

ヒト非小細胞肺癌における HLA クラス I 発現、 腫瘍内浸潤 CD 8 陽性 T 細胞と臨床病理学的因子の関連性

学位論文内容の要旨

【背景】HLA クラス I 抗原はヒトの全ての有核細胞と血小板に発現する、重鎖と β 2-ミクログロブリン軽鎖からなる膜貫通型糖タンパクであり、感染したウイルスや癌抗原といった内在性抗原を CD8 陽性細胞に提示し、免疫反応を惹起させる働きを持つ。一方で様々な癌腫において、16~50%程度に HLA クラス I 抗原の発現低下・欠失がみられると報告されており、HLA 抗原発現低下・欠失は癌細胞が免疫監視機構から逃避する機序のひとつであると考えられている。

最近、札幌医科大学の鳥越俊彦博士らは、ホルマリン固定パラフィン組織切片において、古典的 HLA クラス I 抗原である HLA-A, HLA-B, HLA-C の全ての重鎖を認識するモノクローナル抗体 (EMR8-5) を初めて作成し、報告した。

【目的】我々はこの抗体を用いて免疫組織学的検討を行い、ヒト非小細胞肺癌における HLA クラス I 発現と、腫瘍内浸潤 CD8 陽性細胞および臨床病理学的因子の関連性に関する検討を行った。

【対象】1982 年から 1994 年に北海道大学医学部附属病院で初回治療として切除を行った非小細胞肺癌患者 161 例を対象として後ろ向き研究を行った。これらの患者の切除原発腫瘍から連続パラフィン切片を作成し、免疫組織化学染色を行った。一次抗体は抗 HLA クラス I 抗体 (EMR8-5)、抗 β 2-ミクログロブリン抗体 (EMR-b6)、抗 CD8 抗体 (clone C8/144b) を使用した。HLA クラス I および β 2-ミクログロブリンの発現は、細胞膜がリンパ球と同程度の染色強度を示す腫瘍細胞が 80%以上あるものを強陽性 (発現)、全く染色されない腫瘍細胞が 80%以上のものを陰性 (欠失)、その中間または、腫瘍細胞膜がリンパ球よりも弱く染色されるものを弱陽性 (発現低下) と定義した。腫瘍内浸潤リンパ球は、腫瘍胞巣内浸潤リンパ球と腫瘍間質浸潤リンパ球の2つのグループに分類し評価した。腫瘍が肺胞上皮置換型増殖を示す症例等、腫瘍胞巣の評価が困難な例については腫瘍内浸潤リンパ球の評価から除外し、計 69 例で検討を行った。

【結果】HLA クラス I 強陽性例は 50 例 (31%) であり、57 例 (35%) が弱陽性、54 例 (34%) が陰性であった。HLA クラス I 発現と β 2-ミクログロブリン発現の程度には有意な相関が見られ、カッパ係数は 0.71 (95%信頼区間 0.62~0.80) であった。HLA クラス I 発現低下・欠失は性別、喫煙歴、組織型、分化度と有意な相関がみられた。陰性群における腫瘍胞巣内浸潤 CD8 陽性細胞数は、有意に弱陽性群 ($P=0.0013$) および強陽性群 ($P=0.00017$) よりも減少していた。また同一組織内に HLA クラス I 強陽性部位と陰性部位が混在する症例 7 例での検討では、HLA クラス I 陰性部位での腫瘍胞巣内浸潤 CD8 陽性

細胞数は、HLA クラスⅠ強陽性部位に比較し有意に減少していた ($P=0.0023$)。HLA クラスⅠ発現の程度がいかなる場合であっても、腫瘍間質内浸潤 CD8 陽性細胞数に差は認められなかった。転帰の判明している 150 例における解析では、HLA クラスⅠ強陽性群は、HLA クラスⅠ弱陽性および陰性群と比較し、有意に予後良好であった ($P=0.0051$)。病期による層別解析では、病理病期Ⅰ期 ($n=88$) では HLA クラスⅠ強陽性群は発現低下・欠失群に比し、有意に予後良好であった ($P=0.0044$) が、Ⅱ期以上の群 ($n=62$) では HLA クラスⅠの発現は予後との相関は認められなかった ($P=0.85$)。

病理病期Ⅰ期群における予後因子の検討では、単変量解析の結果、HLA クラスⅠ発現低下・欠失(ハザード比 3.10, $P=0.0068$)および高齢(ハザード比 1 年あたり 1.05, $P=0.0099$) が有意な予後不良因子であった。コックスの比例ハザードモデルによる多変量解析においても、HLA クラスⅠ発現低下・欠失の補正ハザード比は 2.59 (95%信頼区間 1.13~5.93)、 p 値は 0.024 であり、HLA クラスⅠ発現低下・欠失は病理病期Ⅰ期非小細胞肺癌における独立した予後不良因子であった。

