

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591533

研究課題名（和文） 胃癌所属リンパ節転移とリンパ節内樹状細胞活性化の検討

研究課題名（英文） Evaluation of immune response and metastatic status in regional lymph nodes in patients with gastric carcinoma

研究代表者

二宮 致 (NINOMIYA ITASU)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：60345618

研究成果の概要：

胃癌所属リンパ節内での癌微小転移と樹状細胞活性化を指標とする腫瘍免疫の関係につき検討した。その結果胃癌所属リンパ節においては微小転移が成立する前段階で、樹状細胞の成熟による免疫応答が認められ、この反応は所属リンパ節内で広範囲に認められた。しかし顕微鏡的に癌細胞集塊が確認できる転移状態では樹状細胞の活性化は低下しており免疫応答反応は終息している事が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌、リンパ節転移、微小転移、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

消化器癌の重要な転移経路としてリンパ節転移がある。本来消化管周囲の所属リンパ節は、消化管内の食物や細菌などの異種抗原に対する消化管免疫や消化管粘膜に発生した腫瘍細胞に対する腫瘍免疫に重要な役割を果たしているはずである。腫瘍に対する免疫はまず腫瘍抗原の認識から始まる。腫瘍細胞の抗原を認識する抗原提示細胞には B 細胞、マクロファージ、(Dendritic cell ; DC)などが知られているが、中でも特に DC は強力な抗原提示細胞として注目されている。腫瘍組織に分布する DC は強い貪食能を有し、

血流不足などの原因で死滅した腫瘍細胞の腫瘍抗原を貪食し、消化分解する過程で分化し成熟 DC となる。成熟 DC は腫瘍局所を離れて所属リンパ器官に移動する。成熟 DC の貪食能は低下するが、抗原ペプチドを表出することにより、所属リンパ節中で T 細胞に抗原を提示する。この結果、特異的免疫応答が誘導されるとされている。これまでの研究では Micrometastasis と呼ばれる微小なリンパ節転移の有無も予後不良因子となりうるという報告が多い。しかし宿主においては転移が成立する以前から腫瘍抗原に対する免疫応答が行われているはずであり、さらに微

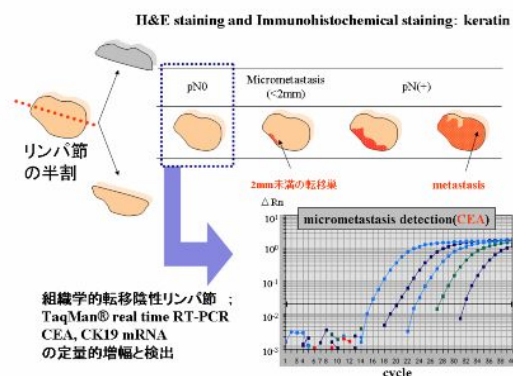
小さな転移巣は宿主の免疫により排除される可能性も含め実際にリンパ節転移として成立していくかどうかは未だ議論の分かれるところである。本研究では胃癌所属リンパ節内での免疫応答として DC の活性化に着目し、所属リンパ節において微少転移と DC 活性化を指標とする腫瘍免疫の関係を検討することを着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では胃癌所属リンパ節内での免疫応答として DC の成熟化に着目し、所属リンパ節において癌微少転移と DC の成熟化を指標とする腫瘍免疫の活性化を観察し、転移と免疫応答の関係を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

胃癌のリンパ節転移の検出は通常、HE 染色による病理検査にて行われているが、病理検査にて検出しない微小転移巣の検出は、通常上皮細胞の表面マーカーである Cytokeratin を免疫組織学的に染色することにより行った。また組織学的検索方法は切片の作成枚数により転移検出感度が左右されてしまうため、リンパ節全体を検査する方法としてはリンパ節全体より RNA を抽出し、癌細胞の Marker として CEA や CK19 mRNA を用いて RT-PCR 法による検出を行った。PCR による遺伝子増幅法は定量性に欠けるため、TaqMan real time RT-PCR 法による定量的増幅を行って高感度かつ定量的な癌転移の観察を行った。

