80　難治性消化器癌に対する選択的癌免疫治療法の開発	庄　雅之

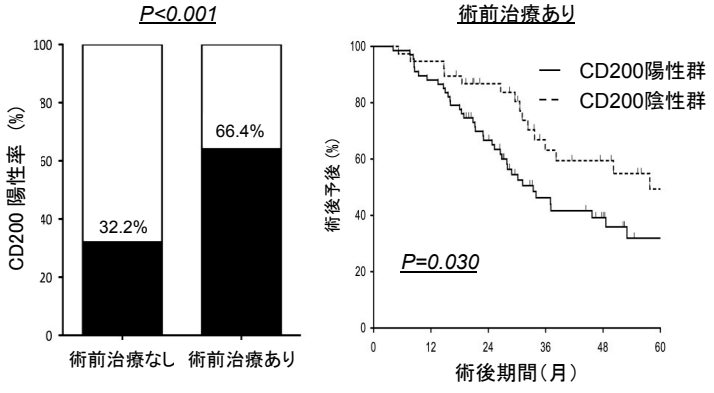
【目的】新規化学療法等の癌治療の進歩により、消化器癌においても予後の向上が認められるが、今なお切除不能例や進行例がみられ、それらの予後は不良である。特に、膵癌に代表される難治性消化器癌は、根治術後であっても転移および再発の頻度が高く、再発後の治療は困難である。したがって、さらなる予後向上のためには、新たな観点からの癌治療法開発が必須である。本研究では、これまで独自に蓄積してきた一連の研究成果と、最新の免疫・癌研究の報告を融合・発展させ、特に膵癌における CD200 発現および大腸癌肝転移における HVEM 発現について検討を行った。

【方法】1. 20 例の膵癌切除症例を用いて、腫瘍細胞の CD200 発現を免疫組織染色にて臨床的意義を検討した。また、腫瘍内浸潤 T 細胞（TIL）についても同様に免疫組織染色にて検討した。さらに、ヒト膵癌株 PANC-1 および Capan-2 を用いて、CD200 の他に、CD44、CD24、EpCAM の発現について、各細胞株に 10 Gy の放射線照射を行い、照射前後に細胞表面マーカーを検討して、膵癌幹細胞との関連を検討した。大腸癌肝転移に肝切除を行った 104 例を対象とした。ヒト HVEM 特異抗体にて免疫染色を行った。HVEM 高発現群と低発現群に分類し臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。また TIL についても同様に検討し、臨床的意義を検討した。

【結果】1. 膵癌における CD200 発現は、手術先行例（術前治療非施行例）では予後との明らかな関連は認めなかった。一方、術前化学放射線治療施行例では非施行例に比して、有意に CD200 発現が高く、また CD200 発現陽性群の予後は陰性群に比して有意に不良であった（P＝0.030）（図）。また多変量解析の結果、CD200 発現は独立予後不良因子であることが明らかとなった（HR 2.51；95% CI 1.35～4.66；P＝0.004）。また、CD4、CD8、CD45RO 陽性 TIL は、CD200 陽性群で、陰性群に比して、いずれも有意に少なかった。さらに *in vitro* での検討の結果、ヒト膵癌株の放射線照射によって、CD200 発現が誘導され、さらには CD44／CD24／ESA 等との関連も認められた。以上より、最難治癌といわれる膵癌において、CD200 は宿主免疫回避機構に影響し。さらには放射線治療等による治療抵抗性に関わっていることが示唆された。したがって、新たな膵癌治療におけるバイオマーカーとなるとともに、治療標的分子としても有用である可能性が示された。

2. 大腸癌肝転移において、HVEM 高発現群 49 例（47.5%）、低発現群 55 例（52.5%）の 2 群に分類して以下の検討を行った。背景因子として、両群間に年齢、性別、同時性転移、異時性転移、化学療法の有無、腫瘍径、T 因子、N 因子において両群間に差は認められなかった。予後との関連は、無再発生存期間は高発現群で低い傾向（P＝0.106）であり、全生存期間では高発現群で有意に予後不良であった（P＝0.002）。また多変量解析では、年齢、腫瘍個数とならんで、HVEM 発現は独立予後不良因子であった（HR＝3.35、P＝0.006）。また、TIL との相関では、CD8 および CD45RO 陽性細胞数は、HVEM 高発現群で有意に少なかった。これらのことから、HVEM が大腸癌肝転移後の再発、生存に有意に関連していることが示唆された。さらに腫瘍免疫を介した機序が少なくとも関連している可能性が示された。したがって，HVEM が大腸癌肝転移症例における新たなバイオマーカーとなるばかりでなく、新たな治療標的因子となり得る可能性が示唆された。

