

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22501061

研究課題名(和文)末梢血ガンマ・デルタ型T細胞の及ぼす腎癌予後への影響

研究課題名(英文)The impact of peripheral blood gamma-delta T cells to recurrence of the patients with early stage renal cell cancer.

研究代表者

小林 博人(Kobayashi, Hirohito)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80318047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：早期腎癌の治療は、手術が第一選択である。しかし、適切に切除した場合でも10%前後再発があり、また術後10年以上経過してから再発を認めることもある。腎癌の進展が宿主の免疫能と深く関与していると考えられるが、どのような免疫担当細胞が働いているのかは明らかにされていない。本研究では、早期腎癌患者から採取した術前末梢血中の型T細胞数が少ないと、有意に術後再発をきたす事を見出した。術前に末梢血中の型T細胞数の少ない症例では、術後のフォローアップを頻回にすることで早期の再発発見に寄与することが可能であり、また術後自己型T細胞を用いた免疫療法を行うことで再発を予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Surgical treatment is the first line treatment for the patients with early stage renal cell cancer (RCC). But, it is well known that about 10% of these patients who were performed appropriate treatments will become to recur of RCC and also late recurrence was often found in these patients more than 10 years after the surgery. Although these phenomena are thought to be closely associated with the immunological statement of the hosts, what type of immune cells play a role of immunological surveillance against RCC are still unclear. In this study, we showed that peripheral blood gamma-delta T cells might inhibit the recurrence of RCC for the patients of early stage RCC after the surgery. Our results will give a cue for an appropriate clinical follow-up schedule for these patients whose peripheral blood gamma delta T cells were low number and help to develop of a new immunotherapy for recurrence prevention.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：ガンマデルタ型T細胞 腎細胞がん 腫瘍免疫 再発予測因子 再発予防

1. 研究開始当初の背景

ガンマ・デルタ型 T 細胞 (型 T 細胞) は抗腫瘍活性を有し、近年新しい癌免疫治療におけるエフェクター細胞として注目されている細胞集団である。申請者は、局所進行腎癌患者で、術前に末梢血中の型 T 細胞の割合が高い症例は、予後良好であることを報告している (*Anticancer Res.* 2011)。また申請者は、腎癌に対する自己活性化型 T 細胞を用いた癌免疫療法の臨床試験から (*Cancer Immunol Immunother.* 2011)、型 T 細胞投与が、腎癌に対して免疫監視機構として働いていることを報告している。腎癌の治療の第一選択は、手術療法である。一方、早期局所腎癌で根治的手術を施行したが、再発をきたす症例があり、宿主の免疫能との関与が考えられているが、どのような免疫担当細胞が関与しているのか明らかにされていない。

2. 研究の目的

腎癌術前患者の末梢血免疫担当細胞の解析をし、再発を期待した症例と無再発症例の免疫パラメーター及び血液生化学的検査データを解析することで、再発リスクの高い症例の選択が可能となるかを検討する。特に、本研究では、末梢血中の型 T 細胞の割合と数が少ないことが、再発リスクを高めるといふ POC の取得を目指すものである。術前の免疫担当細胞の解析から、再発リスクの高い症例の選択が可能になると、再発の早期発見や再発予防法の開発につながると思われる。

3. 研究の方法

東京女子医科大学泌尿器科で手術予定の腎癌患者より、文書による同意取得後、末梢を採取する。末梢血を Ficoll に重層し、重力遠心法にて単核球に精製する。得られた末梢血単核球を以下の抗体 (クローン名) を用いて染色し、リンパ球サブセットの割合及び実数を求める。解析は FACS Calibur™ で測定し、解析ソフトは CellQuest™ を用いた。

抗 CD3-Phycoerythrin-Cy5 (PC5) 抗体 (UCHT1)、抗 TCR V 2-Fluorescein isothiocyanate (FITC) 抗体 (IMMU389)、抗 CD8-Phycoerythrin (PE) 抗体 (B9.11)、抗 CD4-FITC 抗体 (13B8.2)、CD56-PE 抗体 (N901)、抗 CD25-PE 抗体 (B1.49.9)。

