

原 著

胃癌原発巣における腫瘍浸潤リンパ球と腫瘍細胞の アポトーシス発現程度および予後との関連について

岐阜大学医学部第2外科

安江 紀裕 熊沢伊和生 杉山 保幸
国枝 克行 佐治 重豊

目的：癌局所環境における生体反応と予後との関連を腫瘍細胞と腫瘍浸潤リンパ球(TIL)のアポトーシス発現程度から検討し、その臨床的意義を評価した。**方法：**対象は1992年から5年間に経験し、予後が判明している49例。方法は切除標本から薄層連続切片を作製し、H.E染色および抗Tリンパ球抗体(UCHL-1)を用いたLabelled Streptavidin Biotin法で腫瘍細胞とTILを同定後、連続する対側切片を用いてTUNEL染色し、陽性細胞発現頻度(AI,%)を辺縁部と中心部と比較検討した。**結果：**①腫瘍細胞のAI値は辺縁部で高く、中心部では病期、n因子、壁深達度の進行に伴い低下した。②TILの浸潤程度は中心部で高いほど壁深達度が有意($p=0.024$)に浅く、AI値が高いほど深達度が有意($p=0.024$)に深かった。③単位面積当たり180個と比較するとTILが多いほど予後は有意($p<0.002$)に良好であった。④腫瘍細胞のAI値は辺縁部、中心部とも高値群の予後が低値群に比べ有意($p<0.05$)に良好であった。⑤TILのAI値は辺縁部(0.70)、中心部(1.00)とも低値群の予後が高値群に比べ有意($p<0.03$, $p<0.001$)に良好であった。**考察：**腫瘍細胞とTILのアポトーシス発現頻度の検索は、とくに中心部で予後予測や補助療法の選択の上で、有用な上方を提供可能と推察された。

緒 言

手術時採取した摘出標本の病理組織学的所見で、腫瘍局所での好中球やリンパ球の浸潤程度と予後が相関するとの考え¹⁾、腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocytes:以下、TIL²⁾の存在が注目され、その意義が検討されてきた。すなわち、TILによる免疫学的抗腫瘍作用による癌細胞の破壊であるが、その後の検討で、TILの浸潤程度と予後との関連を否定する報告が散見される³⁾。理由としてTILの中には細胞傷害性リンパ球と腫瘍増殖性リンパ球が存在するため、TILの浸潤が予後の改善に直結しないとの考えである。

ところで、TILによる腫瘍細胞の破壊は壊死(ネクローシス)よりも枯死(アポトーシス)による可能性が高いことから⁴⁾、腫瘍細胞のアポトーシス発現の程度が注目され、これが予後と相関することで、再度TIL

浸潤程度の解析が試みられている^{5,6)}。しかし、癌微小環境では遺伝子の多段階変異の蓄積によりアポトーシスから解除された癌細胞が無限の増殖を開始するが、一部はTILなどの攻撃を受けアポトーシスに陥る。一方、TILもアポトーシスを繰り返しながら、腫瘍・宿主環境を構築するので、予後の予測には腫瘍細胞とリンパ球双方でのアポトーシス発現程度の検索が重要と推察される。そこで、今回癌局所環境における生体反応と予後との関連を、癌細胞とTILのアポトーシス発現程度から評価し、その臨床的意義を検討した。

研究対象と研究方法

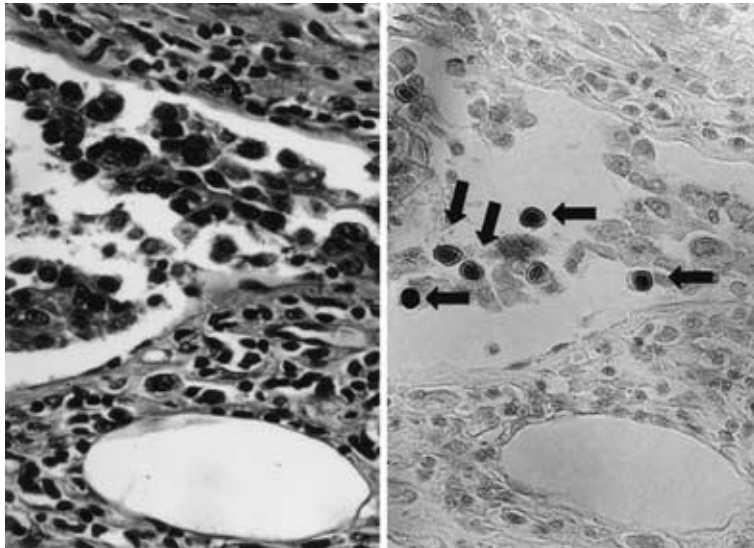
1. 対象

1992年から5年間に教室で経験した胃癌切除症例で、術後5年以上を経過し予後が判明している症例の中から病期別頻度が全国集計⁷⁾と近似する症例で、予後との関連でstage I aとstage IVの根治度C症例⁸⁾を除外した。その結果、stage Ibが12例、IIが11例、IIIaが11例、IIIbが5例、IVが10例の計49例となった。

