

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791555

研究課題名（和文） 食道癌センチネルリンパ節における樹状細胞活性化動態と  
Th17/Tregバランス研究課題名（英文） The activation of dendritic cells and regulatory T cells in sentinel  
lymph node of esophageal cancer

研究代表者

櫻村 省吾（KASHIMURA SEIGO）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80398346

研究成果の概要（和文）：Single Photon Emission Computed Tomography（SPECT）にて上縦隔に hot spot を認め、Multi-detector raw Computed Tomography（MDCT）の画像と合成したところ、106reL と考えられ、手術時に hot node（HN）と診断できたことから、センチネルリンパ節の解剖学的位置情報の把握に有用であると考えられた。免疫染色によるセンチネルリンパ節における樹状細胞（DCs）と制御性 T 細胞（Tregs）の動態の検討では、HN と cold node（CN）では DCs および Tregs の数に差は見られなかったが、転移のあるリンパ節では転移のないリンパ節に比べて Tregs が多く、DCs が少なかった。

DC が遊走して抗原提示するリンパ節で転移なるリンパ節では免疫応答を抑制する Foxp3 で代表される Tregs が有意に増加していた。活性化指標と抑制化指標は腫瘍の進展に相反して変動していたことが明らかになった。樹状細胞の腫瘍内増加や制御性 T 細胞抑制等による腫瘍免疫効果の賦活を期待する。

研究成果の概要（英文）：Image synthesis method of Single Photon Emission Computed Tomography（SPECT） and Multi-detector raw Computed Tomography（MDCT） is useful way to identify anatomic locations of sentinel nodes.

Deference of the number of CD83+DCs and Foxp3+Tregs in hot node and cold node were not observed. The decreased prevalence of CD83+DCs and the increased prevalence of Foxp3+Tregs were observed in metastatic lymph nodes. It is reasonable to assume that high density of Foxp3+Tregs plays an important role directly or indirectly in inhibition of local activation of DCs. To investigate its efficacy further, careful monitoring of the two arms of the immune response will be needed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌 制御性 T 細胞 樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在、乳癌では、sentinel node (SN)理論の妥当性、臨床的有用性が実証され、SN 転移診断に基づく個別化縮小手術が実践されている。消化器癌領域においても、SN 理論の検証が胃癌を中心に進められている。食道癌においても sentinel node navigation surgery (SNNS)の臨床的意義の検証と日常臨床への応用が積極的になされていくと考えられる。また、近年免疫抑制活性を有する CD4+制御性 T 細胞 (Treg)により自己免疫疾患が惹起されたり、抗腫瘍反応が抑制されたりすることが報告されている。CD4+制御性 T 細胞 (Treg)はその多くが細胞表面に恒常的に CD25 を発現し、また転写因子 Foxp3 が、その免疫抑制機能の獲得・維持にかかわっている。CD4+CD25+Treg は自己寛容の維持に重要な役割を果たしており、その数値的・機能的異常は重篤な自己免疫病を引き起こす。近年マウスモデルにおいて、CD4+CD25+Treg を除去するか、CD4+CD25+Treg の抑制を解除する可能性のある物質をアジュバントとして使用することにより、癌に対する免疫応答を増強し、癌を駆逐できること、また CD4+CD25+Treg によって認識される抗原を免疫することにより、癌に対する免疫応答を強く抑制し、化学発癌剤による発癌促進、マウス移植癌の増悪が起こることが報告され、Treg が腫瘍免疫応答をも制御していることが強く示唆された。ヒトにおいても種々の癌患者で、末梢血および癌局所に浸潤している CD4+CD25+Treg の割合が健常人に比較して増加していること、末梢血での CD4+CD25+Treg 数の増加、腫瘍局所での CD8+T 細胞/FOXP3+CD25+Treg 比の低下は予後不良因子となりうるということが報告され、Treg が腫瘍免疫応答を制御していることが示されてきた。制御性 T 細胞の遊走能につい

