

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790271

研究課題名（和文） ヒト自然発生癌局所での免疫反応の解析

研究課題名（英文） In situ immunological analyses of human sporadic carcinomas.

研究代表者

佐藤 永一（SATO EIICHI）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60408101

研究成果の概要：卵巣癌，乳癌，膀胱癌の組織検体を使って研究を遂行した。卵巣癌，乳癌では CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞が存在すると予後が良好であった。HLA class I の発現や制御性 T 細胞の浸潤は CD8 陽性 T 細胞の浸潤と相関するが，それぞれの因子単独では予後と相関していなかった。何らかの抗原が発現していること，HLA class I が発現していること，抗原を記憶した細胞障害性 T 細胞が浸潤していることの 3 条件がそろっている群でのみ免疫反応の存在が予後を延長するものと考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：腫瘍免疫, 人体, 腫瘍精巣抗原, T リンパ球, HLA class I

1. 研究開始当初の背景

ヒト自然発生癌は，すでに免疫系から逃避した状態で発生すると考えられてきた。しかし実際には自然発生癌でも局所に免疫反応があり，特に細胞障害性 T 細胞の浸潤の有無が患者の生命予後と相関していることが明らかにされてきた。われわれもまた大腸癌，卵

巣癌，および進行性膀胱癌で細胞障害性 T 細胞が存在すると予後が良好であることを確認してきた。さらに局所での細胞障害性免疫反応を理解するために，抗原発現や癌細胞による HLA class I の発現，制御性 T 細胞の浸潤を合わせて包括的な解析を行うことが求められている。

2. 研究の目的

ヒト自然発生癌での免疫担当細胞の浸潤, 腫瘍抗原の発現, HLA class I の発現, 制御性 T 細胞の浸潤を免疫組織化学にて検出し, 得られた結果と予後情報をあわせて, 統計学的な解析を行う. その結果をもって, 癌患者の予後を免疫学的な環境から評価する方法を模索することを目的とする.

3. 研究の方法

本研究は東京医科大学倫理委員会の承認を経て施行されている.

ヒト自然発生癌の代表的癌腫として, 卵巣癌, 乳癌, 膀胱癌の切除検体を用いて免疫組織化学を施行した. 症例数は卵巣癌 119 例, 乳癌 88 例, 膀胱癌 76 例である.

免疫担当細胞として, CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞, CD68 陽性マクロファージ, CD1a 陽性の未熟樹状細胞を検討した. また CD25 と FoxP3 の二重染色で制御性 T 細胞を検出した. 腫瘍細胞での HLA class I 発現を我々で新規に作成したモノクロナル抗体で検出した. また代表的な腫瘍精巢抗原である NY-ESO-1 についての免疫組織化学も施行した.

免疫担当細胞の浸潤は高倍率視野 3 箇所での浸潤数を計測した. HLA class I, NY-ESO-1 については腫瘍細胞での発現率を半定量的に評価し, 5% 以上の腫瘍細胞に陽性シグナルが分布する症例を陽性とした.

患者年齢, 性別, 病理学的ステージ分類, 組織型, および生存時間を臨床データとして集積し, 免疫担当細胞浸潤や HLA class I, NY-ESO-1 の発現と臨床データの相関を統計学的に解析した. 解析は生存率解析を主体とし, Log-rank テスト, および Cox 比例ハザードモデルを用いた.

4. 研究成果

腫瘍組織の局所に各種の免疫担当細胞が浸潤していることが確認された. それぞれの浸潤は顕微鏡観察での計測が可能であった. 代表的な免疫組織化学の結果を図に提示する. 図 1 乳癌での CD8 陽性 T 細胞浸潤

