

論文要旨

Analysis of T-helper type1 and type2 cells and T-cytotoxic type1 and 2 cells of sentinel lymph nodes in breast cancer

乳癌センチネルリンパ節における Th1 細胞と Th2 細胞
および Tc1 細胞と Tc2 細胞の分析

衣斐 勝彦

【序論および目的】

Sentinel node (SN) concept は原発巣から最初のリンパ流を受けるリンパ節である SN が存在し、SN から癌の転移が形成されるという概念である。SN の転移状況を調べることにより、リンパ節の郭清範囲を決定する術式が乳癌や悪性黒色腫で臨床応用されている。最近、乳癌、悪性黒色腫、胃癌で SN 内の免疫変調が報告されてきており、SN では SN 以外のリンパ節 (non-SN) に比較して免疫抑制状態が早期に起こっていることが示唆されている。しかし、SN での免疫抑制状態を直接証明することは容易でない。T 細胞は産生サイトカインであるインターフェロン (IFN)- γ 、インターロイキン (IL)-2, IL-4, IL-10 をマーカーとして Th1, Th2, Tc1, Tc2 に亜分類される。担癌患者では Th1, Th2, Tc1, Tc2 の割合が免疫調節の重要な役割を演じている。また、担癌患者では末梢血液の Th1/Th2 バランスや Tc1/Tc2 バランスが免疫抑制状態を直接反映している。肺癌の腫瘍内浸潤リンパ球の Th1 と Th2 の割合は、腫瘍の進行とともに減少したという報告がある。フローサイトメトリーを用いて SN のリンパ球細胞内サイトカインレベルを測定し、Th1/Th2 バランスや Tc1/Tc2 バランスを明らかにした研究はほとんど見当たらない。本研究では、フローサイトメトリーを用いて乳癌の SN と non-SN 内リンパ球の Th1/Th2 バランスと Tc1/Tc2 バランスを評価し、SN の免疫環境と臨床病理学因子の関連性について検討した。

【材料および方法】

- 1) 対象：鹿児島大学病院で施行された乳癌根治切除 24 例を対象とした。全員女性で、年齢は 38 歳から 76 歳 (平均 57.4 歳)であった。臨床病期分類は TNM 分類を用いて評価した。
- 2) 方法 ①SN の同定：手術前日にテクネシウム標識スズコロイドを腫瘍周囲に注入し、術中に Navigator GPS を用い SN と non-SN を摘出した。
②リンパ節内リンパ球の Th1, Th2 の割合と Tc1, Tc2 の割合の計測：リンパ球の細胞内サイトカインを染色したのち、3 カラー・フローサイトメトリーによって計測した。CD4 陽性細胞で IFN 陽性かつ IL-4 陰性を Th1 細胞、IFN 陰性かつ IL-4 陽性を Th2 細胞とした。また CD8 陽性細胞で IFN 陽性かつ IL-4 陰性のものを Tc1 細胞とし、IFN 陰性かつ IL-4 陽性のものを Tc2 細胞とし、Th1/Th2 バランス、Tc1/Tc2 バランスを計算した。
③同一患者ごとの SN と non-SN の Th1/Th2 バランス、Tc1/Tc2 バランスの比較を行った。さらに、24 例の Th1/Th2 バランス、Tc1/Tc2 バランスと臨床病理学的因子の関連性を検討した。

【結 果】

- 1) 24 例の全例に SN が同定された. SN は平均 2.4 個同定され, 24 例中 6 例に SN のリンパ節転移が確認された.
- 2) 同一症例の SN の Th1/Th2 バランスは non-SN と比較して, 有意に低値を示した ($p < 0.05$).
- 3) 同一症例で腫瘍径を 20mm 以上に限定すると, SN の Th1/Th2 バランスは non-SN と比較して, 有意に低値であった ($p < 0.05$). しかし, 長径 20mm 未満の症例では両者の Th1/Th2 バランスに有意差は認められなかった.
- 4) SN の Th1/Th2 バランスと臨床病理学的因子を比較検討すると, 年齢 50 歳以上 ($p < 0.05$), 腫瘍径が 15mm 以上 ($p < 0.05$), リンパ節転移陽性 ($p < 0.05$), 組織型が非浸潤癌 ($p < 0.01$) で有意の低下が認められた. non-SN で同様な検討した結果, 組織型のみで有意差が認められた.
- 5) Th1/Th2 バランスの結果と相反して, Tc1/Tc2 バランスはいずれの臨床病理学的因子とも有意差は認められなかった.

