

学 位 論 文 題 名

The CD40-CD154 interaction would correlate with proliferation and immune escape in pancreatic ductal adenocarcinoma

(膵癌における CD40-CD154反応はその増殖や免疫回避に関係する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 膵癌は消化器悪性疾患の中でも非常に予後不良であり、その要因として急速な増殖、他臓器への高度な浸潤や転移が考えられる。外科的切除が唯一の根治的治療法とされるが、根治術は全膵癌症例の約 10-15%に施行されるに過ぎない。また、補助療法として放射線・化学療法が行われているが、根治療法としては確立されていない。そこで、患者の腫瘍免疫を活性化させて腫瘍の増殖を特異的に障害することを目的とした、新たな治療法が期待されている。これまでの報告では、膵癌患者の腫瘍における CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の浸潤は良好な予後因子とされており、抗腫瘍免疫の活性化は膵癌における一つの有力な治療法となる可能性があると考えられるが、抗腫瘍免疫に関連する因子については不明な点が多い。

CD40 は TNF ファミリーに属する分子量約 43kD の膜蛋白で、主に B 細胞に発現してその増殖に関与しており、それ以外に樹状細胞、単球などの抗原提示細胞でも発現している。CD40 のリガンドである CD154 も TNF ファミリーに属する分子量約 36kD の膜蛋白で、主に活性化 CD4 陽性 T 細胞や NK 細胞に発現している。CD40 陽性 B 細胞が CD154 陽性 T 細胞と反応することで B 細胞の増殖や免疫グロブリン産生、免疫グロブリンのクラススイッチなど液性免疫の活性化が起こる。また、CD40 刺激により、抗原提示細胞上の CD80、CD86 などの共刺激分子の発現を介して、T 細胞の活性化や増殖、サイトカイン分泌などを誘導する。本研究では膵癌患者における CD40 および CD154 の発現を検討し、それらと臨床病理学的因子・予後との関係を明らかにするとともに、CD40-CD154 反応が膵癌細胞の増殖やサイトカイン分泌に影響を与えるかを検討した。

【材料と方法】 膵癌細胞株 10 株 (KLM-1, PK-9, PK-45P, SUIT-2, KP-1N, KP-4, MIA PaCa-2, Panc-1, AsPC-1, BxPC-3) およびヒト胎児膵由来細胞株 1 株 (1C3D3) を用いて、CD40 および CD154 の発現を Western Blotting にてスクリーニングした。また、CB17/SCID マウスに膵癌細胞株を皮下移植して得られた腫瘍 (Xenografts) を用いて同様のスクリーニングを施行した。CD40 の陽性対照としてヒト末梢血単核球 (PBMC)、CD154 には recombinant human soluble CD40 ligand (rhCD154) を用いた。

1992年から1999年までに北海道大学病院第2外科および関連病院において膵癌患者から外科的切除された、遠隔転移のない、術前未治療の80例を対象として、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、免疫組織染色を行った。CD40の発現は癌細胞で確認されたほか、腫瘍浸潤リンパ球でも発現が確認されたため、これらの発現について症例を中央値で2群分

類し、CD154は癌細胞においてのみ陽性細胞がみられたため、発現の程度で4群に分類して検討した。臨床病理学的因子との相関は χ^2 検定またはFisher's exact test、生存分析はKaplan-Meier法およびCox比例ハザードモデルを用いて検討し、 $p<0.05$ を有意差ありとした。

CD40 発現株 PK-45P, SUIT-2, KP-4, Panc-1 を rhCD154 monomer、trimer および抗 CD40 抗体、抗 CD154 抗体を加えて共培養し、細胞増殖試験を行った。続いて同じ株を同様にして共培養し、各種サイトカイン (IFN- γ , IL12-p70, IL-6, IL-10, IL-12p40) の測定を行った。また、健常人の PBMC にこれらの共培養した上清を加えて各種サイトカインの分泌を検討した。統計解析はいずれも Mann-Whitney U 検定にて行い、 $p<0.05$ を有意差ありとした。

【結果】 CD40 は培養細胞株では 8 株に発現が認められ、Xenografts では培養細胞株とほぼ同等の発現であった。CD154 は培養細胞株 10 株全てに発現が認められ、Xenografts においても培養細胞株とほぼ同等の発現であった。

免疫組織染色では、癌細胞における CD40 発現の陽性例は 29 例、CD40 陽性リンパ球浸潤の陽性例は 36 例で、いずれも予後との相関は認めなかった。CD154 では高発現群がその他の群に比較して、有意に予後が良好であった ($p=0.0198$)。また、CD154 高発現群は N 因子、分化度、CD4 陽性 T 細胞浸潤数 (CD4 status) と相関した。CD4 status は CD8 陽性 T 細胞、CD40 陽性 B 細胞の両方の浸潤数と相関した。単変量解析では N 因子、v 因子、腫瘍径、CD154 status が予後予測因子であったが、多変量解析では N 因子、v 因子が独立した予後予測因子であり、CD154 発現に独立性は認められなかった。

細胞増殖試験では、いずれの細胞株でも CD154 刺激で増殖に変化を認めなかったが、抗 CD40 抗体および抗 CD154 抗体暴露で 2 株において増殖の低下がみられた。また、PK-45P では CD154 刺激で IL-10 分泌の増加がみられ、抗体暴露で減少したほか、IL-6、IL-12p40 は抗体暴露で分泌の減少がみられた。PBMC においても IL-6、IL-12p40 の分泌はともに CD154 刺激で増加し、抗体暴露により減少がみられた。

