

学位論文題名

Association of NY-ESO-1 expression with T cell infiltration in the tumor microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma and survival

(食道扁平上皮癌の腫瘍局所環境におけるNY-ESO-1の発現とT細胞浸潤および生存率との関連)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 食道癌は未だに予後不良の疾患である。このため、癌ワクチン療法はその補助療法の有力な候補として期待されている。癌精巢抗原は、成人の正常組織では精巢以外での発現は認められず、その組織特異的な発現から、癌ワクチン療法のターゲットとして特に注目されている。癌精巢抗原の一つである NY-ESO-1 は食道癌より発見され、多くの癌種での発現が報告されているが、NY-ESO-1 陽性の癌患者は陰性の患者に比べ予後が良好であることが報告されている。

近年、NY-ESO-1 に対する癌ワクチン療法の臨床試験が進行癌に対して行われ、特異的な免疫応答が誘導されることが確認されているが、残念ながら期待されるような腫瘍縮小効果を認めていないものが多い。我々は、食道扁平上皮癌患者において、CD4⁺ および CD8⁺T 細胞(TILs)の浸潤を認めた患者は予後が良好である事を報告している。本研究でまず、食道扁平上皮癌細胞株および手術検体を用いて NY-ESO-1 の発現評価の標準化について検討した。また、NY-ESO-1 の発現と臨床因子および組織病理学的因子との相関を評価した。

この中で特に、CD4⁺ あるいは CD8⁺T 浸潤と NY-ESO-1 発現の相関と予後との関連について検討した。

【材料と方法】 ヒト食道扁平上皮癌細胞株は TE2, TE5, TE8, TE10, TE13, HEC46, SGF7 を用いた。マウスは 4-6 週齢のヌードマウス (CB17) を用いた。食道癌細胞株 TE8、HEC46 の細胞株をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍を生着させ、この腫瘍を用いた。切除組織の標本は実際の手術での切除標本から 10mm 大の切片を -80°C で凍結保存し、その中から 5mm 角の切片を HE 染色による食道扁平上皮癌の診断に、約 100 mm³ (100 mg) の切片を RNA の抽出に用い、生検検体相当標本については 1mm³ (1 mg) の切片を RNA の抽出に用いた。

NY-ESO-1 の発現を評価するための RT-PCR は食道扁平上皮癌細胞株 8 種と手術切除検体 42 例から抽出した RNA を用いて行い、陽性対照にはヒト精巢細胞の cDNA を用いた。Real-time PCR も同様の検体にて行った。手術検体における免疫染色と臨床病理学的因子の検討には、食道切除術が施行された 122 例の検体を用いた。免疫染色は streptavidin-biotin-peroxidase 法にて行った。腫瘍細胞の細胞質が 1%以上染色されているものを NY-ESO-1 発現症例と診断した。

統計学的有意差の検討では χ^2 テスト、Fisher's exact テスト、Mann-Whitney U テスト、生存率の分析では Kaplan-Meier 法、log-rank テスト、単変量解析、多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを用い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】 (1)RT-PCR においては 8 種類の食道扁平上皮癌細胞株のうち HEC46 にのみ NY-ESO-1 の発現が認められ、TE8 を含む他の細胞株では NY-ESO-1 の発現は認められなかった。(2)食道扁平上皮癌切除標本における RT-PCR では 42 例中 10 例に NY-ESO-1 の発現が認められた。10 例の NY-ESO-1 発現検体いずれにおいても、生検検体相当の検体からは NY-ESO-1 の発現は認められなかった。(3)Real-time-PCR においても、RT-PCR において NY-ESO-1 の発現が認められた検体以外からは発現が認められなかった。(4)TE8、HEC46 腫瘍移植マウス切片において、NY-ESO-1 の免疫染色では、核染色は両者に認められたが、細胞質の染色は陽性対照である HEC46 移植マウス切片のみに認められたため、以後、免疫染色における陽性対照として HEC46 の移植切片を用いた。(5)手術検体 122 例における免疫染色では 22 例 (18%) において癌細胞の細胞質の染色を認めた。NY-ESO-1 発現症例の約半数では腫瘍細胞の染色陽性率は 10%以下であった。(6)臨床病理学的因子と

