



# Integrated analysis of tertiary lymphoid structures in relation to tumor-infiltrating lymphocytes and patient survival in pancreatic ductal adenocarcinoma

田中, 雄志

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2023-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8700号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100485884>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Integrated analysis of tertiary lymphoid structures in relation to  
tumor-infiltrating lymphocytes and patient survival  
in pancreatic ductal adenocarcinoma

膵癌における腫瘍浸潤リンパ球と患者の生存に関連した三次リンパ組織の統合分析

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

消化器内科学

(指導教員：児玉 裕三 教授)

田中 雄志

## 【背景】

膵癌は最も悪性度の高い癌の 1 つである。膵癌の発癌や進行、転移において、癌周囲微小環境は重要な役割を果たしており、免疫担当細胞は癌周囲微小環境を構築する構成因子の 1 つである。癌周囲微小環境における抗腫瘍免疫反応の 1 つに、腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocytes ; TILs) が知られている。TILs を含めた癌周囲微小環境での抗腫瘍免疫反応、さらに全身性の抗腫瘍免疫反応は、従来はリンパ節のような 2 次リンパ組織で行われていると考えられてきた。しかし、近年 3 次リンパ組織 (Tertiary lymphoid structure ; TLS) が、癌周囲微小環境内で形成されることが明らかとなってきた。TLS は腫瘍の辺縁や内部にできる異所性リンパ組織であり、TLS 内部は中心に B 細胞ゾーン、周囲に T 細胞ゾーンを有する 2 次リンパ組織に類似した形態を呈している。大腸癌や乳癌、肺癌などでは、TLS の存在が良好な予後と関連していたことが報告されているが、膵癌と TLS との関連性については十分な検討はなされていない。また、がん遺伝子である *KRAS* 遺伝子変異、がん抑制遺伝子である *TP53*、*CDKN2A/p16*、*SMAD4* の遺伝子変異は膵癌において頻度の高い遺伝子変異であり、膵癌の発癌・進行過程にその蓄積が重要である。これらの遺伝子変異は膵癌に特徴的な 4 大遺伝子変異として知られ、予後との関連が報告されている。さらに、抗腫瘍免疫を抑制するメカニズムの 1 つに癌細胞における Programmed death ligand-1 (PD-L1) 発現が知られている。しかしながら、TLS と 4 大遺伝子変異や PD-L1 発現との関連性に関しても明らかではない。そこで、本研究では癌周囲微小環境における TLS と TILs、全身性免疫、臨床的予後、治療反応性、遺伝子変異、PD-L1 発現との関連性につき、包括的な統合分析を行う事を目的とした。

## 【方法】

2008 年 4 月から 2017 年 3 月の間に、神戸大学医学部附属病院で手術加療を受けた通常型膵管癌 162 例を対象とした。全対象症例の年齢、性別、Body mass index (BMI)、家族歴、飲酒喫煙歴、糖尿病歴、血液検査所見 (好中球数、リンパ球数、腫瘍マーカー) などの患者背景因子や、膵癌の臨床病期 (UICC 8th)、組織型、手術根治度、術前術後化学療法の有無、予後などの治療データは診療録より取得した。TLS は全組織切片の hematoxylin-eosin (H&E) 染色を観察し、腫瘍の辺縁もしくは内部に 1 つ以上あるものを TLS ありと定義した。TILs は腫瘍面積の一番多い切片で CD4、CD8、FOXP3、CD45RO の免疫組織化学染色を行い、同切片のうちそれぞれ 5mm 以上離れて 3 カ所でリンパ球数を Image J software (Java image processing program inspired by National Institute of Health (NIH), USA) を用いて平均値を測定し、中央値で高値群・低値群の 2 群に分類した。PD-L1 は免疫組織化学染色を行い、腫瘍の細胞膜における発現の有無を評価した。遺伝子変異の検索は、手術検体の formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) サンプルから DNA を抽出し、カスタムパネルターゲットシーケンスを行った。さらに *TP53*、*CDKN2A/p16*、*SMAD4* に関しては、droplet digital PCR (DDPCR) で Copy number variation (CNV) を検索し、最終的には免疫組織化学染色の結果とシーケンス・DDPCR の結果を統合して遺伝子変異の有無を判定した。また、膵癌

