISA法でAnnexin A2に対する血清反応の検討を行った。cut-off値を健常人の平均値0.143に2倍の標準偏差(0.139x2)を足した0.421に設定したところ、27症例の石綿曝露歴を有する肺癌患者のうち10例(37%)が陽性反応を認めた(図1)。また胸膜中皮腫患者症例では15症例中8例(53%)で陽性反応を認めた(図1)。石綿曝露歴を有する肺癌症例でAnnexin A2発現と、Annexin A2に対する抗体反応との関係を検討した。27症例のうち、切除肺組織中の乾燥肺重量1gあたりの石綿小体を1000本以上認めた症例では、腫瘍組織だけでなく肺組織においても、1000本未満認めた症例の3倍以上のAnnexin A2発現を認めた。さらに石綿小体を1000本以上認めた症例では、15例中9例(60%)にAnnexin A2に対する抗体反応が陽性であった。さらに石綿曝露肺癌患者の液性免疫応答において認識されるAnnexin A2の発現との炎症性サイトカインであるIL-6との関連性の検討を行った。血清中のAnnexin A2抗体と血清中IL-6値を比較検討したところ、有意差を持ってAnnexin A2抗体陽性症例中の血清IL-6値は高値を認めた(図2)。切除肺組織中の乾燥肺重量1gあたりの石綿小体を1000本以上認めた症例と認めなかった症例での比較検討においては、血清IL-6値は差を認めなかった(図3)。このことより、石綿曝露肺癌患者において、炎症性サイトカインであるIL-6が発癌に関与している可能性が示唆された。また悪性胸膜中皮腫において、腫瘍マーカーとされている血清中のオステオポンチンについて、肺癌切除例244例の術前血清を用いてELISAにて測定を行ったところ、男性および扁平上皮癌の症例において有意に血清中オステオポンチン値の高値を認めた。また術後5年生存率については血清オステオポンチンの値が高い群は62.5%、低い群は81.7%と有意に予後不良であった。しかし、石綿曝露肺癌患者とその他の肺癌患者における血清中オステオポンチン値には、有意な差を認めなかった。現時点においては、血清中のオステオポンチンよりも、Annexin A2抗体の方が、石綿関連肺癌のバイオマーカーとして有用と考えられた。

まとめ：

(1) 当科で切除した肺癌症例における石綿曝露量を施行(切除乾燥肺重量1gあたりの石綿小体を検出)。石綿曝露症例(石綿小体1,000本以上)は15例あり、最も多く検出さ

れた症例は58,000本の石綿小体を認めた。  
 (2) 選別した高濃度石綿曝露肺癌症例の血清および当科で樹立した悪性胸膜中皮腫細胞株由来cDNA libraryを用いてSEREX法を施行し、5種類の抗原遺伝子を単離した。  
 (3) 1種類の抗原遺伝子(Annexin A2)は、塩基配列に変異を認めなかったが、自己正常肺組織と比較して肺癌組織で高発現を認めた。  
 (4) Real time PCR法にて正常組織および腫瘍細胞でAnnexin A2の発現を検討したところ、肺癌細胞株では10種類中5細胞株、中皮腫細胞株で5種類中3細胞株にAnnexin A2高発現を認めた。  
 (5) Annexin A2に対する血清反応をELISA法にて比較検討したところ、石綿小体を1,000本以上検出した肺癌症例において15例中9例(60%)、悪性胸膜中皮腫15例中8例(53%)の血清中に抗Annexin A2抗体を陽性として検出した(Fig. 1)。  
 (6) 検討した27症例のうち、切除肺組織中の乾燥肺重量1gあたりの石綿小体を1000本以上認めた症例では、腫瘍組織だけでなく肺組織においても、1000本未満認めた症例の3倍以上のAnnexin A2発現を認め、石綿小体を1000本以上認めた症例では、15例中9例(60%)にAnnexin A2に対する抗体反応が陽性であった。  
 (7) 血清IL-6値とAnnexin A2抗体発現は相関を認めたが、石綿曝露との相関は明らかではなかった。  
 以上より、Annexin A2は腫瘍細胞および石綿曝露肺組織での高発現により、石綿関連悪性腫瘍患者の液性免疫応答に認識されていると考えられ、石綿曝露症例の選別に寄与できる可能性が示された。

図1 石綿曝露肺癌患者、石綿非曝露肺癌患者、悪性胸膜中皮腫患者、健常人におけるAnnexin A2に対する血清抗体価

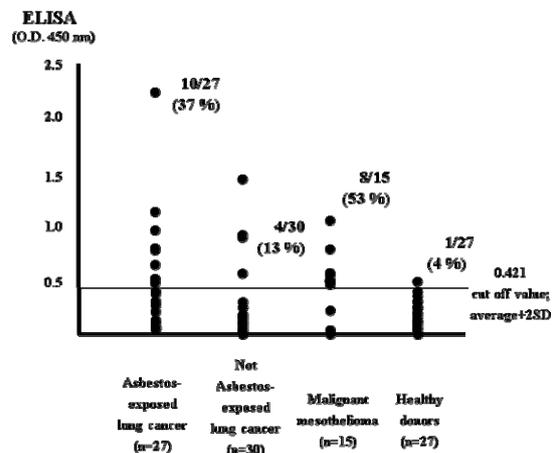


Fig.2 Annexin A2 に対する血清抗体価と血中 IL-6 濃度の関連性

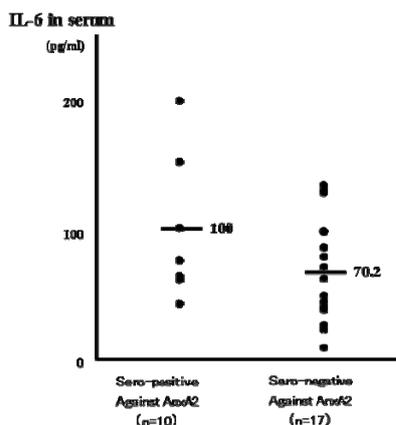
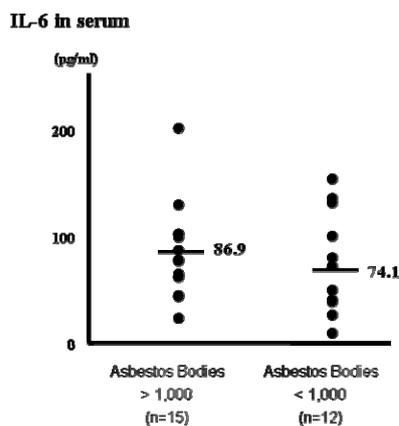