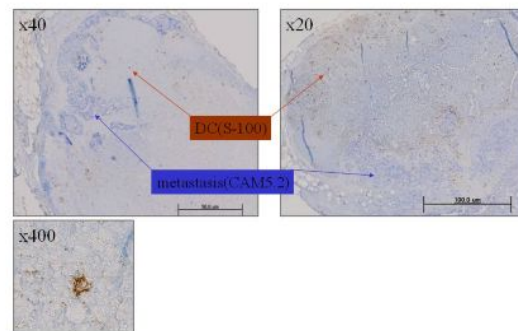


樹状細胞の検出では、転移癌細胞との局在を判定するためには組織学的方法が必要である。なかでも成熟樹状細胞はその表面に CD83 などの表面抗原を表出することがわかっており、CD83 に対する免疫組織染色にて判定される。特に癌転移巣との関係の把握のためには CK 抗原との二重染色を行う。RT-PCR 法でのみ検出される癌微小転移を伴うリンパ節内の樹状細胞成熟性の確認のためには、未熟樹状細胞のマーカーとして CD1a、成熟樹状細胞のマーカーとして CD83 CD86 mRNA を用いて Real time TaqMan RT-PCR を行うことにより、樹状細胞の成熟化の程度を定量的に観察した。

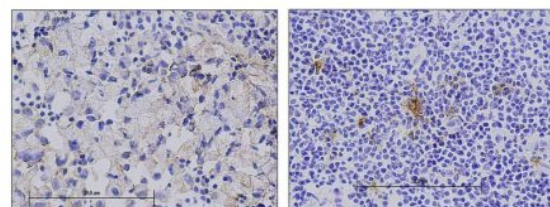
4. 研究成果

4 例の組織学的リンパ節転移陽性胃癌患者に対し所属リンパ節郭清を伴う根治手術を施行し119 個のリンパ節を摘出した。郭清リンパ節に対し S100, CD83 の免疫組織染色を行い DC を観察、さらに CK19 ならびに CAM5.2 を用いた免疫染色により転移の検出を行い。転移と DC 活性化の間係を検討した。その結果リンパ節転移の程度による成熟 DC の分布及び細胞密度に違いは認められなかった。

Double immunohistochemical staining of S-100 and CAM5.2



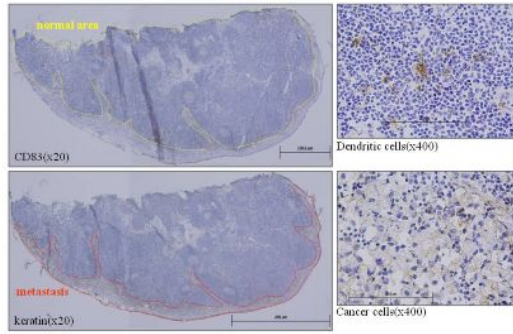
リンパ節の免疫組織染色



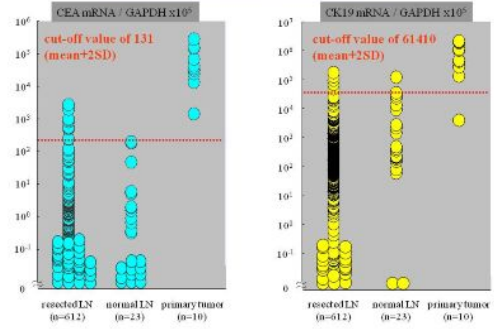
Keratin染色による癌細胞の検出(x400)

CD83免疫染色による樹状細胞の検出(x400)

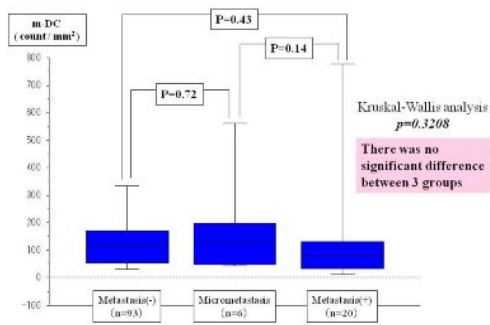
Immunohistochemical staining of MM and DC's



Quantitative analysis of CEA and CK19 mRNA



Extent of metastasis and m-DC density



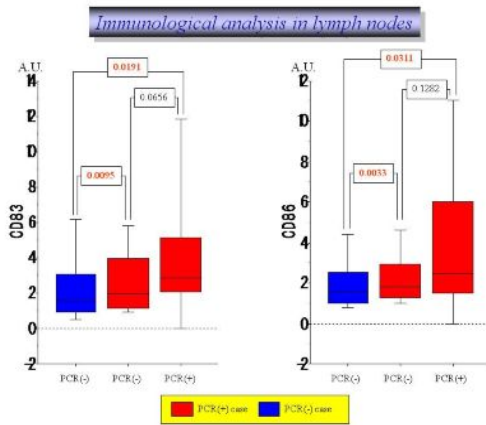
Micrometastasis in pN0 gastric cancer patients

