



Title	口腔扁平上皮癌における高内皮細静脈と臨床的因子との関連
Author(s)	新山, 宗
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第15025号
Issue Date	2022-03-24
DOI	10.14943/doctoral.k15025
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/89303">http://hdl.handle.net/2115/89303</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Takashi_Niiyama.pdf



[Instructions for use](#)

# 博士論文

---

## 口腔扁平上皮癌における 高内皮細静脈と臨床的因子との関連

---

令和4年3月申請

北海道大学  
大学院歯学院口腔医学専攻

新山宗

## 目次

要旨	3
緒言	5
材料と方法	7
結果	10
考察	16
結論	21
謝辞	21
参考文献	22
表	29
図の説明	33

## 要旨

口腔扁平上皮癌は、口腔を原発とする悪性腫瘍の 90%を占め、その中で約 60%が舌癌とされる。舌癌の臨床予後を規定する最も重要な因子の一つに頸部リンパ節転移があるが、頸部リンパ節転移の予測因子についてはいまだ決定的なものではなく、新たな予後予測因子が必要とされている。近年、手術療法、化学療法、放射線療法に次ぐ第四のがん治療法として、免疫療法が確立され、がん細胞のみならず、それらを取り巻くがん微小環境が注目されている。リンパ球のがん部への遊走を調整する特殊な血管として高内皮細静脈 High Endothelial Venule (HEV) が知られている。HEV はリンパ節や小腸のパイエル板など、二次リンパ組織に存在することが知られており、がん組織中に存在する HEV が生命予後に関連することが複数の癌種で報告されている。しかし、口腔扁平上皮癌組織における HEV の機能についてはほとんど報告がない。本研究では、口腔癌における HEV と臨床的意義について明らかにすることとした。北海道大学病院口腔診断内科、口腔顎顔面外科、北海道がんセンター口腔腫瘍外科において初回治療として手術が行われた舌扁平上皮癌症例を対象とした。舌扁平上皮癌組織を用いて、HEV の数・局在、HEV 周囲の CD8 陽性細胞の数・局在、三次リンパ様構造 (TLS) 形成の有無について評価し、各臨床病理学的因子との関係について解析した。その結果、HEV が多い症例では臨床的予後が良好であることが

示された。また、腫瘍辺縁部に HEV が限局している症例は臨床的予後が良好であることが示された。HEV 周囲の CD8 陽性細胞の数と臨床的予後には有意な差が認められなかったが、CD8 陽性細胞が腫瘍辺縁部に限局して浸潤する症例では、臨床的予後が良好であることが示された。TLS 形成症例は HEV の数が有意に多かったが、TLS 形成と臨床的予後に相関は認められなかった。

本研究により、口腔扁平上皮癌において HEV 及び CD8 陽性細胞の局在が予後に関与することが示され、予後予測因子として有用であることが示唆された。

## 緒言

我が国において、口腔を原発とする悪性腫瘍は全がんの約 1%を占め、病理組織学的には 90%が扁平上皮癌である<sup>1)</sup>。初診時の病期診断は、0 期 2.5%、I 期 20.1%、II 期 19.1%、III 期 15%、IV 期 43.3%であり、III・IV 期の進行症例が約 60%を占めている<sup>2)</sup>。また口腔がんにおいて、舌癌が発生頻度 60%と最も多い<sup>3)</sup>。舌癌の Stage 別 5 年生存率は、I 期 約 95%、II 期 約 75%、III 期 約 55%、IV 期 約 40%であり<sup>4)</sup>、進行症例として診断される症例が多いことから決して予後が良いとはいえない。舌癌において、臨床予後に影響する最も重要な因子のひとつは頸部リンパ節転移である。治療前に頸部リンパ節転移の可能性を予測することができれば、患者の臨床予後に有益であるため、これまで肉眼分類<sup>5,6)</sup>や組織学的腫瘍浸潤様式<sup>7,8,9)</sup>など頸部リンパ節転移予測因子の検討がなされてきた。肉眼分類においては、表在型や外向型に比較し、内向型病変は有意に頸部リンパ節転移が多いことが示されており、国際対がん連合 International Union Against Cancer (UICC)による TNM 分類第 8 版<sup>10)</sup>では、原発腫瘍の診断に進達度が加わった。それに伴い、旧分類と新分類を比較し、新分類は後発転移や生存率をよりの確に反映することが報告された<sup>11,12)</sup>。しかし、診断基準が改定されて以降も、早期症例に頸部リンパ節後発転移を生じるような予後不良例が認められ、更なる予後予測因子が求められている。

近年、手術療法、化学療法、放射線療法に次ぐ第 4 のがん治療法として、免疫療法が確

立され、がん細胞のみならず、それらを取り巻くがん微小環境が注目されている。抗腫瘍免疫においてリンパ球の腫瘍部への到達が重要であり、リンパ球の腫瘍部への遊走を調整する特殊な血管である高内皮細静脈 High Endothelial Venule (HEV)が抗腫瘍免疫に関与することが知られている<sup>16,20)</sup>。

HEVはリンパ節などの二次リンパ組織に存在し、リンパ球が血管系からリンパ管系へ移行する(リンパ球ホーミング)際のジャンクションとして機能する<sup>13)</sup>。HEVは終末細静脈と比較し、丈が高く厚みのある血管内皮細胞をもつことを特徴としている。HEVの血管内皮細胞表面には、L-セレクチンリガンドが発現しており、リンパ球に発現するL-セレクチンと特異的に接着する<sup>14)</sup>。HEVは二次リンパ組織のみならず、自己免疫疾患などの慢性炎症巣にも存在し、HEVを介してリンパ球が組織に移動することで三次リンパ組織 Tertiary lymphoid structure (TLS)を形成し、病態を増悪させると考えられてきた<sup>15)</sup>。がん組織中にもHEVが存在し、HEVの存在の有無やその数が臨床的予後に関連していることが報告されている<sup>16-18)</sup>。HEVががん組織中に多くみられる症例は臨床的予後が良好であることが報告されている<sup>16-18)</sup>一方で、HEVが多い症例ではリンパ節転移が多いことを示した報告<sup>19)</sup>もあり、がん組織中のHEVの機能について未だ解明されていないのが現状である。これまで口腔癌で、HEVの数やHEVを介したリンパ球の分布、TLS形成が臨床的予後と関連することについて数本の論文報告がある<sup>18-22)</sup>が、口腔癌は希少であることから検討症例数が少なく、更なる検討の余地があると考えられる。そこで本研究では、口腔癌組織に存在する

HEV を組織学的に解析し、臨床的因子との関連を検討することで、HEV の存在意義及び予後予測因子としての有用性について検索した。

## 材料と方法

### 1. 対象

2010 年から 2015 年に北海道大学病院口腔診断内科、口腔顎顔面外科において、また 2016 年から 2019 年に北海道がんセンター口腔腫瘍外科において加療を行った舌扁平上皮癌 251 例のうち、初回治療として手術が行われ、ホルマリン固定パラフィン包埋標本が使用可能であった 83 例を対象とした。本研究では組織学的解析に対する脱灰の影響を考慮し、比較的顎骨切除を伴うことが少ない舌癌を選択した。舌原発の扁平上皮癌の中でも切除時に顎骨の合併切除がなされた症例は研究対象から除外した。

### 2. 免疫組織染色

通法に従い、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から切片を薄切し、脱パラフィン、脱水処理後、TE バッファー (Tris/EDTA 溶液 : pH9.0) を用いて加熱処理し抗原の賦活化を行った。次に 0.5% $H_2O_2$  を 10 分間反応させて内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。リン酸緩衝液 (Phosphate-buffered saline: PBS) で洗浄し、5% Goat serum albumins (GSA) 含有 PBS を用いて 10 分間処理し、非特異的反応を阻害した。一次抗体として抗 CD31 抗体 (ab28364, Lot.#GR3247742-11, Abcam, Cambridge), 抗 MECA79 抗体 (120802,



Lot.#B282544, Biolegend, San Diego), 抗 CD20 抗体 (GTX29475, Lot.# 822004112, GeneTex, Irvine) はそれぞれ 400 倍, 抗 CD8 抗体 (4B11, Lot.#6068276, Leica Biosystems, Wetzlar) は 100 倍に希釈して用いた. また抗 CD3 抗体 (413241, Lot.#H1407, ニチレイバイオサイエンス, 東京) は未希釈で用いた. 一次抗体は 4°C で 15 時間反応させた. その後, HRP 標識抗ウサギ二次抗体 (Dako, 東京), HRP 標識抗ラット二次抗体 (Dako, 東京), HRP 標識抗マウス二次抗体 (Dako, 東京) を 100 倍に希釈して用いた. また HRP 標識抗マウス二次抗体 (ニチレイバイオサイエンス, 東京) は未希釈で使用した. 二次抗体は室温で 60 分間作用させ, DAB (3, 3 - diaminobenzidine, Dako, 東京) にて発色後, ヘマトキシリンで核染色を行った. 水洗後, 脱水, 透徹を行い封入し, 光学顕微鏡にて検鏡した.

