

## 学位論文題名

CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells Cooperate to Improve Prognosis of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

(CD4<sup>+</sup>T細胞とCD8<sup>+</sup>T細胞の協調作用により  
食道扁平上皮癌患者における予後は改善される)

## 学位論文内容の要旨

## 背景および目的

食道扁平上皮癌の診断および治療は近年発展してきたものの生存率は満足のゆくものではなく、新しい臨床的予後因子の解析および補助療法の研究が必要である。Tumor infiltrating lymphocyte(TIL)は癌細胞に対する宿主免疫応答の兆候と考えられており、様々なタイプの癌腫で研究され予後因子として注目されているが、中でも CD8<sup>+</sup>T細胞は抗腫瘍免疫応答において重要な位置を占めている。また CD4<sup>+</sup>T細胞は、近年、抗腫瘍免疫応答の開始および維持に中心的な役割を果たしており、nest 内への浸潤の程度が予後予測因子となり得ることが報告されている。しかしこれらにつき臨床検体を用いた免疫染色による解析はこれまでのところほとんど行われていないのが現状である。

もとより腫瘍免疫応答は、CD8<sup>+</sup>T細胞のような腫瘍特異的 TILs によってのみ成立するのではなく、腫瘍非特異的 TILs も関連しているものと思われるが、最近になって、大腸癌、胃癌、肺癌患者においてはNK細胞が腫瘍へ浸潤したものの予後は良いと報告された。しかしながら、食道扁平上皮癌患者についての検索はいまだ行われておらず今回、我々は食道扁平上皮癌患者における、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、NK細胞の個々の役割および協調作用を明確にするために本研究を行った。

## 対象および方法

1989年から1999年に北海道大学腫瘍外科および関連2施設において切除術が施行された原発性食道扁平上皮癌症例122例を対象とした。切除された食道癌における最深部切片において、各々抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD57抗体(Leu7)を一次抗体とし、ビオチン化2次抗体、DABを用いて免疫染色を行った。nest内またはその周囲のstromaにおいて光学顕微鏡下200倍で10視野以上観察し、リンパ球のもっとも豊富な部位を5視野選択し、染色細胞の個数をカウントした。個数の多い順にほぼ同数となるようthe most abundant (n=31), abundant (n=30), moderate (n=31), scanty (n=30)の4群に分類した。次に、stromaにおけるCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞において個数の多い61例を各々CD4(+), CD8(+), 個数の少ない61例を各々CD4(-), CD8(-)と定義し、CD4(+)+CD8(+)+をCD4/8(+/+), 同様にCD4/8(+/-), CD4/8(-/+), CD4/8(-/-)と再分類した。カイ2乗検定を適宜用いた。生存率はKaplan-Meier法を用いて算出し、Log rank法にて比較検討した。相関係数をrとし|r| ≥ 0.7を強相関

とした。さらに Cox 比例ハザードモデルを用い CD4/8 (+/+)が予後におよぼす影響を検討した。

### 結果

CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、NK 細胞は癌腫の nest 内またはその周囲の stroma に存在した。CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞において nest 内および stroma の双方で個数の多い群ほど予後良好であった。しかしながら、NK 細胞においては予後との関連は認められなかった。次に個々の症例における nest 内のリンパ球の個数と stroma に存在するそれとの相関について検討したところ、CD8<sup>+</sup>T細胞においては、強い相関が認められた ( $r = 0.790$  ;  $p < 0.0001$ )が、CD4<sup>+</sup>T細胞( $r = 0.417$  ;  $p < 0.0001$ )とNK 細胞( $r = 0.405$  ;  $p < 0.0001$ )については相関が認められなかった。CD4/8 (+/+), CD4/8 (+/-), CD4/8 (-/+), CD4/8 (-/-)は各々n=44, 17, 17, 44 であり、CD4/8 (+/+)は他の群に比較して有意に予後良好であった( $P=0.0012$ )。同様の検討を stageIII、IV に限って(各々n=14, 6,8,20)行ったところ、やはり CD4/8 (+/+)は他の3群に比較して有意に予後良好であり( $P=0.0088$ )、CD4/8 (+/-), CD4/8 (-/+), CD4/8 (-/-)の3群では3年生存率0%に対し、CD4/8 (+/+)群の3年生存率は60.6%であった。CD4/8 (+/+)群と各臨床病理学的因子との間に性別( $P=0.0352$ )を除いて相関はみられなかった。また Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析においては、T分類(hazard ratio, 2.390 ;  $P=0.0213$ )、N分類(hazard ratio, 4.585 ;  $P=0.0015$ )とともにCD4/8が独立予後規定因子となった(hazard ratio, 0.245 ;  $P=0.0002$ )。