2. 方法

1) 標準作製法：手術時採取した胃癌原発巣を直ち

Fig. 1 Positive stain of cancer cells. Lt : H. E. stain, Rt : TUNEL stain



に10%中性緩衝ホルマリン液にて24時間固定後パラフィン包埋し、3 μ mの薄層連続切片を作製した。

2) 染色法：通常のHematoxylin Eosine (以下, H. E.) 染色, および1次抗体として抗Tリンパ球抗体, UCHL-1 (Dako社製)を用いたLabelled Streptavidin Biotin法 (LSAB2キット/HRP)による免疫染色⁹⁾で癌細胞とTILを同定後, その浸潤程度を観察した。次に, これと連続する対側切片を用いてterminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (以下, TUNEL)法¹⁰⁾にて免疫染色しアポトーシスの有無を検索した。

3) 判定法：400倍視野にてTUNEL陽性細胞を検出し, 対側のH.E.染色所見で核クロマチンの凝縮程度からDNAの断片化が形態学的に確認できた細胞を陽性細胞とし, 2名で判定した。また, アポトーシスの発現頻度はapoptotic index (以下, AI) 値として, 癌組織辺縁部 (以下, 辺縁部) と内部 (以下, 中心部) で, 単位面積 (0.96mm²) 当たりの陽性細胞数を求め, 各3か所の平均値を%で表示した。

判定は腫瘍細胞 (Fig. 1) およびTIL (Fig. 2) 別にAI値を算定し, 臨床病理学的因子や予後との関連を比較検討した。

3. 統計学的処理法

得られた測定値はmean \pm standard deviation (m \pm SD) で表示し, 検定にはMann-Whitney's U-testを用

いた。AIのcut off値は得られた測定値をReceiver operating characteristic (受信者動作特性; 以下, ROC)¹¹⁾ 曲線上に描記し, 左上隅に最も近い値を採用したが便宜上2種のcut off値を採用し, それぞれ評価に用いた。なお, 統計学的有意差はMann-Whitney's U検定, 順位のないカテゴリー変数による分析には χ^2 検定にて判定し, 多群間の検定には, Kruskal-Wallis検定を用いた。また, 累積生存率はKaplan-Meier法にて算出しlogrank testを用いて検定した。いずれも危険率5%未満を有意差ありと判定した。

研究結果

1. 対象症例の特徴

病期別頻度を全国胃がん登録調査報告 (stage IaとIVの根治度Cを除外した修正頻度はIbが23.6%, IIが22.7%, IIIaが23.5%, IIIbが17.4%, IVが12.7%)³⁾ に類似させた結果, $p=0.813$ と高い相関を示した。なお, 各因子別では壁深達度ではssとse症例が, リンパ節転移度ではn0, n1例が, 病理組織学的には未分化型 (低分化がた23例, 印環細胞癌6例, 粘液癌1例) の頻度が多かった (Table 1)。

2. 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の浸潤程度

癌微小環境におけるTILの平均値は辺縁部で228 \pm 89 (個), 中心部で202 \pm 82で辺縁部に多くなる傾向 ($p=0.07$) が観察された。これを病期別, 壁深達度別, リンパ節転移度別, 組織型別にみると, 中心部で単位

Fig. 2 Positive stain of lymphocytes. Lt : UCHL-1 stain, Rt : TUNEL stain

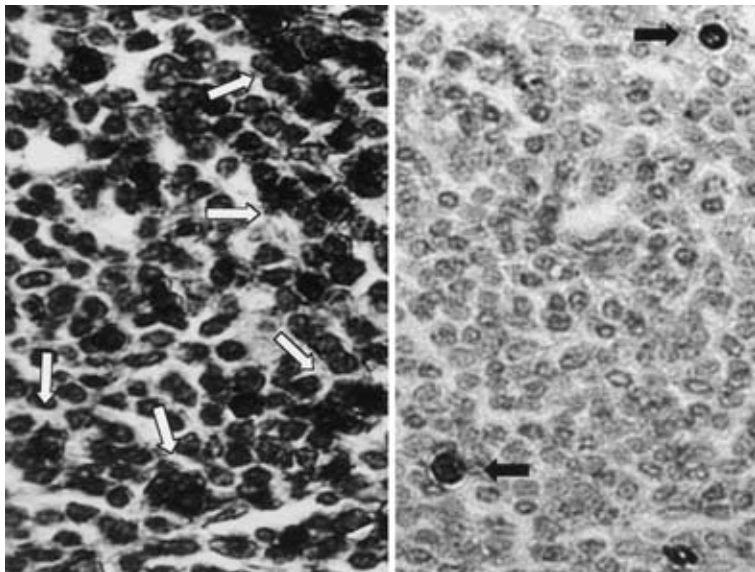


Table 1 Patient backgrounds according to the Japanese Classification of gastric carcinoma

stage I b	12 (24.5%)	n0	17 (34.7%)
stage II	11 (22.4%)	n1	16 (32.7%)
stage III a	11 (22.4%)	n2	8 (16.3%)
stage III b	5 (10.2%)	n3	8 (16.3%)
stage IV	10 (20.4%)		
sm	1 (2.0%)	differen 1)	19 (38.8%)
mp	10 (20.4%)	undifferen 2)	30 (61.2%)
ss	19 (38.8%)		
se	18 (36.7%)		
s (sei)	1 (2.0%)		

1) differentiated; pap and tub

2) undifferentiated; por, sig and muc

面積当たりで ROC 曲線より得られた 180 個で比較すると, TIL の浸潤程度が高いほど深達度が有意 ($p = 0.024$) に浅く, 辺縁部でも単位面積当たり 200 個と比較すると同様傾向 ($p = 0.079$) が観察された. なお, 有意差はみられなかったが, リンパ節転移度 (n) と病期 (stage) との関連では, stage の方に軽度の関連が示唆された (Table 2, 3). 他に辺縁部で, v 因子が高くなると, TIL の浸潤が有意 ($p = 0.002$) に増加した.

