

労災疾病臨床研究事業費補助金

石綿関連胸膜疾患における個別化治療とケアの確立

平成 30 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤本 伸一

平成 31（2019）年 3 月

目 次

．総括研究報告

石綿関連胸膜疾患における個別化治療とケアの確立.....	1
------------------------------	---

研究代表者 藤本 伸一 岡山労災病院 腫瘍内科部長 / 呼吸器内科第二部長

．分担研究報告

1. 切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としてのシスプラチン、ペメトレキセドおよびニボルマブ併用化学療法の第 II 相試験.....	7
--	---

研究代表者 藤本 伸一 岡山労災病院 腫瘍内科部長 / 呼吸器内科第二部長

研究分担者 尾瀬 功 愛知県がんセンター研究所 がん予防医療研究領域 がん予防研究分野 主任研究員

研究分担者 青江 啓介 山口宇部医療センター 総括診療部 内科系診療部長

研究分担者 加藤 勝也 川崎医科大学 総合放射線医学 教授

研究分担者 岸本 卓巳 岡山労災病院 アスベスト疾患ブロックセンター長

研究分担者 上月 稔幸 四国がんセンター 臨床研究センター 臨床試験推進部 臨床試験支援室長

研究分担者 堀田 勝幸 岡山大学病院 新医療研究開発センター 臨床研究部 教授

(資料 1) 切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としてのシスプラチン、ペメトレキセドおよびニボルマブ併用化学療法の第 II 相試験 本治験実施計画の概要

2. 悪性胸膜中皮腫細胞株における葉酸代謝拮抗薬に応答する代謝変化解析.....	25
--	----

研究分担者 牧野嶋秀樹 国立がん研究センター 先端医療開発センター TI 分野 1ユニット長

研究協力者 佐藤 雄三 庄内地域産業振興センター がんメタボロミクス研究室 研究補助員

3. 石綿ばく露による免疫動態の変化とニボルマブ投与における免疫修飾の観察に向けての整備.....	29
---	----

研究分担者 大槻 剛巳 川崎医科大学 衛生学 教授

研究協力者 西村 泰光 川崎医科大学 衛生学 准教授

4. 石綿ばく露によるびまん性胸膜肥厚の著しい呼吸機能障害に関する研究.....	39
--	----

研究協力者 宮本 洋輔 岡山労災病院 呼吸器内科 医師

研究協力者 小阪 紀子 岡山労災病院 中央検査部 主任検査技師

研究分担者 尾瀬 功 愛知県がんセンター研究所 がん予防医療研究領域 がん予防研究分野 主任研究員

研究分担者 加藤 勝也 川崎医科大学 総合放射線科 教授 加藤勝也

研究分担者 岸本 卓巳 岡山労災病院 アスベスト疾患ブロックセンター長

研究代表者 藤本 伸一 岡山労災病院 腫瘍内科部長 / 呼吸器内科第二部長

．研究成果の刊行に関する一覧表.....	43
----------------------	----

．研究成果の刊行物・別刷	45
--------------------	----

・ 総括研究報告

労災疾病臨床研究事業費補助金
総括研究報告書

【石綿関連胸膜疾患における個別化治療とケアの確立】

研究代表者 藤本伸一 岡山労災病院 腫瘍内科部長 / 呼吸器内科第二部長

研究要旨

悪性胸膜中皮腫に対し、二次、三次治療として免疫チェックポイント阻害剤であるニボルマブが承認された。臨床的手法を用いてこれらの治療の初回化学療法における有用性を明らかにする必要がある、「切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としてのシスプラチン、ペメトレキセドおよびニボルマブの併用化学療法の第 II 相試験」を開始した。また今後使用例の増加が予想されるニボルマブに関し、その効果を予測するためのバイオマーカーの確立が必須と考え、悪性胸膜中皮腫症例に対するニボルマブを含む化学療法における包括的免疫病態の変化の観察に着手した。さらにニボルマブ使用例に限らず、悪性胸膜中皮腫の早期診断や他の薬剤を用いた化学療法におけるバイオマーカーの探索を目指し、メタボローム解析技術を用いた悪性胸膜中皮腫細胞の代謝産物プロファイルの解析に着手した。また著しい呼吸機能障害を伴うびまん性胸膜肥厚は良性疾患であるものの、予後不良で多大な苦痛を伴う疾患である。画像所見や呼吸機能検査のみでその重症度を評価することはしばしば困難であるため、6 分間歩行テストなどを用いた新たな呼吸機能障害の基準を提唱することとした。

研究分担者

岸本 卓巳：岡山労災病院
アスベスト疾患ブロックセンター
センター長
青江 啓介：山口宇部医療センター
総括診療部 内科系診療部長
大槻 剛巳：川崎医科大学
衛生学 教授
尾瀬 功：愛知県がんセンター研究所
がん予防医療研究領域
がん予防研究分野 主任研究員
加藤 勝也：川崎医科大学
総合放射線医学 教授
上月 稔幸：四国がんセンター
臨床研究センター臨床試験推進部
臨床試験支援室長
堀田 勝幸：岡山大学病院

新医療研究開発センター

臨床研究部 教授

牧野嶋秀樹：国立がん研究センター
先端医療開発センター
TI 分野 ユニット長

研究協力者

西村 泰光：川崎医科大学
衛生学 准教授
宮本 洋輔：岡山労災病院
呼吸器内科 医師
佐藤 雄三：庄内地域産業振興センター
がんメタボロミクス研究室
研究補助員
小阪 紀子：岡山労災病院
中央検査部 主任検査技師

A．研究目的

胸膜中皮腫に対する新たな治療法として、「切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としてのシスプラチン、ペメトレキセドおよびニボルマブ併用化学療法の第 II 相試験」を医師主導治験（以下本治験）として行う。ニボルマブを含む化学療法における包括的免疫病態の変化を観察し、化学療法の奏功を予測する免疫病態因子の確立を目指す。胸膜中皮腫における代謝産物プロファイルを解析することにより、抗がん剤の効果を予測し、患者を層別化できるバイオマーカーの発見を目指す。また石綿ばく露によるびまん性胸膜肥厚症例の新たな呼吸機能障害の基準として、6 分間歩行テストにおける認定基準を設けることを目的として、本研究を立案した。

B．研究方法

本治験では、外科的切除不能の進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫を対象とし、奏効率（中央判定）を主要評価項目として、ニボルマブの有効性を検討する。主目的は、切除不能の進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫に対し、初回化学療法としてシスプラチン（75 mg/m²）、ペメトレキセド（500 mg/m²）、ニボルマブ（360 mg/body）を 3 週間間隔で、最大 6 コース投与し、以後は中止基準に該当するまでニボルマブによる維持療法を 3 週間ごとに実施し、有効性および安全性を多角的に検討する。実施医療機関は、岡山労災病院、岡山大学病院、四国がんセンター、山口宇部医療センターの 4 施設である。実施可能性を考慮し、症例数は 18 例と設定した。

石綿による悪性胸膜中皮腫における免疫指標を包括的にスコアリングするため、胸膜ブランク、悪性中皮腫および健常人から末梢血を採取し、サイトカイン、単球・CD4 陽性細胞（Th）・CD8 陽性細胞（CTL）およびナチュラルキラー細胞（NK 細胞）の膜表面分子、遺伝子発現を観察した。また悪性胸膜中皮腫細胞株および患者由来細胞株を用いて、胸膜中皮腫細胞の代謝プロファイルと、葉酸代謝拮抗薬処理時の細胞内代謝産物プロファイルを解析した。

胸部単純写真および CT 検査にて労災認定基準を満たすびまん性胸膜肥厚と診断された症例において、呼吸機能検査として、肺機能検査 1

次（パーセント肺活量や 1 秒量、1 秒率など）・2 次（PaO₂ や AaDO₂ など）検査とともに 6 分間歩行テストを行う。6 分間歩行テストでは経皮的酸素飽和度（SpO₂）の最低値や歩行距離などをモニタリングする。

（倫理面への配慮）

本治験は治験実施計画書、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、医薬品、医療機器等の品質、有効性および安全性の確保等に関する法律第 14 条第 3 項、第 23 条の 25 第 3 項および第 80 条の 2 に規定する基準並びに「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（GCP）」（平成 9 年 厚生省令第 28 号）に則り実施するものとする。本治験は、実施に先立ち、各実施医療機関の治験審査委員会において、治験実施計画書、被験者の同意を得るのに使用される方法、治験薬概要書およびその他の必要な文書が審議され、本治験が倫理的および科学的に妥当であるかどうか、その他、本治験が実施医療機関において行うのに適当であるかどうかの審査を受ける。被験者の登録および症例報告書における被験者の特定はデータ・試料管理担当者によって、被験者識別コード等で行うなど連結可能匿名化を行う。原資料の直接閲覧・取り扱い等においては被験者のプライバシー保護に十分配慮する。患者試料、中央判定のための画像なども、同様に被験者識別コード等で行うとともに、他施設への試料の移送などに際しては、この被験者識別コード等にて識別する。

C．研究結果

本治験では 2018 年 1 月より症例登録を開始し、2019 年 3 月末の時点で 17 例の登録を得ており、予定期間内に症例集積を完了する予定である。これまでに登録、治療されている症例に関して、予期していなかった、あるいは併用療法によると思われる重大な有害事象は発生していない。

悪性胸膜中皮腫患者の末梢血免疫担当細胞における免疫指標としては、Th および CTL にて CXCR3 の発現低下、また中皮腫の Th で CTLA4 の発現亢進が認められた。またサイトカインでは、IFN α 2、MCP-1、IL-6、IL-8、IP-10G-CSF、GM-CSF などの主に炎症性サイト

カインの高値が観察された。

胸膜中皮腫細胞株を用いた実験では、ペメトレキセド感受性株である MSTO-211H 細胞、耐性株 NCI-H2452 細胞を用いてそれぞれの培養条件で代謝産物を抽出し、メタボローム解析を行ったところ、117 代謝産物の定量値が得られ、感受性株と耐性株で特徴的に違う代謝産物を示した。

D．考察

本研究は、「石綿関連胸膜疾患における個別化治療とケアの確立」を課題とし、以下の研究項目を掲げた。1．切除不能悪性胸膜中皮腫に対するシスプラチン、ペメトレキセドおよびニボルマブ併用化学療法の医師主導治験、2．石綿ばく露による免疫動態の変化とニボルマブ投与における免疫修飾の観察、3．悪性胸膜中皮腫細胞における細胞内代謝産物プロファイルの解析（メタボローム解析）4．びまん性胸膜肥厚における重症度を客観的に評価するための指標の作成、である。

悪性胸膜中皮腫に対する薬物治療としては、シスプラチン、ペメトレキセド療法が標準治療とされているがその治療成績は十分とは言えない。2018 年 8 月にニボルマブが化学療法既治療の悪性胸膜中皮腫に対して適応を取得し、新たな治療選択肢として大きく期待されているものの、初回化学療法としての有用性、既存の化学療法と併用する際の有用性と安全性、また奏効例あるいは有害事象の可能性のある症例をあらかじめ選択するためのバイオマーカーの確立など、解決すべき課題は山積している。またニボルマブが使用できるようになったものの抗腫瘍効果が得られる患者は限られており、引き続き新たな治療法の探索は急務である。さまざまな手法を駆使した基礎研究において胸膜中皮腫細胞の生物学的特性を解明していくことが重要である。本研究では、実際の患者を対象とする臨床試験に加え、本年度までに得られたヒト悪性胸膜中皮腫組織、胸水あるいは血液試料を用いたいわゆるトランスレーショナルリサーチの結果を基に、次年度以降本格的に悪性胸膜中皮腫の早期診断や治療に応用可能なバイオマーカーの探索に着手する。

また悪性胸膜中皮腫のほか、本研究では石綿

ばく露作業者に発症するびまん性胸膜肥厚にも着目した。著しい呼吸機能障害を伴うびまん性胸膜肥厚は良性疾患であるものの、予後不良で多大な苦痛を伴う疾患である。労災補償に際する著しい呼吸機能障害の評価において、日常生活動作における呼吸状態を客観的に評価する指標が必要である。職業性石綿ばく露歴があり、胸部画像検査でびまん性胸膜肥厚の認定基準を満たす症例を対象に、呼吸機能検査、動脈血ガス分析および 6 分間歩行テストやアンケート調査を行い、多角的に評価することで、6 分間歩行テストによる新たな呼吸機能障害の基準を設けることが可能だと考える。

E．結論

「切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としてのシスプラチン、ペメトレキセドおよびニボルマブ併用化学療法の第 II 相試験」を医師主導治験として開始した。

これまでの石綿ばく露に関連する免疫担当細胞の変化を総括し、今後の研究体制を整備した。また本年度の成果より、葉酸代謝拮抗薬の効果を予測できる代謝バイオマーカー発見の可能性が示唆された。次年度以降、代謝産物プロファイル解析、メタボローム解析を用いて悪性胸膜中皮腫の生物学的特性の解明を進める。石綿ばく露によるびまん性胸膜肥厚の著しい呼吸機能障害に関する研究についても企画、立案した。

F．健康危険情報

本治験における抗悪性腫瘍薬の使用に際しては製薬メーカーから提供される取扱情報に基づき適正に取り扱う。また実際の投与に際しては、厚生労働省労働基準局より発出された「発がん性等を有する化学物質を含有する抗がん剤等に対するばく露防止対策について」（基安化発 0529 第 1 号）に則り各施設で定められた抗がん剤ばく露対策マニュアルを遵守し、医師、薬剤師、看護師が薬剤にばく露しないようにする。また患者やその家族に対しても、薬剤の取り扱いに関する情報を周知する。

G．研究発表

1．論文発表

1) [Fujimoto N, Aoe K, Kozuki T, Oze I, Kato](#)

- K, Kishimoto T, Hotta K. A phase II trial of first-line combination chemotherapy with cisplatin, pemetrexed, and nivolumab for unresectable malignant pleural mesothelioma: A study protocol. Clin Lung Cancer. S1525-7304(18)30106-2. 2018
- 2) Shintani Y, Hasegawa S, Takuwa T, Aoe K, Kato K, Fujimoto N, Hida Y, Morise M, Moriya Y, Morohoshi T, Okumura M, Yoshino I. Prospective registry database of patients with malignant mesothelioma: directions for a future Japanese registry-based lung cancer study. J Thorac Dis. Mar;10(3):1968-1971. 2018
 - 3) 大塚義紀、宇佐美郁治、水橋啓一、岸本卓巳、坂本浩一、宮本顕二、木村清延、藤本伸一、加藤宗博、横山多佳子、太田千晴 . じん肺患者における好中球細胞質抗体 (ANCA) 陽性率の検討 —多施設共同横断的研究—. 日職災医誌 66:196-200, 2018
 - 4) 岸本卓巳、藤本伸一 . 胸膜中皮腫初診時の胸部 CT 画像の検討について . 労災疾病等医学研究 1 R1-1 . 日職災医誌 66:239-245 , 2018
 - 5) 大塚義紀、宇佐美郁治、水橋啓一、岸本卓巳、坂本浩一、宮本顕二、木村清延、藤本伸一、加藤宗博、横山多佳子、太田千晴 . 病歴データベースによるじん肺患者における ANCA (好中球細胞質抗体) 関連血管炎・腎疾患発症頻度の検討 . 日職災医誌 66 : 259-263 , 2018
 - 6) Sato Y, Matsuda S, Maruyama A, Nakayama J, Miyashita T, Udagawa H, Umemura S, Yanagihara K, Ochiai A, Tomita M, Soga T, Tsuchihara K, Makinoshima H. Front Pharmacol. Metabolic Characterization of Antifolate Responsiveness and Non-responsiveness in Malignant Pleural Mesothelioma Cells. Front Pharmacol. 12;9:1129. doi: 10.3389/fphar. 2018
- ## 2 . 学会発表
- 1) Fujimoto N, Aoe K, Kozuki T, Oze I, Kato K, Kishimoto T, Hotta K. Combination Chemotherapy with Cisplatin, Pemetrexed, and Nivolumab for Malignant Pleural Mesothelioma: A Trial in Progress. The 19th World Conference on Lung Cancer, Sep 23-26, 2018, Toronto, ON, Canada.
 - 2) 藤本伸一 . 胸膜中皮腫に対する免疫チェックポイント阻害剤 . 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会 . パネルディスカッション 4 「悪性胸膜中皮腫の治療」 . 平成 30 年 10 月 5 日、東京 .
 - 3) 青江啓介、岡田守人、木島貴志、加藤晃史、藤本伸一、中川和彦、竹田雄一郎、樋田豊明、金井一修、今村文生、大泉聡史、高橋利明、竹之山光広、田中洋史、大江裕一郎 . 2nd 又は 3rd ラインの悪性胸膜中皮腫を対象としたニボルマブの他施設共同非盲検非対照試験 . 第 16 回日本臨床腫瘍学会学術集会 . 2018 年 (平成 30 年) 7 月 19 日、神戸 .
 - 4) Nakano T, Okada M, Kijima T, Aoe K, Kato T, Fujimoto N, Nakagawa K, Takeda Y, Hida T, Kanai K, Imamura F, Oizumi S, Takahashi T, Takenoyama M, Tanaka H, Ohe Y. Long-Term Efficacy and Safety of Nivolumab in Second- or Third-Line Japanese Malignant Pleural Mesothelioma Patients (Phase II: MERIT Study). The 19th World Conference on Lung Cancer, Sep 23-26, 2018, Toronto, ON, Canada.
 - 5) 佐藤雄三、松田詩織、牧野嶋秀樹 . 葉酸代謝拮抗薬投与による悪性胸膜中皮腫における核酸代謝産物への影響 . 第 6 回がん代謝研究会 . ポスター . 2018 年 5 月 . 奄美大島 .
 - 6) 佐藤雄三、松田詩織、曾我朋義、富田勝、牧野嶋秀樹 . 葉酸代謝拮抗薬投与による悪性胸膜中皮腫における核酸代謝産物への影響 . 第 12 回メタボロームシンポジウム . ポスター . 2018 年 10 月 . 鶴岡市 .
 - 7) 牧野嶋秀樹 . がんにおける代謝を指標とし

たバイオマーカーの探索．第 12 回メタボ
ロームシンポジウム 口頭 2018 年 10 月．
鶴岡市．

- 8) 牧野嶋秀樹．がん細胞における核酸代謝の
役割．第 29 回日本消化器癌発生学会総会．
口頭．2018 年 11 月．東京．
- 9) 佐藤雄三、松田詩織、曾我朋義、富田勝、
牧野嶋秀樹．葉酸代謝拮抗薬投与による悪
性胸膜中皮腫における核酸代謝産物への
影響．第 41 回日本分子生物学会年会．ポ
スター．2018 年 11 月．横浜市．

H .知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1 . 特許取得

該当するものなし。

2 . 実用新案登録

該当するものなし。

3 . その他

特記すべき事項なし。

· 分担研究報告

労災疾病臨床研究事業費補助金
分担研究報告書

【切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としてのシスプラチン、
ペメトレキセドおよびニボルマブ併用化学療法の第 II 相試験】

研究代表者	藤本伸一	岡山労災病院 腫瘍内科部長 / 呼吸器内科第二部長
研究分担者	尾瀬 功	愛知県がんセンター研究所 がん予防医療研究領域 がん予防研究分野 主任研究員
	青江啓介	山口宇部医療センター 総括診療部 内科系診療部長
	加藤勝也	川崎医科大学 総合放射線医学 教授
	岸本卓巳	岡山労災病院 アスベスト疾患ブロックセンター長
	上月稔幸	四国がんセンター 臨床研究センター 臨床試験推進部 臨床試験支援室長
	堀田勝幸	岡山大学病院 新医療研究開発センター 臨床研究部 教授

研究要旨

悪性胸膜中皮腫は診断・治療ともに困難な疾患であり、診断から死亡に至るまでの生存期間中央値は 7.9 か月と予後不良である。化学療法治療歴のない悪性胸膜中皮腫の一次治療としてシスプラチンとペメトレキセドの併用療法が標準治療とされているが、同療法に抵抗性となった患者に対する確立した治療法はなく、新たな治療法の開発が切望されている。本研究では、抗 PD-1 抗体の有用性を検討するため「切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としてのシスプラチン、ペメトレキセドおよびニボルマブ併用化学療法の第 II 相試験」を医師主導治験として企画、立案し、治験を開始した。本年度内に症例集積をほぼ終了しており、今後データの解析に着手する予定である。

本試験は、悪性胸膜中皮腫に対する内科的治療において、医薬品の臨床試験に関する基準 (Good Clinical Practice, GCP) に準拠する国内で初めての医師主導の臨床試験であり、今後の新規治療法の開発において極めて重要である。

A. 研究目的

1. 治験の主目的

外科的切除不能の進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫に対し、初回化学療法として、シスプラチン (75 mg/m²)、ペメトレキセド (500 mg/m²)、ニボルマブ (360 mg/body) を 3 週間間隔で、最大 6 コース投与し、以後は中止基準に該当するまでニボルマブによる維持療法を 3 週間ごとに実施したときの有効性 (奏効率) を検討する。

2. 治験の副目的

設定した有効性の副次評価項目及び安全性の評価項目を用いて、外科的切除不能の進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫に対するシスプラチン、ペメトレキセドおよびニボルマブ併用化学療法の有効性及び安全性を多角的に検討する。

B. 研究方法

1. 対象

未治療の外科的切除不能の進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫患者

2. 選択基準

登録時に、下記のすべての基準を満たす被験者を選択する。なお、登録から3剤併用化学療法の初回投与前までに下記の基準を満たさないことが明らかとなった場合は、3剤併用化学療法の1コース目の投与を開始しない。

- 1) 年齢（同意取得時）：20歳以上
- 2) 病理学的に悪性胸膜中皮腫と診断された患者
- 3) 未治療の外科的切除不能の進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫患者
- 4) 登録前28日以内の画像診断において、CT又はMRIにより、Modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumours（RECIST）criteriaに定義される測定可能病変を一つ以上有する患者。ただし、測定可能病変が胸膜病変のみで胸膜癒着術の既往がある場合は、胸膜癒着術後の画像診断において測定可能病変を確認できた患者に限る。
- 5) PD-L1発現解析に用いる腫瘍組織（保存組織又は直近で採取した生検組織）を提供できる患者
- 6) Eastern Cooperative Oncology Group（ECOG）Performance Statusが0又は1の患者
- 7) 90日以上生存が期待される患者
- 8) 登録前7日以内に酸素補充を行わない状態で、安静時にパルスオキシメーターにて測定した経皮的酸素飽和度が94%以上の患者。
- 9) 登録前7日以内に実施した最新の臨床検査値が下記の基準を満たす患者。なお、検査日前14日以内に顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF製剤）の投与又は輸血を受けていない臨床検査値とする。
 - 好中球数が1,500/mm³以上
 - 血小板数が100,000/mm³以上
 - ヘモグロビンが9.0 g/dL以上
 - AST（GOT）及びALT（GPT）が施設

設基準値上限の3.0倍以下

総ビリルビンが施設基準値上限の2.0倍以下

クレアチニンが施設基準値上限以下かつクレアチニンクリアランス（Cockcroft/Gault式による推定値）が60 mL/minを超える。

- 10) 妊娠する可能性のある女性（化学閉経などの医学的理由により月経がない患者も含む）
- 11) 男性の場合、ニボルマブ投与開始後からニボルマブ最終投与後少なくとも7か月間（ニボルマブの5倍半減期と精子の代謝回転に要する期間の合計）の避妊に同意した患者、若しくは完全禁欲に同意した患者
- 12) 治験責任医師等より、本治験の内容について同意文書及び説明文書を用いて十分に説明を受け、自由意思により本治験参加に同意する患者

3. 除外基準

登録時に、下記のいずれかの基準に該当すると考えられる被験者は除外する。なお、登録から3剤併用化学療法の初回投与前までに下記のいずれかの基準に抵触した場合は、3剤併用化学療法の1コース目の投与を開始しない。

- 1) 抗体製剤を含む他の薬剤に対する高度の過敏反応の合併又は既往を有する患者
- 2) 自己免疫疾患の合併又は慢性的あるいは再発性の自己免疫疾患の既往を有する患者。ただし、全身療法を必要としない皮膚疾患（白斑、乾癬、脱毛症など）又は外的誘因の非存在下では再発すると考えられない疾患、ホルモン補充療法により対処可能な甲状腺機能低下症を合併している患者は登録可能とする。
- 3) 重複がんを有する患者（完全切除された基底細胞がん、Stage 0の有棘細胞がん、上皮内がん、粘膜内がん又は表在性膀胱がん、あるいは5年間以上再発が認められない他のがんの既往を有する患者は登録可能とする）
- 4) 脳又は髄膜に転移巣を有する患者。ただし、無症状かつ治療を必要としない患者は登録可能とする。また、本治験への登録の28

日以上前に同病巣に対する治療を終えて病状が安定しており、かつ本治験への登録の前 14 日間で全身性副腎皮質ホルモンの継続使用を要さない患者は登録可能とする。

- 5) 画像診断又は臨床所見により診断された間質性肺疾患若しくは肺線維症の合併又は既往を有する患者。ただし、放射線性肺臓炎については、線維化による安定化が確認され、再発の懸念がない患者は登録可能とする。
- 6) 憩室炎又は症候性消化管潰瘍疾患を合併している患者
- 7) 2 週間に 1 回を超える頻度で排水を必要とする胸水の貯留を認める患者
- 8) 治療を必要とする心嚢液又は腹水の貯留を認める患者
- 9) 腫瘍に関連する疼痛が安定せず、管理不能な患者
- 10) 登録前 180 日以内に一過性脳虚血発作、脳血管発作、血栓症又は血栓塞栓症（肺動脈塞栓症又は深部静脈血栓症）の既往を有する患者
- 11) 下記の管理不能又は重大な心血管疾患を有する患者
登録前 180 日以内の心筋梗塞
登録前 180 日以内の管理不能な狭心症
New York Heart Association(NYHA)
心機能分類 Ⅲ 度又は Ⅳ 度のうつ血性心不全
適切な治療にもかかわらず管理不能な高血圧（収縮期血圧 150 mmHg 以上又は拡張期血圧 90 mmHg 以上が 24 時間以上持続するなど）
管理不能な不整脈
- 12) 抗凝固療法（低用量アスピリンを含む抗血小板療法を除く）を受けている又はそれらを必要とする疾患を有する患者
- 13) 管理不能な糖尿病を合併している患者
- 14) 治療を必要とする全身性感染症を有する患者
- 15) HIV への感染が明らかな患者
- 16) HTLV-1 抗体検査、HBs 抗原検査又は HCV 抗体検査のいずれかが陽性の患者。

また、HBs 抗原検査が陰性であるが、HBs 抗体検査又は HBc 抗体検査のいずれかが陽性かつ HBV-DNA 定量が検出感度以上の患者

- 17) 過去にニボルマブ（MDX-1106 又は BMS-936558）、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-L2 抗体、抗 CD137 抗体、抗 CTLA-4 抗体又はその他の T 細胞制御を目的とした抗体療法若しくは薬物療法の前治療歴を有する患者
- 18) 登録前 14 日以内に局所又は表面麻酔を伴う手術療法を受けた患者
- 19) 登録前 28 日以内に全身麻酔を伴う手術療法を受けた患者
- 20) 登録前 14 日以内に胸膜癒着術を受けた患者（ピシバニールによるものを除く）
- 21) 登録前 28 日以内にピシバニールによる胸膜癒着術を受けた患者
- 22) 心膜癒着術あるいは腹膜癒着術の既往のある患者
- 23) 登録前 14 日以内に疼痛緩和を目的とした放射線療法を受けた患者
- 24) 登録前 56 日以内に放射性医薬品（検査及び診断を目的とした放射性医薬品の使用を除く）の投与を受けた患者
- 25) 登録前 28 日（抗体製剤の場合は 90 日）以内に他の未承認薬の投与（悪性胸膜中皮腫に対する効能・効果を有しない承認薬、臨床研究による投与や未承認の配合薬、新剤形薬も含む）を受けた患者
- 26) 登録前 28 日以内に全身性副腎皮質ホルモン（検査、アレルギー反応に対する予防投与又は放射線療法に伴う浮腫軽減などを目的とした一時的な使用を除く）又は免疫抑制剤の投与を受けた患者
- 27) 妊娠中、授乳中又は妊娠している可能性のある患者
- 28) 認知症の合併などにより同意能力を欠く状態であると判断される患者
- 29) その他、治験責任医師等が治験対象として不適当と判断した患者

4. 投与量及び投与方法

本治験は外科的切除不能の進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫を対象に、標準療法である PC

療法（シスプラチン、ペメトレキセド療法）にニボルマブを加えた3剤併用化学療法の有効性及び安全性を検討する多施設共同非盲検非対照試験である。本試験はスクリーニング期、治療期及び後観察期からなる。「選択基準」に示す基準を満たし、かつ「除外基準」に示す基準に該当せず、試験責任医師又は試験分担医師が本試験の対象として適格と判断した患者を組み入れる。

治療期は、「3剤併用化学療法期」と「ニボルマブ単独維持療法期」から構成される。初回投与は登録から7日以内に行う。3剤併用化学療法期では、シスプラチン（75 mg/m²）、ペメトレキセド（500 mg/m²）、ニボルマブ（360 mg/body）の用量を3週間間隔で静脈内投与する。3週間を1コースとして、2コース間隔で画像診断（CT/MRI など）を実施し、「3剤併用化学療法期の投与継続基準」に示す基準をすべて満たす被験者は3剤併用化学療法を4～6コース行う。3剤併用化学療法期を完了するか、若しくは3剤併用化学療法の投与中止基準のいずれかに該当する場合は、ニボルマブ単独維持療法期への移行基準を確認のうえ、ニボルマブ単独維持療法期に移行する。移行期は「ニボルマブ単独維持療法期の投与中止基準」のいずれにも該当しない場合、3週間間隔で継続可能である。ニボルマブ単独維持療法期に移行できない場合や移行例が「ニボルマブ単独維持療法期の投与中止基準」のいずれかに該当する場合は、後観察期に移行する。

5. 実施医療機関数

4施設（岡山労災病院、岡山大学病院、四国がんセンター、山口宇部医療センター）

6. 計画された被験者数とその根拠

国内で施行されたシスプラチン、ペメトレキセド併用療法における奏効率は36.8%と報告されている（Nakagawa et al. J J Clin Oncol 2008）。本試験を第II相試験として実施する場合、実施可能性を考慮のうえ、18例と設定した。本試験における奏効例数を5例～10例と想定すると、奏効率は35.7%～71.4%となるが、そのとき、奏効率の点推定値とExact法による下側信頼限界（信頼係数：両側90%）の幅は20%

～25%となる。必要被験者数の算出で算出した必要被験者から数名の被験者が早期脱落などにより評価不能となる可能性を考慮し、目標被験者数を18名とした。

7. 評価項目

1) 有効性の評価項目

主要評価項目

Modified RECIST criteria による奏効率（中央判定）

副次評価項目

- 奏効率（実施医療機関の医師による判定、Modified RECIST criteria）
- 奏効率（中央判定、Modified RECIST criteria）
- 病勢制御率（中央判定、Modified RECIST criteria）
- 全生存期間
- 無増悪生存期間（中央判定、Modified RECIST criteria）
- 奏効期間（中央判定、Modified RECIST criteria）
- 奏効に至るまでの期間（中央判定、Modified RECIST criteria）
- 最良総合効果（中央判定、Modified RECIST criteria）
- 標的病変の腫瘍径和の変化率（実施医療機関の医師による判定、Modified RECIST criteria）

2) 安全性の評価項目

有害事象

- 臨床検査（血液学的検査、生化学的検査、脾機能検査、血液凝固系検査、尿検査、免疫学的検査、ホルモン検査）
- バイタルサイン（収縮期血圧／拡張期血圧、脈拍数、体温）、体重
- 12誘導心電図
- 胸部X線
- ECOG performance status

3) QOL 評価

QOL（EQ-5D、LCSS-Meso）

4) 探索的評価項目

PD-L1 の免疫組織化学的解析

8. 治験実施期間

2018 年 1 月～2019 年 6 月 (18 か月)

登録期間と根拠

2018 年 1 月～2019 年 6 月 (18 か月)

1～2 例/月の登録を見込んで、上記期間に 18 例を集積する。

観察期

2018 年 1 月～2019 年 12 月まで (最終患者登録から 6 か月後まで)

(倫理面への配慮)

本治験は治験実施計画書、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律第 14 条第 3 項、第 23 条の 25 第 3 項及び第 80 条の 2 に規定する基準並びに「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令 (GCP)」(平成 9 年厚生省令第 28 号)に則り実施するものとする。本治験は、実施に先立ち、各実施医療機関の治験審査委員会において、治験実施計画書、被験者の同意を得るのに使用される方法、治験薬概要書及びその他の必要な文書が審議され、本治験が倫理的及び科学的に妥当であるかどうか、その他、本治験が実施医療機関において行うのに適当であるかどうかの審査を受ける。被験者の登録および症例報告書における被験者の特定はデータ・試料管理担当者によって、被験者識別コード等で行うなど連結可能匿名化を行う。原資料の直接閲覧・取り扱い等においては被験者のプライバシー保護に十分配慮する。患者試料、中央判定のための画像なども、同様に被験者識別コード等で行うとともに、他施設への試料の移送などに際しては、この被験者識別コード等にて識別する。

C. 研究結果

2018 年 1 月より症例登録を開始し、同年 12 月までに 15 例が登録された。予定した 18 例に達していないため登録期間を半年間延長し、2019 年 6 月までとした。2019 年 3 月末の時点で登録数は 17 例となっており、予定期間内に症例集積は完了する予定である。有効性の評価

は全例の登録が終了したのちに中央判定にて行う予定である。なおこれまでに登録、治療されている症例に関して、シスプラチン、ペメトレキセドおよびニボルマブに関連すると思われる既知の有害事象は出現しているものの、予期していなかった、あるいは併用療法によると思われる重大な有害事象は発生していない。

D. 考察

悪性胸膜中皮腫の発症原因は職業環境および生活環境から吸入した石綿 (アスベスト) との関連が高いことが知られており、石綿ばく露から約 30～50 年という非常に長い期間を経て発症するとされる。日本には中皮腫の登録制度がないため、悪性胸膜中皮腫の新規発症患者数は不明であるが、各種疫学情報などから、悪性胸膜中皮腫の年間罹患数は 1,500 人程度と推定されており、今後も増加することが予想されている。悪性胸膜中皮腫は診断・治療ともに困難な疾患であり、診断から死亡に至るまでの生存期間中央値は 7.9 か月と予後不良である。早期に診断された症例では外科的切除を中心に放射線療法、術後化学療法が施行されるものの、大半の症例が診断時には既に進行期に達しており、化学療法が第一選択となる。

悪性胸膜中皮腫に対する薬物治療としては、一次治療としてシスプラチン、ペメトレキセド療法が標準治療とされているがその治療成績は十分とは言えず、また同療法に抵抗性となった患者においては確立した治療法はなく、新たな治療法の開発が切望されている。

ニボルマブは、小野薬品工業株式会社とメダレックス社 (現、プリストル・マイヤーズ スクイブ社) が作製した、ヒト PD-1 (Programmed cell death-1) に対するヒト型モノクローナル抗体であり、小野薬品および BMS 社が臨床開発を進めている。国内で行われた臨床試験「2nd/3rd ラインの悪性胸膜中皮腫 (MPM) に対するニボルマブの第 Ⅲ 相試験 (MERIT 試験)」において、シスプラチンあるいはカルボプラチンとペメトレキセドの併用療法に不応又は不耐となった悪性胸膜中皮腫 34 例が登録された。患者背景は男/女 = 29/5, 年齢中央値 68 歳 (43-78 歳), PS0/1 = 13/21, 上皮/肉腫/二相 = 27/3/4, 前治療レジメン数 1/2 = 24/10 であった。観察期

間中央値 16.8 か月 (1.8-20.2 か月) の時点で奏効率は 29.4% (95%CI: 16.8-46.2) , 無増悪生存期間および全生存期間の中央値はそれぞれ 6.1 か月 (95%CI: 2.9-9.9) , 17.3 か月 (95%CI: 11.5-NR) であった。この結果に基づき、二次若しくは三次治療としてのニボルマブは有用な治療法であると結論づけられ、2018 年 8 月 21 日に「がん化学療法後に増悪した切除不能な進行・再発の悪性胸膜中皮腫」に対する適応を取得した。

本研究は、現在の標準治療であるシスプラチン、ペメトレキセド療法とニボルマブの併用によりさらなる治療効果の上乗せを期待し、初回化学療法における有効性および安全性を評価するものであり、大きな意義があるものと考ええる。また本試験は、悪性胸膜中皮腫に対する内科的治療において、医薬品の臨床試験に関する基準 (Good Clinical Practice, GCP) に準拠する国内で初めての医師主導の臨床試験であり、今後の新規治療法の開発において極めて重要である。

E . 結論

「切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としてのシスプラチン、ペメトレキセドおよびニボルマブ併用化学療法の第 Ⅲ 相試験」を医師主導試験として企画、立案した。すでに試験を開始しており、症例登録もほぼ完了している。

F . 健康危険情報

抗悪性腫瘍薬の使用に際しては製薬メーカーから提供される取扱情報に基づき適正に取り扱う。また実際の投与に際しては、厚生労働省労働基準局より発出された「発がん性等を有する化学物質を含有する抗がん剤等に対するばく露防止対策について」(基安化発 0529 第 1 号) に則り各施設で定められた抗がん剤ばく露対策マニュアルを遵守し、医師、薬剤師、看護師が薬剤にばく露しないようにする。また患者やその家族に対しても、薬剤の取り扱いに関する情報を周知する。

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Fujimoto N, Aoe K, Kozuki T, Oze I, Kato K, Kishimoto T, Hotta K. A phase II trial

of first-line combination chemotherapy with cisplatin, pemetrexed, and nivolumab for unresectable malignant pleural mesothelioma: A study protocol. Clin Lung Cancer. 2018 May 9. pii: S1525-7304(18)30106-2. doi: 10.1016/j.clcc.2018.05.001.

