

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 添野 孝文



論文題目

「CD33<sup>+</sup> Immature Myeloid Cells Critically Predict Recurrence in Advanced  
Gastric Cancer

(進行胃癌における CD33 陽性未成熟骨髓細胞の意義)」

指 導 教 授 承 認 印

比 企 直 樹



## 論文題目

# CD33<sup>+</sup> Immature Myeloid Cells Critically Predict Recurrence in Advanced Gastric Cancer

(進行胃癌における CD33 陽性未成熟骨髄細胞の意義)

氏名 添野 孝文

### 【背景】

胃癌は、世界のがん死亡原因の第3位(男性)、第5位(女性)である。術前 TNM 病期分類は、胃癌患者の適切な治療戦略を決定するのに有用であるが、長期的な転帰を予測するには不十分である。再発リスクの高い患者を選択するだけでなく、新たな治療法の研究にも貢献できる有用なバイオマーカーを見つけることが必要である。

癌の進行は、宿主の免疫監視からの逃避にかかっている。腫瘍微小環境では、免疫細胞の調節不全により、骨髄由来抑制細胞(MDSC)などの免疫抑制細胞が増強される。近年、MDSCと呼ばれる未熟骨髄系細胞が、Tリンパ球やナチュラルキラー(NK)細胞の活性を抑制することで、癌の免疫回避に寄与していることが明らかになっている。MDSCは、末梢血、リンパ節、骨髄、および腫瘍部位で頻繁に増加し、消化器癌ではMDSCのレベルが腫瘍のステージを反映している。人間の腫瘍組織では、ほとんどのCD33<sup>+</sup>細胞が免疫抑制的なMDSC様の活性を示す。胃癌を含む様々な癌において、どのタイプの免疫細胞が胃癌において最も重要であるのかはまだ不明である。そこで、本研究では、胃癌患者における免疫細胞の重要性を、未熟骨髄系由来の免疫細胞に着目して明らかにすることを目的とした。

### 【対象と方法】

**対象：**2002年から2010年までに北里大学病院において胃癌と診断され、根治的リンパ節切除(D2)を伴う根治的胃切除術を受けた1673例を対象とした。病理学的に進行胃癌と診断されたのは733例であり、pStage II/IIIと診断されたのは396例であった。168例に術後補助化学療法S-1が行われた。CD33免疫組織化学で十分なサンプルの質が得られた139例が最終的にこの研究で分析された。

**方法：**手術時病理検体を用い、CD33免疫組織化学染色を行った。癌部、間質、癌浸潤部3か所の平均値としてCD33<sup>+</sup>細胞数を測定し、臨床病理学的特徴を検討した。根治的胃切除術後5年以内に発生した場合を「再発」と定義した。術後5年の時点で再発の兆候がない場合を「非再発」とした。

**CD33免疫組織化学：**ホルマリン固定したパラフィン包埋ブロックから厚さ4 $\mu$ mの連続切片を作成した。抗原除去は、抗原除去用緩衝液(1.8mMクエン酸、8.2mMクエン酸ナトリウム、0.05%Tween20、pH6.0)を用いて121 $^{\circ}$ Cで10分間オートクレーブ処理を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性は、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノールを用いて室温で5分間インキュベートすることでブロックし、非特異的結合は10%正常ウサギ血清を用いて室温で10分間インキュベートすることでブロックした。抗CD33マウスモノクローナル抗体(NCL-L-CD33, Leica Biosystems)を加え、ス

ライスを 4℃で一晩インキュベートした。Histofine® SAB-PO(M)キット (NICHIREI BIOSCIENCES, Inc, Tokyo, Japan) を用いて免疫複合体を検出した。これらの免疫複合体は、3,3'-diaminobenzidine (DAB) 基質を発色剤として用いて3分間発光した。切片はヘマトキシリンで対比染色した。

統計解析：カテゴリ変数には $\chi^2$  検定またはフィッシャーの正確検定を適用し，連続変数には student t 検定を用いた。5年無再発生存率 (RFS) は Kaplan-Meier 曲線で推定し，log-rank 検定で比較した。単変量解析で予後の可能性を示した変数を用いて，多変量比例ハザードモデルを採用した ( $p < 0.05$ )。連続変数の場合は，ROC 曲線を用いてカットオフ値を決定した， $p < 0.05$  を有意とした。すべての統計解析は JMP Pro 14 (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) を用いて行った。

## 【結果】

### 患者および疾患の特徴

男性が 73.4%，女性が 26.6%であった。年齢の中央値は 65 歳 (範囲：30～83 歳) であった。観察期間中央値は 61 ヶ月であった。腫瘍部位は，M/L が 68.3%を占めた。組織型は，未分化型が分化型よりも多かった (64.7% 対 35.3%)。Stage II が 43 名 (30.9%)，Stage III が 96 名 (69.1%) であった。T2, T3, T4a, T4b はそれぞれ 16.5%，21.6%，60.4%，1.4%であった。リンパ管侵襲，血管侵襲がある患者は，それぞれ 95.0%，90.6%であった。

