

令和元年6月12日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08650

研究課題名(和文)胆嚢癌におけるムチンコア蛋白およびCD1a蛋白発現の意義と免疫機構への影響

研究課題名(英文) Infiltration of CD1a-positive dendritic cells and mucin core protein expression in gallbladder cancer

研究代表者

甲斐 敬太 (Kai, Keita)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：60516540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胆嚢癌の腫瘍組織内に浸潤するCD1a陽性樹状細胞に着目し、予後を含めた臨床病理学的因子、およびムチンコア蛋白発現との関連について解析を行った。その結果、胆嚢癌症例の中には、多数のCD1a陽性樹状細胞が浸潤する症例と、そうでない症例が存在し、多数のCD1a陽性樹状細胞が腫瘍中に存在する症例は、T因子やN因子の状況に関わらず、極めて予後良好であることが明らかとなった。さらに、全生存率を対象とした解析において、CD1a陽性樹状細胞浸潤は遠隔転移よりも強力な、独立した予後予測因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆嚢癌組織中のCD1a陽性樹状細胞浸潤を解析することで、現行のステージングを超えた的確な予後予測実現の可能性はある。癌組織においてCD1a陽性樹状細胞が分化誘導されるメカニズムを解明することにより、進行胆嚢癌の新規治療法の開発(免疫療法や分子標的療法)に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have focused on CD1a-positive dendritic cells (CD1a-DCs) infiltrating into gallbladder cancer (GBC) tissue and have analyzed the relationships between CD1a-DCs infiltration and clinicopathological factors including prognosis and expressions of mucin core proteins. We found that GBC could be divided into two subgroups. Namely, CD1a-DCs high group which contains many CD1a-DCs or CD1a-DCs low group which contains none or scant CD1a-DCs. CD1a-DCs high group showed favorable prognosis regardless of T- or N-factors. Furthermore, CD1a-DCs infiltration was powerful independent prognostic factor than distant metastasis in the analysis of overall survival. To clarify the mechanism of induction or differentiation CD1a-DCs in GBC tissue would contribute the development of new treatment (such as immunotherapy or molecular targeted therapy) for GBC.

研究分野：診断病理学

キーワード：胆嚢癌 樹状細胞 CD1a 予後因子 ムチンコア蛋白

1. 研究開始当初の背景

進行胆嚢癌は予後不良であり、切除不能・再発胆嚢癌に対する有効な治療法は未だ確立されていない。Cytotoxic T-lymphocyte (CTL)を誘導する免疫療法は様々な癌腫で試みられているが、胆嚢癌では癌組織中の CTL が必ずしも予後と相関しないことが知られている。我々は、その原因を追究するべく癌の免疫機構に關与するムチンコア蛋白発現と樹状細胞に關する研究に着手していたが、その際に、これまで未熟胸腺細胞以外では樹状細胞に局限して発現すると考えられていた CD1a 蛋白が、胆嚢癌の癌細胞でも時に発現することに気が付いた。

癌細胞における CD1a 発現の研究報告は今までになく、CD1a 発現が癌の悪性度に関与するとすれば、治療標的分子となる可能性がある。また、癌細胞の CD1a 発現が、ムチンフェノタイプや樹状細胞、ひいては CTL と關連し、腫瘍免疫に關与する結果が得られた場合は、免疫療法への応用が期待される。従って、その発現の頻度や意義を明らかにすることは有意義であると考えた。

2. 研究の目的

2-1. 研究当初の目的

胆嚢癌における CD1a 発現の意義と、ムチンコア蛋白発現との關連性、および免疫機構への影響を明らかにすること。

2-2. 研究方針轉換後の目的と背景

研究の方法 3-3 に示す様に、免疫組織化学における胆嚢癌細胞の CD1a 発現には再現性がなく非特異的と結論付けたため、胆嚢癌組織中に浸潤する CD1a 陽性樹状細胞に着目して、研究計画を変更した。

樹状細胞(Dendritic cells: DCs)は最も強力な抗原提示細胞であり、CTL を誘導する。これを応用した癌免疫療法の研究は広く行われているが、癌腫瘍組織における CD1a 樹状細胞浸潤に關する研究は殆どなく、癌腫瘍組織内の CD1a 樹状細胞浸潤の臨床的意義は不明のままとなっている。