ても CCR4 と CCL22 の関係も明らかにされている。

## 2. 研究の目的

本研究では、センチネルリンパ節を含む食道癌所属リンパ節、および末梢血リンパ球、腫瘍内リンパ球において Foxp3、CCR4、CCL22 mRNA の定量や蛍光色素で標識した抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体、抗 Foxp3 抗体を用いた Flow cytometry での測定により、食道癌担癌状態における制御性 T 細胞の動態を明らかにし、臨床病理学的検討と併せて、制御性 T 細胞抑制等による腫瘍免疫効果の賦活を期待する。センチネルリンパ節の解析では Single Photon Emission Computed Tomography (以下 SPECT) を用いて解析し、multi-detector row Computed Tomography (以下 MD-CT) と SPECT の画像を合成する事により 3 次元的に解析する。

## 3. 研究の方法

### 食道癌の SNNS の方法

#### ① トレーサー

SN の同定法としては色素法と放射性医薬品を用いる RI 法、またはその併用法が行われている。色素法は色素を注入してから同定するまでの時間が短く、頸部から腹部まで多方向性に分布する複雑なリンパ流の特徴を有する食道癌には適応は難しいため、RI 法を用いる。放射性同位元素は  $^{99m}\text{Tc}$ -Rhenium-Colloid (185MBq/2ml) を使用する。

#### ② 内視鏡下局注

術前日、内視鏡下に腫瘍最深部と思われる部位の周囲に食道静脈瘤硬化療法用穿刺針 (23G) を用い、トレーサーを 4 箇所、各 0.5ml を粘膜下層に局注する。

### ③ Lymphoscintigraphy

局注 4 時間後に撮像する。この際に SPECT 撮影し、事前に撮影した MDCT と画像を合成し、3 次元的な解析を行う。

### ④ 術中操作

術中にガンマプローブを用いて SN を検索する。GPS NAVIGATOR により 10/10 秒カウントできたリンパ節を hot node (HN) とし、指摘し得た RI 集積のあるリンパ節は術中迅速診断を行う。

#### リンパ節検討項目

#### ① 免疫染色

すべてのリンパ節は通常の HE 組織診断に加え、抗 Foxp3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を用いた免疫染色を行う。

#### ② real-Time RT-PCR 法

手術において採取したリンパ節および腫瘍先進部から Total RNA を抽出する。

Total RNA から cDNA を作成、ABI PRISM7000 を用いて、Foxp3 mRNA, CCL22 mRNA, CCL4 mRNA GAPDH mRNA の発現を real-Time RT-PCR 法により定量する。

#### ③ Flow cytometry

リンパ節、腫瘍組織からリンパ球を採取し、蛍光色素で標識した抗 CD4 抗体、抗 CD25 抗体、抗 Foxp3 抗体を用いて測定する。

## 4. 研究成果

### 食道癌の SNNS

SNNS では、平均 SN 検出個数は  $6.1 \pm 4.3$  個、同定率 90%、転移陽性例検出感度は 83% であった。三次元画像からは、SPECT にて上縦隔に認められた hot spot を画像合成したところ 104 と考えられ、手術時に 104 を SN と診断できた。

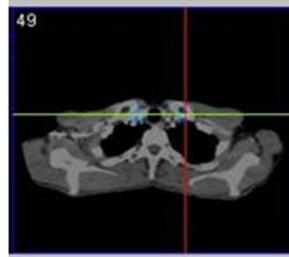


図 1. 環状断面 104LN に集積を認める。

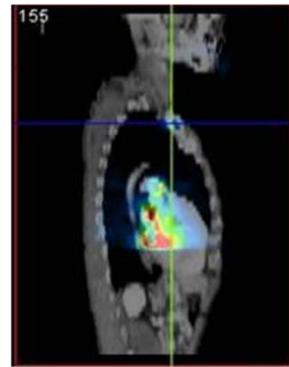


図 2. 矢状断面 104LN に集積。

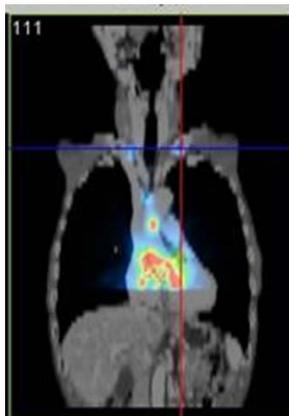
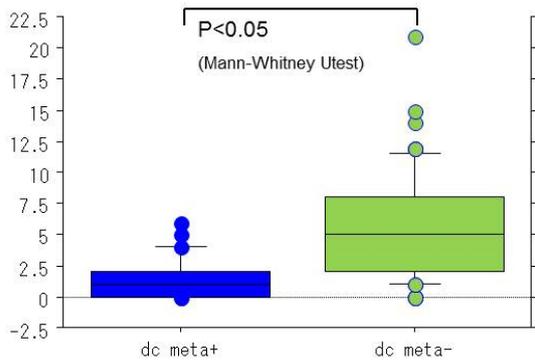