### 3) HEV 数の算出方法

MECA-79 陽性領域を HEV とし, MECA-79 染色標本の癌部において 20 倍の強拡大視野 ( $560\ \mu\text{m} \times 360\ \mu\text{m}$ ) 内に含まれる HEV 数が多い上位 5 箇所をホットスポットと定義した (ホットスポット法<sup>18)</sup>) (図 1A). ホットスポットに含まれる HEV 数の平均値を算出した.

### 4) CD8 陽性細胞数の算出方法

MECA-79 免疫染色標本の連続切片を用いて, CD8 免疫染色を行った. 3) にて HEV 数算出により選択されたホットスポットに認められる CD8 陽性細胞数を計測し, 平均値を算出した (図 1A).

### 5) 三次リンパ様構造 (Tertiary lymphoid structure : TLS) の評価方法

H-E 標本を用いてリンパ濾胞形成の有無について評価し，リンパ濾胞の形成が認められた症例の連続切片を用いて MECA-79，CD3，CD20 の免疫染色を行った．リンパ濾胞に HEV，CD3 陽性 T 細胞，CD20 陽性 B 細胞が全てみられた症例を TLS 形成症例とした(図 1B)．

#### 6) 腫瘍辺縁 HEV の評価方法

腫瘍辺縁部から腫瘍側，正常側それぞれ 150  $\mu$ m の領域における HEV の有無について評価した．同領域に複数個の HEV が認められた症例を腫瘍辺縁 HEV+症例とした(図 1C)．

#### 7) CD8 陽性細胞に対する局在の評価方法

CD8 染色標本を用いて，CD8 陽性細胞が腫瘍内部に瀰漫性に浸潤する症例，CD8 陽性細胞が腫瘍辺縁に限局して浸潤する症例の 2 群に分類した．

#### 8) 統計学的解析法

統計学的解析には統計ソフトウェア (SPSS Statistics v.26 , IBM, Armonk, NY, USA) を使用し，各臨床病理学的因子と HEV の数・局在，TLS 形成の有無，CD8 陽性細胞の数・局在の関連性についてカイ二乗検定および Fischer の正確確率検定を用いて検討した．また無病生存率について Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析および多変量解析を行った．無病生存期間については Kaplan-Meier 法により評価し，各群間の有意差について log-rank 検定を行った． $P < 0.05$  を有意な差とした．

## 結果

### 1) 患者背景

解析に用いた 83 例の臨床病理学的背景を表 1 に示す。初診時の年齢は 29～89 歳で中央値 62 歳，65 歳未満が 45 例，65 歳以上が 38 例であった。性別は男性 44 例，女性 39 例であった。病期は Stage I が 24 例，Stage II が 38 例，Stage III が 13 例，Stage IV が 8 例であり，早期症例が 75% を占めていた。本研究における病期は，国際対がん連合 International Union Against Cancer (UICC) 第 8 版を用いて分類した。なお 83 例中 8 例 (10%) に局所再発，21 例 (25%) に頸部リンパ節後発転移，3 例 (4%) に遠隔転移が認められた。

### 2) 口腔扁平上皮癌組織における HEV の数と臨床的予後の関連

口腔扁平上皮癌組織における HEV を評価するため，腫瘍部のパラフィン包埋切片を用いて，MECA-79 抗体，CD31 抗体により免疫組織染色を行った。腫瘍部の代表的な H-E 染色像，CD31 染色像，MECA-79 染色像を図 2A に示す。腫瘍胞巣周囲に CD31，MECA-79 共陽性の血管が認められた。CD31，MECA-79 共陽性の血管は MECA-79 陰性の血管と比較し，血管壁に厚みがあり，内腔が僅かであった。形態的、免疫組織学的にこれらの血管は HEV と考えられた。

各症例の腫瘍部における HEV 数を計測し，臨床病理学的因子および予後との関連について

で解析した。ホットスポットにみられた HEV の数は、0～9.6 個で中央値は 2.4 個であった。カットオフ値は、上位 1/3、下位 2/3 を画する値とした<sup>16)</sup>。HEV 数がカットオフ値より高値である症例を HEV<sup>high</sup>、低値である症例を HEV<sup>low</sup> とし、83 例を 2 群に分類した(図 2B)。

5 年無病生存率は HEV<sup>high</sup> が 84.8%、HEV<sup>low</sup> が 58.8%であり、腫瘍部における HEV の数が多い症例は有意に無病生存率が高いことが示された(p=0.039)(図 2C)。

各臨床病理学的因子と HEV 数の関連について検討したところ、HEV<sup>low</sup> と比較し、HEV<sup>high</sup> は術後頸部リンパ節非転移群(p=0.029)で有意に多かった。年齢、性別、病期、局所再発の有無、遠隔転移の有無の間には統計学的有意差は認められなかった(表 2)。

### 3) 腫瘍組織中の TLS 形成と臨床的予後との関連

TLS はリンパ組織外の組織中にみられるリンパ濾胞様構造であり、HEV、樹状細胞、T 細胞、B 細胞により構成される。HEV が口腔癌組織中に認められたことから、口腔癌組織中の TLS 形成についても評価を行った。H-E 染色像においてリンパ濾胞様構造がみられる症例で、リンパ濾胞に HEV、T 細胞、B 細胞の全てがみられた症例を TLS 形成症例 (TLS+) とした(図 3A e-h)。一方、H-E 染色像においてリンパ濾胞様構造を形成していないもの、あるいはリンパ濾胞様構造を形成しているものの濾胞内に HEV が認められない症例を TLS 非形成症例 (TLS-) とした(図 3A a-d)。全 83 例中 TLS+群は 11 例、TLS-群は 72 例であった。TLS+群と TLS-群について HEV 数を比較すると、TLS-群に比べ、TLS+群では有意に多くの HEV が認

められた(図 3B). 5 年の無病生存率は TLS+群が 70.0%, TLS-群が 67.1%であり, 差はみられなかった(図 3C).

また各臨床病理学的因子と TLS 形成の関連については, 年齢, 性別, 臨床病期, 局所再発の有無, 術後頸部リンパ節後発転移の有無, 遠隔転移の有無のすべての点で統計学的有意差は認められなかった(表 2).

#### 4) HEV の局在と臨床的予後との関連

HEV 数が多い症例は, 腫瘍内部に HEV が均一に存在し, 結果 2) で示した様に, HEV<sup>high</sup> 群は予後が良いことが示された. しかし, 腫瘍部の HEV 数が少ないにも関わらず, 腫瘍辺縁部に限局して HEV が存在する症例が存在し, さらにそれらの症例の中には再発転移が少ないものがあつた. そこで, HEV の局在に着目し, 臨床的予後との関連について検討した. 腫瘍の辺縁部にのみ HEV が存在する症例(図 4A e, f, g, h)を腫瘍辺縁 HEV+, 腫瘍辺縁部に HEV が認められない症例(図 4A a, b, c, d)を腫瘍辺縁 HEV-とした. 全 83 例において腫瘍辺縁 HEV+群は 37 例, 腫瘍辺縁 HEV-群は 46 例であつた. 腫瘍辺縁 HEV+群と腫瘍辺縁 HEV-群について, ホットスポット法で算出した HEV 数を比較したところ, 腫瘍辺縁 HEV-群に比べ腫瘍辺縁 HEV+群では有意に多くの HEV が認められた(図 4B). 5 年無病生存率は腫瘍辺縁 HEV+群が 89.1%, 腫瘍辺縁 HEV-群が 49.3%であり, HEV が腫瘍辺縁部にみられる症例は有意に無病生存率が高いことが示された( $p < 0.001$ ) (図 4C). 各病期における腫瘍辺縁 HEV

+群の割合は Stage I が 58%, Stage II が 53%, Stage III が 15%, Stage IV が 13%であり, 腫瘍の進行に伴い腫瘍辺縁 HEV+ の割合は低下していた(図 4D). 早期症例である Stage I・II 群 62 例において腫瘍辺縁 HEV+ 群は 34 例, 腫瘍辺縁 HEV- 群は 28 例であった(図 4D). 早期症例における HEV の局在と 5 年無病生存率についても検討すると, 腫瘍辺縁 HEV+ 群が 88.1%, 腫瘍辺縁 HEV- 群が 64.2%であり ( $p=0.038$ ), HEV が腫瘍辺縁部にみられる症例は有意に無病生存率が高いことが示された(図 4E). また, 進行症例における HEV の局在と 5 年無病生存率についても検討すると, 腫瘍辺縁 HEV+ 群が 20%, 腫瘍辺縁 HEV- 群が 0%であり, HEV が腫瘍辺縁部にみられる症例は有意に無病生存率が高いことが示された ( $p=0.048$ ) (図 4F).