3. TIL の TUNEL 陽性細胞の頻度 (AI 値)

病理組織型別にみた AI 値は, 中心部で分化型 (0.844

$\pm 0.633\%$) が未分化型 ($1.041 \pm 0.750\%$) に比べ低値を示したが有意差はみられなかった. 一方, 辺縁部でも文化型 ($0.820 \pm 0.629\%$) と未分化型 ($0.846 \pm 0.410\%$) の間に差はみられなかったが, 中心部の AI 値は, 深達度が高くなると, 増加する傾向 ($p = 0.099$) を認めた (Table 2).

4. 腫瘍細胞のアポトーシス発現頻度

AI 値は辺縁部が $1.002 \pm 0.713\%$ で中心部の $0.901 \pm 0.503\%$ に比べ高値を示したが有意差はみられなかった (Table 2). また, 病理組織学的所見との関連で AI

Table 2 Relationship between the rate of tumor infiltrating lymphocyte and apoptotic index (AI) of cancer cell (TIL) around the marginal area or deep layer of the tumor

	marginal area			deep layer		
	rate of TIL	rate of apoptotic index (%)		rate of TIL	rate of apoptotic index (%)	
		cancer cell	(TIL)		cancer cell	(TIL)
total cases	228 ± 89	1.002 ± 0.719	(0.846 ± 0.489)	202 ± 82	0.901 ± 0.503	(0.964 ± 0.707)
stage I b	246 ± 96	1.228 ± 0.679	(0.858 ± 0.586)	235 ± 106	1.139 ± 0.448	(0.533 ± 0.276)
stage II	260 ± 117	1.131 ± 0.839	(0.996 ± 0.574)	204 ± 81	0.980 ± 0.345	(1.084 ± 0.710)
stage III a	212 ± 52	1.042 ± 0.931	(0.739 ± 0.522)	193 ± 96	0.875 ± 0.484	(0.832 ± 0.490)
stage III b	187 ± 91	0.613 ± 0.483	(0.907 ± 0.399)	172 ± 32	0.650 ± 0.583	(1.557 ± 1.463)
stage IV	206 ± 78	0.754 ± 0.303	(0.754 ± 0.250)	188 ± 45	0.647 ± 0.601	(1.103 ± 0.608)
sm	288	1.035	(0.393)	215	0.936	(0.224)
mp	265 ± 100	1.100 ± 0.654	(0.819 ± 0.619)	248 ± 86	0.941 ± 0.292	(0.744 ± 0.489)
ss	216 ± 94	1.090 ± 0.645	(0.853 ± 0.508)	198 ± 87	1.23 ± 0.532	(0.860 ± 0.613)
se	212 ± 79	0.855 ± 0.868	(0.894 ± 0.434)	184 ± 73	0.766 ± 0.570	(1.196 ± 0.850)
si	297	1.012	(1.044)	146	0.571	(1.734)
n0	233 ± 105	1.129 ± 0.810	(0.920 ± 0.521)	228 ± 108	1.022 ± 0.511	(0.801 ± 0.459)
n1	239 ± 96	1.066 ± 0.822	(0.898 ± 0.574)	182 ± 64	0.90 ± 0.386	(1.013 ± 0.672)
n2	193 ± 65	0.801 ± 0.610	(0.663 ± 0.402)	209 ± 86	0.865 ± 0.566	(1.047 ± 1.246)
n3	228 ± 63	0.822 ± 0.285	(0.769 ± 0.281)	189 ± 44	0.717 ± 0.661	(1.106 ± 0.540)
differen	255 ± 104	1.128 ± 0.766	(0.820 ± 0.629)	217 ± 82	1.006 ± 0.457	(0.844 ± 0.633)
undifferen	210 ± 75	0.922 ± 0.687	(0.846 ± 0.410)	193 ± 82	0.834 ± 0.526	(1.041 ± 0.750)

値の cut off 値を 0.8 とすると、辺縁部では 0.8 未満となる頻度は深達度で有意 ($p = 0.025$) に深く、stage で進行例となる傾向 ($p = 0.076$) を示したが、n 因子および浸潤増殖様式との間に有意の関連はみられなかった。一方、中心部では cut off 値を 0.7 とすると未満となる頻度は病期、n 因子、深達度が有意に高く (それぞれ $p < 0.001$, $p = 0.007$, $p = 0.013$)、浸潤増殖様式が増加する傾向 ($p = 0.056$) が観察された (Table 4)。なお、組織型別での AI 値は、辺縁部では分化型が $1.128 \pm 0.766\%$ 、未分化型が $0.922 \pm 0.687\%$ 、中心部では分化型が $1.006 \pm 0.457\%$ 、未分化型が $0.834 \pm 0.526\%$ と、ともに分化型で未分化型に比べて高値を示したが、有意差はみられなかった (Table 2)。

