

氏名	高橋和也
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 684 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	胃癌患者の腹腔内細胞の解析と腹膜播種治療におけるバイオマーカーとしての意義の解明
論文審査委員	(委員長) 教授 仁木利郎 (委員) 教授 武藤弘行 教授 力山敏樹

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

腹膜播種は胃癌の再発形式として最も頻度が高く、治療に難渋する病態である。腹膜播種をきたした患者の腹腔内には一定数の遊離癌細胞が存在しており、胃癌患者の予後を強く規定する因子として認識されている。また、固形腫瘍における癌微小環境を構成する免疫細胞が、がんの病勢に大きな影響を与える事実がこれまで数多く報告されてきた。しかし、腹腔内の遊離癌細胞量や腹膜播種における微小環境に相当する腹腔内の免疫細胞の動態が播種の進行や患者予後にどう関わっているかについてはほとんど検討されていない。本研究では、フローサイトメーターを利用して、腹腔内の遊離癌細胞、免疫細胞を同定、フェノタイプ分類を行い、その結果と播種の程度や患者予後との関連性を検討することを目的とした。

### 2 研究方法

#### 1. 胃癌患者の腹腔内洗浄液または現役腹水の回収

胃癌患者より、手術開始時に生理食塩水 250ml を用いて腹腔内を洗浄して得られた洗浄液 200 ml、または腹水穿刺により得られた腹水原液 20ml を採取した。腹膜播種を認めた症例は審査腹腔鏡時に Peritoneal Cancer Index (PCI) スコアの測定を行った。S-1/オキサリプラチン+パクリタキセル (PTX) 腹腔内投与併用療法を施行中の症例は PTX 腹腔内投与前に注入用のポートから 20ml の腹水を回収した。

#### 2. 細胞染色と解析

腹水または腹腔内洗浄液を遠心分離して得られた細胞に、FVS780 による死細胞染色後、後述のパネルに分けそれぞれの抗体を添加して多重染色を行った。多重染色後、Cytotfix-Cytoperm に懸濁し、固定・透過処理を行い、核染色剤として DAPI を添加ののち、下記の抗体を添加して細胞内染色を行い、Fortessa™X-20 にて各抗原の発現を測定し、Flow Jo™software を使用して、各細胞集団の特定し、その比率の算出を行った。

・癌細胞パネル: (細胞表面) FITC-CD90, APC-CD326 (EpCAM), BV605-CD45, (細胞内) PE-Ki-67 DAPI 陽性、FVS780 弱陽性の細胞を生細胞とし、CD45 陰性、CD90 陰性の集団を癌細胞とした。癌細胞における Ki-67 の陽性率を調査した。(癌細胞の割合)/(白血球数の割合)×100

を TLR(tumor leukocyte ratio) (%)として算出した。

・リンパ球パネル:(細胞表面) FITC-CD4, PE-CD56, APC-CD8, BV605-CD3, BV711-CD19:

上記と同様に生細胞集団を同定し、CD3 陽性細胞を T リンパ球とし、さらに CD4 陽性、CD8 陽性のフェノタイプに分類した。CD19 陽性細胞を B 細胞、CD3 陰性 CD56 陽性細胞を NK 細胞、CD3 陽性 CD56 陽性細胞を NKT 細胞とし、白血球全体に占める割合を算出した

・ミエロイド系細胞パネル:(細胞表面) FITC-CD66b, PE-CD16, APC-CD14, BV605-CD11b, BV711-CD163: CD11b 陽性細胞のうち、CD14 陰性 CD66b 陽性細胞を顆粒球、そのうち CD16 陽性細胞を好中球、陰性細胞を好酸球とした。CD66b 陰性 CD14 陽性細胞をマクロファージとした。マクロファージは CD16 の発現の有無により CD16 陽性および陰性マクロファージに分類し、それぞれの CD163 の発現率を測定した。