### 考察

腫瘍の nest へ浸潤している CD8<sup>+</sup>T細胞は腫瘍免疫に重要な働きをしていることは報告されていたが、今回の検討で stroma における CD8<sup>+</sup>T細胞の浸潤も同様に予後を良好にしていることが明かとなった。また nest と stroma での CD8<sup>+</sup>T細胞の個数には相関があり、腫瘍を直接攻撃する際、stroma に CD8<sup>+</sup>T細胞が集まり、ついで nest 内へ浸潤していくことが示唆された。一方でCD4<sup>+</sup>T細胞はサイトカインを分泌したり、エフェクター細胞を活性化して腫瘍を間接的に攻撃すると言われており、本検討では stroma に CD4<sup>+</sup>T細胞が豊富な群ほど予後が良くこれらの事実を後押しする結果であった。またCD4<sup>+</sup>T細胞はCD8<sup>+</sup>T細胞の反応の惹起、エフェクター機能の維持、成長、増殖に必要不可欠との報告があり、本検討ではヒト食道扁平上皮癌症例においても同様に CD4<sup>+</sup>T細胞と CD8<sup>+</sup>T細胞が協調作用していることが示唆された。CD4/8 (+/+)はその他の群に比べて明らかに予後が良く、これは stageIII,IV に限ってみても同様であった。一方、TNM 各因子との相関はなく、また多変量解析で独立予後規定因子であった。これらの事実より、CD4/8 (+/+)の症例は、術後の全身的な微少転移が抑制されている可能性が考えられる。NK 細胞は過去の報告とは異なり本検討では予後への影響はなかった。実際には非特異的抗腫瘍免疫のエフェクター細胞として働いている可能性はあるが、CD4<sup>+</sup>T細胞や CD8<sup>+</sup>T細胞に比べて個数が少なく、予後に影響するほどの効果がないものと思われた。これらから食道扁平上皮癌患者における腫瘍免疫の担い手はNK 細胞よりはむしろCD4<sup>+</sup>T細胞と CD8<sup>+</sup>T細胞であると考えられ、これらの協調作用により明らかに予後が改善された。以上の結果を踏まえて CD4<sup>+</sup>T細胞とCD8<sup>+</sup>T細胞を組み合わせた癌免疫療法が食道癌の治療に効果的であることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

## CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells Cooperate to Improve Prognosis of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

(CD4<sup>+</sup> T細胞とCD8<sup>+</sup> T細胞の協調作用により  
食道扁平上皮癌患者における予後は改善される)

腫瘍免疫の分野において CD8<sup>+</sup>T細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞は抗原提示細胞を介して腫瘍を特異的に認識し、直接的または間接的に攻撃するとされているが、近年になって CD8<sup>+</sup>T細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞の相互作用が重要であると報告された。一方 NK cell は非特異的に腫瘍を攻撃する免疫担当細胞として様々な研究がされている。しかしながらこれらの研究は、*in vitro* や mice における研究成績であり、実際にヒトにおいて同様の現象が認められるか否かはいまだ明らかにされていない。本研究は、食道扁平上皮癌患者における CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、NK細胞の個々の役割および協調作用を明確にすることを目的とした。