各臨床病理学的因子と HEV の局在について検討した. 腫瘍辺縁 HEV- 群と比較し, 腫瘍辺縁 HEV+ 群は早期症例である Stage I・II 群 ( $p=0.001$ ), 術後頸部リンパ節非転移群 ( $p=0.001$ ) で有意に多かった. 年齢, 性別, 局所再発の有無, 遠隔転移の有無の間には統計学的有意差を認めなかった(表 2).

#### 5) CD8 陽性細胞の数, 局在と臨床的予後との関連

HEV はリンパ球を血管内から組織内に誘導する機能を果たすとされる. そのため, HEV により腫瘍部に誘導されるリンパ球についても評価を行うこととした. 今回は癌間質部に認められるリンパ球のうち腫瘍免疫の主体を成す殺細胞性 T 細胞に着目した. 殺細胞性 T 細

胞のマーカーCD8 が陽性の類円形細胞を殺細胞性 T 細胞として、CD8 陽性細胞を評価した。

HEV のホットスポット内に認められた CD8 陽性細胞の数は、0～388 個で中央値は 77.6 個、第三四分位点での個数は 177.8 個であった。第三四分位点 177.8 をカットオフ値として、CD8 陽性細胞の数が 177.8 より高値である症例を CD8<sup>high</sup>、低値である症例を CD8<sup>low</sup> とし、83 例を CD8<sup>high</sup>、CD8<sup>low</sup> の 2 群に分類した(図 5A)。CD8<sup>high</sup> 群と CD8<sup>low</sup> 群における 5 年無病生存率は、CD8<sup>high</sup> 群が 70.7%、CD8<sup>low</sup> 群が 66.4%であり、CD8<sup>high</sup> 群の方が生存率が高い傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった(p=0.716)(図 5B)。CD8 陽性細胞の局在は症例により多様であることから、CD8 陽性細胞の局在にも着目し、臨床的予後との関連を検討した。

腫瘍内に瀰漫性に CD8 陽性細胞が浸潤する症例を CD8 瀰漫性浸潤群(図 5C a, b, c)、腫瘍内部への CD8 陽性細胞の浸潤は少ないが腫瘍を取り囲む様に辺縁に存在する症例を CD8 腫瘍辺縁浸潤群(図 5C d, e, f)とした。CD8 瀰漫性浸潤群は 62 例、CD8 腫瘍辺縁浸潤群は 21 例であった。CD8 瀰漫性浸潤群と CD8 腫瘍辺縁浸潤群における 5 年無病生存率は、CD8 腫瘍辺縁浸潤群が 85.4%、CD8 腫瘍辺縁浸潤群が 61.7%であり、CD8 陽性細胞が腫瘍を取り囲む様に辺縁に存在する症例は有意に無病生存率が高いことが示された(p=0.045)(図 5D)。

さらに CD8 陽性細胞の局在と HEV の局在との関連について検討した。CD8 腫瘍辺縁浸潤群 21 例のうち腫瘍辺縁 HEV+症例は 12 例(57%)、CD8 瀰漫性浸潤群 62 例のうち腫瘍辺縁 HEV+症例は 25 例(40%)であり、CD8 瀰漫性浸潤群と比較し、CD8 腫瘍辺縁浸潤群の方が腫瘍辺縁 HEV+症例である割合が多い傾向を示した(図 5E)。

各臨床病理学的因子と CD8 陽性細胞数・CD8 陽性細胞の局在の関連について検討したところ、年齢、性別、臨床病期、局所再発の有無、術後頸部リンパ節後発転移の有無、遠隔転移の有無の間に統計学的有意差は認められなかった(表 2)。

#### 6) Cox 比例ハザードモデルによる生存分析

Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析では、病期、HEV の局在、CD8 陽性細胞の局在については無病生存率に有意な差が認められた(病期、HEV の局在  $p < 0.001$ 、CD8 陽性細胞の局在  $p = 0.045$ )一方で、年齢、性別、HEV の数、TLS 形成の有無、CD8 陽性細胞数と無病生存率に有意な差はなかった。

続いて、同モデルを用いた多変量解析を行い、相対的死亡リスクを算定した。病期、HEV の局在、CD8 陽性細胞の局在の 3 つの因子が独立して無病生存率に影響を与えることが示された。進行症例より早期症例は再発・転移のリスクが 0.255 倍と低く(95% CI 0.112-0.579,  $p = 0.001$ )、腫瘍辺縁 HEV-症例より腫瘍辺縁 HEV+症例は再発・転移のリスクが 0.287 倍低かった(95% CI 0.103-0.799,  $p = 0.017$ )。CD8 細胞の局在については CD8 瀰漫性浸潤群より CD8 腫瘍辺縁浸潤群は 0.236 倍再発・転移のリスクが低い(95% CI 0.069-0.803,  $p = 0.021$ )ことが示された(表 3)。



## 考察

近年、がん微小環境が注目されており、腫瘍浸潤リンパ球(Tumor Infiltrating Lymphocyte: TIL)が多くみられる症例は生命予後が良好であることが報告されている<sup>23-26)</sup>。2011年Martinetらは、ヒトの固形がんにおいてHEVが腫瘍内へのリンパ球浸潤を制御することで抗腫瘍免疫に働くことを示し、腫瘍組織内にHEVが存在することが良好な臨床転帰と相関することを初めて報告した<sup>16)</sup>。これまで口腔癌におけるHEVに関しては、その数や構造と予後との関連が報告<sup>18-20)</sup>されている。腫瘍組織中にHEVが多く認められる症例は臨床的予後が良いと報告されてきたが<sup>18,20)</sup>、本研究でも腫瘍組織中のHEV数が多い症例は有意に再発転移が少ないことが明らかになり、同様の結果が示された。しかし、HEVの局在に着目した研究はこれまでになく、今回、我々は初めて腫瘍辺縁におけるHEVの存在が臨床予後に非常に重要であることを示した。病期の進行に伴い、HEVが減少することは既に報告されている<sup>16-18)</sup>が、臨床病期とHEVの局在の関係についての報告はない。腫瘍部にHEVが形成される機序については、既存の血管の進展によるものか、あるいは循環血管内皮前駆細胞由来なのか、明らかにされていないが、HEVの形成・維持には、リンフォトキシン(LT)が関連するといわれている<sup>17,40-43)</sup>。HEVの血管内皮細胞表面にはLT $\beta$ 受容体が発現

しており、その維持にはLT $\beta$ 受容体シグナルが重要であることが示されている<sup>41)</sup>。In vivoでの検討において、血管内皮上のLT $\beta$ 受容体を特異的に欠失させたマウスでは、末梢リンパ節のHEVの形成不全が生じ、リンパ球のホーミングも著しく阻害されていた<sup>40)</sup>。また、樹状細胞を除去したマウスでは、末梢リンパ節におけるMECA-79陽性血管(HEV)が減少することが観察されていた<sup>42)</sup>。ヒト腫瘍においても、腫瘍内HEV密度と樹状細胞の密度の間に有意な正の相関があり、LT $\beta$ と成熟樹状細胞のマーカーであるDC-LAMPの発現量がそれぞれ、CCL19・CCL21・CXCL13の発現量と有意な正の相関を示したことが報告されている<sup>17)</sup>。これらのことから樹状細胞由来のLT $\beta$ がHEVの維持に重要であることが示唆されている。

