

学 位 論 文 題 名

HLA class I antigens are possible prognostic factors in hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌におけるHLA class I抗原の予後因子としての可能性に関する研究)

学位論文内容の要旨

I 目 的

肝細胞癌 (HCC) の治療には肝切除が最も優れているが、併存する肝障害のため33.4%の患者しか肝切除の対象とならない。非切除症例に対しては肝動脈塞栓術、エタノール注入療法、化学療法等が施行されているが、満足いく生存率は得られていない。治癒切除された症例においても再発率は高く術後5年生存率は50%に満たない。それゆえ、再発の予測あるいは予防を研究することは予後の改善に重要である。

HLA class I抗原は正常の肝細胞には発現しないが、HCCの癌細胞には発現してくることが知られている。近年、MAGE-1などいくつかの腫瘍抗原がメラノーマより同定され、これらの腫瘍抗原がHCCにおいても発現していることがわかってきた。一方、細胞傷害性T細胞 (CTL) はT細胞レセプター (TCR) を介して腫瘍細胞表面のHLA class I抗原に結合した抗原ペプチドを認識して抗腫瘍活性をもたらすことから、腫瘍細胞上のHLA class I抗原の発現は腫瘍特異的免疫反応に不可欠である。そこで、本研究ではHCCの癌細胞上のHLA class I抗原の発現率と臨床病理学的因子ならびに予後との相関について検討した。

II 方 法

1992年6月より1994年3月までに北海道大学医学部附属病院第一外科において肝切除術を施行したHCC 30例を対象とした。HLA class I抗原の発現率は今川らの方法に準じてフローサイトメトリー法により測定した。すなわち、腫瘍組織を0.05%コラゲナーゼ含有RPMI1640培地で攪拌後、金属メッシュを通し、0.1%BSA添加PBSにて洗浄し、単細胞浮遊液とした。この単細胞浮遊液に最終濃度が1:100になるように抗HLA-ABC抗体 (W6/32) を添加し、4℃にて30分間反応させた。PBSにて2回洗浄後、FITC標識2次抗体を最終濃度1:500で4℃にて30分間反応させた。細胞を充分洗浄後PBSに再度浮遊し、フローサイトメトリー (FACScan, Becton-Dickinson) にて解析した。はじめに腫瘍細胞のfractionにゲートをかけ、5000個の腫瘍細胞にてヒストグラムを描いた。2次抗体のみを反応させた細胞を陰性対象とした。

統計学的解析は2群間の解析には対応のないT検定(unpaired student's t-test)、3群以上の解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、危険率5%以下を有意差ありとした。

III 結 果

1. すべての腫瘍組織においてHLA class I抗原の発現が認められた。発現率は最低41.2%から最高97.2%で平均72.0%であった。
2. Stage IVの症例の発現率 ($52.8 \pm 11.6\%$, N=5) はStage I ($82.5 \pm 9.5\%$, N=6)、Stage II ($78.0 \pm 14.3\%$, N=15) の症例の発現率に比べ有意に減少していた ($P < 0.05$)。

3. 肝内転移を伴う症例の発現率 ($51.0 \pm 10.2\%$, $N=7$) は転移のない症例の発現率 ($80.7 \pm 13.3\%$, $N=23$) に比べ有意に減少していた ($P<0.001$)。
4. 絶対非治癒切除症例の発現率 ($51.6 \pm 9.0\%$, $N=3$) は病巣を全摘出した症例の発現率 ($76.2 \pm 16.9\%$, $N=27$) に比べ有意に減少していた ($P<0.05$)。
5. HBs 抗原陰性かつ HCV 抗体陰性例 ($N=7$) では $76.5 \pm 18.7\%$ 、HBs 抗原陰性かつ HCV 抗原陽性例 ($N=12$) では $73.6 \pm 19.5\%$ 、HBs 抗原陽性かつ HCV 抗体陰性例 ($N=9$) では $75.6 \pm 16.9\%$ 、HBs 抗原陽性かつ HCV 抗体陽性例 ($N=2$) では $56.7 \pm 5.0\%$ であり、肝炎ウイルス混合感染例で腫瘍細胞上の HLA class I 抗原の発現率が低下していた。
6. 門脈浸潤陽性症例の発現率は陰性例に比べ低下傾向を示した。
7. 高分化型肝細胞癌に比べて中分化型肝細胞癌で発現率が低下傾向を示した。
8. 浸潤性発育を示す HCC の発現率は膨張性発育を示す HCC に比べ減少傾向を示した。
9. 血清 AFP 値が 200ng/ml 以上の症例の HLA class I 抗原の発現率は 200ng/ml 未満の症例の発現率に比べ低下傾向を示した。PIVKA-II に関しては一定の傾向はみられなかった。
10. 絶対非治癒切除を除く 27 例中 15 例に術後再発を認めた。この 15 例の無再発生存期間と HLA class I 抗原の発現率との間には正の相関関係があった。すなわち、HLA class I 抗原の発現率の高い症例は低い症例に比べ無再発生存期間が延長していた ($P<0.05$)。

IV 考 案

HCC 切除後再発因子として池田らは腫瘍多発例、腫瘍分化度の低い症例、HCV 抗体陰性例をあげている。また、泉らは門脈浸潤が切除後再発のいちばんの危険因子であると報告している。HLA class I 抗原の発現を低下させる因子はこれらの報告における再発危険因子とよく一致した。

HCC の悪性度、予後規定因子としては今までに腫瘍核 DNA ploidy pattern、p53、nm23 などの癌抑制遺伝子の発現、PCNA の発現などが報告されている。本研究では HLA class I 抗原の発現がこれらの因子同様に再発予測因子になりうるということが明らかになった。今後、HLA class I 抗原の発現と p53、nm23 などの因子との相関をみることはさらに重要であろう。

