

悪性胸膜中皮腫における HLA class I の発現および 腫瘍内浸潤リンパ球と臨床病理学的因子の関連性の検討

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 アスベストの使用の影響により悪性胸膜中皮腫の発生が増加しており、この 40 年間に於いてヨーロッパで 25 万人、日本で 10.3 万人の悪性胸膜中皮腫による死亡が予測されている。悪性胸膜中皮腫は極めて悪性度の高い腫瘍であり、胸膜肺全摘、Pemetrexed などの新規抗癌剤や術後の強度変調放射線治療 (Intensity Modulated Radiation Therapy: IMRT) による放射線照射などのさまざまな治療にも関わらず予後は不良である。胸膜中皮腫の予後を改善するために免疫療法などの他の有効的な治療法が必要であるが、悪性胸膜中皮腫における抗腫瘍免疫については不明な点が多い。HLA クラス I 分子はほぼすべてのヒト細胞に発現し、特異的な抗原を提示する。さらに CD8⁺T リンパ球は腫瘍細胞の HLA 分子に提示された腫瘍特異的抗原を認識し細胞障害性に腫瘍細胞を攻撃する。したがって腫瘍内浸潤リンパ球は腫瘍特異的な抗原を認識し、免疫防御機構に重要な役割を果たすと考えられている。これまでさまざまな腫瘍において腫瘍内浸潤リンパ球および HLA クラス I 発現と予後との関連性が報告されているが、悪性胸膜中皮腫においては腫瘍内浸潤リンパ球および HLA クラス I 発現の役割については十分理解されていない。よって本研究において悪性胸膜中皮腫患者の検体を用いて HLA クラス I と腫瘍内浸潤リンパ球について免疫組織化学染色を用い評価し臨床病理学的因子との関連性を検討した。

【対象と方法】 対象は 1997 年 5 月から 2008 年 1 月に北海道大学病院、勤医協中央病院、山口宇部医療センター、岡山労災病院で診断された悪性胸膜中皮腫患者 44 名。パラフィン包埋切片に対して HLA クラス I 発現と CD4、CD8、NK 細胞の腫瘍内浸潤リンパ球をそれぞれ抗 HLA クラス I 抗体(clone EMR8-5 ; 100 倍希釈)、抗 CD4 抗体(clone 1F6 ; 20 倍希釈)、抗 CD8 抗体(clone C8/144b : 50 倍希釈)、抗 CD56 抗体(clone 1B6 ; 50 倍希釈)で免疫組織化学染色を施行した。HLA クラス I の発現は強拡大 (×400) でスライドを観察し腫瘍細胞の細胞膜が染色されている腫瘍細胞の割合を算出した。また腫瘍内浸潤リンパ球については、強拡大 (×400) で観察し個々のスライドで最も CD4、CD8、CD56 陽性細胞が多い 5 か所を選び陽性細胞をカウントして、その 5 か所の平均値を個々の症例の浸潤数とした。腫瘍内浸潤リンパ球は中央値をカットオフとして高浸潤と低浸潤の二群に分類した。評価した HLA クラス I の発現と腫瘍内浸潤リンパ球と臨床病理学的因子および予後との関連性を検討した。

【結果】 44 症例の年齢中央値は 59 才 (範囲 35~85 才)、40 例 (90.9%) が男性で 4 例 (9.1%) が女性であった。病期は Stage I が 3 例 (6.8%)、Stage II が 17 例 (38.6%)、Stage III が 21 例 (47.7%)、Stage IV が 3 例 (6.8%) であった。組織型は上皮型が 26 例 (59.1%)、二相性型が 14 例 (31.8%)、肉腫型が 4 例 (9.1%) であった。治療として手術 (胸膜肺全摘術) を受けた症例が 28 (63.6%) 症例、化学療法を受けた症例が 9 例 (20.5%)、緩和医療を受けた症例が 7 例 (15.9%) であった。HLA クラス I はすべての患者で陽性であり、陰性例は認めなかった。腫瘍内浸潤リンパ球の免疫化学染色では CD4⁺と CD8⁺T リンパ球は主に腫瘍間質に、また CD56⁺の NK 細胞は腫瘍組織内に散在性に存在し、CD4⁺T

