

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460412

研究課題名(和文) 予後予測因子としての癌免疫微小環境の意義

研究課題名(英文) Prognostic significance of immune microenvironment in cancer.

## 研究代表者

森川 鉄平 (Morikawa, Teppei)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80451772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：尿路上皮癌(腎盂尿管癌、膀胱癌)および胃癌組織内における免疫微小環境の状態と予後との相関を検討した。腎盂尿管癌および膀胱癌では、CD204陽性腫瘍関連マクロファージの浸潤が多い症例が有意に予後不良であった。さらに、膀胱癌におけるCD204/CD8比はより強力な予後予測因子であった。胃癌でも、CD204陽性腫瘍関連マクロファージの浸潤が多い症例が有意に予後不良であった。以上、複数の癌種において、免疫微小環境の状態、特にCD204陽性細胞密度が予後不良因子となりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We examined the association between immune-microenvironment status and prognosis in upper and lower tract urothelial carcinoma and gastric carcinoma. In upper and lower tract urothelial carcinoma, high-infiltration of CD204-positive tumor-associated macrophages was significantly correlated with poorer patient outcome. In addition, CD204/CD8 ratio was a strong prognostic factor in bladder cancer. High-infiltration of CD204-positive macrophages was also significantly correlated with poorer patient outcome in gastric carcinoma. In conclusion, we have found that immune-microenvironment status, especially the density of CD204-positive macrophages, may serve as a useful prognostic factor in multiple types of cancer.

研究分野：人体病理学

キーワード：癌免疫微小環境 免疫組織化学 画像解析 生存解析

## 1. 研究開始当初の背景

癌患者の予後を予測する分子マーカーとしては、従来癌細胞の分子異常（遺伝子突然変異、DNA メチル化や遺伝子発現、タンパク発現の異常等）が用いられてきた。しかし、癌組織は癌細胞のみならず間質細胞、炎症細胞、血管内皮細胞など様々な種類の細胞から成り立っており、癌細胞以外の細胞も癌患者の予後に影響を及ぼす可能性がある。近年、癌組織におけるリンパ球やマクロファージの浸潤パターン、すなわち免疫微小環境が有用な予後予測マーカーとなりうることが報告されている。しかし、それぞれの癌種において、どのような免疫細胞の浸潤がどのように患者の予後に影響を与えるかについては十分に解明されているとは言い難い。

## 2. 研究の目的

確立された予後予測分子マーカーが存在しない尿路上皮癌（腎盂尿管癌および膀胱癌）および胃癌における免疫微小環境の状態を解析し、新たな予後予測因子となりうるかどうか検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 症例

東京大学医学部附属病院で手術を施行された以下の癌を対象とした。1. 腎尿管全摘が施行された腎盂尿管癌 171 例。2. 膀胱全摘が施行された膀胱癌 72 例。3. 胃切除が施行された胃癌 119 例および EB ウイルス関連胃癌 77 例。

### (2) 組織マイクロアレイの作成

多数症例に対して同一条件で免疫組織化学

的染色を行うため、組織マイクロアレイを作成した。各症例の腫瘍部から 2 か所、直径 2mm のコアを打ち抜き、新たなパラフィンブロックを作成した。腎盂尿管癌については、腫瘍中心部と浸潤先進部からそれぞれ 1 か所を打ち抜いた。EB ウイルス関連胃癌については、腫瘍全体を評価するため組織マイクロアレイは作成せず、full section を用いた。

### (3) 免疫組織化学的染色

作成した組織マイクロアレイのブロックから 4 μm 厚の切片を作成し、免疫染色を行った。一次抗体として、リンパ球表面マーカーである CD3, CD8, CD20, CD45RO、腫瘍関連マクロファージのマーカーである CD204、好中球のマーカーである CD66b、さらに癌精巢抗原である MAGE-A に対する各モノクローナル抗体を用いた。免疫組織化学染色は自動免疫染色装置 (Ventana, Benchmark) を用いて行った。

### (4) 画像解析ソフトによる定量的解析および統計解析

免疫染色標本をバーチャルスライドスキャナを用いてデジタルデータとして取り込み、各マーカーの陽性細胞の密度を画像解析ソフト (Definiens, Tissue Studio) を用いて定量的に測定した。MAGE-A については、染色強度を 2 人の病理医が判定した。各マーカーの陽性細胞の密度と臨床病理学的因子および術後の予後との相関を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 腎盂尿管癌

免疫細胞の各マーカーにつき、陽性細胞密度の中央値で 2 群に分け、生存解析を行った。その結果、CD3, CD8, CD20, CD45RO については腎尿管全摘術後の膀胱内再発、転移再

発、癌特異的死亡との間に有意な相関は認められなかった。一方、CD204 陽性細胞の密度が高い症例群は、早期の術後転移再発および癌特異的死亡と有意に関連していた（いずれも log-rank  $P < 0.001$ ）。癌の進行度やその他の臨床病理学的因子で調整を行った多変量解析でも、CD204 陽性細胞の密度が高い症例群は早期の術後転移再発と有意に関連していた。CD204 陽性細胞密度と膀胱再発までの期間に有意な関連は認めなかった。