### CD33+細胞の動員は Stage II/III 胃癌における疾患再発を予測する

再発患者では，原発腫瘍における CD33+細胞数の分布が有意に高かった。再発を予測するため CD33+細胞数の最適なカットオフ値を ROC 曲線で算出した。カットオフ値 37.8 は，高い感度 (79%) と特異性 (72%)，高い AUC (0.81) で再発を予測した。CD33+細胞数が 37.8 個以上の患者の 5年 RFS は 29.0%であったが，37.8 個未満の患者は 79.4%であった。単変量解析では，原発巣の CD33+細胞数が多い (CD33-hi)，高齢 (65 歳以上)，近位部 (食道または胃上部)，分化度，pT 因子 (T4)，リンパ節転移，pStage III，血清 CA19-9 が RFS 不良と有意に関連していた。多変量解析では，原発巣の CD33-hi が独立した最も強固な予後因子であった。

### 各 Stage における予後の分析

pStage II の単変量解析では，原発巣の CD33-hi，高齢，男性，近位部 (E/U) が，予後を有意に左右した。CD33-hi は予後不良であった (5年 RFS : 38.5%)。一方，CD33+細胞数が少ない (CD33-lo) 群の 5年 RFS は 93.1%であった。再発患者は，pStage II で有意に高い CD33+細胞数を示した。多変量解析の結果，CD33-hi は，pStage II において独立した，最も強固な予後因子であった ( $p < 0.01$ )。

pStage III では，単変量解析において，CD33-hi，組織型，T4，血清 CA19-9 が予後と有意に関連していた。CD33-hi は，CD33-lo (5年 RFS 71.2%) に比べて，有意に予後不良であった (5年 RFS 26.1%， $p < 0.01$ )。再発患者は，pStage III で有意に高い CD33+細胞数を示した。多変量解析では，pStage III においても，原発巣の CD33-hi が予後不良を独立して予測した。

### CD33-hi と末梢白血球分画およびその他の臨床病理学的因子との関連

pStage II/III 胃癌における相関分析では，臨床病理学的因子，末梢白血球分画は原発巣の

CD33+細胞数との有意な関連を示さなかった。

### Stage II/III 胃癌における再発パターンと CD33+細胞数

再発パターンと CD33+細胞数の関連性を評価した。CD33-hi 群は血行性再発と有意に関連していた。一方、リンパ節再発は CD33+細胞数と逆相関していた。

#### **【考察】**

術後 S-1 療法を受けた根治切除後の進行胃癌において、原発巣への大量の CD33+細胞の浸潤が血行性再発を予測する重要な要因であることを明らかにした。本研究では、CD33+細胞の原発巣への動員は、Stage II/III 両方で、病気の再発と劇的に関連していた。Stage II でも CD33-hi 群は、5年 RFS (38.5%) を示し、CD33-hi の Stage III の患者 (26.1%) と同程度であった。これまでの報告では、原発巣に浸潤した MDSC と循環している MDSC が正の相関関係にあり、両者は腫瘍の病期や転移と関連しているとされていた。しかし、本研究では、Stage II 胃癌において、CD33-hi は、末梢単球率が高いこととわずかに関連している以外は、末梢白血球率との有意な相関はなかった。これらの結果は、増殖した CD33+未熟骨髄系細胞の数は、全身の主要な白血球集団の数に影響を与えるには比較的小さいことを示唆していると思われる。しかし、CD33+細胞の大量増殖は、原発性腫瘍において免疫抑制作用を発揮し、癌の再発につながると考えられる。

CD33+細胞は、未熟骨髄系由来の免疫細胞である。人間の固形癌では、原発巣の CD33+細胞のほとんどが骨髄由来のサブレッサー細胞 (MDSC) で構成されている。MDSC は、上皮間葉転換 (EMT) や間葉上皮転換 (MET) を促進することで、遠隔転移にも関与している。MDSCs は、抗癌剤や放射線治療に対する抵抗性に極めて重要な役割を果たしている。MDSC が免疫チェックポイント阻害剤の抗癌作用を阻害すると考えられている。その結果、循環する MDSC は、様々な癌の臨床病期や転移性腫瘍と相関している。CD33+細胞の動員は、血行性再発と密接に関連していたが、リンパ節再発とは逆に相関していた。これらの結果は、腫瘍の進行における CD33+細胞の活動を反映していると考えられる。

結論として、原発巣における CD33-hi は、胃癌を根治切除した場合に高リスクの患者を選択できる可能性があることがわかった。本研究の利点の 1 つは、連続した根治手術と S-1 療法からなる標準的な治療を受けた同質的な患者集団で実施されたことである。CD33+未熟骨髄系由来の免疫細胞は、再発や S-1 感受性のメカニズムを明らかにする手がかりとなるだろう。