本研究ではStage I・IIの早期症例では腫瘍辺縁にHEVが存在する症例が半分以上みられたが、後期Stageでは腫瘍辺縁にHEVが認められる症例が少なかった。すなわち腫瘍の進行に伴い腫瘍辺縁のHEVが減少することが示唆された(図4D)。この理由として我々は2つの可能性を考えている。一つは辺縁に存在していたHEVが消失する機序として、腫瘍が周囲に浸潤増殖する際に、放出するサイトカイン等により樹状細胞のLT $\beta$ 産生量が低下、あるいはHEVにおけるLT $\beta$ 受容体発現量が減少すること、2つめとして、もともと腫瘍辺縁HEVが少ない症例では、CD8陽性細胞や樹状細胞が誘導されず腫瘍細胞が水平方向、垂直方向へ容易に浸潤するため、進行癌になりやすいという可能性である。今後、我々はこれらの可能性について研究を進め、腫瘍辺縁HEVの形成、消失の機序を明らかにする予定である。

口腔癌発症のリスク因子は、飲酒、喫煙、慢性の機械刺激など炎症を伴うものが多い。頭頸部扁平上皮癌で、炎症性サイトカインである IL-6 が高発現しているという報告<sup>37)</sup>や、様々ながん種において IL-6 高発現と予後不良との関連が報告されている<sup>32-37)</sup>。IL-6 は、STAT3 を活性化することにより樹状細胞を抑制することが知られている<sup>38)</sup>。樹状細胞は、HEV の形成・維持に重要な細胞であり<sup>17)</sup>、ナイーブ CD8 陽性細胞の活性化と細胞傷害性 T 細胞 (CTL) への分化にも重要な役割を果たしている<sup>39)</sup>。今回の研究で HEV 及び CD8 陽性細胞の局在が重要であったことに、IL-6 が関与していることも考えられる。腫瘍中心部では IL-6 の産生に伴い、樹状細胞の機能が抑制され、HEV によるリンパ球誘導が抑制された可能性も考えられた。さらに、既に腫瘍部に誘導されていた CD8 陽性細胞が CTL へ分化することができず抗腫瘍効果が得られなかったことも考えられた。一方、腫瘍辺縁部は、腫瘍中心部と比較しサイトカインの影響を受けにくく、その結果樹状細胞が正常に機能し、HEV、CTL が誘導・活性化され腫瘍免疫が働いたのではないかと推測された。今後は、CTL について活性化マーカーを用いて検討を行い、HEV と CD8 陽性細胞の活性化状態との関連について解析予定である。

抗腫瘍免疫において重要な役割を果たしている細胞の 1 つに CD8 陽性細胞がある。早期直腸癌においては、腫瘍中心部及び腫瘍浸潤縁の双方で CD8 陽性細胞の密度が高いと臨床的予後が良好であることが示されている<sup>24)</sup>。また、上皮性卵巣癌においては腫瘍胞巣内への T 細胞の浸潤が重要であり、癌間質部の T 細胞浸潤は予後に影響を与えないことも示さ

れている<sup>23)</sup>。一方で、腫瘍胞巣内への T 細胞ではなく癌間質部の T 細胞浸潤が乳癌の良好な予後に関連するといった報告もある<sup>25)</sup>。口腔癌においては、Chen らが腫瘍中心部と腫瘍辺縁部における CD3 陽性細胞、CD8 陽性細胞の数と疾患特異的生存率について検討を行っている。腫瘍中心部、腫瘍辺縁部ともに CD8 陽性細胞数による予後の差はなく、腫瘍辺縁部で CD3 陽性細胞が多いと有意に予後が良かったと報告している<sup>26)</sup>。このように腫瘍においてリンパ球浸潤が多い症例は、臨床予後が良いことを示した報告<sup>23-26)</sup>が多数存在する一方、リンパ球浸潤が多い症例で有意に再発が多いことを示した報告もある<sup>31)</sup>。このように、CD8 陽性細胞はその数や局在について、様々な検討がされているが、いまだ臨床的予後との相関については明らかではなく、検討の必要がある。本研究は HEV を介して腫瘍部に浸潤する CD8 陽性細胞の局在が臨床的予後と相関することを示唆しており、抗腫瘍免疫の新たなメカニズムの解明につながることを期待される。

腫瘍部に形成される樹状細胞、T 細胞、B 細胞、HEV から構成される三次リンパ構造 (TLS) ががんの良好な予後に寄与するという報告がある<sup>21, 22, 27, 28)</sup>。近年 TLS は免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーとしても期待されている<sup>29, 30)</sup>。口腔癌においては治療法が手術のみならず、術後治療として化学療法や放射線療法が行われた症例が含まれる報告<sup>21)</sup>や、リンパ濾胞を形成する成熟 TLS とリンパ濾胞を形成していないが未成熟 TLS をともに解析対象とした報告<sup>22)</sup>があるが、論文報告はわずかであり、口腔癌組織における TLS の存在意義はいまだ十分には解明されていない。今回検討した 83 例中 11 例 (13.3%) に TLS 形

成が認められた (図 3B) . 口腔扁平上皮癌組織中の TLS に関する報告<sup>21,22)</sup>では, TLS 形成を認めた症例は対象症例中およそ 10-20%と比較的少なく, 今回も同様の結果であった. 臨床予後については, TLS 形成を認めなかった症例と, TLS 形成を認めた症例で有意な差は認められず (図 3C), これまでの報告とは異なる結果であった. 本研究の対象の進行症例は, 初回治療として全例手術可能で, 術後治療が必要となるリスク因子を有する症例はなかった. そのためいずれも術後照射治療を行っていない. 一方, 先行論文では手術後に放射線治療または放射線治療後に手術を行った症例が 8 割を占めていた<sup>21)</sup>. In vivo での検討において, 放射線照射が TLS にアポトーシスと一過性のサイズ縮小を引き起こすが, その後 TLS の大きさは回復し, むしろ照射前よりも活性化した CD8 陽性細胞が有意に増加することが示されており<sup>44)</sup>, 放射線治療による免疫調整作用が期待されている. 以上のことから, TLS 形成と生命予後についての検討において, 本研究とこれまでの報告との間に違いがあったのではないかと考える. また, TLS 形成の有無と HEV の数について, TLS 形成がみられない症例と比較し, TLS 形成がみられた症例は, HEV 数が有意に多かった (図 3B) が, これは, TLS には HEV の誘導, 維持に重要である樹状細胞が存在したためではないかと考えられる. しかし, 本研究では口腔癌組織中の IL-6 や樹状細胞について検討できておらず, 今後更なる解析が必要である.

本研究により, 口腔扁平上皮癌において HEV 及び CD8 陽性細胞はその数よりも局在が臨床的予後に重要であることが示され, HEV の抗腫瘍免疫効果のメカニズムについて解明する上

で重要な足がかりとなると考えられる。今後、HEV 及び CD8 陽性細胞が口腔扁平上皮癌の術後頸部リンパ節転移の予測マーカーとして、また将来的には免疫チェックポイント阻害薬使用のコンパニオンマーカーの1つとして診断に用いられることが期待される。

#### 結論

本研究により、口腔扁平上皮癌において HEV 及び CD8 陽性細胞の局在が予後予測因子として有用であることが示唆された。

#### 謝辞

本研究に多大なるご支援とご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学分野血管生物分子病理学教室 樋田京子教授，東野史裕准教授，松田彩助教，間石奈湖助教ならびに血管生物分子病理学教室 教室員各位，口腔病態学分野口腔顎顔面外科教室 鄭漢忠名誉教授，大廣洋一准教授ならびに教室員各位，医学研究院外科系部門外科学分野循環器・呼吸器外科学教室 樋田泰浩准教授に厚く御礼申し上げます。また，北海道がんセンター口腔腫瘍外科 上田倫弘医長ならびに北海道がんセンターの症例を提供いただいた同センター病理診断科 鈴木宏明臨床病理研究室長に厚く感謝申し上げます。

#### 参考文献

1. 日本頭頸部癌学会編. 頭頸部癌取扱い規約第6版, 金原出版, 東京, 2018.
2. 日本頭頸部癌学会, 頭頸部悪性腫瘍全国登録(2012年度)
3. Japan Society for Head and Neck Cancer Registry Committee. Report of head and neck cancer registry of Japan. Clinical statistics of registered patients, 2002. Jpn J Head and Neck Cancer 2006 ; 32 (suppl) : 15-34.
4. 全国がんセンター協議会, 生存率共同調査 (2015年8月集計)
5. Capote-Moreno A, Naval L, et al. Prognostic factors influencing contralateral neck lymph node metastases in oral and oropharyngeal carcinoma. J Oral Maxillofac Surg. 2010 ; 68 : 268-75.
6. 山川延宏, 山中康嗣, 他. 舌扁平上皮癌N0症例の治療成績と頸部後発転移についての検討. 口腔腫瘍. 2014 ; 26 : 17-24.
7. Yamamoto E, Miyakawa A, et al. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Head Neck Surg. 1984 ; 6 : 938-47.