5. TIL のアポトーシス発現頻度

AI 値は辺縁部が $0.846 \pm 0.489\%$ で中心部 ($0.964 \pm 0.707\%$) との間に差はみられなかった (Table 2)。また、臨床病理学的因子との関連で TIL の AI 値の cut off 値を 1.0 とすると、中心部では以上群の頻度は深達度で有意 ($p = 0.024$) に深く、辺縁部でも同様の傾向が観察された。しかし、病期進行程度およびリンパ節転移度との間に有意の関連はみられなかった (Table 5)。

6. TIL の浸潤程度と AI 値との関連

TIL の浸潤細胞数と腫瘍の TUNEL 陽性細胞数を座標軸上でプロットすると、辺縁部 (Fig. 3-a) および中心部 (Fig. 3-b) とも有意の相関はみられなかった。

7. 生存曲線からみた予後との関連

1) TIL の浸潤程度と予後との関連

辺縁部では単位面積当たり 200 個で比較すると TIL が多いほど予後は有意 ($p < 0.004$) に良好で、中心部でも単位面積当たり 180 個で比較すると TIL が多いほど予後は有意 ($p < 0.002$) に良好であった (Fig. 4)。しかし、辺縁部で v 因子が高くなるほど TIL の浸潤が多くなり、有意 ($p = 0.002$) に予後不良であった (Table 3)。

2) AI 値と予後との関連

a) 腫瘍細胞の AI 値：辺縁部では AI 値の cut off 値を 0.8 とすると、予後は高値群が低値群に比べ有意 ($p < 0.005$) に良好で、中心部でも cut off 値を 0.7 とすると高値群が有意 ($p < 0.002$) に良好であった (Fig. 5)。

b) TIL の AI 値：辺縁部 (cut off 値 0.7) および中心部 (cut off 値 1.0) とも予後は逆に低値群が高値群に比

Table 3 Patients distribution according to cut off value of the number of lymphocytes around the marginal area of tumor

number of lymphocytes	marginal area(228 ± 89)			deep layer(202 ± 82)		
	< 200	200	p =	< 180	180	p =
stage I b	4	8		5	7	
stage II	5	6		4	7	
stage III a	5	6		6	5	
stage III b	3	2		4	1	
stage IV	6	4	p = 0.200	5	5	p = 0.327
n0	7	9		7	9	
n1	8	9		9	8	
n2	4	4		4	4	
n3	4	4	p = 0.741	4	4	p = 0.741
sm	0	1		0	1	
mp	2	8		2	8	
ss	10	9		10	9	
se	11	7		11	7	
si	0	1	p = 0.079	1	0	p = 0.024
v0	18	10		16	12	
v1	4	5		4	5	
v2	1	8		3	6	
v3	0	3	p = 0.002	1	2	p = 0.166

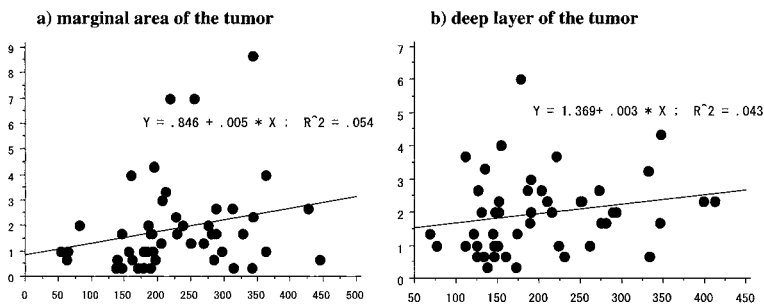
Table 4 Patients distribution according to cut off value of apoptotic index(AI) of cancer around the marginal area and deep layer of tumor

tumor	marginal area(1.022 ± 0.713%)			deep layer(0.901 ± 0.503%)		
	< 0.8	0.8	p =	< 0.7	0.7	p =
stage I b	3	9		0	12	
stage II	5	6		2	9	
stage III a	6	5		4	7	
stage III b	3	2		4	1	
stage IV	6	4	p = 0.076	8	2	p < 0.001
n0	7	9		3	13	
n1	8	9		5	12	
n2	4	4		4	4	
n3	4	4	p = 0.730	6	2	p = 0.007
sm	0	1		0	1	
mp	3	7		2	8	
ss	7	12		5	14	
se	13	5		10	8	
si	0	1	p = 0.025	1	0	p = 0.013
α	0	3		0	3	
β	14	10		7	17	
γ	9	13	p = 0.795	11	11	p = 0.056

Table 5 Patients distribution according to cut off value of apoptotic index(AI) of lymphocytes around the marginal area and deep layer of tumor

Lymphocyte	marginal area(0.846 ± 0.486%)			deep layer(0.964 ± 0.707%)		
	< 0.7	0.7	p =	< 1.0	1.0	p =
stage I b	7	5		11	1	
stage II	4	7		5	6	
stage III a	9	2		7	4	
stage III b	1	4		2	3	
stage IV	6	4	p = 0.88	4	6	p = 0.259
n0	8	8		12	4	
n1	10	7		9	8	
n2	5	3		5	3	
n3	4	4	p = 0.793	3	5	p = 0.116
sm	1	0		1	0	
mp	6	4		8	2	
ss	12	7		12	7	
se	8	10		8	10	
si	0	1	p = 0.152	0	1	p = 0.024

Fig. 3 Correlation between numbers of tumor infiltrating lymphocytes and apoptotic cells in marginal area (a) or deep layer (b) of the tumor



べ有意 (それぞれ $p < 0.03$, $p < 0.001$) に良好であった (Fig. 6).

