

## 論 文 要 旨

### Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer

#### 〔 乳癌における HLA class I 発現の臨床的意義 〕

金子 公一

#### 【序論及び目的】

癌の宿主の抗腫瘍免疫機構からの回避のメカニズムはさまざまである。腫瘍細胞のhuman leukocyte antigen (以下, HLA) class Iの発現低下は, 腫瘍細胞に抗原特異的な cytotoxic T lymphocyte(以下, CTL)からの細胞障害性の回避に重要なプロセスと考えられており, さまざまな癌腫でHLA class I発現と臨床病理学的意義が検討されている。実際, 骨肉腫や非小細胞性肺癌においては, 腫瘍細胞のHLA class I発現が低下している症例が存在し, HLA class I発現低下症例の生命予後との関連性が報告されている。申請者らは乳癌におけるHLA class I発現を免疫組織学的に評価し, その臨床病理学的意義を検討した。

#### 【材料及び方法】

1993年~2003年の間に鹿児島大学病院で手術を施行した212例の原発性浸潤性乳癌を対象とした。全例が女性で平均年齢は56歳, リンパ節転移陽性例は84例であった。TNM分類でI期70例, II期101例, III期41例で全例が根治切除を受けていた。乳癌のHLA class Iの発現はホルマリン固定後, パラフィン包埋標本を用いて免疫組織学的に評価した。抗HLA class I抗体(EMR8-5)を100倍に希釈しovernightで反応させ, ABC法で可視化した。HLA class I陽性細胞が40%以上見られた症例をHLA class I発現陽性と定義した。また, 腫瘍のEstrogen receptor, Progesterone receptorおよびHER2の発現を免疫組織学的に評価し, 10%以上陽性のみられる症例を陽性と評価した。無病再発期間を含めた臨床病理学的因子と腫瘍HLA class I発現程度の関連性を検討した。腫瘍HLA class I発現と臨床病理学的因子との相関は $\chi^2$ テストにて評価した。HLA class I陽性または陰性群の生存曲線はKaplan-Meier法にて算出し, 統計学的有意差はlog-rank検定にて評価した。生存のための独立した予後因子の多変量解析は一般化回帰モデルで行った。

#### 【結果】

- 1) HLA class IIは細胞膜と細胞質に発現を認めた。
- 2) HLA class Iの発現陽性は 212例中69例 (32.5%) に認められた。HLA class Iの発現はリンパ節転移( $p=0.0278$ ), 病期( $p=0.0110$ ), リンパ管侵襲( $p=0.0067$ ), 静脈侵襲( $p=0.0260$ )と有意の関連性が認められたが, 組織型やホルモン受容体との関連性はみられなかった。
- 3) HLA class I発現別で全生存期間では有意差は見られなかった。
- 4) 無病再発率に関してはHLA class I発現低下例はHLA class I発現陽性例に比べて有意に予後不

良であった( $p=0.032$ ).

5) 多変量解析の結果、無病再発期間に対する有意な臨床病理学的因子として腫瘍長径、リンパ節転移の有無、Progesterone receptorおよび静脈侵襲が選定されたが、HLA class I発現は独立した予後因子にはならなかった。

#### 【考察】

乳癌のHLA class Iの発現を検討した報告は散見されるが、申請者らが今回用いた抗体 (EMR8-5) はパラフィン固定標本でもHLA A, BおよびCの重鎖すべてを認識することができる新しい抗体である。乳癌に関して本抗体を用いた検討の報告は初めてである。

乳癌ではHLA class Iの発現低下例が66%にみられ、胃癌や食道癌、骨肉腫に比較して高い傾向にあったが、HLA class I発現の差異は臓器特異的なものと考えられた。今回の臨床病理学的因子との関連性の検討ではHLA class Iの発現と癌の病期やリンパ節転移と有意な負の関連がみられた。早期乳癌で高頻度に発現していたHLA class IIは進行とともに低下していく。腫瘍がさらに進展、転移を来す過程になるとHLA class Iの喪失がみられ、腫瘍の悪性度が次第に高まっていくことが推定された。これに対応してHLA class I発現陰性例は陽性例に比べて、無病再発率も有意に不良であった。以上より乳癌における腫瘍HLA class I発現は HLAの喪失を介した腫瘍免疫機構からの回避に関連した、癌の生物学的悪性度の評価に有用なマーカーであると考えられた。

(Bio Med Central Cancer, 11, 454 2011年 掲載)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第215号	学位申請者	金子 公一	
審査委員	主査	堂地 勉	学位	博士 (医学)
	副査	松山 隆美	副査	馬場 昌範
	副査	谷本 昭英	副査	古川 龍彦

### Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer

#### 乳癌における HLA class I 発現の臨床的意義

癌の宿主の抗腫瘍免疫機構からの回避のメカニズムはさまざまである。腫瘍細胞の human leukocyte antigen (以下, HLA) class I の発現低下は、腫瘍細胞に抗原特異的な cytotoxic T lymphocyte (以下, CTL) からの細胞障害性の回避に重要なプロセスと考えられており、さまざまな癌腫で HLA class I 発現と臨床病理学的意義が検討されている。実際、骨肉腫や非小細胞性肺癌においては、腫瘍細胞の HLA class I 発現が低下している症例が存在し、HLA class I 発現低下例の生命予後との関連性が報告されている。今回、学位申請者らは乳癌における HLA class I 発現を免疫組織学的に評価し、その臨床病理学的意義を検討した。

その結果、本研究では以下の知見が明らかとされた。

- 1) HLA class I は腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に発現を認めた。
- 2) 乳癌における HLA class I の発現は、212 例中 69 例 (32.5%) に認められた。HLA class I の発現低下はリンパ節転移 ( $p=0.0278$ )、病期 ( $p=0.0110$ )、リンパ管侵襲 ( $p=0.0067$ )、静脈侵襲 ( $p=0.0260$ ) と有意の関連性が認められたが、組織型やホルモン受容体との関連性はみられなかった。
- 3) HLA class I 発現別では全生存期間に有意差は見られなかった。
- 4) HLA class I 発現低下例の無病再発率は、HLA class I 発現陽性例に比べて有意に予後不良であった ( $p=0.032$ )。
- 5) 単変量解析の結果、無病再発期間に対する有意な臨床病理学的因子として腫瘍長径、リンパ節転移の有無、Progesterone receptor、HLA class I 発現および静脈侵襲が選定されたが、多変量解析では HLA class I 発現は独立予後因子にはならなかった。

以上の結果より乳癌における腫瘍の HLA class I 発現は HLA の喪失を介した腫瘍免疫機構からの回避に関連していると考えられた。今回の臨床病理学的因子との関連性の検討では、乳癌の HLA class I の発現は病期やリンパ節転移と有意な関連がみられ、無病再発率にも相関がみられた。早期乳癌で高頻度に発現していた HLA class I は、進行とともに低下し、腫瘍がさらに進展すると HLA class I の喪失が高頻度に見られ、腫瘍の悪性度が次第に上がっていくと推定された。

以上より、乳癌における腫瘍 HLA class I 発現の低下は、癌の生物学的悪性度の評価に有用なマーカーになると期待される。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 215 号	学位申請者	金子 公一
審査委員	主査	堂地 勉	学位 博士 (医学)
	副査	松山 隆美	副査 馬場 昌範
	副査	谷本 昭英	副査 古川 龍彦
<p>主査および副査の 5 名は、平成 24 年 9 月 10 日、学位申請者 金子 公一君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1) 抗体 EMR8-5 は構造的にどこを認識しているのか。また <math>\beta 2</math> ミクログロブリンまで認識できるのか。  (回答) 抗体 EMR8-5 は、HLA class I の重鎖を認識している。 <math>\beta 2</math> ミクログロブリンは認識しない。</p> <p>質問 2) HLA class I 発現の有無で浸潤リンパ球に差はみられるか。  (回答) 今回の研究では検討していない。</p> <p>質問 3) Triple Negative (ER-, PR-, HER2-) 乳癌の予後と HLA class I 消失の関連はどうか。  (回答) バイオマーカーの組み合わせによる詳細な検討はしていないが、ER, PgR, HER2 に関して個々の発現との関連は認められないため、バイオマーカーの組み合わせでも関連はないと推測される。</p> <p>質問 4) なぜ HLA class I は多変量解析で独立した予後因子とならなかったのか。  (回答) HLA class I 発現が陰転化すると NK 細胞の活性化が助長されることが知られており、陰転化だけでは独立した予後因子とはならない可能性がある。</p> <p>質問 5) 免疫染色で ABC 法を用いた理由はなぜか。  (回答) 以前、当科で検討した胃癌での EMR8-5 発現についての論文では ABC 法を用いており、これを参考に行った。</p> <p>質問 6) 切片による染色性の違いはどうか。また 1 症例あたり何切片くらい検討したか。  (回答) ある程度染色性の差異があるため、多数切片を作製し検討した。</p> <p>質問 7) 今回の研究で EMR8-5 の cut-off 値を 40% とした理由は何故か。  (回答) 癌腫により HLA class I の発現率はさまざまであり、乳癌は他の癌腫と比べ陽性率はやや低頻度であった。今回の検討では、陽性率の平均値をもとに 40% を cut-off 値とした。</p> <p>質問 8) 進行により HLA class I 発現が低下すると考察しているが、進行に関わらず元々 HLA class I の発現が高値と低値の腫瘍はないのか。  (回答) 早期乳癌では発現率は高いことを考慮すると、元々発現していた HLA class I が癌の進行に伴って、HLA class I を喪失していくと思われる。</p> <p>質問 9) 原発巣と転移巣での比較はしていないか。またその報告はないか。  (回答) 今回の研究では検討していないが、文献的に食道癌症例の検討では、転移巣で有意に発現が低下したという報告がある。</p> <p>質問 10) 乳癌でリンパ球浸潤を伴う間質を持ち、HLA 発現陽性例は髄様癌を考えるが、髄様癌でも今回と同様の結果がでると思うか。  (回答) 髄様癌は特殊型に分類される稀な疾患で、今回の検討からは除外してあり、結果については不明である。</p> <p>質問 11) 担癌患者で HLA class I 発現が低下するのはどういう機序によるものか。  (回答) HLA class I 発現低下の原因の大部分は HLA 軽鎖 <math>\beta 2</math> ミクログロブリンの発現低下であり、その原因はヒストン脱アセチル化といわれている。</p>			

