

氏名	松岡 弘泰
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工博4甲 第228号
学位授与年月日	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	先進医療科学専攻
学位論文題名	Clustering based on tumor interleukin-12 subunit alpha and transforming growth factor beta 1 expression is useful for detecting tumor-infiltrating forkhead box P3-positive T cells that influence the prognosis of lung adenocarcinoma. (腫瘍組織の IL12A と TGFB1 測定は肺腺癌の予後に影響を与える腫瘍浸潤性 Foxp3 陽性 T 細胞の同定に有用である)
論文審査委員	委員長 教授 宮澤 恵二 委員 准教授 杉田 完爾 委員 講師 安藤 隆

学位論文内容の要旨

Objectives: Tumor-infiltrating regulatory T cells (Tregs) are a poor prognostic factor in lung cancer. Tregs are detected as forkhead box P3+ (FOXP3+) and cluster of differentiation (-CD) 4+ T cells. Recently, however, FOXP3+CD4+ T cells have been divided into different subtypes, including as naive, effector and non-Tregs. Whilst the classification of Tregs is important, it is difficult to divide them based on immunohistochemistry from only formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. We aimed to classify clusters following a past report of interleukin-12 subunit alpha (IL12A) and transforming growth factor beta 1 (TGFB1) messenger RNA expression levels in tumor specimens.

Materials and methods: Seventy-nine patients with lung adenocarcinoma who underwent pulmonary resection and regional lymph node dissection at our hospital between 2004 and 2011 were included in this study. Clinical data were obtained from the patients' medical records. Tumor tissue samples were obtained during pulmonary resection, and preserved as FFPE tissue specimens. Immunohistochemical staining for CD4, CD8 and FOXP3 were performed. Stained cell counts were obtained using 5 high-power fields. Complementary DNA was synthesized from total RNA extracted from FFPE tissue specimens and amplified with Taqman probes for Foxp3, IL12A, TGFB1 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Results: Two clusters were identified: IL12A^{low}TGFB1^{low} (cluster 1: n = 44) and IL12A^{high}TGFB1^{high} (cluster 2: n = 39). No significant difference in the FOXP3+ cell/CD4+ cell rat

io was observed between the two clusters ($P = 0.921$). However, the high FOXP3+/CD4+ cell ratio group was associated with significantly poorer relapse-free survival rate than the low FOXP3+/CD4+ cell ratio group in cluster 1 ($P = 0.031$).

Conclusion: Although we cannot directly prove an association between Tregs and prognosis according to each subtype, we can conclude that clustering based on tumor IL12A and TGFBI messenger RNA expression is for excluding cases whose Tregs are not associated with prognosis.

(研究の目的)

本研究では、肺腺癌における腫瘍浸潤性制御性T細胞が肺切除術後の再発に及ぼす影響を確認することを目的としている。

(方法)

2004年から2011年に山梨大学第2外科で肺切除とリンパ節郭清を施行した肺腺癌症例のうち、術後補助化学療法を施行した症例、他癌の担癌状態にある症例、炎症性疾患に罹患している症例を除いた79例を対象とした。

対象症例の背景・術後経過についてはカルテから収集し、肺切除検体はホルマリン固定後、パラフィン包埋されたものを使用した。

パラフィンブロックから薄切切片を切り出し、CD4、CD8、FOXP3に対する免疫染色とRNAの抽出を行った。免疫染色標本は、連続切片を使用し、FOXP3はその陽性細胞が多い個所を強拡大5視野で、CD4についてはその同一視野でカウントを行った。CD8はその陽性細胞が多い個所を強拡大5視野でカウントを行った。抽出したRNAは相補的DNAに逆転写し、Foxp3、IL12A、TGFBI、GAPDHのTaqmanプローブとともにPCRを行った。

(結果)

腫瘍部のIL12AとTGFBIのRNA発現レベルから、クラスター解析を用いてIL12A_{low}TGFBI_{low}のクラスター1 ($n=44$) とIL12A_{high}TGFBI_{high}のCluster2 ($n=35$) へと分けることができた。2つのクラスター間では、クラスター1の症例で有意に無再発生存率が低かった ($P=0.039$)。