抗体の組み合わせは以下の通りである。

CD3/V 2/CD56

CD3/V 2/CD25

CD3/CD4/CD8

通常の外來診療に合わせて、術後 2 年間は 3 ~ 6 ヶ月毎の CT 検査、採血を施行し、その後は 6 ~ 12 ヶ月毎に CT 検査、採血を施行して転移 / 再発の有無の確認をした。CT 検査にて転移 / 再発と診断された日を、転移再発確認位日とした。また、生存確認は最終外來受診日とし、他院でフォローまたは、来院ない場合は、電話確認とした。

術前のパラメーターとして、手術時年齢、性

別、血液生化学的及び血清検査としてアルブミン値、ヘモグロビン値、LDH 値、CRP 値、白血球数、好中球数 (個 / μL) および白血球分画 (%)、リンパ球数および % を調べた。免疫学的パラメーターとしては、CD3 陽性細胞数および %、V 2 陽性型 T 細胞数および T 細胞に占める割合 (%)、CD4 陽性細胞数および T 細胞に占める割合 (%)、CD8 陽性細胞数および T 細胞に占める割合 (%) を調べた。組織学的検査は、pT、腫瘍サイズ、病期、組織型、グレードを用いた。術前のパラメーターと転移再発を認めた症例および認めない症例を検討し、術前の末梢血型 T 細胞と予後転帰について統計学的に検討する。統計ソフトとして JMP Pro. (version 11.0) を用いた。

4. 研究成果

2009 年 9 月から 2011 年 4 月までの期間で、腎癌の診断で手術を施行した 188 症例のうち、病理学的に腎細胞癌と診断された 146 症例について解析した。

表 1 に症例 profile を示す。

表 1

Sex	male	105
	female	41
Age (years-old)	range	27-84
	median	61
Follow up	range	2.6-64.9 months
	median	52
Tumor	T1a	88 cases
	T1b	31 cases
	T2	9 cases
	T3a	6 cases
	T3b	10 cases
	T4	2 cases
	4.3 ± 3.0cm	Median 3.5cm
Metastasis at the surgery	lung	4 cases
	Lung+other	4 cases
	Out of lung	2 cases
Stage	I	119 cases
	II	6 cases
	III	9 cases
	IV	12 cases

次に病理学的パラメーターを表 2 に示す。観察期間中に新たな再発を認めた症例は 20 症例あり、術後 2.9 ヶ月から 61.3 ヶ月、中央値で 39.2 ヶ月に再発を認めた。T2 症例のうち 22.2%、T3a 症例のうち 50%、T3b 症例のうち 60% と局所進行腎癌では再発率が高いが、早期腎癌で根治的手術が施行された症例においても T1a で 5.7%、T1b で 12.9% の再発を認めている (表 3)。

表 2

Histology	Clear cell	124
	Papillary type I	1
	Papillary type II	16
	Chromophobe	2
	Others	3
Dominant grade	1	41
	2	99
	3	6

表 3

Reccurrence cases	20
T1a	5 (5/88: 5.7% of all T1a cases)
T1b	4 (4/31: 12.9% of all T1a cases)
T2	2 (2/9: 22.2% of all T1a cases)
T3a	3 (3/6: 50.0% of all T1a cases)
T3b	6 (6/10: 60.0% of all T1a cases)
metastatic sites	lung 11
	Lung + other 0
	Out of 9 lung
Time after the surgery (months)	range 2.9-61.3
	Average 33.5 ± 21.5 ± SD
	median 39.2