2 . 学会発表

- 1) Fujimoto N, Aoe K, Kozuki T, Oze I, Kato K, Kishimoto T, Hotta K. Combination Chemotherapy with Cisplatin, Pemetrexed, and Nivolumab for Malignant Pleural Mesothelioma: A Trial in Progress. The 19th World Conference on Lung Cancer, Sep 23-26, 2018, Toronto, ON, Canada.

H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当するものなし。

2. 実用新案登録

該当するものなし。

3. その他

特記すべき事項なし。

（資料１）

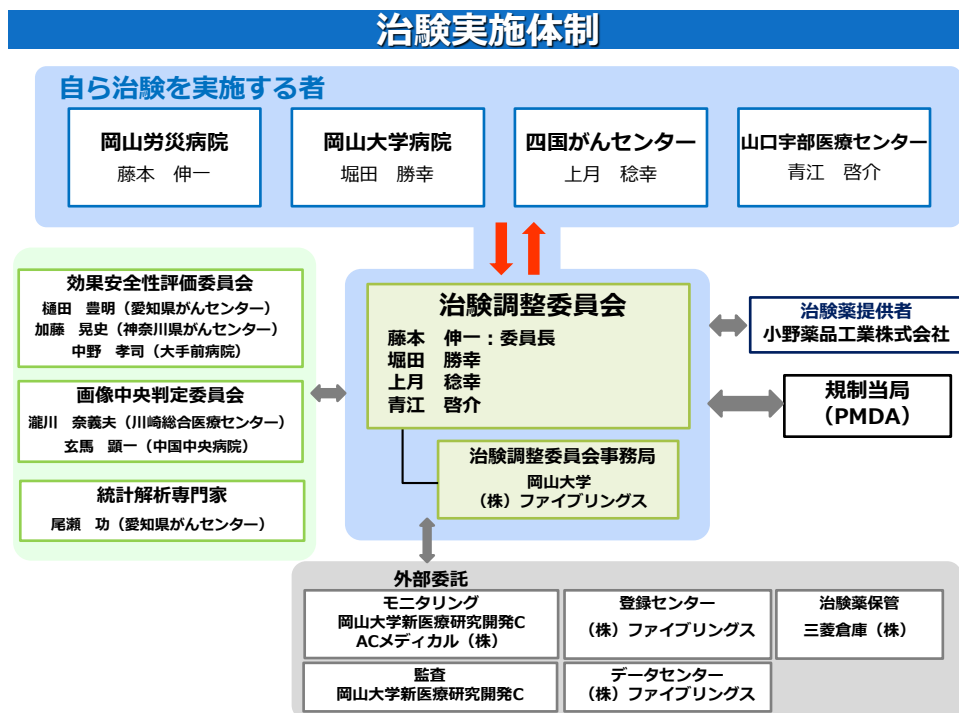
切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としてのシスプラチン、ペメトレキセド及びニボルマブ併用化学療法の第 II 相試験本治験実施計画の概要

切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としての シスプラチン、ペメトレキセド及びニボルマブ併用 化学療法の第II相試験

本治験実施計画の概要

2017年12月21日

1



治験実施計画の概要

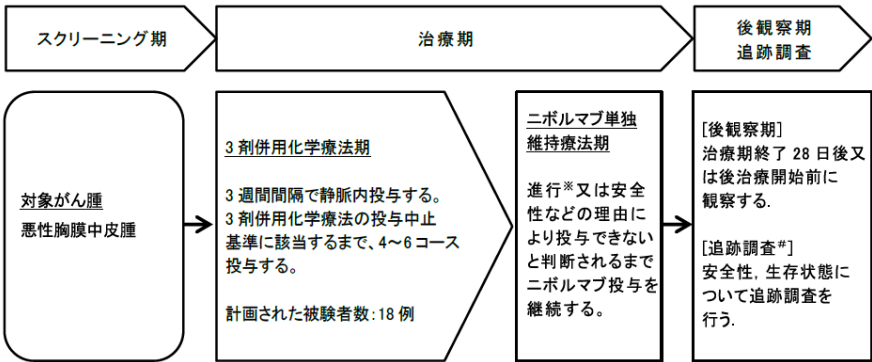
切除不能悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としてのシスプラチン、ペメトレキセド及びニボルマブ併用化学療法の第II相試験（治験実施計画書番号：JME-001）

フェーズ		第II相
目的		未治療の外科的切除不能の進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫に対する初回化学療法としての標準療法（シスプラチン、ペメトレキセド療法）にニボルマブを加えた3剤併用化学療法の有効性及び安全性について、多施設共同非盲検非対照試験により検討する。
評価項目	有効性の評価項目	主要評価項目 Modified RECIST criteriaによる奏効率（中央判定）
		副次評価項目 1) 奏効率（実施医療機関の医師による判定、Modified RECIST criteria） 2) 奏効率（中央判定、RECIST ガイドライン1.1版） 3) 病勢制御率（中央判定、Modified RECIST criteria） 4) 全生存期間 5) 無増悪生存期間（中央判定、Modified RECIST criteria） 6) 奏効期間（中央判定、Modified RECIST criteria） 7) 奏効に至るまでの期間（中央判定、Modified RECIST criteria） 8) 最良総合効果（中央判定、Modified RECIST criteria） 9) 標的病変の腫瘍径和の変化率（実施医療機関の医師による判定、Modified RECIST criteria）
	安全性の評価項目 1) 有害事象 2) 臨床検査（血液学的検査、生化学的検査、臓機能検査、血液凝固系検査、尿検査、免疫学的検査、ホルモン検査） 3) バイタルサイン（収縮期血圧／拡張期血圧、脈拍数、体温）、体重 4) 12誘導心電図 5) 胸部X線 6) ECOG Performance Status	
	QOL評価 QOL（EQ-5D、LCSS-Meso）	
	探索的評価項目 PD-L1の免疫組織化学的解析	
対象		未治療の外科的切除不能の進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫患者
目標症例数		18例
治験実施期間		2018年1月～2019年6月

3

治験実施計画の概要

治験デザイン



- ◆ 未治療、外科的切除不能、進行又は転移性悪性胸膜中皮腫
- ◆ ECOG PS:0 or 1
- ◆ Modified RECIST criteria に定義される
測定可能病変を有する
- ※：進行が確認された後でも、治験実施計画書に規定する状況下で投与を継続できる。
- ※：総合効果が CR, PR 又は SD と判定されたにもかかわらず、安全性の理由で治療期を終了した場合は、後治療期を開始するまで又は PD と判定されるまで画像診断を継続する。

4

治験実施計画の概要

投与量及び投与方法

1) 3剤併用化学療法期

シスプラチン（75 mg/m²）、ペメトレキセド（500 mg/m²）、ニボルマブ（360 mg/body）の用量を3週間間隔で静脈内投与する。

3剤併用化学療法期の投与継続基準をすべて満たす被験者に3剤併用化学療法を4～6コース行う。

3剤併用化学療法では、ニボルマブを30±10分かけて静脈内投与し、その約60分後にペメトレキセドを10±5分かけて静脈内投与、その後30分以上経過してからシスプラチンを60±20分かけて静脈内投与する。

2) ニボルマブ単独維持療法期

ニボルマブ（360 mg/body）の用量を3週間間隔で30±10分かけて静脈内投与する。ニボルマブ単独維持療法期の投与中止基準に該当しない場合は3週間間隔で継続可能である。

5

治験実施計画の概要

選択基準

- 1) 年齢（同意取得時）：20歳以上
- 2) 病理学的に悪性胸膜中皮腫と診断された患者
- 3) 未治療の外科的切除不能の進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫患者
- 4) 登録前28日以内の画像診断において、CT又はMRIにより、Modified RECIST criteriaに定義される測定可能病変を一つ以上有する患者。ただし、測定可能病変が胸膜病変のみで胸膜癒着術の既往がある場合は、胸膜癒着術後の画像診断において測定可能病変を確認できた患者に限る。
- 5) PD-L1発現解析に用いる腫瘍組織（保存組織又は直近で採取した生検組織）を提供できる患者
- 6) ECOG Performance Statusが0又は1の患者
- 7) 90日以上生存が期待される患者
- 8) 登録前7日以内に酸素補充を行わない状態で、安静時にパルスオキシメーターにて測定した経皮的酸素飽和度が94%以上の患者。
- 9) 登録前7日以内に実施した最新の臨床検査値が下記の基準を満たす患者。なお、検査日前14日以内に顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF製剤）の投与又は輸血を受けていない臨床検査値とする。
 - ・好中球数が1,500/mm³以上 ・血小板数が100,000/mm³以上 ・ヘモグロビンが9.0 g/dL以上
 - ・AST（GOT）及びALT（GPT）が施設基準値上限の3.0倍以下 ・総ビリルビンが施設基準値上限の2.0倍以下
 - ・クレアチニンが施設基準値上限以下かつクレアチンクリアランス（Cockcroft/Gault式による推定値）が60mL/minを超える。
- 10) 妊娠する可能性のある女性（化学閉経などの医学的理由により月経がない患者も含む）^{#1}の場合、同意取得時からニボルマブ最終投与後少なくとも5か月間（ニボルマブの5倍半減期と排卵周期の合計）の避妊^{#2}に同意した患者、若しくは完全禁欲に同意した患者。また、同意取得時からニボルマブ最終投与後少なくとも5か月間授乳しないことに同意した患者
- 11) 男性の場合、ニボルマブ投与開始後からニボルマブ最終投与後少なくとも7か月間（ニボルマブの5倍半減期と精子の代謝回転に要する期間の合計）の避妊^{#2}に同意した患者、若しくは完全禁欲に同意した患者
- 12) 治験責任医師等より、本治験の内容について同意文書及び説明文書を用いて十分に説明を受け、自由意思により本治験参加に同意する患者

#1：妊娠する可能性のある女性とは、初潮を経験しており、不妊手術（子宮摘出術、両側卵管結紮又は両側卵巢摘出術など）を受けておらず、閉経していない女性すべてが含まれる。閉経後の定義は、特筆すべき理由がないにもかかわらず、12か月以上連続して無月経であることとする。経口避妊薬又は子宮内避妊器具やバリア法などの機械的避妊法を使用している女性は妊娠する可能性があるものとみなす。

#2：避妊については、男性患者又は相手男性の精管切除若しくはコンドーム、あるいは女性患者又は相手女性の卵管結紮、避妊ベッサリー、子宮内避妊器具若しくは経口避妊薬のうち、いずれか2つによる二重避妊に同意する必要がある。

6

治験実施計画の概要

除外基準

- 1) 抗体製剤を含む他の薬剤に対する高度の過敏反応の合併又は既往を有する患者
- 2) 自己免疫疾患の合併又は慢性的あるいは再発性の自己免疫疾患の既往を有する患者。ただし、全身療法を必要としない皮膚疾患（白斑、乾癬、脱毛症など）又は外的誘因の非存在下では再発すると考えられない疾患、ホルモン補充療法により対処可能な甲状腺機能低下症を合併している患者は登録可能とする。
- 3) 重複がんを有する患者（完全切除された基底細胞がん、Stage I の有棘細胞がん、上皮内がん、粘膜内がん又は表在性膀胱がん、あるいは5年間以上再発が認められない他のがんの既往を有する患者は登録可能とする）
- 4) 脳又は髄膜に転移巣を有する患者。ただし、無症状かつ治療を必要としない患者は登録可能とする。また、本治験への登録の28日以上前に同病巣に対する治療を終えて病状が安定しており、かつ本治験への登録の前14日間で全身性副腎皮質ホルモン継続使用を要さない患者は登録可能とする。
- 5) 画像診断又は臨床所見により診断された間質性肺疾患若しくは肺線維症の合併又は既往を有する患者。ただし、放射線性肺炎について、線維化による安定化が確認され、再発の懸念がない患者は登録可能とする。
- 6) 憩室炎又は症候性消化管潰瘍疾患を合併している患者
- 7) 2週間に1回を超える頻度で排液を必要とする胸水の貯留を認める患者
- 8) 治療を必要とする心嚢液又は腹水の貯留を認める患者
- 9) 腫瘍に関連する疼痛が安定せず、管理不能な患者
- 10) 登録前180日以内に一過性脳虚血発作、脳血管発作、血栓症又は血栓塞栓症（肺動脈血栓症又は深部静脈血栓症）の既往を有する患者
- 11) 下記の管理不能又は重大な心血管疾患を有する患者
 - ・登録前180日以内の心筋梗塞
 - ・登録前180日以内の管理不能な狭心症
 - ・New York Heart Association (NYHA) 心機能分類Ⅲ度又はⅣ度のうつ血性心不全
 - ・適切な治療にもかかわらず管理不能な高血圧（収縮期血圧150mmHg以上又は拡張期血圧90mmHg以上が24時間以上持続するなど）
 - ・管理不能な不整脈
- 12) 抗凝固療法（低用量アスピリンを含む抗血小板療法を除く）を受けている又はそれらを必要とする疾患を有する患者
- 13) 管理不能な糖尿病を合併している患者
- 14) 治療を必要とする全身性感染症を有する患者

7

治験実施計画の概要

除外基準（続き）

- 15) HIVへの感染が明らかな患者
- 16) HTLV-1抗体検査、HBs抗原検査又はHCV抗体検査のいずれかが陽性の患者。また、HBs抗原検査が陰性であるが、HBs抗体検査又はHBc抗体検査のいずれかが陽性かつHBV-DNA 定量が検出感度以上の患者
- 17) 過去にニボルマブ（MDX-1106又はBMS-936558）、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CD137抗体、抗CTLA-4抗体又はその他のT細胞制御を目的とした抗体療法若しくは薬物療法の前治療歴を有する患者HIVへの感染が明らかな患者
- 18) HTLV-1抗体検査、HBs抗原検査又はHCV抗体検査のいずれかが陽性の患者。また、HBs抗原検査が陰性であるが、HBs抗体検査又はHBc抗体検査のいずれかが陽性かつHBV-DNA 定量が検出感度以上の患者
- 19) 過去にニボルマブ（MDX-1106又はBMS-936558）、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CD137抗体、抗CTLA-4抗体又はその他のT細胞制御を目的とした抗体療法若しくは薬物療法の前治療歴を有する患者
- 18) 登録前14日以内に局所又は表面麻酔を伴う手術療法を受けた患者
- 19) 登録前28日以内に全身麻酔を伴う手術療法を受けた患者
- 20) 登録前14日以内に胸膜癒着術を受けた患者（ピシノニールによるものを除く）
- 21) 登録前28日以内にピシノニールによる胸膜癒着術を受けた患者
- 22) 心膜癒着術あるいは腹膜癒着術の既往のある患者
- 23) 登録前14日以内に疼痛緩和を目的とした放射線療法を受けた患者
- 24) 登録前56日以内に放射性医薬品（検査及び診断を目的とした放射性医薬品の使用を除く）の投与を受けた患者
- 25) 登録前28日（抗体製剤の場合は90日）以内に他の未承認薬の投与（悪性胸膜中皮腫に対する効能・効果を有しない承認薬、臨床研究による投与や未承認の配合薬、新剤形薬も含む）を受けた患者
- 26) 登録前28日以内に全身性副腎皮質ホルモン（検査、アレルギー反応に対する予防投与又は放射線療法に伴う浮腫軽減などを目的とした一時的な使用を除く）又は免疫抑制剤の投与を受けた患者
- 27) 妊娠中、授乳中又は妊娠している可能性のある患者
- 28) 認知症の合併などにより同意能力を欠く状態であると判断される患者
- 29) その他、治験責任医師等が治験対象として不適当と判断した患者

8

治験実施計画の概要

治験スケジュール

項目			スクリーニ ング期 ¹	治療期					後観察期	追跡調査期		
				3剤併用化学療法期			ニボルマブ単剤 維持療法期	治療期 終了時 ² (中止時) ²			治療期終 了 28日後 ^{2,3}	追跡調査
				コース1		コース2-6						
試験日				1日目 投与前	投与後	8日目	1日目	1日目				
採用幅(日)			-7~0	1		±3 (5日目 ~11日目)	0~+2 (前コース 22日目~24日目)	±3 (前コース19 日目~25日目)	±3	±7	—	
文書同意取得/登録			○ ⁴									
患者背景/選択/除外基準			○									
治療薬投与 ⁴				○			○	○				
ウイルス検査			○									
妊娠検査 ⁷			○									
Performance Status			○	○			○ ⁶	○ ⁶	○	○		
診察/バイタルサイン/体重			○	○	○ ⁷	○ ⁷	○ ⁶	○ ⁶	○	○		
12誘導心電図			○	○			○ ⁶	○ ⁶	○	○		
臨床検査	一般血液検査	血液学的検査	○			○	○ ⁶	○ ⁶	○	○		
		生化学的検査	○			○	○ ⁶	○ ⁶	○	○		
		腎機能検査	○				○ ⁶	○ ⁹	○	○		
		血液凝固系検査	○			○	○ ⁶	○ ⁶	○	○		
		尿検査	○			○	○ ⁶	○ ⁶	○	○		
		腫瘍マーカー	○				○ ⁶	○ ⁹	○	○		
	心筋マーカー	○				○ ⁶	○ ⁹	○	○			
		免疫学的検査/ホルモン検査	○				○ ⁶	○ ⁹	○	○		
	胸部X線 ¹⁰		○				○ ⁹	○ ⁹	○	○		
	PD-L1発現解析(腫瘍組織) ⁸		○									
画像解析(CT/MRI) ¹¹		○ ¹²				○ ⁹	○ ⁹	○	○	○ ¹³		
QOL/EQ-5D/LCSS-Meso) ¹⁴			○				○ ⁹	○ ⁹	○	○		
併用治療/有害事象 ¹⁵											○ ¹⁶	
転帰調査											○ ¹⁷	

○：必須項目、※：中央測定

9

治験実施計画の概要

3剤併用化学療法期 1) 投与継続基準

毎回の投与開始時において、以下のすべての基準に合致しなければならない。

- 1) 好中球数が1,500 /mm³以上である。
- 2) 血小板数が100,000 /mm³以上である。
- 3) シスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブとの因果関係が否定できないGrade 3以上の非血液毒性を認めない。ただし、臨床症状を伴わないGrade 3のアミラーゼ増加及びリパーゼ増加の場合は、治験調整委員会と慎重に協議の上、投与継続を可能とする。
- 4) シスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブとの因果関係が否定できないGrade 2以上の下痢、大腸炎、クレアチニン増加又は神経毒性が発現していない。
- 5) シスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブとの因果関係が否定できない、投与開始前の結果から2-Grade以上のAST (GOT)、ALT (GPT) 又は総ビリルビンの上昇（例えば、Grade 1からGrade 3への上昇、又はGrade 0からGrade 2への上昇）を認めない。
- 6) Grade 2以上の間質性肺炎を認めない。*
- 7) 自己覚所見又は臨床検査などにより自己免疫疾患の発症が疑われていない。
- 8) 治験責任医師等により3剤併用化学療法が可能と判断される。

* 3剤併用化学療法期にGrade1の間質性肺炎が生じた場合、Grade0への回復、あるいはGrade1内での軽快が認められれば、治験調整委員会と慎重に協議の上、継続可能とする。

10

治験実施計画の概要

3剤併用化学療法期 2) 増量、減量、スキップ基準**① スキップ**

3剤併用化学療法期において、投与継続可否の判断時に以下の3剤併用化学療法期の投与継続基準投与継続基準に示す項目の一部を満たさない場合、全てを満たすまで同療法をスキップする。

ただし、スキップ中、下記1)～3)のすべての基準に合致する場合は、治験調整委員会と慎重に協議の上、ニボルマブの単独投与による治療継続を可能とする。早急にニボルマブの投与が必要と判断される場合に限り、治験調整委員会への事後報告を許容する。この場合、治験責任医師等は、ニボルマブの単独投与による治療継続を開始する前に、被験者の治療継続の意思を確認した上で診療記録に記録を残すこととする。

- 1) 病勢進行によると判断される臨床症状の悪化を認めない。
- 2) 投与継続による臨床的ベネフィットが期待される。
- 3) 被験者のベースラインを考慮して安全にニボルマブの投与を継続可能と判断される。

なお、抗腫瘍効果を判定するための画像診断や安全性評価などは、3剤併用化学療法の投与の有無にかかわらず、スケジュールに従って実施する。

11

治験実施計画の概要

3剤併用化学療法期 2) 増量、減量、スキップ基準**② 減量基準**

➤ ニボルマブ

用量の変更は行わない。(3剤併用化学療法期及びニボルマブ単独維持療法期に共通)

➤ 化学療法(ペメトレキセド、シスプラチン)

表を参考に減量する。化学療法を減量した場合、頻回に臨床検査を繰り返すなど被験者の安全性を十分に配慮する必要がある。その後も同じ用量又は更に減量された用量で治療を継続し、用量の増量は行わないこととする。ただし、被験者の臨床状況が表の規定内容にそぐわないと治験責任医師等が判断する場合、治験調整委員会との相談を介して、記述以外の対応を行うことを許容する。

化学療法の用量減量

用量レベル	ペメトレキセド	シスプラチン
開始用量	500mg/m ²	75mg/m ²
1次減量	375mg/m ²	60mg/m ²
2次減量	3剤併用化学療法を中止	

化学療法の減量基準

有害事象	ペメトレキセド	シスプラチン
グレード3以上の発熱性好中球減少症	1用量レベル減量	1用量レベル減量
グレード3以上の血小板数減少	1用量レベル減量	1用量レベル減量
グレード3以上の下痢	1用量レベル減量	1用量レベル減量
グレード2以上の知覚異常	変更なし	1用量レベル減量
1.5mg/dLを超える血清クレアチニン値	1用量レベル減量	1用量レベル減量
その他、シスプラチンあるいはペメトレキセドとの因果関係が否定できない、グレード3以上の有害事象、あるいは、忍容不能なグレード2の有害事象	1用量レベル減量考慮	1用量レベル減量考慮

12

治験実施計画の概要

3剤併用化学療法期 3) 投与中止基準

下記の基準のいずれかに該当した被験者は、予定された3剤併用化学療法の投与を中止する。

- 1) 1回の化学療法の減量にもかかわらず有害事象の発現により、2回目の減量が必要と判断された。
- 2) Modified RECIST criteriaに従い、治験責任医師等により総合効果がPDと判定された。
- 3) 病勢進行によると判断される明らかな臨床症状の悪化により治療継続が不適切と判定された。
- 4) シスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブとの因果関係の有無にかかわらずGrade 2以上の間質性肺疾患が発現した、あるいは、Grade1の間質性肺疾患が発現し、軽快傾向がみられない。
- 5) 局所治療によりGrade 1以下に軽快しないシスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブとの因果関係が否定できないGrade 2以上の眼障害（眼痛又は視力低下）が発現した。
- 6) シスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブとの因果関係が否定できないGrade 3以上の気管支痙攣、神経毒性、過敏症反応、注入反応（発熱、悪寒、悪心、疼痛、頭痛、咳、そう痒又は発疹など）又はブドウ膜炎が発現した。
- 7) 有害事象の発現などにより、シスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブの最終投与日から6週間以内にシスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブが投与されなかった。ただし、副腎皮質ホルモンの投与量を漸減するために6週間を超えてスキップされる場合はこの限りではない。
- 8) 被験者又は被験者のパートナーの妊娠が判明した。
- 9) 併用禁止薬、併用禁止療法が必要となった。
- 10) 被験者が同意を撤回した。
- 11) 3剤併用化学療法開始後、不適格症例であると判明した。
- 12) 被験者の都合で必要な観察、検査の実施が不可能であることが判明した。
- 13) その他、有効性又は安全性を考慮して、治験による3剤併用化学療法の継続が適当でないと治験責任医師等により判断された。

13

治験実施計画の概要

3剤併用化学療法期 3) 投与中止基準（続き）

ただし、3剤併用化学療法期の投与中止基準1)、4)、7)、13)の基準に該当した場合は、その時点で問題となっている有害事象の軽快を確認し、被験者の安全性も十分に考慮した上で、ニボルマブ単独維持療法期への移行基準に従いニボルマブの単独投与による維持療法への移行の可否を判断する。

<3剤併用化学療法期 投与中止基準>（抜粋）

- 1) 1回の化学療法の減量にもかかわらず有害事象の発現により、2回目の減量が必要と判断された。
- 4) シスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブとの因果関係の有無にかかわらずGrade 2以上の間質性肺疾患が発現した、あるいは、Grade1の間質性肺疾患が発現し、軽快傾向がみられない。
- 7) 有害事象の発現などにより、シスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブの最終投与日から6週間以内にシスプラチン、ペメトレキセド又はニボルマブが投与されなかった。ただし、副腎皮質ホルモンの投与量を漸減するために6週間を超えてスキップされる場合はこの限りではない。
- 13) その他、有効性又は安全性を考慮して、治験による3剤併用化学療法の継続が適当でないと治験責任医師等により判断された。

14

治験実施計画の概要

3剤併用化学療法期 3) 投与中止基準（続き）

2)の基準にのみ該当した場合でも、治験責任医師等が以下に示す①～④のすべての基準に合致すると判断する場合には、治験調整委員会と慎重に協議の上、3剤併用化学療法を継続できる場合がある。投与継続によるベネフィットが期待され、早急に治験薬の投与が必要と判断される場合は、治験調整委員会への事後報告を許容する。この場合、治験薬の投与を継続することについて、治験薬の投与継続の前に被験者の治療継続の意思を確認し、診療録に記録を残すこととする。

- ① 急速な病勢進行を認めず、治験薬投与を継続することによる臨床的有用性が期待される。
- ② 3剤併用化学療法に対して忍容性がある。
- ③ ECOG Performance Status が安定している。
- ④ 治験による治療の継続により、病勢進行に伴う重大な合併症（脳転移など）に対する予防的介入を遅延させない。

なお、Modified RECIST criteriaに準じ、初回PD 後に治験による治療の継続を判断した時点の評価を起点として更なる進行（新病変を含むすべての測定可能病変の径和が更に20%以上増加した場合、新病変が出現した場合、非標的病変の明らかな増悪が認められた場合などと定義する）、あるいは、上記①～④のいずれかを満たさなくなった場合は、3剤併用化学療法を中止しなければならない。

<3剤併用化学療法期 投与中止基準>（抜粋）

2) Modified RECIST criteriaに従い、治験責任医師等により総合効果がPDと判定された。

15

治験実施計画の概要

ニボルマブ単独維持療法期への移行基準

3剤併用化学療法期に関して、以下の(1)(2)のいずれかに該当し、しかも治験責任医師等が、以下の移行基準①～④のすべてに合致すると判断する場合には、被験者の安全性も十分に考慮したうえで、ニボルマブ単独維持療法期に移行する。

- (1) 3剤併用化学療法期の投与が完了した場合
- (2) 3剤併用化学療法の投与中止基準において1)、4)、7)、13)の基準に該当して3剤併用化学療法の投与を中止し、なおかつ中止時点で問題となった有害事象の軽快を確認した場合

移行基準：

- ① 急速な病勢進行を認めず、ニボルマブ投与を継続することによる臨床的有用性が期待される。
- ② ニボルマブに対して忍容性がある。
- ③ ECOG Performance Statusが安定している。
- ④ 治験による治療の継続により、病勢進行に伴う重大な合併症（脳転移など）に対する予防的介入を遅延させない。

ニボルマブ単独維持療法期に移行しない場合は、治療期終了時（中止時）の評価を行い、後観察期に移行する。

16

治験実施計画の概要

ニボルマブ単独維持療法期 1) 投与継続基準

毎回の投与開始時において、以下のすべての基準に合致しなければならない。

- 1) ニボルマブとの因果関係が否定できないGrade 3以上の非血液毒性を認めない。ただし、臨床症状を伴わないGrade 3のアミラーゼ増加及びリパーゼ増加の場合は、治験調整委員会と慎重に協議の上、投与継続を可能とする。
- 2) ニボルマブとの因果関係が否定できないGrade 2以上の下痢、大腸炎、クレアチニン増加又は神経毒性が発現していない。
- 3) ニボルマブとの因果関係が否定できない、3剤併用化学療法の投与開始前の結果から2-Grade以上のAST (GOT)、ALT (GPT) 又は総ビリルビンの上昇（例えば、Grade 1からGrade 3への上昇、又はGrade 0からGrade 2への上昇）を認めない。
- 4) ニボルマブ単独維持療法期への移行基準を満たしている。
- 5) Grade 2以上の間質性肺炎を認めない。*
- 6) 自他覚所見又は臨床検査などにより自己免疫疾患の発症が疑われていない。
- 7) 治験責任医師等によりニボルマブの投与が可能と判断される。

* ニボルマブ単独維持療法期にGrade1の間質性肺炎が生じた場合、Grade0への回復、あるいはGrade1内での軽快が認められれば、治験調整委員会と慎重に協議の上、継続可能とする。

ニボルマブ単独維持療法期において、投与継続可否の判断時にニボルマブ単独維持療法期の投与継続基準に示す項目の一部を満たさない場合、全てを満たすまで予定されたニボルマブの投与をスキップする。

17

治験実施計画の概要

ニボルマブ単独維持療法期 2) 投与中止基準

ニボルマブ単独維持療法期において、下記の基準のいずれかに該当した被験者は治験によるニボルマブ単独維持療法を中止し、維持療法期終了時（中止時）の評価を行い、後観察期に移行する。なお、治験期間終了に伴い維持療法期を終了する場合は完了例とみなし、後観察期には移行せずに、維持療法期終了時の評価を行う。

- 1) Modified RECIST criteriaに従い、治験責任医師等により総合効果がPDと判定された
- 2) 病勢進行によると判断される明らかな臨床症状の悪化により治療継続が不適切と判定された。
- 3) ニボルマブとの因果関係の有無にかかわらずGrade 2以上の間質性肺疾患が発現した、あるいは、Grade1の間質性肺疾患が発現し、軽快傾向がみられない。
- 4) 局所治療によりGrade 1以下に軽快しないニボルマブとの因果関係が否定できないGrade 2以上の眼障害（眼痛又は視力低下）が発現した。
- 5) ニボルマブとの因果関係が否定できないGrade 3以上の気管支痙攣、神経毒性、過敏症反応、注入反応（発熱、悪寒、悪心、疼痛、頭痛、咳、そう痒又は発疹など）又はブドウ膜炎が発現した。
- 6) 有害事象の発現などにより、ニボルマブの最終投与日から6週間以内にニボルマブが投与されなかった。ただし、副腎皮質ホルモンの投与量を漸減するために6週間を超えてスキップされる場合はこの限りではない。
- 7) 被験者又は被験者のパートナーの妊娠が判明した。
- 8) 併用禁止薬、併用禁止療法が必要となった。
- 9) 被験者が同意を撤回した。
- 10) ニボルマブ単独維持療法の実施中、不適格症例であると判明した。
- 11) 被験者の都合で必要な観察、検査の実施が不可能であることが判明した。
- 12) その他、有効性又は安全性を考慮して、治験による治療の継続が適当でないと治験責任医師等により判断された。

18

治験実施計画の概要

ニボルマブ単独維持療法期 2) 投与中止基準（続き）

1)の基準にのみ該当した場合でも、治験責任医師等が以下に示す①～④のすべての基準に合致すると判断する場合には、治験調整委員会と慎重に協議の上、ニボルマブ単独維持療法を継続できる場合がある。投与継続によるベネフィットが期待され、早急にニボルマブの投与が必要と判断される場合は、治験調整委員会への事後報告を許容する。この場合、ニボルマブの投与を継続することについて、ニボルマブの投与継続の前に被験者の治療継続の意思を確認し、診療録に記録を残すこととする。

- ① 急速な病勢進行を認めず、治験薬投与を継続することによる臨床的有用性が期待される。
- ② ニボルマブに対して忍容性がある。
- ③ ECOG Performance Status が安定している。
- ④ 治験による治療の継続により、病勢進行に伴う重大な合併症（脳転移など）に対する予防的介入を遅延させない。

なお、Modified RECIST criteriaに準じ、初回PD 後に治験による治療の継続を判断した時点の評価を起点として更なる進行（新病変を含むすべての測定可能病変の径和が更に20%以上増加した場合、新病変が出現した場合、非標的病変の明らかな増悪が認められた場合などと定義する）、あるいは、上記①～④のいずれかを満たさなくなった場合は、ニボルマブの投与を中止しなければならない。

<3剤併用化学療法期 投与中止基準>（抜粋）

- | |
|---|
| 1) Modified RECIST criteriaに従い、治験責任医師等により総合効果がPDと判定された。 |
|---|

19

治験実施計画の概要

後観察期

3剤併用化学療法を終了又は中止しニボルマブ単独維持療法期に移行できなかった被験者及びニボルマブ単独維持療法を終了*又は中止した被験者に対して、治療期終了時（中止時）の評価を行う。その後、後観察期に移行する。治療期終了時（中止時）の評価から28日後に、治験スケジュールに規定された観察・検査を実施し、それを以て後観察期を終了する。なお、治療期終了時（中止時）の評価から28日後より前に、臨床上の必要性から悪性胸膜中皮腫に対する後治療を開始する場合、後治療の開始前かつ可能な限り開始に近い時点で付録4に規定された観察・検査を実施し、それを以て後観察期を終了する。

* 治験期間終了に伴うニボルマブ単独維持療法の終了を指す。

追跡調査

転帰調査（死亡している場合は死亡日及び死因の確認）は、電話、FAX又は手紙などによる調査を可能とし、6～8週間間隔を目安にイベントの発生状況に応じて、随時追跡調査する。追跡調査中は、悪性胸膜中皮腫に対する後治療の有無、治療開始日及び治療内容についても可能な限り調査を行い、症例報告書に記入する。

20

治験実施計画の概要

併用禁止薬・療法

治験薬投与開始から後観察期終了までは、以下の治療法を禁止する。

- 1) 免疫抑制剤
- 2) 10 mg/日を超えるプレドニソロン相当量の副腎皮質ホルモン^{注1)}
- 3) 抗体製剤を含むすべての抗悪性腫瘍療法（化学療法、分子標的療法及び免疫療法など^{注2)}）
なお、3剤併用化学療法期のPC療法の併用は可とする。
- 4) 悪性腫瘍に対する手術療法
- 5) 腹膜癒着術、心膜癒着術及び胸膜癒着術
- 6) 腹水穿刺、心嚢穿刺及び2週間に1回を超える頻度の胸水穿刺^{注3)}
- 7) 放射線療法（化学放射線療法を含む）
- 8) 放射性医薬品^{注4)}
- 9) ビスホスホネート製剤及び抗RANKL抗体^{注5)}
- 10) 移植療法
- 11) 他の未承認薬（悪性胸膜中皮腫に対する効能・効果を有しない承認薬、臨床研究による投与や未承認の配合薬、新剤形薬も含む）

^{注1)}：副腎皮質ホルモンについては、外用、関節内投与、鼻腔内投与、点眼又は吸入などの局所投与、あるいは造影剤アレルギー又は有害事象などの治療、若しくは予防に対する一時的な使用は可能とする。ただし、ニボルマブとの因果関係が否定できない有害事象に対して副腎皮質ホルモンの全身投与を必要とするにもかかわらず、ニボルマブの投与継続を考慮する場合は治験調整委員会への連絡を必須とし、必要に応じてニボルマブの投与継続の可否を治験調整委員会と協議の上、決定することとする。

^{注2)}：ビンブエールなどの局所療法を含む。

^{注3)}：2週間に1回を超える頻度の胸水穿刺を必要とするにもかかわらず、ニボルマブの投与継続を考慮する場合は治験調整委員会への連絡を必須とし、ニボルマブの投与継続の可否を治験調整委員会と協議の上、決定することとする。

^{注4)}：検査及び診断を目的とした放射性医薬品の使用は可能とする。

^{注5)}：ビスホスホネート製剤及び抗RANKL抗体については、ニボルマブの初回投与前より使用している場合、可能な限り同一の用法・用量により継続して投与することは可能とする。

21

治験実施計画の概要

被験者の治験中止

被験者登録後に以下に該当することが判明した場合、直ちに当該被験者に対する治験を中止する。

- 1) 被験者より治験中止の申し出があった場合
- 2) 被験者の選択基準を満たしていないことが判明した場合
- 3) 被験者の除外基準に抵触することが判明した場合
- 4) 有害事象が発現のため治験の継続が困難と治験責任医師等が判断した場合
- 5) 病勢進行により治験の継続が適当でないと治験責任医師等が判断した場合
- 6) 併用禁止薬の投与、併用禁止療法の施行が必要となった場合
- 7) 必要な観察、検査の実施が不可能であることが判明した場合
- 8) 被験者又は被験者のパートナーが妊娠した場合
- 9) その他、治験責任医師等が治験を中止すべきと判断した場合

上記に定める基準のいずれかに該当した場合、直ちに治験を中止し、治験責任医師等は適切な処置を実施し、可能な限り中止時の臨床症状及び他覚所見などについて観察・測定を行う。更に、中止日、中止理由、中止後の処置及び経過などを症例報告書に記入し、治験調整委員会事務局へ速やかに連絡する。来院予定日に来院せず、治験薬の投与ができなくなった場合には、治験責任医師等はその理由とその後の経過について、可能な限り追跡調査を行い、被験者の状況を確認し、その内容を症例報告書に記入する。

