

論文の内容の要旨

論文題目 腫瘍関連マクロファージの臨床病理学的意義と腫瘍浸潤リンパ球の遺伝子解析

氏名 市村 崇

腫瘍に浸潤するマクロファージは腫瘍関連マクロファージ(TAM)、腫瘍に浸潤するリンパ球は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)と呼ばれる。第一部では TAM に注目した。TAM は、がん細胞の増殖を直接的、あるいは間接的に促進する働きがあり、がんの進展に寄与している。TAM は腫瘍抑制性に働く M1 マクロファージおよび腫瘍促進性に働く M2 マクロファージに分類される。TAM の大部分は M2 マクロファージである。M2TAM に特異的な表面マーカーとして知られている CD204 に注目した。これまで、CD204 陽性腫瘍関連マクロファージ(CD204⁺TAM)密度が高いと予後不良であるとする報告は、グリオーマ、卵巣癌、肺線癌、肺扁平上皮癌、膵癌、食道癌などである。第一部では、これまでに報告がない胃癌(EBV 関連胃癌:EBVaGC、EBV 非関連胃癌:EBVnGC)、上部尿路上皮癌(UUTC) について CD204⁺TAM 密度と臨床病理学的因子と生存期間との相関について Tissue microarray(TMA)標本を用いて調べた。第二部では TIL に注目した。TIL については種々の癌種で予後との関連が報告されてきた。近年 TIL の中で B 細胞系リンパ球の報告がされ始め、腫瘍浸潤 B リンパ球 (TIL-B) が予後と相関する事が、卵巣癌、前立腺癌、メラノーマ、膵癌で報告されている。一方、ここ数年、癌免疫療法の臨床試験において、CTLA-4 や PD-1 に対する阻害抗体を用いた第Ⅲ相臨床試験で、良好な結果が報告されている。しかし、著効例と無効例での差が大きく、癌免疫療法の有効性を早期に判断できるバイオマーカーの検索が求められている。その一つとして TIL のレパートリー解析が注目されている。これまで個々のリンパ球の遺伝子解析は技術的に困難であったが、次世代シーケンサーの開発が進み、大幅なコストダウンがされ末梢血中の T 細胞受容体や B 細胞受容体の遺伝子再構成の網羅的解析が可能となってきた。第二部では、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体から抽出した DNA を解析し、TIL-B の免疫グロブリン重鎖 (IgH) の遺伝子再構成を調べる事が技術的に可能かどうか検討した。

第一部では、1990 年～2004 年の間に胃切除を施行した任意の胃癌 119 例と、1996 年～2012 年の間に腎尿管全摘術を施行した上部尿路上皮癌 171 例を対象とした。抗ヒト CD204 マウスモノクローナル抗体(clone SRA-E5, 1:500)を用いて、自動染色装置 Ventana Benchmark[®]XT Autostainer を使用して、免疫組織化学染色を行った。各スライド標本は、20 倍率で NanoZoomer Digital Pathology (NDP) System を用いてデジタル画像として取り込み、画像解析ソフト(Tissue Studio v. 3.5, Definiens AG, Munich, Germany)で解析した。CD204⁺TAM の解析は、各コアの面積に対する CD204⁺TAM の合計面積のパーセンテージの平均値 (CD204⁺TAM の合計面積/各コアの面積×100 の平均値)を用いて求めた。統計解析は SAS software、R version 3.0.2 を用いた。

