



Association of Sarcopenia with a Poor Prognosis and Decreased Tumor-Infiltrating CD8-Positive T Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Retrospective Analysis

増田, 重人

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8892号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490117>

※ 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)

Association of Sarcopenia with a Poor Prognosis and Decreased
Tumor-Infiltrating CD8-Positive T Cells in Pancreatic
Ductal Adenocarcinoma: A Retrospective Analysis

膵癌におけるサルコペニアと予後の増悪および腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞の減少との関連
性について:後方視的解析

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)

増 田 重 人

【背景】

膵癌は最も悪性度の高い癌の 1 つである。膵癌によって引き起こされる悪液質は予後不良と関連している。悪液質は食欲不振、意図しない体重減少、骨格筋量の低下といった特徴をもつ複雑な代謝障害で、QOL の低下や予後の悪化をおこす。加えて、膵癌患者の約 80%が悪液質を発症する。近年、悪液質に随伴するサルコペニアの重要性が注目されており、その病態の解明が急速にすすんでいる。サルコペニアは骨格筋の量と質の低下を特徴とする病態と定義されている。いくつかの先行研究では膵癌患者でサルコペニアは長期予後の悪化と関連しており、独立した予後不良因子であると報告されている。しかし、術後膵液漏の罹患率や 30 日死亡率をふくむ短期予後にサルコペニアがおよぼす影響については報告によって結論が異なっており、さらなる議論が必要である。また、サルコペニアと予後が関連する理由については明らかにされていない。サルコペニアは無再発生存期間の増悪と関連していることが報告されていることから、サルコペニアで大きな問題点とされる患者の虚弱性だけでは予後不良との関連が説明できないと考えられる。

近年、骨格筋はマイオカインといわれる複数のサイトカインを産生、放出する内分泌器官として注目されている。いくつかの報告はマイオカインが癌の腫瘍浸潤 T 細胞、腫瘍関連マクロファージといった癌の局所免疫系に重要な役割を担っていることを示唆している。サルコペニアが膵癌における腫瘍微小環境の形成に関与しており、予後不良の一因となっている可能性があるが、サルコペニアを伴う膵癌患者のドライバー遺伝子の変異や腫瘍微小環境をふくむ腫瘍の特徴を明らかにした報告はない。そこで本研究ではサルコペニアを有する膵癌患者の腫瘍微小環境を明らかにすることを目的とした。

【方法】

2008 年 4 月から 2017 年 5 月にかけて神戸大学医学部附属病院において手術加療を受けた膵癌切除例全例を対象とした。年齢、性、BMI、6 か月以内の 10%をこえる体重減少の有無、パフォーマンスステータス、血中総蛋白値、血中アルブミン値、好中球/リンパ球比、血中 CEA 値、血中 CA19-9 値、家族歴、飲酒歴、喫煙歴、糖尿病既往歴、IPMN 既往歴、慢性膵炎既往歴を臨床情報として診療録より収集した。検査データは手術から 3 か月以内のデータを解析した。腫瘍の大きさ、臨床病期(UICC 8th)、部位、病理学的グレード、腫瘍遺残、術前化学療法、術後化学療法、術前放射線療法の有無を調べた。手術関連情報として手術方法、手術時間、推定出血量、CD に基づく術後合併症、ISGPF に基づく膵液瘻、入院日数、30 日合併症、30 日以内再手術を収集した。

サルコペニアは第 3 腰椎(L3)レベルの骨格筋インデックス(SMI,cm²/m²)で評価した。L3 レベルの

骨格筋断面積は CT 画像を Ziostation 2 type 1000 を用いて算出した。SMI は算出した断面積 (cm²) を身長² (m²) で割って計算した。すべての CT 画像は術前 3 か月以内に撮影されたものを使用した。サルコペニアは SMI が性別における中央値 (男性: 41.9、女性: 36.6) より低い症例と定義した。