【結論及び考察】

フローサイトメーターで測定した SN リンパ球の Th1/Th2 バランスは, non-SN に比較して有意に低下していた. これは悪性黒色腫患者の SN 内の樹状細胞数が non-SN に比較して免疫組織学染色で有意に減少していたという報告や, 乳癌患者の SN では免疫担当細胞の浸潤が non-SN より有意に低下したとする PCR の分析結果の報告と同様であった. SN の中でヘルパー T 細胞の免疫麻痺状態が早期に生じていると考えられた.

今回の検討では, 腫瘍長径 20mm 以上の乳癌患者の SN と non-SN の間で Th1/Th2 バランスに強い相関が認められた. さらに 24 例全例の検討から, 腫瘍径の大きな患者ほど SN における Th1/Th2 バランスは低値を示していた. 腫瘍量に応じて免疫抑制物質が SN に流入している可能性も考えられた. SN 内の T 細胞性免疫はリンパ節転移を来す前に一旦低下し, 転移に伴い活性化するという報告があるが, 本研究では転移陽性 SN の Th1/Th2 バランスは, 転移陰性 SN と比較して有意に低下していた. 転移陽性 SN 内のリンパ球は腫瘍細胞とともに共存しており, 腫瘍細胞が抗腫瘍免疫を抑制している状態であると考えられた. 一方, Tc1/Tc2 バランスは同一患者の SN と non-SN の検討や全例の検討でも有意差は認められなかった. 乳癌ではいかなる状況でも Tc1 と Tc2 の免疫学的変化は軽微である可能性が示唆された.

乳癌患者の SN 内リンパ球では, ヘルパー T 細胞の免疫機能の変化が最初に起こるが, リンパ節転移や腫瘍長径など腫瘍量の影響を受けていた. 腫瘍によって引き起こされた T 細胞性の免疫学的変化により, SN ではリンパ節転移をきたしやすい状況を作り出していると考えられた. したがって, リンパ節の T 細胞性免疫機構の変化を分析することは SN を同定するための有用な尺度になると考えられた.

(Oncology Reports 2008 年 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	医研 第 667号	氏名	衣斐 勝彦
審査委員	主査	堂地 勉	
	副査	松山 隆美	小賤 健一郎

Analysis of T-helper type1 and type2 cells and T-cytotoxic type1 and 2 cells of sentinel lymph nodes in breast cancer

(乳癌センチネルリンパ節におけるTh1細胞とTh2細胞 およびTc1細胞とTc2細胞の分析)

原発巣から最初のリンパ流を受けるリンパ節はSentinel node (SN)と呼ばれ、癌の転移が最初に形成される部位と考えられている。乳癌や悪性黒色腫など一部の癌腫についてSNでのリンパ節転移の有無を検索した後にリンパ節郭清範囲の決定がなされている。最近、乳癌、悪性黒色腫、胃癌でSN内の免疫変調が指摘されてきており、SN以外のリンパ節 (non-SN) に比較してSNでは免疫抑制状態が早期に起こっている可能性が示唆される。細胞性免疫を評価する方法としてTh1・Th2、Tc1・Tc2バランスがある。T細胞は産生されるサイトカインによってTh1、Th2、Tc1、Tc2に重分類され、担癌患者では末梢血液のTh1/Th2やTc1/Tc2比が低下し、直接的に免疫抑制状態を反映している。本研究では、乳癌を対象にフローサイトメトリーを用いてSNとnon-SNリンパ球のTh1/Th2とTc1/Tc2比を評価し、SNの免疫環境と臨床病理学因子の関連性について検討した。

乳癌根治切除24例を対象とし、手術前日にテクネシウム標識スズコロイドを腫瘍周囲に注入し、術中にNavigator GPSを用いてSNとnon-SNを同定した。摘出したリンパ節内リンパ球のTh1/Th2比とTc1/Tc2比の計測は、リンパ球を刺激後、細胞内サイトカインを染色したのち、3カラーフローサイトメトリーで計測した。CD4陽性IFN γ 陽性かつIL-4陰性をTh1細胞、CD4陽性IFN γ 陰性かつIL-4陽性をTh2細胞、CD8陽性IFN γ 陽性かつIL-4陰性のものをTc1細胞、CD8陽性IFN γ 陰性かつIL-4陽性をTc2細胞とし、Th1/Th2比、Tc1/Tc2比を計算した。同一患者ごとおよび24例全体のSNとnon-SNのTh1/Th2比、Tc1/Tc2比と臨床病理学因子の関連性を検討し、以下の知見を明らかにした。

