

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	酒 井 康 弘
論文審査担当者	主 査            中 山 淳 副 査            塩 沢 丹 里 ・ 本 田 孝 行
論文題目	
<p><b>High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in testicular seminoma</b> (精巣セミノーマにおける高内皮細静脈様血管とリンパ球の動員)</p>	
<p>(論文の内容の要旨)</p> <p>〔背景と目的〕 Seminoma は精巣原発腫瘍の中で最も頻度が高く、組織学的には、腫瘍胞巣周囲に腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte; TIL) を伴うことが特徴である。TIL は seminoma をはじめ様々な腫瘍の免疫監視や生長抑制に重要である上、予後との相関を指摘している報告もあり、TIL の腫瘍組織への浸潤機序の解明は腫瘍免疫を精察する上で非常に重要な関心事であった。今回我々は、TIL は高内皮細静脈 (high endothelial venule; HEV) 様血管という特殊な血管を介して供給されている可能性を考えた。本来 HEV は二次リンパ組織に存在し、血液中からリンパ球を「ホーミング」させる役割を担う。古典的にはまず、HEV の内皮細胞上に発現する 6-硫酸化シアリルルイス X がリンパ球上の L-セレクトリンと結合することで互いに弱く接着し、リンパ球の“tethering and rolling”が起こる。その後ケモカインによって活性化されたリンパ球は、自身に発現するインテグリンを HEV 上に発現する細胞接着分子と結合させ、強固な接着を営むことで HEV 内皮上に“arrest”して、血管外組織への遊走が始まる。最近では、様々な炎症性疾患や腫瘍において HEV に類似した血管が炎症部位や腫瘍組織に出現し、生理的なホーミングと同様の機序でリンパ球を局所に動員していると考えられている。しかし、seminoma は TIL を豊富に伴うにも関わらずその報告がない。今回我々は、精巣 seminoma で HEV 様血管の出現とホーミング関連分子の発現やその機能性、さらに HEV 様血管を介したリンパ球動員や増殖の様式を明らかにすべく、本研究を施行した。</p> <p>〔材料と方法〕 信州大学医学部附属病院で seminoma と病理診断された精巣手術材料 26 例を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を用い、extended core 1 O-glycan 上の 6-硫酸化 N-アセチルラクトサミンを認識する MECA-79 抗体とシアリルルイス X を認識する HECA-452 抗体で免疫染色を行い、seminoma の HEV 様血管に発現する糖鎖構造を調べた。リンパ球ホーミングに関する細胞接着分子である intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)・vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)・mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) に対する抗体と MECA-79 抗体を用いた蛍光二重染色を行い、これらの分子の発現の有無を検討した。また L-セレクトリン・IgM キメラ・E-セレクトリン・IgM キメラを (6-硫酸化) シアリルルイス X に対する機能性プローブとして用い、<i>in vitro</i> selectin chimera binding assay を行った。加えて CD20/CD79<math>\alpha</math> (B 細胞)・CD3 (T 細胞)・MECA-79 の免疫三重染色や CD8 (細胞傷害性 T 細胞)・MECA-79 の免疫二重染色を行い、HEV 様血管の内腔側に接着しているリンパ球を鏡検し計測して、何れが優位のリンパ球サブセットかを統計学的に明らかにした。さらに CD8・Ki-67 の免疫二重染色を施し、細胞傷害性 T 細胞が腫瘍組織に動員された後の増殖傾向を調べた。</p> <p>〔結果〕 26 例全例で TIL が腫瘍組織に認められ、そのうち 24 例 (92.3%) には TIL の集簇が顕著な部を中心に MECA-79 陽性 HEV 様血管が出現していた。HEV 様血管の密度は <math>3.2 \pm 5.6 / \text{cm}^2</math> で、年齢・pT 分類・S 分類・Stage・リンパ節転移の有無との間には相関は認められなかった。これらの HEV 様血管は HECA-452 抗体にも同様に陽性であり、両抗体の染色性から seminoma の HEV 様血管上には 6-硫酸化シアリルルイス X が発現していることが示された。また <i>in vitro</i> selectin binding assay の結果、L-セレクトリン・IgM キメラの結合は同定に能わなかったが、E-セレクトリン・IgM キメラは HEV 様血管の内腔面に結合した。従って HEV 様血管に発現する 6-硫酸化シアリルルイス X は、N-アセチルグルコサミンの 6 位の硫酸化が一部不全なものも含まれているが、潜在的にはこの糖鎖構造はセレクトリンとの結合能を有することが機能性に示された。さらに、ホーミングに関する細胞接着分子のうち VCAM-1・MAdCAM-1 は陰性だったものの ICAM-1 の発現がみられたことから、リンパ球の HEV 様血管を介した血管外遊走のうち“tethering and rolling”と“arrest”に必要なホーミング関連接着分子が備わっていることが証明された。実際これらの HEV 様血管には多数のリンパ球が接着している様子が顕微鏡下で確認でき、その数を計測すると CD3<sup>+</sup> T 細胞の方が CD20/CD79<math>\alpha</math><sup>+</sup> B 細胞より有意に多く (<math>p &lt; 0.0001</math>)、従って HEV 様血管を介したリンパ球動員は T 細胞が優位であると考えられた。T 細胞の密度は最もリンパ球浸潤の著しい部の強拡大 5 視野を計測したところ <math>780.8 \pm 318.1 / \text{HPF}</math> で、HEV 様血管の密度との間には相関は認められなかった。一方、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性 T 細胞は HEV 様血管内にはごく少数しか観察されないものの、腫瘍組織に存する T 細胞はほとんどが CD8<sup>+</sup>細胞傷害性 T 細胞だった。血管外に存する CD8<sup>+</sup>細胞傷害性 T 細胞には Ki-67 陽性のものが目立ったため、細胞傷害性 T 細胞は血管外に遊走された後に腫瘍抗原などによって刺激され、局所で増殖している可能性が示唆された。</p> <p>〔結論〕 精巣 seminoma では、TIL (特に T 細胞) が HEV 様血管を介して腫瘍組織に動員され、さらに細胞傷害性 T 細胞については HEV 様血管を介して腫瘍組織に動員された後に増殖していることが本研究で示された。</p>	