



ヒト乳癌におけるHLA (human leucocyte antigen) 発現に関する免疫組織化学的研究

中澤, 健

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1991-08-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1570

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001570>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	なか ざわ たけし 中 澤 健 (新潟県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1267号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成3年8月7日
学位論文題目	ヒト乳癌におけるHLA (Human Leucocyte Antigen) 発現に関する免疫組織化学的研究

審査委員	主査 教授 斎藤 洋一
	教授 望月 真人 教授 伊東 宏

論文内容の要旨

I 緒 言

ヒトの主要組織適合抗原(以下MHC)であるHLAは、肝細胞などを除いた殆ど全ての正常有核細胞膜上に表現されており、個体の免疫発現に深く関与しているが、組織の腫瘍化に伴ってその発現が著しく減弱する場合がある。このような、腫瘍組織のHLA陰性化は担癌個体の腫瘍免疫の誘導に大きな影響を及ぼし、更にはその予後をも左右する事が予想される。そこで我々は本邦に於ける乳癌の組織分類が腫瘍の生物学的分化度や予後を反映した分類である点に着目し、免疫組織化学的に見た乳癌組織のHLA発現状況と症例の臨床病理学的特徴との関連を、予後に影響を及ぼす可能性を踏まえ、検討した。

II 対象及び方法

1 対象

昭和60年1月から昭和62年12月まで、当教室及び兵庫県立成人病センターに於て乳房切断術を施行した乳癌症例107例、及び再発例2例、計109例について検討した。平均年齢は53才、初発例では左右差無く、内側中心例が60%、組織型は乳頭腺管癌28%、充実腺管癌27%、硬癌39%、その他6%であった。

2 方法

手術摘出新鮮組織の腫瘍辺縁部分から標本を採取し、即ち OCT Compound で包埋、液体窒素にて瞬間凍結し-80℃で保存した。

Cryostat にて切片を作成し、約半日間風乾。抗 HLA class I モノクローナル抗体（コスモバイオ株式会社、IT-0107）及び、抗 class II モノクローナル抗体（Becton Dickinson Immunocytometry System, L-243）を1次抗体とし、以下PAP法または間接法を施行した。発色はDAB過酸化水素溶液で行い、核染色はヘマトキシリン液で行なった。

光学顕微鏡下に観察し、ペルオキシダーゼによる腫瘍組織の発色状況を、間質の線維芽細胞またはリンパ球の発色程度を基準に以下のように3段階に分類した。すなわち間質細胞成分の細胞膜が発色しているにも拘らず、腫瘍組織に全く発色の認められないものを、HLA発現陰性、腫瘍組織の発色程度が間質細胞膜の発色程度と同等かあるいはそれ以上の場合を強陽性、陰性と強陽性の間、または不均一な発色を呈するものを中等度陽性とした。

これらの結果と、腫瘍の組織型・腫瘍周囲リンパ球浸潤の程度・リンパ節転移程度・腫瘍径など、臨床病理像との関連を検討した。

尚、腫瘍周囲のリンパ球浸潤の程度は、腫瘍組織の辺縁に於て腫瘍をとりまくように多くのリンパ球を認めた場合をリンパ球浸潤強陽性とし、ほとんど認めない場合を陰性、その中間を中等度陽性とした。組織診断は摘出組織のパラフィン包埋によるヘマトキシリン・エオジン染色標本にて行った。

Ⅲ 結 果

1. 正常乳腺組織及び間質細胞・リンパ球の細胞表面上には、HLA抗原の強い発現を認めた。

2. 109例の乳癌症例に於ける癌組織の HLA class I 抗原の発現状況は、半数以上の61例（56%）が陰性であり、強陽性はわずか20例（18%）であった。腫瘍細胞の HLA class I 抗原と class II 抗原の発現状況は概ね相関を示したが、class II 抗原の発現程度は class I 抗原のそれより全体的に弱い傾向を示した。また class I 抗原のみ単独で発現している例は19例（20%）見られたが、class II 抗原の単独発現例は認めなかった。

3. 乳癌取扱規約に基づいた組織型分類と、HLA class I 抗原発現状況との関係を中等度以上の陽性例の占める割合からみると、予後良好な乳頭腺管癌で最もHLA陽性率が高く68%（21/31）を占めたのに対し、充実腺管癌では41%（12/29）、硬癌では28%（12/43）であり、乳頭腺管癌と硬癌の間にはHLA発現率に有意の差を認めた（ $\chi^2=10.013$, $P<0.01$ ）。