そこで、胆嚢癌腫瘍組織内に浸潤する CD1a 陽性の樹状細胞を解析し、その臨床的意義を解明することを新たな研究目的とした。

* 「4. 研究の成果」に關しては、計画変更後の結果に關してのみ、記載した。

3. 研究の方法

3-1. 対象症例

胆嚢癌に対して外科切除を行い、文書による承諾を得ている連続症例のうち、腫瘍死のなかった非浸潤癌(pTis)および粘膜内癌(pT1a)を除外した、75 例の胆嚢癌症例を対象とした。

3-2. 癌細胞における CD1a 蛋白、ムチンコア蛋白発現の判定

CD1a 蛋白、ムチンコア蛋白(MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6)発現の判定は、外科切除された胆嚢癌組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより 4 μ m の薄切組織片を作成して、それぞれ免疫組織化学を行い、検討した。免疫組織化学の評価は、1%未満 = Negative、1-10% = focal (\pm)、10-50% = moderate (+)、51%以上 = diffuse (++)として行い、最終的に moderate 以上を陽性と判定した。

CD1a の癌細胞における発現に關しては、異なるクローンの抗体(VP-C311 と 010 RTU)を用いて複数回行った。両クローンとも癌細胞での染色を認めたが、解析結果が一致せず、自動免疫染色プラットフォームをアジレント社の Autostainer Plus から、同じくアジレント社の Autostainer Link 48 に変更して、再度 CD1a(010 RTU)の染色を行ったところ、癌細胞における CD1a の発現が消失した症例が存在した。以上の結果より、免疫組織化学で観察していた癌細胞の CD1a 発現は非特異的なものであったと判断し、研究計画を変更した。

3-3. CD1a 陽性樹状細胞の判定

胆嚢癌組織における CD1a 陽性樹状細胞の判定は、010 RTU のクローンを用いた、CD1a の免疫組織化学により行った。胆嚢癌組織において、光学顕微鏡 200 倍視野で 10 個以上の CD1a 陽性樹状細胞の集簇があるものを陽性と判定した。

3-4. 統計学的解析

統計解析は、ソフトウェア JMP version 13 (SAS institute)を用いて行った。2 群間の比較は、状況に応じてスチューデントの t 検定、あるいはピアソンのカイ 2 乗検定を用いて行った。overall survival (OS) は、手術時から死亡まで、あるいは最近の生存確認までの期間と定義し、disease-specific survival (DSS)は手術時から腫瘍死まで、あるいは

最近の生存確認までの期間と定義した。生存曲線はカプランマイヤー法を用いて算出した。OS と DSS に関する各因子の単変量解析、および多変量解析は、Cox の比例ハザードモデルを用いて行った。p 値は 0.05 以下を統計学的有意と判定した。

4. 研究成果

4-1. 対象症例の臨床病理学的因子

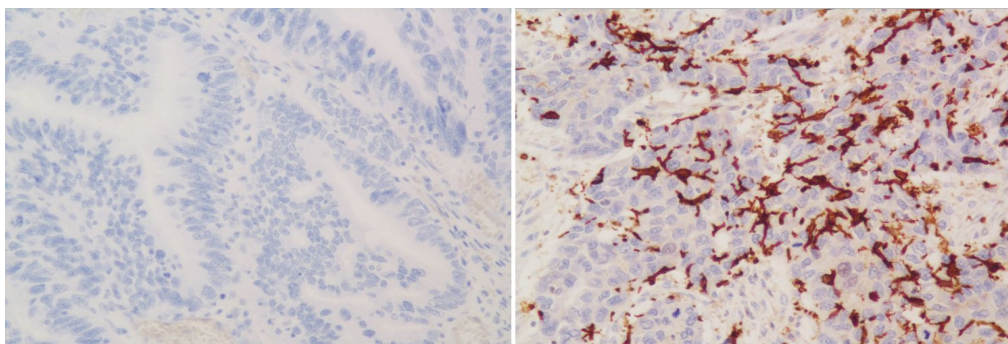
対象 75 例の臨床病理学的因子を表 1 に示す。内訳は男性 23 例(30.7%)、女性 52 例(69.3%)で、年齢の中央値は 70 歳(標準偏差 9.3)であった。腫瘍の局所浸潤の程度を示す T 因子は、T1b が 9 例、T2 が 29 例、T3 が 33 例、T4 が 4 例であった。N 因子に関しては、N0(リンパ節転移なし)が 36 例(48.0%)、N1(リンパ節転移あり)が 37 例(52.0%)であった。M 因子に関しては、M0(遠隔転移なし)が 59 例(78.7%)、M1(手術時に遠隔転移あり)が 16 例(21.3%)であった。