【考察】 CD154 による CD40 刺激は樹状細胞などの抗原提示能を増強させ、これを介して T 細胞を誘導する可能性が示唆されるが、この系は癌細胞においても生物学的、免疫学的な意味を持つことが示唆される。

過去の報告では、CD40 刺激が癌細胞の増殖に関わっていると示唆されている。本研究においては、膀胱癌細胞株で CD154 刺激では増殖に変化を認めなかったものの、抗 CD40 抗体、抗 CD154 抗体の暴露で増殖が抑制されたことから、内因性の CD40-CD154 反応系の存在が示唆された。

IL-6 は多様な作用を持つ Th-2 系サイトカインで、いくつかのリンパ増殖疾患における予後予測因子であり、IL-10 は IFN- γ や IL-2 などの Th-1 サイトカインに抑制的に作用する Th-2 サイトカインで、大腸癌や肺癌などの固形癌の予後予測因子である。また、IL-12 は Th-1 の IL-12p70 と Th-2 の IL-12p40 の 2 つがあり、後者は IL-12 受容体に拮抗して作用し、IL-12p70 と競合するとされている。いくつかの膀胱癌細胞株においては CD40-CD154 反応によってサイトカイン分泌が誘導され、周囲の微小免疫環境を Th-2 系へと変化させる可能性が示唆された。

以上より、膀胱癌細胞は外部からの CD154 刺激や自身の CD40-CD154 反応によって増殖や周囲の微小環境に変化をもたらすと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 准教授 平 野 聡

学 位 論 文 題 名

The CD40-CD154 interaction would correlate with proliferation and immune escape in pancreatic ductal adenocarcinoma

(膵癌における CD40-CD154反応はその増殖や免疫回避に関係する)

CD40-CD154 反応は近年、癌細胞でも発現が報告されており、今回、膵癌患者検体での膵癌細胞と腫瘍浸潤リンパ球におけるこれらの発現と予後との関係、また膵癌細胞株でのこれらの反応の細胞増殖やサイトカイン分泌に与える影響を検討した。膵癌細胞株 10 株とこれらを SCID マウスに皮下移植した腫瘍 (Xenografts) を用いて、CD40、CD154 の発現をスクリーニングした。1992 年から 1999 年までに北海道大学病院および関連施設で切除された膵癌患者検体 80 例に対して免疫染色を行った。CD40 は発現癌細胞数および腫瘍浸潤リンパ球数を計測、CD154 は癌細胞での発現の程度で分類した。次に CD40 発現株を rhCD154 および抗 CD40・CD154 抗体を加えて共培養し、増殖試験を行った。続いて同様にして共培養した培養上清のサイトカイン (IFN- γ , IL-12p70, IL-6, IL-10, IL-12p40) を測定した。また健常人の PBMC にこれらの培養上清を加えて共培養し、サイトカイン分泌への影響を検討した。CD40 は培養細胞株で 8 株に、CD154 は 10 株全てに発現がみられ、Xenografts でもほぼ同等であった。免疫染色では CD40 の発現と予後には関連は認めず、CD154 では高発現群が他の群より有意に予後良好であった ($p=0.0198$)。CD154 高発現は N 因子、分化度、CD4 陽性 T 細胞浸潤数 (CD4 status) と相関し、CD4 status は CD8 陽性 T 細胞、CD40 陽性 B 細胞浸潤数と相関した。予後因子解析では CD154 高発現は非独立予後因子であった。増殖試験では rhCD154 で増殖に変化を認めず、抗 CD40・CD154 抗体で 2 株増殖が低下した。PK-45P では rhCD154 で IL-10 が増加し、抗体で減少したほか、IL-6、IL-12p40 は抗体で減少した。PBMC においても IL-6、IL-12p40 は rhCD154 刺激を受けた培養上清で増加し、抗体暴露を受けた培養上清で減少した。CD154 による CD40 刺激は樹状細胞等の抗原提示能を増強させ T 細胞を誘導する可能性が示唆される。増殖試験から膵癌では内因性の CD40-CD154 反応系の存在が示唆された。さらにこの反応でサイトカイン分泌が誘導され、周囲の微小免疫環境を Th-2 系へと変化させる可能性が示唆された。免疫染色との関連では、膵癌細胞が何らかの因子を受けることで CD154 を高発現させて増殖を促進し、免疫回避している可能性が考えられる。以上より、膵癌細胞は外部からの CD154 刺激や自身の CD40-CD154 反応により細胞増殖や周囲の微小免疫環境に変化をもたらすと

考えられた。また膵癌細胞における CD154 高発現は予後良好因子であることが示唆された。

スライドを用いた口頭発表後、副査の今村雅寛教授より *in vivo* でのサイトカインの検討、*in vitro* と *in vivo* の相反する結果の要因、細胞株の由来について、副査の平野聡准教授より免疫染色の精度管理と工夫、*Xenografts* のウエスタンブロットと免疫染色の結果の解離、細胞増殖試験の結果の解釈、今後の研究について、主査の秋田弘俊教授より正常膵管や胎児膵由来細胞株での発現、正常膵管・腺腫・癌での発現解析、多段階発癌過程での発現様式の変化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。ただし、*in vivo* でのサイトカインの確認、CD154 の正常膵管での発現、多段階発癌過程における発現変化等の検討は行っておらず、今後の課題として必要性を強調した。

この論文は、膵癌細胞での CD154 発現と宿主の免疫反応は相互に作用し、免疫細胞からの CD154 刺激や膵癌細胞自身の CD40-CD154 反応により細胞増殖や周囲の微小免疫環境を変化させる可能性を示した点で高く評価され、今後、この反応系に特異的に作用する新しい癌治療に方向性と可能性を与えることが期待される。

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。