NY-ESO-1 の発現の関連性の統計学的検討では年齢と NY-ESO-1 の発現との間に有意な相関を認められたが、他の項目では有意な相関を認めなかった。(7)CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、及び NK 細胞浸潤と NY-ESO-1 の発現との関連性の検討では、NK 細胞浸潤との関連性は認められなかった(p=0.9947)。一方、CD4⁺T 細胞浸潤(p=0.0889)、CD8⁺T 細胞浸潤(p=0.0641)それぞれ単独因子と NY-ESO-1 の発現との相関を解析したところ、NY-ESO-1 陽性症例では浸潤細胞数が増加する傾向は認められたが、有意な相関を認めなかった。しかしながら、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞両者とも浸潤陽性のグループでは、他のグループと比較して NY-ESO-1 の発現との間に有意な相関を認めた(p=0.0029)。(8)生存率の検討では、NY-ESO-1 陽性の症例は陰性の症例に比べ予後良好な傾向を認めた(p=0.0858)。Stage III 又は IV の症例について層別解析すると NY-ESO-1 陽性の症例は陰性の症例に比べ有意に予後良好であった(p=0.0107)。単変量解析においては NY-ESO-1 の発現 (p=0.0212)と CD4/8 陽性 T 細胞浸潤(p=0.0028)が予後予測因子として抽出され、多変量解析では NY-ESO-1 の発現 (p=0.0058)と CD4/8 陽性 T 細胞浸潤 (p=0.0399)が Stage III 又は IV の食道扁平上皮癌患者の独立予後規定因子として抽出された。

【考察】 NY-ESO-1 を発現している腫瘍に対する癌ワクチン療法の臨床試験を行うには適応患者を選択するための診断法の標準化が必要である。切除不能な食道癌患者で適応患者を選択するには生検検体から NY-ESO-1 の発現を確認することが有用であると考えられるが、今回の結果からは生検検体での正確な診断は困難であると考えられた。実際に、HEC46 細胞株移植腫瘍の生検検体相当の検体からも RT-PCR においては NY-ESO-1 の発現が確認できなかった。移植切片の腫瘍ではヒトの腫瘍組織と異なり、めったに heterogeneity を有していない為、生検検体からの NY-ESO-1 の発現の診断が困難であり、正確な診断には十分な腫瘍組織が必要であると考えられた。RT-PCR と免疫染色の結果の乖離については報告がなされており、発現の不均一性が原因ではないかとの推測がなされている。今回の結果はこの乖離の原因の一つが NY-ESO-1 発現細胞の不均一性であることを強く示すものである。最後に我々は以前に CD4⁺あるいは CD8⁺T 細胞浸潤の意義を明らかにした食道癌症例を用いて、NY-ESO-1 の発現と宿主の癌に対する免疫応答を免疫染色を用いて評価した。NY-ESO-1 陽性症例でも、約半数は陽性細胞の比率は数%であったが、多くの NY-ESO-1 陽性症例が陽性細胞数の割合に関わらず、CD4/8(+/+)群に属していた。この事は NY-ESO-1 発現症例では陽性細胞数が少ない場合でも免疫反応に認識されている可能性を示しており、さらに、この事が患者の予後を改善している可能性がある。一方で、NY-ESO-1 以外の癌抗原と免疫細胞との間の免疫応答についても考慮する必要がある。我々は以前に食道癌患者のうち CD4/8(+/+) 群が有意に予後が良好であることを報告した。したがって、免疫反応が予後を改善する重要な因子であると考えられる。その上、進行食道癌での長期生存患者は全て CD4/8(+/+)群に属しており、そうでない患者群は他の群に属していた事は非常に重要である。今回の検討では、生存曲線は早期癌患者に比べ進行癌患者に於いての方が免疫反応が認められている点が重要である。また、興味深いことに CD4/8(+/+)群とその他の群では癌の進行度には差を認めなかったことである。ここで注目すべきは、Stage III、IV の進行癌であっても腫瘍を切除した患者に於いては抗腫瘍免疫が患者の予後を改善する可能性がある事である。

【結論】 NY-ESO-1 の発現を免疫染色にて評価する場合には、適切な陽性対照および陰性対照を用いるべきであり、今回我々は標準的な評価系を確立した。食道扁平上皮癌患者に於いては、NY-ESO-1 は宿主に癌抗原として認識されていると考えられ、最も効果的な抗腫瘍免疫反応は腫瘍切除後に認められる可能性がある。したがって、癌ワクチン療法は、NY-ESO-1 発現陽性患者の術後補助療法として行われるべきであり、予後を有意に改善する可能性があると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 平 野 聡
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 瀬 谷 司

学位論文題名

Association of NY-ESO-1 expression with T cell infiltration in the tumor microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma and survival