FOXP3陽性細胞数とFOXP3陽性細胞/CD4陽性細胞比は無再発症例に比べて再発症例で有意に高値であった (それぞれ $P=0.018$, $P=0.012$)。クラスター1と2の症例では、FOXP3陽性細胞数とFOXP3陽性細胞/CD4陽性細胞比に有意差を認めなかった (それぞれ $P=0.594$, $P=0.921$)。比例ハザード回帰分析にて多変量解析を行ったところ、全症例の再発に対する危険因子はリンパ節転移 (ハザード比5.219)、病理病期Ⅱ期以上 (ハザード比11.37)、血管浸潤あり (ハザード比4.817) であったのに対し、クラスター1のみでは、腫瘍最大径 >3.5 cm (ハザード比3.88)、リンパ節転移 (ハザード比

7.683)、血管浸潤 (ハザード比3.945)、FOXP3陽性細胞/CD4陽性細胞比 >0.192 (ハザード比4.461) であった。

(考察)

FOXP3陽性T細胞は、様々な悪性腫瘍内に存在が確認され、腫瘍の免疫逃避に関与するといわれている。また、近年ではFOXP3陽性細胞にはいくつかの分画があることを示す報告が散見される。中でも、FOXP3強陽性、CD45RA陰性のEffector Tregと呼ばれる分画が免疫逃避に関与し、FOXP3弱陽性、CD45RA陽性non-Tregと呼ばれる分画は炎症に関与すると報告されている。この報告の中で、腫瘍組織のRNAの発現を調べたところ、IL12AとTGFBIが高発現の症例では、non-Tregが多かったと結論がなされている。

我々の研究では、直接的にFOXP3陽性細胞の分画を測定することはできていないが、この報告と同様に、症例全体ではFOXP3陽性細胞/CD4陽性細胞比が高値であることは独立した再発の危険因子ではなかったのに対し、IL12A^{low}TGFB1^{low}のクラスター1では独立した再発の危険因子であった。すなわち、腫瘍組織のIL12AとTGFB1のRNA発現を調べることで、non-Tregが多く、FOXP3陽性細胞/CD4陽性細胞比が予後不良因子となりえない群を除外できたのではないかと考えた。

(結論)

、腫瘍組織のIL12AとTGFB1のRNA発現を調べることで、FOXP3陽性細胞/CD4陽性細胞比が予後不良因子となりえない群を除外できる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

1. 学位論文テーマの学術的意義

肺腺がんにおいて Treg は予後不良因子である。Treg は FoxP3⁺CD4⁺の T 細胞であるが、このマーカーを持つ T 細胞の中には non Treg が含まれることが明らかになっている。また、肺がんでは腫瘍細胞そのものが FoxP3 を発現している例もあり、腫瘍組織全体での FoxP3 発現解析に影響する可能性がある。このため、FoxP3 の発現と予後の相関についての見解は、がんの種類によってまちまちで、一致していない。本研究では、ホルマリン処理された肺腺がんのパラフィン包埋組織を題材に、Treg の浸潤量を評価する方法の開発を試みている。まず、患者由来の 79 検体を IL-12A と TGF-β1 の mRNA の発現により Cluster1 (IL12A^{low}TGFB1^{low})、Cluster2 (IL12A^{high}TGFB1^{high}) に分類した。次に FOXP3⁺/CD4⁺ の比率を免疫組織学的に検討したところ、Cluster1 では FOXP3⁺/CD4⁺の比率が高い時に予後が悪いことが明らかとなった。一方、Cluster2 は全般に予後が良かった。

本研究は、結果にバイアスを与える要因を除外しながら FOXP3⁺/CD4⁺の比率を指標に Treg の浸潤を評価し、予後との対応を明らかにした点で学術的に評価される。

2. 学位論文および研究の争点、問題点、疑問点、新しい視点等。

本研究では免疫組学的解析において検討する細胞数を多くするため、CD4⁺細胞の浸潤が多く見られる部位 (ホットスポット) を中心にデータを収集している。これに対し、ランダム視野で収集すべきとの考えも示され、データ収集の客観性については議論の余地があると考えられる。

また、今回はホルマリン処理したパラフィン包埋組織を用いた検討であり、回収できる mRNA の質、切片の抗体への応答性の面で十分ではない点があることは否めない。

3. 実験およびデータの信頼性

データは全て適切な統計処理を経て議論されている。その点では信頼性は十分にあると考えられる。

4. 学位論文の改善点、等々。

投稿中の論文をベースとしたため、発表会で出したデータで学位論文に含まれていないものがあつた。このうち、Cluster1 と Cluster2 の Kaplan-Meier 生存曲線は、差が大きく印象的だった。そ子で、これらを学位論文に追加し、関連した内容を本文に加筆することを要望した。再提出された論文は審査委員長が確認し、最終的に合格と判断した。