8. 小浜源郁, 野口 誠, 他. 口腔扁平上皮癌の臨床所見と病理組織所見に基づいた外科療法 481 例の分析. 口腔腫瘍. 2001 ; 13 : 33-41.
9. Amin MB, Edge S, et al. AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed. Springer, Switzerland, p3-94, 2017.
10. Brierley JD, Gospodarowicz MK, et al. eds. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2017.
11. 吉田祥子, 岸本晃治, 他. 舌扁平上皮癌における新TNM分類(UICC:第8班)の実用性. 口腔腫瘍. 2018 ; 30 : 151-157.
12. Michael W, Miriam N, et al. Staging more important than grading? Evaluation of malignancy grading, depth of invasion, and resection margins in oral squamous cell carcinoma. Clin Oral Invest. 2021; 25: 1169-1182.
13. Miyasaka M., et al.: Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: Dogmas and enigmas. Nat. Rev. Immunol. 2004; 4: 360-370.
14. Tanaka T., et al.: Molecular determinants controlling homeostatic recirculation and tissue specific trafficking of lymphocytes. Int. Arch. Allergy Immunol. 134: 120-134, 2004.
15. Aloisi, F. and Pujol-Borrell, R. Lymphoid neogenesis in chronic



- inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6, 205-217.
16. Martinet, L. et al. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 2011, 71, 5678-5687
  17. Martinet, L, Filleron T, et al: Lymphocytes Are Associated with Lymphotoxin  $\beta$ -Producing Dendritic Cells in Human Breast Cancer. *The Journal of Immunology.* 2013, 191(4): 2001-2008.
  18. Anna M.W, Oddveig G.R., et al: Presence of tumour high-endothelial venules is an independent positive prognostic factor and stratifies patients with advanced-stage oral squamous cell carcinoma. *Tumor Biol.* 2016; 37:2449-2459.
  19. Hui S, Xiang W, et al: Alterations of high endothelial venules in primary and metastatic tumors are correlated with lymph node metastasis of oral and pharyngeal carcinoma. *Cancer Biology & Therapy.* 2014; 15: 342-349.
  20. Anna M.W, Ida K.E., et al: Presence of high-endothelial venules correlates with a favorable immune microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Modern Pathology.* 2018.

21. Anna M.W, Oddveig G.R., et al: Characterisation and prognostic value of tertiary lymphoid structures in oral squamous cell carcinoma. *BMC Clinical Pathology* 2014; 14:1-10
22. Qunxing L, Xiangqi L, et al: Prognostic value of tertiary lymphoid structure and tumour infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral Science*. 2020; 12.
23. Lin Zhang, Jose R.C.G, et al: Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N ENGL L MED*. 2003; 348: 203-13
24. Franck Pages, Amos Kirilovsky, et al: In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *Journal Of Clinical Oncology*. 2009; 27: 5944-5951
25. Sahar M.A. Mahmoud, Emma Claire Paish, et al: Tumor-Infiltrating CD8<sup>+</sup> Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *Journal Of Clinical Oncology*. 2011; 29: 1949-1955
26. Chen Zhou, Yaping Wu, et al: Density location of CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes correlate with prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2018; 47: 359-367

27. Luc de Chaisemartin, Jeremy Goc, et al: Characterization of Chemokines and Adhesion Molecules Associated with T cell Presence in Tertiary Lymphoid Structures in Human Lung Cancer. *Cancer Research*. 2011; 71(20): 6391-9
28. YOSHIHITO YAMAKOSHI, HIROAKI TANAKA, et al: Immunological potential of tertiary lymphoid structures surrounding the primary tumor in gastric cancer. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*. 2020; 57: 171-182
29. Beth A Helminck, Sangeetha M. Reddy, et al: B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature*. 2020; 577: 549-555
30. Rita Cabrita, Martin Lauss, et al: Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*. 2020; 577: 561-565
31. Gregory T. Wolf, Douglas B. Chepeha, et al: Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) and Prognosis in Oral Cavity Squamous Carcinoma: A Preliminary Study. *Oral Oncology*. 2016; 61: 159-165

32. C W Wu, S R Wang, et al: Serum interleukin-6 levels reflect disease status of gastric cancer. *The American journal of gastroenterology*. 1996; 91(7): 1417-22
33. T Tsukamoto, Y Kumamoto, et al: Interleukin-6 in renal cell carcinoma. *The Journal of urology*. 1992; 148(6): 1778-81
34. Jun Nakashima, Masaaki Tachibana, et al: Serum Interleukin 6 as a Prognostic Factor in Patients with Prostate Cancer. *Clinical Cancer Reserch*. 2000; 6: 2701-2706
35. M Plante, S C Rubin, et al: Interleukin-6 level in serum and ascites as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer*. 1994; 73(7): 1882-8
36. G J Zhang, I Adachi: Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer research*. 1999; 19(2B): 1427-32
37. Sonia A. Duffy, Jeremy M.G. Taylor, et al: Interleukin-6 Predicts Recurrence and Survival Among Head and Neck Cancer Patients. *Cancer*. 2008; 113(4): 750-7

38. Sung-Joo Park, Takayuki Nakagawa, et al: IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 Activation. *The Journal of Immunology*. 2004; 173: 3844-3854
39. MARY F. LIPSCOMB, BARBARA J. MASTEN: Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*. 2002; 82: 97-130
40. Lucas Onder, Renzo Danuser, et al: Endothelial cell-specific lymphotoxin- $\beta$  receptor signaling is critical for lymph node and high endothelial venule formation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2013; 210(3): 465-473
41. Shan Liao, Nancy H. Ruddle: Synchrony of High Endothelial Venules and Lymphatic Vessels Revealed by Immunization. *The journal of Immunology*. 2006; 177: 3369-3379
42. Christine Moussion, Jean-Philippe Girard: Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *NATURE*. 2011; 479: 542-546
43. Ann Ager, Michael J May: Understanding high endothelial venules: Lessons for cancer immunology. *OncoImmunology*. 2015; 4: e10087991-1-14

44. Gael Boivin, Pradeep Kalambaden, et al: Cellular Composition and Contribution of Tertiary Lymphoid Structures to Tumor Immune Infiltration and Modulation by Radiation Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2018; 8: 1-13

表1：全83例の臨床病理学的パラメーター

	計	
	n=83	(%)
年齢		
<65	45	(54)
≥65	38	(46)
性別		
男	44	(53)
女	39	(47)
TNM 病期 <sup>†</sup>		
I	24	(29)
II	38	(46)
III	13	(16)
IV	8	(9)
局所再発		
なし	75	(90)
あり	8	(10)
術後頸部リンパ節転移		
なし	62	(75)
あり	21	(25)
術後遠隔転移		
なし	80	(96)
あり	3	(4)