- 1) 同一症例におけるSNのTh1/Th2比はnon-SNと比較して、有意に低値を示した ($p<0.05$)。
- 2) 腫瘍径を20mm以上に限定すると、SNのTh1/Th2比はnon-SNと比較して、有意に低値を示したが ($p<0.05$)、長径20mm未満の症例では有意差は認められなかった。
- 3) SNのTh1/Th2比と臨床病理学因子を比較検討すると、年齢50歳以上 ($p<0.05$)、腫瘍径が15mm以上 ($p<0.05$)、リンパ節転移陽性 ($p<0.05$)、組織型が非浸潤癌 ($p<0.01$) で有意の低下が認められた。non-SNで同様な検討を行ったが、組織型のみで有意差が認められた。
- 4) Th1/Th2比の結果と相反して、Tc1/Tc2比はいずれの臨床病理学因子とも有意の関連性は認められなかった。

SNリンパ球のTh1/Th2比は、non-SNに比較して有意に低下していた。これは悪性黒色腫でSN内の樹状細胞数がnon-SNに比較して有意に減少していたという免疫組織学的検討や、乳癌のSNでは抗腫瘍免疫細胞の浸潤がnon-SNより有意に低下したとするRT-PCRの分析結果と一致していた。本研究ではSNの中でもヘルパーT細胞の免疫麻痺状態が早期に生じており、リンパ節転移や腫瘍長径など腫瘍量の影響を受けやすいことを明らかにした。T細胞性の免疫学的変化により、SNではより早くリンパ節転移をきたしやすい状況を作り出されている可能性がある。SNとnon-SNのTh1/Th2比を測定し、その差異が確認できれば、SN同定のための腫瘍免疫学的な証明になることを示した点も興味深い。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	医研 第 667 号	氏名	衣斐 勝彦
審査委員	主査	堂地 勉	
	副査	松山 隆美	小賤 健一郎
<p>主査および副査の3名は、平成20年3月31日、学位申請者 衣斐 勝彦君に面接し、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) シンチグラフィーで描出され、術中にRI uptakeがあり摘出されたリンパ節をSentinel nodeとして良いか？</p> <p>(回答) Sentinel node conceptから考えると、シンチ、手術で同定されたリンパ節をSentinel nodeとしてよいと考える。1990年代に発表されている論文によれば、同定法として色素法が始まり、症例を重ねる (learning curve) ごとに同定率が上昇していることがわかる。またRI法が開発され、色素法との併用も含め、同定率の上昇がみられている。現在では、RIコロイドの至適粒子径の研究により同定率は95%以上である。</p>			
<p>質問2) Sentinel nodeに年齢による免疫学的影響はあるか？</p> <p>(回答) 免疫学的影響はあると考えられる。本研究の結果からも51歳以上の乳癌患者のSentinel nodeのTh1/Th2は50歳以下と比較して有意に低下していた。</p>			
<p>質問3) 他の癌種と比べて、女性であるという因子の影響はあるか？</p> <p>(回答) 胃癌、食道癌について、Sentinel nodeの免疫環境について樹状細胞を用いて検討を行った。食道癌のSentinel nodeでは免疫抑制を示唆する結果であったが、胃癌では免疫抑制はみられなかった。したがって乳癌も含めて、臓器特異性があると考えられる。女性であるという因子についての検討は行っていない。</p>			
<p>質問4) Table2の組織型 (非浸潤癌と浸潤癌) の検討について症例が少ないが、有意差が出た理由は？</p> <p>(回答) 浸潤癌と比較して、非浸潤癌は腫瘍径が大きかった。したがって、腫瘍細胞からの免疫抑制物質の産出量も多いために、Sentinel nodeのTh1/Th2が有意に低下したと考えられる。</p>			
<p>質問5) Th1, Th2の値が過去の文献と比較して低い理由は何か？</p> <p>(回答) CD69を測定することにより、Tリンパ球が抗原を認識して活性化していることを確認しているため、この測定方法に関しては問題ないとする。摘出してすぐにリンパ節のTリンパ球の測定を行わず、リンパ節の処理後に-80℃で凍結を行っている。保存し解凍後にリンパ球の測定を行っていることが、Th1, Th2の値の低下する一因になっている可能性がある。</p>			
<p>質問6) 分離の際に、単球を分離しているのか？</p> <p>(回答) 細胞がひとつずつレーザー光を通過するたびに発せられる散乱光や蛍光は、光学検出器を用いてパラメーターごとに測定し、細胞ひとつひとつの特性として測定できる。蛍光強度と散乱光の違いでリンパ球と単球は分離できるので、この計測においても分離している。</p>			
<p>質問7) Sentinel nodeが複数存在する症例は、Sentinel nodeを一括して検討したのか、個別にしたのか？</p> <p>(回答) Sentinel nodeが複数存在する症例でも1症例につき1個のSentinel nodeと1個のnon-Sentinel nodeを検討した。</p>			
<p>質問8) Table2, Table3の解析を多変量解析で行ってみてはどうか？</p> <p>(回答) 今回は行っていない。行うべき価値は十分にあると考える。</p>			