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 2) 対象患者は抗癌剤を投与されていないが、抗癌剤で HLA class I を低下させる薬剤はあるのか。

(回答) IFN $\gamma$  が HLA class I の発現を増強することは知られているが、抗癌剤は HLA class I の発現に関与しているという報告はない。

質問 1 3) 使用した抗体 EMR8-5 の由来は何か。また positive control は何か。

(回答) マウス由来モノクローナル抗体であり、positive control として扁桃を用いた。

質問 1 4) 免疫染色のコンピューター解析等はあるのか。

(回答) 現在客観的に染色強度を測定する解析ソフトがあるが、今回は使用していない。

質問 1 5) survivin ワクチンの結果はすでにわかっているか。

(回答) 検索した範囲で、survivin ワクチンの結果の報告はみられていない。

質問 1 6) HC10 と EMR8-5, W6/32 での発現率の違いはどうか。

(回答) W6/32 と EMR8-5 の HLA class I 陽性率はほぼ同等であり、HLA class I 発現低下例が予後不良であった。一方、HC10 の HLA class I 陽性率はほぼ同等であったが、HLA class I 発現低下例が予後良好という逆の結果であった。

質問 1 7) HLA class I 発現低下は NK cell が活性化されることであるが、NK のリガンドに関する報告はないか。

(回答) 乳癌細胞における NK のリガンドに関する報告は確認できなかった。

質問 1 8) Table 1 で腫瘍長径を揃えた場合、予後に差はでるのか。

(回答) 今回の研究では、腫瘍長径を揃えて検討していない。

質問 1 9) インターフェロンは HLA class I を上げるが、乳癌では臨床的に使用されているか。

(回答) 実臨床で IFN は腎細胞癌の治療に使用されているが、乳癌での治療には使用されていない。

質問 2 0) 1993 年～2003 年の 10 年の臨床例で検討をしているが、医学の進歩による臨床データの差はみられないのか。

(回答) データに差がでる可能性はあるが、乳癌は比較的予後がよく短期でのデータでは差が出ない可能性が高いので長期予後の解析が必要である。

質問 2 1) 免疫染色はまとめて行ったのか。

(回答) 一定期間にまとめて染色と評価を行った。免疫染色は同じ条件下で行うことが大事である。

質問 2 2) 染色の判定は何人で行ったか。検者により、また日時により差はでるか。

(回答) 2 人の外科医が乳癌の臨床データを伏せた状態で別々に評価した。日時による評価に差が出る可能性があるので日時を変えて多数回評価を行った。

質問 2 3) ER, PgR, HER2 の cut-off と HLA class I 発現の cut-off が異なっているが、このように異なるものなのか。

(回答) ER, PgR, HER2 の cut-off 値は臨床的に決定されており最近でも変化している。HLA class I 発現と cut-off 値が異なっても問題はないと思われる。

質問 2 4) HLA 発現の評価は術後の補助療法に応用できるか。

(回答) 現時点では臨床応用は難しいと思われるが、癌ペプチドワクチンの使用に際しては腫瘍での HLA class I 発現性は重要であり、今後ワクチン治療につながる事が予想される。

質問 2 5) 子宮癌で HLA 発現を検討した報告はあるか。

(回答) 検索した範囲では、報告はない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。