### 3 研究成果

1. 胃癌患者 205 例(播種症例 83 例、非播種症例 122 例)より検体を回収し解析を行った。播種のある症例で TLR は中央値 0.139% (最小値 0.002%- 最大値 790%)、播種のない症例では中央値 0.008% (最小値 0%- 最大値 0.377%) と、TLR は播種症例で有意に高値を示した ( $p<0.0001$ )。播種症例中、TLR は細胞診陽性患者で有意に高値を示した (中央値 CY1: 0.593% vs CY0: 0.016%,  $p<0.0001$ )。TLR の対数値と PCI スコア間に正の相関を認めた ( $r=0.2907$ ,  $p=0.0114$ )。

2. 癌細胞における Ki-67 は細胞診陽性症例と陰性症例の間に有意差を認めず、播種の進行度を示す TLR や PCI スコアと Ki-67 陽性率との間に相関関係は認められなかった。

3. 根治切除症例において、T4 症例は T3-1 症例よりも TLR が有意に高値であり (中央値 T4: 0.019% vs T3-1: 0.005%,  $p=0.0002$ )、リンパ節転移陽性症例は陰性症例よりも有意に TLR が高値を示した (中央値 N1-3: 0.017% vs N0: 0.004%,  $p=0.0041$ )。T4 症例の中で、術後に播種再発した症例は播種再発を認めない症例に比べて手術時の TLR が有意に高値であった (中央値 再発+: 0.019% vs 再発-: 0.005%,  $p=0.0003$ )。TLR が 0.02%以上の症例と未満の症例に分けて比較したところ、TLR が高値群で有意に全生存期間、および播種に関する無再発生存期間が短い結果となった ( $p=0.0016$ ,  $p=0.0014$ )。

4. 腹腔内リンパ球の割合は、CD8 陽性 T 細胞、NKT 細胞が播種症例で有意に減少していた (CD8: 中央値: 播種+: 18.0% vs 播種-: 27.4%,  $p<0.0001$ , NKT: 中央値: 播種+: 2.09% vs 播種-: 7.18%)。

一方、B 細胞は播種症例で有意に増加していた (中央値 播種+: 2.45% vs 播種-: 0.79%,  $p=0.0004$ )。CD4 陽性 T 細胞、NK 細胞は播種の有無で差は見られなかった。

5. CD11b(+)ミエロイド系細胞全体の割合は播種症例で有意に増加し、そのうちマクロファージの割合が播種症例で有意に増加していた (中央値播種+: 31.9% vs 播種-: 20.3%,  $p=0.0234$ )。特に CD16 陽性マクロファージの割合が顕著に増加していた (中央値: 播種+: 17.5% vs 播種-: 0.81%,  $p<0.0001$ )。また、CD16 陽性マクロファージの大部分が CD163 を発現しており、CD163 陽性率は CD16 陰性マクロファージよりも有意に高かった (中央値: CD16-M $\phi$ : 39.6% vs CD16+M $\phi$ : 91.4%,  $p<0.0001$ )。CD16 陽性マクロファージの割合は CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞の割合と負の相関を認めた (CD8:  $r=-0.3994$ ,  $p=0.0002$ , NK:  $r=-0.3749$ ,  $p=0.0006$ , NKT:

$r=-0.3943$ ,  $p=0.0003$ ).

6. S-1/オキサリプラチン+PTX 腹腔内投与併用療法を受けた 15 症例の治療前後で免疫細胞の割合を比較したところ、治療後に好酸球の割合が増加していた（中央値 開始前：0.50% vs 開始後：9.29%,  $p=0.0006$ ）。治療開始後に細胞診が陰転化しなかった 4 症例と、細胞診が治療開始前から陰性あるいは治療後陰転化した症例 11 例において治療開始前後の腹腔内好酸球の割合を比較すると、陰転化しなかった症例では好酸球の割合の有意な増加は認めなかったのに対し、治療開始前から陰性あるいは開始後に陰転化した症例では有意な好酸球の割合の増加を認めた（中央値 陰転化なし：0.5% vs 陰転化あり：10.7%,  $p=0.001$ ）。