膵癌における CD200 発現の臨床的意義



80. 難治性消化器癌に対する選択的癌免疫治療法の開発

庄　雅之

奈良県立医科大学 医学部 消化器・総合外科学教室

Key words：消化器癌，免疫治療，T 細胞，CD200，HVEM

緒　言

新規化学療法等の癌治療の進歩により、消化器癌においても予後の向上がみられている。一方、今なお全ての消化器癌に切除不能例や進行例がみられ、それらの予後は不良である。特に、膵癌に代表される難治性消化器癌は、根治術後であっても転移および再発の頻度が高く、再発後の治療は困難である。したがって、さらなる予後向上のためには、新たな観点からの癌治療法開発が必須である。我々はこれまで膵癌を中心とした消化器癌に関する臨床研究とともに、免疫を中心とした基礎的研究を精力的に行い、特に腫瘍領域において、1. T 細胞の不活化・抑制経路である PD-L / PD-1、B7-H3、HVEM、ETBR 等に関する新たな知見を見いだし、それらの臨床的意義および新規癌免疫療法の可能性を論文報告してきた［1～8］。また、2. 腫瘍内浸潤メモリーT 細胞が種々の癌腫において普遍的に、従来の TNM-Stage 分類とは独立して、予後や術後再発と関連することを報告した［9～10］。T 細胞上の PD-1 や CTLA-4 といった負の受容体の存在は、T 細胞を機能不全に陥らせ、ワクチン等の既存免疫治療によっても、腫瘍抗原応答性 T 細胞が十分に活性化されずに、腫瘍が宿主免疫を回避する機序の一つとして考えられる。実際に、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体の有用性が実証され、現在、臨床でも多くの新たな抗腫瘍および予後延長効果を示している。さらに最近の癌幹細胞に関する一連の研究報告は、難治癌の治療抵抗性に癌幹細胞が重要な役割を果たしていることを示唆している。我々がこれまで蓄積してきた研究成果および最新の癌研究報告を併せて鑑みると、1. 既知の T 細胞不活化分子以外にも、生体内腫瘍免疫機構において重要な機能を有する他分子が存在し、さらに多くの因子、多様なメカニズムが複雑に関連している、2. 癌幹細胞に対する T 細胞不活化阻害は、腫瘍根絶に至る革新的治療法となり得る可能性があると考えられる。また、最新の臨床研究の報告では、個々の癌患者の遺伝子背景と免疫治療の顕著な関連が示され、今後の 3. 癌治療において、患者各々の遺伝子背景に基づいた個別化治療の重要性がより一層認知されるようになっている。本研究では、これまで独自に蓄積してきた一連の研究成果と、最新の免疫・癌研究の報告を融合・発展させ、新規免疫治療標的分子の探索を行うとともに、癌幹細胞との関連の検証を目的とした。特に本研究では膵癌における CD200 発現および大腸癌肝転移における HVEM 発現について、詳細な検討を行った。

方　法

1.　膵癌における CD200 発現の検討

当教室で経験した 220 例の膵癌切除症例を用いて、腫瘍細胞の CD200 発現を免疫組織染色にて検討し、各種臨床病理学的因子および予後との関連を検討した。このうち術前化学放射線治療施行例、術後化学療法完遂例等、予後の観点から、詳細に検討して、CD200 発現の臨床的意義を検討した。また、メカニズムの検討のために、CD4、CD8、CD45RO の腫瘍内浸潤 T 細胞（TIL）についても同様に免疫組織染色にて検討した。さらに、ヒト膵癌株 PANC-1 および Capan-2 を細胞培養して、フローサイトメトリーにて、CD200 の他に、膵癌幹細胞マーカーと考えられる CD44、CD24、EpCAM の発現を検討した。各細胞株は、培養中に 150-KVp X-ray generator を用いて、10 Gy の放射線照射を行い、照射前後に細胞表面マーカーを検討して、膵癌幹細胞との関連を検討した。