腫瘍内の Interferon (IFN)-gamma と Interleukin (IL)-2 の発現を検索するため、TLS を有する群と認めない群でそれぞれ 5 例ずつ In situ hybridization (ISH) を行った。さらに IFN-gamma に関しては、発現している細胞を確認する確認で、CD4 および CD8 との 2 重染色を行った。In vitro で、IFN-gamma および IL-2 と抗がん剤 (5-fluorouracil ; 5-FU) との相乗効果を検討するために、膵癌細胞株 (AsPC-1) を用いて Apoptosis assay を行い、投与 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後のアポトーシス細胞の割合を測定した。疾患特異的生存期間の解析は Kaplan-Meier 法、コックス比例ハザード分析を用い、群間の比較には、Fisher's exact test 及びロジスティック回帰分析を用いた。多変量解析は、ステージ・組織型・R 因子・術前/術後化学療法の有無・遺伝子変異の有無を調整因子として解析を行った。ISH におけるサイトカインの発現はウェルチ t 検定、Apoptosis assay における各群の比較にはダネット検定を用いた。P 値 0.05 以下を有意水準とし、すべての統計学的解析は JMP ver. 12 ソフトウェア を用いて行った。

### 【結果】

通常型膵管癌 162 例のうち、112 例 (69.1%) に TLS を認めた。112 例のうち、85 例 (75.9%) は TLS を辺縁のみに認めたが、27 例 (24.1%) は腫瘍辺縁だけではなく腫瘍内部にも TLS を認めた。患者背景因子において TLS を有する群は、喫煙 ( $P=0.02$ )、CA19-9 基準値範囲内 ( $P=0.02$ )、PD-L1 発現 ( $P=0.002$ ) と関連を認め、さらに T1 stage で多く認める傾向にあった ( $P=0.04$ )。4 大遺伝子変異は、*KRAS* (92.6%)、*TP53* (68.5%)、*CDKN2A/p16* (64.2%)、*SMAD4* (38.2%) の順に多く認め、既報と同様であった。TLS と 4 大遺伝子変異との関連は認めなかったが、*KRAS* 変異がある群において *KRAS*<sup>G12D</sup> 変異があると TLS を認めない傾向にあった ( $P=0.044$ )。多変量ロジスティック回帰分析において、TLS は CD4 陽性 TIL 高値 (Odds Ratio 3.50, 95%CI 1.65-7.80,  $P=0.001$ )、CD8 陽性 TIL 高値 (Odds Ratio 11.0, 95%CI 4.57-29.7,  $P<0.0001$ )、CD45RO 陽性 TIL 高値 (Odds Ratio 2.64, 95%CI 1.24-5.80,  $P=0.01$ )、および血中リンパ球高値 (Odds Ratio 2.46, 95%CI 1.21-5.12,  $P=0.01$ ) と関連を認めた。観察期間中央値は 26 カ月 (1 カ月~122 か月) であり、TLS を有する群は TLS を認めない群と比較し、有意に予後が延長した (Log rank test ;  $P<0.0001$ )。さらに TLS を有する群のうち、腫瘍辺縁および内部に TLS を有する群は、腫瘍辺縁のみに TLS を有する群と比較し、有意に良好な予後を示した (Log rank test,  $P=0.02$ )。コックス比例ハザード分析においても、TLS は独立して良好な予後を示した (Hazard Ratio 0.37, 95%CI 0.25-0.56,  $P<0.0001$ )。次に、TLS の有無と術後化学療法との関連性を検討するために、S-1 治療群 (74 例)・Gemcitabine 群治療 (43 例)・化学療法を施行していない群 (45 例) の 3 群に分類した。TLS を有さない群では S-1 投与による予後延長効果を認めなかったが (Log rank test,  $P=0.50$ )、TLS を有する群では S-1 投与による予後延長効果を認めた (Log rank test,  $P=0.02$ )。3 群の背景因子において、化学療法を施行していない群で有意に年齢が高く ( $P=0.007$ )、BMI が低く ( $P=0.02$ )、Gemcitabine 治療群で喫煙歴のある症例が多く ( $P=0.006$ )、R1 切除が多かった ( $P=0.003$ )。これら 4 つの因子で調整した多変量コックス比例ハザード分析の結果、TLS は、S-1 治療群において予後延長効果が示された (Hazard Ratio 0.51, 95%CI 0.26-0.97,  $P=0.04$ )。