考 察

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) は、癌微小環境における免疫応答で重要な役割を担っていることから、TIL の細胞膜表面分化抗原¹²⁾や細胞傷害活性¹³⁾の検索、あるいは TIL を用いた活性化リンパ球の誘導¹⁴⁾などが試みられている。一方、TIL の中で好酸球¹⁵⁾や樹状細胞¹⁶⁾の浸潤程度が注目され、特に T 細胞は樹状細胞により活性化されるので、この機能異常が第一義である可能性がある。樹状細胞は血中あるいは骨髄より腫瘍局所に入り、腫瘍抗原を捕捉した後、所属リンパ節や脾臓など

のリンパ臓器に入るといふ組織間移行 (trafficking) を行うとされており、これにより T 細胞に接触、感作されて免疫応答が誘導され、主に癌細胞周辺や血管周囲に T リンパ球の浸潤がおきると考えられる。したがって、樹状細胞の機能抑制により抗腫瘍 T 細胞応答の抑制が生じ、結果、担癌宿主に免疫抑制が生じていると考えられる。また、腫瘍局所に動員された樹状細胞が腫瘍由来の因子により、そこでアポトーシスに陥り、これにより免疫抑制が生ずる例も報告されている¹⁷⁾。教室でも胃・大腸癌症例を対象に検討し、樹状細胞の浸潤程度と予後との間に有意の相関を認めた¹⁸⁾。

しかし、樹状細胞の同定は必ずしも容易ではなく、

Fig. 4 comparison of survival curves between higher and lower number of tumor infiltrating lymphocytes around the tumor in marginal area (a) or deep layer (b)

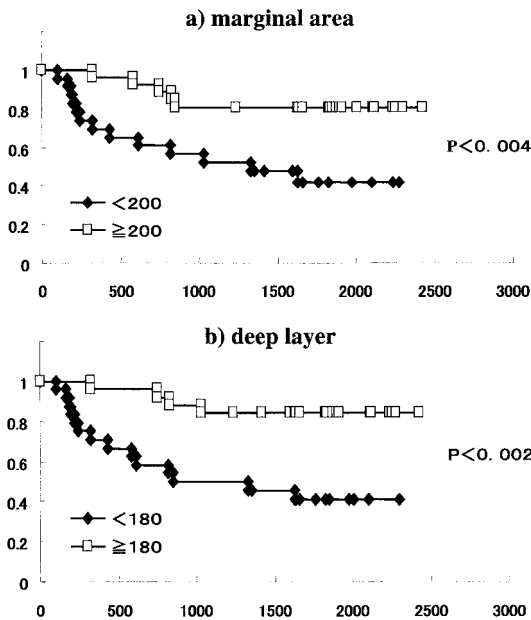


Fig. 5 Comparison of survival curves between higher and lower cut off value of apoptotic index (AI) of cancer cell around the tumor in marginal area (a) or deep layer (b)

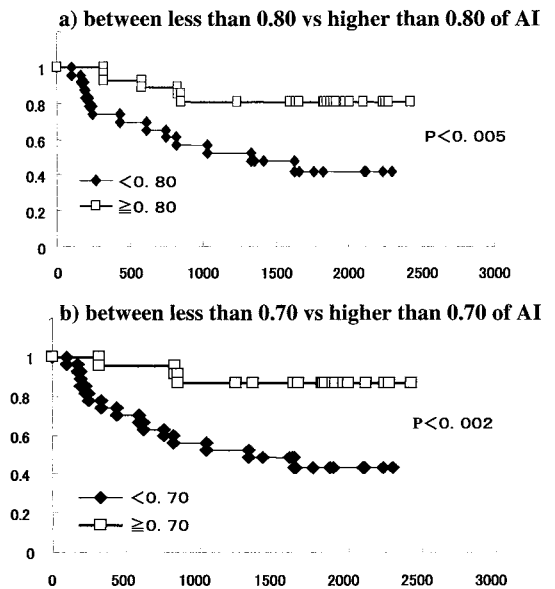
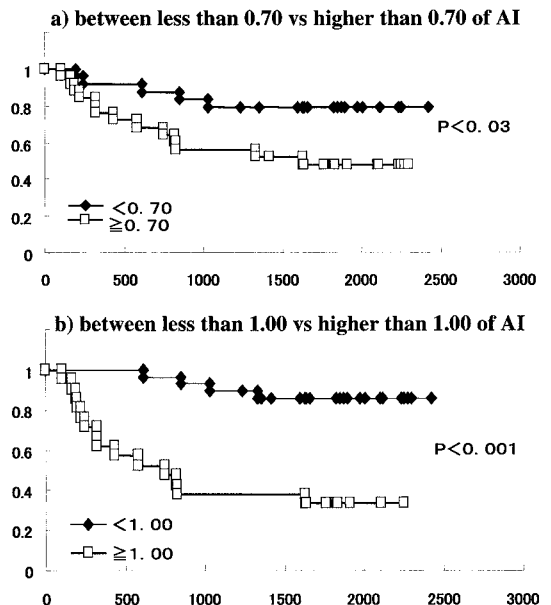