リンパ球と CD8⁺T リンパ球の浸潤程度に有意な相関関係を認めた ($R=0.76, p<0.001$)。緩和医療を受けた症例を除いて手術または化学療法を受けた症例で予後を解析したが CD8⁺T リンパ球、CD4⁺T リンパ球ならびに NK 細胞の浸潤の程度と予後には有意な関連性は認めなかった。次に手術（胸膜肺全摘術）を受けた症例のみで予後を検討したが、CD8⁺T リンパ球の高浸潤群は低浸潤群に比べて有意に予後が良好であった ($p<0.05$)。また多変量解析でも CD8⁺T リンパ球の高浸潤は有意に予後良好な因子であった。

【考察】悪性胸膜中皮腫においては、HLA クラス I の発現はすべての症例で保たれており、外科的治療を受けた症例において CD8⁺T リンパ球の浸潤と予後とに関連性を認めた。よって CD8⁺T リンパ球は発現が保たれている HLA クラス I に提示された腫瘍特異抗原を認識し、胸膜中皮腫細胞を効果的に排除している可能性がある。これまで腫々の腫瘍組織内の腫瘍内浸潤リンパ球が検討され、大腸癌、食道癌、卵巣癌、肝細胞癌において CD8⁺T リンパ球の強い浸潤は予後と関連していたと報告がある。一方で腎細胞癌、肺癌においては CD8⁺T リンパ球の浸潤程度と予後には関連性がなかったとの報告があり腫瘍内浸潤リンパ球と予後との関連性については不明な点が多い。CXCR3 と CCR5 のリガンドとなるケモカインの腫瘍からの産生が CD8⁺T リンパ球の遊走に重要であるとの報告もあり、これらのケモカインの産生の程度によって、腫瘍内浸潤リンパ球の浸潤強度に影響を及ぼし、さらには予後にも関与している可能性が考えられる。また腫瘍の種類、進行程度や異なる治療法がそれぞれの腫瘍の予後を反映しているかもしれない。

悪性胸膜中皮腫においてはこれまで腫瘍内浸潤リンパ球を評価した研究がいくつか報告されている。Leigh らはリンパ球の浸潤は予後良好因子であったと報告しているが、リンパ球の評価方法に免疫化学染色は用いておらずヘマトキシリンエオジン染色のみで行っていた。Mudhar らは悪性胸膜中皮腫 15 症例において免疫化学染色で白血球、リンパ球、NK 細胞を評価したがこれらの浸潤程度と予後には関連性がなかったと報告している。最近では Anraku らが外科的切除を受けた悪性胸膜中皮腫症例において CD8⁺T リンパ球の浸潤が強い症例は有意に予後が良好であったと報告している。本研究結果と同様に、悪性胸膜中皮腫の抗腫瘍免疫には T リンパ球が重要であることを示唆している。よって CD8⁺T リンパ球は悪性胸膜中皮腫の抗腫瘍免疫に関して重要な役割を果たす可能性があり、CD8⁺T リンパ球を用いた抗腫瘍免疫療法は有用かもしれない。

【結論】悪性胸膜中皮腫のすべての症例で HLA クラス I 発現を認め、CD8⁺T リンパ球の高浸潤は外科的切除を受けた症例において有意に予後良好因子であった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 近 藤 哲

