



A comprehensive analysis of tumor-stromal collagen in relation to pathological, molecular, and immune characteristics and patient survival in pancreatic ductal...

芦名, 茂人

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8883号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490108>

※ 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

A comprehensive analysis of tumor-stromal collagen in relation to pathological, molecular, and immune characteristics and patient survival in pancreatic ductal adenocarcinoma

膵癌の腫瘍間質内膠原線維量と分子病理学的特徴、腫瘍内免疫、
及び、生存率に関する統合的解析

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)

芦 名 茂 人

【背景】

膵癌の5年生存率は未だ10%以下とされ、予後不良の悪性腫瘍である。その予後予測因子として、腫瘍の大きさやステージなどの腫瘍因子、糖尿病の有無などの患者背景因子が知られている。近年、特に分子病理学的な解析が進み、腫瘍周囲に存在する膠原線維が豊富な間質や免疫細胞などから構成される腫瘍周囲微小環境 (TME: tumor microenvironment) が、膵癌の予後に関連することが明らかとなってきた。

膵癌の TME は、I 型コラーゲンを主とする細胞外マトリックス (ECM: extracellular matrix) タンパク質や、免疫細胞、内皮細胞、癌関連線維芽細胞 (CAF : cancer associated fibroblast) などで構成されている。CAF のうち、ACTA2 (α -平滑筋アクチン [α -SMA]) 陽性筋線維芽細胞は膵癌間質の膠原線維の主な構成成分である ECM タンパク質の産生に参与する CAF である。従来は、膵癌間質の豊富な線維化は TME 内に低酸素状態を引き起こし、また抗がん剤などの薬物の送達を妨げることにより、化学療法抵抗性と腫瘍の進行に寄与していると考えられてきた。しかし、近年の膵癌マウスモデルを用いた研究では、CAF を活性化する Hedgehog 経路の阻害することで線維化の少ない低分化な腫瘍が形成され、腫瘍の進行が加速したと報告されている。さらには、 α -SMA 陽性筋線維芽細胞特異的に I 型コラーゲンの産生を欠失する事により、低分化な腫瘍の発生と不良な予後をもたらしたとの報告もある。つまり、従来は腫瘍促進的と考えられてきた腫瘍内線維化が膵癌の進行に対して抑制的に作用する可能性もあり、膵癌の線維化の腫瘍進行における意義は依然として議論の余地がある。

また、膵癌の予後に関連する因子として、抗腫瘍免疫として作用する腫瘍内に浸潤するリンパ球 (TIL : tumor infiltrating lymphocyte) や非リンパ組織における免疫細胞の凝集体の形成である三次リンパ構造 (TLS : tertiary lymphoid structures) が挙げられる。腫瘍内線維化と腫瘍免疫との関連性に関しても、従来は、腫瘍内線維化は障壁として作用し、腫瘍浸潤リンパ球の腫瘍内への供給を妨げていると考えられていた。しかし、近年の研究では、高度な腫瘍内線維化が腫瘍浸潤リンパ球の増加に関与しているとの報告もあり、腫瘍内線維化と腫瘍免疫の関連性も一定の見解を得ていない。さらには、膵癌に特徴的な4大遺伝子 (*KRAS*、*TP53*、*CDKN2A/p16*、および *SMAD4*) の変異は BIG4 と呼ばれ、予後と関連が報告されているが、腫瘍内線維化との関連性は明らかではない。

そこで、本論文では、腫瘍内線維化と4大遺伝子変異を含む腫瘍の分子病理学的特徴、腫瘍浸潤リンパ球、TLS などの腫瘍免疫や予後との関連についての統合的な解析を行い、膵癌における腫瘍内線維化の意義を明らかにする事を目的とした。

【方法】

2008 年 4 月から 2017 年 3 月にかけて当院で膵切除術を行った 234 例の膵癌患者のうち、特殊型膵癌などを除いて病理学的に膵管癌と診断された 169 例を対象として後方視的に解析した。臨床情報として、年齢、性別、BMI、膵癌の家族歴、飲酒量（60g/日未満または 60g/日以上）、喫煙歴、糖尿病の有無、CA19-9、CEA、術前化学療法の有無、術後補助化学療法の有無、膵癌の臨床病期（UICC 8thに基づく）、T 因子、腫瘍の存在部位、組織型、手術根治度を収集した。