2. 大腸癌肝転移における HVEM 発現の検討

当教室で経験した大腸癌肝転移症例に対して肝切除を行った 104 例を対象とした。術後追跡期間の中央値は 50.2 ヵ月であった。切除標本のパラフィンブロックからスライドを作製し、ヒト HVEM 特異抗体にて免疫染色を行った。HVEM 高発現群と低発現群に分類し臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。また機序の解明のために、CD4、CD8、CD45RO の腫瘍内浸潤 T 細胞（TIL）についても同様に免疫組織染色にて検討し、腫瘍免疫学的観点から、HVEM の臨床的意義を検討した。

本研究では、いずれも生存については Kaplan-Meier 法にて解析し、検定は Log-rank を用いた。また、Cox ハザードモデルを用いて予後検定を行った。$P < 0.05$ にて有意差ありとした。

結果および考察

1. 膵癌における CD200 発現の臨床的意義

膵癌における CD200 発現は、手術先行例（術前治療非施行例）では予後との明らかな関連は認めなかった。一方、術前化学放射線治療施行例では非施行例に比して、有意に CD200 発現が高く、また CD200 発現陽性群の予後は陰性群に比して有意に不良であった（$P = 0.030$）（図 1）。また多変量解析の結果、CD200 発現は独立予後不良因子であることが明らかとなった（HR 2.51 ; 95% CI 1.35～4.66 ; $P = 0.004$）。また、CD4、CD8、CD45RO 陽性 TIL は、CD200 陽性群で、陰性群に比して、いずれも有意に少なかった。さらに *in vitro* での検討の結果、ヒト膵癌株の放射線照射によって、CD200 発現が誘導され、さらには CD44／CD24／ESA 等との関連も認められた。以上より、最難治癌といわれる膵癌において、CD200 は宿主免疫回避機構に影響し、さらには放射線治療等による治療抵抗性に関わっていることが示唆された。したがって、新たな膵癌治療におけるバイオマーカーとなるとともに、治療標的分子としても有用である可能性が示された。

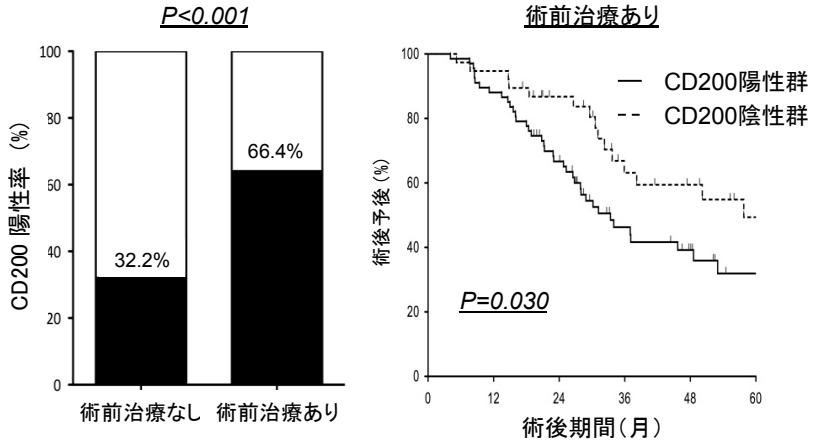


図 1. 膵癌における CD200 発現の臨床的意義

術前治療なし群に比較して、術前治療あり群では膵癌細胞の CD200 発現陽性率が有意に高値であった。

術前治療を施行した症例においては、CD200 発現陽性群の予後が陰性群に比して有意に不良であった。

（Log-rank test、$P = 0.030$）

2. 大腸癌肝転移における HVEM 発現の臨床的意義

HVEM 高発現群 49 例（47.5%）、低発現群 55 例（52.5%）の 2 群に分類して以下の検討を行った。背景因子として、両群間に年齢、性別、同時性転移、異時性転移、化学療法の有無、腫瘍径、T 因子、N 因子において両群間に差は認められなかった。予後との関連は、無再発生存期間は高発現群で低い傾向（P＝0.106）であり、全生存期間では高発現群で有意に予後不良であった（P＝0.002）また多変量解析では、年齢、腫瘍個数とならんで、HVEM 発現は独立予後不良因子であった（HR = 3.35、P = 0.006）（表 1）。また、TIL との相関では、CD8 および CD45RO 陽性細胞数は、HVEM 高発現群で有意に少なかった。これらのことから、HVEM が大腸癌肝転移後の再発、生存に有意に関連していることが示唆された。さらに腫瘍免疫を介した機序が少なくとも関連している可能性が示された。したがって、HVEM が大腸癌肝転移症例における新たなバイオマーカーとなるばかりでなく、新たな治療標的因子となり得る可能性が示唆された。