22

【悪性胸膜中皮腫細胞株における葉酸代謝拮抗薬に応答する代謝変化解析】

研究分担者 牧野嶋秀樹 国立がん研究センター 先端医療開発センター
TI 分野 ユニット長

研究協力者 佐藤 雄三 庄内地域産業振興センター
がんメタボロミクス研究室 研究補助員

研究要旨

メタボローム解析技術を用いたメタボローム解析は、オーミクス解析の一つで、疾患における初期診断や薬剤に対するバイオマーカーに応用可能な生体内の代謝産物量を網羅的に測定することが可能である。悪性胸膜中皮腫の早期診断や臨床で治療に使用されている抗がん剤に対するバイオマーカーの探索を目指し、悪性胸膜中皮腫細胞株における葉酸代謝拮抗薬処理時の、細胞内代謝産物プロファイル解析した。まず、葉酸代謝拮抗薬が良く効くあるいは効かない悪性胸膜中皮腫細胞株を同定した。そして、葉酸代謝拮抗薬の標的酵素の代謝経路で下流に位置する代謝産物を加えることにより、薬効が完全に消失した。この実験条件下でメタボローム解析を行った結果、葉酸代謝拮抗薬処理により悪性胸膜中皮腫細胞内で、一炭素代謝経路に関連するアミノ酸や核酸の代謝産物量に変化が観察された。

A．研究目的

質量分析計を用いる生体内の代謝産物を網羅的に解析するメタボローム解析技術は、400 以上におよぶ代謝産物を同定することができ、疾患の早期発見や患者の層別化を可能とするバイオマーカーを発見できる可能性を秘めている。

画像検査において胸膜中皮腫が疑われる場合、胸水細胞診や胸膜生検の病理診断が必要である。中皮腫は、組織学的に上皮型、肉腫型とその両者が混ざり合って存在する二相型の3種類に分けられ、病理診断は難しい現状である。血液検査で胸膜中皮腫を早期に発見する腫瘍マーカーの研究も進められているが、これまでのところ確実に診断する腫瘍マーカーは発見されていない。

胸膜中皮腫は非常に治療が難しい病気の一つで、化学療法では葉酸代謝拮抗薬のペメトレキ

セドとシスプラチンの併用療法である。しかし、実際にこの治療を受けた患者で奏効が認められる人は全体の30～40%にとどまり、現在では寛解にいたる効果は期待できない現状である。そこで、代謝産物プロファイル解析することにより、抗がん剤の効果を予測し、患者を層別化できるバイオマーカーの発見を最終的に目指している。

これらの最終目標に向けて、今年度は、悪性胸膜中皮腫細胞株および患者由来細胞株を用いて、胸膜中皮腫細胞の代謝プロファイルと葉酸代謝拮抗薬処理時の、細胞内代謝産物プロファイルを解析した。

B．研究方法

市販されている悪性胸膜中皮腫細胞株と国立がん研究センターで樹立された patient-

derived xenograft (PDX) で樹立された細胞を用いた。葉酸代謝拮抗薬はペメトレキセド (Pemetrexed, PMX) を用いて、薬剤感受性試験を行った。悪性胸膜中皮腫細胞の生存率をペメトレキセドの濃度を変化させ、それぞれの細胞生存率を測定した。ペメトレキセドの効果を標的分子の下流に存在する代謝産物、ピリミジン合成経路 TYMS の下流に存在するチミジン (THY) とプリン塩基新規合成経路 GART の下流に存在するヒポキサンチン (HXN) これら 2 つが含まれる溶液 (HT) を培養液に添加し、細胞の生存率を測定した。最後に、Phosphate Buffered Saline (PBS) をコントロールとし、PMX (1 μ M) 処理、PMX + HT の 3 条件で、それぞれ悪性胸膜細胞から代謝産物を抽出し、Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry (CE-MS) を用いて、メタボローム解析を行った。

(倫理面への配慮)

今年度の研究は、細胞株を用いた研究成果であり、ヒト由来検体を用いていないため、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

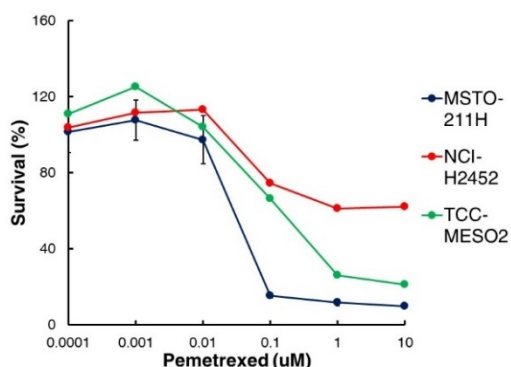


図1. ペメトレキセド濃度と生存曲線

ペメトレキセドに対する悪性胸膜中皮腫細胞株の感受性は、MSTO-211H 細胞に対しては高く、NCI-H2452 細胞に対しては低かった (上図)。そこで、MSTO-211H 細胞を感受性株、NCI-H2452 細胞を耐性株として、感受性株と耐性株の違いを明らかにする目的で、種々の実験を行った。

ペメトレキセドの標的分子は、一炭素 (1C)

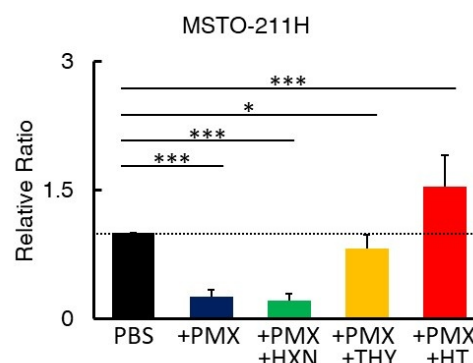
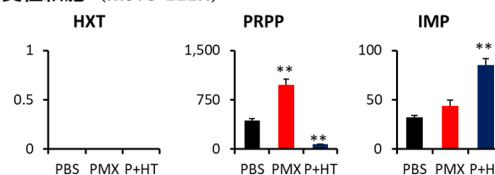


図2. 薬剤感受性と下流代謝産物の影響

代謝経路の DHFR、プリン塩基新規合成経路の GART、ピリミジン合成経路の TYMS の 3 種類の酵素である。MSTO-211H 細胞株では、コントロールの PBS 処理と比較して、葉酸代謝拮抗薬ペメトレキセド処理 (1 μ M PMX) により細胞の増殖が抑制される。PMX 存在時に、ピリミジン合成経路 TYMS の下流に存在するチミジン (16 μ M, THY) とプリン塩基新規合成経路 GART の下流に存在するヒポキサンチン (100 μ M, HXN) これら 2 つが含まれる溶液 (HT) を添加すると、THY 添加により PMX の薬効が大きく消失した (上図)。この結果は、ペメトレキセドがピリミジン合成経路を阻害することにより、悪性胸膜中皮腫の細胞増殖を抑制していることを示唆した。

感受性細胞 (MSTO-211H)



耐性細胞 (NCI-H2452)

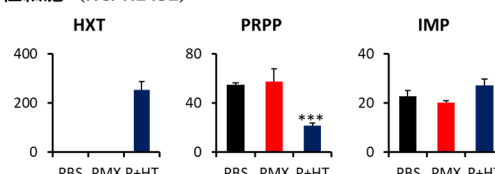


図3. 特徴的な代謝産物量の変化 (pmol/10⁶細胞)

ペメトレキセド感受性株である MSTO-211H 細胞、耐性株 NCI-H2452 細胞を用いてそれぞれの培養条件で悪性胸膜中皮腫細胞から代謝産物を抽出し、CE-MS を用いてメタボローム解析を行った。117 代謝産物の定量値が得られ、感受性株と耐性株で特徴的に違う代謝産物を示した（上図）。HXT は感受性細胞株ではすべての条件で検出されず、耐性株では HT を添加することにより検出された。ピリミジン塩基やプリン塩基のリボースの元になる PRPP は、感受性株では PMX 処理により蓄積するが耐性株では変化が観察されない一方、HT 添加の実験条件下では、感受性株と耐性株共に低下した。HXT と PRPP から産生される IMP は、感受性株でのみ細胞内濃度の上昇が観察された。

D. 考察

今回の研究では、葉酸代謝拮抗薬が良く効くあるいは効かない悪性胸膜中皮腫細胞株を同定し、葉酸代謝拮抗薬の標的酵素の代謝経路で下流に位置する代謝産物を加えることにより、薬効が完全に消失することを実証した。さらに、葉酸代謝拮抗薬処理下でメタボローム解析を行った結果、一炭素代謝経路に関連するアミノ酸、ピリミジン塩基やプリン塩基といった核酸の代謝産物量に変化が観察された。

これらの結果は、もし標的分子の下流に存在する核酸関連代謝産物、本研究で使用したような THY や HXT が、ヒト悪性胸膜中皮腫組織で高いレベルで存在する場合、葉酸代謝拮抗薬は効果がないことが予想される。つまり、腫瘍組織の代謝プロファイルと比較することにより、ペメトレキセドの効果が予想できるバイオマーカーの発見が期待される。

がんを対象としたメタボローム解析では、これまで多くの場合、上皮細胞由来の癌に関連するヒト検体が用いられてきた。石綿ばく露という発がん物質により、中皮細胞が増殖能を獲得し、腫瘍を形成する悪性胸膜中皮腫と上皮細胞由来の癌である腫瘍、それぞれの組織から代謝産物を抽出し、メタボローム解析を行うことは、発がんのメカニズム解明の一助となることが期待される。

今後は、ヒト悪性胸膜中皮腫組織、胸水あるいは血液試料を用いてメタボローム解析を実施

し、悪性胸膜中皮腫の早期診断や臨床で治療に使用されている抗がん剤に対するバイオマーカーの探索を目指す。

E. 結論

本研究結果より、葉酸代謝拮抗薬の効果を予測できる代謝バイオマーカー発見の可能性が示唆された。今後、倫理面に配慮しながら、ヒト患者由来の悪性胸膜中皮腫組織や胸水を集積し、代謝産物プロファイル解析、メタボローム解析が悪性胸膜中皮腫に対する TR 研究に貢献できることを明らかにしたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato Y, Matsuda S, Maruyama A, Nakayama J, Miyashita T, Udagawa H, Umemura S, Yanagihara K, Ochiai A, Tomita M, Soga T, Tsuchihara K, Makinoshima H. Metabolic Characterization of Antifolate Responsiveness and Non-responsiveness in Malignant Pleural Mesothelioma Cells. Front Pharmacol. 2018 Oct 12;9:1129.

2. 学会発表

- 1) 佐藤雄三、松田詩織、牧野嶋秀樹．葉酸代謝拮抗薬投与による悪性胸膜中皮腫における核酸代謝産物への影響．第 6 回がん代謝研究会．ポスター．2018 年 5 月．奄美大島
- 2) 佐藤雄三、松田詩織、曾我朋義、富田勝、牧野嶋秀樹．葉酸代謝拮抗薬投与による悪性胸膜中皮腫における核酸代謝産物への影響．第 12 回メタボロームシンポジウム．ポスター．2018 年 10 月．鶴岡市
- 3) 牧野嶋秀樹．がんにおける代謝を指標としたバイオマーカーの探索．第 12 回メタボロームシンポジウム．口頭 2018 年 10 月．鶴岡市
- 4) 牧野嶋秀樹．がん細胞における核酸代謝の役割．第 29 回日本消化器癌発生学会総会．口頭．2018 年 11 月．東京
- 5) 佐藤雄三、松田詩織、曾我朋義、富田勝、牧野嶋秀樹．葉酸代謝拮抗薬投与による悪性胸膜中皮腫における核酸代謝産物への影響．第 41 回日本分子生物学会年会．ポスター．2018 年 11 月．横浜市

G .知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

記載事項なし。

2. 実用新案登録

記載事項なし。

3. その他

特記すべき事項なし。

【石綿ばく露による免疫動態の変化とニボルマブ投与における 免疫修飾の観察に向けての整備】

研究分担者 大槻剛巳 川崎医科大学 衛生学 教授

研究協力者 西村泰光 川崎医科大学 衛生学 准教授

研究要旨

本研究班では、石綿関連胸膜疾患における個別化治療とケアの確立についての検討を実施することになるが、その中で、我々は前治療不応性悪性胸膜中皮腫症例に対するニボルマブを含む化学療法における包括的免疫病態の変化の観察を行い、可能な限り、ニボルマブを含む化学療法の奏功を予測する免疫病態因子の確立を目指すこととする。

本年度は、本研究の背景となるこれまでの石綿ばく露に関連する免疫担当細胞の変化の観察の総括を改めて行うとともに、今後の研究目的に合わせた整備（倫理申請を含む）を実施した。

A．研究目的

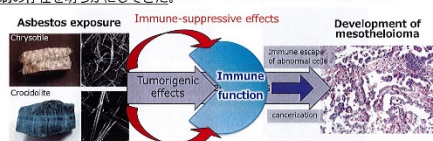
本研究班では、石綿関連胸膜疾患における個別化治療とケアの確立についての検討を実施することになるが、その中で、我々は前治療不応性悪性胸膜中皮腫症例に対するニボルマブを含む化学療法における包括的免疫病態の変化の観察を行い、可能な限り、ニボルマブを含む化学療法の奏功を予測する免疫病態因子の確立を目指すこととする。

B．研究方法

本研究班で実施する免疫動態の包括的解析手法について、従来、我々が検討してきた内容を改めて総括することとする。

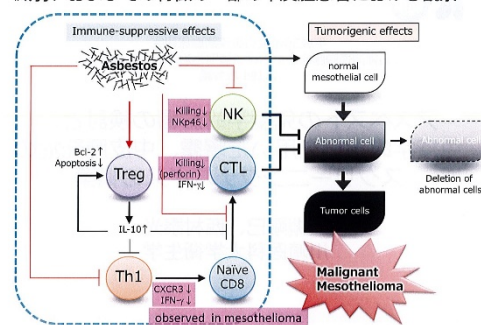
Hypothesis: 石綿曝露の免疫抑制作用および
その悪性中皮腫との関わり

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が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。それらの背景の下、我々は“石綿曝露の免疫機能影響”を提起し、これまでに石綿曝露と悪性中皮腫に関連した幾つかの免疫機能抑制の存在を明らかにしてきた。



上図に示すように石綿による中皮腫発癌の基盤の一つとして、免疫担当細胞への影響、特に腫瘍免疫への抑制が生じている可能性がある。

石綿曝露により引き起こされるTreg機能増強とNK・CTL機能の減弱、およびその特徴の一部の中皮腫患者における観察

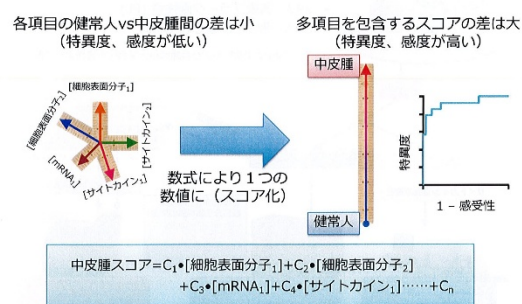


西村泰光ほか【レギュラトリート細胞の機能発現】制御性T細胞機能への
アスベスト曝露影響 臨床免疫・アレルギー科(1881-1930) 2014; 62(4):366-70.

詳細は省略するとして、石綿ばく露が、NK細胞、CTL（細胞傷害性T細胞＝CD8陽性T細胞）の機能抑制、さらに制御性T細胞に対しては機能亢進などを惹起することを報告してきた。これらの検討から、石綿ばく露者における何らかの免疫修飾が起こっていることが想定され

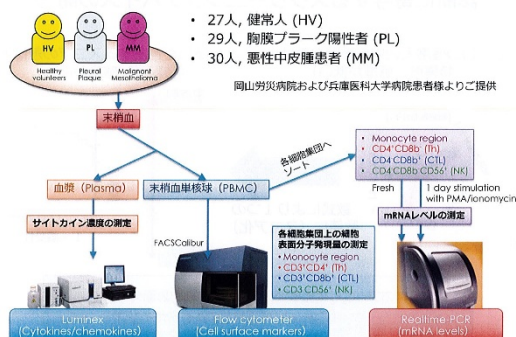
た。従来、単一の指標による中皮腫のバイオマーカーの報告は多くあるが、所謂、癌のバイオマーカーの場合には、腫瘍サイズとの関連が高く、再発の指標などには臨床的にも有効であるが、なかなか早期診断指標としては使用し難い側面がある。しかし、我々の検討では、胸膜ブランク症例でも何らかの変化を捉えることができおり、さらに下図のように幾つかの免疫指標を包括的にスコアリングすることで、特異度・感度を向上させることのできる可能性が想定された。

目的：免疫機能指標に基づく石綿曝露または中皮腫の診断に寄与するスクリーニングデバイスの開発



この仮定を基盤に、胸膜ブランク、悪性中皮腫および健康人から末梢血を採取し、サイトカイン(29種の解析)単球・CD4陽性細胞(Th)・CD8陽性細胞(CTL)およびNK細胞の膜表面分子、遺伝子発現(採取後と一晚PMA/イオノマイシンで刺激後)を観察した(下図)。

方法：末梢血を用いた包括的免疫機能解析



なお、解析した内容は下図のものである。これらの解析から、単独の因子としては、細

胞表面分子の発現量ではブランク、中皮腫ではThおよびCTLにてCXCR3の発現低下、また中皮腫のThでCTLA4の発現亢進が認められた。mRNAレベルでは、中皮腫のThとCTLでTNFαの高発現、中皮腫のNK細胞でNKp46の低下、また、Granzyme Bはブランクと中皮腫で比較して、後者での発現低下が観察された。

Surface molecules, mRNAs and cytokines assayed

Cells	Surface molecules	Notes	mRNAs in (a) cells	mRNAs in stimulated cells	Notes
CD4 ⁺ (Th)	CD25, CD49	Activated cell markers	Foxp3, T-bet, GATA-3, RORC	TNF-α, IFN-γ, TGF-β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A	Master regulators for Th1, Th2 and Th17
	CD25, GHR, CTLA-4	Regulatory markers			Cytokine production
	CXCR3	Migration for periphery/Th1 marker	IL-8, IL-18, IL-181		IL-1 family receptors/IL-181 as Th17 marker
	IL-181, IL181	IL-1 family receptors/IL-181 as Th17 marker			Anti-apoptotic gene
CD8 ⁺ (CTL)	CD25, CD49, HLA-DR	Activated cell markers	Notch1, EOMES, CEB3	Granzyme B, FasL	Differentiation regulators
	CD45RO	Effector/memory marker			Cytotoxicity
	CXCR3	Migration for periphery	IFN-γ	TNF-α, IFN-γ, IL-4	Cytokine production
	FasL	Cytotoxicity	IL-181, IL-181		IL-1 family receptors
CD56 ⁺ (NK)	CD49	Activated cell marker	NKp46	Granzyme B, FasL	Activating receptor
	NKG2D, NKp46	Activating receptors			Cytotoxicity
	CXCR3	Migration for periphery	TNF-α, IFN-γ		Cytokine production
	FasL	Cytotoxicity			
Monocyte	HLA-DR	Antigen presentation	TNF-α, IL-1β, IL-12p35, IL-18, IL-18, IL-23		Cytokine production
	CD80, CD86	Costimulatory molecules			

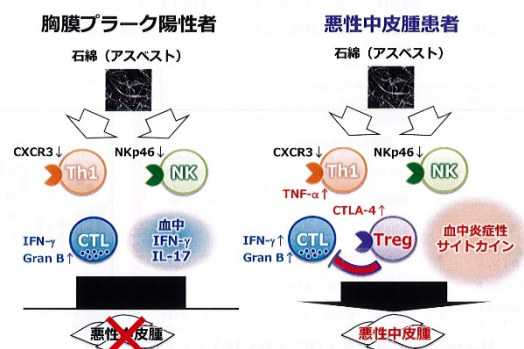
Plasma Cytokines

IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-α2, IFN-γ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, TNF-α and TNF-β

またサイトカインでは、ブランク症例でIFNγの高値、中皮腫症例でIFNα2、MCP-1、IL-6、IL-8、IP-10-G-CSF、GM-CSFなどの主に炎症性サイトカインの高値が観察された。

免疫病態という考え方では下図のように、胸膜ブランク症例ではCTLの高機能が生じており、Th1やNK細胞で観察される腫瘍免疫の低下(これは石綿ばく露全般で生じると想定される)を凌駕しているため、中皮腫発症には至らないが、その後炎症性サイトカインの高値などで、制御性T細胞機能の亢進も生じ、CTLを抑制する病態となって中皮腫発症の基盤形成が生じる可能性が考えられた。

包括的免疫機能解析結果のまとめと考察



また中皮腫(M)、胸膜ブランク(P)および

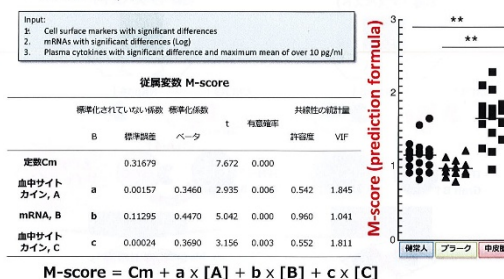
健康人をこれら2群(A:アスベストばく露)と判別するスコア化を重回帰分析を用いてみると、以下の図に示すように、それぞれMスコア、Pスコア、Aスコアとして、公式を創出することが可能となり、これらのROC曲線を描出してみると、感度・特異度ともに0.9前後という結果が得られた。さらに続く図でそれぞれの群への予測能も表出すると、良好な結果を得ることが出来た。

特報2015-84983

M-score：中皮腫に特徴的なスコア式

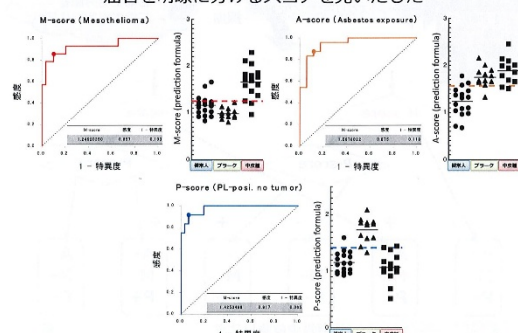
Malignant mesothelioma score

重回帰分析による悪性中皮腫関連因子の同定と予測式(M-score)の算出
 • HV and PL = 1, MM = 2



特報2015-84983

良好なROC曲線を示し中皮腫・石綿曝露者・石綿曝露非担癌者を明瞭に分けるスコアを見いだした



カットオフ値で陰性/陽性を判定した時の石綿曝露・悪性中皮腫・胸膜プラークの予測能

		Healthy	Plaque	Mesothelioma
A-score (for asbestos exposure) Cutoff value=1.5876022	A-	88.20% ^a (15/17)	8.30% ^b (1/12)	16.70% ^b (2/12)
	A+	11.80% ^a (2/17)	91.70% ^b (11/12)	83.30% ^b (10/12)
M-score (for mesothelioma) Cutoff value=1.2492035	M-	82.40% ^a (14/17)	100.00% ^a (12/12)	8.30% ^b (1/12)
	M+	17.60% ^a (3/17)	0.00% ^a (0/12)	91.70% ^b (11/12)
P-score (for plaque, no tumor) Cutoff value=1.4253498	P-	94.10% ^a (16/17)	8.30% ^b (1/12)	91.70% ^a (11/12)
	P+	5.90% ^a (1/17)	91.70% ^b (11/12)	8.30% ^a (1/12)
A-score M-score	others	94.10% ^a (16/17)	100.00% ^a (12/12)	25.00% ^b (3/12)
	A+,M+	5.90% ^a (1/17)	0.00% ^a (0/12)	75.00% ^b (9/12)

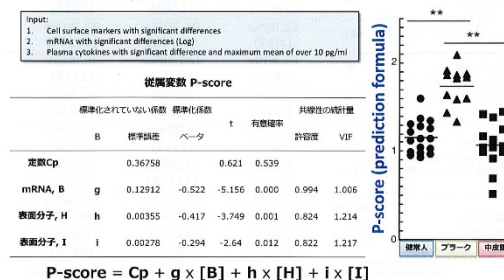
Each subscript character shows no statistical difference with p<0.05, analyzed by SPSS software with 2 test.

特報2015-84983

P-score：石綿曝露非担癌者に特徴的なスコア式

Plaque-positive no tumor score

重回帰分析による石綿曝露非担癌因子の同定と予測式(P-score)の算出
 • HV and MM = 1, PL = 2

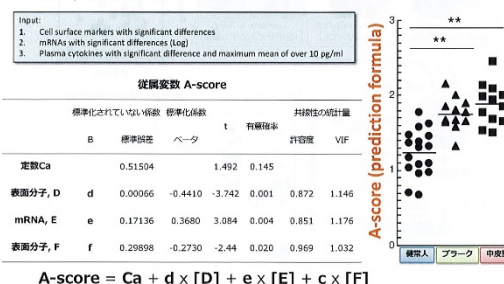


特報2015-84983

A-score：石綿曝露に特徴的なスコア式

Asbestos exposure score

重回帰分析によるアスベスト曝露関連因子の同定と予測式(A-score)の算出
 • HV = 1, PL and MM = 2



本研究課題では、これらのスコアを用いることによって、ニボルマブ投与前、投与後1週間、およびその後3か月毎（病態がPDと判断された場合には、その時点で最終の採血とし、SDからPR、CRの場合には、観察期間中、経時的に3か月毎のチェックを想定）の検討を行うこととしている。

（倫理面への配慮）

本研究については、解析主体である川崎医科大学衛生学・大槻を研究代表者として、研究課題名「前治療不応性悪性胸膜中皮腫症例に対するニボルマブを含む化学療法における包括的免疫病態の変化の観察」として、倫理申請を行った。

本研究課題では、血漿成分を、本班研究の分担研究者である牧野嶋秀樹博士のヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社へ受託契約を取り交わし（済）、二次利用として、血漿のメタボローム解析を実施する。

以下に、倫理申請計画書の一部を抜粋する。

1. 目的

悪性胸膜中皮腫症例の中で、がん化学療法後に増悪した切除不能な進行・再発の症例で、今後、ペメトレキセドとプラチナ製剤の併用療法に 2018 年 8 月に保険収載されたオブジーボを加えた抗がん化学療法を実施する症例において、オブジーボを含む化学療法開始前、開始後 5～7 日目、および効果判定時（初回治療から約 3 か月目、オブジーボは 2 週ごとの投与を想定している）もしくはそれより前に病態の変化が認められた時（主には PD: Progressive Disease の場合）の 3 回（SD: Stable Disease 以上であれば、引き続いて約 3 か月ごとの採血が収集される）を基盤として、包括的な免疫関連指標の測定とともに、血漿のメタボローム解析を実施。最終的には、悪性胸膜中皮腫におけるオブジーボの効果予測バイオマーカーの探索を目指す。

2. 対象

- 患者（ペメトレキセドとプラチナ製剤の併用療法に不応又は不耐で、前治療歴が 2 レジメンを越えない進行又は転移性の悪性胸膜中皮腫）
- その他（患者と年齢がほぼ合致する非担癌（中皮腫含む）・非石綿ばく露・非免疫疾患の高齢対照者）
募集において、患者および高齢対照者の自由意思によって登録されます。

胸膜中皮腫については、20 歳以上の症例として、保険収載されたオブジーボを使用するため、がん化学療法後に増悪した切除不能な進行・再発の悪性胸膜中皮腫の症例に限られる。なお、症例は

（独）労働者健康安全機構岡山労災病院、腫瘍内科・部長、藤本 伸一 医師

（独）労働者健康安全機構岡山労災病院、アスベスト疾患ブロックセンター・センター長、岸本 卓巳 医師、

（独）国立病院機構山口宇部医療センター、総括診療部・内科系診療部長、青江 啓介 医師、

（独）国立病院機構四国がんセンター、臨床研究センター臨床試験推進部・臨床試験支援室長、上月 稔幸 医師

によって経過観察されている、がん化学療法後に増悪した切除不能な進行・再発の悪性胸膜中皮腫症例で、今後、ペメトレキセドとプラチナ製剤の併用療法に保険収載されたオブジーボを加えた抗がん化学療法を実施する症例となる。

なお、対象の「その他」は中皮腫に対する高齢者対照との位置付けで、非担癌（中皮腫含む）・非石綿ばく露・非免疫疾患の高齢者となり、医療法人福嶋医院 福嶋・いるかグループ、理事長、福嶋 啓祐 医師により統括されている医療法人 福嶋医院 福嶋・いるかグループ（岡山県浅口市寄島）に入所あるいは通所している利用者となる。通所および入所の症例ということで、高血圧や糖尿病、あるいは脳梗塞後症候群などの既往もしくは現症を有する症例も含むこととする。条件としては、採血時点における非担癌（中皮腫含む）・非石綿ばく露・非免疫疾患（明らかなアレルギー疾患、および自己免疫疾患ならびに免疫不全状態（AIDS など）や免疫抑制剤投与中（ステロイド剤など））と規定する。

3. 健康人の募集方法

- ☐ 健康人を対象としない
- ☐ インターネット、ポスター掲示等による公募（場所： ）
- その他（具体的内容：上記「その他」の高齢対照者を健常対象者とするが、年齢的に疾病を有していない高齢者は希少となっているので、上記枠にて対照とする。）

4. 予定症例数と設定根拠

予定症例数： ■ 30 + 15 例

- がん化学療法後に増悪した切除不能な進行・再発の悪性胸膜中皮腫

（独）労働者健康安全機構岡山労災病院

（独）国立病院機構山口宇部医療センター

（独）国立病院機構四国がんセンター、

上記 3 施設において、30 例を目標とする。

- 患者と年齢がほぼ合致する非担癌（中皮腫含む）・非石綿ばく露・非免疫疾患の高齢対照者
医療法人 福嶋医院 福嶋・いるかグループ
上記施設にて 15 例を目標とする。

予定症例数の設定根拠：

臨床試験とは異なっているが、本研究の目的はがん化学療法後に増悪した切除不能な進行・再発の悪性胸膜中皮腫の症例に対してオブジーボを含む抗がん化学療法を実施し、その転機から、投与前の包括的免疫指標から、オブジーボの有効性を予測するバイオマーカーを検出することにある。よって、奏功（完全もしくは部分）、不変（SD）および増悪（PD）の3群となるにしても、例数は多いほどよい。

ただし、悪性胸膜中皮腫は希少がんであり、現在、年間1,000人強が、労災あるいは救済法で登録されているが、その中には死亡例も含まれており、加えて、今回の対象は初回治療例ではない。

加えて、現在の測定項目では、末梢血免疫担当細胞の亜群（単球、ナチュラルキラー（NK）細胞、Tヘルパー1細胞（Th1）、細胞傷害性T細胞（CTL））における膜表面分子の発現や新鮮時および一晩の *in vitro* でのリンパ球増殖刺激後の mRNA 発現を観察することを前提としており、この場合、採血から川崎医科大学衛生学に到着するのが、採血日同日である必要性（細胞の鮮度）がある。よって、労災疾病臨床研究補助金事業 藤本班（2018～2020年度）における臨床の施設（上記の3施設）は、この条件に適合していることになる。そして、これら3施設での適合症例の数を、過去実績から想定した。

その結果、解析可能ならびに臨床実績からの予定症例数となる。

なお、患者と年齢がほぼ合致する非担癌（中皮腫含む）・非石綿ばく露・非免疫疾患の高齢対照者については、オブジーボを含む抗がん化学療法前の悪性胸膜中皮腫症例における包括的免疫動態が、年齢がほぼ一致した非担癌（中皮腫含む）・非石綿ばく露・非免疫疾患の高齢対照者と同等か、もしくは異なっているか（中皮腫であること、さらに既にいくつかの抗がん剤も投与されている上に、担癌であることから）の検証を実施する目的での採取となり、悪性胸膜中皮腫例が30例を想定していることより、概ね、半数の例を想定した。

5. 方法

割付の有無とその方法、スケジュール、検査項目、調査項目、解析方法などを記載してください。

上記3病院施設における悪性胸膜中皮腫症例および1介護老人施設における高齢対照者の採血は朝、実施する。EDTA（抗凝固剤）入りの採血管に計14ml採血し、上記3病院施設および1介護老人保健施設にて匿名化された後に、バイク便、新幹線などの交通機関を介して、午後に川崎医科大学衛生学に移送する。

情報としては、年齢、性、前治療、診断後日数、前治療効果判定後（もしくは前治療後PDと判断された時点）からの日数、組織型、臨床病期、TNM分類が、胸膜悪性中皮腫の場合には、入手される。

また高齢対照者の場合には、年齢、性とともに有している疾病の情報が入手される。

採血は、遠心分離により血漿と血球成分（単核球）に分離。血漿は分注して凍結保存する。血球成分は、FACSを用いて、細胞のサイズの表面の性状により単球とリンパ球に、リンパ球は代表的な表面マーカーによりNK細胞、Th1細胞、CTL細胞に分離する。一部は、特異的な膜表面分子と同時に解析し、また、ソートしたこれら4亜群の免疫担当細胞は、半分に分けられて、一方は凍結保存する。また、残りは細胞培養に供し、PMA（Phorbol 12-Myristate 13-Acetate）とイオノマイシンにて一晩の刺激後に、回収して凍結保存する。

凍結保存後の血漿は、ルミネックス法によって、サイトカイン29種類の濃度を網羅的に測定するとともに、一部は、メタボローム解析のため、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社に届けられる。メタボローム解析に際しては、その後、heat map 解析あるいは悪性胸膜中皮腫による亜群における発現度比較が必要になるため、番号化された試料が、凍結を維持するためドライアイスとともに梱包され陸上輸送されるとともに、上記の情報は委託先に封書で伝えられるが、既に川崎医科大学衛生学では検体提出施設にて匿名化・番号化された情報しか取り扱っておらず、匿名化・番号化された情報として伝えられる。

サイトカインは次の項目である：IL（インタ

ーロイキン)-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、INF α 2、IFN γ 、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TNF- α 、TNF- β

血球の一部は、FACSにてソート時に、次に示すような膜表面分子の発現を細胞亜群により、解析する。PD-1、PD-L1、CD25、CD69、GITR、CTLA-4、HLA-DR、CD45RO、CXCR3、FasL、NKG2D、NKp46、CD80、CD86 など。

また、新鮮時もしくは一晩の刺激後に凍結された細胞亜群からは、全RNAを採取後cDNAに変換して凍結しRT-PCR法にて、亜群に合わせて次の遺伝子発現などを測定する。PD-1、PD-L1、TNF- α 、IFN- γ 、TGF- β 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、Granzyme B、FasL、T-bet、GATA-3、RORC、IL-R1、IL-18R1、Bcl-2、Notch1、EOMES、CREB1、NKp46、IL-12p35、IL-15、IL-18、IL-23 など。加えて、現在、川崎医科大学衛生学にて検討中のCD8+細胞のトランスクリプトーム解析から抽出された転写産物についても、検討する。

採血のタイミングは、高齢対照者は1回のみ。悪性胸膜中皮腫症例では、オプジーボを含む抗がん化学療法の開始前(初回投与前)、開始後5~7日目、その後、オプジーボは2週ごとの投与となるが、最初の効果判定を約3か月後と想定しており、その後は効果判定時(約3か月ごと)の採血とする。現状では、オプジーボの投与をどの程度継続すべきかということは、臨床的に定まっていないため、症例のQOLが投与可能であれば、限りなく継続する予定である。なお、これらの経過の中で(初回効果判定の前であっても)、病態が変化した場合、ほとんどがPD~増悪・進行と判断された場合には、その段階で、採血を実施する。

実際の解析は、オプジーボを含む抗がん化学療法投与前と、高齢対照者の比較、および悪性胸膜中皮腫群では、労災疾病臨床研究補助金事業としての藤本クラスの予定年度である2020年度終了までの段階で、最終的な効果判定を施し、奏功(CR:完全奏功、PR:部分奏功)、不変(SD)および増悪・進行(PD)という帰結から、投与前の群分けをし、投与前に効果判定を予測する免疫学的なバイオマーカーを抽出できるかどうか

かを検討する。

なお、その際には、単一のマーカーを想定するのみならず、統計学的手法を用いて、回帰式の構築も目標とする。

またメタボロームにおいても、同様に帰結を将来予測すべき代謝産物の変化を構築すべく解析を実施する。

C. 研究結果

本課題に向けた基盤整備は、我々の構築したM/P/Aスコアで構築できていると判断しており、今後、今回の班研究でリクルートされる症例における解析を実施することになる。

倫理申請については、2018年10月30日付で、承認番号3270として承認された。

これを受け、本申請の申請書、計画書、対象者説明文書ならびに同意書・同意撤回書を基盤として、岡山労災病院、四国がんセンターならびに山口宇部医療センターで施設ごとの倫理申請を実施して頂き、岡山労災病院、四国がんセンターにて承認を頂いている。

4月からの年度で、症例のリクルートを開始する予定である。

D. 考察

ニボルマブの奏功症例を事前に予測可能にすることは、臨床上、意義が高いと考えられる。ただし、本来であれば、ニボルマブも含めた、他の免疫チェックポイント薬や、その他の新規治療剤などのラインアップがある中で、それぞれの有効性予測が可能となるような状況が構築されることが望ましい。

E. 結論

研究に向けての制度整備が整った。

F. 研究発表

本研究課題の基盤に関して、川崎医科大学衛生学では繊維・粒子状物質の免疫影響について観察しており、それらの報告を列記する。

1. 論文発表

- 1) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Otsuki T. Decrease in intracellular perforin levels and IFN-gamma production in