質問9) CD3 ϵ についての結果と近いか？

(回答) 胃癌患者のSentinel nodeにおいては、CD3複合体の ϵ 鎖がnon-Sentinel nodeと比較して低下しているといわれている。また早期乳癌患者のSentinel nodeにおいても同様のことが言われており、当論文に示したとおり、乳癌Sentinel nodeの局所免疫応答において免疫抑制が示唆されている。

質問10) この論文の症例は何年間で集められたか？

(回答) 以前より乳癌のSentinel nodeの検出感度のlearning curveの検討を行ってきた。手技が十分に確立した後、最近の1年10ヶ月の症例を用いて検討した。

質問11) Sentinel nodeの摘出(手術)において問題はなかったか？

(回答) 手技的には確立した後今回の研究を行ったので、特に問題はないと考える。

質問12) グラフの統計解析法は何を用いたか？

(回答) Two group t-test : Pairedを用いて解析した。

質問13) Table2で年齢を50歳でわけて検討しているが、何か理由があるのか？

(回答) 閉経と免疫の関係について検討が必要と考えた。閉経の詳細なデータがなかったため、閉経を50歳前後と考えて分類した。

質問14) エストロゲンレセプターの有無と免疫の検討は行ったか？

(回答) 今回の検討ではエストロゲンレセプターの有無で有意差は認められなかった。

質問15) 浸潤癌でTh1/Th2 ratioが上昇している理由は何か？

(回答) 非浸潤癌は浸潤癌と比較して、腫瘍径が大きかった。そのため腫瘍細胞からの免疫抑制物質の産出量が多く、Sentinel nodeのTh1/Th2が有意に低下したと考えられる。一方、浸潤癌は非浸潤癌と比較して、Th1/Th2 ratioが上昇しているという結果となった。

質問16) 子宮頸癌、体癌でも同じような結果が得られると考えるか？

(回答) 食道癌、乳癌においては、Sentinel nodeの局所免疫応答の抑制が示唆される結果が出ている。しかし胃癌では癌以外の食事などの刺激が多い臓器では様々な免疫反応が生じ、Sentinel node局所免疫応答の多様性が示されている。子宮頸部、体部では免疫学的な刺激という観点では乳癌に近いと考えられるため、今回と同様な結果になると推測される。

質問17) Tc1/Tc2で差が出なかった理由は何が考えられるか？

(回答) ナイーブT細胞が抗原-抗原提示細胞より刺激をうけて、ヘルパーT細胞(Th)の分化が始まる。この分化が、進行して細胞障害性T細胞(Tc)の分化が始まる。分化という面から、まだ十分にTcまで進んでいないため、差がみられなかったと考えられる。

質問18) Sentinel nodeのTh1/Th2の分析が、臨床的に応用できるのか？

(回答) この研究の主旨は免疫学的アプローチによりSentinel node conceptが成り立つということを示明することである。Sentinel nodeでは局所免疫応答の抑制が示唆されるという結果より、このconceptは成り立つと考えられる。また、Sentinel nodeとして同定されたリンパ節が他のリンパ節より免疫抑制が強いと判断された場合、そのリンパ節はSentinel nodeであるという有用な尺度になりうる。Sentinel nodeの免疫抑制が強い症例では、腫瘍免疫の低下と考え、術後補助療法を行う目安になりえる。

質問19) Th1/Th2 ratioの低下は免疫抑制という言葉を使って良いか？

(回答) 抗腫瘍免疫は、CTLを中心とするT細胞性免疫である。CTLの刺激・活性化にはTh1細胞からのサイトカインが必要である。Th1/Th2比の低下はTh1リンパ球からのサイトカインの産生の減少、Th2リンパ球からのCTLを抑制するサイトカインの増加を意味する。したがって、Th1/Th2 ratioの低下は間接的に免疫抑制を反映していると考えられる。

質問20) Th1とTh2のバランスがTh1/Th2 ratioで表現しているがこれで良いか？

(回答) 他の論文でもTh1とTh2のバランスを評価する場合には、Th1/Th2 ratioを使用している報告がほとんどであるため、本研究もこれに準じて評価した。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と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。