さらに、TLS の S-1 投与による予後延長効果のメカニズムを解析するために TLS を有する群と認めない群で、IFN-gamma および IL-2 の ISH を行った。TLS を有する群では、認めない群と比較し、IFN-gamma および IL-2 の発現が有意に多かった ( $P<0.05$ )。さらに、ISH と免疫組織化学染色の 2 重染色を行い、IFN-gamma は CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と共発現していることが示された。次に膵癌細胞株 (AsPC-1) を用いて、IFN-gamma 単独・IL-2 単独・5-FU 単独・IFN-gamma+5-FU・IL-2+5-FU の投与を行い、Apoptosis assay を行った。7 日目のアポトーシス細胞の割合はコントロール群よりも IFN-gamma および 5-FU 投与群で有意に高く ( $P<0.01$ )、さらに IFN-gamma+5-FU の併用療法は、IFN-gamma 単独および 5-FU 単独よりも有意に高く ( $P<0.001$ )、IFN-gamma と 5-FU の腫瘍抑制における相乗効果が示された。

### 【考察】

膵癌の発癌や進行、転移において、抗腫瘍免疫反応は重要な要素の 1 つであることがよく知られている。癌周囲微小環境における抗腫瘍免疫として TIL は重要であるが、腫瘍に浸潤するリンパ球の数だけではなく、種類も臨床転帰にとって重要である。CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞は腫瘍の排除に不可欠であり、CD4 陽性ヘルパー T 細胞はサイトカインの分泌と抗原提示細胞の活性化を通じて抗原提示を促進する。CD45RO 陽性 T 細胞は、メモリー T 細胞として細胞性免疫応答中に生成され、抗原が除去された後も長期間生存し、2 回目以降の抗原への曝露に対して、より迅速で増幅された応答を誘導する役割を果たす。TLS は癌周囲微小環境内で、このようなエフェクター T 細胞の分化において重要な役割を果たす。しかしながら、微小環境内の免疫機構と遺伝子変異との関連性や、化学療法との相乗効果には十分解明されていない。本研究では、膵癌の TLS を介した腫瘍免疫機構の統合的解析を行った。本研究では、TLS と 4 大遺伝子変異との関連は認めなかったが、*KRAS* 変異アレルの一つである *KRAS*<sup>G12D</sup> 変異や、腫瘍細胞の PD-L1 発現があると TLS 形成が阻害される傾向にあった。*KRAS*<sup>G12D</sup> 変異は、IL-10 や TGF- $\beta$  など、抗腫瘍免疫を抑制するようなサイトカインを upregulate することが報告されている。また、癌免疫サイクルを阻害するメカニズムの 1 つとして、免疫チェックポイントが知られている。腫瘍細胞に PD-L1 が高発現すると、免疫寛容が引き起こされ、有効な免疫サイクルが誘導されない。*KRAS*<sup>G12D</sup> 変異や PD-L1 発現による抗腫瘍免疫の抑制によって、TLS 形成が阻害されたのではないかと考えられた。本研究では、膵癌の癌周囲微小環境に TLS が存在すると、CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞、CD45RO 陽性 T 細胞などのリンパ球が腫瘍内に高度に浸潤しており、CD4 陽性 T 細胞・CD8 陽性 T 細胞における IFN-gamma や IL-2 の発現が高値であった。また血中のリンパ球数も高値であり、癌周囲微小環境および全身の抗腫瘍免疫が活性化されている事が示唆され、それが、生存期間の延長に寄与したと考えられた。さらには、TLS がある患者では、術後補助化学療法として 5-FU のプロドラッグである S-1 投与による予後延長効果を認めた。抗がん剤との相乗効果を確認するために、膵癌細胞株を用いた in vitro の実験を行い、IFN-gamma 単独および 5-FU 単独よりもそれらの併用療法の方が、より多くのアポトーシスが誘導される

事を明らかにした。TLS は通常の診療でよく用いる H&E 染色で同定し得る簡便なマーカーであり、膀胱癌の免疫状態、予後を予測する上で有用である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3302 号	氏 名	田中 雄志
論 文 題 目 Title of Dissertation	<p>Integrated analysis of tertiary lymphoid structures in relation to tumor-infiltrating lymphocytes and patient survival in pancreatic ductal adenocarcinoma</p> <p>膵癌における腫瘍浸潤リンパ球と患者の生存に関連した三次リンパ組織の統合分析</p>		
審 査 委 員 Examiner	<p>主 査 南 康博 Chief Examiner</p> <p>副 査 青井 貴之 Vice-examiner</p> <p>副 査 南 博之 Vice-examiner</p>		