次に、免疫学的検討に移る。

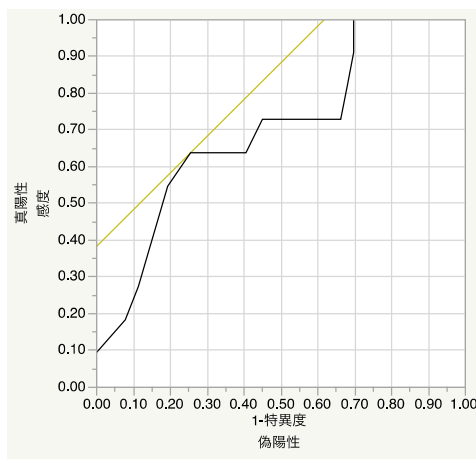
まず、健常人と腎癌症例での末梢血中の T 細胞に占める 型 T 細胞の割合を検討した。健常人 39 人 (19 歳-75 歳) の末梢血中の T 細胞に占める 型 T 細胞の割合は、 $3.8 \pm 2.3\%$ であり、限局性腎癌症例では $2.8 \pm 3.5\%$ 、進行性腎癌症例では $3.4 \pm 3.8\%$ であった。健常人と比較して、限局性腎癌症例では有意に末梢血中の 型 T 細胞の割合が低かった ($t=0.032$, t 検定)。次に、全腎癌症例の内、手術時に転移を有する症例 (stage IV) を除いた 134 症例について、再発のリスク因子を統計学的に検討した。全てのステージにおいて、再発と有意なパラメーターは、表 4 のようであった。

しかし、腫瘍サイズが大きいほど、また高グレードほど再発リスクが高いのは既知であり、また貧血、低アルブミン値、高 LDH、高 CRP、好中球増多、リンパ球及び T 細胞減少も予後不良因子として既知のものである。

表 4

パラメーター	p 値
年齢	0.0272
血清アルブミン値	0.0033
ヘモグロビン値 (Hb)	0.0028
血清 CRP 値	0.0282
血清 LDH	0.0154
末梢血好中球%	0.0115
末梢血単核球数	0.0142
末梢血 CD3 陽性細胞数	0.0155
末梢血 CD4 陽性細胞数	0.0188
腫瘍サイズ	<0.001
グレード	<0.001

次に、限局性腎癌で根治的手術が施行された症例でも T1a で 5.7%、T1b で 12.9%、T2 で 22.2% の症例が転移を来したことに注目し、再発に關与するパラメーターを調べた。T1a+T1b+T2 の 128 症例について解析した。128 症例のうち 11 症例 (8.6%) に再発を認めた。T1+T2 症例における再発リスクとなるパラメーターを調べると、驚くことに末梢血中の T 細胞数のみが有意なパラメーターであること



がわかった ($p=0.283$)。

T1-2 症例術前の末梢血 型 T 細胞数と再発の有無に關して再発を陽性とする ROC 曲線を用いて解析した。

カットオフ値は、末梢血 型 T 細胞数が 6 個/ μL であった。AUC=0.69 であり、末梢血 型 T 細胞数による再発の予測能は、低~中等度と考えられた。

腎癌の術後再発に關する因子の解析は多いが、根治術の施行された局所限局腎癌での予後因子に關する報告は少ない。診断時年齢が術後再発予測因子になるという報告が本邦より報告されているが、私たちの検討では $p=0.0501$ と傾向は認めるが、有意ではなかった。腎癌の再発は宿主の免疫能が關与してい

ると考えられており、本研究ではどのような免疫担当細胞が再発と関連しているのかに注目した。本研究では、限局性腎癌症例において、術前の末梢血中の 型 T 細胞数が、有意に再発と関与していることが明らかとなった。術前に末梢血中の 型 T 細胞が 6 個/μL 以下の症例では、術後再発予防に自己 型 T 細胞を投与する免疫療法が有効である可能性があり、新しい治療法開発につながる結果と言える。

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1件)

Hirohito Kobayashi, Yoshimasa Tanaka
T cell therapy-A Review,
Pharmaceuticals 2015,8,40-61.

査読あり

DOI:10.3390/ph8010040

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 博人 (KOBAYASHI, Hirohito)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80318047