胃癌 CD204⁺TAM 密度 (2 コアの平均値)の中央値は 0.215% (0.00295%～3.545%) だった。中央値以上の群を CD204-high、中央値未満の群を CD204-low とした。単変量解析では、CD204-high の割合が有意に高い因子は、65 歳以上 ($P=0.008$)、進行癌 ($P<0.0001$)、リンパ管侵襲陽性 ($P=0.03$)、静脈侵襲陽性 ($P<0.001$)、リンパ節転移陽性 ($P<0.001$) であった。また、CD204-high の割合が有意に低い因子は EBVaGC ($P=0.03$) であった。多変量解析では CD204-high の割合が有意に高い因子は、65 歳以上 (オッズ比 3.25, 95%信頼区間 1.23-8.63, $P=0.018$)、進行癌 (オッズ比 10.7, 95%信頼区間 4.17-27.5, $P<0.0001$)、CD204-high の割合が有意に低い因子は EBVaGC (オッズ比 0.3, 95%信頼区間 0.10-0.91, $P=0.034$) であった。119 例で生存解析を行った。観察期間中央値は 2808 日 (85～7215 日)。術後の全死亡をイベントとした全生存期間において、Kaplan-Meier 分析で有意に予後不良だったのは、CD204-high 群 ($P=0.0075$)、男性 ($P=0.039$)、部位 (体上部) ($P<0.001$)、進行癌 ($P<0.0001$)、リンパ管侵襲陽性 ($P<0.0001$)、静脈侵襲陽性 ($P<0.0001$)、リンパ節転移陽性 ($P<0.0001$) であった。多変量解析 (Cox 比例ハザード回帰モデル) では、リンパ節転移陽性 (ハザード比 10.05, 95%信頼区間 3.77-26.8, $P<0.0001$) のみ有意に予後不良であった。術後の癌特異的死亡をイベントとした癌特異的生存期間が Kaplan-Meier 分析で有意に短かったのは、CD204-high 群 ($P=0.0015$)、部位 (体上部) ($P=0.0024$)、進行癌 ($P<0.001$)、リンパ管侵襲陽性 ($P<0.0001$)、静脈侵襲陽性 ($P<0.001$)、リンパ節転移陽性 ($P<0.0001$) であった。多変量解析 (Cox 比例ハザード回帰モデル) では CD204-high 群 (ハザード比 6.30, 95%信頼区間 1.38-28.73, $P=0.018$)、リンパ管侵襲陽性 (ハザード比 6.63, 95%信頼区間 1.44-30.58, $P=0.015$) が有意だった。

上部尿路上皮癌の腫瘍中心部で CD204⁺TAM 密度の中央値は 0.64% (0.03-9.29%)、辺縁部では

0.81%(0.03-12.43%)だった。2か所のCD204⁺TAM密度には強い正の相関があり(スピアマン相関係数 $\rho=0.76$, $P<0.0001$)、2か所で有意な差はなかった($P>0.05$, Wilcoxon signed-rank test)。全症例を中央値で2群に分け、中央値より高い群をCD204-high、低い群をCD204-lowとした。その結果、腫瘍中心部および辺縁部共に、CD204-highの割合が有意に高かったのは非乳頭状構築($P=0.0037$)、高異型度($P<0.0001$)、脈管侵襲($P<0.0001$)、上皮内癌併存($P=0.0046$, $P=0.0002$)、深達度($P<0.0001$)、リンパ節転移($P=0.0017$, $P=0.0081$)であった。腎尿管全摘術を行った時点で膀胱癌を有していなかった140症例において、58症例が膀胱再発、32症例が遠隔転移、23例が腫瘍関連死という結果であった。観察期間中央値は56カ月。Kaplan-Meier分析でCD204-high群は、腫瘍中心部、辺縁部共に、早期の術後転移再発(log-rank $P<0.0001$)および癌特異的死亡(log-rank center $P=0.0002$, periphery $P=0.0003$)と有意に相関していた。しかし、膀胱再発までの期間との有意な関連性は認めなかった。多変量解析(Cox比例ハザード回帰モデル)では、CD204-high群は、早期の術後転移再発と有意に相関していた(center;ハザード比2.52, 95%信頼区間1.02-6.22, $P=0.045$, periphery;ハザード比3.10, 95%信頼区間1.17-8.16, $P=0.022$)。

