HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	術前化学放射線療法が膵癌微小環境にもたらす免疫学的効果に関する研究
Author(s)	桒原, 尚太
Description	配架番号：2525
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14061号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14061
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77938
Type	doctoral thesis
File Information	Shota_Kuwabara.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

術前化学放射線療法が膵癌微小環境にもたらす免疫学的効果に関する研究

(Studies on prognostic relevance of tertiary lymphoid organs following neoadjuvant chemoradiotherapy in pancreatic ductal carcinoma)

2020 年　3 月

北　海　道　大　学

栗原　尚太

学　位　論　文

術前化学放射線療法が膵癌微小環境にもたらす免疫学的効果に関する研究

(Studies on prognostic relevance of tertiary lymphoid organs following neoadjuvant chemoradiotherapy in pancreatic ductal carcinoma)

2020 年 3 月

北　海　道　大　学

栗原　尚太

目　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・　1 頁

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2 頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5 頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　6 頁

方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　9 頁

結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　14 頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　28 頁

結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　33 頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　34 頁

利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　35 頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　36 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Shota Kuwabara, Takahiro Tsuchikawa, Toru Nakamura, Yutaka Hatanaka, Kanako C Hatanaka, Katsunori Sasaki, Masato Ono, Kazufumi Umemoto, Tomohiro Suzuki, Osamu Sato, Yuma Hane, Yoshitsugu Nakanishi, Toshimichi Asano, Yuma Ebihara, Yo Kurashima, Takehiro Noji, Soichi Murakami, Keisuke Okamura, Toshiaki Shichinohe, and Satoshi Hirano

Prognostic Relevance of Tertiary Lymphoid Organs Following Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

Cancer Science Jun 110(6):1853-1862 2019.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Shota Kuwabara, Takahiro Tsuchikawa, Toru Nakamura, Toshiaki Shichinohe, and Satoshi Hirano

Prognostic relevance and constitutive alteration of TLO following neoadjuvant chemoradiotherapy in Pancreatic cancer

The 77th annual meeting of Japanese Cancer Association, Osaka, Japan. Sep 27th-29th 2018

2. Shota Kuwabara, Takahiro Tsuchikawa, Yoshitsugu Nakanishi, Toshimichi Asano, Takehiro Noji, Yuma Ebihara, Yo Kurashima, Soichi Murakami, Toru Nakamura, Keisuke Okamura, Toshiaki Shichinohe, and Satoshi Hirano

Tertiary lymphoid organs as a good prognostic indicator following neoadjuvant chemo (radio) therapy for pancreatic cancer

SITC 32nd Annual meeting, Washington DC, USA. Nov 8th-12th 2017

要旨

【背景と目的】

膵癌は極めて予後不良の疾患であるが、近年では術前治療として化学療法や放射線照射療法を併用する集学的治療が、腫瘍縮小効果、R0 切除率の上昇、リンパ節転移陰性症例の増加などの点で治療成績を改善する可能性があると報告されている。さらなる集学的治療成績向上のためには、術前治療効果判定のためのバイオマーカーの探索が課題の一つである。腫瘍微小環境には腫瘍細胞はもとより血管、線維芽細胞、宿主免疫細胞、細胞外マトリックスなどさまざまな要素で構成されていることが知られているが、本研究では術前化学放射線療法の効果を反映するバイオマーカー候補として Tertiary Lymphoid Organs（以下 TLO）に着目した。TLO は元来、慢性炎症性疾患を中心にその存在が着目されていたが、近年悪性腫瘍組織にも認められることが報告されてきている。膵癌組織についての報告で、術前未治療で手術を先行して治療を行った患者を対象として、腫瘍組織内に TLO が高発現している症例ほど予後良好となることを示し、臨床病理学的に意義があることを証明した。

本研究では上記の先行研究を踏まえ、術前化学放射線治療群と手術先行群において腫瘍微小環境内での TLO 発現の程度を解析し、両群間で TLO の機能的差異があるかどうか、また予後との関連を比較することで、術前化学治療放射線治療を行った膵癌患者において TLO が持つ臨床病理学的意義について検討し、新規バイオマーカーを探索することと、術前化学放射線治療が膵癌微小環境に与える影響について検討することを目的とした。

【対象と方法】

対象

2009 年 1 月～2015 年 12 月の期間に、北海道大学病院消化器外科Ⅱで根治切除が施行された膵癌 140 例を、術前化学放射線療法（Neoadjuvant chemoradiotherapy；以下 NAC）群 47 例と、手術先行（Surgery First；以下 SF）群 93 例に群分けした。

方法

ホルマリン包埋標本を用いて腫瘍微小環境に発現する TLO の発現量、腫瘍組織に対する TLO の占有率（以下 TLO/Tumor 比）を両群において評価した。さらに、免疫組織化学染色法を用いて TLO を構成する免疫学的因子（CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、CD20 陽性 B 細胞、Foxp3 陽性制御性 T 細胞、PD-1 陽性リンパ球、CD80 陽性マクロファージ、CD163 陽性マクロファージ、PNAd 陽性高内皮細静脈）の発現程度と TLO に占める割合、さらに TLO 構成細胞の増殖能について K-67 を用いて画像解析ソフトを用いて評価した。最後に腫瘍微小環境に発現する TLO が患者治療成績に及ぼす影響

について生存解析を行い検討した。また臨床病理学的因子（年齢、性別、腫瘍局在、腫瘍サイズ、リンパ節転移の有無、組織学的グレード、Evans 分類、リンパ管侵襲、静脈侵襲、神経侵襲）に TLO/ Tumor 比を加えて単変量解析、多変量解析を行った。

統計学的比較検討に際し、2 群間検定では Man-Whitney U test、相関分析にはχ二乗検定、Fisher の直接検定、生存分析には Kaplan-Meier 法、Log rank 検定、Cox 比例ハザードモデルをそれぞれ使用した。$p<0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

【結果】

NAC 群と SF 群の２群間の患者背景の比較では年齢、性別、腫瘍局在、腫瘍因子、リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、病理学的ステージ、組織学的分類、術後補助療法施行の有無において有意差を認めなかった。TLO の発現率は全 140 症例中 128 例、91.4%に認められた。総腫瘍面積、総 TLO 面積は NAC 群において有意に低値となった（いずれも $p<0.0001$）。NAC 群と SF 群における総腫瘍面積の差は NAC による腫瘍縮小効果と思われる。総 TLO 面積の差については腫瘍縮小に伴って修飾されたバイアスと考え、TLO/Tumor 比が修飾バイアスを補正するための重要なパラメータであることが示唆された。TLO/Tumor 比については NAC 群、SF 群の間に有意差はなかった。