図 3. 前額断 原発巣及び 104LN に集積。

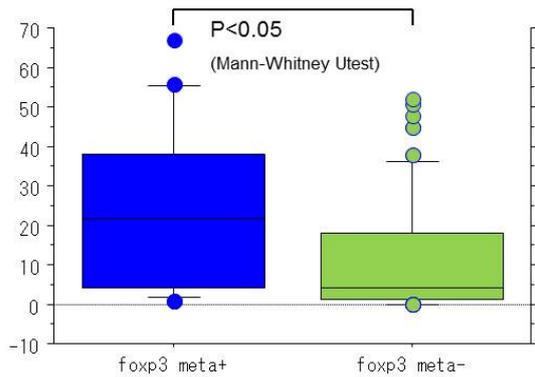
以上より SPECT と MDCT の画像合成はセンチネルリンパ節の解剖学的位置情報の把握に有用であると考えられた。

### リンパ節の検討

転移のあるリンパ節では転移のないリンパ節に比べて制御性 T 細胞が多く、樹状細胞が少なかった。(図 4, 5)

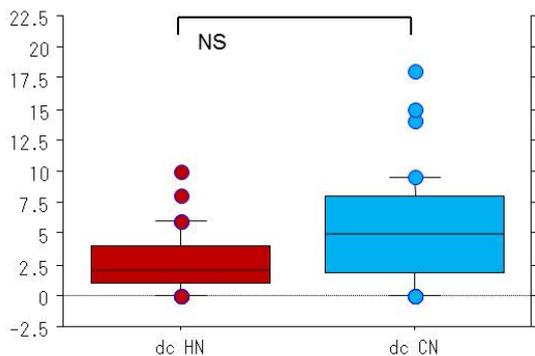


(図 4)

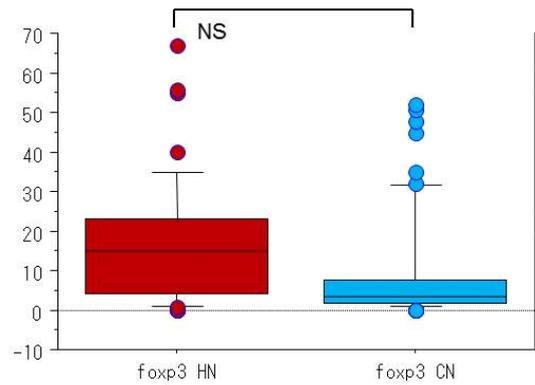


(図 5)

HN と CN では樹状細胞および制御性 T 細胞に差は見られなかった。(図 6, 7)



(図 6)



(図 7)

以上より DC が遊走して抗原提示するリンパ節で転移なるリンパ節では免疫応答を抑制する Foxp3 で代表される Tregs が有意に増加していた。活性化指標と抑制化指標は腫瘍の進展に相反して変動していたことが明らかになった。樹状細胞の腫瘍内増加や制御性 T 細胞抑制等による腫瘍免疫効果の賦活を期待する。

### 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)

- ① Kashimura S, Saze Z, Terashima M, Soeta N, Ohtani S, Osuka F, Kogure M, Gotoh M. CD83<sup>+</sup> dendritic cells and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in primary lesions and regional lymph nodes are inversely correlated with prognosis of gastric cancer. *Gastric Cancer* 15(2):144-153, 2012  
DOI: 10.1007/s10120-011-0090-9

[学会発表] (計 1 件)

- ① Kashimura S, Saze Z, Soeta N, Ohtani S, Osuka F, Kogure M, Gotoh M. CD83<sup>+</sup> dendritic cells and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in primary lesions and regional lymph nodes are inversely correlated with prognosis of gastric cancer. ISW2011, 2011. 8. 28-9. 1 Yokohama, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎村 省吾 (KASHIMURA SEIGO)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80398346

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

木暮 道彦 (KOGURE MICHIIHIKO)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90264548  
大須賀 文彦 (OSUKA FUMIHIKO)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80404870