本研究は、胃癌および上部尿路上皮癌において、CD204と臨床病理学的因子および予後との関連を評価した初めての報告である。画像解析ソフトと目視カウントスコアの相関はBraunらの報告と同様に比較的高い相関を示し、CD204⁺TAMの解析においても画像解析ソフトが目視カウントスコアの強力な代替手段になる事が示された。画像解析ソフトを用いた事で、各症例につきTMAの2コア(6.28mm²)の面積を評価する事ができ、よりバイアスが少ないデータが得られたと考えられる。胃癌において、CD204-high群は癌特異的生存期間が有意に短い事から、CD204⁺TAM密度は、新たな予後不良因子である事が示唆された。上部尿路上皮癌において、CD204-high群は早期の術後転移再発と有意に相関しており、CD204⁺TAM密度は新たな予後不良因子である事が示唆された。

第二部では、2010年~2011年の間に根治的胃切除が行われたリンパ節転移がある症例を任意に3例選択しFFPEからDNAを抽出した。また、UUTCのTMA標本においてCD204-High症例およびCD204-Low症例を任意に各3例選択し、TMAを作成した残りのFFPEからDNAを抽出した。

EBVnGCではDNA抽出量が最も多く、腫瘍割合が最も高いNo.1症例をIgH解析に採用した。またUUTCではDNA抽出量が最も多く、CD204(%)が最も高いNo.4をCD204-high UUTC症例とし、CD204(%)が最も低いNo.7をCD204-low UUTC症例として採用した。No.1から2セット、No.4から3セット、No.7から4セットの検体を独自のプライマーセットを用いてPCR増幅した。No.1 set1およびset2はそれぞれ最終的に約24万、34万塩基をシーケンスする事が出来た。No.1 set1はアミノ酸82種類、set2は23種類のアミノ酸配列からなっており、そのうち上位二つが完全に一致した。No.7 set1およびset2~4混合はそれぞれ最終的に約56万、47万塩基をシーケンスする事が出来た。No.7set1はアミノ酸75種類、set2~4混合はアミノ酸124種類からなっており、10個以上のアミノ酸の一致は7種類に認め、23種類では一致を認めなかった。No.4set1~3およびNo.7set2~4混合はそれぞれ最終的に約49万、47万塩基をシーケンスする事が出来た。No.4set1~3はアミノ酸62種類、No.7set2~4混合はアミノ酸124種類からなっており、10個以上のアミノ酸の一致は11種類に認め、13種類では一致を認めなかった。

No.1set1とset2の解析結果は、増幅されたIgHのV,J領域の分布が、ほぼ一致しており、アミノ酸配列においても上位2種類の完全な配列の一致を認め、同一症例による検体間の再現性が確認された。No.7set1とset2~4混合の解析結果は、増幅されたIgHのV,J領域の分布の一致はわずかであり、使用されているV,Jフレームには相違があった。この原因は、抽出したDNA自体に偏りがある可能性や、シーケンシングする際の増幅されやすさの偏りで特定の部位が増幅されてしまった可能性がある。No.4set1~3混合とNo.7set2~4混合の解析結果は、増幅されたIgHのV,J領域の分布は大部分で一致していた。ところどころに特異的V,J領域の増幅があり、症例間の差異を示している可能性が示唆された。症例内、症例間のばらつきが認められたため、症例数を追加し検討する必要がある。

本研究では、胃癌においてCD204-high群で有意に癌特異的生存期間が短く、CD204⁺TAMは新たな予後因子である可能性が示された。また、尿路上皮癌においてCD204-high群は早期の術後転移再発と有意に相関しており、CD204⁺TAMは新たな予後因子である可能性が示された。今後は、CD204⁺TAM密度による症例の層別化、層別化に基づいた治療選択、さらにはCD204をターゲットとした新規治療薬の開発につながる事が期待される。TIL-Bについては、FFPE検体を用いてIgH遺伝子の網羅的なシーケンシングが可能である事を示した。FFPE検体を用いる利点は、病理学的診断所見と比較可能であり、アーカイブ検体を利用できる点である。これまで免疫療法を行った症例のFFPE検体を用いて、免疫療法の著効例と無効例でのIgHレパートリーの差を比較する事が技術的に可能となれば、免疫療法前後の変化が免疫療法の有望なバイオマーカーとなる可能性がある。