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*、*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。腫瘍微小環境の評価は腫瘍周囲の免疫担当細胞と線維化・間質マーカーについて行った。免疫担当細胞は、免疫染色により CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、FOXP3 陽性 T 細胞を区別して腫瘍周囲への集簇の程度を評価した。線維化や間質の指標としては免疫染色で α SMA 陽性線維芽細胞数と EVG 染色での膠原線維の量を評価した。上記の判定にあたっては、画像解析ソフトを用いて強度の高い 3 か所を選択しその平均を算出した。統計解析は IBM SPSS version 28.0 を用いて行った。データの比較はカイ二乗検定を用いた。全生存期間と無再発生存期間はカプランマイヤー法を用いて推定し、ログランク検定で比較した。ハザード比と 95% 信頼区間は多変量 COX ハザードモデルを用いて検定した。P 値 0.05 以下を有意とした。

【結果】

BMI、喫煙歴、SMI がサルコペニア群で非サルコペニア群より有意に低かった (BMI, $P < 0.001$; smoking history, $P < 0.001$; SMI, $P < 0.001$)。PS、体重減少、血中アルブミン値、血中総蛋白値、腫瘍サイズ、臨床病期、病理学的ステージは 2 群間に有意差を認めなかった。

OS と RFS は全症例を対象にすると 2 群間に有意差を認めなかった (2-year OS: 58.3% versus 58.0%, $P = 0.23$; 2-year RFS: 37.7% versus 30.9%, $P = 0.42$)。一方で、臨床病期が Stage IIa 以下の症例では OS、RFS ともにサルコペニア群で有意に短かった (2-year OS: 89.7% versus 59.1%, $P = 0.03$; 2-year RFS: 74.9% versus 50.0%, $P = 0.02$)。Stage IIa 以下の症例の OS について単変量解析を行うと、R1 もしくは R2 切除 (HR 4.15, 95% CI 1.65-10.47, $P < 0.001$)、サルコペニア (HR 2.50, 95% CI 1.06-5.89, $P = 0.04$) が有意な予後不良因子であった。さらに一般的に予後不良因子と知られ単変量解析で $P < 0.200$ であった術後化学療法の不施行、R1 もしくは R2 切除にサルコペニアを加えた 3 因子で多変量解析を行うと、R1 もしくは R2 切除 (HR 5.22, 95% CI 1.98-13.80, $P < 0.001$)、サルコペニア (HR 2.58, 95% CI 1.06-6.25, $P = 0.04$) が独立した予後不良因子であった。

手術関連成績については、術式、手術方法、手術時間、推定出血量、術後合併症、膵液漏合併で2群間に差を認めなかった。術後の入院期間はサルコペニア群で有意に短かった(非サルコペニア群 24 日 vs サルコペニア群 21 日, $P = 0.03$)。さらに、手術関連因子がサルコペニアと OS の交絡因子となるか調べるために多変量解析を行ったところ、サルコペニアは手術関連成績と独立した予後不良因子であった(HR 3.08, 95% CI 1.24-7.61, $P = 0.02$)。

サルコペニアが Stage IIa 以下の患者で予後不良因子となる理由を調べるため、腫瘍の遺伝子変異、免疫担当細胞を解析した。遺伝子変異については *KRAS*、*TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* のいずれも2群間に差を認めなかった。免疫担当細胞では CD8 陽性リンパ球がサルコペニア群において有意に少なく(66.7% vs 31.8%, $P = 0.02$)、CD4 陽性リンパ球がサルコペニア群で少ない傾向にあった(66.7% vs 45.5%, $P = 0.16$)。FOXP3 陽性 T リンパ球と TLS は2群間で差を認めなかった。

【考察】

本研究でリンパ節転移を合併しない早期の膵癌でサルコペニア群が非サルコペニア群と比べ、予後が悪いことが明らかになった。既報では、サルコペニアが死亡率を増やす報告があるが(HR 1.35, 95% CI 1.18-1.54)、長期予後についてはサルコペニアと非サルコペニアに有意差はないという報告もある。SMI、大腰筋容積などの測定方法の違いによるものと主張されているが、これらの研究では臨床病期を区分した予後の検討はされていない。