免疫組織化学染色法を用いた解析では、NAC 群において TLO 内に占める CD8 陽性 T リンパ球、PNAd 陽性高内皮細静脈、CD163 陽性マクロファージ、Ki-67 陽性リンパ球の割合が有意に高値であった。一方、PD-1 陽性免疫抑制性リンパ球の割合は有意に低値であった。生存解析では NAC 群患者が SF 群患者に比較して予後良好であること示された。またサブグループ解析において NAC 群患者では TLO/Tumor 比高値群が低値群に比べて予後良好であることが示された。臨床病理学的因子に TLO/Tumor 比を加えて全生存期間に対する多変量解析を施行したところ、リンパ節転移の有無（HR 0.029, 95%CI 0.003-0.163, $p<0.001$）、TLO/Tumor 比（HR 0.056, 95%CI 0.006-0.297, $p<0.001$）が独立した予後良好因子であることが示された。

【考察】

化学放射線療法施行後の腫瘍微小環境内に浸潤する T リンパ球に関する研究は多く報告されているが、TLO 構築に関する免疫学的メカニズムや TLO の機能の詳細についてはいまだ解明されていない。本研究結果からは術前化学放射線療法による腫瘍崩壊に伴い、腫瘍関連抗原が腫瘍微小環境内に放出されることでマクロファージによる抗原提示、免疫担当細胞の増殖能の増加、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の活性化、リンパ球遊走のための高内皮細静脈の誘導が活性化される一方で、免疫逃避機構に関与する PD-1 陽性リンパ球が抑制され、NAC 群患者における腫瘍微小環境を予後良好な方向に変化させる可能性があることが示唆された。

【結論】

膵癌術前化学放射線療法により TLO を構成する免疫担当因子が変化することで腫瘍局所環境が免疫促進方向に変化し、良好な予後をもたらす可能性が考えられた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

APC	antigen presenting cell
DFS	disease free survival
HEV	high endotherial venules
NAC	neoadjuvant chemoradiotherapy
OS	overall survival
PD-1	programmed death-1
SF	surgery first
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
TLO	tertiary lymphoid organs
TME	tumor microenvironment

緒言

膵癌は進行が早く、早期に転移再発を来す極めて悪性度の高い腫瘍である。根治切除後でも 5 年生存率は 15～25%と予後不良（Siegel R et al.,2016）で、本邦においては悪性腫瘍による死亡原因の第 4 位、全世界では第 5 位に位置し、2030 年までに西欧諸国の中では第 2 位に浮上すると言われている（Ansari D et al.,2012)。そのため、新たな集学的治療法の開発が急務であり、近年では術前治療として化学療法や放射線照射療法を併用する集学的治療が、腫瘍縮小効果、R0 切除率の上昇、リンパ節転移陰性症例の増加などの点で治療成績を改善する可能性があると報告されている（Chun YS et al.,2010)。従って、さらなる治療成績向上のためには、術前治療効果判定のためのバイオマーカーの探索が課題の一つである。

術前治療後の生命予後延長効果が期待できるような症例を選別するためのバイオマーカー研究については、血清 CA19-9 値が切除可能境界型膵癌に対する術前化学療法の治療効果を示す可能性があるという血清タンパク質レベルに着目したもの（Tzeng CW et al., 2014)、膵癌において特異的遺伝子（KRAS、CDKN2A、TP53、SMAD4）異常が予後予測マーカーになり得るという遺伝子工学に着目したもの（Hayashi et al., 2017)、膵癌間質に発現した癌関連線維芽細胞が予後因子となり得るという病理組織学的所見に着目したもの（Sato D et al., 2016）などいくつかの報告がある。これまでの血清学的、遺伝子工学的、病理組織学的アプローチに加えて、Cancer Immunity Cycle（Chen DS et al., 2013、図１）に基づいた腫瘍微小環境（Tumor microenvironment、以下 TME）内での免疫応答を反映するものとして免疫学的アプローチによるバイオマーカー探索研究が近年盛んに行われるようになってきた。

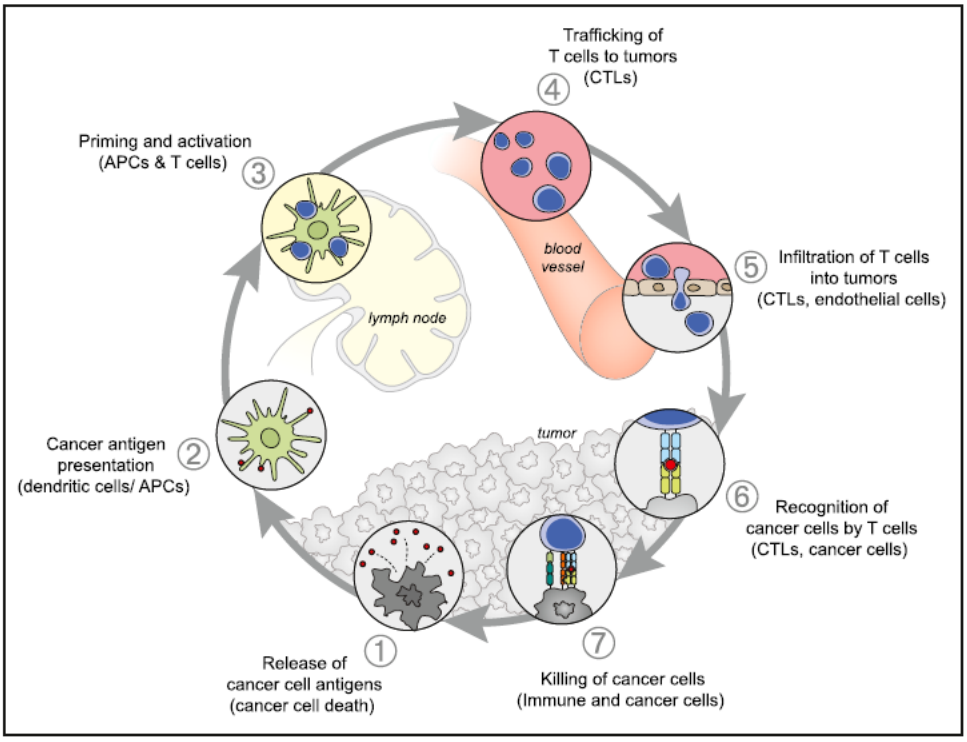

図１　Cancer Immunity Cycle（Chen DS et al., 2013 より引用）

腫瘍抗原の放出、腫瘍抗原による抗原提示（樹状細胞）、プライミングと活性化（抗原提示細胞、T 細胞）、腫瘍への T 細胞の遊走（細胞傷害性 T 細胞）、腫瘍内への T 細胞浸潤、T 細胞による腫瘍細胞の認識、腫瘍細胞の殺傷。

