

博士論文（要約）

EBV 関連胃癌の微小環境における樹状細胞——腫瘍細胞由来エクソソームとの関連を含めて

日向 宗利

論文の内容の要旨

論文題目 EBV 関連胃癌の微小環境における樹状細胞——腫瘍細胞由来エクソソームとの関連を含めて

氏名 日向宗利

Epstein-Barr ウイルス(EBV)は 184kbp の 2 本鎖 DNA から構成される γ ヘルペスウイルスの 1 つである。EBV は世界の人口の 9 割以上が成人までに感染し、生涯にわたって感染が維持される。EBV は悪性腫瘍の発生と関連があり、EBV 保持者の一部に Burkitt リンパ腫、鼻咽頭癌、Hodgkin リンパ腫、胃癌、免疫不全関連リンパ増殖性疾患をはじめとする腫瘍を形成する。

胃癌は世界における癌関連死の原因の第 3 位を占め、日本人における罹患率が高い。これまで診断および治療の改善のため様々な努力がなされてきたが依然として予後不良な疾患の 1 つである。胃癌の中には EBV のモノクローナルな感染を伴ったものが 10%程度に認められ、EBV 関連胃癌と呼ばれる。EBV 関連胃癌は病理組織学および epigenetics の観点から特異な性質を有し、胃癌における 1 つの特徴的な亜型として認識される。

癌組織には腫瘍細胞の他に炎症細胞、線維芽細胞、血管/リンパ管、細胞外基質といった非腫瘍性の成分が含まれ、腫瘍微小環境を構築している。腫瘍微小環境の構築は様々な細胞種間のクロストークによりなされ、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、炎症性/基質リモデリング酵素などが複雑に関与しているが、近年はこれらに加えて細胞から放出されるエクソソームの重要性も認識されている。エクソソームは、腫瘍細胞を含む様々な細胞から放出される径 40~100nm 程度の小胞であり、RNA、タンパク、脂質、DNA 等が含まれ細胞間の情報伝達に関与するとされる。

EBV 関連胃癌は間質への CD8 陽性 T リンパ球の密な浸潤を伴い、一部は lymphoepithelioma-like carcinoma (LELC) もしくは gastric carcinoma with lymphoid stroma (GCLS) と呼ばれる特徴的な組織像を示すことが知られ、特異な微小環境を有すると考えられる。EBV 関連胃癌では腫瘍組織中に浸潤する樹状細胞の密度が高いとする報告もある。

樹状細胞(Dendritic cells: DC)は強力な抗原提示能を有する細胞であり、免疫系において重要な役割を果たしている。末梢組織中で抗原を貪食、処理した樹状細胞はリンパ組織へ遊走し、B 細胞・T 細胞を刺激することにより免疫反応を引き起こす。樹状細胞は外来抗原に対し攻撃的に働く反応とともに、自己抗原に対する免疫寛容にも関与している。また、樹状細胞には表現型、機能の点で異なる複数のサブセットが存在する。腫瘍組織中においても樹状細胞の浸潤が認められる。腫瘍に浸潤する樹状細胞は通常、腫瘍由来の抗原を貪食

しリンパ節へ遊走後、腫瘍特異的な T リンパ球を活性化することにより腫瘍免疫を惹起すると考えられている。浸潤する樹状細胞の多寡と予後の関連については様々な腫瘍において検討されているが、樹状細胞の浸潤密度の高いものは予後良好であるとする報告と予後不良であるとする報告があり、**controversial** な領域である。

EBV 関連胃癌に浸潤する樹状細胞についても免疫組織化学を用いた検討がなされており、EBV 関連胃癌では浸潤する樹状細胞が EBV 陰性の胃癌と比較して多いとする報告が複数ある。しかし、これらの報告において評価されたサブセットは限られており、臨床病理学的因子との相関についても不明な点が多い。本研究では EBV 関連胃癌の微小環境における樹状細胞の分布および臨床病理学的な意義を明らかにするため、EBV 関連胃癌に浸潤する樹状細胞を複数のマーカーを用いて免疫組織化学的に同定し、臨床病理学的因子との相関を検討した。また、EBV 関連胃癌に浸潤する樹状細胞の動態に腫瘍細胞由来のエクソソームが関与する可能性を考慮し、これを培養細胞を用いて検討した。

1. EBV 関連胃癌における樹状細胞の免疫組織化学的評価

本研究では EBV 関連胃癌に浸潤する樹状細胞を複数のマーカー(Langerin, CD1a, S100, BDCA-2, CD83)を用いて免疫組織化学的に同定し、その分布および臨床病理学的因子との相関を検討した。さらに、腫瘍細胞においてエクソソーム放出量の指標となり得る CD63 の発現を評価することにより、樹状細胞の動態にエクソソームが関与する可能性についても検討した。