今回、サルコペニアが膵癌手術関連成績に影響を与えていないことを示した。加えて、サルコペニアが早期の膵癌で無再発生存期間の短縮と関連していることを明らかにした。既報では術後合併症を含む術後成績には違いがないことが示されており、今回の研究もそれに一致していた。また、複数の研究がサルコペニア患者で無再発生存期間が短いことを報告している。これらの報告はサルコペニアが患者の虚弱性と独立して、膵癌の予後不良に関わっているという仮説を支持している。しかし、サルコペニアが膵癌の進行を促している機序はわかっていない。

私たちはサルコペニアが早期膵癌患者で腫瘍浸潤 T 細胞、特に CD8 陽性 T リンパ球が増加していることを明らかにした。ここ 40 年で骨格筋はただの運動器ではなく、IL-6、IL-7、IL-15 を含むマイオカインや細胞間相互作用を通して免疫機能を調整する内分泌臓器として認識されている。サルコペニアはこのような相互作用によって免疫機能を抑制し、予後を増悪させている。しかし、胆管癌の報告をのぞくとヒト検体を用いてサルコペニアと腫瘍免疫系の関連をしめしている論文はない。そこでこの研究はサルコペニアと予後、膵癌の腫瘍免疫系の関係をはじめて包括的に解析した研究である。この研究はいくつかのリミテーションを含んでいる。第一にサルコペニアが腫瘍微小

環境を抑制した原因であるのかあるいは結果として生じたものなのかがわからないことである。二つ目は全身の免疫状態の評価を行っていない点である。三つ目は臨床病期によるサルコペニアの影響の違いを説明する結果がえられていないことである。四つ目に本研究は後方視的研究であるためサルコペニアを骨格筋量で定義づけしており、質に関する評価は行っていないことである。今後、サルコペニアが純粹に膵癌の免疫機能を抑制するかを評価するためには、患者由来腫瘍異所移植モデルといった動物モデルを用いて、悪液質やサルコペニアを引き起こし、膵癌の微小免疫環境に影響をあたえる腫瘍の特徴を明らかにする必要がある。

神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 3387 号	氏 名	増田重人
論文題目 Title of Dissertation	Association of Sarcopenia with a Poor Prognosis and Decreased Tumor-Infiltrating CD8-Positive T Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Retrospective Analysis 膵癌におけるサルコペニアと予後の増悪および腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞の減少との関連性について:後方視的解析		
審査委員 Examiner	主 査 佐々木 比平 Chief Examiner 副 査 酒井 良忠 Vice-examiner 副 査 山口 崇 Vice-examiner		

(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 つである。膵癌患者の約 80%が悪液質を発症し、膵癌によって引き起こされる悪液質は予後の悪化と関連している。悪液質は、食欲不振、意図しない体重減少、骨格筋量の低下といった特徴をもつ複雑な代謝障害と定義され、膵癌のみならず様々ながん種で QOL の低下や予後の悪化を引き起こす。サルコペニアは骨格筋の量と質の低下を特徴とする病態と定義されている。

近年、骨格筋はマイオカインといわれる複数のサイトカインを産生、放出する内分泌器官として注目されている。いくつかの報告はマイオカインが癌の腫瘍浸潤 T 細胞、腫瘍関連マクロファージといった癌の局所免疫系に重要な役割を担っていることを示唆している。そこで本研究ではサルコペニアを有する膵癌患者のドライバー遺伝子の変異や腫瘍微小環境に特徴があるかを明らかにすることを目的とした。

【方法】

2008 年 4 月から 2017 年 5 月にかけて神戸大学医学部附属病院において手術加療を受けた膵癌切除例全例を対象とした。年齢、性、BMI、6 か月以内の 10%をこえる体重減少の有無、パフォーマンスステータス (PS)、血中総蛋白値、血中アルブミン値、好中球/リンパ球比、血中 CEA 値、血中 CA19-9 値、家族歴、飲酒歴、喫煙歴、糖尿病既往歴、IPMN 既往歴、慢性膵炎既往歴を臨床情報として診療録より収集した。検査データは手術前 3 か月以内のデータを解析した。腫瘍の大きさ、臨床病期(UICC 8th)、部位、病理学的グレード、腫瘍遺残、術前化学療法、術後化学療法、術前放射線療法の有無を調べた。手術関連情報として手術方法、手術時間、推定出血量、CD (略語はフルスペル必要)に基づく術後合併症、ISGPF (略語はフルスペル必要)に基づく膵液瘻、入院日数、30 日合併症、30 日以内再手術を収集した。