<sup>†</sup>UICCのTNM分類第8版を使用

(表2) 83人の患者における各2群間のカイ二乗検定による比較

臨床病理学的 パラメーター	患者数(%)		患者数(%)		患者数(%)		患者数(%)		患者数(%)						
	HEV <sup>high</sup> (n=28)	HEV <sup>low</sup> (n=55)	p-Value	TLS <sup>+</sup> (n=11)	TLS <sup>-</sup> (n=72)	p-Value	腫瘍辺縁 HEV <sup>+</sup> (n=37)	腫瘍辺縁 HEV <sup>-</sup> (n=46)	p-Value	CD8 <sup>high</sup> (n=21)	CD8 <sup>low</sup> (n=62)	p-Value	CD8 <sup>浸潤 瀰漫性 腫瘍辺縁</sup> (n=21)	CD8 <sup>浸潤 瀰漫性 腫瘍辺縁</sup> (n=62)	p-Value
年齢															
<65	16 (57.1)	29 (52.7)	0.703	4 (36.4)	41 (56.9)	0.202	24 (64.9)	21 (45.7)	0.081	24 (57.1)	21 (51.2)	0.588	34 (54.8)	11 (52.4)	0.845
≥65	12 (42.9)	26 (47.3)		7 (63.6)	31 (43.1)		13 (35.1)	25 (54.3)		18 (42.9)	20 (48.8)		28 (45.2)	10 (47.6)	
性別															
男	16 (57.1)	28 (50.9)	0.591	4 (36.4)	40 (55.6)	0.235	20 (54.1)	24 (52.2)	0.865	25 (59.5)	19 (46.3)	0.229	32 (51.6)	12 (57.1)	0.661
女	12 (42.9)	27 (49.1)		7 (63.6)	32 (44.4)		17 (45.9)	22 (47.8)		17 (40.5)	22 (53.7)		30 (43.4)	9 (42.9)	
病期 <sup>†</sup>															
I, II	23 (82.1)	39 (70.9)	0.266	8 (72.7)	54 (75.0)	0.565	34 (91.9)	28 (60.9)	0.001*	32 (76.2)	30 (73.2)	0.752	49 (79.0)	13 (61.9)	0.119
III, IV	5 (17.9)	16 (29.1)		3 (27.3)	18 (25.0)		3 (8.1)	18 (39.1)		10 (23.8)	11 (26.8)		13 (21.0)	8 (38.1)	
局所再発															
なし	26 (92.9)	49 (89.1)	0.711	10 (90.9)	65 (90.3)	0.714	35 (94.6)	40 (87.0)	0.215	38 (90.5)	37 (90.2)	0.971	54 (87.1)	21 (100)	0.193
あり	2 (7.1)	6 (10.9)		1 (9.1)	7 (9.7)		2 (5.4)	6 (13.0)		4 (9.5)	4 (9.8)		8 (12.9)	0 (0)	
術後リンパ節 後発転移															
なし	25 (89.3)	37 (67.3)	0.029*	9 (81.8)	53 (73.6)	0.435	34 (91.9)	28 (60.9)	0.001*	31 (73.8)	31 (75.6)	0.850	44 (71.0)	18 (85.7)	0.179
あり	3 (10.7)	18 (32.7)		2 (18.2)	19 (26.4)		3 (8.1)	18 (39.1)		11 (26.2)	10 (24.4)		18 (29.0)	3 (14.3)	
術後遠隔転移															
なし	28 (100)	52 (94.5)	0.547	11 (100)	69 (95.8)	0.649	37 (100)	43 (93.5)	0.165	41 (97.6)	39 (95.1)	0.616	59 (95.2)	21 (100)	0.568
あり	0 (0)	3 (5.5)		0 (0)	3 (4.2)		0 (0)	3 (6.5)		1 (2.4)	2 (4.9)		3 (4.8)	0 (0)	

<sup>†</sup>UICCのTNM分類第8版を使用, \* $p < 0.05$  was considered statistically significant.



(表3) 83人のOSCC患者における無病生存率の単変量および多変量解析

検討項目	Disease-free survival		
	Univariate p-Value	Multivariate	
		HR (95%CI)	p-Value
年齢			
<65	0.781		
≥65			
性別			
男	0.143		
女			
病期 <sup>†</sup>			
I, II	<0.001*	0.255 (0.112-0.579)	0.001*
III, IV			
HEV数			
High (≥3.6)	0.039*	1.097 (0.298-4.042)	0.890
Low (< 3.6)			
TLS形成			
なし	0.772		
あり			
HEVの局在 (腫瘍辺縁)			
なし	<0.001*	0.287 (0.103-0.799)	0.017*
あり			
CD8細胞数			
High (≥177.8)	0.716		
Low (< 177.8)			
CD8の局在			
DI	0.045*	0.236 (0.069-0.803)	0.021*
TMI			

HR: Hazard ratio, CI : confidence interval.

<sup>†</sup>UICCのTNM分類第8版を使用

\* $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 図の説明

### 図 1 実験の方法

(A) HEV 数, CD8 陽性細胞数の計測. HEV 数: 癌部において 20 倍の強拡大視野内に含まれる MECA-79 陽性 HEV の数が多い上位 5 箇所をホットスポットとし, ホットスポットに含まれる HEV 数の平均値を算出した. CD8 陽性細胞数: HEV のホットスポットに認められる CD8 細胞数を計測し, 平均値を算出した. (B) 三次リンパ様構造(Tertiary lymphoid structure: TLS)の評価. HE 標本でリンパ濾胞形成が確認できた症例のうち, リンパ濾胞に HEV, T 細胞, B 細胞が全てみられた症例を TLS 形成症例とした. (C) HEV 及び CD8 陽性細胞の局在の評価. HEV の局在: 腫瘍辺縁部から腫瘍側, 正常側それぞれ 150  $\mu$ m の領域に認める HEV の有無について評価した. CD8 陽性細胞の局在: CD8 陽性細胞が腫瘍内部に瀰漫性に浸潤する症例, CD8 陽性細胞が腫瘍辺縁に局限して浸潤する症例の 2 群に分類した.

### 図 2 口腔扁平上皮癌組織中の HEV の数と臨床的予後の関連

(A) 口腔扁平上皮癌の HE, CD31, MECA-79 染色像. (a)-(f) は HEV がみられなかった症例, (g)-(l) は HEV がみられた症例の腫瘍部の染色像. (a), (d), (g), (j) は HE 染色像, (b), (e), (h), (k) は CD31 染色像, (c), (f), (i), (l) は MECA-79 染色像を示す. スケールバー, 0.1 mm. (B) ホットスポット法により算出した HEV 数について, 上位 1/3, 下位 2/3

を画する数値をカットオフ値とし、HEV<sup>high</sup>とHEV<sup>low</sup>の2群に分類した。(C)HEV<sup>high</sup>とHEV<sup>low</sup>の5年無病生存率のKaplan-Meier曲線。log-rank testを用いた統計解析で、有意な相関が見られた(DFS, p=0.039\*)。

### 図3 腫瘍組織中のTLS形成と臨床的予後との関連

(A)口腔扁平上皮癌のHE, MECA-79, CD3, CD20染色像。(a)-(d)はTLSの形成がみられない症例, (e)-(h)はTLSの形成がみられる症例の染色像。(a), (e)はHE染色像。(b), (f)はMECA-79染色像, (c), (g)はCD3染色像, (d), (h)はCD20染色像を示す。スケールバー, 0.25mm。(B)TLSを形成していない症例とTLS形成症例のHEV数の比較(Mann-Whitney U test, p=0.005\*)。(C)TLSを形成していない症例とTLS形成症例の無病生存率のKaplan-Meier曲線。log-rank testを用いた統計解析では、有意な相関は見られなかった(DFS, p=0.772)。

### 図4 HEVの局在と臨床的予後との関連

(A)腫瘍辺縁部のHE, MECA-79染色像。(a)-(d)は腫瘍辺縁にHEVを認めない症例, (e)-(h)は腫瘍辺縁にHEVを認める症例の染色像。(a), (c), (e), (g)はHE染色像, (b), (d), (f), (h)はMECA-79染色像を示す。スケールバー, 0.25mm。矢印はHEVを示す。(B)腫瘍辺縁にHEVを認めない症例と腫瘍辺縁にHEVを認める症例のHEV数の比較(Mann-Whitney U

test,  $p < 0.001^*$ ). (C) 腫瘍辺縁に HEV を認めない症例と腫瘍辺縁に HEV を認める症例の無病生存率の Kaplan-Meier 曲線. log-rank test を用いた統計解析で, 有意な相関が見られた (DFS,  $p < 0.001^*$ ) (D) 各病期における腫瘍辺縁に HEV を認める症例の割合 (カイ二乗検定,  $p = 0.001^*$ ). (E) 早期症例における腫瘍辺縁に HEV を認めない症例と腫瘍辺縁に HEV を認める症例の無病生存率の Kaplan-Meier 曲線. log-rank test を用いた統計解析で, 有意な相関が見られた (DFS,  $p = 0.038^*$ ). (F) 進行症例における腫瘍辺縁に HEV を認めない症例と腫瘍辺縁に HEV を認める症例の無病生存率の Kaplan-Meier 曲線. log-rank test を用いた統計解析で, 有意な相関が見られた (DFS,  $p = 0.048^*$ ).