腫瘍の最大面積を有する FFPE 手術検体を用いて、EVG 染色により膠原線維（線維化）を、免疫染色により α SMA 陽性線維芽細胞を、H&E 染色で腫瘍細胞を評価した。スキャンした病理画像を Adobe Photoshop ソフトウェアを用いて以下の各領域のピクセル数を計算することで線維化の多寡を評価した。腫瘍全体から脂肪組織や血管、その他の付属組織を除いた部分を「総腫瘍領域」とし、腫瘍内の「腫瘍細胞領域」を手動で抽出した。さらに「総腫瘍領域」から「腫瘍細胞領域」を引いたものを「腫瘍間質領域」と定義した。 α SMA 染色の染色部を「 α SMA 陽性細胞領域」、EVG 染色で膠原線維の染色部を「腫瘍間質内膠原線維領域」として、各面積の割合を算出し、各面積比の中央値に基づいて全症例を高値群・低値群の 2 群に分類した。この手法により、局所の拡大画像解析では評価できない腫瘍内部の不均一性を含む腫瘍全体の定量的評価が可能となった。

腫瘍浸潤リンパ球は、免疫染色により CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、FOXP3 陽性 T 細胞を評価した。遺伝子変異に関しては FFPE 手術検体より DNA を抽出し、*KRAS*、*TP53*、*CDKN2A/p16*、*SMAD4* に対するターゲットアンプリコンシーケンスを実施した。さらに *TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* については免疫染色と ddPCR 法による CNV 解析を追加し、シーケンスデータと免疫染色、CNV 解析を統合して遺伝子変異の有無を判定した。

統計学的解析については、腫瘍間質内膠原線維と関連する因子の解析には多変量ロジスティック回帰分析を用いた。予後の解析は多変量 Cox ハザード解析を用いた。群間の比較には、 χ^2 二乗検定、および、Fisher's exact test を用い、P 値が 0.05 以下を有意水準とした。

【結果】

全 234 例のうち、特殊型膵癌 13 例、IPMN 由来膵癌 8 例、術後に Stage IV と判明した 15 例、術前放射線治療を受けた患者 13 例、FFPE 切片が入手困難な例など 16 例を除外した通常型膵管癌 169 例を対象とした。

多変量ロジスティック回帰分析では、低分化型 (poor): オッズ比=3.82 (95% 信頼区間=1.41-12.2, P=0.008)と、*CDKN2A/p16* 変異: オッズ比=2.06 (95% 信頼区間=1.08-4.02,

P=0.046)は腫瘍間質内膠原線維が少ない事の独立した予測因子であった。

予後についての解析では、腫瘍間質内膠原線維が少ない患者は多い患者よりも有意に短い全生存期間を示した (22.1 か月 vs. 38.0 か月、 $P = 0.001$)。同様に α SMA 陽性筋線維芽細胞が少ない患者は多い患者より全生存期間が短い傾向を示した (24.7 か月 vs. 33.4 か月、 $P = 0.09$)。一方で、腫瘍細胞成分の量は予後との関連は認めなかった。さらに、多変量 Cox ハザード解析では、臨床的背景因子 (年齢、BMI、性別、家族歴、飲酒歴、喫煙歴、糖尿病、CA19-9、CEA) により調整した多変量ハザード比=0.56 (95%信頼区間 =0.39-0.81, $P=0.002$)、および腫瘍因子 (Stage、術前化学療法、術後化学療法、組織型、手術根治度、*KRAS*、*TP53*、*CDKN2A/p16*、*SMAD4*) により調整した多変量ハザード比=0.44 (95% CI =0.29-0.65, $P<0.0001$)と腫瘍間質内膠原線維量は独立した予後予測因子であった。組織型による影響を除外するため、低分化型腫瘍を除く 147 例で解析を行ったが同様の結果が得られた。

補助化学療法は全 169 例での内訳が、S-1 治療群 78 例、GEM 治療群 43 例、無治療群 48 例であった。腫瘍間質内膠原線維量と補助化学療法の感受性の関連を解析するために腫瘍間質内膠原線維の高度群・軽度群で層別化し各治療法別に予後を比較した。Stage による調整および多変量解析では、腫瘍間質内膠原線維が少ないことが、S-1 群及び GEM 群の予後不良と有意に関連していた (S-1 群: Stage-adjusted ハザード比=2.86 (95% 信頼区間 =1.52-5.55, $P=0.001$); 多変量 ハザード比 =2.76 (95% 信頼区間=1.36-5.79, $P=0.005$); GEM 群: Stage-adjusted ハザード比=2.90 (95% 信頼区間 =1.33-6.71, $P=0.007$); 多変量 ハザード比=2.91 (95% 信頼区間=1.34-6.71, $P=0.007$)。また、腫瘍間質内膠原線維が軽度群は高度群と比して、腫瘍浸潤 CD4 陽性 T 細胞、腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞が少ない傾向があった。また TLS も同様に腫瘍間質内膠原線維が軽度群で有意に少なかった。

【考察】

本研究では、膵癌において腫瘍間質内膠原線維量が独立した予後因子であること、補助化学療法の感受性に影響を与えること、分化度および *CDKN2A/p16* の変異との関連があることが示された。