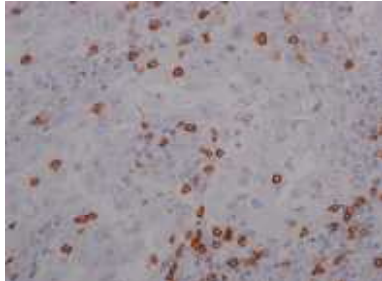


図 2 膀胱癌での HLA class I 発現

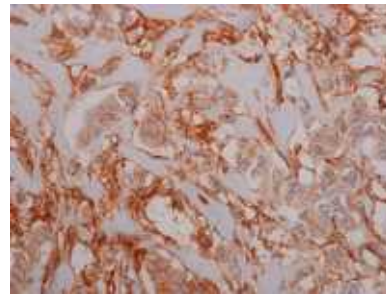
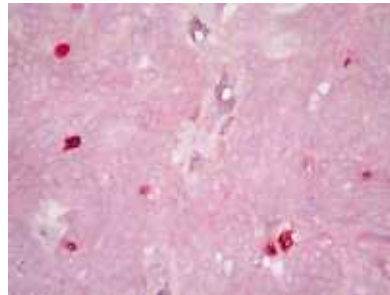
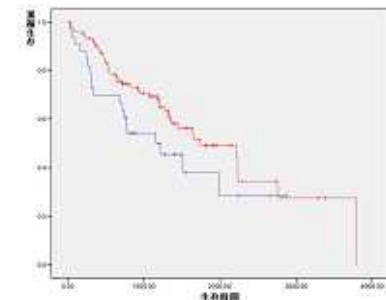


図 3 卵巣癌での制御性 T 細胞の浸潤 (赤: FoxP3, 茶: CD25)



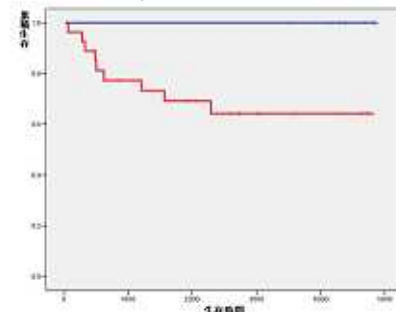
生存率解析を施行したところ, 卵巣癌, および膀胱癌では CD8 陽性 T 細胞が多い群で統計学的有意差を持って予後が良好であることが追認された.

図 4 卵巣癌 (赤: CD8 多, 青: CD8 少).



ただし乳癌では, 他臓器での報告とは異なり, CD8 陽性 T 細胞が多い群で予後が不良であった. いずれも統計学的有意差が確認された.

図 5 乳癌 (赤: CD8 多, 青: CD8 少)



HLA class I の発現の有無で群分けして検討したところ, 卵巣癌において, HLA class I 陽性の腫瘍では CD8 陽性 T 細胞の浸潤が多い群で予後が良好であった. ただし HLA class I

が陰性の群では CD8 陽性 T 細胞の有無は予後に相関しなかった。

図 6 卵巣癌 HLA class I 陽性群
(赤: CD8 多, 青: CD8 少)

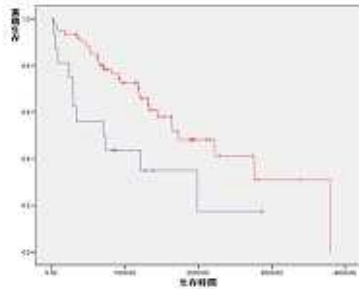
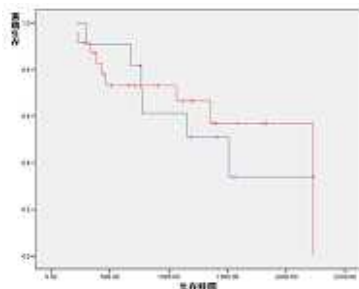


図 7 卵巣癌 HLA class I 陰性群
(赤: CD8 多, 青: CD8 少)



さらに CD68 陽性マクロファージ, および CD1a 陽性の未熟樹状細胞の有無で群分けして検討した。これらについても, マクロファージ, あるいは未熟樹状細胞が局所に浸潤している群では CD8 陽性 T 細胞の浸潤が多い群で予後が延長していたが, 樹状細胞系の細胞の浸潤を欠く群では CD8 陽性 T 細胞の有無は予後と相関しなかった。