【考察】今回の検討では非小細胞肺癌における HLA クラスⅠ発現低下・欠失は 69%に認められたが、これまでの報告は 25%~90%とされ、一定していない。その理由として、まずは用いた検体の処理方法および抗体の違いが考えられる。また、免疫染色の判定基準の違いも考慮しなければならない。今回の検討では鳥越らの報告に倣い、腫瘍細胞の膜がリンパ球と同程度に染まるものを強陽性としたが、これまでの報告では細胞膜の染色について記載がなく、またリンパ球を内因性強陽性コントロールとして用いたとの記載もない。

今回の検討では HLA クラスⅠ発現低下・欠失は予後不良因子であり、また病理病期Ⅰ期においては独立した予後不良因子であったのに対し、Ⅱ期以上では HLA クラスⅠ発現と予後との間に相関を認めなかった。大腸癌においては、HLA クラスⅠの発現低下は予後不良であり、比較的早期(TMNO~Ⅱ)の症例でその傾向が強いとの報告があるが、これは我々の結果と同様の傾向を示すものと考えられた。今回の検討では HLA クラスⅠ発現が病理病期との有意な相関を認めない一方で、病理病期Ⅰ期の術後の予後と有意な相関を認めたことは、既に増大した腫瘍には免疫が働いても有効ではないが、切除後に腫瘍量が微量となった場合には免疫が有効である可能性が考えられる。一方で前述の大腸癌の報告では、HLA クラスⅠ完全欠失群もまた予後良好であり、この点は我々の結果と異なっている。肺癌においては大腸癌とは異なり、NK 細胞による免疫反応はあまり重要でないものと推測された。HLA クラスⅠ発現と腫瘍内浸潤 CD8 陽性細胞との相関については、これまで食道癌、膵癌、大腸癌、卵巣癌等で報告され、HLA クラスⅠ発現低下・欠失部位では腫瘍内浸潤 CD8 陽性細胞が少ないと報告されているが、腫瘍内浸潤細胞を腫瘍胞巣内浸潤細胞と腫瘍間質内浸潤細胞に分けて HLA クラスⅠとの相関を検討した報告はなく、また同一検体内に HLA クラスⅠ強陽性部位と陰性部位が混在する例で、その強陽性部位と陰性部位への浸潤細胞を検討した報告はない。我々は、非小細胞肺癌手術標本において、HLA クラスⅠ陰性群は弱陽性群および強陽性群と比較して腫瘍胞巣内浸潤 CD8 陽性細胞数は有意に減少するが、腫瘍間質内浸潤 CD8 陽性細胞は HLA クラスⅠ発現による影響が少ないことを示した。また、同一検体内の HLA クラスⅠ発現陰性部位では強陽性部位よりも腫瘍胞巣内浸潤 CD8 陽性細胞数が有意に減少することを示した。

【結論】非小細胞肺癌 161 例のホルマリン固定パラフィン連続切片において、免疫組織学的手法を用いて、HLA クラスⅠ、 $\beta 2$ -ミクログロブリンの発現、および腫瘍内浸潤 CD8 陽性細胞について検討を行った。非小細胞肺癌において HLA クラスⅠ発現低下・欠失群は有

意に予後不良であり、腫瘍胞巣内 CD8 陽性細胞浸潤にも影響を及ぼしていることが示唆された。これらの結果は非小細胞肺癌における免疫治療戦略を考える上で、有用な情報となることが期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 近 藤 哲
副 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学位論文題名