Characteristics	n (%)
Age, yrs (median ± SD)	70.0 ± 9.3
Male / Female	23 / 52 (69.3 / 30.7)
T-stage (1b / 2 / 3 / 4)	9 / 29 / 33 / 4
T1b or T2 / T3 or T4	38 (50.7) / 37 (49.3)
N0 / N1	36 (48.0) / 39 (52.0)
M0 / M1	59 (78.7) / 16 (21.3)

表 1. 対象 75 例の臨床病理学的因子

4-2. CD1a 陽性樹状細胞の胆嚢癌組織への浸潤状況

光学顕微鏡 200 倍視野で 10 個以上の CD1a 陽性樹状細胞を認めた症例は 27 例(36.0%)存在し、これを CD1a-DCs high 群とし、残りの 48 例(64.0%)を CD1a-DCs low 群とした。今回、200 倍視野で 10 個以上というカットオフ値を設定したが、実際に観察すると、CD1a-DCs high 群では、CD1a 陽性樹状細胞が癌組織内にカットオフ値を超えて多数みられ、CD1a-DCs low 群では CD1a 樹状細胞を全く認めないという両極端な傾向があった(図 1)。また、CD1a 陽性樹状細胞は上皮に密着する形で存在しており、間質には殆ど認めなかった。



CD1a-DCs low 群

CD1a-DCs high 群

図 1. 胆嚢癌組織中 CD1a 陽性樹状細胞の代表的な写真

4-3. 胆嚢癌組織におけるムチンコア蛋白の発現状況

胆嚢癌組織におけるムチンコア蛋白発現および CD1a 陽性樹状細胞の浸潤状況を表 2 に示す。単一のムチンコア蛋白のみが発現する症例は殆どなく、複数のムチンコア蛋白が混在して発現する症例が大多数であった。MUC1 陽性は 48 例(64.0%)にみられ、MUC5AC 陽性も 48 例(64.0%)と多かった。MUC6 蛋白の発現は 20 例(26.7%)にみられた。腸型ムチンである MUC2 の発現は少数例であった。

Characteristics	n (%)
CD1a-DCs high / low	27 (36.0) / 48 (64.0)
MUC 1, Positive / Negative	48 (64.0) / 27 (36.0)
MUC 2, Positive / Negative	5 (6.7) / 70 (93.3)
MUC 5AC, Positive / Negative	48 (64.0) / 27 (36.0)
MUC 6, Positive / Negative	20 (26.7) / 55 (73.3)

表 2. ムチンコア蛋白発現および CD1a 陽性樹状細胞の浸潤状況

4-4. CD1a 陽性樹状細胞浸潤とムチンコア蛋白発現、臨床病理学的因子との関連

ムチンコア蛋白発現および臨床病理学的因子に関して、CD1a-DCs high 群と CD1a-DCs low 群とで比較検討した結果を表 3 に示す。CD1a-DCs high 群は、CD1a-DCs low 群に比して、遠隔転移陽性例が有意に少なく(p=0.0272)、MUC5AC 陽性例が有意に少なかった(p=0.0081)。年齢、性別、T 因子、N 因子、MUC1 蛋白発現、MUC2 蛋白発現、MUC6 蛋白発現に関しては、両群間で統計学的有意差は認めなかった。

Characteristics	CD1a-DCs high (n=27)	CD1a-DCs low (n=48)	p-value
Age (≥ 70 / < 70)	17 (63.0) / 10 (37.0)	24 (48.0) / 26 (52.0)	0.1541
Male / Female	8 / 19 (29.6 / 70.4)	15 / 33 (31.3 / 68.7)	0.8839
T1b or T2 / T3 or T4	15 / 12 (55.6 / 44.4)	23 / 25 (47.9 / 52.1)	0.5253
N0 / N1	16 / 11 (59.3 / 40.7)	20 / 28 (41.7 / 58.3)	0.1433
M0 / M1	25 / 2 (92.6 / 7.4)	34 / 14 (70.8 / 29.2)	0.0272
MUC 1, Positive / Negative	19 / 8 (70.4 / 29.6)	29 / 19 (60.4 / 39.6)	0.3887
MUC 2, Positive / Negative	0 / 27 (0 / 100)	5 / 43 (10.4 / 89.6)	0.0826
MUC 5AC, Positive / Negative	12 / 15 (44.4 / 55.6)	36 / 12 (75.0 / 25.0)	0.0081
MUC 6, Positive / Negative	4 / 23 (14.8 / 85.2)	16 / 32 (33.3 / 66.7)	0.0817