RT-PCR positive lymph nodes	
CK19	4/613 (0.65%)
CEA	11/613 (1.79%)
CK19 or CEA	15/613 (2.45%)

RT-PCR positive cases	
CK19	2/25 (8%)
CEA	4/25 (16%)
CK19 or CEA	6/25 (24%)

上記結果より顕微鏡的に観察可能なレベルのリンパ節転移が成立した状態では既にDCによる免疫応答が終了していると考えられた。そこで次に25例の術前リンパ節転移陰性胃癌患者に対し所属リンパ節郭清を伴う根治手術を施行し合計 613個のリンパ節を摘出した。病理学的に全例リンパ節転移陰性であった。RT-PCR 法による分子生物学的手法を用いて、リンパ節内微小転移の検出を行った。その結果 613個中15個 2.45%のリンパ節に微小転移を検出した。

これらは病理学的に全例リンパ節転移陰性であった。次にこれらのリンパ節において、成熟樹状細胞のマーカとして CD83 mRNA を用いて Real time TaqMan RT-PCR を行うことにより、樹状細胞の成熟化の程度を定量的に観察した検討したところ微小転移陽性リンパ節では、活性DC由来のCD83, CD86 mRNAの高発現が確認された。CD83, CD86 mRNAは微小転移陽性リンパ節で最も高発現であったが、転移陽性症例における転移陰性リンパ節内でも高いCD83, CD86 mRNAの発現が認められた。



Immunological analysis in PCR(+) and PCR(-) cases

mRNA expression	PCR positive cases (n=6)	PCR negative cases (n=19)	p value
	median (range)	median (range)	
CD83	2.03 (0-18.7)	1.61 (0-107.1)	0.0020
CD1a	0.83 (0-617.7)	0.78 (0-700.0)	0.3332
CD86	1.85 (0-29.3)	1.54 (0-75.5)	0.0008
IFN γ	1.84 (0-819.8)	2.03 (0-163.4)	0.6941

Statistics: Mann-Whitney's U-test

Immunological analysis in PCR(+) and PCR(-) lymph nodes

mRNA expression	PCR positive LN (n=15)	PCR negative LN (n=598)	p value
	median (range)	median (range)	
CD83	2.80 (0-18.7)	1.72 (0-107.1)	0.0242
CD1a	0.81 (0-6.7)	0.79 (0-700.0)	0.5864
CD86	2.45 (0-22.8)	1.65 (0-75.5)	0.0421
IFN γ	5.24 (0-819.8)	1.94 (0-376.8)	0.1176

Statistics: Mann-Whitney's U-test

Immunological analysis in lymph nodes

mRNA expression	PCR(+) case		PCR(-) case	p value
	PCR(+) LN (n=15)	PCR(-) LN (n=136)	PCR(-) LN (n=462)	
CD83	2.80 (0-18.7)	1.91 (0-12.0)	1.61 (0-107.1)	0.0030
CD1a	0.81 (0-6.7)	0.81 (0-6.7)	0.78 (0-700.0)	0.4381
CD86	2.45 (0-22.8)	1.80 (0.5-29.3)	1.54 (0-75.5)	0.0018
IFN γ	5.24 (0-819.8)	1.78 (0-376.8)	2.03 (0-163.4)	0.2030

Statistics: Kruskal Wallis analysis

以上より胃癌所属リンパ節においては微小転移が成立する前段階で、樹状細胞の成熟による免疫応答が認められ、この反応は所属リンパ節内で広範囲に認められることが

明らかとなった。しかし顕微鏡的に癌細胞集塊が確認できる転移状態ではDCの活性化は低下しており免疫応答反応は終息していると考えられた。本研究は胃癌のリンパ節転移の成立と宿主免疫の関係を考察する上で重要な意義をもつと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1件)

① 中村 慶史、二宮 致

胃癌リンパ節転移による所属リンパ節内免疫応答の検討

第 67 回日本癌学会、2008. 10. 29、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二宮 致 (NINOMIYA ITASU)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号:60345618

(2) 研究分担者

太田 哲生 (OHTA TETSUO)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 40194170

藤村 隆 (FUJIMURA TAKASHI)

金沢大学・附属病院・講師
研究者番号: 50262580