Fig.3 切除肺組織の石綿小体の本数と血中 IL-6 濃度の関連性



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yasuda M, Hanagiri T, Shigematsu Y, Onitsuka T, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, Ichiki Y, Uramoto H, Takenoyama M, Yasumoto K : Identification of a tumour associated antigen in lung cancer patients with asbestos exposure. *Anticancer Res* 30 : 2631-2639. 2010 査読有
- ② Yasuda M, Hanagiri T, Takenoyama M, Yasumoto K : Tumor antigens and

serological biomarkers for the diagnosis of asbestos-related malignancies. *Curr Res in Cancer* 4 : 39-40. 2010 査読無

- ③ Shigematsu Y, Hanagiri T, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, Ichiki Y, Yasuda M, Takenoyama M, Sugio K, Yasumoto K : Malignant mesothelioma-associated antigens recognized by tumor-infiltrating B cells and the clinical significance of the antibody titers. *Cancer Sci* 100 : 1326-1334. 2009 査読有 DOI: 0.1111/j.1349-7006.2009.01181.x
- ④ 近石泰弘, 安田学, 井上政昭, 花桐武志, 杉尾賢二, 安元公正 : 胸膜肺全摘後にネフローゼ症候群の改善を認めた悪性胸膜中皮腫の一例. *日呼外会誌* 23 : 986-991. 2009 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 竹中賢, 中川誠, 篠原伸二, 栗田泰治, 岡壮一, 近石泰弘, 重松義紀, 永田好香, 下川秀彦, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 田中文啓 : pN2-Ⅲ期非小細胞肺癌に対する外科切除例の検討. 第52回日本肺癌学会総会 大阪国際会議場 大阪. 2011年11月3-4日
- ② 花桐武志, 岡壮一, 馬場哲郎, 永田好香, 重松義紀, 下川秀彦, 浦本秀隆, 竹之山光広, 田中文啓 : 病理病期Ⅰ期原発性肺癌切除例における予後因子としての術前腫瘍マーカー. 第28回日本呼吸器外科学会総会 別府国際コンベンションセンター 別府. 2011年5月12-13日
- ③ 竹之山光広, 重松義紀, 馬場哲郎, 永田好香, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 田中文啓 : 悪性胸膜中皮腫に対す

る腫瘍特異的免疫応答の解析(第2報).  
第29回産業医科大学学会総会 産業医  
科大学ラマツイーホール 北九州. 2011  
年10月18日

- ④ 安田学, 花桐武志, 重松義紀, 馬場哲郎,  
下川秀彦, 永田好香, 小野憲司, 浦本秀  
隆, 竹之山光広, 安元公正: 石綿関連  
悪性疾患に対する新規バイオマーカー  
の探求. 第63回日本胸部外科学会定  
期学術集会 大阪国際会議場 大阪  
2010年10月24-27日
- ⑤ 安田学, 花桐武志, 水上真紀子, 塩田広  
宣, 黒田耕志, 重松義紀, 馬場哲郎, 永  
田好香, 宗哲哉, 市来嘉伸, 菅谷将一,  
浦本秀隆, 宗知子, 大賀丈史, 竹之山光  
広, 杉尾賢二, 安元公正: 肺癌に対す  
る新規抗体療法の開発. 第26回日本  
呼吸器外科学会総会 西日本総合展示  
場、北九州国際会議場 北九州 2009  
年5月14-15日
- ⑥ 安田学, 花桐武志, 黒田耕志, 鬼塚貴光,  
重松義紀, 馬場哲郎, 永田好香, 宗哲哉,  
小野憲司, 浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光  
広, 安元公正: 石綿関連肺癌に対する  
液性免疫応答の解析. 第13回日本が  
ん免疫学会総会 北九州国際会議場  
北九州 2009年6月24-25日
- ⑦ Hanagiri T, Yasuda M, Kuroda K,  
Shigematsu Y, Baba T, So T, Ono K,  
Uramoto H, So T, Takenoyama M,  
Yasumoto K, : The identification of  
tumor antigens associated with  
asbestos-related lung cancer. 13th  
World Conference on Lung Cancer W  
Hotel San Francisco, USA 2009年7月  
31-8月4日
- ⑧ 安田学, 花桐武志, 重松義紀, 黒田耕志,  
鬼塚貴光, 馬場哲郎, 宗哲哉, 小野憲司,

浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光広, 安元公  
正: 石綿関連悪性腫瘍(胸膜中皮腫、  
肺癌)に対する新規バイオマーカー.  
第63回日本呼吸器学会・日本結核病学  
会九州支部秋季学術講演会 北九州国  
際会議場 北九州 2009年11月26-27  
日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安田 学 (YASUDA MANABU)  
産業医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号: 50352307

### (2) 研究分担者

花桐 武志 (HANAGIRI TAKESHI)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30299614

竹之山 光広 (TAKENOYAMA MITUHIRO)  
産業医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号: 10309966