表 3. CD1a 陽性樹状細胞浸潤とムチンコア蛋白発現、臨床病理学的因子との関連

4-5. CD1a 陽性樹状浸潤に基づく生存曲線

CD1a-DCs high 群と CD1a-DCs low 群の Overall survival (OS) および Disease specific survival (DSS)、それぞれの生存曲線を図 2 に示す。

OS、DS ともに、CD1a-DCs high 群は CD1a-DCs low 群に比して、良好な予後を示した。

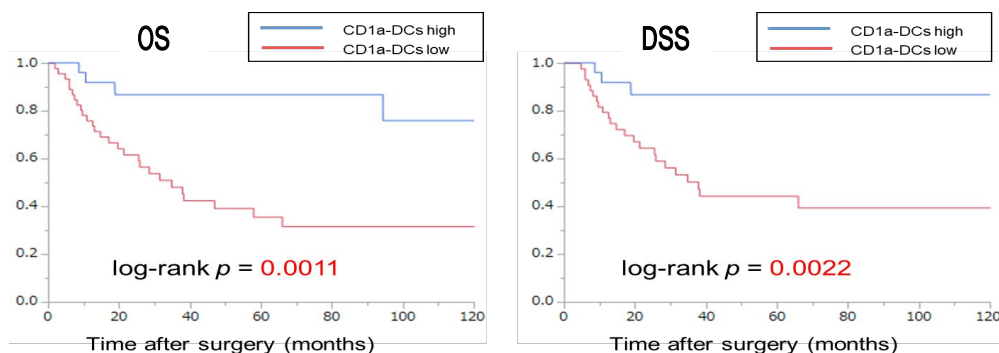


図 2. CD1a 陽性樹状浸潤に基づく生存曲線

4-6. Cox の比例ハザードモデルを用いた単変量解析

単変量解析の結果を表 4 に示す。OS に関連した因子は、年齢 ($p=0.0462$)、T 因子 ($p=0.0069$)、N 因子 ($p=0.0006$)、M 因子 ($p=0.0003$)、CD1a-DCs low ($p=0.0004$) であった。DSS 関連した因子は、T 因子 ($p=0.0012$)、N 因子 ($p=0.0003$)、M 因子 ($p<0.0001$)、CD1a-DCs low ($p=0.0009$) であった。

Label	OS		DSS	
	HR (95%CI)	p-value	HR (95%CI)	p-value
Age ($70 \leq$ yrs)	0.482 (0.223–0.988)	0.0462	0.462 (0.197–1.014)	0.0544
Gender (male)	0.788 (0.343–1.660)	0.5472	0.574 (0.210–1.351)	0.2133
T3 or T4	2.711 (1.315–5.815)	0.0069	3.753 (1.665–9.247)	0.0012
N1	3.629 (1.730–8.136)	0.0006	4.576 (1.988–11.818)	0.0003
M1	4.477 (2.081–9.279)	0.0003	6.080 (2.718–13.405)	<0.0001
CD1a-DCs low	4.884 (1.902–16.557)	0.0004	5.347 (1.857–22.571)	0.0009
MUC 1, Positive	1.558 (0.737–3.589)	0.253	1.634 (0.716–4.193)	0.2686
MUC 2, Positive	0.510 (0.028–2.395)	0.5088	0.5702 (0.031–2.703)	0.5481
MUC 5AC, Positive	1.858 (0.843–4.674)	0.129	2.985 (1.141–10.209)	0.024
MUC 6, Positive	1.028 (0.462–2.140)	0.9419	1.187 (0.505–2.607)	0.6816

表 4. Cox の比例ハザードモデルを用いた単変量解析

4-7. Cox の比例ハザードモデルを用いた多変量解析

単変量解析で有意であった因子を用いて多変量解析を行った。その結果を表 5 に示す。OS に関しては、CD1a 陽性樹状細胞の癌組織内への浸潤のみが、独立した予後規定因子として抽出された。DSS に関しては遠隔転移の有無のみが、独立した予後規定因子として抽出された (p=0.05)。