その結果、EBV 関連胃癌においてはいずれのマーカーを発現する樹状細胞も EBV 陰性の胃癌と比較して単位面積あたりの浸潤数が多いことが確認された。また、EBV 関連胃癌では CD1a を発現する樹状細胞を除いて浸潤する樹状細胞数とリンパ球数の間に正の相関が認められたことから、EBV 関連胃癌の組織学的特徴である間質のリンパ球浸潤には樹状細胞の多くのサブセットが関与していることが推測された。

臨床病理学的因子との相関については、EBV 関連胃癌において CD83 を発現する成熟した樹状細胞の浸潤数が多いものは予後が良い傾向が見られ、また早期癌症例が有意に多かった。この他、EBV 関連胃癌では BDCA-2 を発現する plasmacytoid DC の性質を有する樹状細胞の浸潤が多い症例で diffuse type, 進行癌症例、静脈侵襲を伴う症例が有意に多かった。

また、EBV 関連胃癌において Langerin, S100, BDCA-2 を発現する樹状細胞は腫瘍細胞のエクソソームマーカー(CD63)高発現例で有意に浸潤数が多く、EBV 関連胃癌においては樹状細胞の浸潤にエクソソームが関与している可能性が示唆された。

2. EBV 感染胃癌細胞に由来するエクソソームの特性および樹状細胞に対する影響の検討

今回、免疫組織化学的な検討の結果から EBV 関連胃癌では EBV 陰性の胃癌と比較して樹状細胞の浸潤数が多く、この現象に腫瘍細胞由来のエクソソームが関与している可能性が示唆された。そこで EBV 感染胃癌細胞に由来するエクソソームの物理化学的および生物

学的特性を多面的に検索し、さらに胃癌細胞株由来エクソソームの存在下で単球から樹状細胞への分化培養を行うことにより、樹状細胞に対するエクソソームの影響を検討した。

その結果、EBV 感染に伴ってエクソソーム中 miR-221 およびエクソソーム中分泌型 Clusterin が増加する可能性が示唆された。樹状細胞の分化培養においては、胃癌細胞株由来のエクソソームを添加したもので maturation marker である CD86 の陽性率が上昇したが、EBV 感染株では CD86 の陽性率の上昇が抑えられた。

本研究では EBV 関連胃癌に浸潤する樹状細胞の分布および臨床病理学的因子との相関をこれまでより多くのサブセットにおいて免疫組織化学的に検討した。EBV 関連胃癌では検討したいずれのサブセットも EBV 陰性の胃癌と比較して単位面積あたりの浸潤数が多く、EBV 関連胃癌は浸潤する樹状細胞の観点からも特徴的な腫瘍であることを再確認した。

EBV 関連胃癌において CD83 を発現する成熟樹状細胞の浸潤数が多い症例では早期癌が多く予後が良い傾向が見られた。これは EBV 陰性の胃癌では確認されなかったため、EBV 関連胃癌に特異的な現象の可能性がある。このような関連を示す機序としては成熟樹状細胞が腫瘍免疫を促進することにより癌の進展が抑制される可能性が考えられるが、腫瘍に浸潤する成熟樹状細胞の意義については controversial である。また成熟樹状細胞の浸潤と予後の因果関係は不明であり、早期癌が抽出された結果を見ている可能性もある。EBV 関連胃癌における成熟樹状細胞の意義については更なる検討を要する。

EBV 関連胃癌において、BDCA-2 を発現する plasmacytoid DC の性質を有する樹状細胞の浸潤数は不良な転帰と関連する因子との相関が認められた。これは EBV 陰性の胃癌と共通する部分が多く、胃癌全体で見られる現象と考えられる。胃癌において plasmacytoid DC の浸潤数と制御性 T 細胞の浸潤数には正の相関があるとする報告があり、EBV 関連胃癌においても制御性 T 細胞を介して腫瘍免疫が抑制される可能性が考えられる。

胃癌由来エクソソームの存在下で単球から樹状細胞への分化培養を行った結果からは、EBV 関連胃癌由来エクソソームが樹状細胞の成熟、活性化を抑制することが示唆された。これは CD63 発現量による各樹状細胞浸潤数の違いとも一貫している。EBV 関連胃癌において腫瘍細胞由来のエクソソームが樹状細胞の成熟、活性化の抑制を介して癌に対する免疫を抑制することを支持する結果である。また、EBV 感染に伴って変化し得るエクソソーム内容物として miR-221 および Clusterin が挙げられた。これらはいずれも樹状細胞の分化・機能や癌の悪性度との関連が指摘されている。

以上の結果は、EBV 関連胃癌の発癌機序の解明や予後の予測、治療ターゲットとしての検討において足掛かりとなることが期待される。