#### 図 5 CD8 陽性細胞の数, 局在と臨床的予後との関連

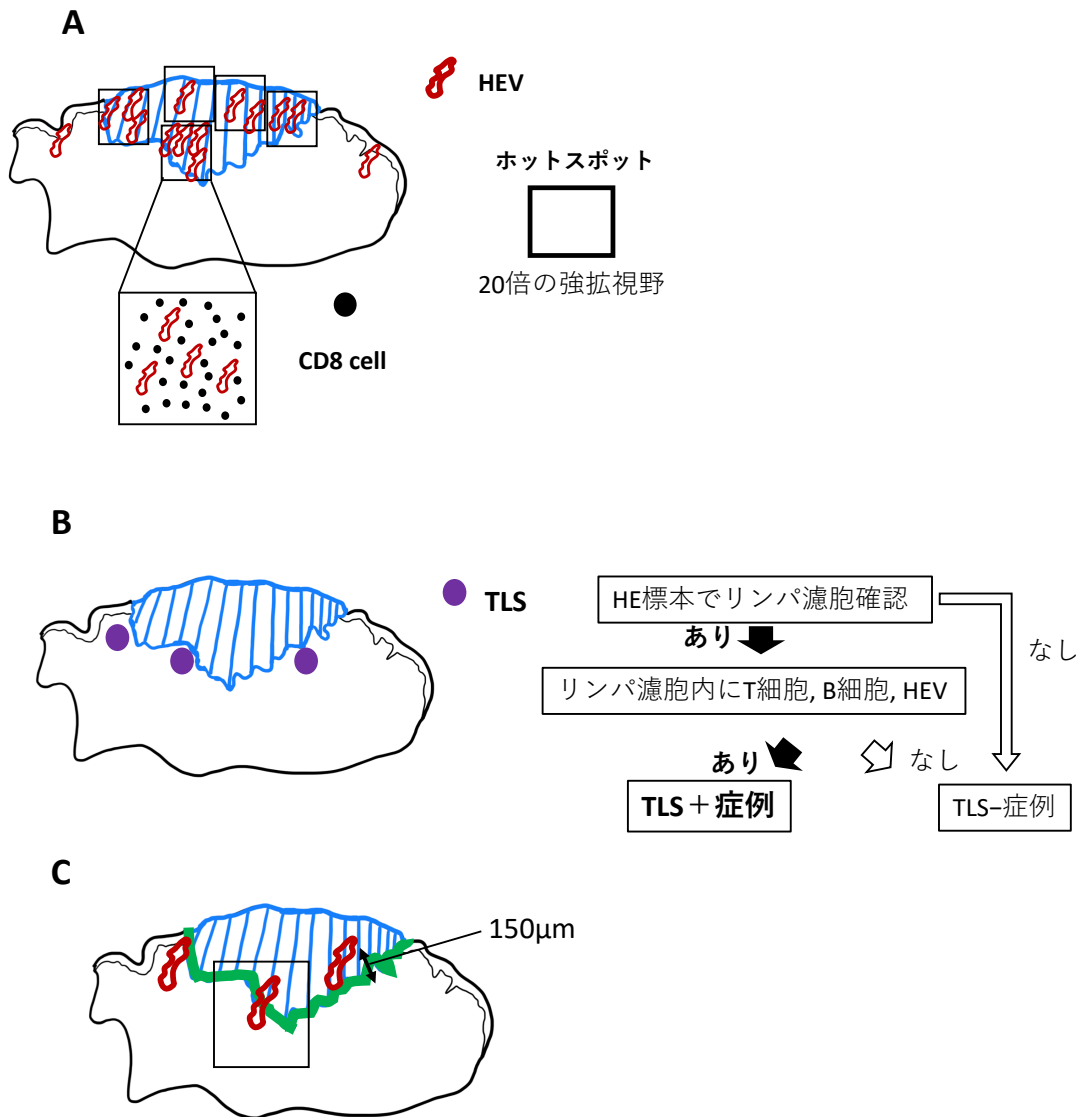
(A) CD8 陽性細胞数の第三四分位点をカットオフ値とし,  $CD8^{high}$  と  $CD8^{low}$  の 2 群に分類した.

(B) CD8 陽性細胞が多い症例と CD8 陽性細胞が少ない症例の無病生存率の Kaplan-Meier 曲線. log-rank test を用いた統計解析では, 有意な相関は見られなかった (DFS,  $p = 0.716$ ).

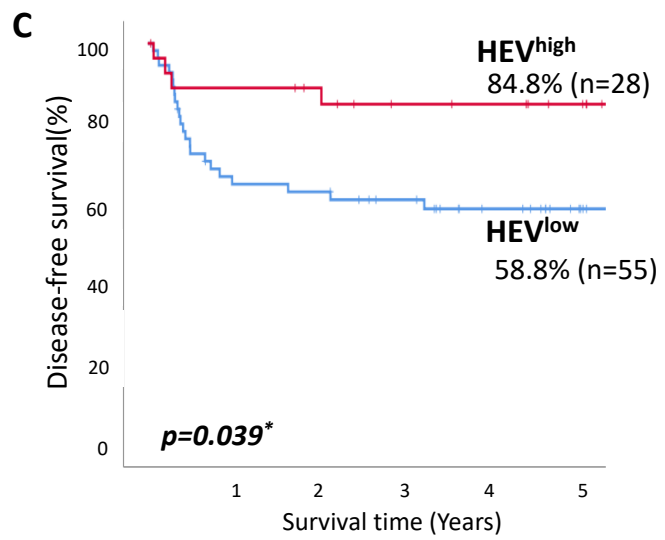
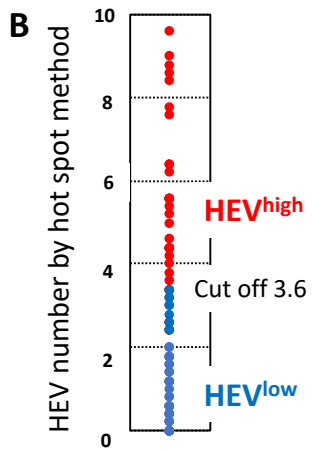
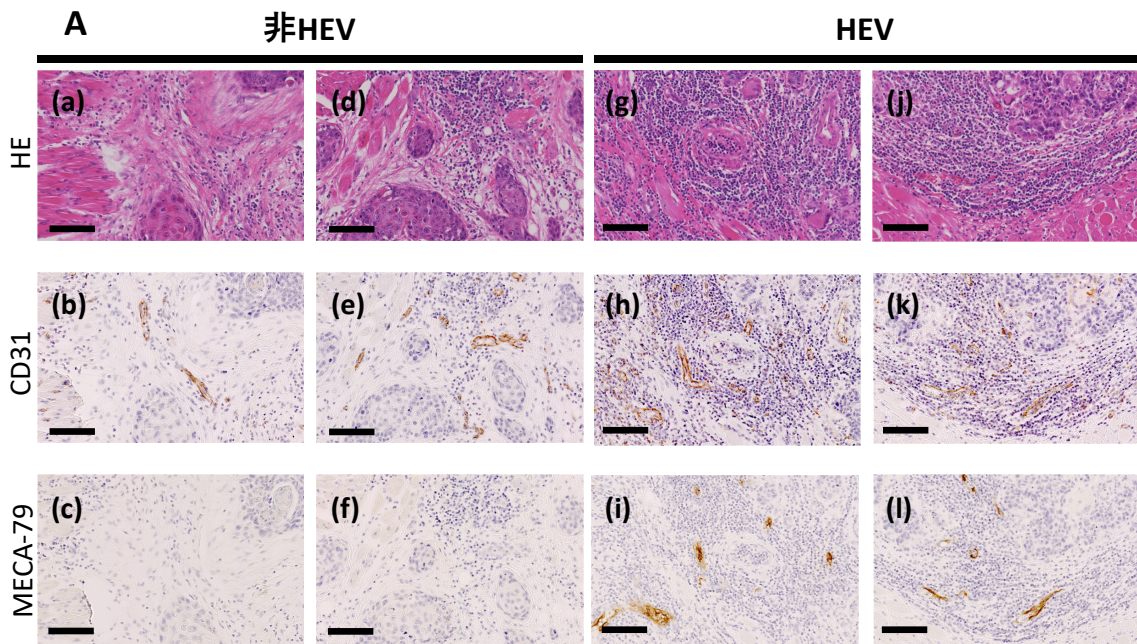
(C) CD8 陽性細胞の局在. (a)-(c) は CD8 陽性細胞が腫瘍部に瀰漫性に浸潤している症例の染色像, (d)-(f) は CD8 陽性細胞が腫瘍辺縁に局限している症例の染色像. (a), (d) は HE 染色像, (b), (c), (e), (f) は CD8 染色像を示す. スケールバー, (a), (b) 0.5mm, (c), (f) 0.25mm, (d), (e) 2.5mm. (D) CD8 陽性細胞が腫瘍部に瀰漫性に浸潤している症例と CD8 陽性細胞が腫瘍辺縁に局限している症例の無病生存率の Kaplan-Meier 曲線. log-rank

test を用いた統計解析で、有意な相関を認めた (DFS,  $p=0.045^*$ )。 (E) CD8 陽性細胞の局在と HEV の局在の関連。 CD8 陽性細胞が腫瘍辺縁に局限してみられた症例では腫瘍辺縁に HEV がみられた症例の割合が多かったが、統計学的に有意な相関は見られなかった (カイ二乗検定,  $p=0.18$ )。