（要旨は1，000字～2，000字程度）



**【背景】** 膵癌は最も悪性度の高い癌の1つで、発癌、進行、転移において癌周囲微小環境 (TME) は重要な役割を担い、免疫担当細胞は TME を構築する構成因子の1つである。TME では抗腫瘍免疫反応を司る腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) が知られており、TILs を含む TME での抗腫瘍免疫反応や全身性の抗腫瘍免疫反応はリンパ節等の2次リンパ組織で見られるが、近年3次リンパ組織 (TLS) が TME 内で形成されることが報告された。TLS は腫瘍の辺縁や内部に見られる異所性リンパ組織であり、その中心に B 細胞ゾーン、周囲に T 細胞ゾーンを有する2次リンパ組織に類似した形態を呈し、大腸癌、乳癌、肺癌などで TLS の存在が良好な予後と関連することが示されているが、膵癌と TLS との関連性については不明な点が多い。また、*KRAS*、*TP53*、*CDKN2A/p16*、*SMAD4* の変異は膵癌において頻度の高い4大遺伝子変異で、予後との関連が示されている。さらに、抗腫瘍免疫を抑制するメカニズムの1つに癌細胞における PD-L1 発現があるが、TLS と4大遺伝子変異や PD-L1 との関連も不明である。本研究では TME における TLS と TILs、全身性免疫、臨床的予後、治療反応性、遺伝子変異、PD-L1 発現との関連につき、包括的な統合分析を行った。

**【方法】** 2008 年 4 月～2017 年 3 月に神戸大学医学部附属病院で手術加療を受けた通常型膵管癌 162 例を対象とし、全症例の年齢、性別、BMI、家族歴、飲酒喫煙歴、糖尿病歴、血液検査所見、膵癌の臨床病期、組織型、手術根治度、術前術後化学療法の有無、予後などのデータを取得した。TLS は全組織切片の H&E 染色を観察し、腫瘍の辺縁もしくは内部に1つ以上あるものを TLS 有りと定義した。TILs は腫瘍面積の一番多い切片で CD4、CD8、FOXP3、CD45RO の免疫組織化学染色を行い、同切片で 5mm 以上離れて3カ所でリンパ球数を Image J software を用いて平均値を測定し、中央値で高値群・低値群の2群に分類した。PD-L1 は免疫組織化学染色により腫瘍細胞での発現の有無を解析した。遺伝子変異の検索は、手術検体の FFPE サンプルから DNA を抽出しターゲットシーケンスを行った。さらに *TP53*、*CDKN2A/p16*、*SMAD4* については、コピー数多型を解析し、免疫組織化学染色、シーケンスの結果と統合して変異の有無を判定した。また、膵癌腫瘍内の IFN- $\gamma$ 、IL-2 の発現について TLS を有する群と認めない群で 5 例ずつ in situ hybridization (ISH) により検索した。IFN- $\gamma$  に関しては、CD4 及び CD8 の2重染色を行った。また IFN- $\gamma$  及び IL-2 と抗がん剤 (5-FU) の相乗効果を検討するために、膵癌細胞株 (AsPC-1) を用いてアポトーシス解析を行い、投与後のアポトーシス細胞の割合を測定した。統計学的解析は常法を用いて適切に実施した。

**【結果】** 通常型膵管癌 162 例中 112 例に TLS を認め、うち 85 例は TLS を辺縁のみに認めたが、27 例は腫瘍辺縁に加え腫瘍内部にも TLS を認めた。患者背景因子で TLS を有する群は、喫煙、CA19-9 基準値範囲内、PD-L1 発現と関連を認めた。TLS と4大遺伝子変異との関連は認めず、*KRAS* 変異では *KRAS*<sup>G12D</sup> 変異があると TLS を認めない傾向にあった。TLS は CD4 陽性 TIL 高値、CD8 陽性 TIL 高値、CD45RO 陽性 TIL 高値、血中リンパ球高値と関連を認め、TLS を有する群は TLS を認めない群に比べ、有意に予後が延長した。また腫瘍辺縁および内部に TLS を有する群は、腫瘍辺縁のみに TLS を有する群と比べ、有意に良好な予後を示した。次に、TLS の有無と術後化学療法との関連性を検討するために、S-1 治療群・Gemcitabine 群治療・化学療法を施行していない群に分けて検討した。TLS を有さない群では S-1 投与による予後延長効果を認めなかったが、TLS を有する群では S-1 投与による予後延長を認めた。また、TLS を有する群と認めない