TME は、腫瘍細胞はもとより血管、線維芽細胞、宿主免疫細胞、細胞外マトリックスなどさまざまな要素で構成されている（Quali DF et al., 2013）。本研究では術前化学放射線療法（Neoadjuvant chemoradiotherapy、以下 NAC）の効果を反映するバイオマーカー候補として Tertiary Lymphoid Organs（異所性リンパ組織、以下 TLO）に着目した。一般にリンパ器官はリンパ球の分化、成熟に関わる胸腺や骨髄などの 1 次リンパ器官にはじまり、生体内での免疫応答に携わるリンパ節に代表される 2 次リンパ器官、3 次リンパ器官から構成され、TLO は 3 次リンパ器官に分類される。TLO は B 細胞領域、T 細胞領域、高内皮細静脈（High Endotherial Venules；以下 HEV）を有する 2 次リンパ器官と類似の構造で、被膜を持たないものと定義され、機能は 2 次リンパ器官と同様に抗原認識を行い、抗原特異的な抗体産生作用を有すると考えられている。TLO が正常組織に存在するという報告はなく、サイトカインやケモカインの刺激により局所にリンパ球が誘導され形成される（van de Pavert SA et al., 2010）。

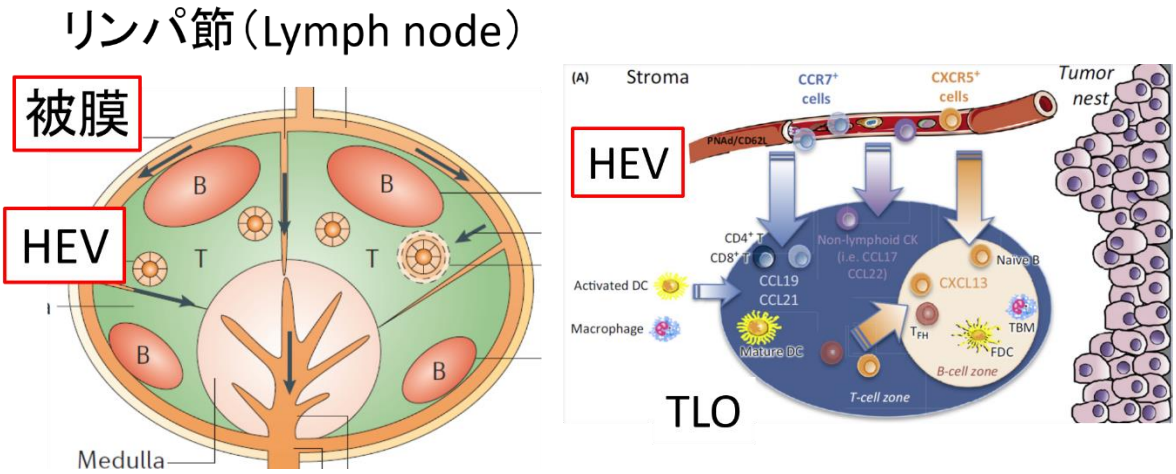

図 2　リンパ節と TLO の構造の違い

左はリンパ節、右は TLO の構造のシェーマを示した。どちらにも T 細胞領域、B 細胞領域、HEV は存在するが、TLO は被膜を持たないことが特徴である。

TLO は関節リウマチや Crohn 病、H. pyroli 感染症など慢性炎症性疾患を中心にその存在が着目されていたが（Aloisi F et al., 2006）、近年悪性腫瘍組織にも認められることが報告されてきている（Pitzalis C et al., 2014、Dieu-Nosjean MC et al., 2016、Colbeck EJ et al., 2017）。膵癌組織についての報告では TLO の臨床病理学的意義に関して検討し、術前未治療で手術を先行して治療を行った患者を対象として、腫瘍組織内に TLO が高発現している症例ほど全生存期間（Overall survival、以下 OS）、無再発生存期間（Disease free survival、以下 DFS）が有意に長くなることを

示している（Hiraoka N et al., 2015)。

本研究では上記の先行研究を踏まえ、TLO が NAC 施行症例において手術先行（Surgery First; 以下 SF）症例と比較して TME 内で高発現していることで良好な予後を予測するバイオマーカーとなり得るという仮説のもと、両群において TME 内での TLO 発現の程度を解析し、両群間で TLO の機能的差異があるかどうか、また予後との関連を分析することで TLO が持つ臨床病理学的意義について検討し、膵癌患者における新規バイオマーカーを探索することを目的とした。

方法

1. 対象患者とサンプル

2009 年 1 月～2015 年 12 月の期間に膵癌と診断され北海道大学病院消化器外科Ⅱで根治切除が施行された 146 名のうち、他癌腫（胃癌、大腸癌）で術後補助化学療法が行われた 4 名、術前治療により腫瘍が消失した 2 名を除いた 140 例を対象とし、術前化学放射線療法（Neoadjuvant chemoradiotherapy；以下 NAC）群 47 例と、手術先行（Surgery First；以下 SF）群 93 例に群分けした。（図 3）