HLA class I 抗原に結合して発現される抗原ペプチドについては、1991 年に Van der Bruggen らにより MAGE gene が報告されて以来いくつかの腫瘍抗原が同定され、報告されている。これらの腫瘍抗原は HCC にも存在するという報告があり、また、未だ同定されるに至っていない腫瘍抗原も多数存在すると思われる。それゆえ、HCC においても CTL は HLA class I 抗原を発現している腫瘍細胞に対して特異的免疫反応を示すことが期待される。

一方、T 細胞側の因子である TCR repertoire について Weidmann らは HCC 患者の PBL、TIL 中の V β 3 gene の高度発現、V β 4 gene の発現低下を指摘している。HLA class I 抗原を発現する腫瘍細胞を認識し、抗腫瘍活性をもたらす CTL を選択的に癌局所に数多く誘導する工夫が期待される。

HCC の手術後再発には肝内転移再発のほかに残肝に新たな癌が新生してくる多中心性発生が高頻度に存在し、その鑑別は必ずしも容易ではない。しかし、少なくとも肝切除後の肝内転移再発の制御には、HLA class I 抗原の発現を上げ腫瘍局所に CTL を数多く集める工夫がなされることが期待される。

V 結 語

HCC における HLA class I 抗原の発現は Stage IV 症例、肝内転移陽性例、絶対非治癒切除症例において有意に低下した。

HLA class I 抗原の発現は B 型および C 型肝炎ウイルスの混合感染例、門脈浸潤陽性例、中分化型肝細胞癌症例、浸潤性発育症例において対象例に比べ低下傾向を示した。

HLA class I 抗原の発現率の高い症例は低い症例に比べ無再発生存期間が有意に延長した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

HLA class I antigens are possible prognostic factors in hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌におけるHLA class I抗原の予後因子としての可能性に関する研究)

腫瘍細胞上の HLA class I 抗原の発現は腫瘍特異的免疫反応に不可欠であり、HLA class I 抗原の発現低下と悪性腫瘍の悪性度の相関については現在までに大腸癌、膀胱癌、喉頭癌、悪性黒色腫、悪性リンパ腫などで報告例があるが、肝細胞癌についての報告はない。そこで申請者は肝細胞癌切除症例について HLA Class I 抗原の発現率と手術所見、肉眼的進行程度、病理組織学的所見、無再発生存期間等との関連について検討した。

1992 年 6 月より 1994 年 3 月までに北海道大学医学部附属病院第一外科において肝切除術を施行した HCC 30 例を対象とした。HLA class I 抗原の発現率は今川らの方法に準じてフローサイトメトリー法により測定した。すなわち、腫瘍組織を 0.05% コラゲナーゼ含有 RPMI1640 培地で攪拌後、金属メッシュを通し、0.1% BSA 添加 PBS にて洗浄し、単細胞浮遊液とした。この単細胞浮遊液に抗 HLA-ABC 抗体(W6/32)を 4°C にて 30 分間反応させた。PBS にて洗浄後、FITC 標識 2 次抗体を 4°C にて 30 分間反応させた。細胞を充分洗浄後 PBS に再度浮遊し、フローサイトメトリー(FACScan、Becton-Dickinson)にて解析した。はじめに腫瘍細胞の fraction にゲートをかけ、5000 個の腫瘍細胞にてヒストグラムを描いた。2 次抗体のみを反応させた細胞を陰性対象とした。肉眼および病理組織学的所見は原発性肝癌取り扱い規約第 3 版に従った。術後再発は 3 ヶ月おきに AFP、PIVKA-II などの腫瘍マーカー、US、CT などの画像診断によりチェックした。

すべての腫瘍組織において HLA class I 抗原の発現が認められた。発現率は最低 41.2% から最高 97.2% で平均 72.0% であった。Stage IV 症例、肝内転移陽性例、絶対非治癒切除例において有意に HLA class I 抗原の発現率の低下がみられた。門脈浸潤陽性例、腫瘍分化度の低い症例、浸潤性発育症例、肝炎ウイルス混合感染例において HLA class I 抗原の発現率の低下傾向がみられた。HLA class I 抗原の発現率と無再発生存期間との間には正の相関を認めた。以上より、HLA class I 抗原の発現率が予後因子として有用であることが明らかとなった。さらに HLA class I 抗原及び腫瘍抗原をターゲットとした特異的養子免疫療法の開発により肝細胞癌患者の予後の改善が期待される。

審査にあたって浅香教授から肝細胞における HLA Class I 抗原の発現の有無、非癌部肝細胞の HLA Class I 抗原の発現率と肝細胞癌の悪性度および予後との相関についての質問があった。申

請者は病変肝における HLA Class I 抗原の発現に関する文献、申請者自身の実験データを用いて正常肝細胞には HLA Class I 抗原は発現しないこと、慢性肝炎、肝硬変など病変肝の肝細胞には HLA Class I 抗原が発現してくること、非癌部肝細胞の HLA Class I 抗原の発現率と肝細胞癌の悪性度および予後との間には相関がないことを応答した。続いて、加藤教授より従来からの予後因子と HLA Class I 抗原の発現率とのギャップの理由について、主査から今後予後改善につながるような免疫療法の可能性などについての質問があった。申請者は自身のデータを用いて、有意差のない因子につてもある程度の傾向はあり従来からの予後因子と HLA Class I 抗原の発現率との間には大きなギャップはない旨を回答した。また、免疫療法の可能性については、第一外科学教室での肝細胞癌に対する LAK 細胞を用いた養子免疫療法の成績、腫瘍抗原の同定に関する文献を引用し、明解に回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。