Fig. 6 Comparison of survival curves between higher and lower cut off value of apoptotic index (AI) of lymphocytes around the tumor in marginal area (a) or deep layer (b)



細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導を目的とした免疫療法の適応症例選択や治療効果の予測法として有用であるが、通常の予後予測には癌微小環境での TIL の方が簡便で、利便性が高いと推察される。

ところで、手術時採取した病理組織所見で、癌細胞周辺での TIL 浸潤程度と予後が相関すると考えられてきたが¹⁾、その後の検索では必ずしも相関はみられず²⁾、理由として TIL の性格による可能性が指摘されている。すなわち、腫瘍に対し細胞傷害性に作用する TIL (Th1 系) と腫瘍増殖促進性に作用する TIL (Th2 系) の存在である¹⁹⁾。そこで、TIL による抗腫瘍効果の証として腫瘍細胞のアポトーシス発現程度の検索が試みられている^{5,6)}。すなわち、アポトーシスから解除された腫瘍細胞は無限の増殖を開始するが、一部は TIL などの攻撃を受けアポトーシスに陥るとの考えである。しかし、TIL も腫瘍細胞から産生されたさまざまなサイトカインや腫瘍破壊後にアポトーシスに陥るわけ²⁰⁾、これの繰り返しにより腫瘍・宿主環境が構築されるものと推察している。それゆえ、予後の予測には TIL の浸潤程度と腫瘍細胞のアポトーシス発現

程度の検索に加え、TIL のアポトーシス発現程度の検索が重要と考え、上記検討を行ったわけである。

1. 癌微小環境における TIL の浸潤程度

今回の検索対象は 49 例と少数例のため、病期のばらつきによる結果の誤差を少なくする目的で、全国胃がん登録調査報告⁷⁾の Stage 分類に類似させた。なお、壁深達度で ss と se が、組織形で未分化型の頻度が高く、自験例は悪性度が全国集計に比べ若干高いと推察された。そのためか、TIL の浸潤程度は中心部に比べ辺縁部で多くなる傾向がみられ、予後因子別では中心部で TIL の浸潤程度と壁深達度が有意に逆相関し、辺縁部でも同様傾向がみられたが、v 因子とは正相関を示した。以上の所見は、癌微小環境で TIL は腫瘍辺縁部では抗腫瘍性に作用するため増加し、中心部では腫瘍増殖を認めて低下し、血管新生の著しい部では反応性に増加する可能性が示唆された。また、予後は辺縁部、中心部とも TIL の浸潤が強い程有意に良好であった。辺縁部では v 因子が高い群は、有意に TIL の浸潤が強くなる結果となったが、これらを自験例で詳細に検討すると、v2, v3 症例 12 例のうち、v3 症例 3 例を含めた 8 例が生存しており、その内訳は stage 2 が 4 例で、3a, 4 が各 2 例であり、分化型、未分化型が各 4 例であった。これらの結果から、腫瘍辺縁部では通常予後不良と考えられる脈管浸潤が強い進行癌症例においても、浸潤リンパ球が多ければ予後良好となる症例のあることが示唆された。

これらのことより、癌微小環境では腫瘍と宿主がさまざまな免疫応答を演じて互いにけん制しあっているが、腫瘍辺縁部ではまず Th1 が主体となって腫瘍の増殖を抑制し、腫瘍の進展にともない増殖を認可すると Th1-Th2 の cross-regulation が働き、癌の増殖進展が進むものと推察される²¹⁾。

2. 腫瘍細胞のアポトーシス発現頻度

胃癌のアポトーシス発生頻度は 1% 程度と報告されているが^{22, 23)}、自験例でも 0.09 から 2.876、平均 0.952 で近似した値であった。また、腫瘍の辺縁部と中心部との間で AI 値に差はみられなかったが、予後因子別では AI 値が低い程、辺縁部で深達度が有意に深く、病期が進む傾向を示し、中心部では病期、n 因子、深達度とも有意に高く、浸潤増殖様式が増強する傾向を示した。さらに、組織型別で未分化型は辺縁部・中心部とも AI が低値を示した。以上の所見は、まず発癌ステップで癌細胞はアポトーシスによる細胞死の制御異常が生じ²⁴⁾増殖進展するが、一方では TIL の攻撃から逃避

した癌細胞が増殖するため、進行癌症例で AI 値が有意に低下したものと推察される。それゆえ、辺縁部・中心部とも AI 低値群で有意に予後不良となった理由も了解可能と思われる。なお、胃癌で AI 値と病期、分化度との間に一定の関連はみられないとの報告が多いが^{22, 24)}、大草ら⁵⁾は TIL が密に分布している部位に一致して癌細胞にアポトーシスが発生している症例で、リンパ管侵襲が有意に軽度であったと報告している。なお、大腸癌症例では AI 値は高分化型、病期の低い癌、リンパ節転移陰性例、悪性度の低い例で高値を示したと報告されており^{25, 26)}、著者らの見解と趣を同じくする結果と考えている。

