

学位論文題名

CD8⁺ TILs together with CD4⁺ TILs and dendritic cells improve prognosis for patients with pancreatic adenocarcinoma

(CD8⁺ TILはCD4⁺ TILとdendritic cellと共に
膵癌患者の予後を改善する)

学位論文内容の要旨

背景と目的

膵癌は難治性癌の一つとして知られており、外科的切除が根治の望める唯一の治療手段であるが、根治的手術を施行しえた症例でも5年生存率は10%程度にとどまっている。最近、癌患者の予後における腫瘍免疫の役割が重用視され、大腸癌などでは予後決定因子としてCD8陽性Tumor infiltrating lymphocyte(TIL)の存在がきわめて重要であることが示されている。また近年CD4陽性T cellは腫瘍免疫において中心的、統率的な役割を果たしていることが明らかになりつつある。一方、Dendritic cellsは抗原提示細胞として腫瘍免疫反応の初期に作用し、CD4陽性T cellはこのような抗原提示細胞からMHC classIIを介して抗原認識を行うと考えられている。今回我々は免疫組織学的手法を用いて膵癌の予後につき臨床病理学的因子との相関、CD4、CD8陽性TILの関係、またDendritic cellsの存在との関係を明らかにする事を目的とし、検討を加えた。

方法

1992年から1999年に手術された膵癌切除症例80例を対照とした。術前に遠隔転移のあった症例、cystadenocarcinoma、ムチン産生腫瘍は本検討から除外された。年齢は31才から83才(平均年齢62.0才)であった。切除された膵癌組織に存在する免疫胆嚢細胞を調べるため、抗CD4抗体、抗CD8抗体、dendritic cellのマーカーである抗S100抗体を一次抗体とし、HRP標識二次抗体およびSABを用いて免疫染色した。染色された各標本に対しリンパ球が癌組織に最も浸潤している部位を5箇所選択し、400倍視野におけるリンパ球の個数の平均値を評価の対象とした。CD4については20以上をCD4(+), CD8については100以上をCD8(+)と判定した。更にそれぞれを組み合わせるCD4/8(+/+), CD4/8(+/-), CD4/8(-/+), CD4/8(-/-)の4群にグループ分けし、膵癌症例80例における病理学的因子との相関を比較検討した。次にこれらの4群の生存率をKaplan-Meier法を用いて算出し、Log-rank testにて比較検討した。さらに単・多変量解析をもちいて、CD4/8(+/+)が予後に

およぼす影響を検討した。CD4/8(+/+)と dendritic cell の関係を調べるため同様の方法で癌組織中の dendritic cell の個数を数え、Mann-Whitney 検定をもちいて検討した。

結果

- 1) 発現頻度:CD4(+)は 47 例(58.8%)、CD4(-)は 33 例(41.3%)、CD8(+)は 16 例(20.0%)、CD8(-)は 64 例(80.0%)であり、腫瘍浸潤リンパ球個数の平均値は CD4(+)で 87.6、CD4(-)で 1.9、CD8(+)で 148.4、CD8(-)で 45.3 であった。Kaplan-Meier 法による生存曲線では CD8(+)は 5 年生存率で 42.2%と CD8(-)の 7.0%に対し有意に予後良好であった(log-rank test $P=0.0228$)が、CD4 に関しては有意差を認めなかった。次に CD4 と CD8 を組み合わせて CD4/8(+/+)、CD4/8(+/-)、CD4/8(-/+), CD4/8(-/-)の 4 つの群に分けたところ 5 年生存率でそれぞれ 48.4%、10.1%、0%、4.6%であり、CD4/8(+/+)のみが非常に予後良好であった。CD4/8(+/+)以外の 3 つの群を合わせた 5 年生存率は 6.8%であり、CD4/8(+/+)とそれ以外の 2 群に分け検討を行ったところ $P=0.0098$ (log-rank test)と有意に予後良好であった。
- 2) CD4/8(+/+)と病理学的因子との関連: χ^2 検定により CD4/8(+/+)と各臨床病理学的因子との関連を調べたところ、腫瘍深達度($P=0.013$)、stage($P=0.009$)との間で有意な逆相関が認められた。
- 3) 予後との関連: 単変量解析を行ったところ CD4/8(+/+)は予後良好因子であり、リンパ節転移、腫瘍径、surgical margin と共に有意な予後規定因子であった($P=0.0136$)。さらに多変量解析にて CD4/8(+/+)の危険率は 0.380 ($p=0.0305$, 95%信頼区間 0.158-0.913)であり、独立予後因子であった。
- 4) Dendritic cell との関連: 腫瘍に浸潤している dendritic cell の個数は CD4/8(+/+)とその他の群で比較したところ 23.8 対 9.9 と CD4/8(+/+)で多く、Mann-Whitney 検定にて有意差を認めた($P=0.0069$)。