Label	OS		DSS	
	HR (95%CI)	p-value	HR (95%CI)	p-value
Age (70≤ yrs)	0.457 (0.198–1.009)	0.0526	0.437 (0.176–1.023)	0.0564
T3 or T4	1.595 (0.660–4.053)	0.3054	2.142 (0.801–6.228)	0.132
N1	1.828 (0.612–5.440)	0.2772	1.441 (0.424–4.935)	0.555
M1	2.004 (0.783–5.249)	0.1463	2.682 (1.000–7.667)	0.05
CD1a-DCs low	4.884 (1.902–16.557)	0.0133	3.104 (0.985–13.78)	0.0533
MUC 5AC, Positive	1.258 (0.526–3.366)	0.6186	1.990 (0.707–7.155)	0.2046

表 5. Cox の比例ハザードモデルを用いた多変量解析

4-8. 考察

今回の研究から、胆嚢癌には高度の CD1a 陽性樹状細胞の浸潤を伴う症例 (CD1a-DCs high 群) と、CD1a 陽性樹状細胞浸潤を殆ど伴わない症例 (CD1a-DCs low 群) が存在し、CD1a-DCs high 群は、CD1a-DCs low 群に比べて、極めて良好な臨床経過を辿るという結果を得ることができた。CD1a-DCs high 群は、今回検討した胆嚢癌症例中の 36% を占めていた。腫瘍組織中の樹状細胞の量が癌患者の生命予後と相関するという研究報告は少数存在するが、胆嚢癌あるいは胆道癌に関する報告は今までになく、臨床的に重要な新知見と考える。

今回の研究において、CD1a 陽性樹状細胞浸潤は、一般的な予後因子である T 因子や N 因子と有意な関連がないにも拘らず、OS、DSS とともに強く相関した。このことは、腫瘍組織中の CD1a 陽性樹状細胞浸潤を検討することで、現行の胆嚢癌のステージングを超えて予後を推測しうる可能性を示唆しており、非常に興味深い結果と言える。

遠隔転移を有する患者では、腫瘍中の CD1a 陽性樹状細胞は有意に少なかった。また、多変量解析で、CD1a 陽性樹状細胞浸潤は DSS より OS と強く相関しており、OS においては、遠隔転移よりも強力な予後予測因子となっていた。以下、この点に着目して、少し考察を加えてみる。

遠隔転移を有する患者で、癌組織中の CD1a 陽性樹状細胞の数が減少する原因として、「腫瘍細胞の免疫寛容」と、「宿主の免疫能を反映した結果」の 2 つの仮説が考えられる。は、腫瘍細胞の抗原を認識できない (免疫寛容) ために、樹状細胞が浸潤せず、その結果、腫瘍の悪性度が増して遠隔転移をきたしているという仮説である。もしそうであれば、免疫寛容の原因を追究することで、新規の治療法 (免疫療法) の開発に繋がる可能性がある。は、手術時に遠隔転移をきたしている患者は、既に免疫能が低下しており、その結果、腫瘍組織に樹状細胞が浸潤できない状態となっているという仮説である。この仮説は、CD1a 陽性樹状細胞浸潤は DSS より OS と有意に関連するという結果も説明することが可能である。もし、この仮説が正しければ、胆石症などに対する胆嚢摘出で偶然発見された胆嚢癌症例において、組織学的に検討した腫瘍中の CD1a 陽性樹状細胞の浸潤状況、追加で拡大手術を行うか否かの判断材料となる可能性がある。

形態的に、必ずと言っていいほど、CD1a 陽性樹状細胞は癌細胞に密着して存在しており、間質には存在しなかった。また、CD1a 陽性樹状細胞が腫瘍組織中に存在する症例は、多数の CD1a 陽性樹状細胞を認める一方、そうでない症例は、全くといっていいほど CD1a 陽性樹状細胞を腫瘍組織中に認めないという極端な傾向がみられた。以下、これらの現象について考察を加えてみる。

末梢血中の単球が樹状細胞に分化し、前述の様に CD1a がやや未熟な樹状細胞に発現することを考慮すると、CD1a 陽性樹状細胞が腫瘍細胞に密着して存在する点から「腫瘍細胞に接することで、樹状細胞の分化が促されているのではないか」という仮説が立てられる。また、症例によって、CD1a 陽性樹状細胞の浸潤に極端な差があるということは、「胆嚢癌細胞が樹状細胞への分化を促す、あるいは免疫寛容を許す、何等かの因子を出している症例とそうでない症例が存在するのではないか」という仮説も成立する。これらの仮説の検証には今回の研究では至らなかったが、このメカニズムを解明し、樹状細胞への分化を促す、あるいは免疫寛容を許す責任物質が特定できれば、胆嚢癌の新規治療法に繋がる可能性がある。実際に今回の検討で、MUC5AC の発現と CD1a 樹状細胞浸潤に有意な相関がみられたことから、ムチンコア蛋白も責任物質の候補となろう。