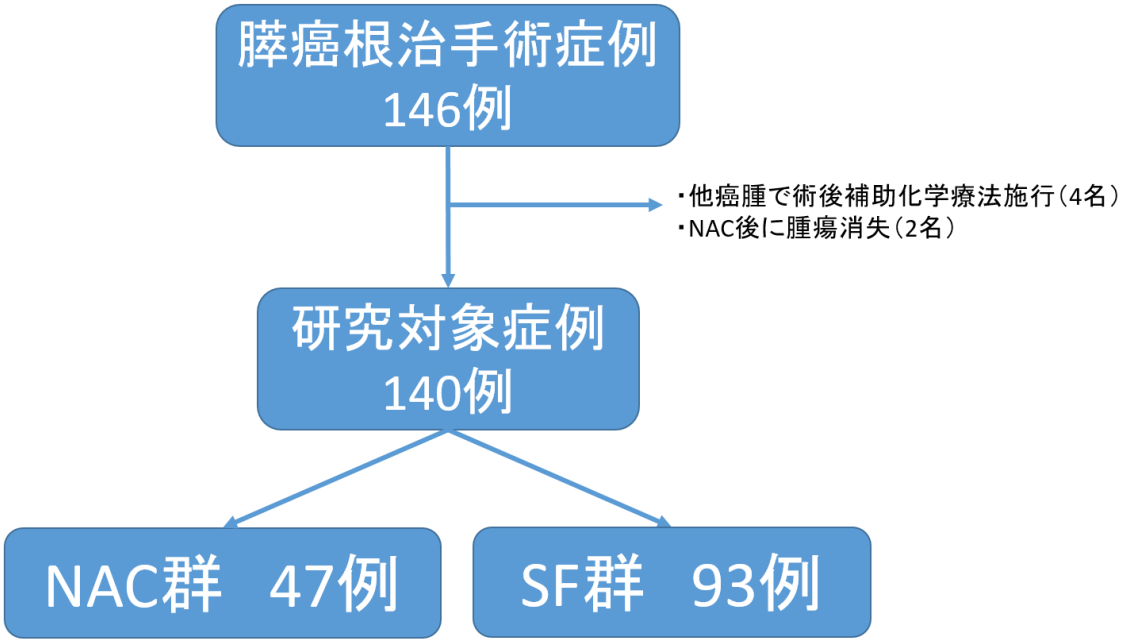

図 3　対象症例選定のフローチャート

北海道大学病院消化器外科Ⅱで根治切除が施行された 146 名のうち、他癌腫（胃癌、大腸癌）で術後補助化学療法が行われた 4 名、術前治療により腫瘍が消失した 2 名を除いた 140 例を対象とし、NAC 群 47 例と SF 群 93 例に群分けした。

対象患者全ての臨床病理学的データは後方視的に電子カルテより収集した。また病理組織標本サンプルは北海道大学病院病理部、消化器外科Ⅱに保管されているホルマリン固定パラフィン包埋標本より作製した。

なお本研究は「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従い、北海道大学病院自主臨床試験（No. 016-0318）として北海道大学病院倫理審査委員会の承認を得て行ったものであり全ての対象患者より同意を得て行った。

2. TLO の評価

北海道大学病院消化器外科Ⅱ、病理部に保管されていた 140 例の切除検体から作成された HE 染色標本の中から腫瘍最大割面となるスライドを抽出し、腫瘍範囲、TLO を特定した。病理組織標本は NanoZoomer Digital Pathology system (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を用いてスキャンしデジタルデータとして取り込んだ。Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて腫瘍面積 (㎟)、TLO 面積 (㎟)、腫瘍面積に対する TLO の占有比率 (以下 TLO/ Tumor 比) を計算した。

3. 免疫組織化学染色法

TLO を構成する免疫学的因子の発現程度を調べるために免疫組織化学染色を行った。ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから 4μm に薄切した組織切片をキシレンとアルコールを段階的に用いて脱パラフィン化した。高 pH あるいは低 pH 緩衝液 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) を用いて熱処理法による抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼは 3%過酸化水素水に 5 分間浸してブロッキングした。1 次抗体を希釈液で指定倍率に希釈した後に 30 分間かけて染色した。1 次抗体にはヘルパーT 細胞のマーカーとして CD4、キラーT 細胞のマーカーとして CD8、B 細胞のマーカーとして CD20、制御性 T 細胞 (Treg) のマーカーとして Foxp3、HEV のマーカーとして PNAd、免疫チェックポイント分子マーカーとして PD-1、細胞増殖能のマーカーとして Ki-67、M1 マクロファージのマーカーとして CD80、M2 マクロファージのマーカーとして CD163 を使用した。各抗体と希釈倍率、抗原賦活法についての詳細は表１に示す。続いて HRP 標識ポリマー法 (EnVision FLEX System, Dako) を用いて 2 次抗体に 30 分浸して DAB 染色を行った。最後にヘマトキシリンで核染色した後、エタノール脱水し、キシレンで洗浄し、封入剤を用いてカバーグラスをかけて観察を行った。

表 1　免疫染色に用いた 1 次抗体リスト

Antigen	Clone	Ig subclass	Dilution	Antigen retrieval	Production
CD4	EPR6855	rabbit IgG	1:500	High pH	Abcam
CD8	EP1150Y	rabbit IgG	1:500	High pH	Abcam
CD20	L26	mouse IgG2a	1:50	High pH	Abcam
FoxP3	236A/E7	mouse IgG1	1:300	High pH	Abcam
PNAd	MECA-79	rat IgM	1:100	High pH	BD Pharmingen
PD-1	NAT105	Mouse IgG1	1:50	High pH	Abcam
Ki-67	SP6	rabbit IgG	1:100	Low pH	Abcam
CD80	EPR1157(2)	rabbit IgG	1:1000	High pH	Abcam
CD163	EPR19518	rabbit IgG	1:500	High pH	Abcam

4. TLO を構成する免疫担当細胞の評価基準

CD4、CD8、CD20、CD80、CD163 のようなリンパ球や免疫担当細胞が 1 つの TLO 内でびまん性あるいは一部に染色される場合（図 4A)、染色陽性細胞の総面積を求め、1 つの TLO に占める比率を求めた。Foxp3、PD-1、Ki-67 のような染色陽性細胞が細胞単位で同定できる場合（図 4B)、染色陽性細胞個数を測定し、1 つの TLO を構成する T 細胞、B 細胞、間質細胞を含めた全ての細胞数に対する比率を求めた。HEV の場合（図 4C)、血管内腔の総面積を求め、1 つの TLO に対する比率を求めた。全ての画像解析は Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA)、BZ-X analyzer (Keyence, Osaka, Japan) を用いて行った。