- human CD8+ T cell line following long-term exposure to asbestos fibers. J Immunol Res 2018 Oct 23;2018:4391731. doi: 10.1155/2018/4391731
- 2) Maeda M, Matsuzaki H, Yamamoto S, Lee S, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Min Y, Sada N, Nishimura Y, 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: 748-758, 2018. doi: 10.3892/or.2018.6481
 - 3) Kumagai-Takei N, Yamamoto S, Lee S, Maeda M, Matsuzaki H, Sada N, Yu M, Yoshitome K, Nishimura Y, Otsuki T. Inflammatory alteration of human T cells exposed continuously to asbestos. Int J Mol Sci. Special issue "Macrophages in Inflammation" 2018, 19(2), 504; doi: 10.3390/ijms19020504
 - 4) Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Maeda M, Yu M, Sada N, Yoshitome K, Nishimura Y, 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
 - 5) 西村泰光、武井直子、吉留敬、松崎秀紀、李順姫、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 2018: 5; 102-106
 - 6) 李順姫、松崎秀紀、武井直子、吉留敬、西村泰光、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 2018: 5; 130-135
 - 7) Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Sada N, Yoshitome K, Nishimura Y, Otsuki T. Alteration of various lymphocytes by particulate and fibrous substances. In. Lymphocyte. ISBN 978-953-51-6445-6 Book edited by:Dr. Erman Salih Istifl. IntechOpen Limited, London, UK. Published: November 5th 2018. DOI: 10.5772/intechopen.79054
 - 8) Lee S, Hayashi H, KUmagai-Takei N, Matsuzaki H, Yoshitome K, Sada N, Kusaka M, Uragami K, Nishimura Y. Autoantibodies in silicosis patients: silica-induced dysregulation of autoimmunity. In: Autoantibodies and Cytokines, ISBN 978-953-51-5732-8 Book edited by: Wahid Ali Khan, IntechOpen Limited, London, UK. 2019 (Accepted)
- ## 2 . 学会発表
- 1) Otsuki T, Maeda M, Lee S, Yu M, Hidenori H, Kumagai-Takei N, Sada N, Yoshitome K, Nishimura Y. Effects of continuous exposure to asbestos fibers on human T cell: on the viewpoint of anti-tumor immunity. Seminar in Institute of Occupational Diseases, Zhejiang Medical Science Academy. 2018.4/13
 - 2) Otsuki T, Lee S, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Nishimura Y. Search for biomarkers of asbestos exposure and asbestos-induced cancers in investigations of the immunological effects of asbestos. ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland)
 - 3) Otsuki T, Hayashi H, Lee S, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Nishimura Y, Fujimoto W. Alteration of immune cells in silicosis: Roles in development of autoimmunity and lung fibrosis. ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland)
 - 4) Otsuki T, Maeda M, Lee S, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Nishimura Y. Induction of IL-17 production from human peripheral blood CD4+ cells by asbestos exposure. ICOH (International Congress on Occupational

- Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland)
- 5) Nishimura Y, Lee S, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Nakno T, Kishimoto T, Otsuki T. Scores predictive for asbestos exposure, malignant mesothelioma and pleural plaque on the basis of comprehensive immunological analysis. ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland))
 - 6) Nishimura Y, Yoshioka D, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Otsuki T. Nanotoxicity of titanium nanosheets for human immune cells. ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland))
 - 7) Nishimura Y, Maki Y, Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Yoshitome K, Otsuki T. Augmented proliferation of mesothelial cells caused by secretory factors derived from immune cells upon exposure to asbestos. ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland))
 - 8) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Otsuki T. Effect of long-term exposure to asbestos on functional properties of human CD8+ T cell line. ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland))
 - 9) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Otsuki T. Effects of IL-15 addition on the suppressed induction of CTL upon exposure to asbestos. ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland))
 - 10) Lee S, Hayashi H, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Yoshitome K, Nishimura Y, Uragami K, Kusaka M, Yamamoto S, Ikeda M, Hatayama T, Fujimoto W, Otsuki T. Clinical evaluation of CENP-B and Scl-70 autoantibodies in silicosis patients. ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland))
 - 11) Matsuzaki H, Lee S, Maeda M, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Nishimura Y, Otsuki T. Effect of short-term exposure of asbestos on human T cell line MT-2. ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland))
 - 12) Matsuzaki H, Lee S, Maeda M, Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Otsuki T. Effect of asbestos on FOXO1 expression in MT-2 cell. ICOH (International Congress on Occupational Health 2018.4/29-5/04 The Convention Center Dublin (Ireland))
 - 13) 大槻剛巳、山本祥子、李順姫、松崎秀紀、武井直子、吉留敬、西村泰光 . アスベスト曝露ヒト T 細胞株における酸化的リン酸化に関連する複合体発現 . 第 91 回日本産業衛生学会 2018.5/16-19. 熊本市市民会館、熊本市国際交流会館、くまもと県民交流館パレア、鶴屋ホール
 - 14) 西村泰光、李順姫、武井直子、松崎秀紀、吉留敬、岡本賢三、岸本卓巳、大槻剛巳 . アスベスト関連良性疾患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 2018.5/16-19. 熊本市市民会館、熊本市国際交流会館、くまもと県民交流館パレア、鶴屋ホール
 - 15) 大槻剛巳 . アスベスト問題と健康管理～免疫影響の研究内容も踏まえて～ . 平成 30 年度 宮崎県医師会産業医研修会 2018.6/30 宮崎県医師会館 2 階研修室 (+ TV 会議システム : 各都市医師会)
 - 16) 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 2018.7/17 大阪府立国際会議場（グランキューブ）
- 17) 武井直子、李順姫、松崎秀紀、前田恵、佐田渚、西村泰光、大槻剛巳 . アスベスト繊維の細胞傷害性 T 型細胞の分化・増殖に及ぼす影響. 第 6 回 日本繊維状物質研究学会 2018.8/23-24 仏教伝導ビル（東京三田）
 - 18) 前田恵、大槻剛巳、李順姫、松崎秀紀、武井直子、吉留敬、西村泰光 . アスベスト長期継続曝露 Treg 様細胞株における転写因子発現 . 第 9 回 JMIG (Japan Mesothelioma Interest Group: NPO 日本中皮腫研究機構) 研究会 2018.9/08 YIC studio (学校法人 YIC 学院) @小郡
 - 19) 西村泰光、吉岡大輔、武井直子、李順姫、吉留敬、大槻剛巳 . チタン酸ナノシート曝露によるヒト単球培養時のオートファジー関連遺伝子発現量変化. 第 25 回日本免疫毒性学会学術年会 2018.9/28-29 つくば国際会議場
 - 20) 山本祥子、李順姫、松崎秀紀、幡山圭代、武井直子、吉留敬、西村泰光、大槻剛巳 . 石綿継続曝露 T 細胞における NNT の発現亢進は石綿誘導性 ROS 発生を抑制する. 第 25 回日本免疫毒性学会学術年会 2018.9/28-29 つくば国際会議場
 - 21) 大槻剛巳、山本祥子、松崎秀紀、李順姫、武井直子、西村泰光 . Oxidative phosphorylation -related complexes in human T cell (MT-2) and its sublines continuously exposed to asbestos. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018.9/27-29 大阪国際会議場
 - 22) 武井直子、西村泰光、松崎秀紀、李順姫、吉留敬、大槻剛巳 . ヒト CD8+T 細胞株を用いて作成した石綿曝露亜株の機能解析. 第 25 回 石綿・中皮腫研究会 2018.11/10. 奈良市ならまちセンター 市民ホール
 - 23) 大槻剛巳 . 結晶質シリカの生体影響について——最近の知見——（基礎講座 1）. 第 58 回日本労働衛生工学会 2018.11/14-16 富山国際会議場 大手町フォーラム
 - 24) 西村泰光、吉岡大輔、武井直子、吉留敬、大槻剛巳 . チタン酸ナノシート曝露後の単球におけるアポトーシスの機序解析, リソソーム・オートファジー機能との関連. メタルバイオサイエンス研究会 2018 2018.11/16-17 仙台市戦災復興祈念館
 - 25) Nishimura Y. . Immune-suppressed characteristics with increased Treg marker and decreased perforin expression by CTL in patients with mesothelioma compared with diffuse pleural thickening. 第 47 回日本免疫学会学術集会 2018.12/10-12 福岡国際会議場
 - 26) 大槻剛巳、前田恵、武井直子、松崎秀紀、李順姫、吉留敬、西村泰光 . アスベスト繊維長期低濃度曝露ヒト T 細胞株における細胞特性の変化. 第 18 回分子予防環境医学研究会 . 2019. 1/11-12 @名古屋大学医学部鶴舞キャンパス・鶴友会館
 - 27) 西村泰光、吉岡大輔、武井直子、李順姫、吉留敬、大槻剛巳 . ヒト単球へのチタン酸ナノシートの v-ATPase 依存的リソソーム毒性. 第 89 回日本衛生学会 . 2019. 2/01-03 @名古屋大学東山キャンパス・豊田講堂
 - 28) 西村泰光、武井直子、李順姫、吉留敬、大槻剛巳 . 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. 2/01-03 @名古屋大学東山キャンパス・豊田講堂
 - 29) 武井直子、西村泰光、松崎秀紀、李順姫、吉留敬、大槻剛巳 . 石綿曝露下 CTL 分化抑制時の細胞増殖と granzyme B 産生に対する IL-15 の影響. 第 89 回日本衛生学会 . 2019. 2/01-03 @名古屋大学東山キャンパス・豊田講堂
 - 30) 李順姫、山本祥子、幡山圭代、松崎秀紀、武井奈子、吉留敬、西村泰光、大槻剛巳 . 珪酸曝露下の免疫細胞における TLR 刺激応答と自己免疫疾患関連分子の探索. 第 89 回日本衛生学会 . 2019. 2/01-03 @名古屋大学東山キャンパス・豊田講堂
 - 31) 大槻剛巳 . 珪酸曝露による免疫病態: IL-17 とアポトーシス関連分子の関与. 第 7 回ケラチノサイト・免疫と皮膚を勉強する会

(KISS), 2019. 2/16 @ホテルモントレ
半蔵門

- 32) Nishimura Y. CD4+ T Cell-Derived
Factors Prevent Asbestos-Caused
Suppression of Mesothelial Cell Growth.
The 58th Annual Meeting of the Society
of Toxicology, 2019.3/10-14. @Baltimore
Convention Center, Baltimore, Maryland,
U.S.A.

G .知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1 . 特許取得

2018 年度では無し。

2 . 実用新案登録

2018 年度では無し。

3 . その他

2018 年度では特に無し。

労災疾病臨床研究事業費補助金
分担研究報告書

【石綿ばく露によるびまん性胸膜肥厚の著しい呼吸機能障害に関する研究】

研究協力者 宮本洋輔 岡山労災病院 呼吸器内科
小阪紀子 岡山労災病院 中央検査部 主任検査技師
研究分担者 尾瀬 功 愛知県がんセンター研究所 がん予防医療研究領域 がん予防研究分野 主任研究員
加藤勝也 川崎医科大学 総合放射線医学 教授
岸本卓巳 岡山労災病院 アスベスト疾患ブロックセンター長
研究代表者 藤本伸一 岡山労災病院 腫瘍内科部長 / 呼吸器内科第二部長

研究要旨

石綿ばく露作業者に発症したびまん性胸膜肥厚における著しい呼吸機能障害の評価において、呼吸機能検査が出来ない場合には6分間歩行テストを施行することもあるが、明確な基準が存在しない。呼吸機能検査や動脈血ガス分析などの検査値が労災認定基準を満たさないにも関わらずADL低下が顕著な症例がどの程度存在するのか、また、6分間歩行テストにおけるSpO₂の低下および歩行距離がどの程度であれば著しい呼吸機能障害ありとしてよいのかを調査するため、本研究を行う。職業性石綿ばく露歴があり、胸部画像検査でびまん性胸膜肥厚の認定基準を満たす症例を対象に、呼吸機能検査、動脈血ガス分析および6分間歩行テストやアンケート調査を行い、多角的に評価することで、6分間歩行テストによる新たな呼吸機能障害の基準を設けることを目的とする。

A. 研究目的

労災補償における石綿ばく露作業者に発症したびまん性胸膜肥厚における著しい呼吸機能障害の基準は、(1)パーセント肺活量(%VC)が60%未満、または(2)パーセント肺活量(%VC)が60%以上80%未満であって、次の(ア)または(イ)に該当する((ア)1秒率が70%未満であり、かつ、パーセント1秒量が50%未満)(イ)動脈血酸素分圧(PaO₂)が60 Torr以下である場合または肺胞気動脈血酸素分圧較差(AaDO₂)が限界値を超える場合となっている。呼吸機能検査が出来ない場合には6分間歩行テストを施行することもあるが、この検査における著しい呼吸機能障害の基準は歩行時あるいは歩行

後のSpO₂ 88%(PaO₂ 55mmHg)あるいはSpO₂ 90%(PaO₂ 60mmHg)とされることがある。また歩行距離の測定による基準もあるが、明確な基準がないのが現状である。呼吸機能検査や動脈血ガス分析の検査値では認定基準を満たさないが、ADL低下が顕著な症例がどの程度存在するのか不明であり、またそのような症例を労災認定できるようにするための研究も必要と考えられる。じん肺法検査の呼吸機能検査1次および2次、6分間歩行、活動量計の装着、またアンケート調査(問診票 P-ADL)を行い、多角的に評価することで、石綿ばく露によるびまん性胸膜肥厚症例の新たな呼吸機能障害として、6分間歩行テストにおける認定基準を設ける

ことを目的として、本研究を立案した。

B. 研究方法

2-1 対象

以下の条件を全て満たすものを対象とする。
また、目標症例数は 30 例とする。

1. 3 年間以上の職業性石綿ばく露歴があり、胸部単純写真および CT 検査でびまん性胸膜肥厚の認定基準を満たした症例を対象とする。ただし、労災認定の有無は問わない。
2. 器質化胸水を伴う症例の CT 所見。平成 28 年度環境省委託研究報告書に記載されている基準を用いる。すなわち、
胸水内部の不均一性（胸水の高吸収化）
胸郭容積低下
胸水貯留部位における “Crow's feet sign” の存在
胸水量の固定化（3 か月以上の経過観察）
胸水内エアーの存在
を必須とする 3 項目以上が合致した場合についてびまん性胸膜肥厚と判断する。
3. 年齢 20 歳以上。
4. 検査の実施、またアンケートへの回答が可能な症例とする。ただし、アンケートに関しては、家族・医療者の助けを借りることで回答可能なものは対象として構わない。
5. 在宅酸素を導入している症例は除外とする。

2-2 方法

1. 胸部単純写真および CT 検査にて労災認定基準を満たすびまん性胸膜肥厚と診断された症例において、呼吸機能検査として、肺機能検査 1 次（パーセント肺活量や 1 秒量、1 秒率など）・2 次（ PaO_2 や AaDO_2 など）とともに 6 分間歩行テストを行う。6 分間歩行テストでは SpO_2 最低値や歩行距離などをモニタリングする。

[6 分間歩行（禁忌と中止基準）]

- (1) 絶対的禁忌
 - ・前月の不安定狭心症と心筋梗塞
 - (2) 相対的禁忌
 - ・安静時心拍数 $> 120\text{bpm}$
 - ・収縮期血圧 $> 180\text{mmHg}$, および拡張期血圧 $> 100\text{mmHg}$
 - (3) 中止基準
 - ・胸痛, 耐えられない呼吸困難, 下肢の痙攣, ふらつき, 多量の発汗, 顔面蒼白またはチアノーゼの出現
2. 活動量計を装着し、評価を行う。
 3. 日常生活の状況について P-ADL を用いてアンケート調査を行う。（既往歴、内服、喫煙歴、職業歴などを併せて聴取する）

実施期間・場所

ベースライン調査は 2019 年 4 月から 2021 年 3 月まで行い、2021 年 3 月に調査を終了する。労働者健康安全機構アスベスト疾患研究・研修センターに研究事務局をおき、データマネジメントを行い、個人情報外部へ流出しないような管理を行う。

倫理的事項

患者の保護

本テストの実施にあたって関係する法令や指針（ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針など）を遵守する。20 歳以上の患者が対象候補として参加を依頼され、その同意協力を考慮した上で、研究の意義、目的、方法、予測される結果、提供者が被るおそれのある不利益、試料保存及および使用方法、研究参加は自由意志によるもので、拒否・中止も自由でそれに伴う不利益もないこと等について十分な説明を行った上で同意を得る。また、一度同意を得ても患者の自由意志で撤回できる。よって、被検者の自由意志を尊重していると考ええる。

実施などによって生ずる個人への利益、不利益の危険性

本研究で研究参加者が得られる利益はない。
また、検査の施行やアンケートへの回答が可能であることが担当者（主治医）によって確認されたものを対象とすることで、対象者の保護を図る。

C．研究結果

石綿ばく露によるびまん性胸膜肥厚の著しい呼吸機能障害に関する研究を企画、立案した。倫理審査については、岡山労災病院にて承認されており、来年度より順次対象者へ研究説明を行い同意を得たのち研究を開始するものとする。

D．考察

石綿ばく露作業者に発症したびまん性胸膜肥厚における著しい呼吸機能障害の評価において、呼吸機能検査が出来ない場合には6分間歩行テストを施行することもあるが、明確な基準が存在しない。呼吸機能検査や動脈血ガス分析などの検査値が労災認定基準を満たさないにも関わらずADL低下が顕著な症例がどの程度存在するのか、また、6分間歩行テストにおけるSpO₂の低下および歩行距離がどの程度であれば著しい呼吸機能障害ありとしてよいするのかを調査するため、本研究を行う。職業性石綿ばく露歴があり、胸部画像検査でびまん性胸膜肥厚の認定基準を満たす症例を対象に、呼吸機能検査、動脈血ガス分析および6分間歩行テストやアンケート調査を行い、多角的に評価することで、6分間歩行テストによる新たな呼吸機能障害の基準を設けることが可能だと考える。

E．結論

石綿ばく露によるびまん性胸膜肥厚の著しい呼吸機能障害に関する研究を企画、立案し制度整備が整った。本研究の研究成果は、国内外の学会発表および英文雑誌で紙上発表することを目指とする。その際には完全な匿名化を行い、個人情報の特定ができないような措置を講ずる。また、発表媒体の倫理規定・投稿規定を遵守する。また、現在6分間歩行による著しい呼吸機能障害の明確な基準のない労災認定基準（案）として厚生労働省に報告を送付して検討していただく。

F．研究発表

1．論文発表

該当するものなし。

2．学会発表

該当するものなし

G．知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1．特許取得

該当するものなし。

2．実用新案登録

該当するものなし。

3．その他

特記すべき事項なし。

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

< 研究成果の刊行に関する一覧表 >

【 書 籍 】

該当するものなし

【 雑 誌 】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujimoto N, Aoe K, Kozuki T, Oze I, Kato K, Kishimoto T, Hotta K.	A phase II trial of first-line combination chemotherapy with cisplatin, pemetrexed, and nivolumab for unresectable malignant pleural mesothelioma: A study protocol.	Clin Lung Cancer.	19(5)	e705-e707	2018
Shintani Y, Hasegawa S, Takuwa T, Aoe K, Kato K, Fujimoto N, Hida Y, Morise M, Moriya Y, Morohoshi T, Okumura M, Yoshino I.	Prospective registry database of patients with malignant mesothelioma: directions for a future Japanese registry-based lung cancer study.	J Thorac Dis.	10(3)	1968-1971.	2018
Sato Y, Matsuda S, Maruyama A, Nakayama J, Miyashita T, Udagawa H, Umemura S, Yanagihara K, Ochiai A, Tomita M, Soga T, Tsuchihara K, Makinoshima H.	Metabolic Characterization of Antifolate Responsiveness and Non-responsiveness in Malignant Pleural Mesothelioma Cells.	Front Pharmacol.	doi: 10.3389/fphar.		2018

< 研究成果の刊行に関する一覧表 >

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大塚義紀、宇佐美郁治、水橋啓一、岸本卓巳、坂本浩一、宮本顕二、木村清延、藤本伸一、加藤宗博、横山多佳子、太田千晴	じん肺患者における好中球細胞質抗体 (ANCA)陽性率の検討—多施設共同横断的研究—	日職災医誌	66	196-200	2018
岸本卓巳、藤本伸一	胸膜中皮腫初診時の胸部 CT 画像の検討について	日職災医誌	66	239-245	2018
大塚義紀、宇佐美郁治、水橋啓一、岸本卓巳、坂本浩一、宮本顕二、木村清延、藤本伸一、加藤宗博、横山多佳子、太田千晴	病職歴データベースによるじん肺患者における ANCA (好中球細胞質抗体) 関連血管炎・腎疾患発症頻度の検討	日職災医誌	66	259-263	2018

・ 研究成果の別刷



A Phase II Trial of First-Line Combination Chemotherapy With Cisplatin, Pemetrexed, and Nivolumab for Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma: A Study Protocol

Nobukazu Fujimoto,¹ Keisuke Aoe,² Toshiyuki Kozuki,³ Isao Oze,⁴ Katsuya Kato,⁵ Takumi Kishimoto,⁶ Katsuyuki Hotta⁷

Abstract

Background: The purpose of this study is to assess the efficacy and safety of combination chemotherapy with cisplatin, pemetrexed, and nivolumab for unresectable malignant pleural mesothelioma (MPM). **Patients and Methods:** Patients with untreated, advanced, or metastatic MPM who meet the inclusion and exclusion criteria will be included. A total of 18 patients will be enrolled from 4 Japanese institutions within 1 year. Combination chemotherapy with cisplatin (75 mg/m²), pemetrexed (500 mg/m²), and nivolumab (360 mg/person) is administered every 3 weeks for a total of 4 to 6 cycles. Then, maintenance therapy with nivolumab will be administered until disease progression, unacceptable toxicities, or the patient's condition meets the withdrawal criteria. The primary end point is the centrally reviewed overall response rate. The secondary end points include the disease control rate, overall survival, progression-free survival, and adverse events. **Conclusion:** This phase II trial evaluating first-line combination chemotherapy for unresectable MPM commenced in January 2018. This is the first prospective trial to evaluate the effect of an anti-programmed death-1 antibody combined with cisplatin and pemetrexed for unresectable MPM.

Clinical Lung Cancer, Vol. 19, No. 5, e705-7 © 2018 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords: Asbestos, Immune checkpoint inhibitor, Maintenance, Programmed death-1, Prospective study

Introduction

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a highly aggressive tumor that arises from mesothelial-lined surfaces and has a poor survival rate.¹ MPM occurs more frequently in men (80%) than in

women, and the peak age of onset is between 60 and 80 years old.² The industrial use of asbestos has been banned in Japan since 2006, but the incidence of MPM is expected to continue to increase for the next few decades because of the past usage of asbestos.³ Treatment of MPM is challenging. Most of the cases are diagnosed at an advanced stage and are treated with systemic chemotherapy. Combination chemotherapy with cisplatin and pemetrexed is the standard treatment regimen; however, the median overall survival (OS) is only approximately 12 months.⁴ Recently, the additional use of bevacizumab improved OS when used with cisplatin and pemetrexed in unresectable MPM.⁵ However, the prolongation of the OS was <3 months. In addition, it can be administered only to bevacizumab-eligible patients. On the basis of these facts, cisplatin and pemetrexed is still considered the standard treatment regimen, thus, additional treatment options are urgently needed.

Nivolumab is a human monoclonal antibody that targets the programmed death (PD)-1 cluster of differentiation 279 cell surface membrane receptor. Binding of PD-1 to its ligands, PD ligands 1 and 2, results in the downregulation of lymphocyte activation.

This trial is registered in the UMIN Clinical Trials Registry: UMIN000030892.

¹Department of Medical Oncology, Okayama Rosai Hospital, Okayama, Japan

²Department of Medical Oncology, National Hospital Organization Yamaguchi-Ube Medical Center, Ube, Japan

³Department of Thoracic Oncology, National Hospital Organization Shikoku Cancer Center, Matsuyama, Japan

⁴Division of Molecular and Clinical Epidemiology, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan

⁵Department of Diagnostic Radiology 2, Kawasaki Medical School, Okayama, Japan

⁶Department of Medicine, Okayama Rosai Hospital, Okayama, Japan

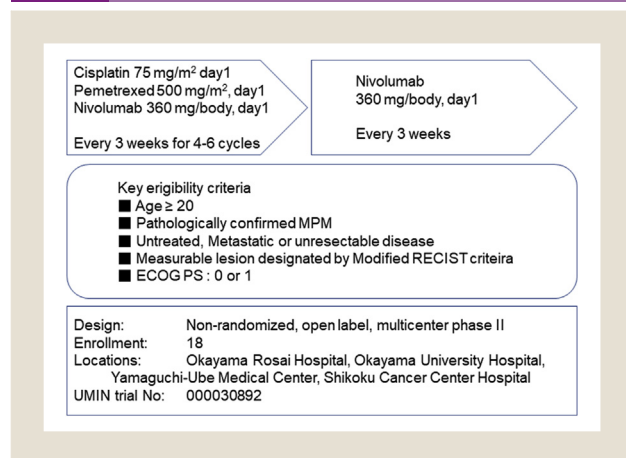
⁷Center of Innovative Clinical Medicine, Okayama University Hospital, Okayama, Japan

Submitted: Mar 25, 2018; Revised: Apr 12, 2018; Accepted: May 1, 2018; Epub: May 9, 2018

Address for correspondence: Nobukazu Fujimoto, MD, PhD, Department of Medical Oncology, Okayama Rosai Hospital, 1-10-25 Chikkomidorimachil, Okayama 7028055, Japan

Fax: +81-86-2623391; e-mail contact: nobufujimoto@gmail.com

Figure 1 Overview of the Study Design



Abbreviations: ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group; MPM = malignant pleural mesothelioma; PS = performance status; RECIST = Response Evaluation Criteria in Solid Tumors.

Nivolumab inhibits the interaction between PD-1 and its ligands, promotes immune responses, and triggers antitumor activity. It has already been approved by the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan for multiple types of cancer including malignant melanoma, non-small-cell lung cancer, and gastric cancer in Japan. Additionally, a phase II trial showed there was a favorable response with nivolumab for previously treated MPM.⁶

A recent report indicated that platinum drugs enhance the effector immune response through modulation of PD-ligand 1.⁷ These encouraging results might extend to the first-line treatment of MPM with the hope of enhancing the antitumor response, particularly in combination with the current standard chemotherapy. Unfortunately, no prospective clinical trial is being conducted to evaluate the combination of nivolumab and cisplatin/pemetrexed. Thus, we launched the current trial to assess combination chemotherapy with cisplatin, pemetrexed, and nivolumab for MPM.

Table 1 Key Inclusion Criteria

1. Age: older than 20 years at the date of informed consent
2. Pathologically-confirmed pleural malignant mesothelioma
3. Advanced or metastatic malignant pleural mesothelioma that is untreated and unresectable
4. Patients who have a measurable lesion designated according to modified RECIST criteria
5. Tumor sample available to test for programmed death-ligand 1 expression
6. Eastern Cooperative Oncology Group performance status is 0 or 1
7. Life expectancy is ≥90 days
8. Oxygen saturation measured using pulse oximeter is ≥94%
9. Meet the defined lab value criteria
10. Females of childbearing potential who agree to prevent pregnancy and lactation for at least 5 months after the last administration of nivolumab
11. Men who agree to contraception for at least 7 months after the last administration of nivolumab
12. Patients who understand the study contents and provide written consent by their own free will

Abbreviation: RECIST = Response Evaluation Criteria in Solid Tumors.

Table 2 Key Exclusion Criteria

1. History of anaphylaxis induced by any drug
2. Autoimmune disease
3. Double cancer
4. Metastasis to the brain or meninges
5. Interstitial lung disease or pulmonary fibrosis
6. Diverticulitis or peptic ulcer
7. Pleural effusion that requires drainage every 2 weeks or more
8. Pericardial effusion or ascites that requires drainage
9. Uncontrollable cancer pain
10. Transient ischemic attack, cerebrovascular accident, thrombosis, or thromboembolism within 180 days
11. Uncontrollable severe cardiovascular disease
12. Anticoagulant therapy
13. Uncontrollable diabetes
14. Receiving treatment for a systemic infection
15. Obviously positive for human immunodeficiency virus
16. HTLV-1 antibody-positive, HBs antigen-positive, or HCV antibody-positive. Either HBs antigen positive or HBe antibody-positive and HBV-DNA detection if HBs antigen is negative
17. History of treatment for T-cell regulation
18. Surgery with local or surface anesthesia within 14 days
19. Surgery with general anesthesia within 28 days
20. Pleurodesis within 14 days
21. Pleurodesis treated with picibanil within 28 days
22. Adhesion surgery of the pericardium or peritoneum
23. Radiation therapy for pain relief within 14 days
24. Radiopharmaceutical therapy within 56 days
25. Administration of unapproved drugs within 28 days or an unapproved antibody within 90 days
26. Administration of systemic adrenal cortical hormone or immunosuppressive agents
27. Women who are or might be pregnant or lactating
28. Patients who are incapable of giving consent (for example, because of dementia)
29. Any other inadequacy for this study

Abbreviations: HB = hepatitis B; HBV = hepatitis B virus; HCV = hepatitis C virus; HTLV = human T-cell leukemia virus.

Patients and Methods

Objectives/End Points

This study will assess the efficacy and safety of the first-line combination therapy of cisplatin, pemetrexed, and nivolumab for advanced or metastatic MPM. The primary end point is the centrally reviewed overall response rate. The secondary end points include efficacy evaluated according to the: (1) response rate assessed by investigators; (2) disease control rate; (3) OS; (4) progression-free survival; (5) duration of response; and (6) time to response. Safety and adverse events will also be evaluated.

Study Design/Study Setting

This is a single-arm, prospective, nonrandomized, non-comparative, open-label, multicenter, phase II trial. Figure 1 shows an overview of the study design.

Eligibility Criteria

All patients who meet the main inclusion and exclusion criteria (Tables 1 and 2) will be invited for screening. Written informed

consent must be obtained by an investigator from the patient before any screening or inclusion procedure. This study will be conducted in compliance with the principles of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the institutional review board of each of the participating hospitals.

Intervention

Treatment is composed of 2 sequential phases: the combination phase and the maintenance phase. In the former, cisplatin (75 mg/m²), pemetrexed (500 mg/m²), and nivolumab (360 mg/person) will be administered intravenously. Nivolumab was kindly provided by Ono Pharmaceutical Co, Ltd. This treatment will be repeated every 3 weeks with a total of 4 to 6 cycles. If patients have not progressed during the combination phase, maintenance therapy with nivolumab will be administered until disease progression, unacceptable toxicities, or the patient's condition meets the withdrawal criteria.

Nivolumab was administered at a dose of 240 mg/person biweekly in recent clinical trials^{6,8} including the one for MPM that showed encouraging clinical utility and acceptable toxicity profile.⁶ Both of cisplatin and pemetrexed are usually administered every 3 weeks. Under the consideration of practical utility and dose intensity, we planned to administer nivolumab every 3 weeks with the dose of 360 mg/person. The combination of nivolumab (10 mg/kg) and pemetrexed/cisplatin every 3 weeks showed an acceptable toxicity profile and encouraging antitumor activity in patients with advanced non-small-cell lung cancer.⁹ On the basis of these findings, nivolumab will be administered at a dose of 360 mg/person, every 3 weeks, in the current study.

Outcome Measurement/Follow-up

Response is evaluated using the modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors.¹⁰ The OS is defined as the duration from study registration until the date of death or the last patient visit.

Statistical Considerations

The target number of patients is 18 for the current phase II study. If we assume that there would be 6 to 12 patients with a response, the response rate would be 33.3% to 66.7%. In this case, the estimated accuracy indicates the range between the point estimate of the response rate and the lower confidence limit (2-sided 95% confidence coefficient on the basis of exact test) would be 18% to 22%. An OS curve will be constructed using the Kaplan–Meier product limit method.

Discussion

There is a medical need for improved treatments for MPM. This study is, to our knowledge, the first clinical trial to evaluate the effect of combining an immune checkpoint inhibitor and platinum-based chemotherapy for MPM. In addition, to our knowledge, this is the first investigator-initiated prospective clinical trial evaluating systemic chemotherapy for MPM that complies with Good Clinical Practice in Japan.

Conclusion

A phase II trial of first-line combination chemotherapy for unresectable MPM commenced in January 2018. This study is, to our knowledge, the first prospective trial to evaluate the effect of an anti-PD-1 antibody combined with cisplatin and pemetrexed for unresectable MPM.

Acknowledgments

This study is supported by a grant from Ono Pharmaceutical Co, Ltd, and also by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan. Nivolumab was kindly provided by Ono Pharmaceutical Co, Ltd.

Disclosure

Dr Fujimoto has received consultancy fees from Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Kyorin, and Kissei, and received honoraria or research funding from Hisamitsu, Chugai, Ono, Taiho, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Novartis, GlaxoSmithKline, and MSD. Dr Aoe has received consultancy fees from Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Ono, and received honoraria or research funding from Ono, Bristol-Myers Squibb, Novartis, MSD, AstraZeneca, and Eli Lilly. Dr Kozuki has received honoraria or research funding from Chugai, AstraZeneca, Eli Lilly, Pfizer, Ono, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Kyowa, Taiho, MSD, Merck, and Nippon Kayaku. Dr Hotta has received honoraria or research funding from AstraZeneca, Ono, Boehringer Ingelheim, Nippon Kayaku, Taiho, Chugai, Astellas, Novartis, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, and MSD. The remaining authors have stated that they have no conflicts of interest.

References

- Gemba K, Fujimoto N, Aoe K, et al. Treatment and survival analyses of malignant mesothelioma in Japan. *Acta Oncol* 2013; 52:803-8.
- Gemba K, Fujimoto N, Kato K, et al. National survey of malignant mesothelioma and asbestos exposure in Japan. *Cancer Sci* 2012; 103:483-90.
- Robinson BW, Lake RA. Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med* 2005; 353:1591-603.
- Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, et al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 2003; 21:2636-44.
- Zalcman G, Mazieres J, Margery J, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2016; 387:1405-14.
- Goto Y, Okada M, Kijima T, et al. A phase II study of nivolumab: a multicenter, open-label, single arm study in malignant pleural mesothelioma (MERIT). *J Thorac Oncol* 2017; 12(11 suppl 2):S1883.
- Hato SV, Khong A, de Vries IJ, Lesterhuis WJ. Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. *Clin Cancer Res* 2014; 20:2831-7.
- Zhao X, Suryawanshi S, Hruska M, et al. Assessment of nivolumab benefit-risk profile of a 240-mg flat dose relative to a 3-mg/kg dosing regimen in patients with advanced tumors. *Ann Oncol* 2017; 28:2002-8.
- Kanda S, Goto K, Shiraishi H, et al. Safety and efficacy of nivolumab and standard chemotherapy drug combination in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a four-arm phase Ib study. *Ann Oncol* 2016; 27:2242-50.
- Byrne MJ, Nowak AK. Modified RECIST criteria for assessment of response in malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol* 2004; 15:257-60.

Prospective registry database of patients with malignant mesothelioma: directions for a future Japanese registry-based lung cancer study

Yasushi Shintani¹, Seiki Hasegawa², Teruhisa Takuwa², Keisuke Aoe³, Katsuya Kato⁴, Nobukazu Fujimoto⁵, Yasuhiro Hida⁶, Masahiro Morise⁷, Yasumitsu Moriya⁸, Takao Morohoshi⁹, Meinoshin Okumura¹, Ichiro Yoshino¹⁰

¹Department of General Thoracic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan; ²Department of Thoracic Surgery, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan; ³Department of Medical Oncology, National Hospital Organization Yamaguchi-Ube Medical Center, Yamaguchi, Japan; ⁴Department of Diagnostic Radiology 2, Kawasaki Medical School, Okayama, Japan; ⁵Department of Medical Oncology, Okayama Rosai Hospital, Okayama, Japan; ⁶Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Hokkaido, Japan; ⁷Department of Respiratory Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Aichi, Japan; ⁸Division of General Thoracic Surgery, Chiba Rosai Hospital, Chiba, Japan; ⁹Division of General Thoracic Surgery, Yokosuka-Kyosai Hospital, Kanagawa, Japan; ¹⁰Department of General Thoracic Surgery, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

Contributions: (I) Conception and design: Y Shintani, S Hasegawa, T Takuwa; (II) Administrative support: All authors; (III) Provision of study materials or patients: All authors; (IV) Collection and assembly of data: Y Shintani, S Hasegawa, T Takuwa; (V) Data analysis and interpretation: S Hasegawa, I Yoshino; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

Correspondence to: Yasushi Shintani, MD, PhD. Department of General Thoracic Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2-L5, Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan. Email: yshintani@thoracic.med.osaka-u.ac.jp.

Background: The International Association for the Study of Lung Cancer, in collaboration with members of the International Mesothelioma Interest Group (IMIG), developed a large international database and TNM-based system to study malignant pleural mesothelioma (MPM). However, this database has some limitations since it was a retrospective study and it was based predominantly on surgical cases. The Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry (JJCLCR) employs a project of prospective registry database of patients in Japan with MPM in order to clarify MPM's epidemiology, current management practices, and prognosis and also to investigate the potential capabilities to target the best patients for therapy.

Methods: Tumor stage is described using the 7th and 8th versions of IMIG staging system. This prospective cohort study has been conducted from April 1, 2017 to March 31, 2019.

Discussion: We will analyze the data in this registry to determine the most recent outcomes and trends related to MPM treatment in Japan. The present prospective study is expected to validate the 8th version of IMIG staging system, and to investigate whether tumor thickness is a reliable T-descriptor.

Trial registration: ClinicalTrials.gov Identifier: UMIN 000024664

Keywords: Malignant pleural mesothelioma (MPM); prospective registry database

Submitted Jan 11, 2018. Accepted for publication Feb 13, 2018.

doi: 10.21037/jtd.2018.03.53

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/jtd.2018.03.53>

Introduction

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare but aggressive neoplasm and deadly disease throughout the world. The number of MPM cases in Japan is expected to rise (1,2). Although there is a clear association between occupational and environmental asbestos and mineral fiber exposure and the development of MPM (3), its epidemiology, adequate management protocols, and prognosis are less studied. Surgery, chemotherapy, and radiation are the 3 standard therapies used to treat mesothelioma, but these are palliative treatments and demonstrate poor median overall survival (4,5). The International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), in collaboration with members of the International Mesothelioma Interest Group (IMIG), developed a large international database and TNM-based system to study MPM (6-8). It must be pointed out that the IASLC clinical database has limitations. The most obvious problems of the MPM database are the predominance of surgical cases and lack of data on nonsurgical staging tools such as positron emission tomography (PET) (9). The database also has been used in retrospective analyses. Thus, we will obtain new prospective data from Japanese teaching hospitals to overcome the limitations of this retrospective database.