表 1. 大腸癌肝転移症例における予後因子 -多変量解析-

		例数		HR	95%CI	*P値*
年齢	<70 / ≥70	71/33		3.21	1.38−7.52	0.007
肝外病変	無 / 有	82/22		2.34	0.98−5.59	0.055
腫瘍個数	<5 / ≥5	82/22		2.60	1.01−6.67	0.047
CEA値, ng/ml	<20 / ≥20	67/37		1.55	0.70−3.41	0.281
CA19−9値, U/ml	<100 / ≥100	90/14		2.63	0.82−8.46	0.104
原発巣N因子	N0−1 / N2−3	76/28		1.87	0.74−4.70	0.186
HVEM発現	高発現 /低発現	55/49		3.35	1.41−7.93	0.006

単変量予後因子解析にて有意であった年齢、肝外病変、腫瘍個数、CEA、CA19-9、原発巣N因子、HVEM発現を多変量解析にて検討した結果、年齢、腫瘍個数とともに、HVEM腫瘍発現が有意な独立予後因子であることが示された。

文　献

1） Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, Nakamura S, Enomoto K, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2007 Apr 1;13(7):2151-7. PMID: 17404099

2） Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, Mizuno T, Yoriki R, Kashizuka H, Yane K, Tsushima F, Otsuki N, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. Clin Cancer Res. 2005 Apr 15;11(8):2947-53. PMID: 15837746

3） Yamato I, Sho M, Nomi T, Akahori T, Shimada K, Hotta K, Kanehiro H, Konishi N, Yagita H, Nakajima Y. Clinical importance of B7-H3 expression in human pancreatic cancer. Br J Cancer. 2009 Nov 17;101(10):1709-16. doi: 10.1038/sj.bjc.6605375.

4） Tanaka , Sho M, Takayama T, Wakatsuki K, Matsumoto S, Migita K, Ito M, Hamada K, Nakajima Y. Endothelin B receptor expression correlates with tumour angiogenesis and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 2014 Feb 18;110(4):1027-33. doi: 10.1038/bjc.2013.784.

5) Inoue T, Sho M, Yasuda S, Nishiwada S, Nakamura S, Ueda T, Nishigori N, Kawasaki K, Obara S, Nakamoto T, Koyama F, Fujii H, Nakajima Y. HVEM expression contributes to tumor progression and prognosis in human colorectal cancer. Anticancer Res. 2015 Mar;35(3):1361-7. PMID: 25750286

6) Hokuto D, Sho M, Yamato I, Yasuda S, Obara S, Nomi T, Nakajima Y. Clinical impact of herpesvirus entry mediator expression in human hepatocellular carcinoma. Eur J Cancer. 2015 Jan;51(2):157-65. doi: 10.1016/j.ejca.2014.11.004. PMID: 25468715

7) Migita K, Sho M, Shimada K, Yasuda S, Yamato I, Takayama T, Matsumoto S, Wakatsuki K, Hotta K, Tanaka T, Ito M, Konishi N, Nakajima Y. Significant involvement of herpesvirus entry mediator in human esophageal squamous cell carcinoma. Cancer. 2014 Mar 15;120(6):808-17. doi: 10.1002/cncr.28491. PMID: 24249528

8) Yasuda S, Sho M, Yamato I, Yoshiji H, Wakatsuki K, Nishiwada S, Yagita H, Nakajima Y. Simultaneous blockade of programmed death 1 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) induces synergistic anti-tumour effect in vivo. Clin Exp Immunol. 2013 Jun;172(3):500-6. doi: 10.1111/cei.12069.

9) Wakatsuki K, Sho M, Yamato I, Takayama T, Matsumoto S, Tanaka T, Migita K, Ito M, Hotta K, Nakajima Y. Clinical impact of tumor-infiltrating CD45RO$^+$ memory T cells on human gastric cancer. Oncol Rep. 2013 May;29(5):1756-62. doi: 10.3892/or.2013.2302. PMID: 23440298

10) Enomoto K, Sho M, Wakatsuki K, Takayama T, Matsumoto S, Nakamura S, Akahori T, Tanaka T, Migita K, Ito M, Nakajima Y. Prognostic importance of tumour-infiltrating memory T cells in oesophageal squamous cell carcinoma. Clin Exp Immunol. 2012 May;168(2):186-91. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04565.x PMID: 22471279