サルコペニアは第 3 腰椎 (L3) レベルの骨格筋インデックス (SMI:略語はフルスペル必要,cm²/m²) で評価した。L3 レベルの骨格筋断面積は CT 画像を Ziostation 2 type 1000 を用いて算出した。SMI は算出した断面積 (cm²) を身長² (m²) で割って計算した。すべての CT 画像は術前 3 か月以内に撮影されたものを使用した。サルコペニアは SMI が性別における中央値 (男性:41.9、女性:36.6) より低い症例と定義した。

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*、*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。腫瘍微小環境の評価は腫瘍周囲の免疫担当細胞と線維化・間質マーカーについて行った。免疫担当細胞は、免疫染色により CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、FOXP3 陽性 T 細胞を区別して腫瘍周囲への集簇の程度を評価した。線維化や間質の指標としては免疫染色で α SMA 陽性線維芽細胞数と EVG 染色での膠原線維の量を評価した。上記の判定にあたっては、画像解析ソフトを

用いて強度の高い3か所を選択しその平均を算出した。統計解析はIBM SPSS vesion 28.0を用いて行った。データの比較はカイ二乗検定を用いた。全生存期間 (OS: overall survival) と無再発生存期間 (DFS: disease free survival) はカプランマイヤー法を用いて推定し、ログランク検定で比較した。ハザード比と 95%信頼区間は多変量 COX ハザードモデルを用いて検定した。P 値 0.05 以下を有意とした。

【結果】

BMI、喫煙歴、SMI がサルコペニア群で非サルコペニア群より有意に低かった (BMI, $P < 0.001$; smoking history, $P < 0.001$; SMI, $P < 0.001$)。PS、体重減少、血中アルブミン値、血中総蛋白値、腫瘍サイズ、臨床病期、病理学的ステージはサルコペニアの有無と関連を認めなかった。

OS と RFS は全症例を対象にするとサルコペニアの有無と関連を認めなかった。(2-year OS: 58.3% versus 58.0%, $P = 0.23$; 2-year RFS: 37.7% versus 30.9%, $P = 0.42$)。一方で、臨床病期が Stage IIa 以下の症例では OS、RFS とともにサルコペニア群で有意に短かった (2-year OS: 89.7% versus 59.1%, $P = 0.03$; 2-year RFS: 74.9% versus 50.0%, $P = 0.02$)。Stage IIa 以下の症例の OS について単変量解析を行うと、R1 もしくは R2 切除 (HR 4.15, 95% CI 1.65-10.47, $P < 0.001$)、サルコペニア (HR 2.50, 95% CI 1.06-5.89, $P = 0.04$) が有意な予後不良因子であった。さらに一般的に予後不良因子と知られ単変量解析で $P < 0.20$ であった術後化学療法の不施行、R1 もしくは R2 切除にサルコペニアを加えた 3 因子で多変量解析を行うと、R1 もしくは R2 切除 (HR 5.22, 95% CI 1.98-13.80, $P < 0.001$)、サルコペニア (HR 2.58, 95% CI 1.06-6.25, $P = 0.04$) が独立した予後不良因子として抽出された。

【考察】

本研究でリンパ節転移を合併しない早期の膵癌 (Stage IIa 以下) でサルコペニア群が非サルコペニア群と比べ、予後が悪いことが明らかになった。既報では、サルコペニアが死亡率を増やす報告があるが (HR 1.35, 95% CI 1.18-1.54)、長期予後についてはサルコペニアと非サルコペニアに有意差はないという報告もある。SMI、大腰筋容積などの測定方法の違いによるものと主張されているが、これらの研究では臨床病期を区分した予後の検討はされていない。

私たちはサルコペニアが早期の stage の膵癌患者で腫瘍浸潤 T 細胞、特に CD8 陽性 T リンパ球が増加していることを明らかにした。

本研究は、サルコペニアの診断と膵癌との関連性を証明した報告である。新たな診断、治療法に繋がる可能性があり、価値のある業績であることを認める。本研究、及び、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。