The Japan Lung Cancer Society, the Japanese Association for Chest Surgery, the Japanese Respiratory Society, the Japan Society for Respiratory Endoscopy jointly established the Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry (JJCLCR), which regularly constructs nationwide registrations of lung cancer cases. JJCLCR collects the characteristics of lung cancer patients and aims to develop treatments and provide data that support the TNM classification organized by the Union for International Cancer Control (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC) (10,11). JJCLCR currently maintains a prospective registry database of patients in Japan with MPM to better understand MPM's epidemiology, current management protocols, and prognosis and clarify potential capabilities to target the best patients for each therapy.

Accurate diagnosis of MPM can be challenging because it is often difficult to distinguish from benign conditions. Furthermore, MPM staging is difficult (12). A new TNM classification for MPM was integrated into the 8th TNM classification of the AJCC/UICC staging system (9). To validate these staging systems, tumor stage is described using the 7th and 8th TNM classifications in the JJCLCR registry. Furthermore, evaluating tumor volume using three

measurements of pleural thickness seems to have a high prognostic value (13). As tumor thickness measurements are found to be practical and reproducible, these clinical MPM classifications will further improve for inclusion in the 9th edition of the TNM staging system, and we will include these registration contents in our registry.

Purpose

The aim of this study is to assess the clinicopathologic features of new MPM cases diagnosed in Japan.

Study setting

This is a non-interventional, prospective, observational cohort study of patients with MPM diagnosed from April 1, 2017 to March 31, 2019 in Japan. This study will review the medical records of each patient.

Methods of analysis

Registry methods

JJCLCR maintains a prospective observational registry of patients with MPM. The JJCLCR committee asked teaching hospitals certified by the Japan Lung Cancer Society, the Japanese Association for Chest Surgery, or the Japanese Respiratory Society to join the study, and JJCLCR committee also asked the hospitals affiliated with the Japan Mesothelioma Interest Group and Japan Organization of Occupational Health and Safety to participate.

This study was approved by the institutional review board (IRB) of Osaka University Medical Hospital, where the registry office is located, on October 11, 2016 (approval no. 16038). This study is registered at the UMIN Clinical Trials Registry as UMIN 000024664 (<http://www.umin.ac.jp/ctr/index.htm>).

Institutions participate in this registry by accessing a website established by JJCLCR. Each participating institution is sent a USB flash drive that contains software for accessing the registry after IRB approval by each institution. Each institution is authorized to use the registration form on the JJCLCR server after entering their credentials (this form is also mailed to each institution). For these procedures, JJCLCR uses SSL certification, which is considered reliable and more secure than postal mail. The data sheet containing the patient's identification and registration number (used for anonymity purposes) is kept on the USB flash drive and placed in a location that can be

locked by each participating institution. In addition, each USB flash drive is coded with an individual serial key sent from JJCLCR and known only by the institution.

This registry follows the ethical guidelines for epidemiologic studies published jointly by the Japan Ministry of Science, Culture, and Education and the Japan Ministry of Health, Labor, and Welfare on June 17, 2002 and revised on February 28, 2017.

The following data will be collected and analyzed: (I) demographic characteristics including date of registration, sex, birth month and year, and asbestos exposure; (II) preoperative status including Eastern Cooperative Oncology Group performance status, preoperative comorbidity, smoking status, pretreatment laboratory values [hemoglobin (Hb), white blood cells (WBC), platelets (PLT), total protein (TP), albumin (Alb), creatinine (Cr), C-reactive protein (CRP), fibronectin, ferritin, hyaluronic acid, and soluble mesothelin-related peptides] and tumor markers [carcinoembryonic antigen (CEA), squamous cell carcinoma antigen (SCC), and cytokeratin fragment 21-1 (Cyfra)], maximum standardized uptake value (SUV) of the pleura on PET, and respiratory function [forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in one second (FEV₁), % predicted FVC, and % predicted FEV₁]; (III) disease description at diagnosis including date of diagnosis, diagnostic method (cytology or histology), immunohistochemical evaluation results [CEA, thyroid transcription factor 1 (TTF-1), cytokeratin (CK) 5/6, calretinin, D2-40, Wilms tumor 1 protein (WT-1), desmin, and p16], histologic type, clinical T factor status (i.e., tumor involvement), pleural thickness, presence of effusion, clinical N factor status (lymph nodes), and clinical M factor status (metastasized organs); (IV) surgical characteristics including induction therapy, operations, combined resection, status of residual tumor, and postoperative morbidity; (V) postoperative diagnosis including tumor histology and pathologic T, N, and M factors; (VI) chemotherapy regimen; (VII) radiotherapy characteristics including irradiated sites and type of radiation therapy; and (VIII) follow-up characteristics including date of last follow-up, vital status at last follow-up, date of initial relapse, and location of initial relapse. A case report form is described online: <http://jtd.amegroups.com/public/addition/jtd/supp-jtd.2018.03.53-1.pdf>.

Endpoints

Primary endpoints

We will analyze the data obtained from this registry to

reveal the most recent outcomes (overall and disease-specific survival) and trends related to MPM treatment in Japan.

Secondary endpoints

Secondary endpoints include patient background, surgical results, stage-specific prognosis, and correlations with the primary endpoints.

Eligibility criteria

All new cases of MPM diagnosed in Japan from April 1, 2017 to March 31, 2019 will be included. MPM diagnosis has to be confirmed by the industrial accident compensation insurance or approved by the Environmental Restoration and Conservation Agency of Japan.

Exclusion criteria

Patients who refuse to participate in this study will be excluded.

Enrollment and study periods

Enrollment period

Patients can enroll from April 1, 2017 to March 31, 2019.

Study period

The study will be conducted from April 1, 2017 to March 31, 2026.

Statistical considerations

The association between patient background and survival (overall and disease-specific survival) will be analyzed using pertinent statistical methods, including the Kaplan-Meier method and Cox proportional hazard modeling, by a statistical collaborator.

Acknowledgements

This study is sponsored by JJCLCR, which was established by the Japan Lung Cancer Society, the Japanese Association for Chest Surgery, and the Japanese Respiratory Society, and the Japan Society for Respiratory Endoscopy.

Footnote

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Ethical Statement: This study was approved by the institutional review board (IRB) of Osaka University Medical Hospital, where the registry office is located, on October 11, 2016 (approval no. 16038).

References

1. Murayama T, Takahashi K, Natori Y, et al. Estimation of future mortality from pleural malignant mesothelioma in Japan based on an age-cohort model. *Am J Ind Med* 2006;49:1-7.
2. Hasegawa S, Tanaka F. Malignant mesothelioma: current status and perspective in Japan and the world. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2008;56:317-23.
3. Scherpereel A. Malignant pleural mesothelioma: new treatments, new hopes? *Eur Respir J* 2017;49. pii: 1700319.
4. Zalcman G, Mazieres J, Margery J, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2016;387:1405-14.
5. Hasegawa S, Okada M, Tanaka F, et al. Trimodality strategy for treating malignant pleural mesothelioma: results of a feasibility study of induction pemetrexed plus cisplatin followed by extrapleural pneumonectomy and postoperative hemithoracic radiation (Japan Mesothelioma Interest Group 0601 Trial). *Int J Clin Oncol* 2016;21:523-30.
6. Rusch VW, Chansky K, Kindler HL, et al. The IASLC Mesothelioma Staging Project: Proposals for the M Descriptors and for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2016;11:2112-9.
7. Nowak AK, Chansky K, Rice DC, et al. The IASLC Mesothelioma Staging Project: Proposals for Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2016;11:2089-99.
8. Rice D, Chansky K, Nowak A, et al. The IASLC Mesothelioma Staging Project: Proposals for Revisions of the N Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2016;11:2100-11.
9. Pass H, Giroux D, Kennedy C, et al. The IASLC Mesothelioma Staging Project: Improving Staging of a Rare Disease Through International Participation. *J Thorac Oncol* 2016;11:2082-8.
10. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:706-14.
11. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016;11:39-51.
12. Patel SC, Dowell JE. Modern management of malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer (Auckl)* 2016;7:63-72.
13. Frauenfelder T, Tutic M, Weder W, et al. Volumetry: an alternative to assess therapy response for malignant pleural mesothelioma? *Eur Respir J* 2011;38:162-8.

Cite this article as: Shintani Y, Hasegawa S, Takuwa T, Aoe K, Kato K, Fujimoto N, Hida Y, Morise M, Moriya Y, Morohoshi T, Okumura M, Yoshino I. Prospective registry database of patients with malignant mesothelioma: directions for a future Japanese registry-based lung cancer study. *J Thorac Dis* 2018;10(3):1968-1971. doi: 10.21037/jtd.2018.03.53



Metabolic Characterization of Antifolate Responsiveness and Non-responsiveness in Malignant Pleural Mesothelioma Cells

Yuzo Sato^{1,2,3,4}, Shiori Matsuda^{1,2,4}, Ami Maruyama^{1,2}, Joji Nakayama^{1,2,5}, Tomoyuki Miyashita^{1,2,5}, Hibiki Udagawa⁶, Shigeki Umemura⁶, Kazuyoshi Yanagihara⁷, Atsushi Ochiai⁸, Masaru Tomita^{3,4}, Tomoyoshi Soga^{3,4}, Katsuya Tsuchihara⁵ and Hideki Makinoshima^{1,5*}

¹ Tsuruoka Metabolomics Laboratory, National Cancer Center, Tsuruoka, Japan, ² Shonai Regional Industry Promotion Center, Tsuruoka, Japan, ³ Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University, Fujisawa, Japan, ⁴ Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, Japan, ⁵ Division of Translational Research, Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center, National Cancer Center, Kashiwa, Japan, ⁶ Department of Thoracic Oncology, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan, ⁷ Division of Biomarker Discovery, Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center, National Cancer Center, Kashiwa, Japan, ⁸ Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center, National Cancer Center, Kashiwa, Japan

OPEN ACCESS

Edited by:

Guoxiang Xie,
University of Hawaii Cancer Center,
United States

Reviewed by:

Runqiu Jiang,
Nanjing Medical University, China
Zui Pan,
University of Texas at Arlington,
United States

*Correspondence:

Hideki Makinoshima
hmakinosh@ncc-tmc.jp;
hmakinosh@east.ncc.go.jp

Specialty section:

This article was submitted to
Translational Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 14 May 2018

Accepted: 18 September 2018

Published: 12 October 2018

Citation:

Sato Y, Matsuda S, Maruyama A, Nakayama J, Miyashita T, Udagawa H, Umemura S, Yanagihara K, Ochiai A, Tomita M, Soga T, Tsuchihara K and Makinoshima H (2018) Metabolic Characterization of Antifolate Responsiveness and Non-responsiveness in Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Front. Pharmacol.* 9:1129. doi: 10.3389/fphar.2018.01129

Antifolates are a class of drugs effective for treating malignant pleural mesothelioma (MPM). The majority of antifolates inhibit enzymes involved in purine and pyrimidine synthesis such as dihydrofolate reductase (DHFR), thymidylate synthase (TYMS), and glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GART). In order to select the most suitable patients for effective therapy with drugs targeting specific metabolic pathways, there is a need for better predictive metabolic biomarkers. Antifolates can alter global metabolic pathways in MPM cells, yet the metabolic profile of treated cells has not yet been clearly elucidated. Here we found that MPM cell lines could be categorized into two groups according to their sensitivity or resistance to pemetrexed treatment. We show that pemetrexed susceptibility could be reversed and DNA synthesis rescued in drug-treated cells by the exogenous addition of the nucleotide precursors hypoxanthine and thymidine (HT). We observed that the expression of pemetrexed-targeted enzymes in resistant MPM cells was quantitatively lower than that seen in pemetrexed-sensitive cells. Metabolomic analysis revealed that glycine and choline, which are involved in one-carbon metabolism, were altered after drug treatment in pemetrexed-sensitive but not resistant MPM cells. The addition of HT upregulated the concentration of inosine monophosphate (IMP) in pemetrexed-sensitive MPM cells, indicating that the nucleic acid biosynthesis pathway is important for predicting the efficacy of pemetrexed in MPM cells. Our data provide evidence that may link therapeutic response to the regulation of metabolism, and points to potential biomarkers for informing clinical decisions regarding the most effective therapies for patients with MPM.

Keywords: tumor metabolism, mesothelioma, antifolate therapy, purine, pyrimidine

Abbreviations: ECAR, extracellular acidification rate; IMP, inosine monophosphate; MPM, malignant pleural mesothelioma; MTA, 5-methylthioadenosine; MTAP, methylthioadenosine phosphorylase; PRPP, phosphoribosyl diphosphate.

INTRODUCTION

Malignant pleural mesothelioma is a locally invasive and rapidly fatal malignancy linked to asbestos exposure (Liu et al., 2017; Yap et al., 2017). MPM develops in the pleural cavity and is highly resistant to a number of therapeutics, with prognosis of patients remaining poor (Creaney and Robinson, 2017; Liu et al., 2017; Scherpereel et al., 2018). A combination of pemetrexed (PMX, also called Alimta or LY231514) and cisplatin has been the first line chemotherapy regimen for more than a decade (Vogelzang et al., 2003; Scagliotti et al., 2008; Liu et al., 2017). Pemetrexed is an antifolate that is able to simultaneously inhibit the synthesis of purines and pyrimidines (Shih et al., 1997). In clinical use, treatment with pemetrexed plus cisplatin and vitamin supplements resulted in superior survival, time to progression, and response rates compared to treatment with cisplatin alone in patients with MPM (Vogelzang et al., 2003; Scagliotti et al., 2008). Pemetrexed and its polyglutamated derivatives inhibit thymidylate synthase (*TYMS*), dihydrofolate reductase (*DHFR*), and glycinamide ribonucleotide transformylase (*GART*), all of which are involved in the *de novo* biosynthesis of thymidine and purine nucleotides (Shih et al., 1997; Yap et al., 2017). Antimetabolite agents, including pemetrexed, induce an imbalance in the cellular nucleotide pool and inhibit nucleic acid biosynthesis that results in arresting the proliferation of tumor cells and inducing cell death (Zhao and Goldman, 2003; Yap et al., 2017).

The discovery of oncogenic driver mutations has allowed the identification of druggable targets and development of new therapies using small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKI) aimed at the relevant patient populations (Irmer et al., 2007; Levitzki, 2013; Hylebos et al., 2016). Comprehensive genomic analysis of MPM identified recurrent mutations, gene fusion and splicing alterations (Bueno et al., 2016). Through integrated analyses, alterations were identified in Hippo, mTOR, histone methylation RNA helicase and TP53 signaling pathways in MPM (Bueno et al., 2016). Other studies demonstrated that the most frequent genetic variations clustered into two main pathways (Hylebos et al., 2016). The first altered pathway was the TP53/DNA repair pathway with genetic variations in *TP53*, *BAP1* and *CDKN2A* genes, and the second pathway was the PI3K/AKT pathway, with genetic variations in *KIT*, *KDR*, *PIK3CA* and *NF2* genes, respectively (De Rienzo et al., 2016; Hylebos et al., 2016). However, there has been a paucity of new actionable mutations in MPM as drug targets.

Accumulating evidence shows that genetic mutations in cancer-driver genes, tumor suppressors, and amplified oncogenes are linked to specific alterations in metabolic pathways in cancer cells, involving proteins such as isocitrate dehydrogenase (IDH), fumarate hydratase (FH), MYC, K-RAS and BRAF (Levine and Puzio-Kuter, 2010; Cairns et al., 2011; Cheong et al., 2012; Dejure and Eilers, 2017; Palm and Thompson, 2017). The Warburg effect, the phenomenon in which cancer cells exhibit intense glucose consumption with production of lactate despite abundant oxygen availability, has been recognized since the 1930s (Vander Heiden et al., 2009; Lunt and Vander Heiden, 2011; Soga, 2013). Genetic mutations in tumor cells might cause

several unique metabolic phenotypes that are critical for cancer cell proliferation in MPM. The frequent loss of CDKN2A (at 9p21) in MPM typically includes the homozygous co-deletion of MTAP (Illei et al., 2003). Specifically, MTAP catalyzes the reversible phosphorylation of MTA to the purine adenine and 5-methylthioribose-1-phosphate and PRMT5 inhibition induced metabolic vulnerability (Kryukov et al., 2016; Mavrakis et al., 2016; Yap et al., 2017). The MTAP protein plays a crucial role in polyamine metabolism involving salvage of adenosine and methionine from the substrate MTA (Bertino et al., 2011; Makinoshima et al., 2018).

One-carbon metabolism involving the folate and methionine cycle integrates carbon units from amino acids and generates diverse outputs, such as the biosynthesis of nucleotides, lipids and proteins in cancer cells (Yang and Vousden, 2016; Ducker and Rabinowitz, 2017; Newman and Maddocks, 2017). Glycine can be utilized for *de novo* purine biosynthesis by two mechanisms: direct incorporation into the purine backbone or further oxidation by the glycine cleavage system (GCS) to yield one-carbon units for nucleotide synthesis and cellular methylation reactions (Amelio et al., 2014; Newman and Maddocks, 2017). The GCS has also been implicated in cell transformation and tumorigenesis (Zhang et al., 2012). Given the high proliferation rate of cancer cells and the requirement of nucleotides for proliferation, cancer cells have a large demand for one-carbon units for nucleotide synthesis (Yang and Vousden, 2016; Ducker and Rabinowitz, 2017; Newman and Maddocks, 2017). To this day, chemical variants of these initial folate antagonists such as methotrexate and pemetrexed constitute a major class of cancer chemotherapy agents and are used as frontline chemotherapy for diverse cancers (Zhao and Goldman, 2003).

In this paper, we characterized the metabolic features of mesothelioma using a non-targeted metabolic profiling strategy based on capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE/MS). MPM cell lines were categorized into two groups according to their susceptibility to pemetrexed treatment. Using end product rescue, we showed that treatment with pemetrexed mainly targets pyrimidine biosynthesis rather than purine biosynthesis in MPM cells. We also demonstrated a metabolic response including one-carbon cycle against pemetrexed treatment in sensitive or resistant MPM cells. Our results link the antifolate therapeutic response to the regulation of metabolism and imply that the levels of glycine and IMP are potential biomarkers that may inform the clinical utility of specific targeted therapies to treat patients with MPM.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

MPM an aggressive malignancy affecting pleural surfaces, is divided into three main histological subtypes. The epithelioid and sarcomatoid subtypes are characterized by cuboid and fibroblastoid cells, respectively. The biphasic subtype contains a mixture of both. Commercially available cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), which included MSTO-211H (biphasic), NCI-H28 (epithelial),

NCI-H226 (epithelial), NCI-H2052 (epithelial) and NCI-H2452 (epithelial). 3 MPM cell lines (TCC-MESO1 (epithelial), TCC-MESO2 (epithelial), and TCC-MESO3 (biphasic)) were established from Japanese patients with MPM and some of the biological characteristics were analyzed in a previous report (Yanagihara et al., 2010). All cell lines were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS. RPMI-1640 (R8758), glucose minus RPMI-1640 (R1383), phosphate buffered saline (PBS), hypoxanthine, thymidine, 2-deoxy-D-glucose (2DG) and MTA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, United States). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Biowest (Nuaille, France). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and glucose were purchased from Wako Pure Chemicals Industries (Osaka, Japan). Pemetrexed was purchased from Selleck (Houston, TX, United States). Cell Counting Kit-8 was purchased from Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan). FluxPak XF24 assay pack and XF glycolysis stress test kit was purchased from Seahorse Bioscience (North Billerica, MA, United States). Propidium iodide (PI) was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, United States). Mini-PROTEAN TGX Precast Gel, Trans-Blot Turbo Transfer System and Trans-Blot Turbo Transfer Pack were purchased from Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, United States). Primary antibodies specific for DHFR, GART and TYMS were purchased from Abcam (Cambridge, United Kingdom) and primary antibody to phospho-RB1 (pRB1), RB1, p21 and GAPDH were purchased from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, United States). The peroxidase-linked secondary antibodies for WB, HRP-linked sheep anti-mouse IgG and donkey anti-rabbit IgG, were purchased from GE Healthcare Biosciences (Pittsburgh, PA, United States). Oligomycin was purchased from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). SYBR Premix Ex Taq and primers were purchased from TaKaRa Bio (Shiga, Japan). Ribonuclease A (RNase A) was purchased from Roche Applied Science (Penzberg, Germany) and contaminating DNase was inactivated at 80°C for 30 min.

Cell Survival Assay and Proliferation Assay

MPM cells were seeded in RPMI-1640 containing various concentrations of pemetrexed in 96-well cell culture plates. After 72 h of incubation, cell viability was analyzed using a WST-8 assay using the Cell Counting Kit-8. The pemetrexed concentration against the percent of cell survival was plotted using all MPM cell lines. The IC_{50} values were calculated using Graph Pad Prism 7 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, United States). For rescue experiments, MPM cells were cultured in complete medium supplemented with 100 μ M hypoxanthine alone, 16 μ M thymidine alone or mixed hypoxanthine plus thymidine in the presence of pemetrexed.

Cell Cycle Analysis

Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. PBS, pemetrexed or pemetrexed + HT treated cells were harvested, washed twice with PBS, and fixed in 70% ethanol overnight at -20°C . Fixed cells were harvested and washed twice with PBS,

incubated with 1 ml of PBS containing 40 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide and 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A for 30 min at 37°C . Stained cells were analyzed using a Becton Dickinson FACSMelody instrument (Franklin Lakes, NJ, United States). FlowJo software (FlowJo, LLC, Ashland, OR, United States) was used for data analysis and generation of graphs. Single cell populations were gated and the percentage of cells in the various stages of the cell cycle (G0/G1, S, and G2/M phases) was determined by the Watson Model.

Measurement of ECAR and OCR

ECAR and OCR were measured with a XF glycolysis stress test kit according to the manufacturer's instructions (Seahorse Bioscience, Agilent). In brief, 4.5×10^4 cells were plated onto XF24 plates in RPMI-1640 (10% FBS, 2 mM glutamine) and incubated at 37°C , 5% CO_2 overnight. Cells were washed with assay medium (minus glucose and unbuffered RPMI-1640 (SIGMA R1383)), replaced with assay medium, and then placed at 37°C in a CO_2 -free incubator for 30 min. ECAR and OCR were monitored using a Seahorse Bioscience XF24 Extracellular Flux Analyzer over time and each cycle consisted of 3 min mixing, 3 min waiting, and 3 min measuring. Glucose, oligomycin and 2DG were diluted into XF24 media and loaded into the accompanying cartridge to achieve final concentrations of 10 mM, 5 μM , and 100 mM respectively. Injections of the drugs into the medium occurred at the time points specified.

Western Blotting

Cells were lysed in CST lysis buffer on ice for 2 min and centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 min. The protein content of supernatants was measured by BCA assay (Pierce). Equivalent amounts of protein samples were separated via 4–20% SDS/PAGE, transferred to PVDF membranes, and incubated overnight with primary antibodies (1:1000 dilution). The primary antibodies used in this study are listed in the materials. ECL anti-rabbit IgG HRP-linked whole antibody (1:10,000; GE Healthcare) was used as secondary antibody. Signals were detected using ECL Western Blotting Detection reagent (GE Healthcare) and FUSION FX (VILBER, France). The intensity of bands was quantified using Fusion Capt Advance FX7 software.

Quantitative RT-PCR

Cells were washed with PBS and total RNA from the MPM cell lines was isolated with TRIzol Reagent (Invitrogen). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen). Primers for metabolic genes were purchased from TaKaRa Bio (Japan). Real-time RT-PCR was carried out with specific primers and a QuantStudio 3 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, United States). GAPDH was used for normalization as control and the relative quantitation value compared to the calibrator for that target is expressed as $2^{-(Ct - Cc)}$.

Metabolite Measurements

Metabolic extracts were prepared from $1-5 \times 10^6$ MPM cells with methanol containing internal standard solution

(Human Metabolome Technologies; HMT, Inc., Tsuruoka, Japan) and analyzed using a capillary electrophoresis (CE)-connected electrospray ionization/time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOFMS) and capillary electrophoresis tandem mass spectroscopy (CE-MS/MS) system (CARCINOSCOPE, Human Metabolic Technologies, Tsuruoka, Japan). Procedures for metabolite measurements were as previously described (Makinoshima et al., 2014, 2018). In brief, cells were washed twice in 5% mannitol solution and then treated with 800 μ L of methanol and 550 μ L of Milli-Q water containing internal standards (H3304-1002, HMT, Inc., Tsuruoka, Japan). The metabolite extract was transferred into a microfuge tube and centrifuged at $2,300 \times g$ and 4°C for 5 min. Next, the upper aqueous layer was centrifugally filtered through a Millipore 5-kDa cutoff filter to remove proteins. The filtrate was centrifugally concentrated and resuspended in 50 μ L of Milli-Q water for CE-MS analysis. Cationic compounds were analyzed in the positive mode of CE-TOFMS and anionic compounds were analyzed in the positive and negative modes of CE-MS/MS according to the methods developed by Soga and Heiger (2000) and Soga et al. (2002, 2003). To obtain peak information including m/z , migration time (MT), and peak area, detected peaks by CE-TOFMS and CE-MS/MS were extracted using automatic integration software (MasterHands, Keio University, Tsuruoka, Japan and MassHunter Quantitative Analysis B.04.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States, respectively). Concentrations of metabolites were calculated by normalizing the peak area of each metabolite with respect to the area of the internal standard and by using standard curves obtained by three-point calibrations.

Statistical Analyses

Unless otherwise indicated, results were reported as the mean $\pm$ SD. Statistical analyses were done by two-tailed Student's t -test and p -values were indicated as * < 0.05 , ** < 0.01 and *** < 0.005 . For metabolomic data analysis we used Welch t -test and p -values were indicated as * < 0.05 , ** < 0.01 , and *** < 0.001 .

RESULTS

IC₅₀ Measurements in 8 Mesothelioma Cell Lines Treated With Pemetrexed

We analyzed the *in vitro* sensitivity of MPM cell lines to the antifolate inhibitor pemetrexed through proliferation assays. MPM cell growth inhibition dose-response curves of pemetrexed are shown in **Figure 1**. The cytotoxic effect of pemetrexed on human MPM cells was analyzed using a WST-8 cell counting kit after 72 h of exposure. The IC₅₀ value was defined as the dose of pemetrexed required to produce a 50% reduction in the viability of MPM cells. IC₅₀ values were measured in 8 MPM cell lines after 72 h treatment with pemetrexed and found to range from 47.4 nM to $\geq 10,000$ nM (**Figure 1**) as follows: MSTO-211H (47.4 nM), NCI-H28 (84.1 nM), NCI-H226 (1950 nM), NCI-H2052 (135 nM), NCI-H2452 ($> 10,000$ nM), TCC-MESO1 (435 nM), TCC-MESO2 (94.3 nM), TCC-MESO3 (883 nM).

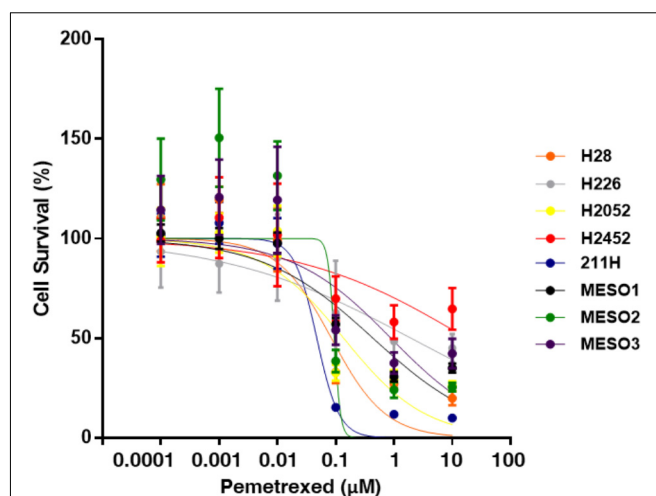
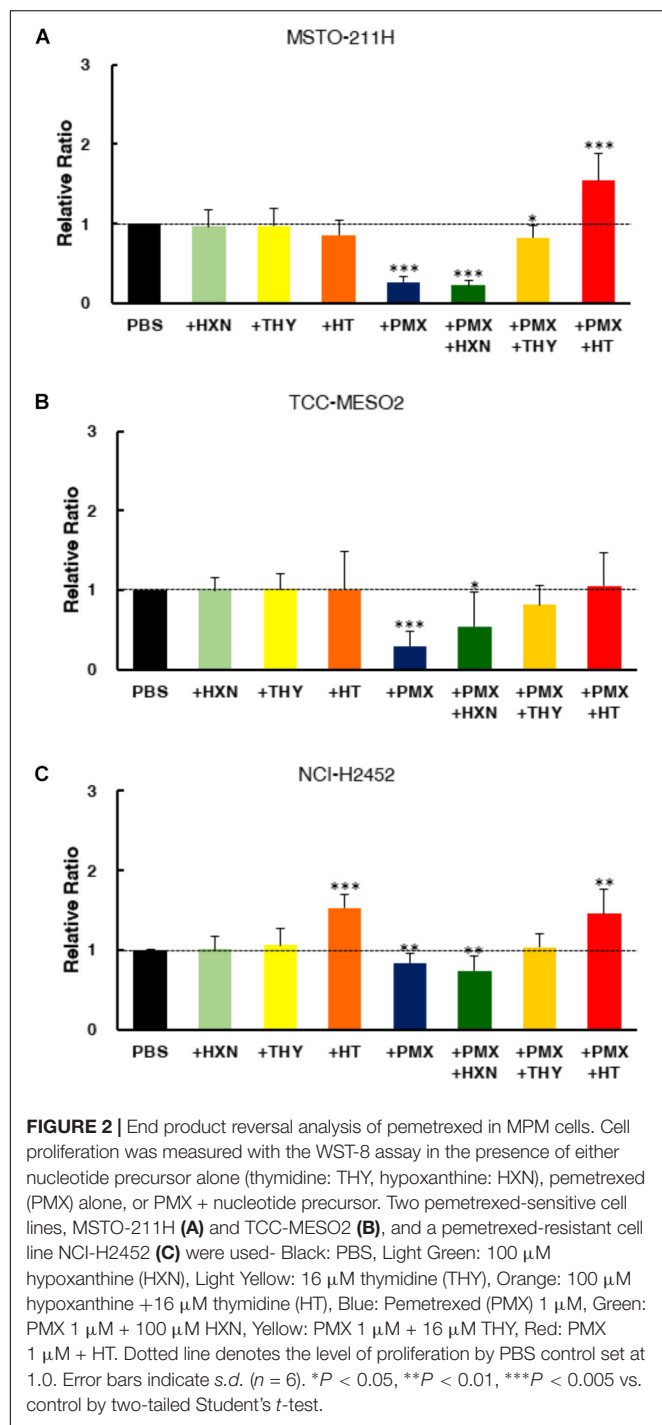


FIGURE 1 | Pemetrexed treatment represses cell growth of MPM cells. WST-8 assay with pemetrexed. Cells were treated with the indicated concentration of pemetrexed for 72 h, and their viability was assessed by the WST-8 assay. The % viability data are shown as the mean $\pm$ standard deviation (SD) ($n = 6$). Error bars indicate the range of SD. Blue line: MSTO-211H, Orange line: NCI-H28, Gray line: NCI-H226, Yellow line: NCI-H2052, Red line: NCI-H2452, Black line: TCC-MESO1, Green line: TCC-MESO2, and Purple line: TCC-MESO3. The *in vitro* half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of pemetrexed for the growth of MPM cell lines was calculated as the following values for each cell line: NCI-H28 = 84.1 nM, NCI-H226 = 1950 nM, NCI-H2052 = 135 nM, NCI-H2452 = $> 10,000$ nM, MSTO-211H = 47.4 nM, TCC-MESO1 = 435 nM, TCC-MESO2 = 94.3 nM, and TCC-MESO3 = 883 nM.

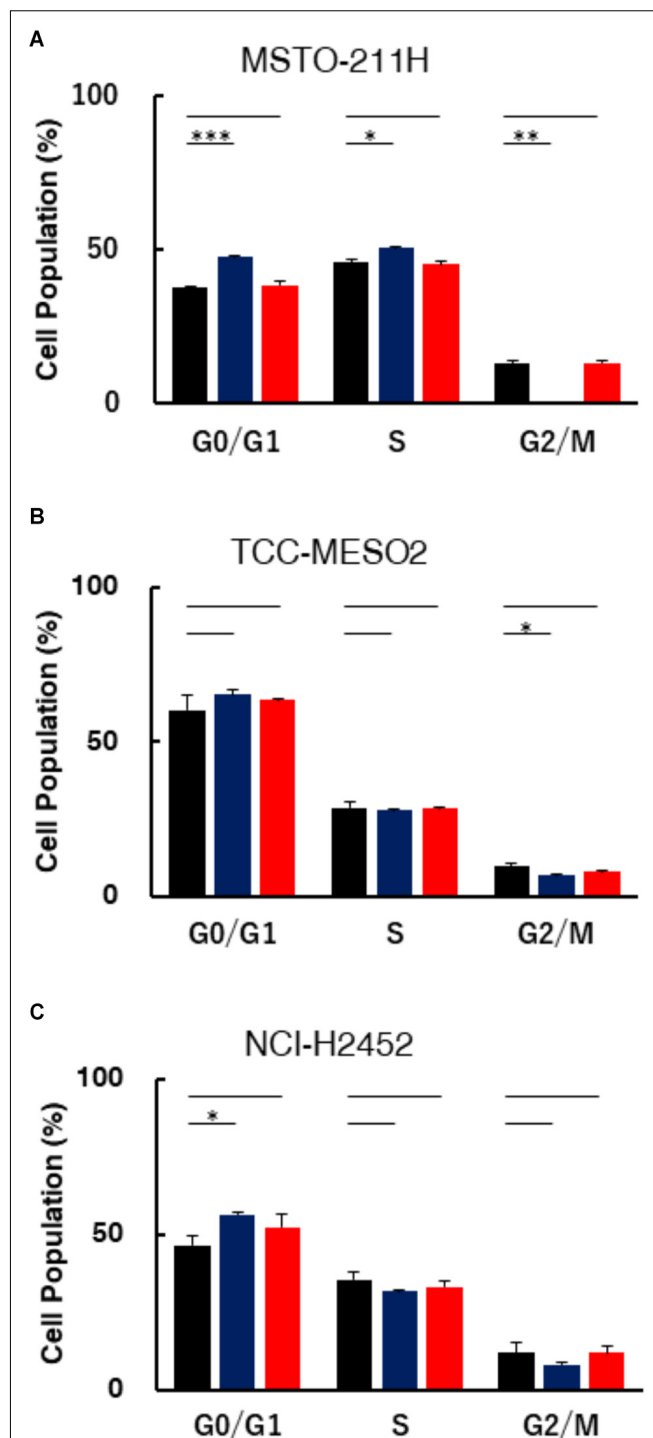
We found that MPM cell lines could be categorized into two groups according to their susceptibility to pemetrexed treatment. In agreement with previous findings (Satoh et al., 2017), the NCI-H2452 cell line was resistant to pemetrexed treatment as compared to other MPM cell lines. MSTO-211H was highly sensitive to pemetrexed in the nanomolar range as compared to the pemetrexed-resistant cell line NCI-H2452 (**Figure 1**). For the rest of this paper, we utilized the MSTO-211H and TCC-MESO2 cell lines as pemetrexed-sensitive cells and the NCI-H2452 cell line as pemetrexed-resistant cells.

End Product Reversal Studies of Pemetrexed in MPM Cells

To confirm the target specificity of pemetrexed, we tested the ability of exogenous nucleotide precursors (hypoxanthine and thymidine) to rescue the antiproliferative effects of pemetrexed on either sensitive or resistant MPM cells (**Figure 2**). The cytotoxic effect of pemetrexed on human MPM cells was analyzed using the WST-8 cell counting kit after 72 h of exposure. The addition of either hypoxanthine (HXN) or thymidine (THY) did not change the cell proliferation rate as compared to PBS control (**Figures 2A–C**). Treatment with PMX significantly reduced cell growth in both sensitive and resistant MPM cells (**Figures 2A–C**). In agreement with previous findings (Shih et al., 1997), the addition of HXN partially rescued PMX cytotoxicity in TCC-MESO2 but had no effect for MSTO-211H and NCI-H2452 cell lines (**Figure 2**). Next, we found that the addition of THY



nullified PMX cytotoxicity in TCC-MESO2 (Figure 2B) and NCI-H2452 (Figure 2C) cells, and partially in MSTO-211H cells (Figure 2A). The combination of hypoxanthine plus thymidine (+HT) completely rescued the growth repression induced by pemetrexed and the cell numbers here were significantly higher than those seen with PBS control in MSTO-211H and NCI-H2452 cells. These results demonstrate the target specificity of pemetrexed in MPM cells.