3. TIL のアポトーシス発現頻度

腫瘍中心部では TIL の AI 値が高い程、深達度が有意に深く、辺縁部でも同様傾向が観察されたが、病期およびリンパ節転移度との間に有意の関連はみられなかった。すなわち、壁深達度が進む程 TIL はアポトーシスに陥り抗腫瘍活性が低下し、癌の増殖進展が進むものと推察される。一方、TIL の浸潤度と AI 値の間には有意の相関はみられなかったが、Ostenstad ら²⁷⁾は癌細胞と TIL を混合培養すると癌細胞にアポトーシスが誘導されることを確認しており、宿主免疫活性が健全な早期癌では、TIL により腫瘍細胞はアポトーシスに陥り、増殖が抑制されると考えている。その後、腫瘍の増殖進展に伴い TIL もアポトーシスに陥るが、Okada ら²⁸⁾は大腸癌で TIL のアポトーシス発現頻度が高くなる程予後不良で、癌部の Fas-Fas ライグランド (L) system の発現と相関すると報告している。すなわち、悪性腫瘍では Fas の発現減弱と Fas-L の構成的発現が観察されるが、これは腫瘍細胞に発現した FasL が CTL の Fas に作用してアポトーシスを誘導し、免疫担当細胞の攻撃から回避する可能性を示唆したものと推察される (Fas counterattack)²⁹⁾。同様に食道癌でも TIL がアポトーシスにより排除されるが、これは Fas-L が癌に有利な環境を構築するために寄与している可能性を示唆するものである³⁰⁾。それゆえ、今回の検索で腫瘍辺縁部・中心部とも、TIL の AI 低値群の予後が有意に良好となった理由も同様機序によると推察される。

一般に T 細胞は機能的に調節性 T 細胞とエフェクター T 細胞に、膜表面分化抗原からは CD4 + CD8 + に、さらに interferon (IFN) γ , interleukin (IL) 2, lymphotoxin (LT, TNF- β) を産生し遅延型過敏症を担う Th1 細胞と、IL-4 や IL-5, IL-10 など産生し抗体産

生応答を担う Th2 細胞に大別される³⁰⁾。一方, CTL の細胞傷害機構は, ① Perforin および granzyme を介する機構³¹⁾ ② Fas-L を介する機構³²⁾ ③ tumor necrosis factor(TNF) α や TNF- β による機構³³⁾などで, 標的細胞にアポトーシスを誘導する。また, CTL 細胞の多くは CD8+ で, Th 細胞の多くは CD4+ であるが, CD4 + CTL は Fas-L を介してアポトーシスを誘導する。Bennet ら³⁴⁾も胃癌細胞で FasL 陽性細胞周囲の TIL にアポトーシスを高頻度に認めているが, いずれも抗原提示細胞を介して活性化される。それゆえ, 上記理論より中心部では腫瘍の進展にともない TIL が Th2 主体となり, 腫瘍の存続を認可した結果, 腫瘍増殖促進的に作用した可能性が推察された。

今回の検討結果, 胃癌症例で手術時採取した摘出標本の癌部周辺で, リンパ球浸潤が強く, 腫瘍細胞のアポトーシス発現が高く, TIL のアポトーシス発現が低い症例の予後は有意に良好であった。今後, リンパ球や腫瘍細胞で各種メデーターやサイトカインの産生能などの検索が必要であるが, 術後の予後予測や補助療法を選択の上で, 有用な情報を提供可能と推察している。

文 献

- 1) 三輪 昭昭: 腫瘍内浸潤リンパ球について。癌の臨 30: 753 756, 1984
- 2) 佐藤 雄一: 浸潤リンパ球, 組織球のサブセット同定による肺癌局所の免疫応答の検討。病理の臨 3: 89 96, 1985
- 3) Kanaeda T, Hayakawa S, Nemoto N: Tumor infiltrating lymphocytes uterine cervical carcinoma use skewed TCR V β gene segments but possesses low prognostic values Nihon Univ J Med 42: 327 337, 2001
- 4) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239 257, 1972
- 5) 大草 世雄, 田中 完児, 榎屋 義郎ほか: 胃癌におけるアポトーシス増加と腫瘍内浸潤リンパ球との関連について。Biother 13: 385 389, 1999
- 6) Eerola AK, Soini Y, Paakko P: Tumour infiltrating lymphocytes in relation to tumour angiogenesis, apoptosis and prognosis in patients with large cell lung carcinoma. Lung Cancer 26: 78 83, 1999
- 7) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約。改訂第 13 版。東京, 1999
- 8) 三輪 潔: 全国胃がん登録調査報告第 55 号。三輪胃がん登録研究所, 東京, 1999, p56
- 9) Giorno R: A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. Diagn Immunol 2: 161 166, 1984
- 10) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493 501, 1992
- 11) 日本放射線技術学会専門委員会, デジタル画像の ROC 解析検討班編: ROC 解析の基礎と応用。日本放射線技術学会, 京都, 1994, p1 3
- 12) 西村 泰治: T 細胞抗原受容体におけるリガンドと伝達シグナルの多様性。細胞工学 19: 228 238, 2000
- 13) Bossi G, Griffiths GM: Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. Nat Med 5: 90 96, 1999
- 14) 山口 佳之, 峠 哲哉: 癌に対する活性化自己リンパ球移入療法。リンパ学 22: 75 78, 1999
- 15) Songun I, van de Velde CJ, Hermans J: Expression of oncoproteins and the amount of eosinophilic and lymph infiltrates can be used as prognostic factors in gastric cancer. Dutch Cancer Group (DGCG) Br J Cancer 74: 1783 1788, 1996
- 16) Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392: 245 252, 1998
- 17) Esche C, Lokshin A, Shurin GV et al: Tumor 's other immune targets: dendritic cells. J Leukoc Biol 66: 336 344, 1999
- 18) 熊澤 伊和生, 安江 紀裕, 佐治 重豊ほか: 予後因子としての胃癌原発巣における樹状細胞浸潤程度の検索意義について。Biother 15: 495 501, 2001
- 19) Mossman TR, Cherwinski HM, Bond MW et al: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 136: 2348 2357, 1986
- 20) Green DR, Scott DW: Activation-induced apoptosis in lymphocytes Curr Opin Immunol 6: 476 487, 1994
- 21) Saegusa M, Takano Y, Wakabayashi T et al: Apoptosis in Gastric carcinomas and its association with cell proliferation and differentiation. Jpn J Cancer Res 86: 743 748, 1995
- 22) Ikeguchi M, Cai J, Yamane N et al: Clinical significance of spontaneous apoptosis in advanced gastric adenocarcinoma. Cancer 85: 2329 2335, 1999
- 23) Ikeda M, Shomori K, Endo K et al: Frequent occurrence of apoptosis in an early even tin the oncogenesis of humangastric carcinoma. Virchows Arch 432: 43 47, 1998
- 24) Hashimoto S, Koji T, Kohara N et al: Frequency of apoptosis relates inversely to invasiveness and metastatic activity in human colorectal cancer.