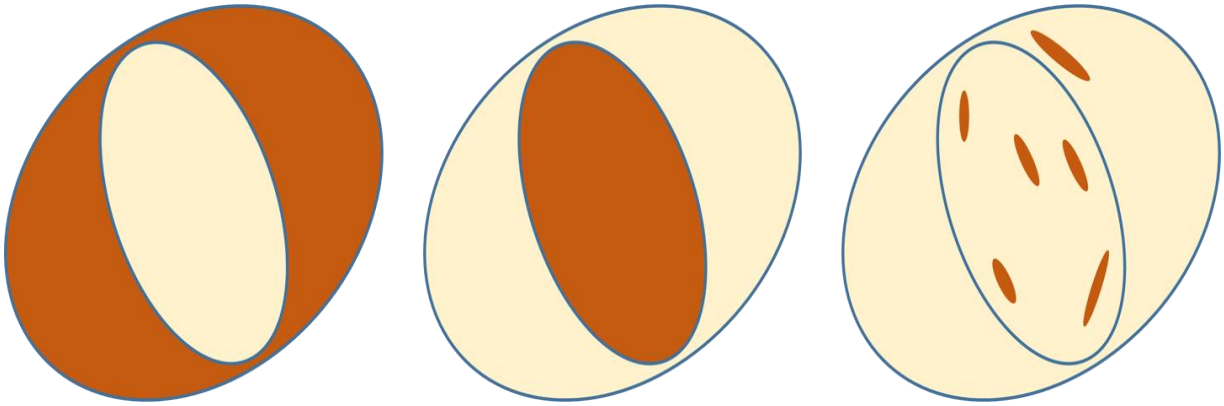

図 4A　びまん性あるいは一部に染色陽性となる場合（染色陽性：茶色）

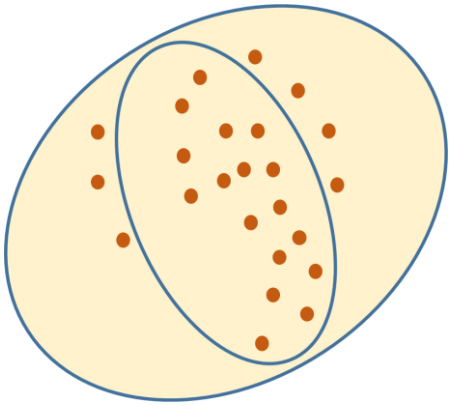

図 4B　染色陽性細胞が細胞単位で同定できる場合（染色陽性：茶色）

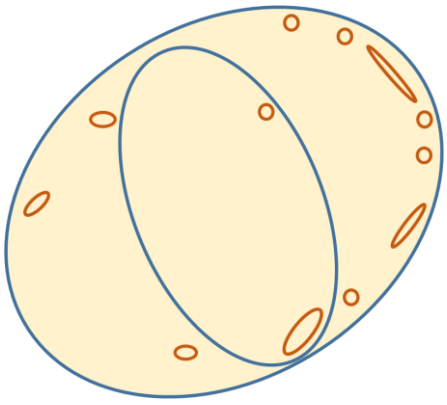

図 4C　染色陽性となる HEV の血管内腔が同定できる場合（染色陽性：茶色）

5. 生存解析

TME に発現する TLO が患者治療成績に及ぼす影響について Kaplan-Meier 法を用いて生存解析を行い検討した。また臨床病理学的因子（年齢、性別、腫瘍局在、腫瘍サイズ、リンパ節転移の有無、組織学的グレード、Evans 分類、リンパ管侵襲、静脈侵襲、神経侵襲）に TLO/ Tumor 比を加えて単変量解析、多変量解析を行った。

6. mRNA 抽出と遺伝子発現解析

パイロット研究として NAC 群、SF 群からランダムに 6 例ずつ症例を選択して mRNA を抽出し遺伝子発現解析を行った。ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから 10 μm に薄切したスライドを 2 枚用意し QIAsymphony RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて添付プロトコールに従い mRNA を抽出した。抽出したサンプルは NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて濃度測定とクオリティチェックを行った。遺伝子発現解析には NanoString® PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA)を使用し核酸デジタルカウント法にて測定し、専用解析ソフトである nSolver Analysis Software version 4.0 (NanoString Technologies)を用いてデータ解析を行った。*CCL19, CCL21, CXCL13, CD3, CD4, CD8, FOXP3, PDCD1, CD34, ICAM1, VCAM1*, and *HPRT1* をターゲット遺伝子とした。

7. 統計解析

統計学的比較検討に際し、2 群間検定では Man-Whitney U test、相関分析には χ 二乗検定、Fisher の直接検定、Spearman の順位相関分析を用いた。生存分析には Kaplan-Meier 法を用いて 2 群間の比較は Log rank 検定を用いた。全生存期間（OS）に関する単変量解析、多変量解析には Cox 比例ハザードモデルをそれぞれ使用した。OS は NAC 群では術前治療開始日から死亡日、SF 群では手術日から死亡日までと定義した。$p<0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。全ての統計解析には JMP 13 (SAS Institute., Cary, NC, USA) を用いた。

結果

1. 対象患者の背景因子

表 2　対象患者の臨床病理学的背景の比較

Characteristics	No. of patients	NAC	SF	p-value
All cases	140	47	93	
Age				
<60	29	10	19	
≥60	111	37	74	0.9071
Sex				
Male	83	23	60	
Female	57	24	33	0.0764
Tumor located area				
Ph	90	35	55	
Pbt	50	12	38	0.0739
Tumor status				
Tis	1	1	0	
T1	11	5	6	
T2	3	0	3	
T3	125	41	84	
T4	0	0	0	0.2426
Node status				
N0	53	22	31	
N1	87	25	62	0.1206
Metastasis status				
M0	137	45	92	
M1	3	2	1	0.2608
pStage				
0	1	1	0	
IA	7	3	4	
IB	1	0	1	
IIA	45	18	27	
IIB	83	23	60	
III	0	0	0	
IV	3	2	1	0.2055
Histological grade				
G1	49	18	31	
G2	84	28	56	
G3	7	1	6	0.5349
Adjuvant therapy				
+	111	35	76	
-	29	12	17	0.3173

表 2 に本研究の対象患者の臨床病理学的背景の比較を示す。年齢、性別、腫瘍局在、腫瘍因子、リンパ節因子、遠隔転移因子、病理学的ステージ、組織学的分類、術後補助化学療法施行の有無について NAC 群、SF 群において有意差はなかった。