4. 症例の組織学的リンパ節転移度（n-因子）及び腫瘍径（T-因子）と HLA class I 抗原の発現状況との関係を見ると、明らかな相関関係を認めないものの、n 2 症例、T 3 症例でそれぞれ10/16例（63%）、10/15例（67%）が陰性で、腫瘍の進展に伴って陰性化する傾向が認められた。

5. 腫瘍周囲のリンパ球浸潤を検索し得た97例中、強度のリンパ球浸潤は15例にみられ、その全例（100%）で中等度以上のHLA発現を認めた。これに対しリンパ球浸潤の少ない症例は49例で、このうち中等度以上HLA発現例は15例（30%）であり、リンパ球浸潤の程度とHLA発現の有無に明らかな相関関係を認めた（ $\chi^2=19.505$, $P<0.01$ ）。

Ⅳ 考 案

MHC抗原は最初移植組織の拒絶反応を引き起こす分子として発見されたが、現在では主としてT細胞を介した抗原認識に重要な役割を演じるものと考えられている。このうち、HLA class I 抗原はCD8陽性T細胞の、class II 抗原はCD4陽性T細胞の分化誘導に関与し、ともに特異的免疫反応の惹起には不可欠である。

従来 HLA class I 抗原は全ての有核細胞の表面に表現されていると考えられたが、その後の免疫組織化学的研究で、その分布が従来考えられていたより狭く、また組織の腫瘍化によって正常組織で発現されているこの抗原が消失する場合のあることが示された。

担癌宿主が腫瘍を異物として認識し、積極的な免疫応答を示すか否かは予後を考える上できわめて重要である。癌組織に於けるリンパ球浸潤の程度と予後はよく相関することから、実際の臨床例でも何らかの形で腫瘍免疫が生じて宿主の予後に影響している可能性が高い。そしてこの腫瘍免疫発現、ことに特異的細胞傷害性T細胞の誘導に関して腫瘍細胞のHLA発現は重要な鍵を握るものと思われる。

C57BL/6マウス由来の methylcholanthrene A 誘発 fibrosarcoma 細胞を用いた分子生物学的研究では、この細胞上に消失していたH-2 k 抗原を発現させることによって、移転・増殖能を抑制し得る事が示された。少なくともこの系ではMHCを介した腫瘍特異抗原の認識が生じ、細胞傷害性T細胞が誘導されたと考えられ、腫瘍細胞上に表現されたMHCが重大な意味を有することが実験的に示唆されている。

このように宿主-腫瘍間にMHCが重要な役割を果たすことは疑いが無いが、しかしその関わり方は必ずしも単純でない。マウスの場合、細胞障害性T細胞の制限要素として作用するのはH-2 抗原で知られた3つの haplotype, K, D, L, の何れであるかは抗原の種類によって異なる事が知られている。上記の実験系ではH-2 k 抗原とH-2 d 抗原の腫瘍免疫に及ぼす態度が全く異なり、H-2 d 抗原の発現はかえって腫瘍細胞の転移増殖を促進し、免疫学的防御機構の発現を積極的に抑制している可能性を示している。

また、種々の抗原に対する宿主の反応性がMHC haplotype により規定されるという事実からみて、腫瘍免疫にも haplotype が関わる可能性は十分に考えられる。

局所における腫瘍周囲のリンパ球浸潤に関して我々の検討した97例中、リンパ球浸潤の弱い症例では腫瘍組織のHLA発現陰性例が多く、また一方強度のリンパ球浸潤はすべて陽性例にみられ、両者の間に明らかな相関を認めた。このことは、腫瘍周囲のリンパ球浸潤程度と予後が相関するという種々の報告を考えあわせると興味深い。

リンパ節転移への影響についてみると、n 2 或はT 3 症例でHLA陰性例がやや多いという傾向を認めるものの明らかな相関関計はみられず、また少数例、腋窩リンパ節転移巣のHLA発現を調べたところ、原発巣とはほぼ同じ消長を示していた。従ってこれらの結果からはHLA陰性細胞のみが免疫学的防御機構から逃れて転移増殖する、とは一概には言い切れず、前述のように haplotype にまで踏み込んだ解析が必要と考えられる。

HLA発現と腫瘍組織の分化度との関係を今回の乳癌に於ける結果から検討すると、まず正常乳腺

組織ではHLA class I 抗原は陽性であったが、乳癌組織では56%と半数以上で陰性化がみられた。また、わが国の乳癌研究会に於ける、“組織学的分化度や予後をも包括した組織分類”と比較検討すると、一般に分化型乳癌で予後良好と言われている乳頭腺管癌で最もHLA陽性率が高く(68%)、充実腺管癌(41%)、硬癌(28%)と分化度が低くなるにつれて陽性率も低くなった。すなわち乳癌におけるHLA発現は組織の分化度と相関を示すことが今回はじめて明らかとなり、予後との関連がうかがわれた。