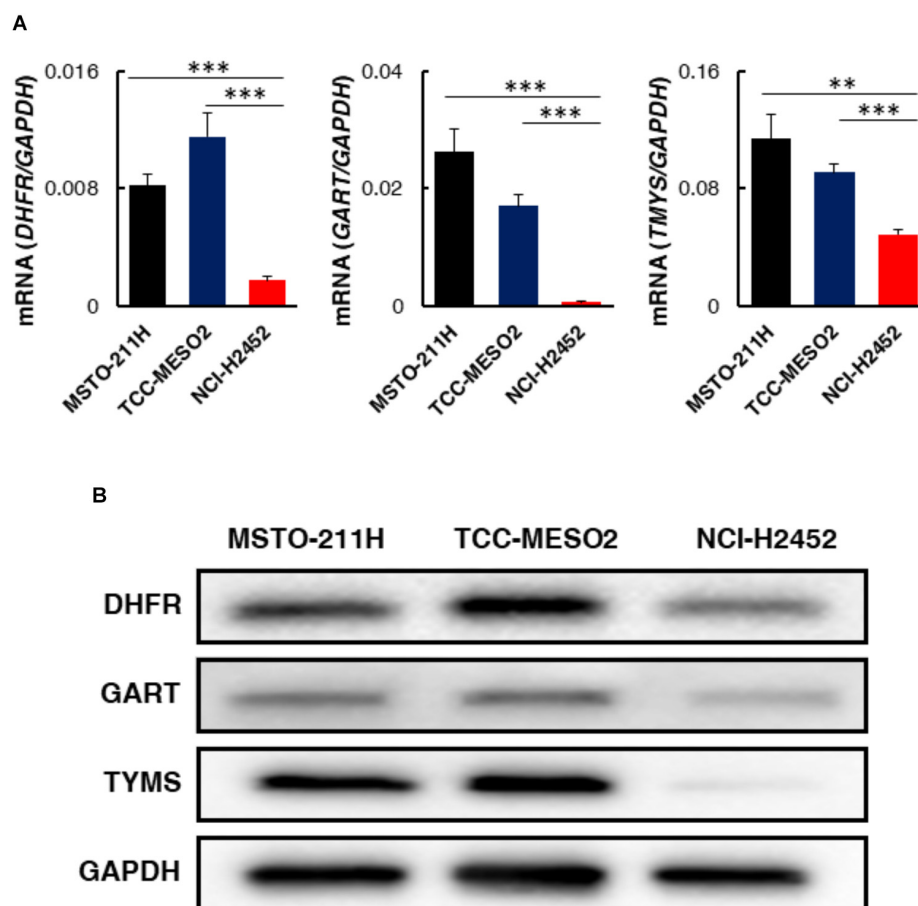


FIGURE 4 | Expression levels of target genes involved in one-carbon metabolism in pemetrexed-sensitive vs. pemetrexed-resistant MPM cells. **(A)** mRNA expression was evaluated by real-time RT-PCR using the $\Delta\Delta CT$ method normalized to the housekeeping gene GAPDH. Asterisks show significant difference from NCI-H2452 cells. Error bars indicate s.d. ($n = 6$). $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.005$ vs. control by two-tailed Student's *t*-test. **(B)** Representative images of Western blotting (WB) characterizing proteins involved in one-carbon metabolism. Equivalent amounts of proteins from whole-cell lysates were subjected to WB analysis to detect the indicated proteins. GAPDH was used as a loading control.

Treatment of MPM Cells With Pemetrexed Alters Cell Cycle Populations

To characterize the impact of pemetrexed treatment on cell cycle progression, we performed cell cycle analysis in MPM cells fixed and stained with PI (propidium iodide). The DNA content of the cells treated with pemetrexed for 6 h is shown in **Figure 3**, while the data for 24 h is shown in **Supplementary Figure S1**. Cell cycle distributions were determined by flow cytometric analyses of MSTO-211H, TCC-MESO2 and NCI-H2452 cells treated with PBS or 1 μ M pemetrexed, which is a relatively high concentration of pemetrexed for a short period of time (6 h). In pemetrexed-treated MSTO-211H cells, we observed a significant accumulation in the G0/G1 phase ($47.7 \pm 0.4\%$) of the cell cycle compared with $37.8 \pm 0.1\%$ in G1 when treated with PBS control (**Figure 3A**). The treatment of MSTO-211H cells with pemetrexed also induced S phase cell cycle arrest at $50.7 \pm 0.1\%$ of the cell population in the presence of pemetrexed as compared to $45.8 \pm 1.2\%$ with PBS control. Cell cycle arrest was released

when HT solution was added into culture medium (**Figure 3A**). In both pemetrexed-sensitive cell lines, MSTO-211H and TCC-MESO2, the G2/M cell population was decreased after treatment with pemetrexed. MSTO-211H cells in G2/M were changed from 12.8 ± 0.1 to 0.0% and TCC-MESO2 cells in G2/M were altered from $9.5 \pm 1.0\%$ to $7.7 \pm 0.4\%$ (**Figures 3A,B**). Similarly, we observed statistically significant G1 arrest after treatment with pemetrexed in NCI-H2452 cells (**Figure 3C**). As the treatment with pemetrexed altered cell cycle in MPM cells, we analyzed the levels of proteins involved in cell cycle regulation using Western blot (WB). WB analyses of pRB1, RB1 and p21 did not evidence substantial changes in their levels upon pemetrexed treatment (**Supplementary Figure S2**).

Expression Level of Pemetrexed Target Molecules

Pemetrexed and its polyglutamated derivatives mainly inhibit thymidylate synthase (TYMS), dihydrofolate reductase (DHFR), and glycineamide ribonucleotide transformylase (GART), all of

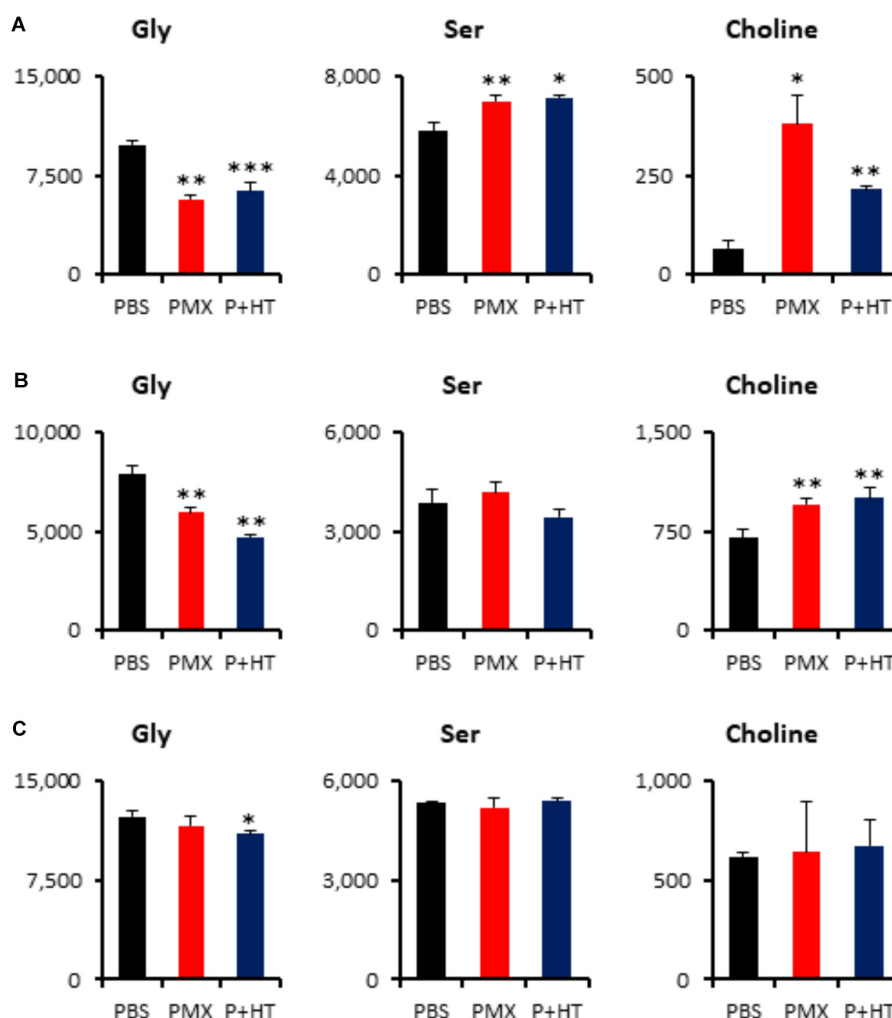


FIGURE 5 | Quantification of metabolites involved in the one-carbon pathway. Intracellular concentration (pmol/million cells) of key metabolites involved in the one-carbon metabolic pathway after treatment with pemetrexed is shown. Error bars indicate s.d. ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control by Welch t -test. Total metabolites were extracted with methanol from MSTO-211H (A), TCC-MESO2 (B), or NCI-H2452 (C) cells treated with PBS (black), 1 μ M PMX (red) or 1 μ M PMX + HT (blue) for 6 h. Representative metabolites such as glycine (Gly), serine (Ser), and choline are shown.

which are involved in the *de novo* biosynthesis of thymidine and purine nucleotides (Supplementary Figure S3). To investigate the efficacy of one-carbon metabolic pathway inhibition against MPM cells, we investigated whether the expression levels of pemetrexed targets involved in this pathway were different in pemetrexed sensitive vs. resistant MPM cell lines. Several prior studies showed that *TYMS* overexpression is one of the major factors leading to resistance in pemetrexed-resistant cells and that regulation of *DHFR*, *RFC*, and *FPGS* expression is associated with acquired resistance to antifolate (Zhao and Goldman, 2003). Therefore, we measured the expression level of *TYMS*, *DHFR* and *GART* at the transcriptional and protein levels. Transcriptional expression of genes encoding pemetrexed-target enzymes was measured by RT-PCR (Supplementary Table S1). Interestingly, as shown in Figure 4A, we observed that *DHFR*, *GART*, and *TYMS* mRNA expression levels were all significantly higher in pemetrexed-sensitive cells as

compared to the pemetrexed-resistant NCI-H2452 cells (*DHFR*: MSTO-211H = 4.7-fold, TCC-MESO2 = 6.5-fold; *GART*: MSTO-211H = 35.5-fold, TCC-MESO2 = 23.0-fold; *TYMS*: MSTO-211H = 2.3-fold, TCC-MESO2 = 1.9-fold). To confirm the mRNA results, we analyzed protein levels by WB. Representative images of WB results are shown in Figure 4B and quantitative analysis is shown in Supplementary Figure S4. Differences in *DHFR* protein levels in PMX-sensitive MSTO-211H and TCC-MESO2 cells as compared to PMX-resistant NCI-H2452 cells were not statistically significant (Supplementary Figure S4, $P = 0.055$). Consistent with the mRNA expression data, the expression of *GART* (MSTO-211H: 3.4-fold, TCC-MESO2: 3.3-fold), and *TYMS* proteins (MSTO-211H: 71.9-fold, TCC-MESO2: 81.4-fold) was found to be higher in pemetrexed-sensitive cells as compared to the pemetrexed-resistant NCI-H2452 cells (Supplementary Figure S4). Relative levels of GAPDH protein were not changed in MSTO-211H and

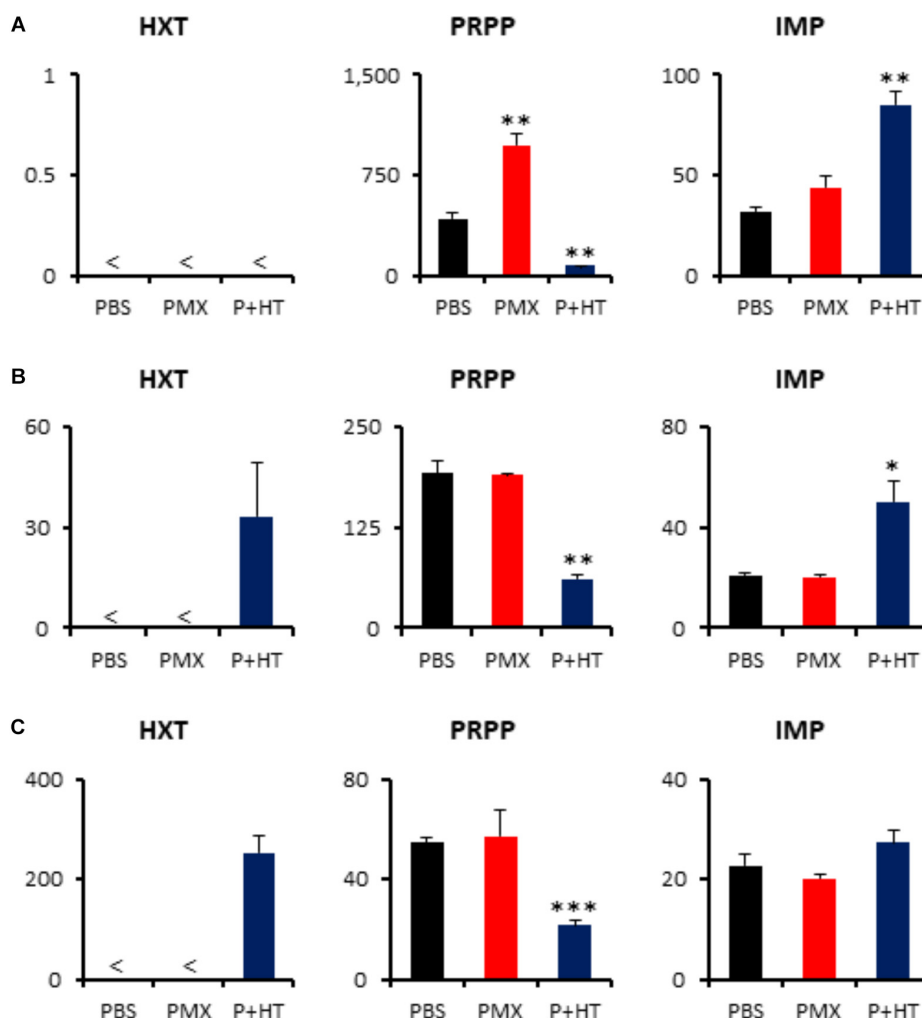


FIGURE 6 | Quantification of metabolites involved in purine salvage pathway. Intracellular concentration (pmol/million cells) of key metabolites involved in the purine salvage pathway after treatment of pemetrexed is shown. Error bars indicate s.d. ($n = 3$) and < indicates the metabolite was not detected (N.D.). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control by Welch t -test. Total metabolites were extracted with methanol from MSTO-211H (A), TCC-MESO2 (B), or NCI-H2452 (C) cells treated with PBS (black), 1 μ M PMX (red) or 1 μ M PMX + HT (blue) for 6 h. Representative metabolites including hypoxanthine (HXT), PRPP, and IMP are shown.

TCC-MESO2 as compared to NCI-H2452 cells (**Supplementary Figure S4**). The lower level of pemetrexed target molecules in the pemetrexed-resistant NCI-H2452 cells as compared to the sensitive cells suggests that the one-carbon metabolic pathway is altered and that the resistant cells may survive by bypassing folate related pathways.

Glycolytic Activities Are Not Altered in MPM Cells After Treatment With Pemetrexed

The expression level of enzymes in pemetrexed-sensitive cells was different from resistant cells, suggesting that metabolic profiles could be altered in cells sensitive or resistant to pemetrexed treatment. In cancer cells, the Warburg effect, whereby glucose is consumed with secretion of lactate despite abundant oxygen availability, has been recognized since the 1930s (Vander Heiden

et al., 2009; Lunt and Vander Heiden, 2011; Soga, 2013). We hypothesized that glycolytic activity would be correlated with pemetrexed sensitivity. To test this idea, we measured the glucose-induced ECAR, an indicator of lactate production, and the oxygen consumption rate (OCR), an indicator of oxidative phosphorylation (OXPHOS), using a flux analyzer. Basal levels of ECAR at the beginning of measurements, which indicated non-glycolytic acidification, were low in all MPM cells (**Supplementary Figure S5**). Equivalent ECAR was observed in MPM cells both pre- and post-treatment with an ATPase inhibitor oligomycin to induce maximum cellular glycolytic capacity (**Supplementary Figure S5**). At the final step, the addition of 2-deoxy-D-glucose (2DG), an inhibitor of glycolysis, completely shut down extracellular acidification (**Supplementary Figure S5**). ECAR was not statistically different in sensitive or resistant MPM cells either with or without pemetrexed (**Supplementary Figure S5**).

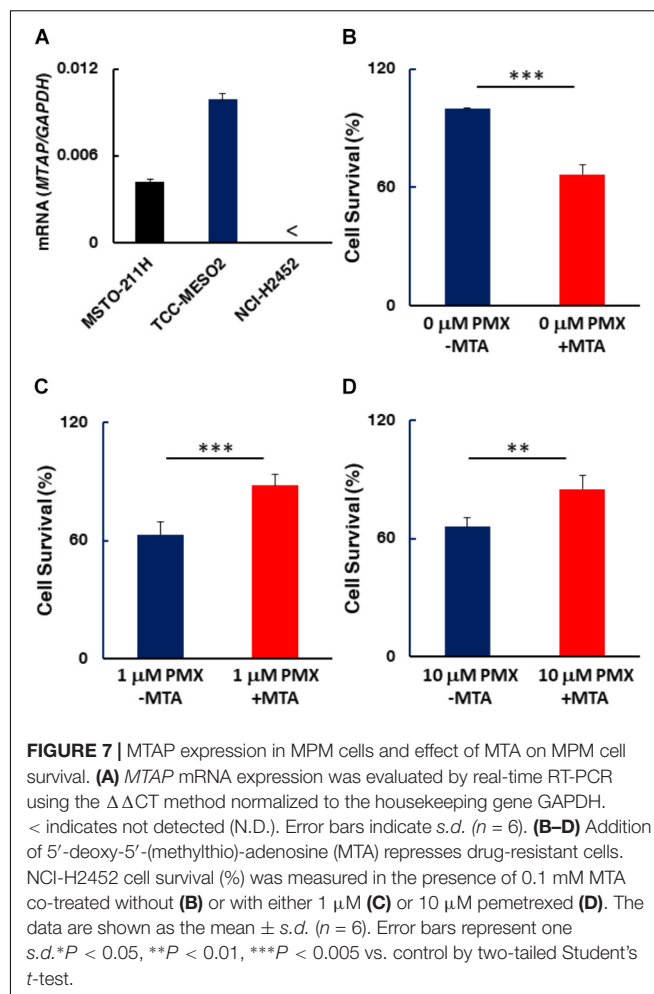
Alterations in Metabolic Pathways in the Response to Pemetrexed Treatment

To investigate whether treatment of MPM cells with pemetrexed affects global cancer metabolism, we employed metabolomics analysis. Intracellular metabolites were extracted with methanol and analyzed using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) (Soga et al., 2003) and the profile of 117 quantified metabolites is shown in **Supplementary Table S2**. Principal component analysis (PCA) and heatmap analysis of metabolomics datasets within the indicated cell lines and culture conditions are shown in **Supplementary Figure S6**. The amount of adenosine triphosphate (ATP), which is the molecular unit of currency of intracellular energy transfer, was not changed in any of the three tested cell lines after pemetrexed treatment for 6 h (**Supplementary Table S2**). Thymidine was not detected in MPM cells under any experimental conditions (**Supplementary Table S2**). With respect to one-carbon metabolism, glycine was significantly decreased in pemetrexed-sensitive cells after treatment with pemetrexed, but not in the resistant NCI-H2452 cells (**Figure 5**). On the other hand, choline accumulated in pemetrexed-sensitive cells after pemetrexed treatment, but not in resistant NCI-H2452 cells (**Figure 5**). Although the folate metabolic pathway is linked with the methionine cycle and polyamine biosynthesis pathways (**Supplementary Figure S3**), intermediate metabolites were not changed by pemetrexed treatment in both pemetrexed-sensitive and resistant cells (**Supplementary Table S2**).

The addition of exogenous hypoxanthine and thymidine is sufficient to provide the end product of the pemetrexed block and to permit DNA synthesis for cell division (**Figure 2**). Although intracellular thymidine was not detected in MPM cells under any experimental condition (**Supplementary Table S2**), intracellular hypoxanthine was detected in TCC-MESO2 and NCI-H2452 cells (**Figure 6**). Metabolome analysis revealed that HT treatment with pemetrexed significantly decreased the levels of PRPP in both pemetrexed-sensitive and pemetrexed-resistant cell lines (**Figure 6**). On the other hand, IMP, which is a product of the purine salvage pathway, was increased in the pemetrexed-sensitive MPM cells treated with pemetrexed + HT solution (**Figures 6A,B**), but not in resistant NCI-H2452 cells (**Figure 6C**).

MTAP Expression and MTA Effect for MPM Cell Survival

A previous study has shown homozygous deletion of *CDKN2A* and co-deletion of the *MTAP* gene in the majority of clinical cases of MPM (Illei et al., 2003). To determine the status of MTAP expression in MPM cell lines used here, we quantified *MTAP* mRNA expression levels by RT-PCR. *MTAP* gene expression was detected in the pemetrexed-sensitive MSTO-211H and TCC-MESO2 cells, but not in pemetrexed-resistant NCI-H2452 cells (**Figure 7**). Given our observation that pemetrexed treatment with HT solution significantly decreased the levels of PRPP in all MPM cells whereas IMP was upregulated in pemetrexed-sensitive but not pemetrexed-resistant cells (**Figure 6**), we hypothesized that MTA changed the pemetrexed sensitivity of MPM cells. To test this, we added MTA to the culture medium and measured



survival of the NCI-H2452 pemetrexed-resistant cell line treated with 0, 1, or 10 μ M pemetrexed (**Figure 7**). As predicted, the addition of MTA to the culture media of the drug-resistant cell line, NCI-H2452, resulted in a growth-repressive phenotype, as reflected by decreased cell survival (**Figure 7B**). In contrast, the addition of MTA to the culture media of NCI-H2452 cells treated with pemetrexed resulted in a more pemetrexed-resistant phenotype (**Figures 7C,D**). These results indicate that the vulnerability to targeting of the one-carbon metabolic pathway in MPM cells may be dependent on the purine biosynthesis pathway.

DISCUSSION

Antifolate is feasible chemotherapeutic option to treat MPM in the clinic. Most antifolate drugs including pemetrexed inhibit DHFR, TYMS and GART molecules involved in purine and pyrimidine biosynthesis. There still exists a need to develop predictive metabolic biomarkers that would allow stratification of patients for effective therapy with pemetrexed targeting the one-carbon metabolism pathway. In this paper, we found that MPM cell lines could be categorized into two groups based on their

sensitivity to pemetrexed treatment. Hypoxanthine and thymidine, which are end products of the pemetrexed-targeted metabolic pathway, are sufficient to cancel the cytotoxic effects of pemetrexed. Moreover, we found that the expression of pemetrexed-targeted enzymes was lower in pemetrexed-resistant MPM cells than in pemetrexed-sensitive cells on a molecular basis. Metabolomic analysis revealed that glycine and choline, which are involved in one carbon metabolism, were altered after treatment in pemetrexed-sensitive MPM cells, but not in resistant cells. In addition, the supplementation of HT induced higher concentrations of IMP in pemetrexed-sensitive MPM cells. Finally, we showed that the addition of MTA altered pemetrexed-sensitivity in MTAP-negative NCI-H2452 cells, indicating that the nucleic acid biosynthesis pathway is important for predicting the efficacy of pemetrexed in MPM cells.

The lower level of pemetrexed target molecules in the pemetrexed-resistant NCI-H2452 cells suggests that they may survive by bypassing folate related pathways (Figure 4). In addition, the level of intracellular glycine was decreased after treatment with pemetrexed in the sensitive MSTO-211H and TCC-MESO2 cells (Figure 5). In contrast to glycine, serine accumulated only in the MSTO-211H cells (Figure 5). Accumulating evidence indicates that serine and glycine metabolism is important for cancer growth and proliferation (Jain et al., 2012; Zhang et al., 2012; Kim et al., 2015; Ducker et al., 2017). The enzyme serine hydroxymethyltransferase (SHMT) catalyzes the conversion of serine and tetrahydrofolate (THF) into glycine and 5,10-methylene-THF (Supplementary Figure S3). Similarly, the enzyme glycine decarboxylase (GLDC) catalyzes the conversion of glycine and tetrahydrofolate (THF) into ammonia, carbon dioxide and 5,10-methylene-THF (Supplementary Figure S3). Although serine is the predominant source of one-carbon units in cancer cells (Labuschagne et al., 2014), the level of glycine was more dramatically down-regulated than serine (Figure 5). Glycine consumption and synthesis are correlated with rapid cancer cell proliferation and glycine metabolism supports *de novo* purine nucleotide biosynthesis. Moreover, the metabolic enzyme GLDC is critical for tumor-initiating cells in non-small cell lung cancer (NSCLC) (Zhang et al., 2012). Further investigation would be needed to characterize in greater detail the molecular mechanisms that control glycine metabolism in MPM cells.

Several studies have suggested that TYMS is a predictive biomarker for the use of pemetrexed in NSCLC (Bukhari and Goudar, 2013). However, these associations are controversial. Prior studies showed that TYMS overexpression was one of the major factors leading to resistance in pemetrexed-resistant cells (Zhao and Goldman, 2003). However, our study demonstrated the opposite results (Figure 4). This suggests that differences in degree of pemetrexed-resistance and patterns of resistance may be attributed to multiple factors that include drug transport and polyglutamination as well as changes in cellular folate pools that must be assessed and considered in pemetrexed-resistant MPM cells. A recent report showed that the balance between folic acid uptake, activation and utilization plays a crucial role in the response to pemetrexed-based chemotherapy

and prognosis in MPM (Mairinger et al., 2017). We observed that the addition of HXN partially rescued PMX cytotoxicity in TCC-MESO2 cells but had no effect in MSTO-211H and NCI-H2452 cell lines (Figure 2). With regards to the difference between MSTO-211H and TCC-MESO2 cells in the treatment of PMX + HXN, we speculate that pemetrexed mainly inhibits the pyrimidine biosynthesis pathway in MSTO-211H cells and inhibits both pyrimidine and purine biosynthesis pathways in TCC-MESO2 cells. Our results showed that the combination of hypoxanthine plus thymidine completely rescued the growth repression induced by pemetrexed (Figure 2). We reasoned that the treatment with HT solution might induce the mRNA expression level of PMX-target genes involved in one-carbon metabolism. However, the mRNA levels in both PMX-sensitive vs. PMX-resistant MPM cells was almost equivalent even after treatment with HT solution (Supplementary Figure S7). Therefore, the measured concentrations of hypoxanthine and thymidine in the serum or within the tumor tissue of MPM patients may directly correlate with non-responsiveness for pemetrexed treatment. To test this idea, we will need to analyze nucleic acid metabolites in clinical samples for these and other potential biomarkers to predict therapeutic response in MPM.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HM, JN, SU, AO, MT, TS, and KT designed the study and contributed to analysis and interpretation of data. YS and HM wrote the initial draft of the manuscript. All other authors have contributed to data collection and interpretation, and critically reviewed the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work.

FUNDING

This work was supported in part by research funds from the Yamagata prefectural government and the City of Tsuruoka. This work was also supported by the National Cancer Center Research and Development Fund (28-A-9) and JSPS KAKENHI Grant number 17K07189 to HM.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all of Shonai Regional Industry Promotion Center members for their help. We also thank Dr. Phillip Wong for carefully reading the manuscript and providing critical comments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.01129/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Amelio, I., Cutruzzola, F., Antonov, A., Agostini, M., and Melino, G. (2014). Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 39, 191–198. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.004
- Bertino, J. R., Waud, W. R., Parker, W. B., and Lubin, M. (2011). Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity: current strategies. *Cancer Biol. Ther.* 11, 627–632. doi: 10.4161/cbt.11.7.14948
- Bueno, R., Stawiski, E. W., Goldstein, L. D., Durinck, S., De Rienzo, A., Modrusan, Z., et al. (2016). Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat. Genet.* 48, 407–416. doi: 10.1038/ng.3520
- Bukhari, A. A., and Goudar, R. K. (2013). Thymidylate synthase as a predictive biomarker for pemetrexed response in NSCLC. *Lung Cancer Int.* 2013:436409. doi: 10.1155/2013/436409
- Cairns, R. A., Harris, I. S., and Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 85–95. doi: 10.1038/nrc2981
- Cheong, H., Lu, C., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (2012). Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat. Biotechnol.* 30, 671–678. doi: 10.1038/nbt.2285
- Creaney, J., and Robinson, B. W. S. (2017). Malignant mesothelioma biomarkers: from discovery to use in clinical practice for diagnosis, monitoring, screening, and treatment. *Chest* 152, 143–149. doi: 10.1016/j.chest.2016.12.004
- Dejure, F. R., and Eilers, M. (2017). MYC and tumor metabolism: chicken and egg. *EMBO J.* 36, 3409–3420. doi: 10.15252/embj.201796438
- De Rienzo, A., Archer, M. A., Yeap, B. Y., Dao, N., Sciaranghella, D., Sideris, A. C., et al. (2016). Gender-specific molecular and clinical features underlie malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res.* 76, 319–328. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0751
- Ducker, G. S., Ghergurovich, J. M., Mainolfi, N., Suri, V., Jeong, S. K., Hsin-Jung Li, S., et al. (2017). Human SHMT inhibitors reveal defective glycine import as a targetable metabolic vulnerability of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 11404–11409. doi: 10.1073/pnas.1706617114
- Ducker, G. S., and Rabinowitz, J. D. (2017). One-carbon metabolism in health and disease. *Cell Metab.* 25, 27–42. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.009
- Hylebos, M., Van Camp, G., Van Meerbeeck, J. P., and Op De Beeck, K. (2016). The genetic landscape of malignant pleural mesothelioma: results from massively parallel sequencing. *J. Thorac. Oncol.* 11, 1615–1626. doi: 10.1016/j.jtho.2016.05.020
- Illei, P. B., Rusch, V. W., Zakowski, M. F., and Ladanyi, M. (2003). Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin. Cancer Res.* 9, 2108–2113.
- Irmer, D., Funk, J. O., and Blaukat, A. (2007). EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy. *Oncogene* 26, 5693–5701. doi: 10.1038/sj.onc.1210383
- Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A. L., et al. (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science* 336, 1040–1044. doi: 10.1126/science.1218595
- Kim, D., Fiske, B. P., Birsoy, K., Freinkman, E., Kami, K., Possemato, R. L., et al. (2015). SHMT2 drives glioma cell survival in ischaemia but imposes a dependence on glycine clearance. *Nature* 520, 363–367. doi: 10.1038/nature14363
- Kryukov, G. V., Wilson, F. H., Ruth, J. R., Paulk, J., Tsherniak, A., Marlow, S. E., et al. (2016). MTAP deletion confers enhanced dependency on the PRMT5 arginine methyltransferase in cancer cells. *Science* 351, 1214–1218. doi: 10.1126/science.125214
- Labuschagne, C. F., Van Den Broek, N. J., Mackay, G. M., Vousden, K. H., and Maddocks, O. D. (2014). Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Rep.* 7, 1248–1258. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.045
- Levine, A. J., and Puzio-Kuter, A. M. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330, 1340–1344. doi: 10.1126/science.1193494
- Levitzi, A. (2013). Tyrosine kinase inhibitors: views of selectivity, sensitivity, and clinical performance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 161–185. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140341
- Liu, B., Van Gerwen, M., Bonassi, S., Taioli, E., and International Association for the Study of Lung Cancer Mesothelioma Task Force (2017). Epidemiology of environmental exposure and malignant mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* 12, 1031–1045. doi: 10.1016/j.jtho.2017.04.002
- Lunt, S. Y., and Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 441–464. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237
- Mairinger, F. D., Vollbrecht, C., Flom, E., Christoph, D. C., Schmid, K. W., Kollmeier, J., et al. (2017). Folic acid phenotype (FAP) is a superior biomarker predicting response to pemetrexed-based chemotherapy in malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget* 8, 37502–37510. doi: 10.18632/oncotarget.16398
- Makinoshima, H., Takita, M., Matsumoto, S., Yagishita, A., Owada, S., Esumi, H., et al. (2014). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling regulates global metabolic pathways in EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *J. Biol. Chem.* 289, 20813–20823. doi: 10.1074/jbc.M114.575464
- Makinoshima, H., Umemura, S., Suzuki, A., Nakanishi, H., Maruyama, A., Udagawa, H., et al. (2018). Metabolic determinants of sensitivity to phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibitor in small-cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 78, 2179–2190. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2109
- Mavrikakis, K. J., McDonald, E. R. III, Schlabach, M. R., Billy, E., Hoffman, G. R., Deweck, A., et al. (2016). Disordered methionine metabolism in MTAP/CDKN2A-deleted cancers leads to dependence on PRMT5. *Science* 351, 1208–1213. doi: 10.1126/science.1259444
- Newman, A. C., and Maddocks, O. D. K. (2017). Serine and functional metabolites in cancer. *Trends Cell Biol.* 27, 645–657. doi: 10.1016/j.tcb.2017.05.001
- Palm, W., and Thompson, C. B. (2017). Nutrient acquisition strategies of mammalian cells. *Nature* 546, 234–242. doi: 10.1038/nature22379
- Satoh, T., Tatsuta, T., Sugawara, S., Hara, A., and Hosono, M. (2017). Synergistic anti-tumor effect of bullfrog sialic acid-binding lectin and pemetrexed in malignant mesothelioma. *Oncotarget* 8, 42466–42477. doi: 10.18632/oncotarget.17198
- Scagliotti, G. V., Parikh, P., Von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., et al. (2008). Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 3543–3551. doi: 10.1200/JCO.2007.15.0375
- Scherpereel, A., Wallyn, F., Albelda, S. M., and Munck, C. (2018). Novel therapies for malignant pleural mesothelioma. *Lancet Oncol.* 19, e161–e172. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30100-1
- Shih, C., Chen, V. J., Gossett, L. S., Gates, S. B., Mackellar, W. C., Habeck, L. L., et al. (1997). LY231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes. *Cancer Res.* 57, 1116–1123.
- Soga, T. (2013). Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci.* 104, 275–281. doi: 10.1111/cas.12085
- Soga, T., and Heiger, D. N. (2000). Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72, 1236–1241. doi: 10.1021/ac990976y
- Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., and Nishioka, T. (2003). Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2, 488–494. doi: 10.1021/pr034020m
- Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Matsuda, K., Tomita, M., and Nishioka, T. (2002). Pressure-assisted capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions. *Anal. Chem.* 74, 6224–6229. doi: 10.1021/ac0202684
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809
- Vogelzang, N. J., Rusthoven, J. J., Symanowski, J., Denham, C., Kaukel, E., Ruffie, P., et al. (2003). Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 21, 2636–2644. doi: 10.1200/JCO.2003.11.136
- Yanagihara, K., Tsumuraya, M., Takigahira, M., Mihara, K., Kubo, T., Ohuchi, K., et al. (2010). An orthotopic implantation mouse model of human malignant pleural mesothelioma for in vivo photon counting analysis and evaluation of the effect of S-1 therapy. *Int. J. Cancer* 126, 2835–2846. doi: 10.1002/ijc.25002

- Yang, M., and Vousden, K. H. (2016). Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 650–662. doi: 10.1038/nrc.2016.81
- Yap, T. A., Aerts, J. G., Popat, S., and Fennell, D. A. (2017). Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat. Rev. Cancer* 17, 475–488. doi: 10.1038/nrc.2017.42
- Zhang, W. C., Shyh-Chang, N., Yang, H., Rai, A., Umashankar, S., Ma, S., et al. (2012). Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* 148, 259–272. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.050
- Zhao, R., and Goldman, I. D. (2003). Resistance to antifolates. *Oncogene* 22, 7431–7457. doi: 10.1038/sj.onc.1206946

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Sato, Matsuda, Maruyama, Nakayama, Miyashita, Udagawa, Umemura, Yanagihara, Ochiai, Tomita, Soga, Tsuchihara and Makinoshima. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

じん肺患者における好中球細胞質抗体（ANCA）陽性率の検討 —多施設共同横断的研究—

大塚 義紀¹⁾, 宇佐美郁治²⁾, 水橋 啓一³⁾, 岸本 卓巳⁴⁾
坂本 浩一⁵⁾, 宮本 顕二¹⁾, 木村 清延¹⁾, 藤本 伸一⁴⁾
加藤 宗博²⁾, 横山多佳子²⁾, 太田 千晴²⁾

¹⁾北海道中央労災病院内科

²⁾旭労災病院呼吸器科

³⁾富山労災病院アスベスト疾患センター

⁴⁾岡山労災病院内科

⁵⁾神戸労災病院呼吸器科

(平成 29 年 10 月 5 日受付)

要旨：【はじめに】 ANCA 関連腎疾患患者に、シリカばく露を受けた者が多いとする報告がみられるが、本邦においてじん肺患者における ANCA 関連腎疾患・血管炎の頻度は明らかでない。そこでじん肺患者（以下 PP 群）およびじん肺以外の患者または健常人（以下 NP 群）における MPO-ANCA, PR3-ANCA の陽性率を調べた。

【対象と方法】 2014 年 11 月 1 日から 2017 年 1 月 14 日の期間中に協力病院を受診したじん肺管理 3 以上の男性患者 453 名およびじん肺以外の男性患者（経口ステロイド使用者および担癌患者は除く）および健常成人を対象者併せた対照群を 447 名とした。方法は、採血にて MPO-ANCA, PR3-ANCA, 抗核抗体(ANA), リウマチ因子(RF), 抗 CCP 抗体の ELISA 検査を行った。統計は、抗体陽性比率をカイ二乗検定にて検討し、 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】 粉じん職歴の主なものは炭山 357 名 (81%), 窯業 22 名 (4.9%) であった。PP 群は、全員が管理 3(口)以上で、画像所見上 88% 以上に大陰影を認めた。平均年齢が PP 群で 78.6 ± 6.4 SD 歳, NP 群で 75.2 ± 6.3 歳で PP 群が有意に高齢であったが、eGFR は両群に有意差がなかった。NP 群で GPA 症例 1 例の発症があった。MPO-ANCA の陽性者 (PP 群 6 例: NP 群 3 例) および PR3-ANCA の陽性者 (13 例: 11 例) にて、両群間で有意差がなかった。その他、抗 CCP 抗体は、(14 例: 4 例), ANA (59 例: 26 例), RF (58 例: 29 例) いずれも PP 群で有意に陽性率が高かった ($p < 0.001$)。

