

学位論文題名

Infiltrating Regulatory T Cell Number Is not a Factor to Predict Patient's Survival in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma

(腫瘍に浸潤する制御性 T 細胞の数は
食道扁平上皮癌患者の予後予測因子とはならない)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

ヒト食道扁平上皮癌において腫瘍に浸潤した CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の数が予後規定因子である(Cho, 2003) ことに示されるように、宿主の免疫反応は腫瘍の術後再発を抑制し、患者の予後を規定する重要な因子と考えられる。一方で、胸腺由来の CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (Treg) が抗腫瘍免疫を抑制することが示唆されている。

Tregは末梢での免疫自己寛容を調節する機能をもつT細胞であり、CD4⁺T細胞の5~10%を占める。また、Tregの分化および機能発現を制御する因子として、転写調節因子Foxp3が核に特異的に発現しているため、Foxp3がTregの特異的なマーカーと考えられている。近年では、マウスにおいてTregが抗腫瘍効果を抑制することや、ヒト癌患者の末梢血ではTregの数が増大していることなどが報告されている。しかし、食道癌におけるTregの数と症例の予後についての関係は明らかではない。そこで今回、ヒト食道扁平上皮癌において、CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞にたいするTregの役割を明らかにすることを目的として、Choの報告と同一の検体を用いて以下の検討を行った。

【対象と方法】

1989年から1999年までに北海道大学病院腫瘍外科およびその関連病院で根治手術を施行した、遠隔転移のない術前未治療食道扁平上皮癌患者122例を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋組織より4 μ mの薄切切片を作成し、Foxp3に対する免疫組織染色を施行した。薄切切片をキシレンにて脱パラフィン後、エタノールを段階希釈した溶液を用い水和した。抗原賦活のため1mMEDTA buffer (pH9) に浸し、圧力鍋を用い最高圧で3分間加熱した。内因性ペルオキシダーゼ活性は、0.3%過酸化水素に20分間浸すことで除去した。一次抗体として mouse anti-human Foxp3 antibody (246A/E7; Abcam, 1:40) を室温で60分反応させた。二次抗体 (MAX PO [MALTI]; Nichirei Corporation) を室温で60分反応させ、DABを用いて発色させた。陽性対照として正常扁桃組織を用い、陰性対照には一次抗体としてFoxp3抗体の代わりに Mouse IgG1 (DakoCytomation) で染色した切片を用いた。腫瘍周囲に浸潤するTregの数を計測して中央値で二群に分け、臨床病理学的因子との相関および予後との関連について統計学的検討を行った。また、TregとCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞との相関も併せて検討した。Tregの浸潤と臨床病理学的因子との相関は χ^2 検定を用いて検討した。生存分析は、Kaplan-Meier法で生存曲線を作成し、log-rank法で有意差判定を行った。各

因子について、Cox 比例ハザードモデルを用いて単変量、多変量解析を行った。CD4/8 status (CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞の双方がともに浸潤している状況) と Treg の数の相関は Mann-Whitney U 検定を用いて検討した。浸潤する Treg の数と CD8/CD4 ratio の分散との相関は F 検定を用いた。p<0.05 を有意差ありとした。

【結果】

1. 免疫染色：腫瘍細胞周囲に浸潤する Treg を同定した。
2. 浸潤する Treg の数と臨床病理学的因子との相関：Treg の数は CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞の数や CD4/8 status と有意に相関していた。年齢、性別や他の病理学的因子とは有意な相関はなかった。
3. 浸潤する Treg の数と予後との相関：Treg の数が多い群は少ない群より有意に予後が良好であった。CD4/8 status で群分けして同様の解析を行ったところ、CD4/8(-/-) 群における解析においてのみ、Treg の数が多い群が少ない群より有意に予後が良好であった。さらに Treg の数が多い群が少ない群より予後が良好であるという結果は、癌の進行度に依存しなかった。
4. 単変量解析および多変量解析：単変量解析では T 因子、N 因子、CD8 status、CD4 status とともに、浸潤する Treg の数が予後規定因子として示され、多変量解析では T 因子、N 因子、CD8 status、浸潤する Treg の数が独立予後規定因子であった。しかし CD4/8 status との 2 因子で多変量解析を行った場合、浸潤する Treg 細胞の数は独立予後規定因子とはならなかった。
5. CD4/8 status と Treg の数の相関：CD4/8(+/+)群における Treg の数は、CD4/8(-/-)群および CD4/8(+/-)群における Treg の数より有意に多かった。CD4/8(+/-)群との間には有意差は認められなかった。
6. 浸潤する Treg の数と CD8/CD4 ratio の分散との相関：浸潤する Treg の数が多い群における CD8/CD4 比の分散は少ない群における分散より有意に小さかった。CD4/8(-/-)群のみで同様の検討を行った場合も同様の結果が認められた。
7. CD8/CD4 比により 4 群に分けて生存曲線を作成すると、CD8/CD4 比が最大の群と最小の群が他の二群と比較して有意に予後不良であった。

【考察】

近年、悪性腫瘍に対する免疫反応を制御する因子が注目されている。いくつかの報告では、腫瘍細胞が Treg を誘導し、それが癌患者の予後に影響することを示している。しかしながら、抗腫瘍免疫を評価するには複数の因子が同時に解析されるべきである。本研究は食道癌において Treg と CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞の関連を検討した初の報告である。