表 3　術前治療レジメンの内訳

Preoperative treatments	No. of patients
Gemcitabine + S-1	8
Gemcitabine alone	4
S-1 alone	16
FOLFIRINOX	2
Radiation with	16
Gemcitabine + S-1	11
Gemcitabine	1
S-1	3
FOLFIRINOX	1
Others	1

表 3 に NAC 群患者 47 名の術前治療レジメンの内訳を示す。30 名が化学療法単独（16 名が S-1 単剤、4 名がゲムシタビン単剤、8 名がゲムシタビン＋S-1 併用、2 名が FOLFIRINOX）であった。16 名が化学療法に加え放射線照射療法を併用（11 名がゲムシタビン＋S-1 併用、1 名がゲムシタビン単剤、3 名が S-1 単剤、1 名が FOLFIRINOX）していた。1 名は 5-FU＋ゲムシタビン併用の動注化学療法が施行されていた。

2. NAC 群と SF 群における全腫瘍面積、全 TLO 面積、TLO/Tumor 比

NAC 群、SF 群において Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて全腫瘍面積、全 TLO 面積を測定して、TLO/Tumor 比を計算した。HE 染色スライド画像はデジタルデータとして取り込んだ。

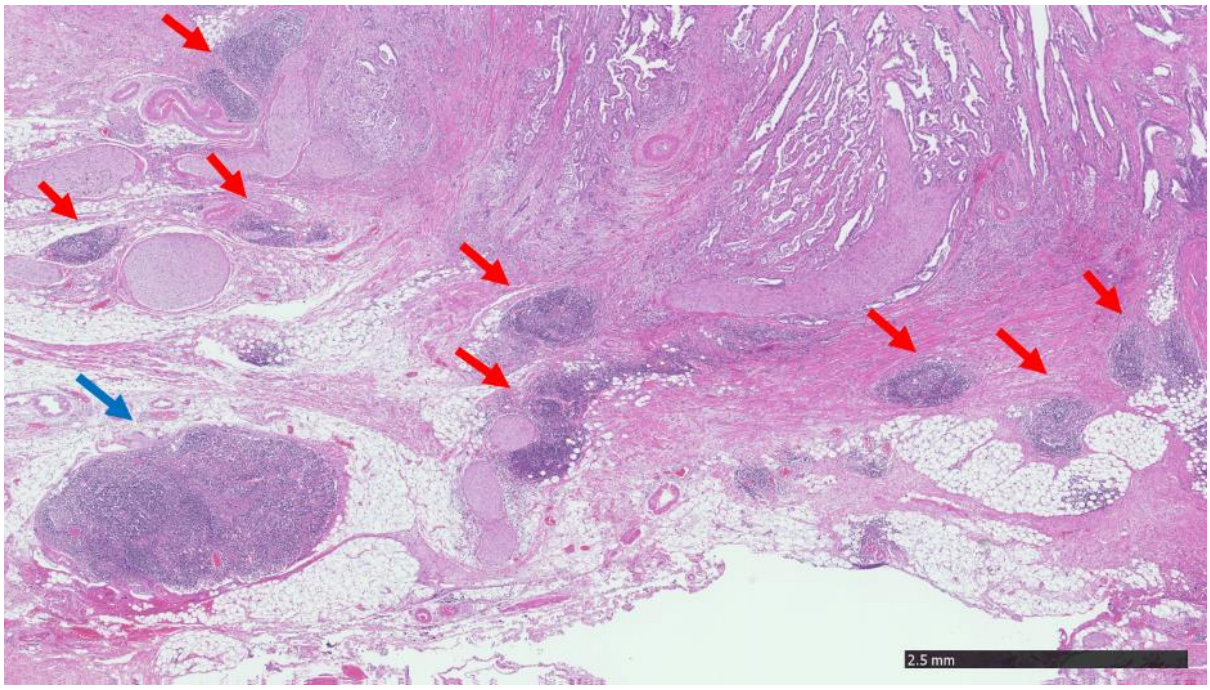

図 5.　腫瘍微小環境に存在する TLO とリンパ節の代表的画像

HE 染色標本スライドをデジタルデータとして取り込んだ。赤矢印が腫瘍細胞周囲に発現する TLO、青矢印がリンパ節を示す。

図 5 に代表的画像を示す。赤矢印が腫瘍細胞周囲に発現する TLO、青矢印がリンパ節である。TLO は形態学的に T、B 細胞領域、HEV を有するリンパ節と類似しているが、被膜を持たないものと定義されている（Hiraoka N et al., 2015)。

TLO の発現率は全 140 症例中 128 例、91.4%に認められた。NAC 群 85.1%、(47 症例中 40 例)、SF 群 94.6%（93 症例中 88 例）で両群間に有意差はなかった（$p=0.0575$)。表 4 に示すように総腫瘍面積、総 TLO 面積は NAC 群において有意に低値となった（いずれも $p<0.0001$)。また図 6 に示すように、総腫瘍面積と総 TLO 面積の間には弱い相関関係があることが分かった（$r=0.36$, $p<0.001$)。

表 4　NAC 群、SF 群における総腫瘍面積、総 TLO 面積、TLO/Tumor 比の比較

	NAC(n=40)	SF(n=88)	p-value
Tumor (mm^2)	94.33 (0.16-453.35)	209.85 (6.53-792.07)	<0.0001
TLO (mm^2)	0.28 (0.01-3.63)	1.26 (0.08-14.88)	<0.0001
TLO/Tumor (%)	0.75 (0.02-59.18)	0.68 (0.03-6.70)	0.7519