群で、IFN- $\gamma$ 、IL-2 の ISH を行ったところ、TLS を有する群では、認めない群と比べ、IFN- $\gamma$ 、IL-2 の発現が有意に多かった。また、ISH と免疫組織化学染色の 2 重染色から、IFN- $\gamma$  は CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と共発現していることが示された。次に膵癌細胞株 AsPC-1 を用いて、IFN- $\gamma$  単独・IL-2 単独・5-FU 単独・IFN- $\gamma$  + 5-FU・IL-2 + 5-FU の投与を行い、アポトーシス解析を行ったところ、アポトーシス細胞の割合はコントロール群よりも IFN- $\gamma$  および 5-FU 投与群で有意に高く、IFN- $\gamma$  と 5-FU の併用療法は、IFN- $\gamma$  単独・5-FU 単独よりも有意に高かった。

**【考察】**膵癌の発癌や進行、転移において抗腫瘍免疫反応は重要な役割を担い、TME における抗腫瘍免疫で TIL のサブセットも臨床転帰に重要である。CD8 陽性キラー T 細胞は腫瘍の排除に、CD4 陽性ヘルパー T 細胞はサイトカイン分泌と抗原提示細胞の活性化を通して抗原提示を促進する。CD45RO 陽性メモリー T 細胞は抗原除去後も長期間生存し、2 回目以降の抗原曝露により迅速で増幅された応答を誘導する。TLS は、TME 内でこのようなエフェクター T 細胞の分化に重要だが、TME 内の免疫機構と遺伝子変異との関連や化学療法との相乗効果は十分解明されていない。本研究では、膵癌の TLS を介した腫瘍免疫機構の統合的解析を行った。*KRAS* 変異アレルの一つである *KRAS*<sup>G12D</sup> 変異や腫瘍細胞の PD-L1 発現があると TLS 形成が阻害される傾向にあった。*KRAS*<sup>G12D</sup> 変異は IL-10 や TGF- $\beta$  など抗腫瘍免疫を抑制するサイトカインを upregulate し、腫瘍細胞での PD-L1 の高発現は抗腫瘍免疫応答を抑制し、TLS 形成が阻害されたと想定される。また、膵癌の TME に TLS が存在すると、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、CD45RO 陽性 T 細胞などが腫瘍内に浸潤し、CD4 陽性 T 細胞・CD8 陽性 T 細胞では IFN- $\gamma$  や IL-2 を高発現していた。血中のリンパ球数も高値であり、TME・全身の抗腫瘍免疫が活性化され、生存期間の延長に寄与したと考えられる。また、TLS がある患者では、術後補助化学療法として 5-FU のプロドラッグである S-1 投与による予後延長を認めた。抗がん剤との相乗効果を確認するために、膵癌細胞株を用いて解析したところ、IFN- $\gamma$  単独、5-FU 単独よりも両者の併用療法が、より多くのアポトーシスを誘導出来ることを見出した。TLS は通常診療で用いる H&E 染色で同定できる簡便なマーカーであり、膵癌の免疫状態、予後を予測する上で有用である可能性が示唆された。

本研究は、膵癌患者の癌周囲微小環境 (TME) における 3 次リンパ組織 (TLS) と腫瘍浸潤リンパ球 (TILs)、全身性免疫、臨床的予後、遺伝子変異、PD-L1 発現などとの関連について包括的な統合解析を行ったものであるが、従来ほとんど行われなかった TME における TLS での TILs の T 細胞各サブセットの浸潤、IFN- $\gamma$ ・IL-2 の高発現や抗腫瘍免疫応答の活性化と臨床的予後延長効果との関連、さらには術後補助化学療法における S-1 投与による予後延長効果などとの関連について重要な知見を得たものとして 価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。