

学位論文題名

Immunohistochemical analysis for antigen presentation and immune escape mechanisms in esophageal cancer

(食道癌における抗原提示機構および免疫回避機構の免疫組織学的解析)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 食道癌は手術・化学療法・放射線療法といった集学的治療の発達により治療成績が向上している。しかし、進行癌の病勢制御が十分とは言えない予後不良な癌の一つである。それ故に新しい予後予測因子の発見や術後補助療法の新しい方法の開発が必要である。

癌特異的な免疫療法は新しい治療方法の一つとして研究が進んでいるが、腫瘍抗原特異的な CTL 反応が誘導されても、かならずしも臨床的な治療効果にはつながらないことがわかってきた。この理由の一つとして腫瘍の局所における癌細胞の免疫回避機構が関与しており、この回避機構の一部に、抗原提示機構である Human Leukocyte Antigen (HLA) class I Pathway が関係している可能性が示唆されている。当研究グループでは今まで癌細胞と免疫の関係について研究し報告してきた。過去の報告では、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の両者が腫瘍周囲に多いとき食道癌患者の予後が良いことが示されている。癌に対する宿主の免疫反応や腫瘍の免疫回避機構が術後患者の予後や再発との相関が示され、その中でも HLA class I Pathway に関連する報告は様々な癌腫において多数報告されている。食道癌においても HLA class I 分子の発現低下が予後不良と関わっている報告がされている。しかし、患者の予後と HLA class I Pathway の各因子を網羅的に検討した報告はない。

本研究は食道癌における HLA class I Heavy chain や β 2 microglobulin を含む 11 種類の抗原提示機構の因子について網羅的に複数の食道癌細胞株を用いて解析した。また、1994 年から 2004 年の間に当科で手術施行された食道癌を対象に、HLA class I 関連タンパクについて Tissue Microarray 法を用いた免疫組織学的手法にて解析し、患者転帰との関係を検討することで、生物学的意義を調べる事を目的とした。

【材料および対象と方法】 使用抗体：Roswell Park Cancer Institute の Dr.Ferrone より供与された HLA クラス I Pathway に関わる因子 (Delta, MB1, Z, LMP7, LMP10, Calnexin, Calreticulin, ERp57, TAP1, TAP2, Tapasin, β 2microglobulin)、および Abcam 社より入手した HLA class I Heavy Chain を認識する抗体を使用した。

11 種類のヒト食道癌細胞株を材料として、Western Blotting 法を用いて上記 13 種類の HLA class I 関連タンパクの発現状況をスクリーニングした。また、これらの細胞株から作成した SCID マウスへの移植腫瘍組織 (Xenograft) を使用し、同様に発現状況を検討した。その結果より免疫組織染色における陽性対照・陰性対照として用いる組織切片を作製した。各抗体について、Western Blotting の結果と免疫組織染色の結果が一致するように適切な組織染色の条件を設定した。

次に 1994 年から 2004 年の間に当科で手術施行された 95 例の食道癌症例 (男性 82 名、女性が 14 名、年齢の中央値は 63 歳、臨床病理学的診断では Stage0 は 1 名、stage1 は 29 名、

stage 2 は 24 名、stage 3 は 21 名、stage 4 は 20 名) を対象に、手術検体より Tissue Microarray 法にてパラフィン切片を作成し、HLA class I 抗原提示機構の免疫組織染色を施行し生存との関連を評価した。

統計学的解析：生存分析の解析には術後全生存期間を採用した。HLA の各因子の発現状況で群分けされた症例の生存期間は Kaplan-Meier 法で生存曲線を作成し、有意差検定には Logrank 検定を使用した。予後リスク因子の解析には Cox 比例ハザードモデルを使用し、単変量解析で有意差を認めた項目について多変量解析を施行した。HLA の各因子と臨床病理学的因子の関係については χ^2 乗検定もしくは Fisher の直接確率検定を用いて解析した。P=0.05 未満の場合を有意差ありと定義した。