MAGE-A の発現は 171 例中 82 症例（48%）で認められた。MAGE-A の発現は、組織学的高異型度、上皮内癌の並存、高い Ki-67 標識率と有意に関連していた。また、MAGE-A の発現は CD3, CD8, CD45RO 陽性の T リンパ球の密度と正に相関していたが、CD20 陽性 B リンパ球の密度との相関は認められなかった。MAGE-A 陽性例は有意に術後転移再発までの期間が短く、多変量解析でも独立した予後不良因子であった。さらに、原発巣で MAGE-A を発現していた症例では、化学療法抵抗性の遠隔転移巣でも MAGE-A を発現していた。

### （2）膀胱癌

CD8、CD204 陽性細胞の密度および CD204/CD8 比につき、中央値で症例を 2 群に分け、癌特異的生存期間との相関を検討した。CD8 陽性細胞密度が高い群は癌特異的生存期間が長かった[多変量ハザード比(HR), 0.39; 95%信頼区間(CI), 0.19-0.78]。それに対し、CD204 陽性細胞密度が高い群は癌特異的生存期間が短かった(多変量 HR, 1.91; 95% CI, 0.91-4.01)。CD204/CD8 比はより強力な予後予測因子であった(多変量 HR, 3.58; 95% CI, 1.68-7.65)。

### （3）胃癌

胃癌組織マイクロアレイの解析では、多変量解析で EB ウイルス関連胃癌、65 歳以上、脈

管侵襲陽性で有意に CD204 陽性細胞密度が高かった。生存解析では、CD204 陽性細胞密度が高い群は癌特異的生存期間が短かった。EB ウイルス関連胃癌は胃癌の 5-10%程度を占め、腫瘍内に豊富なリンパ球浸潤を伴うのが特徴的であるが、好中球浸潤の臨床病理学的意義は知られてない。そこで、好中球のマーカーである CD66b の免疫染色を行い、臨床病理学的因子および予後との相関を検討した。CD66b 陽性好中球の多い症例は、腸型胃癌で多く、リンパ節転移が少なかった。CD66b 陽性細胞密度は癌特異的生存期間との有意な相関はなかったが、多変量解析にて、リンパ節転移と有意に逆相関していた。特に、粘膜下層浸潤癌で好中球浸潤の多い症例では、リンパ節転移をきたした症例は 1 例もなかった。

## 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 5 件)

Abe H, Morikawa T, Saito R, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M. In Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma a high density of CD66b-positive tumor-associated neutrophils is associated with intestinal-type histology and low frequency of lymph node metastasis. *Virchows Arch.* 2016 May;468(5):539-48.

Makise N, Morikawa T, Nakagawa T, Ichimura T, Kawai T, Matsushita H, Kakimi K, Kume H, Homma Y, Fukayama M. MAGE-A Expression, Immune Microenvironment and

Prognosis in Upper Urinary Tract Carcinoma. Hum Pathol. 2016 Apr;50:62-9.

Makise N, Morikawa T, Kawai T, Nakagawa T, Kume H, Homma Y, Fukayama M. Squamous differentiation and prognosis in upper urinary tract urothelial carcinoma. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Jun 1;8(6):7203-9.

Ichimura T, Morikawa T, Kawai T, Nakagawa T, Matsushita H, Kakimi K, Kume H, Ishikawa S, Homma Y, Fukayama M. Prognostic significance of CD204-positive macrophages in upper urinary tract cancer. Ann Surg Oncol. 2014 Jun;21(6):2105-12.

Hayashi A, Morikawa T, Kawai T, Kume H, Ishikawa S, Homma Y, Fukayama M. Clinicopathological and prognostic significance of EZH2 expression in upper urinary tract carcinoma. Virchows Arch. 2014 Apr;464(4):463-71.

〔学会発表〕(計5件)

Abe H, Morikawa T, Saito R, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M. CD66b-Positive Tumor-Associated Neutrophils in Epstein-Barr Virus Associated Gastric Carcinoma: A Comparative Study with CD8-Positive Cytotoxic T-Lymphocytes. United States and Canadian Academy of Pathology, 105th Annual Meeting. 2016/3/12-18, Seattle, USA.

阿部 浩幸, 森川 鉄平, 西東 瑠璃, 深山 正久. EBV 関連胃癌における好中球浸潤は組織型、深達度、及びリンパ節転移と相関する. 第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日、名古屋

Morikawa T, Makise N, Ichimura T, Fukayama M. MAGE-A Expression, Immune Microenvironment and Prognosis in Upper Urinary Tract Carcinoma. United States and Canadian Academy of Pathology, 104th Annual Meeting. 2015/3/21-27, Boston, USA.

森川 鉄平, 市村 崇, 川合 剛人, 中川 徹, 松下 博和, 垣見 和宏, 久米 春喜, 本間 之夫, 深山 正久. 浸潤性膀胱癌における CD8 および CD204 陽性細胞密度と予後. 第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 26-28 日、広島

市村 崇, 阿部 浩幸, 森川 鉄平, 牛久 哲男, 山下 裕玄, 石川 俊平, 瀬戸 泰之, 深山 正久. 胃癌における CD204 陽性細胞密度と予後. 第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 26-28 日、広島

〔図書〕(計1件)

森川 鉄平, 深山 正久. 文光堂、病理と臨床 32 巻臨時増刊号、【免疫組織化学診断と治療選択の指針】定量的計測法(解説/特集)、2014、32-38

〔その他〕

ホームページ

<http://pathol.umin.ac.jp/index.shtml>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

森川 鉄平 (MORIKAWA TEPPEI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80451772

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし