

## 論文の内容の要旨

論文題目 糖環境が大腸癌に及ぼす影響についての総合的検討

氏名 太田 (吉川) 善子

### 研究の背景と目的

大腸癌、糖尿病の罹患率の上昇に伴い、糖尿病合併大腸癌患者が増加している。その治療戦略の構築のためには、腫瘍学的特徴の把握が必要である。糖尿病と大腸癌の関連を示唆する報告はあるものの、結論には至っていない。また、予後に関しても、術後の短期的な予後を扱ったものが多く、十分な検討がなされてこなかった。そこで、本研究の第1章では、待機的に根治的切除術を施行した大腸癌手術症例を対象に、糖尿病を合併した大腸癌の臨床病理学的特徴および術後の長期的予後について検討し、糖尿病合併大腸癌の腫瘍学的特異性を明らかにすることを目的とした研究を行った。

大腸癌の標準的な治療は、手術と化学療法であり、免疫療法に関しては十分な効果が報告されていない。癌の増殖には、癌の免疫逃避機構が関係しており、T細胞の関与が報告されている。大腸癌においては、ヘルパーT細胞 (Th2) が優勢という報告があるが、仕組みは分かっていない。

癌の増殖には大量の栄養が必要であり、癌細胞は血管新生により局所的な血流を確保している。癌の血管新生は血管内皮増殖因子 (VEGF) や線維芽細胞増殖因子 (FGF) などの血管新生促進因子と thrombospondin-1 (TSP-1) などの血管新生阻害因子のバランスによって制御されており、癌組織の局所的な部分ではしばしば低血糖が認められる。癌の微小環境で分泌される TSP-1 は高血糖で分泌が促進されるという報告もある。癌細胞がそうした飢餓状態にどのような反応をするかについてはオートファジーなどの研究報告があるが、同じ環境に曝されている免疫細胞に関する研究は極めて少ない。そこで、本研究の第2章では、健常者の白血球を用い、糖環境が免疫細胞の増殖能およびサイトカイン産生能に及ぼす影響について検討し、癌の免疫逃避機構の一側面を明らかにすることを目的とした研究を行った。

### 方法・結果

第1章では、2000年1月から2009年12月に当院で待機的に大腸癌の根治的切除術を受けた1216例を対象とした retrospective study を行った。フォローアップ期間の平均値±標準偏差は74±39か月であった。当院の医療記録に残っている全ての血液検査の結果を参考にして、空腹時血糖126mg/dl以上またはHbA1c 6.5%以上または治療歴があるケースを「糖尿病」と判定し、統計解析を行った。糖尿病の有無による臨床病理学的要素の比較には、 $\chi^2$ 乗検定と Student-t 検定を行った。患者の予後は、全生存 (OS) と癌特異生存 (CSS)、無再発生存 (RFS) で比較した。

生存率曲線はカプラン・マイヤー法で作成し、差の検定にはログランク検定を適用した。p 値が 0.05 未満で統計的に有意と判断した。

糖尿病合併大腸癌 416 例 (34%)の臨床病理学的特徴は、非合併例 800 例 (66%) と比べ、有意に高齢で (68 歳 vs. 64 歳,  $p < 0.01$ )、男性の割合が有意に高く (73% vs. 58%,  $p < 0.01$ )、腫瘍径が有意に大きかった (43mm vs. 39mm,  $p = 0.02$ )。糖尿病合併例を血糖コントロール良好群 ( $n = 65$ ) とそうでない群 ( $n = 340$ ) に分け、サブ解析を行ったところ、血糖コントロール良好群では腫瘍径が 38mm であり、コントロール不良群の 44mm に比べて有意に小さかった ( $p = 0.049$ )。糖尿病合併例における死因は、心疾患など大腸癌以外の原因によるものが有意に多かった (42% vs. 24%,  $p = 0.02$ )。

糖尿病の合併の有無による生命予後の違いに関しては、糖尿病合併例で OS が低く ( $p = 0.01$ )、更に病期別で比較すると、Stage 0-I と Stage IV で糖尿病合併例の OS が有意に低かった (各  $p < 0.01$ ,  $p = 0.04$ )。OS に関与する因子について多変量解析を行うと、糖尿病は独立した予後因子であることが分かった。一方、CSS、RFS は、糖尿病合併例と非合併例で有意差を認めなかった。但し、病期別では、Stage II の糖尿病合併例で CSS がよい傾向があり ( $p = 0.07$ )、Stage IV では糖尿病合併例で有意に CSS が不良であり ( $p = 0.049$ )、病期が進むにつれて糖尿病の CSS に対する負の影響が強くなる傾向を認めた。有意差のあった Stage IV 症例において CSS に関与する因子の多変量解析を行ったところ、糖尿病合併は独立した予後因子であることが分かった。

第 2 章では、男性 3 人と女性 2 人、平均年齢 39 歳 (範囲 32-53 歳) の健康な成人から末梢静脈血を採取し、末梢血リンパ球 (PBL) を分離、精製した。得られた PBL を様々な糖濃度 (0, 25, 50, 100, 225, 450 mg/dl) の培養液で懸濁し、抗 CD3 抗体コーティングプレートで 3 日間培養し、MTS 法で細胞増殖能の評価をした。また、450 mg/dl の糖濃度と糖フリーの培養液で 3 日間同様に培養した PBL を細胞内蛋白質輸送阻害薬 monensin を含んだ培養液に移し、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と ionomycin で刺激培養後、細胞表面抗原である CD4 と細胞内抗原である IL-4、IFN- $\gamma$  の免疫染色を行い、フローサイトメトリーで CD4 陽性細胞の IL-4、IFN- $\gamma$  産生能を測定した。

MTS 法による増殖能の実験から、低糖濃度環境の PBL の増殖能は、標準血糖値 100 mg/dl 以上の高糖濃度環境の PBL よりも有意に低いことが分かった ( $p < 0.01$ )。糖濃度が 0, 25, 50 mg/dl の培養液で育てられた PBL の間では増殖能に有意差はなく、糖濃度が 100, 225, 450 mg/dl の PBL の間でも有意差はなかった。

フローサイトメトリーの解析からは、糖フリー環境の CD4 陽性細胞は、高糖濃度環境の細胞に比べ、IL-4 分泌能が有意に高く ( $p = 0.049$ )、IFN- $\gamma$  分泌能が有意に低いことが分かった ( $p < 0.01$ )。

## 考察

糖尿病合併大腸癌の臨床病理学的特徴は、有意に高齢で男性の割合が高く、腫瘍径が大きいということだった。糖尿病合併大腸癌が高齢の男性に多いという結果については、糖尿病が高齢男

性に多いことが主な原因であると考えられる。腫瘍径に関しては、糖尿病のマウスと糖尿病でないマウスに大腸癌を移植したところ、糖尿病マウスの腫瘍は有意に大きく成長したという実験報告がある。糖尿病合併例を対象にしたサブ解析より、糖尿病合併例の中でも血糖コントロール不良例で腫瘍が大きいことが分かった。これは、癌が進行して大きくなると、耐糖能を悪くするという機序に基づくと考えられる。一方でコントロール不良の糖環境が癌の発育を促進するという機序も想定され、今後の検証が必要である。

全症例を対象とした生存率の解析からは、糖尿病合併例で OS が有意に低いという結果が得られた一方で、CSS、RFS に差がなかった。つまり、OS が悪いのは癌死以外の死因によるもので、糖尿病の合併症や併発症の影響と考えられる。糖尿病合併例で、心疾患など大腸癌以外の死因が有意に多かったことも、その推論の裏付けとなる。病期別の検討結果では、Stage 0-I の糖尿病合併例で OS が有意に低かったが、早期癌の症例ではそもそも癌死が非常に少なく、実際 CSS、RFS には糖尿病合併の有無による有意差がなかったことから、糖尿病の合併症や併発症による癌以外の死因が大きく影響したと考えられる。Stage II では、糖尿病による大腸癌以外の死因による影響は Stage 0-I と変わらないとすると OS が低くなることが予想されるが、実際は OS において全く有意差を認めておらず、これは糖尿病合併例の CSS が良好である傾向があったことが影響していると考えられる。糖尿病合併大腸癌は進行度が低い段階では悪性度が低い可能性も考えられるが、今後の検証が必要である。一方で Stage IV 症例では CSS が糖尿病合併例で有意に不良であった。これは二つの可能性を示唆していると考えられる。一つはより進行度の高い段階では糖尿病合併大腸癌はより悪性度が高く、そのために CSS が不良となっている可能性である。もう一つは糖尿病合併による術後の治療の差が影響している可能性である。糖尿病の合併症などにより、積極的な抗癌剤治療ができなかった可能性も考えられる。RFS に差がないことを考慮すると、再発後の病勢あるいは治療に差が出た可能性があるが、Stage IV の再発後は他院に移って治療を継続するケースもあり、そのことが検証を困難にしている要因の一つとなっている。最近、特定の糖尿病治療薬が癌リスクに影響を与えるという報告も出てきた。本研究で対象となった糖尿病合併大腸癌の患者は、糖尿病に関しては術前からのかかりつけ医など近医でフォローされているケースが多い。そのため、術後の血糖コントロールや治療薬といった糖尿病関連の情報で不十分なケースがあり、そこが retrospective study である本研究の限界である。糖尿病合併大腸癌の予後改善のためには、大腸癌再発のみならず、糖尿病とその合併症の治療が重要であり、同時に、大腸癌と糖尿病、両者の相互作用を考慮した研究がなされることにより、糖尿病合併大腸癌の腫瘍学的特徴がより明らかになるものと思われる。

糖環境と PBL の増殖能の実験からは、低糖濃度環境は PBL の増殖を妨げることが分かった。PBL の増殖率は培養液の糖濃度と正比例の関係ではなく、標準血糖値より高い糖濃度環境の PBL と低い糖濃度環境の PBL ではそれぞれ異なる増殖率を示し、標準血糖値が境界となっているように思われた。

糖環境と PBL のサイトカイン産生能の実験からは、健康なドナーの CD4 陽性 PBL において、糖の枯渇が IL-4 の分泌を促進し、IFN- $\gamma$  の分泌を抑制することが分かった。Th2 は IL-4 を分泌

しているので、IL-4 産生細胞の増加は Th2 の増加を示していると推測される。一方、Th1 は IFN- $\gamma$  を分泌しているので、IFN- $\gamma$  産生細胞の減少は Th1 の減少の結果と捉えることができる。即ち、健康なドナーの CD4 陽性 PBL では、糖の枯渇が Th2 優勢をもたらすと考えられる。この結果は、悪性疾患で Th2 優勢を認めるという結果と合致している。癌組織の局所において糖枯渇環境ができることが、悪性疾患の Th2 優勢という現象と関係している可能性がある。Th2 優勢あるいは Th1 劣勢は細胞性免疫が十分に働いていないことを示し、それは癌の増殖に有利に働くと推測される。

癌は増殖の過程において血管新生で栄養補給を試みているが、癌組織の局所においては低血糖を認めている。この局所的な低血糖環境が免疫細胞の機能を妨げ、免疫逃避機構の一要因となっていると考えられた。更なる研究によって癌免疫療法の有効性の向上に寄与できる可能性がある。