V まとめ

今回の検討では、乳癌におけるHLA class I 抗原の消長は腫瘍の分化度と相関を示すことが明らかとなり、また腫瘍周囲リンパ球浸潤との間にも明らかな相関を認め、いずれの点からみてもHLA発現と予後との関連が伺われた。このことから腫瘍細胞膜上のHLAは宿主の腫瘍細胞認識の際に何らかの役割を演じている可能性が考えられ、HLAの存在により宿主の腫瘍免疫応答が惹起されている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒトの主要組織適合抗原(以下MHC)であるHLAは、肝細胞などを除いた殆ど全ての正常有核細胞膜上に表現されており、個体の免疫発現に深く関与しているが、組織の腫瘍化に伴ってその発現が著しく減弱する場合がある。このような、腫瘍組織のHLA陰性化は担癌個体の腫瘍免疫の誘導に大きな影響を及ぼし、更にはその予後をも左右する事が予想される。そこで研究者は本邦に於ける乳癌の組織分類が腫瘍の生物学的分化度や予後をも反映した分類である点に着目し、免疫組織化学的に見た乳癌組織のHLA発現状況と症例の臨床病理学的特徴との関連を、予後に影響を及ぼす可能性を踏まえ検討した。

すなわち、当教室及び兵庫県立成人病センターに於て乳房切断術を施行した乳癌症例を対象として、手術摘出新鮮組織の腫瘍辺縁部分から標本を採取し、直ちに OCT Compound で包埋、液体窒素にて瞬間凍結し-80℃で保存した。

Cryostat にて切片を作成し、抗 HLA class I モノクローナル抗体及び、抗 class II モノクローナル抗体を1次抗体とし、以下PAP法または間接法を施行した。発色はDAB過酸化水素溶液中で行い、核染色はヘマトキシリン液で行なった。

光学顕微鏡下に観察し、ペルオキシダーゼによる腫瘍組織の発色状況を、間質の線維芽細胞またはリンパ球の発色程度を基準に以下のように3段階に分類した。すなわち、間質細胞成分の細胞膜が発色しているにも拘らず、腫瘍組織に全く発色の認められないものを、HLA発現陰性、腫瘍組織の発色程度が間質細胞膜の発色程度と同等かあるいはそれ以上の場合を強陽性、陰性と強陽性の間、または不均一な発色を呈するものを中等度陽性とした。

これらの結果と、腫瘍の組織型・腫瘍周囲リンパ球浸潤の程度・リンパ節転移程度・腫瘍径など、

臨床病理像との関連を検討した。

その結果次の様な成績を得た。すなわち、

- (1) 正常乳腺組織及び間質細胞・リンパ球の細胞表面上にはHLA抗原の強い発現を認めた。
- (2) HLA class I 抗原の発現状況は、半数以上が陰性であり、強陽性はわずかであった。腫瘍細胞の HLA class I 抗原と class II 抗原の発現状況は概ね相関を示した。
- (3) 乳癌取扱規約に基づいた組織型分類と、HLA class I 抗原発現状況との関係を中等度以上の陽性例の占める割合からみると、予後良好な乳頭腺管癌で最も高く68%を占めたのに対し、充実腺管癌では41%，硬癌では28%であり乳頭腺管癌と硬癌の間にはHLA発現率に有意の差を認めた。
- (4) 症例の組織学的リンパ節転移度（n-因子）及び腫瘍径（T-因子）と HLA class I 抗原の発現状況との関係を見ると、明らかな相関関係を認めないものの、n 2 症例、T 3 症例でそれぞれ陰性で、腫瘍の進展に伴って陰性化する傾向が認められた。
- (5) 腫瘍周囲の強度のリンパ球浸潤では全例で中等度以上のHLA発現を認めた。これに対しリンパ球浸潤の少ない症例はこのうち中等度以上HLA発現例は30%であり、リンパ球浸潤の程度とHLA発現の有無に明らかな相関関係を認めた。

これらの成績から、乳癌における HLA class I 抗原の消長は腫瘍の分化度と相関を示すことが明らかとなり、また腫瘍周囲リンパ球浸潤との間にも明らかな相関を認め、いずれの点からみてもHLA発現と予後との関連が伺われた。このことから腫瘍細胞膜上のHLAは宿主の腫瘍細胞認識の際に何等かの役割を演じている可能性が考えられ、HLAの存在により宿主の腫瘍免疫応答が惹起されている可能性が示唆されたとの結論を得ている。

本研究は乳癌について、そのHLA発現状況をみたものであるが、従来ほとんど行われなかった予後判定因子としての役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。