【結語】 PP 群で平均年齢が NP 群に比べて高齢であったが、ANCA 陽性率は両群で有意差はなかった。しかし、PP 群で RF, ANA, 抗 CCP 抗体の陽性率は有意に高かった。これらの結果から、じん肺は ANCA 陽性率と関係がない可能性がある。

(日職災医誌, 66: 196—200, 2018)

—キーワード—

MPO-ANCA, PR3-ANCA, 珪肺症

はじめに

じん肺にはカプラン症候群をはじめ、関節リウマチやその他の膠原病の合併が知られ、近年では好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody; 以下 ANCA) に関連した血管炎や腎炎の合併じん肺患者に見

られるとの報告もみられる¹⁾。

ANCA は自己抗体の一つで、1982 年 pauci-immune glomerulonephritis と呼ばれる免疫複合体沈着を伴わない糸球体腎炎に発見されて以来²⁾、その後の研究で、肉芽腫性多発血管炎 (granulomatosis with polyangitis: 以下 GPA)、顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangitis:

表 1 対象者および採血結果

	じん肺群	じん肺以外群	P
N	453	447	
年齢±標準偏差（範囲）	78.6±6.4（57～92）	75.2±6.3（60～92）	<0.001
MPO-ANCA 陽性者率（陽性者数/検査症例数）	1.3%（6/447）	0.7%（3/443）	NS
PR3-ANCA 陽性率（陽性者数/検査症例数）	2.9%（13/447）	2.4%（11/443）	NS
抗 CCP 抗体陽性率（陽性者数/検査症例数）	3.2%（14/439）	0.9%（4/440）	<0.05
抗核抗体陽性率（陽性者数/検査症例数）	15.1%（59/390）	6.3%（26/416）	<0.001
RF 陽性率（陽性者数/検査症例数）	16.3%（58/355）	7.0%（29/417）	<0.001
eGFR（ml/min）±標準偏差	65.6±17.6	65.0±15.4	NS

N：Number of subjects, P：chi-squared test, NS：not significant

以下 MPA），腎限局性血管炎との関連が確立された³⁾⁴⁾。活動性の GPA や MPA の 90% が ANCA 陽性とされ⁵⁾，さらに好酸球性肉芽腫性血管炎の約 40% に ANCA が陽性になることが明らかにされている⁶⁾。

ANCA の検査法には，蛍光抗体法と ELISA 法の 2 つがあり，蛍光抗体法の方が感度は高いが ELISA 法の方がより特異度が高いと言われ，より定量的な ELISA 法が現在では一般的になっている。血管炎では，好中球のアズール顆粒や単球のペルオキシダーゼ陽性ライソゾームに存在するそれぞれ PR3（proteinase-3）と MPO（myeloperoxidase）の 2 つの抗原が標的になっており，これらに対する抗体が PR3-ANCA，MPO-ANCA である⁷⁾。

本邦においてもじん肺患者における ANCA 関連腎疾患の症例報告はあるが，その頻度は明らかでない。そこでじん肺患者を多くかかえる 5 労災病院に通院中であるじん肺患者とじん肺以外の患者または健康人における MPO-ANCA，PR3-ANCA の陽性率の比較検討をおこなった。

対象と方法

対象は，2014 年 11 月 1 日から 2017 年 1 月 14 日の期間中に 5 つの研究協力病院を受診したじん肺管理 3 以上の男性患者 455 名（うち 2 名取り下げ希望）およびじん肺以外の男性患者（65 歳以上，経口ステロイド使用者および担癌患者は除く）を内科系と循環器内科に通院している患者を中心に募集した。また，老人ホームまたはシルバーボランティア所属の 65 歳以上の高齢者ら（経口ステロイドおよび担癌患者を除く，じん肺以外，通院している基礎疾患は不問）を募集し，併せて 447 名とした。

方法：検査をする前に書面にて同意書を取得後，採血を行った。5 つの病院からの検体は，同一の検査会社 BML で行い，抗核抗体，MPO-ANCA，PR3-ANCA，抗 CCP（cyclic citrullinated peptide）抗体，RF（rheumatoid factor），尿素窒素，クレアチニンを測定した。それぞれの検査項目の基準値も MBL 社の基準値を用いた。MPO-ANCA，PR3-ANCA については，ともに ≥ 3.5 IU/ml を陽性とした。また，推算糸球体濾過量（estimate glomeru-

lar filtration rate：以下 eGFR）については，日本腎臓病学会にて用いられている eGFR（ml/min/1.73m²）= $194 \times \text{Cr}^{-1.094} \times \text{年齢}^{-0.287}$ の計算式を採用して計算した⁸⁾。

統計は，じん肺患者群とそれ以外の群の比率を IBM SPSS Statistics Base，version 24 を用いてカイ二乗検定にて検討し， $p < 0.05$ を有意とした。なお，表中セルの期待度数が 5 よりも小さいときには，Fisher の直接法による計算値を用いた。

なおこの研究は，労働者健康安全機構の倫理委員会ならびに参加 5 施設の倫理委員会にて了承されている。

結 果

じん肺群 453 名，じん肺以外群 447 名が集積された。じん肺患者の主な職歴は，炭山 367 名（81.0%），窯業 22 名（4.9%），隧道 12 名（2.6%），金属鉱山 10 名（2.2%），溶接 6 名（1.3%），石材加工 5 名（1.1%），石綿 3 名（0.7%），鋳物 3 名（0.7%），その他 25 名（5.5%）であった。また，平均的な粉塵職業従事年数は， 28.0 ± 9.3 年（平均値±標準偏差，以下同様とする）であった。じん肺群の背景をみると，管理 3（ロ）が 45%，管理 4 が 55% を占めた。じん肺の画像所見では，小陰影の密度である Profusion Rate（以下 PR）1 の症例が 5%，PR2 の症例 5%，PR3 の症例が 2%，PR4A 24%，PR4B 35%，PR4C 29% であった。つまり大陰影を持つ者が 88% を占めた。両群を比較した結果を表 1 に示した。背景因子の比較では，平均年齢がじん肺群で 78.6 ± 6.4 歳，じん肺以外群で 75.2 ± 6.3 歳でじん肺群が有意に高齢であった。eGFR はじん肺群で 65.6 ± 17.5 ml/min，じん肺以外群で 65.1 ± 15.4 ml/min と有意差はなかった。両群で ANCA 関連血管炎を発症していた者は，じん肺以外群の GPA 症例 1 例（PR3-ANCA 33.1IU/ml）のみでじん肺群に発症者はなかった。抗体の陽性率を比較すると，MPO-ANCA の陽性者はじん肺群で 6 例（1.3%），じん肺以外群で 3 例（0.7%）であった。PR3-ANCA の陽性者は，じん肺群で 13 例（2.8%），じん肺以外群で 11 例（2.5%）であった。いずれも両群で有意差はなかった。ちなみに，ANCA 陽性者中尿蛋白陽性者の数は，じん肺群で 5 名，じん肺以外群で 1 名であった。Cr が > 1.1 mg/dl のものは，各群で 2 名ずつであっ

た。また、じん肺群の中で、抗体陽性者と抗体陰性者において、年齢 (78.9 ± 5.4 歳 : 78.6 ± 6.4 歳) および粉じん職従事年数 (27.5 ± 8.0 年 : 28.1 ± 9.3 年) に有意差はなかった。

その他の自己抗体の陽性率の比較では、抗 CCP 抗体はじん肺群で 14 例 (3.2%)、じん肺以外群で 4 例 (0.9%) とじん肺群で有意に比率が高かった ($p < 0.001$)。いずれの群でも関節リウマチの発症はなかった。抗核抗体、RF もじん肺群でいずれも 59 例 (15.1%)、58 例 (15.1%) とじん肺以外群のそれぞれ 26 例 (6.3%)、29 例 (7.0%) に比較し有意に陽性率が高かった (いずれも $p < 0.001$)。各抗体の陽性者に複数の抗体の重複は少なく、他の抗体によって ANCA 関連抗体陽性の予測は難しい。例えば、MPO-ANCA と PR3-ANCA では 1 例のみであった。

考 案

今回の検討対象になったじん肺患者群は、参加研究施設にてじん肺管理手帳ならびに合併症や管理 4 で定期検査を受けているほぼ全ての患者が対象である。多少の困難をおしても定期検査を受けている患者も多く、そのため対照群となるじん肺以外群の年齢よりも高齢となったものとする。その対象者をもとに検討をおこなった。その結果、発症者はじん肺以外群でのみ GPA 症例が存在し、じん肺群での発症者はいなかった。また、じん肺群で平均年齢が 3 歳ほど高いものの、両群で MPO-ANCA および PR3-ANCA の陽性率に有意差はなかった。しかしながら、それ以外の自己抗体である RF、抗核抗体、抗 CCP 抗体はじん肺群で有意に陽性率が高かった。

Beaudreuil らの検討では、聞き取り調査で粉じん吸入歴がある方が 2.6 倍の ANCA 陽性の危険性があり、シリカに職業的なばく露を受けている人ではさらに高い 3.4 倍の ANCA 陽性の危険性があると報告している⁹⁾。今回の我々の検討した対象の 88% が大陰影を有したじん肺患者であり、その群をもってしても ANCA 陽性率は高くはなかった。じん肺で見られる小陰影ならびに大陰影の成立には、シリカが存在が必要であり、今回検討したじん肺群は粉じん吸入職従事年数が 28 年と長期にわたり、管理区分 3 以上とシリカを含む粉じんを高度に吸入した群を対象にしている。そのため、シリカ吸入に関しては十分な対象者と考える。それにもかかわらず、以前の報告とは異なる結果であった。

じん肺群でじん肺以外群に比較して年齢が 3 歳ほど有意に高齢であった。そのため、早期に ANCA 関連腎疾患・血管炎に罹患したものが除かれてしまうバイアスがかかる危険性がある。しかしながら、今回のじん肺以外群における ANCA 陽性率は、c-ANCA (蛍光抗体法による抗体 ELISA 法での PR3-ANCA に相当) 陽性率が異なるものの、以前報告された一般フランス人高齢者の

MPO-ANCA 陽性率 0.73% とほぼ同等の陽性率であった¹⁰⁾。その報告では c-ANCA は 0% であり、今回の対照群の PR3-ANCA 陽性率は 2.5% であり、この点は異なる。その報告では、我々の検討よりもさらに HIV 感染や最近の輸血をした対象者を除外している点が異なるのかもしれない。

また、Fujimoto らの宮崎県の ANCA 関連腎疾患患者の平均年齢をみると 70.4 ± 10.9 歳であり、今回検討したじん肺以外群の平均年齢が 75.2 ± 6.3 歳 (範囲 65~92 歳) であり、ほぼ好発年齢をカバーしていると考えられる¹¹⁾。今回の検討でのじん肺群は、各病院のほぼじん肺患者全員のデータであり、その意味では本邦のじん肺患者の現状を表していると考ええる。ANCA 関連腎疾患・血管炎は高齢者に発症することが多く、さらにじん肺患者群も高齢化していることで、非じん肺群も高齢者を中心に募集した。

その一方で、ANCA 以外の自己抗体である RF、抗核抗体、抗 CCP 抗体については、じん肺群で有意に陽性率が高値であった。Zaghi らの報告でも、実際の関節リウマチはないが珪肺症患者で RF の陽性率が高く、年齢や喫煙歴には関係なかったとしている¹²⁾。今回の我々の検討でもじん肺患者で RF 陽性者は有意に非じん肺群よりも多く、またじん肺群で RF 陽性 58 名 (>15 IU/ml) 中、抗 CCP 抗体陽性者 (>4.5 IU/ml) は 9 名であった。また、じん肺以外群で RF 陽性者 29 名中、抗 CCP 抗体陽性者は 3 名であった。いずれの群も問診票で、非ステロイド性抗炎症薬の使用歴はなく、関節リウマチの診断は受けていない。じん肺は RF および CCP 抗体陽性にも働く要因にもなっている可能性がある。これらの結果は、今までのじん肺における結果と同様であり、普遍性のあるじん肺患者であるといえよう。その意味で、今回の研究はじん肺が ANCA 陽性率に無関係であることを支持しているものとする。

シリカを含む粉じん自己抗体が陽性になることが言われているが、その機序として、シリカの adjuvant 効果や制御性 T 細胞の免疫寛容などの自己免疫原性がこれらの陽性率に関与している可能性が想定されている¹³⁾¹⁴⁾。今回の検討で、じん肺群における ANCA とそれ以外の自己抗体の陽性率が異なることは、じん肺の存在と ANCA 陽性率が無関係である可能性と ANCA が陽性に成る機序が他の自己抗体が陽性になる機序と異なる可能性の二つが考えられる。今後の研究が期待される。

今回の検討の限界として、じん肺対象者が少ないことが挙げられる。ANCA 関連腎疾患・血管炎の発症率を検討することが望ましいが、ANCA 関連腎疾患・血管炎の発症率は 10 万人に 20 人前後であり、対照群を併せて 20 万人相当の対象者が必要であろう。そのため、今回は ANCA 陽性率を両群間で比較した。さらに今回の研究は横断的研究であり、じん肺が ANCA 関連腎疾患・血管

炎の発症に寄与するかどうかを判断するためには、数万人規模のじん肺または粉じん吸入した対象者を数年にわたって経時的に観察する必要がある。ただし、今回の対象者でも今までに報告された ANCA 陽性率を有し、ANCA 以外の自己抗体の陽性率が得られており、今回の検討は妥当な対象の集団で検討していることがうかがわれた。

最後に、今回の検討ではじん肺患者で ANCA 陽性率が有意差をもって高いということは無かった。ただし、膠原病の発症はないものの、他の自己抗体である抗核抗体、RF、抗 CCP 抗体がじん肺患者でじん肺以外群に比較して有意に陽性率が高い結果であった。

謝辞：この研究は、独立行政法人労働者健康安全機構第3期労災疾病研究補助金にて行われた。貴重なアドバイスをいただきました愛知医科大学腎臓リウマチ膠原病内科 坂野章吾教授、対照群の収集にご尽力いただきました北海道中央労災病院循環器科医師酒井寛人先生、高野英行先生、今 寿先生ならびに当研究グループ参加病院の外来医師、看護師、検査科技師、医師事務補助の皆様のご協力に深謝します。

利益相反：利益相反基準に該当無し

文 献

- 1) Gomez-Puerta JA, Gedmintas L, Costenbader KH: The association between silica exposure and development of ANCA-associated vasculitis: Systematic review and meta-analysis. *Autoimmune Rev* 12: 1129—1135, 2013.
- 2) Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB: Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J (Clin Res Ed)* 285: 606, 1982.
- 3) Falk RJ, Jennette JC: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 318: 1651, 1988.
- 4) Tervaert JW, Goldschmeding R, Elema JD, et al: Autoantibodies against myeloid lysosomal enzymes in crescentic glomerulonephritis. *Kid Int* 37: 799, 1990.
- 5) Guillevin L, Durand-Gasselin B, Cevallos R, et al: Microscopic angitis: clinical and laboratory findings in 85 patients. *Arthritis Rheum* 42: 421, 1999.
- 6) Sable-Fourtassou R, Cohen P, Mahr A, et al: Antineutrophil cytoplasmic antibodies and the Churg-Strauss syndrome. *Ann Intern Med* 143: 632, 2005.
- 7) 厚生労働省難治性疾患克服研究事業、難治性血管炎に関する調査研究班、進行性腎障害に関する調査研究班編：第2章 疾患概念、ANCA 関連血管炎の診療ガイドライン 2014 年改訂版。東京、2014, pp 7—17. <http://www.vas-mhlw.org/pdf/results/aav-guideline.pdf> (参照：2017.07.20)。
- 8) 日本腎臓病学会編：6-1 腎機能の評価法：成人、CKD 診療ガイド 2012。東京、東京医学社、2012, pp 18—21. <https://cdn.jsn.or.jp/guideline/pdf/CKDguide2012.pdf> (2017.07.20. 参照)。
- 9) Beaudreuil S, Lasfargues G, Laueriere L, et al: occupational exposure in ANCA-positive patients: a case-control study. *Kidney International* 76: 1961—1966, 2005.
- 10) Maillerfert JF, Pfitzenmeyer P, Thenet M, et al: Prevalence of ANCA in a hospitalized elderly French population. *Clin Exp Rheumatol* 15: 603—607, 1997.
- 11) Fujimoto S, Uezono S, Hisanaga S, et al: Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in the Miyazaki prefecture: the first population-based, retrospective, epidemiologic survey in Japan. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 1016—1022, 2006.
- 12) Zaghi G, Koga F, Nisihara RM, et al: Autoantibodies in silicosis patients and in silica-exposed individuals. *Rheumatol Int* 30: 1071—1075, 2010.
- 13) Vera-Lastra O, Medina G, Cruz-Dominguez Mdel P, et al: Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (Shoenfeld's syndrome): clinical and immunological spectrum. *Expert Rev Clin Immunol* 9: 961—973, 2013.
- 14) Lee S, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, et al: Silica exposure and altered regulation of autoimmunity. *Environ health Prev Med* 19: 322—329, 2014.

別刷請求先 〒068-0004 北海道岩見沢市四条東 16—5
北海道中央労災病院内科・職業性呼吸器疾患センター

大塚 義紀

Reprint request:

Yoshinori Ohtsuka

Hokkaido Chuo Rosai Hospital, 4-jo, Higashi 16-5, Iwamizawa, Hokkaido, 068-0004, Japan

Clinical Investigation of ANCA (Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibody) in Japanese Pneumoconiosis Patients—Multicenter Cross-sectional Study—

Yoshinori Ohtsuka¹⁾, Ikuji Usami²⁾, Keiichi Mizuhashi³⁾, Takumi Kishimoto⁴⁾, Kouichi Sakamoto⁵⁾,
Kenji Miyamoto¹⁾, Kiyonobu Kimura¹⁾, Nobukazu Fujimoto⁴⁾, Munehiro Kato²⁾,
Takako Yokoyama²⁾ and Chiharu Ohta²⁾

¹⁾Department of Internal Medicine, Hokkaido Chuo Rosai Hospital

²⁾Department of Respiratory Medicine, Asahi Rosai Hospital

³⁾Asbestos Related Disease Prevention Center, Toyama Rosai Hospital

⁴⁾Department of Internal Medicine, Okayama Rosai Hospital

⁵⁾Department of Respiratory Medicine, Kobe Rosai Hospital

Background: Silica exposure history has been reported as one of the etiological/environmental factors of ANCA-related renal disease patients. Several cases of ANCA-related renal or vasculitis with silica exposure have been reported in Japan, although no epidemiological study has been conducted. Therefore we have planned a cross-sectional study to evaluate the prevalence rate of MPO (myeloperoxidase)-ANCA and PR3 (proteinase 3)-ANCA positivity both in Japanese pneumoconiotic patients (PP) and in non-pneumoconiotic patients or volunteers (NP).

Subjects and Method: During the period of November 1, 2014 to January 14, 2017, 455 PP recognized as more than grade 3 (2 patients rejected later) and 477 NP without steroid treatment and without past history of cancer treatment were recruited from 3 hospitals. With written permission of agreement, serum antibodies including MPO-ANCA, PR3-ANCA, RF (rheumatoid factor), anti-CCP (citrullinated cationic protein) antibody, ANA (anti-nuclear antibody) were analyzed with ELISA in a nation-wide clinical examination company. Statistical analyses were conducted with chi-square tests and were considered as significant with p value under 0.05.

Results: Four hundred fifty three PP and 447 NP were studied. PP were consisted with 45% of grade 3 and 55% of grade 4 according to the Japanese Pneumoconiosis Law grade criteria. PP were consisted with 12 % simple silicosis type and 88 of complicated silicosis type. Mean age of PP was 78.6 ± 6.4 SD years old and was significantly higher than that of NP group 75.2 ± 6.7 years old ($p < 0.05$). Estimated eGFR was not significantly different between the two groups. One GPA (granulomatous poly angitis) was detected in NP group. There was not significantly difference in the positive rate of MPO-ANCA, and PR3-ANCA antibodies between the two groups (MPO-ANCA; 6 case vs 3 case, PR3-ANCA; 13 cases vs 11 cases). Although, PP group had significantly higher autoantibody positivity in anti-CCP antibody (14 cases vs 4 cases), ANA (59 cases vs 26 cases), and RF (58 cases vs 29 cases). There were few overlap among antibody positivity and were difficult to estimate the ANCA positivity from other antibody results.

Conclusion: PP group patients were significantly older than NP group by 3 years. Except ANCA, autoantibodies, such as RF, ANA, and anti-CCP antibodies were more frequently positive in PP group than in NP group. From these results, pneumoconiosis might have no relationship with the positivity of MPO-ANCA and PR3-ANCA.

(JJOMT, 66: 196—200, 2018)

—Key words—

MPO-ANCA, PR3-ANCA, pneumoconiosis, silicosis

胸膜中皮腫初診時の胸部 CT 画像の検討について

岸本 卓巳, 藤本 伸一

岡山労災病院アスベスト研究センター

(平成 30 年 1 月 17 日受付)

要旨：胸膜中皮腫 782 例の初診時の画像所見について胸部 CT 上以下の 7 パターンすなわち、①単発胸膜腫瘍形成、②環状胸膜肥厚、③軽度胸膜肥厚、④縦隔側胸膜肥厚、⑤胸水のみ、⑥多発性腫瘍形成、⑦特殊型に分けてその頻度を検討したところ、環状胸膜肥厚が 39.0%、多発性腫瘍形成が 14.9%、縦隔側胸膜肥厚が 14.8%、軽度胸膜肥厚 12.7%、単発胸膜腫瘍形成 9.2%、胸水のみ 8.4% であった。各組織型とも環状胸膜肥厚が最も多かったが、上皮型及び二相型では縦隔側胸膜肥厚、肉腫型では多発性腫瘍形成が 2 番目に多かった。一方、二相型では単発胸膜腫瘍形成が 6.4%、肉腫型では胸水のみが 2.7% と低率であった。

年代別では～2008 年までは環状胸膜肥厚、多発性腫瘍形成が多かったが、2009 年以降には縦隔側胸膜肥厚、胸水のみが増加傾向を示した。

岡山労災病院の 166 例について予後を検討したところ、組織型別では上皮型では生存期間中央値は 14.3 カ月と非上皮型に比較して有意 ($p<0.05$) に良好であった。

Staging 別では、Stage I は 24.4 カ月、Stage II は 17.0 カ月と比較的良好であったが、Stage III は 10.4 カ月、Stage IV は 8.6 カ月と予後不良であり、早期病変と進行期の間には有意差 ($p<0.05$) を認めた。画像別では単発胸膜腫瘍形成は手術により予後良好な症例が一定数いるが、生存期間中央値ではその他のパターンと差異はなかった。一方、胸水のみあるいは軽度胸膜肥厚はその他のパターンに比較して予後良好傾向を示したが、有意差はなく画像形態と予後の間には一定の関連性は認められなかった。

(日職災医誌, 66: 239—245, 2018)

—キーワード—

胸膜中皮腫、環状胸膜肥厚、胸水のみ

はじめに

胸膜中皮腫は石綿ばく露によって発症する特異な悪性腫瘍であるが、診断後は予後が不良で、早期に診断して手術療法を施行することが唯一の治癒が望まれる治療方法である。化学療法としては 2007 月に CDDP+pe-metrexed 併用療法が有効な治療として承認されて以降、有効な治療法がないのが現状である。そこで、初診時の胸部 CT 画像に注目して、特徴を 7 パターンに分類し、そのパターン別に集計し、生存期間との関連について検討する。

対象と方法

対象は 2003～2008 年までに胸膜中皮腫で死亡した症例のうち過去の全国調査で組織型の確定できた 482 例、2000～2016 年までに岡山労災病院で診断した 166 例、

2005～2016 年までに山口宇部医療センターで診断した 110 例、2006～2016 年までに札幌南三条病院で診断した 24 例の合計 782 例について、初診時の胸部 CT 画像の特徴について検討した。

方法は胸膜中皮腫の初診時の画像所見について胸部 CT 上以下の 7 パターンすなわち、①単発胸膜腫瘍形成、②環状胸膜肥厚、③軽度胸膜肥厚、④縦隔側胸膜肥厚、⑤胸水のみ、⑥多発性腫瘍形成、⑦特殊型 (表 1) に分けて、その頻度を検討した。

さらに病理組織型及び年代別 (2008 年までと 2009 年以降) に分けて比較検討した。

また、岡山労災病院の症例については病理組織型、Stage、画像パターン別の生存期間について検討した。Staging は IMIG1995 分類に従って分類した¹⁾。また、生存期間の有意差は Wilcoxon rank sum test により、 $p<0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1) 対象者は表2に示すように、782例で、男性657例、女性125例である。2005年の兵庫県尼崎市の旧クボタ神崎工場周辺の環境ばく露による中皮腫の発生が社会問題化した3年後の2008年を境界としてその前後の診断状況について検討したところ、それ以前が594例、その後が188例であった。2008年までは70歳未満が

表1 胸膜中皮腫の初診時胸部CT画像の特徴

- ・1：単発胸膜腫瘍形成
- ・2：環状胸膜肥厚（厚みがおおむね3mm以上）
- ・3：軽度胸膜肥厚（厚みが3mm未満）
- ・4：縦隔側胸膜肥厚
- ・5：胸水のみ
- ・6：多発性腫瘍形成（漿膜腫瘍）
- ・7：特殊型（胸壁腫瘍形成、縦隔腫瘍形成等）

60.6%であったが、2009年以降は48.4%と高齢者が多くなる傾向にあった。782例中胸水を伴う症例が89.1%あった。また組織型別では上皮型59.6%、二相型18.3%、肉腫型21.5%、特殊型が0.6%であった。

2) 782例の画像パターン別では、図1のごとく環状胸膜肥厚が39.0%、多発性腫瘍形成が14.9%、縦隔側胸膜肥厚が14.8%、軽度胸膜肥厚12.7%、単発胸膜腫瘍形成9.2%、胸水のみ8.4%で特殊型が1.0%であった。

組織型別の画像の特徴は図2のごとく、いずれのパターンでも環状胸膜肥厚が最も多かったが、上皮型及び二相型では縦隔側胸膜肥厚が2番目に多く、肉腫型では多発性腫瘍形成が2番目で、単発胸膜腫瘍形成が3番目であった。

一方、二相型では単発胸膜腫瘍形成が6.4%、肉腫型では胸水のみが2.7%と低率であった。

年代別では図3に示すように、環状胸膜肥厚が最も多

表2 対象症例の性別、年齢、年代別症例の一覧

		全体	～2008年まで	2009年以降
症例数		782	594	188
性別	男性	657 (84.0%)	493 (83.0%)	164 (87.2%)
	女性	125 (16.0%)	101 (17.0%)	24 (12.8%)
年齢	～60歳	159 (20.3%)	138 (23.2%)	21 (11.2%)
	61～65歳	150 (19.2%)	119 (20.0%)	31 (16.5%)
	66～70歳	142 (18.2%)	103 (17.4%)	39 (20.7%)
	71～75歳	137 (17.5%)	97 (16.3%)	40 (21.3%)
	76～80歳	111 (14.2%)	81 (13.7%)	30 (16.0%)
	81歳～	77 (9.8%)	50 (8.4%)	27 (14.4%)
	不明	6 (0.8%)	6 (1.0%)	0 (0%)

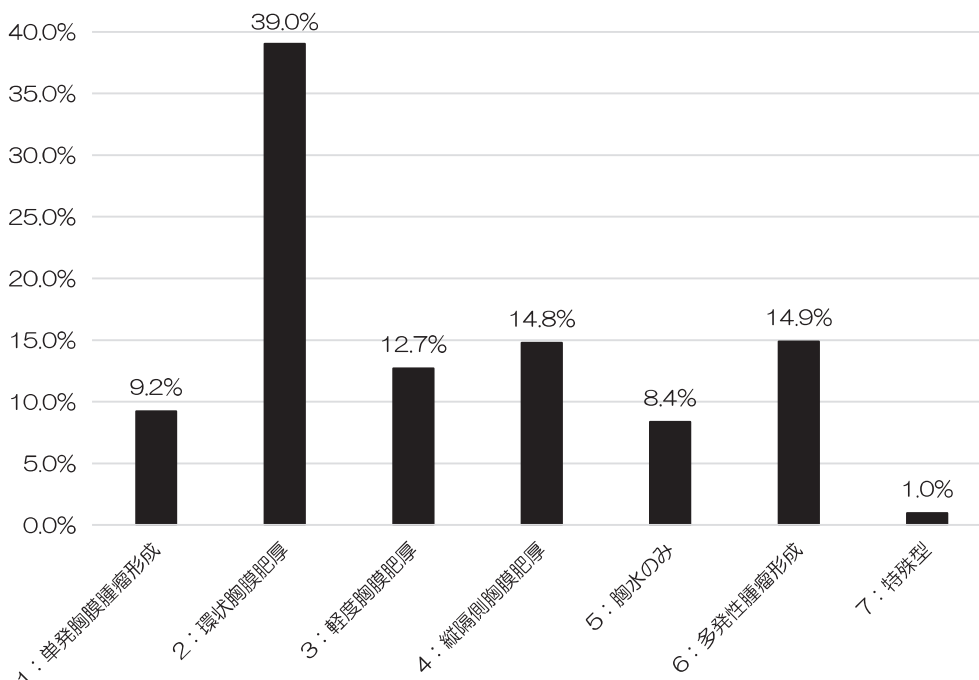


図1 全782例の胸部CT画像所見別頻度

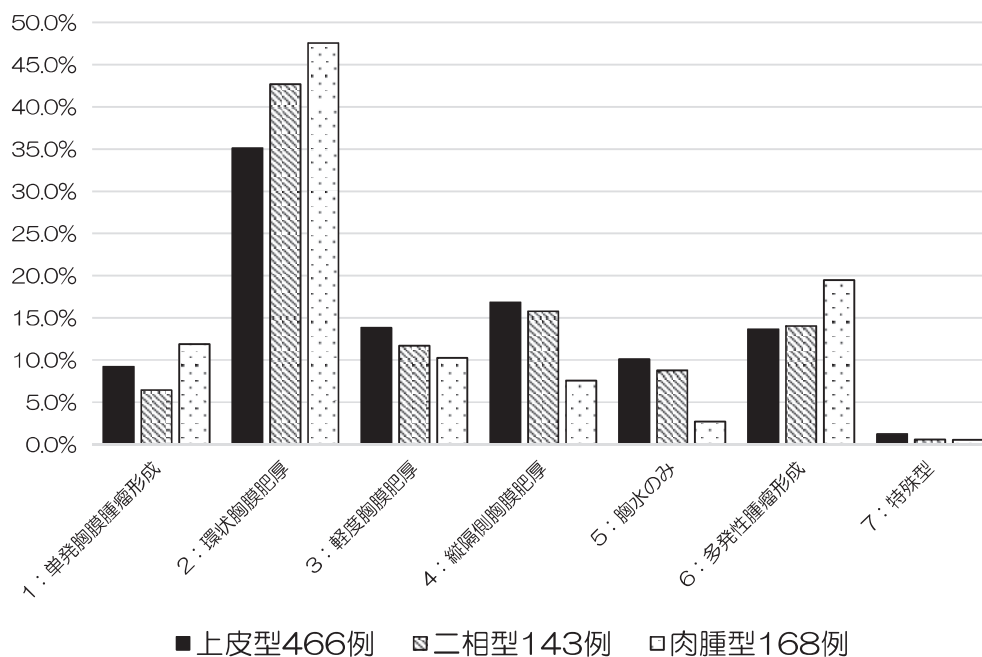


図2 組織型別画像所見頻度

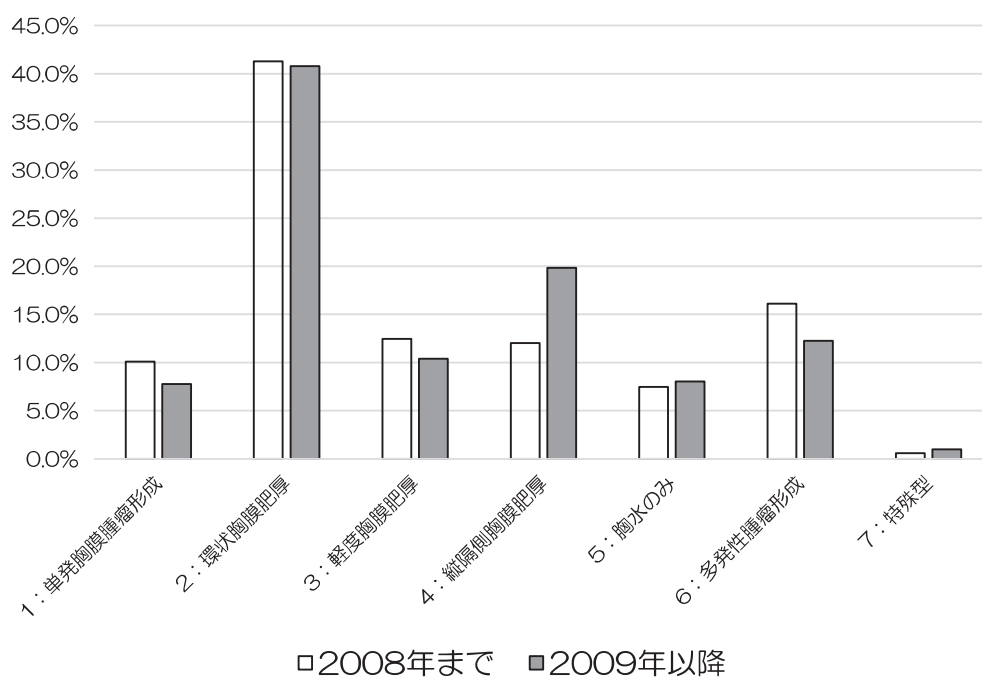


図3 年代別画像所見頻度

かったが、～2008年までは環状胸膜肥厚、多発性腫瘍形成が多かったが、2009年以降には縦隔側胸膜肥厚、胸水のみが増加傾向を示した。

この傾向を組織型別に検討したところ(図4)、上皮型では縦隔側胸膜肥厚や胸水のみの方が2009年以降増加傾向にあった。しかし、肉腫型では環状胸膜肥厚が56.0%と圧倒的に多く、2009年以降も増加傾向を示した。一方、胸水のみ等早期病変を示すパターンは10%未満であっ

た。

3) 岡山労災病院の166例については組織型、Stage、画像別に生存期間について検討した。図5に示すように、組織型別では上皮型では生存期間中央値は14.3カ月と非上皮型に比較して有意($p < 0.05$)に良好であったが、二相型は9.5カ月、肉腫型は6.1カ月と同様に予後不良であり、いずれも10カ月には満たなかった。

IMIG1995分類によるStaging別では、Stage Iは24.4

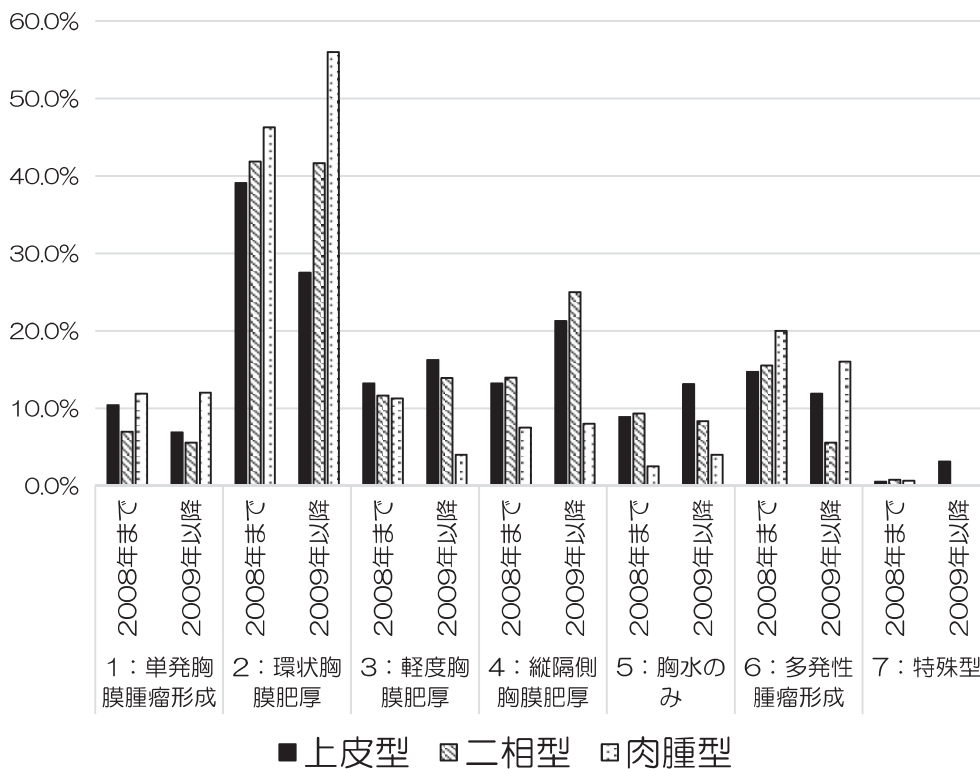


図4 年代・組織型別画像所見頻度

カ月, Stage II は 17.0 カ月と比較的良好であったが, Stage III は 10.4 カ月, Stage IV は 8.6 カ月と予後不良であり, 早期病変と進行期の間には有意差 ($p < 0.05$) を認めた (図 6)。

画像別では, 図 7 に示すように単発胸膜腫瘍形成は手術により予後良好な症例が一定数いるが, 生存期間中央値ではその他のパターンと差異はなかった。一方, 胸水のみあるいは軽度胸膜肥厚はその他のパターンに比較して, 予後良好傾向を示したが, 有意差はなかった。以上の結果から, 画像形態と予後の間には一定の関連性は認められなかった。