腫瘍浸潤リンパ球および TLS は抗腫瘍免疫の重要な構成要素であり、膵癌の予後と関連している。本研究では、膵癌における腫瘍間質内膠原線維の減少が腫瘍浸潤 CD4 陽性 T 細胞、腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞を減少、TLS が無いことと関連していた。膵癌における腫瘍間質内膠原線維の減少と抗腫瘍免疫低下が関連し、その結果として予後不良となっている可

能性が示唆された。さらに、腫瘍細胞自体の量よりも腫瘍内線維化や免疫細胞などの TME の組成がより予後に影響する可能性が示唆された。

また従来は豊富な腫瘍内線維化は抗がん剤の薬物送達を妨げ、感受性低下につながるとされてきた。5-FU と GEM は免疫細胞からのインターフェロンガンマ (IFN- γ) 産生が豊富な環境下で効果が増強することが報告されている。腫瘍間質内膠原線維が豊富な膵癌では、腫瘍内の免疫状態が良好で、5-FU のプロドラッグである S-1 や GEM がより効果的である可能性が示唆される。

膵癌の腫瘍内線維化と分化度との関連は過去に報告されているが、膵癌の腫瘍内線維化と *CDKN2A/p16* 変異についての報告はない。他の臓器では、腎臓では p16 ノックダウンにより腎線維症が抑制された報告があり、肺では特発性肺線維症の肺上皮細胞で p16 発現の増加が報告されている。また甲状腺では p16 陽性甲状腺乳頭癌は p16 陰性甲状腺乳頭癌と比較して腫瘍内線維化が軽度であるという報告があり、*CDKN2A/p16* 変異の線維症の形成への関与が示唆され我々の知見を支持している。しかし、肝臓では肝硬変の肝星細胞で p16 発現の減少が認められたという我々の知見と逆の報告がある。*CDKN2A/p16* 変異と線維化との因果関係は未だに不明瞭な点が多く今後さらなる研究が必要である。

本研究の強みは、拡大画像を使用して腫瘍の一部を分析した過去の研究とは異なり、切片全体を使用して腫瘍細胞成分と腫瘍間質を分析および定量化したことである。この方法により、腫瘍全体により近い正確かつ定量的な評価が可能となった。さらに、膠原線維を評価するための EVG 染色は臨床現場で汎用される確立された方法であり実臨床に応用しやすい点が挙げられる。

【結論】

膵癌の腫瘍間質内膠原線維量は、腫瘍免疫を介して予後及び補助化学療法に対する感受性に密接に関与してい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 3378 号	氏 名	芦名 茂人
論 文 題 目 Title of Dissertation	A comprehensive analysis of tumor-stromal collagen in relation to pathological, molecular, and immune characteristics and patient survival in pancreatic ductal adenocarcinoma 膵癌の腫瘍間質内膠原線維量と分子病理学的特徴、腫瘍内免疫、及び、生存率に関する統合的解析		
審 査 委 員 Examiner	主 査 菅原 正和 Chief Examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner 副 査 横 崎 光 Vice-examiner		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

【背景・目的】

膵癌の5年生存率は未だ10%以下とされ、予後不良の悪性腫瘍である。その予後予測因子について、近年分子病理学的な解析が進み、腫瘍周囲に存在する膠原線維が豊富な間質や免疫細胞などから構成される腫瘍周囲微小環境 (TME: tumor microenvironment) が、膵癌の予後に関連することが明らかとなってきた。膵癌の TME は、I 型コラーゲンを主とする細胞外マトリックスタンパク質や、免疫細胞、内皮細胞、癌関連線維芽細胞などで構成されている。従来は、膵癌間質の豊富な線維化は TME 内に低酸素状態を引き起こし、また抗がん剤などの薬物の送達を妨げることにより、化学療法抵抗性と腫瘍の進行に寄与していると考えられてきた。しかし、近年の研究では、腫瘍内線維化が膵癌の進行に対して抑制的に作用する可能性もあり、膵癌の線維化の腫瘍進行における意義は依然として議論の余地がある。そこで、本論文では、腫瘍内線維化と4大遺伝子変異を含む腫瘍の分子病理学的特徴、腫瘍浸潤リンパ球、TLSなどの腫瘍免疫や予後との関連についての統合的な解析を行い、膵癌における腫瘍内線維化の意義を明らかにする事を目的とした。