対象は、1989年から1999年に切除術が施行された原発性食道扁平上皮癌症例122例である。いずれの症例も術前に遠隔転移は認められず、術前治療歴はなかった。検討の方法は免疫染色法を用いた。切除された食道癌における最深部切片において、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD57抗体(Leu7)を一次抗体とし、ビオチン化2次抗体、DABを用いて免疫染色を行った。nest内またはその周囲のstromaにおいて光学顕微鏡下200倍で10視野以上観察し、リンパ球のもっとも豊富な部位を5視野選択し、染色細胞の個数をカウントした。個数の多い順にほぼ同数となるよう the most abundant (n=31), abundant (n=30), moderate (n=31), scanty (n=30)の4群に分類した。次に、stromaにおけるCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞において個数の中央値で2群に分け、これをもとにCD4/8(+/+), CD4/8(+/-), CD4/8(-/+), CD4/8(-/-)に再分類した。統計学的解析はカイ2乗検定を適宜使い、生存率はKaplan-Meier法を用いて算出し、Log rank法にて比較検討した。相関係数rは|r| ≥ 0.7を強相関とした。さらにCox比例ハザードモデルを用いCD4/8(+/+)が予後におよぼす影響を検討した。P<0.05にて有意差ありと判定した。

CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、NK細胞は癌腫の nest 内またはその周囲の stroma に存在した。CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞において nest 内および stroma の双方で個数の多い群ほど予後良好であったが、NK細胞においては予後との関連は認められなかった。次に個々の症例における nest 内のリンパ球の個数と stroma に存在するそれとの相関について検討したところ、CD8<sup>+</sup>T細胞においては、強相関が認められた ( $r = 0.790$ ;  $p < 0.0001$ )。CD4/8 (+/+) は他の群に比較して有意に予後良好であった ( $P = 0.0012$ )。同様の検討を stage III、IV に限って (各々  $n = 14, 6, 8, 20$ ) 行ったところ、やはり CD4/8 (+/+) は他の 3 群に比較して有意に予後良好であり ( $P = 0.0088$ )、他の 3 群では 3 年生存率 0% に対し、CD4/8 (+/+) 群の 3 年生存率は 60.6% であった。CD4/8 (+/+) 群と各病理学的因子との間に相関はみられなかった。また Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析においては、T 分類 (hazard ratio, 2.390;  $P = 0.0213$ )、N 分類 (hazard ratio, 4.585;  $P = 0.0015$ ) とともに CD4/8 が独立予後規定因子となった (hazard ratio, 0.245;  $P = 0.0002$ )。

stroma における CD4<sup>+</sup>T細胞の個数が多いほど予後良好な結果であり、CD8<sup>+</sup>T細胞についても同様であり、さらに CD4/8 (+/+) はその他の群に比べて明らかに予後が良いことより、*in vitro*, mice で確認されていたように、ヒト癌でも同様の現象がおきていることが示された。また活性化した CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞を用いた免疫療法が有効な治療法となりうることが示唆された。TNM 各因子との相関はなく、また多変量解析で独立予後規定因子であったことより、CD4/8 (+/+) の症例は、術後の全身的な微少転移が抑制されている可能性が考えられた。NK細胞は過去の報告とは異なり本検討では予後への影響はなかった。実際には非特異的抗腫瘍免疫のエフェクター細胞として働いている可能性はあるが、CD4<sup>+</sup>T細胞や CD8<sup>+</sup>T細胞に比べて個数が少なく、予後に影響するほどの効果がないものと思われた。

口頭発表において、秋田教授より CD8<sup>+</sup>T細胞が本当に CTL 活性を持った細胞かどうかの検討を行っているか、CD4/8 (+/+) 群に細胞生物学的特徴があったか、また Apoptosis に対する検討がされているか、具体的に免疫療法はどのような方法を考えているのかとの質問があった。加藤教授より術後の adjuvant therapy の有無により data が修飾されていないかについて検討されているか、CD4/8 (+/+) 群が免疫細胞により術後の micrometastasis を抑制しているとの speculation はどのような根拠から言えるのかとの質問があった。最後に、吉木教授より免疫療法を臨床応用可能にする方策についての質問があった。これらに対して申請者はおおむね妥当な回答をした。

食道扁平上皮癌患者における CD4<sup>+</sup>T細胞と CD8<sup>+</sup>T細胞の協調作用により予後が改善されることを明らかにした本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、本論文は博士 (医学) の学位授与に値するものと判定した。