考 察

胸膜中皮腫 CT の典型像は壁側胸膜に発生する腫瘍が胸膜沿いに不整な肥厚像を呈して水平方向に増殖する環状胸膜肥厚 (pleural rind) が最も多いと記載されている^{2)~5)}。腫瘍は胸壁や肋骨浸潤を伴うこともあるが比較的まれである⁴⁾。今回, 我々は過去の厚生労働科学研究において収集した 2003~2008 年に胸膜中皮腫で死亡した症例のご遺族及び病院の同意を得られた 651 例のうち病理組織型が確定されていた 482 例, 岡山労災病院において確定診断された 166 例および山口宇部医療センターで診断された 110 例と札幌南三条病院で診断された 24 例, 合計 782 例の初診時の胸部 CT 画像所見の特徴について検討した。

その結果, 胸膜中皮腫の初診時の胸部 CT 画像では環

状胸膜肥厚が最も多く, 次いで多発性腫瘍形成, 縦隔側胸膜肥厚, 軽度胸膜肥厚, 単発胸膜腫瘍形成で胸水のための症例はわずか 8.4% であった。Kato⁶⁾も 2003~2008 年の日本の中皮腫でその 18% では, 腫瘍性胸膜肥厚を示さない胸水のみあるいはわずかな胸膜肥厚のある症例であったと報告している。Kato らの報告と同様, 病理組織診断において胸膜中皮腫であると組織型が確定している 782 例においてもほぼ同様のパターンを示した。一方, 組織型別でも, 上皮型, 二相型, 肉腫型のいずれにおいても環状胸膜肥厚が最も多かった。しかし, その他のパターン別では二相型では環状胸膜肥厚に次いで, 縦隔側胸膜肥厚, 多発性腫瘍形成が多く, 単発胸膜腫瘍形成はわずか 6.4% のみであった。また, 肉腫型でも環状胸膜肥厚が 47.6% と最も多く, 次いで多発性腫瘍形成, 3 番目に単発胸膜腫瘍形成であったが, 胸水のみは 2.7% と極めて少なかった。すなわち, 組織型には画像パターンの頻度が異なることが窺われた。

この画像パターンについて 2008 年 (いわゆるクボタショックの 3 年後) を境界として, その前後で比較したところ, 2009 年以降では胸水のための症例が 7.5% から 8.8% へと増加しているとともに, 縦隔側胸膜肥厚は 12.0% から 19.8% へと増加していた。その理由として, アスベスト問題が社会問題化したため 2009 年以降胸水を来す疾患の鑑別診断として胸膜中皮腫がクローズアップされ, 胸水中のヒアルロン酸等の測定頻度が増加するとともに胸水細胞診における免疫染色の導入も加速化さ

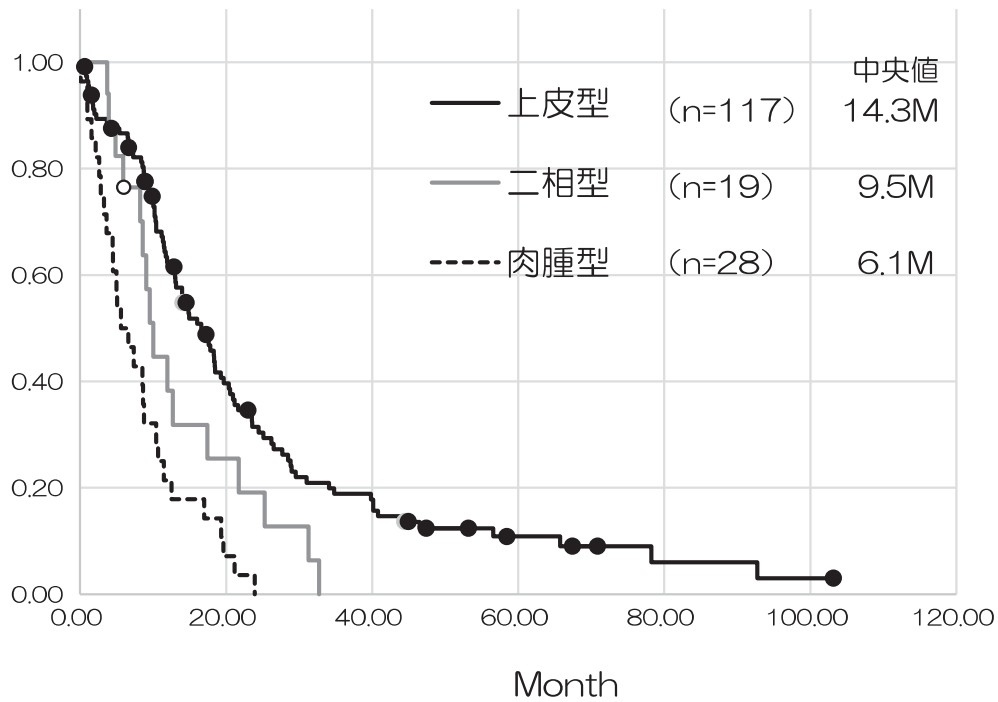


図5 岡山労災病院例の組織別生存期間

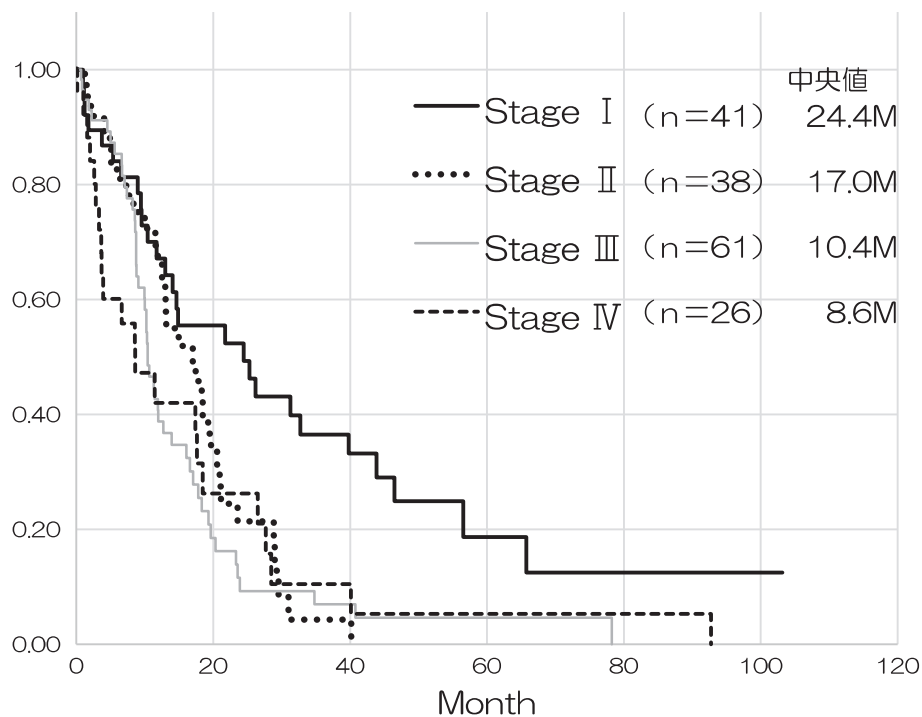


図6 岡山労災病院例 stage 別生存期間

れ、胸腔鏡下胸膜生検が積極的に行われるようになったこと、また縦隔側胸膜肥厚を比較的早期の中皮腫病変と認識するようになったことが胸膜中皮腫早期診断が行われる契機になったと思われる。

岡山労災病院では 2009 年以降石綿ばく露歴があつて

胸水を来した症例については中皮腫を除外するため、胸水ヒアルロン酸⁷⁾、SMRP⁸⁾を測定してその疑いがある症例では胸腔鏡検査を行って肉眼的に観察するとともに疑わしい部位を複数カ所生検することで早期診断が可能となったと考えている。

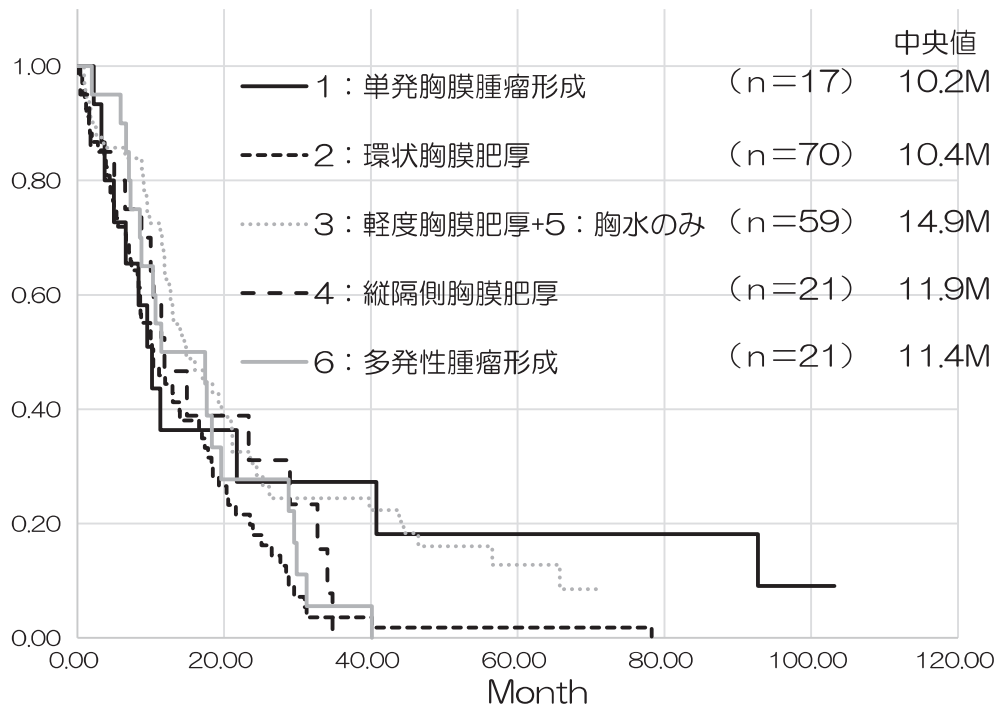


図7 岡山労災病院例の画像別生存期

画像パターン別では胸水のみや軽度胸膜肥厚が予後良好の傾向があったが、有意差は認められなかった。一方、環状胸膜肥厚や多発性腫瘍形成は肺の呼吸面積が縮小するため、呼吸不全、急性肺炎の合併等が死因として重要であった。

予後と関連する組織型及び Staging と比較して、画像パターンが予後に関連するかどうか、岡山労災病院の166例については組織型、Stage、画像別に生存期間について検討した。その結果として、上皮型の生存期間中央値は14.3カ月と比較的良好であったが、二相型は9.5カ月、肉腫型の6.1カ月と同様予後不良であり、いずれも10カ月には満たなかった。

非上皮型では上皮型よりも予後不良⁹⁾と報告されているが、我々の今回の結果でも同様な結果となった。

一方、IMIG1995分類による Staging 別では、Stage I は24.4カ月、Stage II は17.0カ月と比較的良好であったが、Stage III は10.4カ月、Stage IV は8.6カ月であり有意 ($p < 0.05$) に予後不良であった。Stage 別でも過去の報告と同様の結果であった。Stage I, II では手術療法の選択^{10)~13)}も可能であり、5年生存が5例で、10年生存も2例あるため、有意に予後良好であった。

一方、画像別では、胸水のみあるいは軽度胸膜肥厚が比較的予後良好であるものの、その他のパターンとほぼ同等の生存期間であり、画像形態と予後の間には一定の関連性は認められなかった。IMIG2016分類¹⁴⁾は Staging を大きく変更しているが、画像のパターンが予想外に予後因子とならなかった理由として、NあるいはM因子が

大きく予後に関係する可能性が示唆された。今後とも症例を増やして検討していくつもりである。

利益相反：利益相反基準に該当無し

文 献

- 1) Rusch VW: A proposed new international TNM staging system for malignant pleural mesothelioma. From International Mesothelioma Interest Group. *Chest* 108 (4): 1122—1128, 1995.
- 2) Garg K, Lynch DA: Imaging of thoracic occupational and environmental malignancies. *J Thorac Imaging* 17 (3): 198—210, 2002.
- 3) Robinson BW, Lake RA: Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med* 353 (15): 1591—1603, 2005.
- 4) Truong MT, Erasmus JJ, Marom EM, et al: Imaging evaluation in the diagnosis and staging of malignant pleural mesothelioma. *Semin Roentgenol* 39 (3): 386—396, 2004.
- 5) Ismail-Khan R, Robinson LA, Williams CC Jr, et al: Malignant pleural mesothelioma a comprehensive review. *Cancer Control* 13 (4): 255—263, 2006.
- 6) Kato K, Gemba K, Fujimoto N, et al: Fatal pleural mesothelioma in Japan (2003-2008): evaluation of computed tomography findings. *Jpn J Radiol* 34 (6): 432—438, 2016.
- 7) Fujimoto N, Gemba K, Asano M, et al: Hyaluronic acid in the pleural fluid of patients with malignant pleural mesothelioma. *Respir Investig* 51 (2): 92—97, 2013.
- 8) Fujimoto N, Gemba K, Asano M, et al: Soluble mesothelin-related protein in pleural effusion from patients with malignant pleural mesothelioma. *Exp Ther Med* 1 (2): 313—317, 2010.
- 9) Borasio P, Berruti A, Billé A, et al: Malignant pleural

- mesothelioma: clinicopathologic and survival characteristics in a consecutive series of 394 patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 33 (2): 307—313, 2008.
- 10) Cao C, Tian D, Park J, et al: A systematic review and meta-analysis of surgical treatments for malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* 83 (2): 240—245, 2014.
- 11) Hasegawa S: Extrapleural pneumonectomy or pleurectomy/decortication for malignant pleural mesothelioma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 62 (9): 516—521, 2014.
- 12) Domen A, De Laet C, Vanderbruggen W, et al: Malignant pleural mesothelioma: single-institution experience of 101 patients over a 15-year period. *Acta Chir Belg* 117 (3): 157—163, 2017.
- 13) Nelson DB, Rice DC, Niu J, et al: Long-Term Survival Outcomes of Cancer-Directed Surgery for Malignant Pleural Mesothelioma: Propensity Score Matching Analysis. *J Clin Oncol* 35 (29): 3354—3362, 2017.
- 14) Pass H, Giroux D, Kennedy C, et al: The IASLC mesothelioma staging project: Improving staging of a rare disease through international participation. *J Thorac Oncol* 11 (12): 2082—2088, 2016.

別刷請求先 〒702-8055 岡山市南区築港緑町 1—10—25
岡山労災病院アスベスト研究センター長
岸本 卓巳

Reprint request:

Takumi Kishimoto
Chief of Asbestos Research Center, Okayama Rosai Hospital,
1-10-25, Minami-ku Chikko-midorimachi, Okayama, 702-8055,
Japan

Evaluation for Chest CT Images at the First Visit Clinic for Pleural Mesothelioma Patients

Takumi Kishimoto and Nobukazu Fujimoto

Research Center for Asbestos-related Diseases, Okayama Rosai Hospital

The incidence for the chest CT patterns of 782 pleural mesothelioma patients was investigated for 7 patterns such as 1. Single tumor pattern, 2. Pleural rind pattern, 3. Slight thickening of pleura pattern, 4. Mediastinal thickening pattern, 5. Pleural effusion without any pleural thickening pattern, 6. Multiple mass pattern, 7. Special pattern was investigated. Pleural rind pattern occupied 39.0%, multiple mass pattern 14.9%, mediastinal thickening pattern, 14.8%, slight thickening pattern 12.7%, single mass pattern 9.2% and pleural effusion without any pleural thickening pattern 8.4%.

For 3 pathological types, pleural rind pattern is the highest percentage and 2nd is mediastinal thickening pattern for epithelioid and biphasic types but multiple mass pattern for sarcomatoid type. Single mass pattern is the lowest (6.4%) for biphasic type and pleural effusion without any pleural thickening pattern is the lowest (2.7%) for sarcomatoid type.

Before 2008, pleural rind and multiple mass patterns were the major patterns but after 2009, mediastinal thickening and pleural effusion without any pleural thickening patterns increased.

Prognosis of pleural mesothelioma in Okayama Rosai Hospital by histological classification, median survival for epithelioid type was 14.3 months which is significantly ($p < 0.05$) better than non-epithelioid types. For the staging by IMIG 1995, median survival for Stage I is 24.4 months and Stage II is 17.0 months, but Stage III is 10.4 months, and Stage IV is 8.6 months. Stage I and II are significantly ($p < 0.05$) better than stage III and IV. For the patterns of chest CT, single mass pattern seemed better for some patients by surgery, but no significance than other types. On the other hand, slight thickening and pleural effusion without any pleural thickening pattern showed better prognosis, but no significance than other types. We cannot detect any significance of survival for the patterns of chest CT.

(JJOMT, 66: 239—245, 2018)

—Key words—

pleural mesothelioma, pleural rind, pleural effusion without any pleural thickening pattern

原 著

病職歴データベースによるじん肺患者における ANCA（好中球細胞質抗体） 関連血管炎・腎疾患発症頻度の検討

大塚 義紀¹⁾, 宇佐美郁治²⁾, 水橋 啓一³⁾, 岸本 卓巳⁴⁾
坂本 浩一⁵⁾, 宮本 顕二¹⁾, 木村 清延¹⁾, 藤本 伸一⁴⁾
加藤 宗博²⁾, 横山多佳子²⁾, 太田 千晴²⁾

¹⁾北海道中央労災病院内科

²⁾旭労災病院呼吸器科

³⁾富山労災病院アスベスト疾患センター

⁴⁾岡山労災病院内科

⁵⁾神戸労災病院呼吸器科

(平成 29 年 10 月 5 日受付)

要旨：【はじめに】抗好中球細胞質抗体（anti-neutrophil antibody：以下 ANCA）関連血管炎・腎疾患患者に、シリカばく露を受けた者が多いと報告されるが、本邦のじん肺患者における ANCA 関連疾患の頻度は明らかでない。そこでじん肺患者およびじん肺以外の患者における ANCA 関連血管炎・腎疾患の頻度を明らかにするために、全国労災病院の病職歴データベースを用いて検討した。

【目的】後方視的に労災病院群に入院したじん肺患者およびじん肺以外の患者における ANCA 関連血管炎・腎疾患の頻度を比較検討する。

【対象と方法】2005 年 4 月 1 日から 2014 年 9 月 19 日までに全国の労災病院に入院した 32 歳以上の患者（じん肺男性患者：3,597 人，じん肺以外の男性患者 523,541 人）を対象とした。ICD-10 におけるコード「急性糸球体腎炎症候群」，「過敏性血管炎」，「結節性多発動脈炎」，「肺の併発症を伴う多発性動脈炎」，「チャージ・ストラウス」にてソートし，該当患者の退院時要約のコピーを取り寄せて診断の妥当性を調べ，その頻度を χ^2 検定にて検討した。

【結果】じん肺男性患者における ANCA 関連血管炎・腎疾患患者は 8 人，100 万人あたり 236.2 人/年。じん肺以外の男性患者では ANCA 関連血管炎・腎疾患患者は 123 人，100 万人あたり 24.9 人/年であり，有意にじん肺患者で ANCA 関連血管炎・腎疾患患者の頻度が高かった ($p < 0.001$)。じん肺患者の発症者 8 名中 5 名が石綿ばく露によるじん肺であった。そこで，石綿肺に限定すると 100 万人あたり 563.2 人/年であり，じん肺患者全体よりもさらに高い数であった。また，じん肺患者と非じん肺患者の年齢を調整し，非じん肺患者における標準化罹患比を求めると 11.55% (95% 信頼区間：11.53～11.57, $p < 0.05$) で 100% をまたいでいず，じん肺患者群の罹患率に比較して有意に低値であった。

【結論】じん肺患者群において ANCA 関連血管炎・腎疾患の頻度が非じん肺群に比較して有意に高かった。とくに，じん肺群の中の石綿肺群でさらに ANCA 関連腎疾患・血管炎患者の頻度が高く認められた。

(日職災医誌, 66 : 259—263, 2018)

—キーワード—

石綿肺, シリカ

表1 対象者 (単位 人)

	じん肺群	非じん肺群
J60 から J64 でソートされたじん肺対象総数 (繰り返しを除く)	3,599	
除いたペリリウム肺症例	2	
じん肺以外の対象総数 (32 歳以上の男性で繰り返しを除く)		523,541
最終的各群の総母数	3,597	523,541
4つのキーワード*でソートされた血管炎患者症例	9	285
ソートされた症例中サマリーが破棄されていた数	0	15
検討にて除外した症例数 (発症が期間以前, ANCA 関連等 不適格症例)	1	162
最終 ANCA 関連腎疾患・血管炎例	8	123

*4つの ICD-10 キーワード: M300「結節性多発 (性) 動脈炎」, M301「肺の併発症を伴う多発 (性) 動脈炎 (チャウグ・シュトラウス)」, M310「過敏性血管炎」, N019「急速進行性腎炎症候群 詳細不明」

はじめに

抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody: 以下 ANCA) 関連血管炎は, 小型血管炎に分類され比較的まれな疾患であり, 免疫複合体が関与しない血管炎に含まれる。さらに, 壊死性糸球体腎炎を伴うことが多く, 顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis: 以下 MPA) がその代表である。ANCA 関連血管炎には, その他気道の肉芽腫性炎症も伴う, 肉芽腫性多発血管炎 (granulomatous polyangiitis: 以下 GPA), 好酸球浸潤を伴う気道の肉芽腫性炎症を示す好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: 以下 EGPA) が含まれる。

ANCA 関連血管炎の原因はいまだに不明であるが, 原因の一つとして環境因子としてのシリカまたは抗甲状腺薬プロピルチオウラシルの関与が報告されている¹⁾²⁾。さらに, 石綿ばく露患者で非ばく露患者に比較し ANCA 陽性率が高いことも報告されている³⁾。本邦でも, シリカの関与が疑われた ANCA 関連血管炎の症例報告が散見されるが, じん肺における ANCA 関連血管炎または腎疾患の頻度を調べた報告はない。そこで我々は, 後方視的に約 10 年間に労災病院群に入院した患者群で, ANCA 関連血管炎または腎疾患の頻度を調査した。

対象と方法

事前の調査で, じん肺患者の中で ANCA 関連腎疾患・血管炎を発症した患者がすべて男性であったため, すべての対象者を男性に限定した。またじん肺の発症には, 多くの場合粉じん職歴が 10 年以上必要であり, じん肺群の中でシリカが関与しないペリリウム肺患者 2 人を除くと対象者が 32 歳以上であったため, 非じん肺群も年齢 32 歳以上に限定した。対象は, 2005 年 4 月 1 日から 2014 年 9 月 19 日までに全国の独立行政法人労働者健康福祉機構 (現, 安全機構) 労災病院 34 病院に入院し, この間の重複を避けたじん肺男性患者 3,597 名と非じん肺男性患者 523,541 名である (表 1)。全入院患者の第 1 から第 7 病名までを国際疾病分類第 10 版 (以下, ICD-10)

コードの J60 から J64 にてソートし石綿肺を含むじん肺患者をじん肺患者群とした。それ以外の入院患者を非じん肺群とした。両群を 4 つのコード, つまり M300「結節性多発 (性) 動脈炎」, M301「肺の併発症を伴う多発 (性) 動脈炎 (チャウグ・シュトラウス)」, M310「過敏性血管炎」, N019「急速進行性腎炎症候群 詳細不明」にて再度 ANCA 関連腎疾患・血管炎症例を絞り込んだ。

方法は, 上でソートして患者を絞り込んだ後に退院時要約のコピーを回収し ANCA 関連腎疾患・血管炎に合致するかどうかを検討し, 最終的にそれぞれの群の ANCA 関連腎疾患・血管炎症例とした。その際に, 非じん肺群で退院時要約にアスベストシスの記載があった 2 例, 胸膜プラークの記載があった 1 例, 石綿肺の記載があった 1 例の 4 例が含まれていたが, 第 7 病名までじん肺との記載が無い場合非じん肺群の中に入れたままとした。じん肺患者群と非じん肺患者群の年齢構成が異なるため, 年齢を標準化した標準化罹患比を検討した。

なお, 最終的な検討段階で, ANCA 関連血管炎を発症したじん肺患者群の 1 例は「胸膜プラーク」のみで石綿肺と間違えて診断され, 「じん肺」群にソートされ組み入れられている (表 4 症例 5)。本来はじん肺群から削除すべき症例ではあるが, 退院時サマリーを入手でき詳細を検討できたのは ANCA 関連血管炎を発症した群のみであり, 発症していない「じん肺群」にも同様な症例がいることが想定される。そのため, 発症した症例のみを削除することは, よりデータの偏りを生む可能性があり, そのまま「じん肺群」の症例とした。

統計は, 検討母数をさらに調査年数で除して 10 万人あたりの発症率として表記し χ^2 検定にて比較検討し, $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

今回, 検索したじん肺男性患者数は総数 3,597 人, 平均年齢 72.4 歳 (標準偏差 (SD): 7.1 歳)。そのうち ANCA 関連血管炎患者は, 8 人だった。一方, 非じん肺男性患者群の患者数は, 523,541 人で, 平均年齢 71.4 歳 (SD: 9.6 歳)。ANCA 関連腎疾患・血管炎患者数は 123 人であっ

表 2 ANCA 関連腎疾患・血管炎患者の背景因子

	じん肺群	非じん肺男性群
N	8	123
年齢(歳)±SD	72.4±7.1	71.4±9.6
年齢範囲	65～85	34～94
年齢 中央値	68.5	72
MPO-ANCA±SD (U/ml)	625±1,117	316±479
MPA/RPGN/GPA/EGPA/その他(症例数)	6/2/0/0/0	67/28/3/19/6

MPO-ANCA : myelo peroxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody, MPA : microscopic polyangiitis, RPGN : rapidly progressive glomerular nephritis, GPA : granulomatosis with polyangiitis, EGPA : eosinophilic granulomatosis with polyangiitis.

表 3 年齢調整患者数

年齢階級	じん肺		非じん肺(男性)	
	ANCA 患者数	階級別患者数	階級別患者数	ANCA 患者数(期待値)
65～69歳	5	384	65,820	857.0
70～74歳	0	689	71,758	0
75～79歳	1	958	68,379	71.4
80～84歳	1	807	50,619	125.3
85～89歳	1	364	26,805	73.6
90～94歳	0	90	9,183	0
95～歳	0	16	1,830	0
計	8	3,308	294,395	1,064.7

表 4 じん肺に見られた ANCA 関連血管炎症例の内訳

症例	年齢	MPO-ANCA (U/ml)	診 断	背景の基礎疾患
1	85	3,130	MPA-P	じん肺
2	68	68	MPA-P	じん肺
3	68	186	RPGN	じん肺
4	76	不詳	MPA-P	石綿肺
5	65	188	ANCA 陽性 IP	胸膜プラーク
6	68	60	MPA-P	石綿肺
7	80	561	MPA-P	石綿肺
8	69	182	MPA, RPGN	石綿肺

MPO-ANCA : myelo peroxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody

MPA : microscopic polyangiitis

MPA-P : MPA with pulmonary involvement

RPGN : rapidly progressive glomerular nephritis

GPA : granulomatosis with polyangiitis

IP : pulmonary interstitial pneumonia

た。それぞれの群で ANCA 関連腎疾患・血管炎患者の背景を表 2 に示す。血管炎群での内訳は、じん肺群で MPA, 急速進行性糸球体腎炎 (rapidly progressive glomerular nephritis : 以下 RPGN) が占めたのに比較し、非じん肺群では MPA, RPGN 以外の GPA, EGPA がみられた。

年間 100 万人あたりの発症数は、じん肺男性群は 236.2 人/年になる。非じん肺男性患者群では 100 万人あたり 24.9 人/年であった。両者を比較すると、有意にじん肺患者群で頻度が高かった ($p<0.01$)。また、じん肺患者の症例の年齢階層毎の発症率をもとに非じん肺群で、各年齢階層の人数を掛けて非じん肺群で期待される罹患数を計

算すると、1,064.7 人になる。実際の罹患数は 123 人であり、非じん肺群の標準化罹患比 = $123 \times 100 / 1064.7 = 11.55\%$ (95% 信頼区間 ; 11.53～11.57) で 100% をまたがないことから、じん肺群に比べ非じん肺群で有意に低値であると考えられた (表 3)。

じん肺患者群でみられた ANCA 関連血管炎 8 例を表 4 に示す。8 例中 4 例が石綿肺、1 例が胸膜プラークであった。そこでじん肺群を石綿肺だけに限定すると、この期間内に石綿肺は 754 人おり、その中で ANCA 関連血管炎を 4 人発症している。100 万人あたりに換算すると 563.2 人/年になり、さらに多い数と計算された。

考 察

約10年間における全国の労災病院に入院した患者データをもとに、じん肺男性群と非じん肺男性群でANCA関連腎疾患・血管炎発症頻度を調査した。その結果、平均年齢が有意にじん肺群で高いものの、ANCA関連腎疾患・血管炎は有意にじん肺群で発症率が高率であった。また、年齢を調整したANCA関連腎疾患・血管炎罹患比を計算してもじん肺群で高かった。しかしながら、じん肺群で発症した8例のANCA関連腎疾患・血管炎患者の5例の背景が石綿に関連した肺疾患であった。シリカが関与するとされるものは3例であった。この3例を元に両群での発症率を比較し、 χ^2 検定を行っても、じん肺群で有意に高率であった($p<0.001$)。

じん肺群では、じん肺法に則りじん肺手帳健診にて年に1回から2回各労災病院を定期受診している。そのため、非じん肺患者群に比較して、ANCA関連腎疾患・血管炎が発症した際に比較的労災病院を受診しやすい傾向が考えられる。そのため、多くのじん肺患者が集まりANCA関連腎疾患・血管炎の発症率を高めている可能性も考えられる。

年齢については、じん肺群で対照群よりも高齢であった。じん肺が発症するためには少なくとも濃厚な粉じん職歴が10年以上必要である。じん肺を発症してからじん肺患者群に加わるため、非じん肺群に比べて年齢が高くなるのは必然であると思われる。今回のじん肺群の平均年齢72.4歳(SD:8.3歳)は、宮崎県で発症したANCA関連腎疾患・血管炎患者の平均年齢70.4歳(SD:10.9歳)より高齢であり⁴⁾、発症のピークを過ぎた一群の経過をみている危険性も考えられ、少なくとも見積もる可能性がある。実際には、じん肺群で高率にANCA関連腎疾患・血管炎の発症がみられており、年齢差は問題無いと思われる。

今回じん肺患者群でANCA関連腎疾患・血管炎患者8例の粉じん職歴を見ると5例が石綿に関連した肺疾患であった。5例中4例は石綿肺であり、その他1例は胸膜プラークであった。さらに今回のじん肺患者群で石綿肺とコードされた症例に限定して検討した結果、100万人あたりに換算すると563.2人/年とじん肺患者群全体の数字よりもさらに多い数と計算された。このことは、石綿粉じんのばく露をうけた石綿肺でANCA関連腎疾患・血管炎の発症が多く見られる可能性を示唆している。Pelcovaらも、石綿ばく露した対象者でコントロールに比べて有意にANCA陽性率が高いことを報告している³⁾。このことは、石綿ばく露でシリカよりもANCA関連血管炎の発症に関与している可能性を示唆する。石綿ばく露者でANCA陽性率が高いことや、ANCA関連血管炎が高いかどうかを検証するためには、石綿ばく露を受けた集団での発症率を調べる前向き研究による検証

が必要である。

今回の研究には、いくつかの限界がある。非じん肺群においては、労災病院の立地(都市部や過疎地)やその院内に腎臓内科等の専門科がある場合は、よりANCA血管炎症例が集中しやすい傾向があるなど、必ずしもその地域の有病率を反映しない可能性がある。また、じん肺患者群では、じん肺手帳を使った半年ごとの検診があり、よりじん肺患者の方が、有症状になった際にかかりつけの労災病院に多く受診する傾向があるかもしれない。しかしながら、今回の非じん肺患者群の100万人あたりの発症率24.9人/年は、宮崎県で調査されたANCA関連腎疾患・血管炎の発症率22.6人/年と非常に近い値であり⁵⁾、それほど偏った数字では無いと考えられる。そのため、34病院のデータを集めることで非じん肺患者群は均一化され、良い対照群かもしれない。

以上、今回の研究が後方視的な研究であるため、じん肺患者群でよりANCA関連腎疾患・血管炎患者が集積しやすい傾向は否めないが、石綿関連肺疾患を除くじん肺のみとしても、ANCA関連血管炎が3名となり、対照群と比較して有意に頻度が高く、じん肺はANCA関連血管炎発症を増加させる要因である可能性があるかもしれない。さらに、石綿肺でより多くのANCA関連血管炎発症がみられた。シリカよりも石綿ばく露の方がよりANCA関連血管炎発症の病態に関与している可能性があるかもしれない。

謝辞: この研究は、独立行政法人労働者健康安全機構第3期労災疾病研究補助金により行われた。

様々な面でご教授くださいました労働者健康安全機構臨床研究監 加藤賢朗先生、データ調査ならびに統計処理をしていただいた労働者健康安全機構本部病職歴専門員 荒木亮子氏、同課システムエンジニア砂山藤広氏、サマリー回収等当院事務長 高橋幸三氏、診療情報管理士 佐藤由美子氏、全国労災病院事務局長ならびに診療情報管理士の皆様方に感謝申し上げます。

この研究の一部を、平成28年日本職業災害学会学術大会(仙台)および平成29年アメリカ胸部疾患学会総会で報告いたしました。

利益相反: 利益相反基準に該当無し

文 献

- 1) Gomez-Puerta JA, Gedmintas L, Costebader KH, et al: The association between silica exposure and development of ANCA-associated vasculitis: systemic review and meta-analysis. *Autoimmune Rev* 12: 1129—1135, 2013.
- 2) Beaudreuil S, Lasfargues G, Laueriere L, et al: Occupational exposure in ANCA-positive patients: A case-control study. *Kidney International* 76: 1961—1966, 2005.
- 3) Pelcova D, Bartunkova J, Fenclova Z, et al: Asbestos exposure and antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) positivity. *AEOH* 58: 662—668, 2010.
- 4) Fujimoto S, Uezono S, Hisanaga S, et al: Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in the Miyazaki prefecture: the first population-based, retrospective, epide-

miologic survey in Japan. Clin Am Soc Nephrol 1: 1016—1022, 2006.

5) Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, et al: Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the UK. Rheumatol 50: 1916—1920, 2011.

別刷請求先 〒068-0004 岩見沢市四条東 16 丁目 5
北海道中央労災病院内科，職業性呼吸器疾患セ
ンター

大塚 義紀

Reprint request:

Yoshinori Ohtsuka
Hokkaido Chuo Rosai Hospital, 4-jo, Higashi 16-5, Iwami-
zawa, Hokkaido, 068-0004, Japan

Incidence Rate of ANCA-related Vasculitis and Renal Disease in Pneumoconiosis and Asbestosis Patients —A Retrospective Study of 34 Rosai Hospital Group Admission Records—

Yoshinori Ohtsuka¹⁾, Ikuji Usami²⁾, Keiichi Mizuhashi³⁾, Takumi Kishimoto⁴⁾, Kouichi Sakamoto⁵⁾,
Kenji Miyamoto¹⁾, Kiyonobu Kimura¹⁾, Nobukazu Fujimoto⁴⁾, Munehiro Kato²⁾,
Takako Yokoyama²⁾ and Chiharu Ohta²⁾

¹⁾Department of Internal Medicine, Hokkaido Chuo Rosai Hospital

²⁾Department of Respiratory Medicine, Asahi Rosai Hospital

³⁾Asbestos Related Disease Prevention Center, Toyama Rosai Hospital

⁴⁾Department of Internal Medicine, Okayama Rosai Hospital

⁵⁾Department Respiratory Medicine, Kobe Rosai Hospital

Backgrounds: ANCA-related vasculitis and renal disease has been reported to be frequent among silica or asbestos exposed patients. However, it is not clear whether it is true among Japanese pneumoconiosis or asbestosis patients.

Purpose: To know the incidence rate of ANCA-related vasculitis in Japanese pneumoconiosis and asbestosis patients, retrospectively.

Methods: Using ICD-10 cords(from J60 to J64), we selected 3,597 pneumoconiosis or asbestosis male patients and male 523,541 neither pneumoconiosis nor asbestosis patients as a control group among 34 Rosai hospitals' admission records from April 1st, 2005 to September 19th, 2014. Then we sorted data with 4 ICD-10 key words in both groups. We avoided duplication of cases and counted the number of patients. We examined the discharge summary of the sorted cases and compared the incidence rate of ANCA-associated vasculitis with the control group. Statistical analyses were done with Chi-square test, $p < 0.05$ was considered as significant.

Results: The number of ANCA-related vasculitis patients was 8 (made up of 3 pneumoconiosis, 4 asbestosis, and 1 asbestos-related pleural plaque), and annual incidence per million per year was 236.2. Restricted to asbestosis patients, annual incidence per million per year was 563.2, which was higher than that of the whole pneumoconiosis group. In the control group, the number of ANCA-related vasculitis patients was 123, and annual incidence rate was 24.9 per million. The incidence rate of ANCA-related vasculitis in pneumoconiosis or asbestosis was significantly higher than that in control patients ($p < 0.001$). The standardized incidence ratio of control group was 11.55% (95%CI: 11.53-11.57) and was significantly low.

Conclusion: Not only silica but also asbestos might have a role in the development of ANCA-related vasculitis and renal disease in Japanese pneumoconiosis patients.

(JJOMT, 66: 259—263, 2018)

—Key words—

Asbestosis, silica