図 1



☒2



☒3

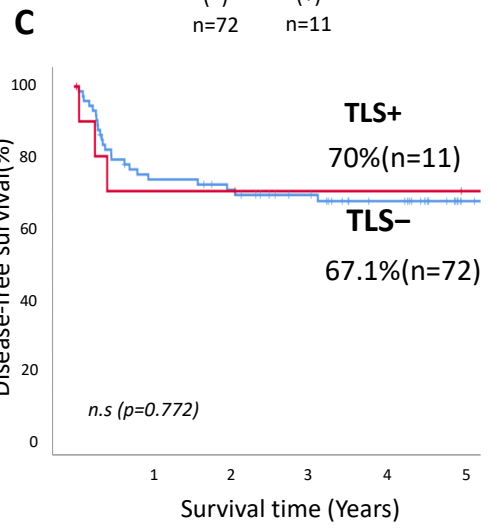
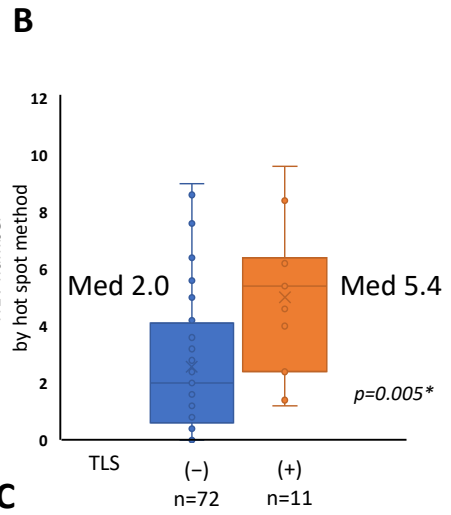
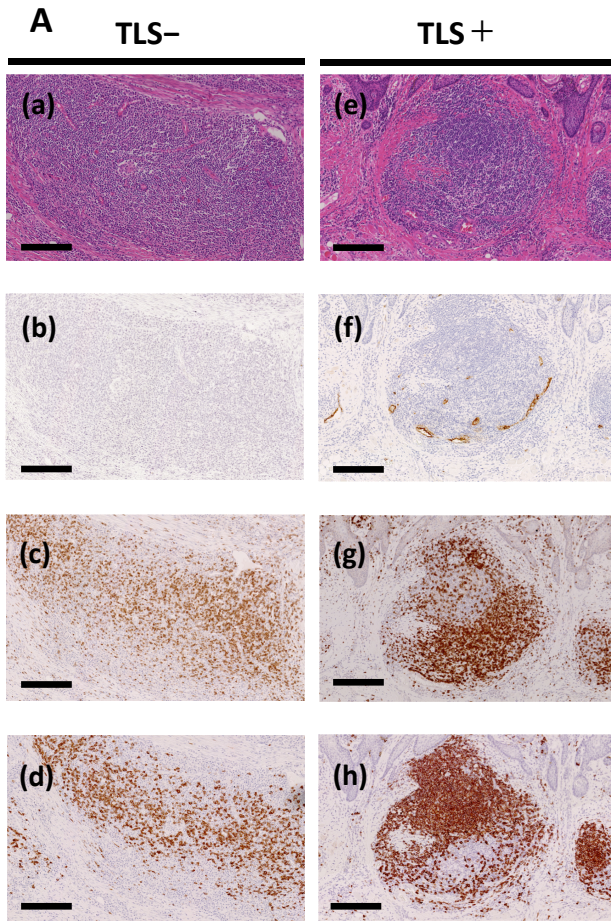
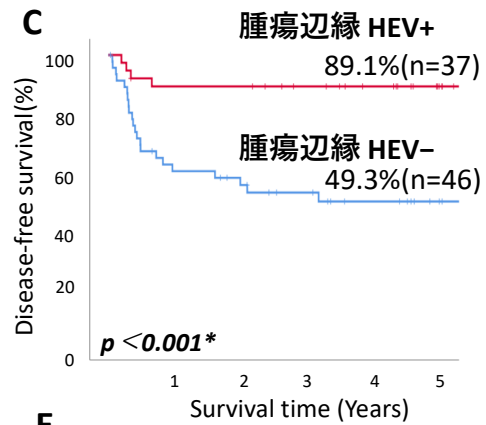
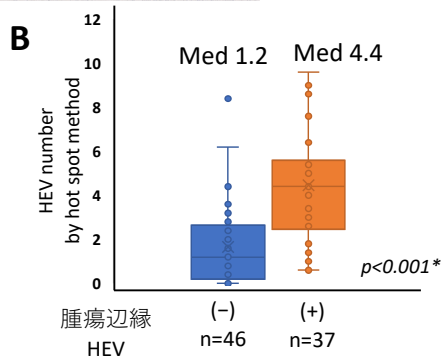
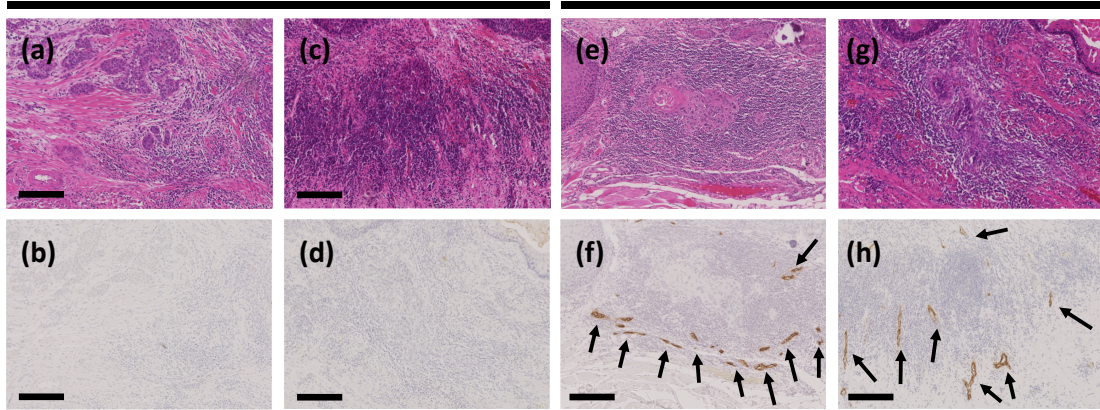




図4  
A

腫瘍辺縁HEV-

腫瘍辺縁HEV+



**D**

Stage	腫瘍辺縁 HEV		腫瘍辺縁 HEV+ の割合
	-	+	
I	10	14	58%
II	18	20	53%
III	11	2	15%
IV	7	1	13%

Stage I・II vs Stage III・IV. chi-square test  $p = 0.001^*$

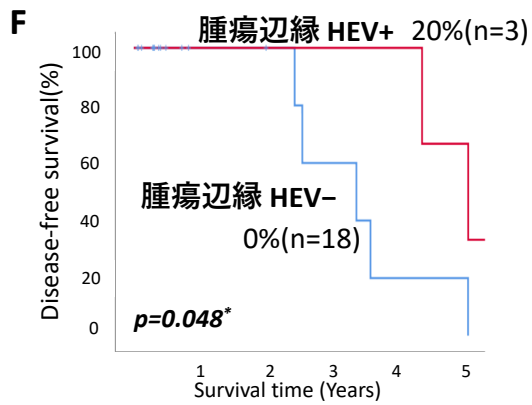
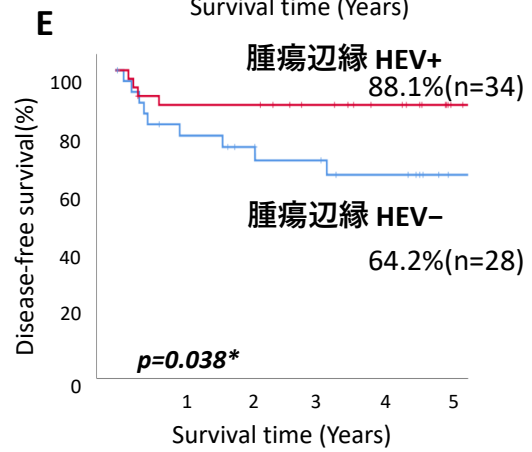


図5