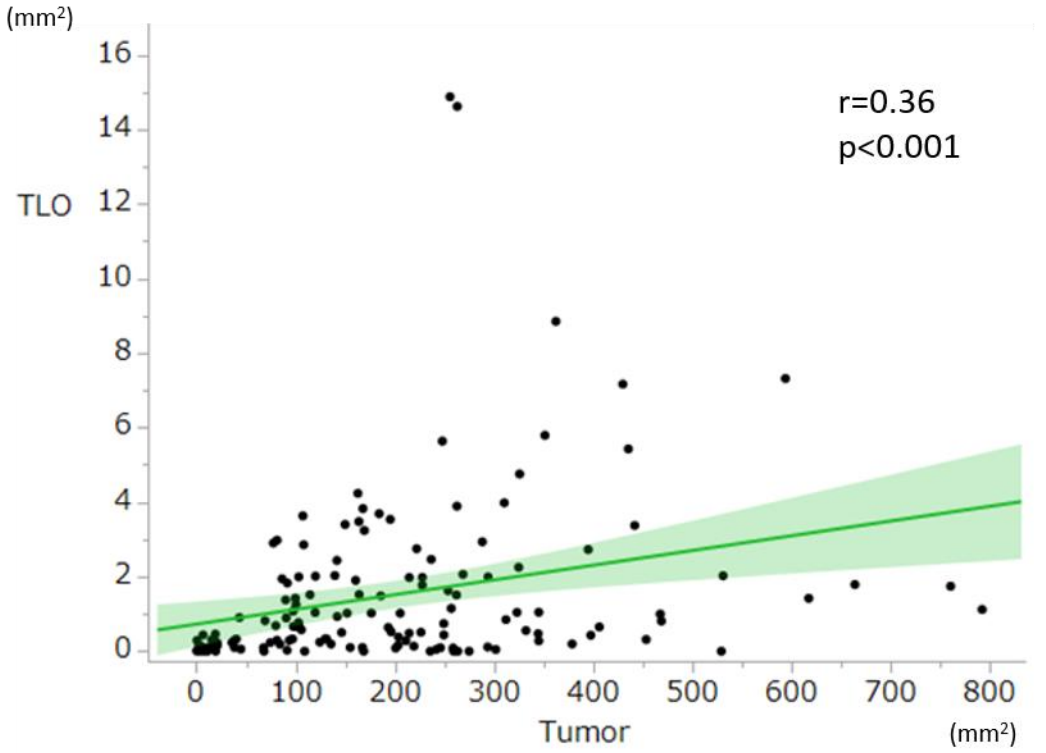

図 6　総腫瘍面積と総 TLO 面積の相関関係

横軸を総腫瘍面積、縦軸を総 TLO 面積として症例ごとにプロットした。総腫瘍面積と総 TLO 面積には弱い相関関係があることが示された。

NAC 群と SF 群における総腫瘍面積の差は NAC による腫瘍縮小効果と思われる。総 TLO 面積の差については、TLO に存在する胚中心様の構造ではリンパ球が非常に分裂している可能性があり NAC に伴って分裂リンパ球が減少してしまった結果である可能性がある。腫瘍縮小に伴って修飾されたバイアスとも考えられ、TLO/Tumor 比が修飾バイアスを補正するための重要なパラメータであることが示唆された。TLO/Tumor 比については NAC 群、SF 群の間に有意差はなかった。

3. 免疫組織化学染色による解析

免疫学的観点から TLO 内の構成要素について分析するために免疫組織化学染色を用いて NAC 群と SF 群で発現解析を行い、両群での違いについて検討した。対象は TLO 発現が陽性となった NAC 群 40 例、SF 群 88 例とした。代表的な免疫染色標本を図 7 に提示する。特徴として CD4、CD8、CD20 は 1 つの TLO 内にびまん性に染色陽性となる一方で、CD80、CD163 は部分的に染色陽性となった。また Foxp3、PD-1、Ki-67 は染色陽性となるリンパ球が細胞単位で同定できた。PNAd 陽性となる HEV も TLO 内に発現していることが示された。