胆嚢癌組織中への CD1a 陽性細胞浸潤の欠落/減少が、予後不良の「原因」なのか、「結果」なのか、今回の研究では明らかにすることはできなかったが、この点を明らかにし、

さらにそのメカニズムを解明することは、進行胆嚢癌の新規治療法の開発、あるいは適切な治療方針の選択に寄与する可能性があり、今後さらに研究すべき課題と考えている。

5. 主な発表論文等

途中で研究方針を転換した為、本研究の成果は現在論文化しつつある段階であり、1件の学会発表に留まっている。しかしながら、研究期間中に主に英文校正費、出版費という形で、本研究費の補助を受けて出版した研究論文があるため、それを記載した。

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Kai K, Yoda Y, Kawaguchi A, et al. Formalin fixation on HER-2 and PD-L1 expression in gastric cancer: A pilot analysis using the same surgical specimens with different fixation times. *World J Clin Cases*. 2019;7:419-430. 査読有. doi: 10.12998/wjcc.v7.i4.419.
2. Yamaji K, Kai K, Komukai S, et al. Occult HBV infection status and its impact on surgical outcomes in patients with curative resection for HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2018;7:443-453. 査読有. doi: 10.21037/hbsn.2018.10.01.
3. Kai K, Satake M, Tokunaga O. Gastric adenocarcinoma of fundic gland type with signet-ring cell carcinoma component: A case report and review of the literature. *World J Gastroenterol*. 2018;24:2915-2920. 査読有. doi: 10.3748/wjg.v24.i26.2915.
4. Kai K, Ryu Y, Kamochi K, et al. Synchronous mantle cell lymphoma and lung adenocarcinoma presenting in a pleural effusion: A rare tumour combination and a potential pitfall of cytodiagnosis. *Cytopathology*. 2018;29:400-402. 査読有. doi: 10.1111/cyt.12532.
5. Kai K, Udo K, Yamaguchi K, et al. A dedifferentiated liposarcoma with inflammatory myofibroblastic tumor-like features. *Pathol Int*. 2018;68:262-264. 査読有. doi: 10.1111/pin.12645.
6. Kai K, Komukai S, Koga H, et al. Correlation between smoking habit and surgical outcomes on viral-associated hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2018;24:58-68. 査読有. doi: 10.3748/wjg.v24.i1.58.
7. Kai K, Minesaki A, Suzuki K, et al. Difficulty in the Cytodiagnosis of Mammary Analogue Secretory Carcinoma: Survey of 109 Cytologists with a Case Originating from a Minor Salivary Gland. *Acta Cytol*. 2017;61:469-476. 査読有. doi: 10.1159/000477390.
8. Koga H, Kai K, Aishima S, et al. Occult hepatitis B virus infection and surgical outcomes in non-B, non-C patients with curative resection for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2017;9:1286-1295. 査読有. doi: 10.4254/wjh.v9.i35.1286.
9. Kai K, Koga F, Araki N, Shindo T, Eguchi Y, Toda S, Aishima S. Autopsy case of systemic EBV-positive T-cell lymphoma of childhood with marked hepatomegaly in a middle-aged man. *Pathol Int*. 2017;67:431-433. 査読有. doi: 10.1111/pin.12549.
10. Kai K, Koga H, Aishima S, et al. Impact of smoking habit on surgical outcomes in non-B non-C patients with curative resection for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2017;23:1397-1405. 査読有. doi: 10.3748/wjg.v23.i8.1397.
11. Kai K, Masuda M, Aishima S. Inverse correlation between CD8+ inflammatory cells and E-cadherin expression in gallbladder cancer: Tissue microarray and imaging analysis. *World J Clin Cases*. 2017;5:1-8. 査読有. doi: 10.12998/wjcc.v5.i1.1.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 甲斐敬太、CD1a 陽性樹状細胞の腫瘍組織への浸潤は胆嚢癌の術後予後と相関する。第 108 回日本病理学会総会、2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。