【結果】 1. ヒト食道癌細胞株において LMP7、LMP10、TAP1、TAP2、Tapasin、HLA class I heavy chain、 $\beta 2$ microglobulin の 7 因子は細胞株間に発現様式が異なっていた。MB1、Delta, Z, Erp57 の 4 因子はすべての細胞株において、正常組織に比べて癌細胞で高発現を認めた。

2. Western Blotting 法で発現の違いを認めた因子を対象として Xenograft のパラフィン切片の免疫染色を施行した。組織陽性対象の Xenograft として TE8 を、組織陰性対象の Xenograft として LCD を使用し、LMP7、LMP10、TAP1、TAP2、Tapasin、HLA class I Heavy chain、 $\beta 2$ microglobulin において、Western Blotting の結果と一致する免疫組織染色の条件設定をおこなった。

3. 食道癌症例の切除組織を免疫染色し、染色結果で群分けした後、予後リスク因子の単変量解析を行ったところ、HLA Heavy chain、 $\beta 2$ microglobulin、TAP1、T 因子、N 因子で有意差を認め、多変量解析では HLA Heavy chain、TAP1、T 因子が有意な予後因子であった。

4. ステージ別に予後リスク因子の解析を行ったところ、ステージ I と II の食道癌症例においてはすべての抗原提示関連因子が有意な予後因子とはならなかったが、ステージ III と IV の 41 症例では HLA class I Heavy chain の低発現が全因子の中で唯一の独立予後規定因子であった。

【考察】 本研究では臨床検体の解析に先立って、細胞株を使用した Western Blotting 法にて複数ある HLA 関連因子をスクリーニングした。細胞株間で発現が異なる因子は、その因子が細胞の性質の違いの原因となっている可能性があるため、このような因子に着目して、臨床病理学的因子との相関を調べることで、その因子のもつ役割を推測することができると考えた。さらには細胞株間で発現が異なる因子は、それらの細胞株の Xenograft を作成することで免疫組織染色の際に組織陽性対照と組織陰性対照の両方を得ることが可能であるため、より客観的な免疫組織染色の条件設定が可能である。

食道癌患者において癌細胞の HLA class I Heavy chain の低発現が予後不良因子であるという結果は従来の報告とも一致しているおり、食道癌術後の転帰には HLA class I Heavy chain が強く関連している可能性が示唆された。

進行食道癌症例においては臨床病理学的因子を含め HLA class I Heavy chain の低発現が唯一の予後不良因子であったことから、予後予測マーカーとして HLA class I Heavy chain の免疫組織染色が有用である可能性が示唆された。この結果は進行癌に対して根治術を施行した後に、HLA class I が発現している微小転移残存腫瘍が宿主の免疫により排除されるという考えを支持するものと考えられる。我々は以前に CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の両方が腫瘍周囲に多く認める食道癌術後患者の予後が良いことを報告している。このことから癌細胞に対する宿主の免疫反応と癌細胞に発現している HLA class I 分子の状態が術後の転帰に対して重要な因子であることに矛盾しない。手術検体の腫瘍細胞が HLA class I Heavy chain を発現している症例において、手術後の遺残癌細胞を排除する作用を助けるために癌特異的な術後補助免疫療法が有効となる可能性が考えられた。

【結語】 HLA class I Heavy chain の発現低下は進行食道癌患者において特に予後不良因子となることがわかった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	藤堂	省
副査	准教授	濱田	淳一
副査	教授	櫻木	範明
副査	教授	秋田	弘俊
副査	准教授	平野	聡

学位論文題名

Immunohistochemical analysis for antigen presentation and immune escape mechanisms in esophageal cancer

(食道癌における抗原提示機構および免疫回避機構の免疫組織学的解析)