#### 4 考察

腹腔内液中の TLR 値は、腹膜播種陽性症例、特に細胞診陽性症例で高値を示し、PCI スコアとも正の相関を示したことから、TLR から播種の進行度を客観的に推定できると考えられる。また、胃切除術を受けた患者において、TLR が高い症例では播種再発をきたしやすく、全生存期間、腹膜播種に関する無再発生存期間がいずれも有意に短くなることが示された。この事実から、TLR は腹膜播種の程度を反映するだけでなく、根治切除後の播種再発のマーカーになりうることが示唆された。しかし、Ki-67 の発現は TLR や PCI スコアとの相関は認めず、予後予測マーカーとしての意義を見出すことはできなかった。

一方、播種陽性症例では、播種陰性症例と比較して腹腔内の CD8 陽性リンパ球、NKT 細胞の割合が低下し、それぞれ TLR と負の相関を示した。一般に、これらの細胞は高い細胞傷害活性を有しているため、腹腔内のエフェクター細胞の減少は、腹膜播種の進行に重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。また、播種陽性患者においては、腹腔内の CD14(+)マクロファージ特に、CD16 を発現する大型で顆粒を多く含む M2 型の細胞が著明に増加していた。CD16 陽性マクロファージの割合は、CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞の割合と負の相関を示し、このフェノタイプのマクロファージは腹腔局所の免疫抑制を誘導し、腹膜播種の成立、進行と深く関わっている可能性が示唆された。

S-1/オキサリプラチン+パクリタキセル腹腔内投与併用療法を受けたほとんどの症例において、治療後に腹腔内の好酸球の割合の増加を認め、その傾向は細胞診が陰転化した症例で特に顕著であった。この事実から、パクリタキセルの局所投与が腹腔内への好酸球の遊走を促進し、結果として細胞診の陰転化に関与している可能性があることが推測された。

#### 5 結論

TLR は腹腔内の播種の状況を反映し、根治切除後の症例においては再発予測のマーカーになりうる。腹腔内免疫細胞は播種の有無や程度によりその割合が変化する。S-1/オキサリプラチン+パクリタキセル腹腔内投与併用療法前後での腹腔内の好酸球の割合の変化を調査することが、治療効果の予測に利用できる可能性がある。

### 論文審査の結果の要旨

本論文では、胃癌患者 205 例の腹腔内の遊離癌細胞ならびに腹腔内の免疫細胞をフローサイト

メーターにより解析し、(癌細胞数) / (白血球) x 100 を TLR (tumor leukocyte ratio) と定義したうえで、TLR と播種の程度や患者予後との関連性を検討している。さらに免疫細胞の表面マーカーを解析し、その結果と種々の臨床的因子との相関も検討している。その結果、1) T4 症例は T3-1 症例よりも TLR が有意に高値である、2) T4 症例の中で TLR 高値は術後の播種再発と相関する、3) TLR 高値群では全生存期間、および播種に関する無再発生存期間が短い、などの結果が得られた。また播種症例では、CD8 陽性 T 細胞、NKT 細胞が有意に減少し、CD16 陽性の表現型を示すマクロファージの割合が有意に増加していることも判明した。

多数の患者検体を用いて、腹腔内の遊離癌細胞ならびに免疫細胞の細胞数のサブセット解析を行い、腹膜播種治療におけるバイオマーカーとしての臨床的意義をみている点は、独創性、新規性があり評価される。反面、さまざまな免疫細胞のサブセット解析を行ってはいないが、機能的な解析はされていないため、観察された相関に因果関係があるのかについての解析はされていない。またサイトカインの発現など、分子レベルの検討がなされていない点が未検討の問題点として指摘された。

このような limitation はあるものの、本研究は患者検体を多数解析し、TLR が腹膜播種の程度を反映するだけでなく、根治切除後の播種再発のマーカーになりうる可能性を示すなど、将来の発展性が見込まれる優れた研究である。よって審査員全員一致で合格と判定した。

## 最終試験の結果の要旨

審査会では、研究背景の説明は簡潔になされ、方法の説明、データの提示も明瞭であった。今回の研究成果の発展性についても十分説得力があった。現在のデータでは未検討の問題点についてもよく理解しており、適切に返答されていた。論文の記載につき、多少の修正を要する点を指摘されたが、審査終了後、すみやかに修正版が提出された。指摘された箇所が適切に修正されている点を確認したうえで最終的に合格と判定した。