- Virchows Arch 431 : 241 246, 1997
- 25) Sugamura K, Makino M, Kaibara N et al : Apoptosis as a prognostic factor in colorectal carcinoma. Surg Today 28 : 145 150, 1998
- 26) Ostenstad B, Sioud M, Schlichting E et al : Freshly isolated tumour-infiltrating T-lymphocytes have a high cytotoxic potential, as measured by their ability to induce apoptosis in the target cell. Scand J Immunol 41 : 42 48, 1995
- 27) Okada K, Komuta K, Hashimoto S et al : Frequency of apoptosis of tumorinfiltrating lymphocytes induced by fas counterattack in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis. Cl in Cancer Res 6 : 3560 3564, 2000
- 28) O'Connell J, O' Sullivan GC, Collins JK : The Fas counterattack : Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. J Exp Med 184 : 1075 1082, 1996
- 29) Bennett MW, O'Connell J, O' Sullivan GC et al : The Fas counterattack in vivo : apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. J Immunol 160 : 5669 5675, 1998
- 30) Mossman TR, Moore KW : The role of IL 10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. Immunol Today 12 : A49 53, 1991
- 31) Lowin B, Hahne M, Mattmann C et al : Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. Nature 370 : 650 652, 1994
- 32) Suda T, Takahashi t, Golstein P et al : Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of tumor necrosis factor family. Cell 75 : 1169 1178, 1993
- 33) Yamamoto N, Zou JP, Li XF et al : Regulatory mechanisms for production of INF-gamma and TNF by antitumor T cells or macrophages in the tumor-bearing state. J Immunol 154 : 2281 2290, 1995
- 34) Bennett MW, O'Connell J, O' Sullivan GC et al : Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas : a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. Gut 44 : 156 162, 1999

Relationship between Prognosis and Apoptotic Index of Tumor Infiltrating Lymphocytes and Cancer Cells in gastric Cancer

Toshihiro Yasue, Iwao Kumazawa, Yasuyuki Sugiyama, Katsuyuki Kunieda and Shigetoyo Saji
Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

Aim : We clarified the relationship between host immuneresponse around the microenvironment of tumors and their prognosis, according to apoptosis in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and discussed about clinicopathological significance. **Methods :** Surgical specimens from 49 patients undergoing gastrectomy for the stomach cancer in the 5 years from 1992 were immunohistochemically stained by UCHL-1 (TIL) and TUNEL (apoptosis) and also H.E. stain. The mean number of TILs, apoptotic index (AI) of cancer cells, and TILs on the 3 areas of marginal and deep were calculated. After evaluating the degree of TILs, we discuss the relationship of clinicopathological study and prognosis based on cumulative survival, etc. **Results :** ① AI in the tumor cells showed higher in marginla area and that in deep layer was significantly lower according to the degree of stage, n and depth. ② In the degree of TILs, higher density in the deep area were significantly shallow in depth ($p = 0.024$). Higher numbers of TIL AI in the deep layer were significantly deeper in depth ($p = 0.024$) ③ In the number of TILs, higher cases showing more than 180 cells per unit area had a significantly better prognosis($p < 0.002$). ④ In tumor cells, prognosis of showing higher AI value both in marginal and deep areas had significantly better prognosis ($p < 0.05$) ⑤ In AI cutoff, cases showing less than 0.70 in marginal areas and 1.00 in deep areas had significantly better prognosis ($p < 0.03$ and $p < 0.001$) **Conclusion :** A close relationship exist between the apoptotic index of TILs in deep areas and cancer patient prognosis, and was useful in determinign patient prognosis and postoperative adjuvant thedrapy.

Key words : cancer microenvironment, tumor infiltrating lymphocyte, apoptotic index, gastric cancer, prognosis

[Jpn J Gastroenterol Surg 35 : 1359 1368, 2002]

Reprint requests : Toshihiro Yasue Second Department of Surgery, Gifu Univercity School of Medicine
40 Tsukasamachi, Gifu City, 501 8705 JAPAN