マウスにおける様々な実験から、Treg が多い患者は予後不良であるという仮説がたてられる。しかし今回の検討では、Treg の多い群は少ない群と比較して有意に予後が良好で、仮説を支持する結果とはならなかった。浸潤する Treg の数の増加は T 細胞全体の数の増加を反映しているのみで、Treg の浸潤は抗腫瘍免疫の抑制には働いていないことが示唆された。CD4/8(+/+)群においては Treg の数は予後と相関しなかったが、CD4/8(-/-)群においては Treg が多い群が有意に予後良好であり、Treg の存在は正常な抗腫瘍免疫が機能していることの指標であると考えられた。

卵巣癌や肝細胞癌においては、腫瘍内での Treg と CD8⁺ T 細胞の比が予後に影響すると報告されている。食道癌における本研究では、CD8⁺ T 細胞 / Treg 比と予後との間に有意な相関は認められなかった。このことから食道癌においては浸潤する Treg が抗腫瘍免疫を抑制しているとは考えられなかった。

一方、大腸癌においては CD8/CD4 比が高い群が予後良好であると報告されている。本研究において、CD8/CD4 比で 4 群に分けて検討した場合、比が最も高い群、最も低い群が他の 2 群と比較して予後不良

であった。このことから CD4⁺ T 細胞数と CD8⁺ T 細胞数の比が重要であると考えられた。Treg が多い群では CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞が一定の割合で存在していることから、腫瘍周囲に浸潤する Treg の数は抗腫瘍免疫が正常に機能していることの指標であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Infiltrating Regulatory T Cell Number Is not a Factor to Predict Patient's Survival in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma

(腫瘍に浸潤する制御性 T 細胞の数は
食道扁平上皮癌患者の予後予測因子とはならない)

ヒト食道扁平上皮癌において腫瘍に浸潤した CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の数が予後規定因子であると報告されているように、宿主の免疫反応は腫瘍の術後再発を抑制し、患者の予後を規定する重要な因子と考えられる。一方で、胸腺由来の CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (Treg) が抗腫瘍免疫を抑制することが示唆されている。Treg は末梢での自己免疫応答を調節する機能をもち、Treg の分化および機能発現を制御する因子として、転写調節因子 Foxp3 が核に特異的に発現している。近年、マウスにおいて Treg が抗腫瘍効果を抑制し、ヒト癌患者の末梢血で Treg 数が増加していることが報告されている。しかし、食道癌における Treg 数と予後についての関係は明らかではない。本研究ではヒト食道扁平上皮癌において、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞に対する Treg の役割を明らかにすることを目的とした。1989 年から 1999 年までに北海道大学病院第二外科およびその関連病院で根治手術を施行した、遠隔転移のない術前未治療食道扁平上皮癌患者 122 例を対象とし、手術検体で Foxp3 に対する免疫組織染色を施行した。腫瘍周囲に浸潤 Treg 数を計測して中央値で二群に分け、臨床病理学的因子との相関および予後との関連について統計学的検討を行った。また、Treg と CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞との相関も併せて検討した。浸潤 Treg 数と臨床病理学的因子との相関では年齢、性別や他の病理学的因子とは有意な相関はなかったが、Treg 数は CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞の数や CD4/8 の割合と有意に相関していた。浸潤 Treg 数と予後との相関では Treg 数が多い群は少ない群より有意に予後が良好であった。CD4/8 の割合で群分けして同様の解析を行ったところ、CD4/8(-/-) 群における解析においてのみ、Treg 数が多い群が少ない群より有意に予後が良好であった。さらに Treg 数が多い群が少ない群より予後が良好であるという結果は、癌の進行度に依存しなかった。単変量解析では T 因子、N 因子、M 因子、CD8 数、CD4 数とともに、浸潤 Treg 数が予後規定因子として示され、多変量解析では T 因子、N 因子、CD8 数、浸潤 Treg 数が独立予後規定因子であった。しかし CD4/8 の割合との 2 因子で多変量解析を行った場合、浸潤 Treg 数は独立予後規定因子とはならなかった。CD4/8(+/+)群における Treg 数は、CD4/8(-/+)群および CD4/8(-/-)群における Treg 数より有意

に多く、CD4/8(+/-)群との間には有意差は認められなかった。浸潤 Treg 数が多い群における CD8/CD4 の割合は少ない群より極端に偏った値を示さなかった。CD4/8(-/-)群のみで同様の検討を行った場合も同様の結果が認められた。CD8/CD4 の割合により 4 群に分けて生存曲線を作成すると、CD8/CD4 の割合が最大の群と最小の群が他の二群と比較して有意に予後不良であった。本研究では、Treg の多い群は少ない群と比較して有意に予後が良好で、従来の報告とは逆の結果であった。浸潤 Treg 数増加は CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞全体の数の増加を反映しているのみで、Treg は抗腫瘍免疫の抑制には働いていないことが示唆された。CD4/8(-/-)群においては Treg 数の多い群が有意に予後良好であり、Treg の存在は正常な抗腫瘍免疫が機能していることの指標であると考えられた。本研究において、CD8/CD4 の割合で 4 群に分けて検討した場合、比が最も高い群、最も低い群が他の 2 群と比較して予後不良であり、CD4⁺T 細胞数と CD8⁺T 細胞数の比が重要であると考えられた。Treg 数が多い群では CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞が一定の割合で存在していることから、腫瘍周囲に浸潤する Treg 数は抗腫瘍免疫が正常に機能していることの指標であると考えられた。

口頭発表に続き、副査秋田弘俊教授より Treg、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞それぞれの浸潤部位について、次に副査近藤哲教授より Treg が腫瘍免疫抑制をきたす機序、Treg の末梢血での働きについて、最後に主査今村雅寛教授より、従来の報告と異なる結果に対する解釈についての質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

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と判定した。