癌に対する新しい治療手段として癌免疫療法があるが、既存の治療法を大きく上回る治療効果は報告されていない。この原因として癌に対する宿主の免疫反応や癌の免疫回避機構は癌患者の再発において重要な役割があることが報告されており、その機構の一部に HLA class I pathway が強く関係していることが判明しつつある。本研究では、免疫染色法を用いて食道癌術後症例の転帰と抗原提示機構との関連を調べるために、先行して複数の食道癌細胞株を用いて抗原提示機構の発現状況を検討している。11 種類の食道癌細胞株を用い抗原提示機構の発現状況を 13 種類の抗体を使用してウェスタンブロッティング法にてスクリーニングをし、HLA class I pathway に関する細胞株間で発現量に差を認めた因子が HLA class I Heavy chain、 β 2 microglobulin、Tapasin、TAP1/2、LMP7/10 であることを示している。免疫染色の適切な条件設定のため、ウェスタンブロッティングでの発現強度と免疫染色の染色強度が一致する条件を模索している。癌細胞株を SCID マウスに植え付けて作成した Xenograft を材料として用い、同一腫瘍から蛋白とパラフィンブロックを作製し、組織陽性対照として食道癌細胞株 TE8、組織陰性対照として肺がん細胞株の LCD を利用できることを示している。条件設定後に Tissue Microarray 法を用いて 96 例の食道癌患者検体を免疫染色し生存解析をした結果、単変量解析では HLA class I Heavy chain、 β 2microglobulin、TAP1 が予後不良因子となり、病理学的因子では T 因子、N 因子が予後不良因子であることを示している。これら単変量解析で有意差を認めた項目に対して多変量解析を行ったところ、HLA class I Heavy Chain の低発現と、TAP1 の高発現、T 因子が独立予後不良因子として認められ、進行期である stage III、IV 症例においては HLA class I Heavy Chain の低発現症例のみが有意な予後不良因子として認められた。食道癌における HLA class I Heavy chain の低発現が予後不良因子であるとする結果は従来の報告と一致することからも、食道癌術後の転

婦には HLA class I Heavy chain が強く関連していると考えられた。以上より、進行食道癌症例では HLA class I Heavy Chain の低発現が唯一の予後不良因子であったことから予後予測マーカーとして有用となる可能性を示唆し、さらに HLA class I Heavy chain の免疫染色を利用することで手術後の治療方針に新しい方向性と可能性を与えると期待されると結論づけた。

スライドを用いた口頭発表後、副査 濱田准教授より、本研究で試行されている、癌部から4箇所だけの組織採取を行う Tissue microarray 法で癌組織内の不均一性をどのように評価できるのかについて質問があった。また、手術症例の一般的な癌再発形式について質問があった。次に、副査 桜木教授より生存解析の際に術後補助化学療法症例の有無で層別化した検討をおこなっているのかについて質問があった。また、HLA class I Heavy chain が発現低下している症例に対して発現を回復する治療方法について質問があった。次に、副査 秋田教授より HLA class I Heavy chain が予後予測マーカーとして使えるなら発現低下症例に対して術後にどのような補助治療方法が考えられるか質問があった。また、対象症例群間における術式の差の有無について質問があった。次に、主査 藤堂教授より HLA class I Heavy chain の stage I, II 症例と III, IV 症例で低発現頻度に差がないのに stage III, IV 症例でのみ予後因子に関わる理由について質問があった。また TIL と HLA class I との関係について質問があった。最後に、副査 平野准教授より Xenograft において TAP1 が弱発現している LCD を組織陰性対照とする際の解釈について質問があった。また、Tissue microarray の一症例からの採取個数は十分であるのか質問があった。また、検鏡の際の二者間の一致率について質問があった。また、TAP1 に関する考察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。

本論文は、免疫組織染色を利用した研究で、条件設定の際に適切な陽性対照と陰性対照を作成した点で高く評価され、今後の HLA class I Heavy chain の免疫染色が患者の治療方針に新しい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）の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。