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

悪性胸膜中皮腫における HLA class I の発現および 腫瘍内浸潤リンパ球と臨床病理学的因子の関連性の検討

HLA クラス I 分子はほぼすべてのヒト細胞に発現し、特異的な抗原を提示する。さらに CD8⁺T リンパ球は腫瘍細胞の HLA 分子に提示された腫瘍特異的抗原を認識し細胞障害性に腫瘍細胞を攻撃する。したがって腫瘍内浸潤リンパ球は腫瘍特異的な抗原を認識し、免疫防御機構に重要な役割を果たすと考えられている。これまでさまざまな腫瘍において腫瘍内浸潤リンパ球および HLA クラス I 発現と予後との関連性が報告されているが、悪性胸膜中皮腫においては腫瘍内浸潤リンパ球および HLA クラス I 発現の役割については十分理解されていない。よって本研究において悪性胸膜中皮腫患者の検体を用いて HLA クラス I と腫瘍内浸潤リンパ球について免疫組織化学染色を用い評価し臨床病理学的因子との関連性を検討した。対象は 1997 年 5 月から 2008 年 1 月に 4 施設で診断された悪性胸膜中皮腫患者 44 名。パラフィン包埋切片に対して HLA クラス I 発現と CD4、CD8、NK 細胞の腫瘍内浸潤リンパ球をそれぞれ抗 HLA クラス I 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD56 抗体で免疫組織化学染色を施行した。評価した HLA クラス I の発現と腫瘍内浸潤リンパ球と臨床病理学的因子および予後との関連性を検討した。HLA クラス I はすべての患者で陽性であり、陰性例は認めなかった。CD4⁺T リンパ球と CD8⁺T リンパ球の浸潤程度に有意な相関関係を認めた ($R=0.76$, $p<0.001$)。手術（胸膜肺全摘術）を受けた症例のみで予後を検討し、CD8⁺T リンパ球の高浸潤群は低浸潤群に比べて有意に予後が良好であった ($p<0.05$)。また多変量解析でも CD8⁺T リンパ球の高浸潤は有意に予後良好な因子であった。悪性胸膜中皮腫においては、HLA クラス I の発現はすべての症例で保たれており、外科的治療を受けた症例において CD8⁺T リンパ球の浸潤と予後とに関連性を認めた。よって CD8⁺T リンパ球は発現が保たれている HLA クラス I に提示された腫瘍特異抗原を認識し、胸膜中皮腫細胞を効果的に排除している可能性がある。

これまで腫々の腫瘍組織内の腫瘍内浸潤リンパ球が検討されているが、腫瘍内浸潤リンパ球と予後との関連性については不明な点が多い。悪性胸膜中皮腫においてはこれまで腫瘍内浸潤リンパ球を評価した研究がいくつか報告されている。Leigh らはリンパ球の浸潤は予後良好因子であったと報告しているが、リンパ球の評価方法に免疫化学染色は用いておらずヘマトキシリンエオジン染色のみで行っていた。Mudhar らは悪性胸膜中皮腫 15 症例において免疫化学染色で白血球、リンパ球、NK 細胞を評価したがこれらの浸潤程度と予後には関連性がなかったと報告している。最近では Anraku らが外科的切除を受けた悪性胸膜中皮腫症例において CD8⁺T リンパ球の浸潤が強い症例は有意に予後が良好であったと報告している。本研究結果と同様に、悪性胸膜中皮腫の抗腫瘍免疫には T リンパ球が重要であると

ことを示唆している。よって CD8⁺T リンパ球は悪性胸膜中皮腫の抗腫瘍免疫に関して重要な役割を果たす可能性があり、CD8⁺T リンパ球を用いた抗腫瘍免疫療法は有用かもしれない。

審査にあたり、副査の浅香教授より 1)CD4⁺TIL と CD8⁺TIL が相関した機序、2)アスベストの曝露歴がある症例においての発癌予防の意義および早期発見についての質問があった。次いで、副査の近藤教授より 1)予後解析において CD4⁺TIL と CD8⁺TIL の結果を組み合わせの検討、2)HLA 発現が保たれているのに悪性胸膜中皮腫自体の予後が悪い理由、3)予後解析において臨床病期と予後との関連性がなかった要因についての質問があった。次いで、副査の秋田教授より 1)TIL の局在と予後との関連性、2)B7.1 の co-stimulatory molecule の発現についての質問があった。最後に主査の西村教授より悪性胸膜中皮腫に対する免疫療法の今後の可能性についての質問があった。申請者はこれらの質問について、自験データと文献を引用して概ね適切な回答を行った。

本研究は比較的稀な疾患である悪性胸膜中皮腫において HLA クラス I の発現と腫瘍内浸潤リンパ球を評価し予後との関連性を検討した点が高く評価され、今後の悪性胸膜中皮腫における抗腫瘍免疫の解明・発展に寄与するものと期待される。

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。