図 8 卵巣癌 CD68 陽性細胞の多い群
(赤: CD8 多, 青: CD8 少)

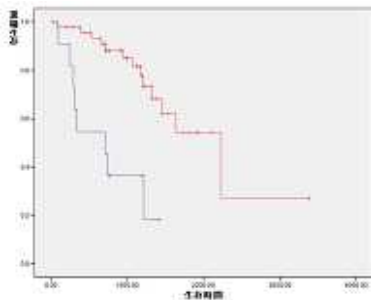
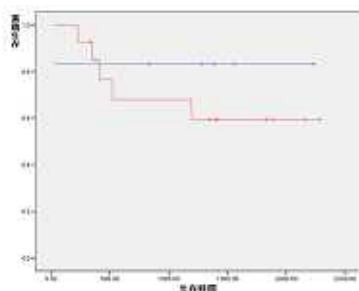


図 9 卵巣癌 CD68 陽性細胞の少ない群



NY-ESO-1 陽性症例は卵巣癌, 乳癌, 膀胱癌のそれぞれで約 15%, 20%, 18% の陽性症例が確認された。生存率解析にて NY-ESO-1 発現と予後の相関は確認されなかった。

以上の研究データを包括すると, HLA class I 発現の有無, マクロファージや樹状細胞の浸潤の有無によって, 細胞障害性 T 細胞の予後に与える効果が異なることが明らかにされた。

包括的な免疫環境を解析する観点からの自然発生癌の解析は本研究以前にはなされていない。自然発生癌の担癌患者においても, 抗原認識および細胞障害性 T 細胞の活性化がなされていることが本研究で初めて明らかにされたと考えられる。

これは癌患者の術後長期生存には, 自然発生癌が患者の免疫系に認識されていること, 特に樹状細胞を介した抗原認識が成立していることが必要であることを示唆する。

さらに, 現在臨床試験が進行中である癌抗原特異的な免疫療法に際して, 本研究で得られたデータは, 免疫療法の適応を決定するための基礎的な情報として重要であると考えられる。

しかし一方で, 乳癌では先行する他臓器での報告と異なり, CD8 陽性 T 細胞の浸潤が多い群で予後が不良であった。この事象を説明するデータ, 所見は現時点では得られていない。乳癌において認められる特異的な形質発現, 特にステロイドホルモンレセプターの発現や間質, 腫瘍細胞でのアロマターゼ発現等をあわせ見て, 局所の免疫環境のより詳細な検討を遂行中である。

また, 主要な癌抗原の一つである NY-ESO-1 陽性細胞の有無は予後と相関していなかった。今回の検討では樹状細胞系に抗原が認識されているか否かを加味した検討を行っておらず, 今後さらに症例数を加えて, 詳細な統計学的な検索を企画している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 3 件)

Wada H, Sato E, Uenaka, A, et al., Analysis of peripheral and local anti-tumor immune response in esophageal cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination, International Journal of Cancer, 123, 2362-2369, 2008, 査読: 有。

Tsuji K, Hamada T, Uenaka A, Wada H, Sato E, et al., Induction of immune response against NY-ESO-1 by CHP-NY-ESO-1

vaccination and immune regulation in a melanoma patient, Cancer Immunology Immunotherapy, 57, 1429-1437, 2008, 査読：有.

Nishikawa H, Kato T, Hirayama M, Orito Y, Sato E, et al., Regulatory T cell-resistant CD8+ T cells induced by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor signaling, Cancer Research, 68, 5948-5954, 2008, 査読：有.

〔学会発表〕(計2件)

永井毅, 佐藤永一, 岩屋啓一 他, 卵巣癌における CD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球と HLA class I 発現の免疫組織化学的検討, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 年 12 月 1 日, 京都.

佐藤永一, 岩屋啓一, 工藤玄恵, ヒト乳癌での CD8 陽性 T 細胞浸潤と HLA class I 発現の臨床的意義, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008 年 12 月 1 日, 京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 永一(SATO EIICHI)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：60408101