(食道扁平上皮癌の腫瘍局所環境におけるNY-ESO-1の発現とT細胞浸潤および生存率との関連)

食道癌は未だに予後不良の疾患であり、癌ワクチン療法はその補助療法の有力な候補として期待されている。本研究では食道扁平上皮癌より発見された癌精巢抗原の一つであるNY-ESO-1について発現診断の標準化を行う事と、癌ワクチン療法への可能性を評価する事を目的とした。

食道扁平上皮癌細胞株、切除検体の凍結標本、NY-ESO-1陽性細胞株移植マウスから得られたRNAを用いたRT-PCRの結果、及び移植マウス、切除検体122例の免疫染色の結果を比較し、RT-PCRと免疫染色での発現診断の整合性が確認された。また、NY-ESO-1陽性患者の検体における生検相当の検体においては、RT-PCRでNY-ESO-1の発現が確認できなかったことから、生検での発現診断は困難である可能性が示唆された。免疫染色での陽性対照にはHEC46細胞株移植マウスの切片が陽性対照として適している事が示された。

次に、手術切除検体122例のNY-ESO-1の免疫染色の結果、及び臨床病理学的因子との関連性の検討を行った。CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、NK細胞それぞれの浸潤とNY-ESO-1の発現との関連性の検討では、NK細胞浸潤との関連性は認められず、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞浸潤それぞれの因子とNY-ESO-1の発現との間には有意な相関を認めなかったが、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞の両者が浸潤陽性のグループでは、他のグループと比較してNY-ESO-1の発現との間に有意な相関を認めた($p=0.0029$)。また、NY-ESO-1の発現と他の臨床病理学的因子との間には年齢以外に有意な相関を認めなかったが、発現陽性患者では陰性患者に比べ5年生存率において予後良好な傾向を認めた($p=0.0858$)。さらに、Stage III・IVの進行癌患者のみの検討ではNY-ESO-1陽性患者が陰性患者に比べ、有意に予後が良好であった($p=0.0107$)。NY-ESO-1の発現を含めた臨床病理学的因子と生存に関する検討を行うと、単変量解析においてはNY-ESO-1の発現($p=0.0212$)とCD4/8陽性T細胞浸潤($p=0.0028$)が予後予測因子として抽出され、多変量解析ではNY-ESO-1の発現($p=0.0058$)とCD4/8陽性T細胞浸潤($p=0.0399$)が独立した予後良好の因子として抽出された。本研究ではNY-ESO-1の発現診断の標準化がなされると共に、生検検体での診断の問題点が示さ

れた。また、NY-ESO-1は宿主の免疫機構から認識されている事が示唆され、これをターゲットとした免疫療法は、手術にて病巣が切除された患者の術後補助療法として行われる事で効果が得られるであろうことが示唆された。

口頭発表に続き副査 瀬谷 司教授より癌精巢抗原の局在に関連した本来の機能に関する質問とNY-ESO-1蛋白を用いた癌ワクチン療法がCD4陽性T細胞、CD8+陽性T細胞両者を強力に誘導するはずであるが、臨床効果として満足な結果が得られない理由についての質問があった。続いて副査 秋田弘俊教授より、NY-ESO-1の発現が生検相当の検体で確認できない事実におけるheterogeneityの関与について、NY-ESO-1の免疫染色での発現頻度が低い、免疫染色の感度の影響について、免疫染色でのNY-ESO-1陽性のcut off値をNY-ESO-1陽性細胞数1%に設定した理由についての質問があった。最後に主査 平野 聡教授よりNY-ESO-1の食道扁平上皮癌における他の報告での陽性率について、生検相当検体として設定した1mm角の検体の、実臨床における生検検体としての妥当性について、NY-ESO-1が発現していても腫瘍の増大は抑制されないという考察と研究結果の整合性について、実臨床でNY-ESO-1を用いた治療を行う場合の対象患者の選択についての質問があった。

腫瘍免疫や癌精巢抗原についてのいくつかの基礎的な質問に対する回答では、申請者の理解および知識が不十分と思われる部分を認めたが、今回の研究の方法論、結果とその考察についての質問に対しては、文献的考察を混じえてほぼ適切に回答が行われた。今回の研究は食道扁平上皮癌におけるNY-ESO-1の、今後の臨床応用の可能性を基礎的データとともに実際の臨床データを併せて検討したものであり、申請者は当該領域に関する深い見識と研究遂行能力を有することを示すものである。審査員一同はこれらを総合的に評価し、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。

質疑応答の時間は約15分であった。なお、出席者はおよそ30名であった。