考察

当初、CD4 陽性 TIL と CD8 陽性 TIL の予後に与える影響を調べたが、CD4(+)は有意な予後規定因子ではなく、CD8(+)は有意な予後規定因子ではあったが多変量解析の結果、独立予後規定因子ではなかった。そこで CD4/8(+/+)、CD4/8(+/-)、CD4/8(-/+), CD4/8(-/-)の 4 群に分けたところ CD4/8(+/+)のみが他の 3 群と比較して有意に予後が良く、かつ独立予後規定因子であった。このことから膀胱癌における腫瘍免疫において CD4 陽性 TIL が CD8 陽性 TIL と共に存在する事が極めて重要であると考えられた。なお最初の検討において CD8(+)の予後が有意に良かったのは CD4/8(+/+)が多く含まれていたためと考えられた。病理組織学的因子との相関において CD4/8(+/+)が腫瘍深達度、stage と逆相関したことから、腫瘍免疫が膀胱癌の進展を妨げていることが示唆された。更に腫瘍に浸潤している dendritic cell の個数を調べたところ、CD4/8(+/+) では他の群と比較して有意に多いことが示された。これらのことから CD4/8(+/+)の症例では抗原提示細胞による抗原認識から cytotoxic T cell に

よる腫瘍細胞攻撃までの一連の腫瘍免疫が協調的に働いていると推察された。以上のことから検体の CD4 陽性 TIL および CD8 陽性 TIL を調べることにより膵癌手術症例の予後をより正確に予測する事が可能となり適正手術の選択に重要な示唆が与えられた。また CD4 陽性 T リンパ球と CD8 陽性 T リンパ球を同時に活性化する新たな治療法の開発により膵癌患者の予後を改善できる可能性が示された。

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

CD8⁺ TILs together with CD4⁺ TILs and dendritic cells improve prognosis for patients with pancreatic adenocarcinoma

(CD8⁺ TILはCD4⁺ TILと dendritic cellと共に
膵癌患者の予後を改善する)

膵癌は難治性癌の一つとして知られており、根治手術を施行しえた症例でも5年生存率は10%程度である。最近、癌患者の予後における腫瘍免疫の役割が重用視されて来ているが今回、申請者は膵癌の予後、臨床病理学的因子とCD4、CD8陽性TILの関係、またDendritic cellsの存在との関係を明らかにする事を目的とし、免疫組織学的手法を用いて検討した。

対照は1992年から1999年に手術された膵癌切除症例80例で、年齢は31才から83才(平均年齢62.0才)であり、男女比は45:35であった。切除された膵癌組織に存在する免疫担当細胞を調べるため、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗S100抗体を一次抗体として免疫染色した。リンパ球が癌組織に最も浸潤している部位を5箇所選択し、400倍視野におけるリンパ球数の平均値を評価の対象とした。CD4については20以上をCD4(+), CD8については100以上をCD8(+)と判定し、更にそれぞれを組み合わせ、CD4/8(+/+), CD4/8(+/-), CD4/8(-/+), CD4/8(-/-)の4群に分け、Kaplan-Meier法及びLog-rank testにて検討した。CD4/8(+/+)と病理学的因子との相関を χ^2 検定にて検討した。さらに単・多変量解析を用いて、CD4/8(+/+)が予後におよぼす影響を検討した。また同様の方法で癌組織中のdendritic cellの個数を数え、CD4/8(+/+)とその他の群との間にはMann-Whitney検定をもちいて検討した。

結果としてCD4(+)は47例(58.8%)、CD4(-)は33例(41.3%)、CD8(+)は16例(20.0%)、CD8(-)は64例(80.0%)であった。Kaplan-Meier法による生存分析ではCD8(+)は5年生存率42.2%とCD8(-)の7.0%に対し有意に予後良好であった(log-rank test $P=0.0228$)

が、CD4 に関しては有意差を認めなかった。次に CD4/8(+/+), CD4/8(+/-), CD4/8(-/+), CD4/8(-/-) の 4 群に分けたところ 5 年生存率でそれぞれ 48.4%、10.1%、0%、4.6% であり、CD4/8(+/) 群は $P=0.0098$ (log-rank test) と有意に予後良好であった。

χ^2 検定により CD4/8(+/) と各臨床病理学的因子との関連を調べたところ、腫瘍深達度 ($P=0.013$)、stage ($P=0.009$) との間で有意な逆相関が認められた。単変量多変量解析にて CD4/8(+/) の危険率は 0.380 ($p=0.0305$, 95%信頼区間 0.158-0.913) であり、予後良好な独立予後規定因子であった。腫瘍に浸潤している dendritic cell の個数を CD4/8(+/) とその他の群で比較したところ 23.8 対 9.9 と CD4/8(+/) で多く、Mann-Whitney 検定にて有意差を認めた ($P=0.0069$)。

以上の結果から膵癌における腫瘍免疫において CD4 陽性 TIL が CD8 陽性 TIL と共に存在する事はきわめて重要であり、CD4/8(+/) の症例では腫瘍免疫が膵癌の進行を妨げ、予後を改善している可能性が示唆された。更に腫瘍に浸潤している dendritic cell は CD4/8(+/) 群で他の群より有意に多く、CD4/8(+/) 群ではリンパ球と抗原提示細胞が協調して働いていると推察された。切除された検体の CD4 陽性 TIL および CD8 陽性 TIL を調べることにより膵癌手術症例の予後予測がより正確に行い得ることが示された。

口頭発表において、秋田教授より TIL の評価方法、threshold の決め方、CD4/8(+/) 群の細胞生物学的特徴、TIL の実際の活動性の評価、膵癌における腫瘍抗原について質問があった。ついで加藤教授より陰性例の解釈の仕方、術前生検を用いた診断の可能性について質問があった。また吉木教授より臨床病理学的因子との相関の解釈および、治療への応用について質問があった。最後に近藤助教授より治療への展望について質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

膵癌における CD4, CD8, 陽性 TIL の臨床病理学的意義を明らかにし、予後の予想、治療への応用の可能性を示唆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。