【方法・結果】

2008年4月から2017年3月にかけて当院で膵切除術を行った234例の膵癌患者のうち、病理学的に膵管癌と診断された169例を対象として後方視的に解析した。臨床情報として、年齢、性別、BMI、膵癌の家族歴、飲酒量(60g/日未満または60g/日以上)、喫煙歴、糖尿病の有無、CA19-9、CEA、術前化学療法の有無、術後補助化学療法の有無、膵癌の臨床病期、T因子、腫瘍の存在部位、組織型、手術根治度を収集した。腫瘍の最大面積を有するFFPE手術検体を用いて、EVG染色により膠原線維(線維化)を、免疫染色により α SMA陽性線維芽細胞を、H&E染色で腫瘍細胞を評価した。腫瘍浸潤リンパ球は、免疫染色によりCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、FOXP3陽性T細胞を評価した。多変量ロジスティック回帰分析では、低分化型(por): オッズ比=3.82(95%信頼区間=1.41-12.2)と、CDKN2A/p16変異: オッズ比=2.06(95%信頼区間=1.08-4.02)は腫瘍間質内膠原線維が少ない事の独立した予測因子であった。予後についての解析では、腫瘍間質内膠原線維が少ない患者は多い患者よりも有意に短い全生存期間を示した。同様に α SMA陽性筋線維芽細胞が少ない患者は多い患者より全生存期間が短い傾向を示した。さらに、多変量Coxハザード解析では、臨床的背景因子により調整した多変量ハザード比=0.56(95%信頼区間=0.39-0.81)、および腫瘍因子により調整した多変量ハザード比=0.44(95%CI=0.29-0.65)と腫瘍間質内膠原線維量は独立した予後予測因子であった。補助化学療法は全169例での内訳が、S-1治療群78例、GEM治療群43例、無治療群48例であった。Stageによる調整および多変量解析では、腫瘍間質内膠原線維が少ないことが、S-1群及びGEM群の予後不良と有意に関連していた(S-1群: Stage-adjusted ハザード比=2.86(95%信頼区間=1.52-5.55); 多変量 ハザード比=2.76(95%信頼区間=1.36-5.79); GEM群: Stage-adjusted ハザード比=2.90(95%信頼区間=1.33-6.71); 多変量 ハザード比=2.91(95%信頼区間=1.34-6.71)。また、腫瘍間質内膠原線維が軽度群は高度群と比して、腫瘍浸潤CD4陽性T細胞、腫瘍浸潤CD8陽性T細胞が少ない傾向があった。またTLSも同様に腫瘍間質内膠原線維が軽度群で有意に少なかった。

【考察】

本研究では、膵癌において腫瘍間質内膠原線維量が独立した予後因子であること、補助化学療法の影響に与えること、分化度および CDKN2A/p16 の変異との関連があることが示された。腫瘍浸潤リンパ球および TLS は抗腫瘍免疫の重要な構成要素であり、膵癌の予後と相関している。本研究では、膵癌における腫瘍間質内膠原線維の減少が腫瘍浸潤 CD4 陽性 T 細胞、腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞を減少、TLS が無いことと相関していた。膵癌における腫瘍間質内膠原線維の減少と抗腫瘍免疫低下が関連し、その結果として予後不良となっている可能性が示唆された。さらに、腫瘍細胞自体の量よりも腫瘍内線維化や免疫細胞などの TME の組成がより予後に影響する可能性が示唆された。また従来は豊富な腫瘍内線維化は抗がん剤の薬物送達を妨げ、感受性低下につながるとされてきた。5-FU と GEM は免疫細胞からのインターフェロンガンマ (IFN- γ) 産生が豊富な環境下で効果が増強することが報告されている。腫瘍間質内膠原線維が豊富な膵癌では、腫瘍内の免疫状態が良好で、5-FU のプロドラッグである S-1 や GEM がより効果的である可能性が示唆される。膵癌の腫瘍内線維化と分化度との関連は過去に報告されているが、膵癌の腫瘍内線維化と CDKN2A/p16 変異についての報告はない。他の臓器では、腎臓では p16 ノックダウンにより腎線維症が抑制された報告があり、肺では特発性肺線維症の肺上皮細胞で p16 発現の増加が報告されている。また甲状腺では p16 陽性甲状腺乳頭癌は p16 陰性甲状腺乳頭癌と比較して腫瘍内線維化が軽度であるという報告があり、CDKN2A/p16 変異の線維症の形成への関与が示唆され我々の知見を支持している。しかし、肝臓では肝硬変の肝星細胞で p16 発現の減少が認められたという我々の知見と逆の報告がある。CDKN2A/p16 変異と線維化との因果関係は未だに不明瞭な点が多く今後さらなる研究が必要である。本研究の強みは、拡大画像を使用して腫瘍の一部を分析した過去の研究とは異なり、切片全体を使用して腫瘍細胞成分と腫瘍間質を分析および定量化したことである。この方法により、腫瘍全体により近い正確かつ定量的な評価が可能となった。さらに、膠原線維を評価するための EVG 染色は臨床現場で汎用される確立された方法であり実臨床に応用しやすい点が挙げられる。

本研究は、膵癌腫瘍間質内膠原線維が病態に与える影響について研究したものであるが、従来ほとんど指摘されていなかった腫瘍間質内膠原線維の減少と抗腫瘍免疫低下との関連性、そしてその結果として予後不良病態を来している可能性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。