ヒト非小細胞肺癌における HLA クラス I 発現、 腫瘍内浸潤 CD 8 陽性 T 細胞と臨床病理学的因子の関連性

HLA クラス I 抗原はヒトの全ての有核細胞に発現する、重鎖と β 2-ミクログロブリン軽鎖からなる膜貫通型糖タンパクであり、感染したウイルスや癌抗原といった内在性抗原を CD8 陽性細胞に提示し、免疫反応を惹起させる働きを持つ。一方で様々な癌腫において、16~50%程度に HLA クラス I 抗原の発現低下・欠失がみられると報告されており、HLA 抗原発現低下・欠失は癌細胞が免疫監視機構から逃避する機序のひとつであると考えられている。最近、札幌医科大学の鳥越俊彦博士らは、ホルマリン固定パラフィン組織切片において、古典的 HLA クラス I 抗原である HLA-A, HLA-B, HLA-C の全ての重鎖を認識するモノクローナル抗体 (EMR8-5) を初めて作成し、報告した。我々はこの抗体を用いて免疫組織学的検討を行い、ヒト非小細胞肺癌における HLA クラス I 発現と、腫瘍内浸潤 CD8 陽性細胞および臨床病理学的因子の関連性に関する検討を行った。対象は 1982 年から 1994 年に北海道大学医学部附属病院で初回治療として切除を行った非小細胞肺癌患者 161 例の切除原発腫瘍、連続パラフィン切片。一次抗体として抗 HLA クラス I 抗体 (EMR8-5)、抗 β 2-ミクログロブリン抗体 (EMR-b6)、抗 CD8 抗体 (clone C8/144b) を用いて免疫組織化学染色を行った。HLA クラス I および β 2-ミクログロブリンの発現は、強陽性 (発現)、弱陽性 (発現低下)、陰性 (欠失) の 3 群に分類した。腫瘍内浸潤リンパ球は、腫瘍胞巣内浸潤リンパ球と腫瘍間質浸潤リンパ球の 2 つのグループに分類し評価した。その結果、HLA クラス I 強陽性例は 50 例 (31%) であり、57 例 (35%) が弱陽性、54 例 (34%) が陰性であった。HLA クラス I 発現と β 2-ミクログロブリン発現の程度には有意な相関が見られ、カッパ係数は 0.71 (95%信頼区間 0.62~0.80) であった。HLA クラス I 発現低下・欠失は男性、喫煙者、非腺癌、中・低分化度で有意に多くみられた。陰性群における腫瘍胞巣内浸潤 CD8 陽性細胞数は、有意に弱陽性群 ($P=0.0013$) および強陽性群 ($P=0.00017$) よりも減少していた。また同一組織内に HLA クラス I 強陽性部位と陰性部位が混在する症例 7 例での検討では、HLA クラス I 陰性部位での腫瘍胞巣内浸潤 CD8 陽性細胞数は、HLA クラス I 強陽性部位に比較し有意に減少していた ($P=0.0023$)。HLA クラス I 発現の程度と腫瘍間質内浸潤 CD8 陽性細胞数には相関は認められなかった。転帰の

判明している 150 例における解析では、HLA クラス I 強陽性群は、HLA クラス I 弱陽性および陰性群と比較し、有意に予後良好であった ($P=0.0051$)。病期による層別解析では、病理病期 I 期 ($n=88$) では HLA クラス I 強陽性群は発現低下・欠失群に比し、有意に予後良好であった ($P=0.0044$) が、II 期以上の群 ($n=62$) では HLA クラス I の発現は予後との相関は認められなかった ($P=0.85$)。病理病期 I 期群における予後因子の検討では、コックスの比例ハザードモデルを用いた単変量解析の結果、HLA クラス I 発現低下・欠失 (ハザード比 3.10, $P=0.0068$) および高年齢 (ハザード比 1 年あたり 1.05, $P=0.0099$) が有意な予後不良因子であった。多変量解析においても、HLA クラス I 発現低下・欠失は病理病期 I 期非小細胞肺癌における独立した予後不良因子であった。審査にあたり、副査近藤哲教授から 1) 腫瘍内浸潤 CD8 陽性細胞数と予後との相関の有無、2) CD4 陽性細胞が予後に影響を及ぼしている可能性について質問があった。次いで副査西村孝司教授から 1) NK 細胞が腫瘍の進展に与える影響について、2) HLA クラス I 発現低下・欠失群に対する免疫療法の戦略について質問があった。また副査秋田弘俊教授から 1) HLA クラス I 発現低下の機序、2) HLA クラス I 発現低下・欠失が喫煙者、男性、扁平上皮癌に多く見られた理由について質問があった。最後に主査西村正治教授から 1) 本研究で使用したモノクローナル抗体と以前の抗体との違い、2) 病理病期 II 期における HLA 発現と予後との関連について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自験データや過去の文献を引用し、概ね適切に解答した。質疑応答の時間は約 15 分であった。

この論文は、新しい汎 HLA クラス I 抗体を用いて、非小細胞肺癌における HLA クラス I の発現が予後、特に病理病期 I 期の術後予後と相関し、腫瘍胞巣内 CD8 陽性細胞浸潤にも影響を及ぼしていることを示したものである。これらの結果は非小細胞肺癌における免疫治療戦略を考える上で、有用な情報となることが期待できる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (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。