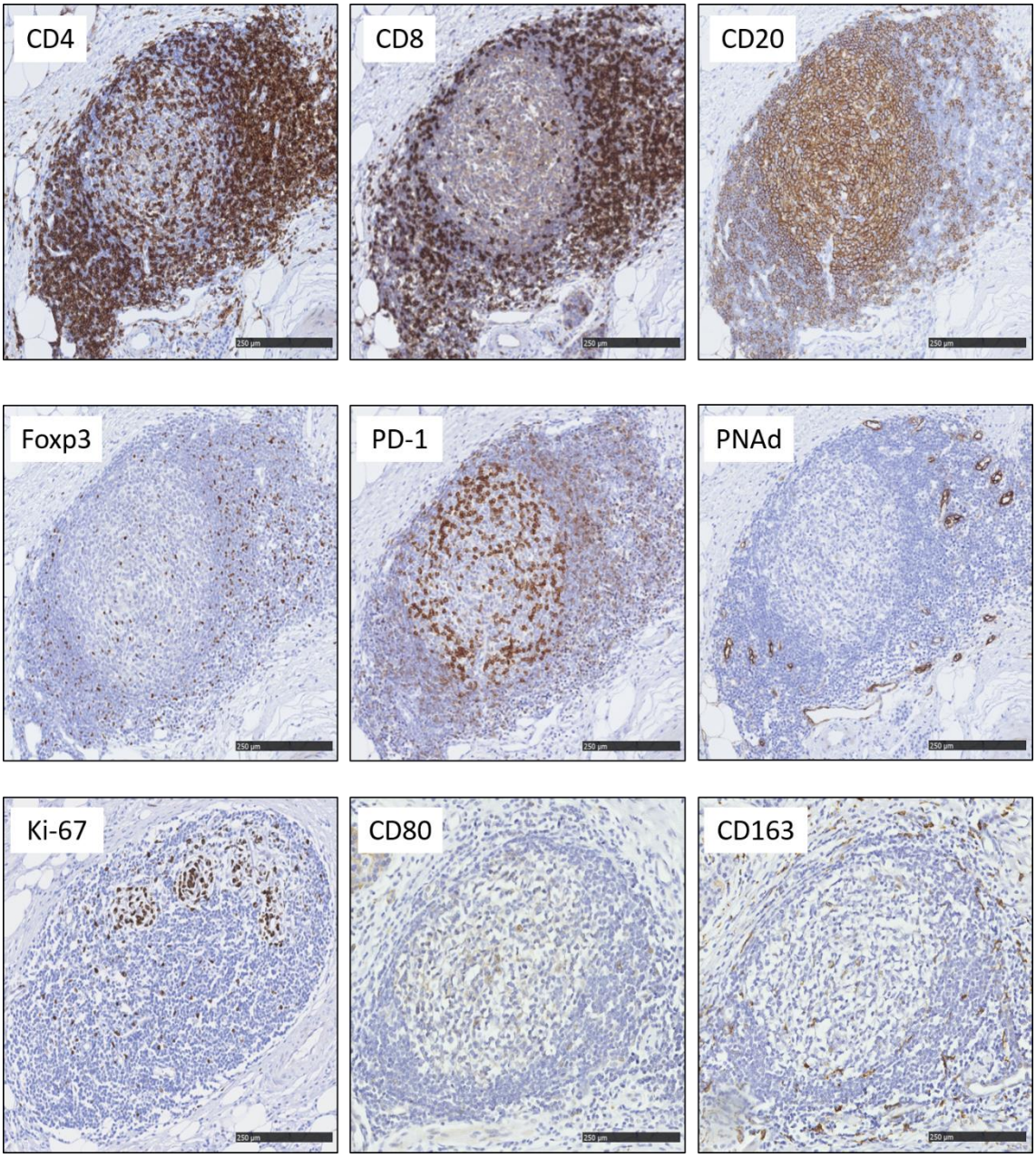

図 7　免疫染色標本の代表的スライド

CD4、CD8、CD20、Foxp3、PD-1、PNAd、Ki-67、CD80、CD163 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。茶色が染色陽性を示している。

NAC 群において CD8 陽性 T 細胞（21.7% vs 12.4%, p=0.0046）、PNAd 陽性 HEV（2.9% vs 1.7%, p=0.0149）の TLO 内に占める割合が SF 群に比較して有意に高くなることが示された。また SF 群において PD-1 陽性リンパ球が TLO 内に占める割合が NAC 群に比較して有意に高くなった（2.2% vs 4.6%, p=0.0004）。CD4 陽性 T 細胞

（23.4% vs 20.0%, p=0.3738）、CD20 陽性 B 細胞（38.1% vs 43.7%, p=0.3015）、Foxp3 陽性抑制性 T 細胞（4.0% vs 3.9%, p=0.9754）は両群で有意差は認めなかった。Ki-67 陽性リンパ球（4.7% vs 2.4%, p=0.0003）、CD163 陽性細胞（3.7% vs 1.9%, p<0.0001）は NAC 群において SF 群と比べ優位に高くなった。CD80 陽性細胞（0.54% vs 0.37%, p=0.0532）は NAC 群で高くなる傾向にあったが有意差は認めなかった（表 5）。

表 5　各抗体の NAC 群と SF 群における発現率の比較

	NAC (n=40)	SF (n=88)	p-value
CD4	23.4 (0.7-59.3)	20.0 (3.3-45.2)	0.3738
CD8	21.7 (3.4-52.6)	12.4 (3.0-47.5)	0.0046
CD20	38.1 (0.1-69.9)	43.7 (3.5-71.4)	0.3015
Foxp3	4.0 (0.3-28.7)	3.9 (0.6-12.2)	0.9754
PD-1	2.2 (0.2-16.7)	4.6 (0.3-19.1)	0.0004
PNAd	2.9 (0.3-12.0)	1.7 (0.4-4.7)	0.0149
Ki-67	4.7 (0.8-23.9)	2.4 (0.3-14.0)	0.0003
CD80	0.54 (0.04-15.2)	0.37 (0.02-3.72)	0.0532
CD163	3.7 (0.7-11.7)	1.9 (0.2-7.3)	<0.0001

続いて図 8 に示すように NAC 群と SF 群の各群で TLO/Tumor 比を中央値で区切り TLO/Tumor 比高値群と低値群に分けてサブグループ解析を行った。

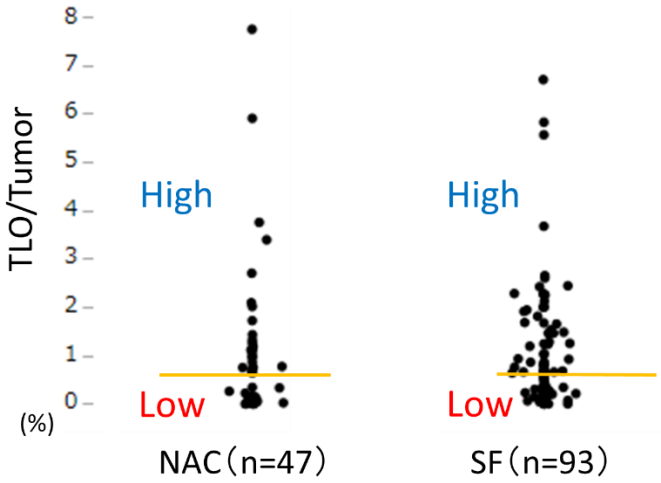

図 8　NAC 群、SF 群における TLO/Tumor 比のプロット図

サブグループ解析を行うために両群において TLO/Tumor 比の値をプロットした。中央で区切り、高値群（high)、低値群（low）に群分けを行った。

NAC 群において CD20 陽性 B 細胞（42.7% vs 23.2%, p=0.0133)、PNAd 陽性 HEV（3.5% vs 1.8%, p=0.0009）の TLO 内に占める割合が TLO/Tumor 比高値群が低値群に比較して有意に高値であった。一方で免疫抑制的に作用する Foxp3 陽性抑制性 T 細胞（2.9% vs 6.1%, p=0.-0208)、PD-1 陽性リンパ球（1.5% vs 6.1%, p=0.0086）の TLO 内に占める割合は TLO/Tumor 比低値群が高値群に比較して有意に高くなることが示された。CD4 陽性 T 細胞（24.3% vs 22.5%, p=0.1756)、CD8 陽性 T 細胞（21.7% vs 21.6%, p=0.7119)、CD80 陽性細胞（0.47% vs 0.56%, p=0.4040)、CD163 陽性細胞（3.7% vs 3.7%, p=0.6715）は両群で有意差はなかった。Ki-67 陽性細胞（3.1% vs 6.8%, p=0.0609）は TLO/Tumor 比低値群で高い傾向にあったが有意差は認めなかった（表 6)。

SF 群においては CD163 陽性細胞（1.6% vs 2.3%, p=0.0340）が TLO 内に占める割合が TLO/Tumor 比低値群が高値群に比較して有意に高くなったが、その他いずれの項目も両群で有意差を認めなかった（表 7)。

表 6　NAC 群における TLO/Tumor 比高値群と低値群の比較

	High (n=23)	Low (n=17)	p-value
CD4	24.3 (3.6-59.3)	22.5 (0.7-34.4)	0.1756
CD8	21.7 (3.4-41.6)	21.6 (4.9-52.6)	0.7119
CD20	42.7 (4.0-62.7)	23.2 (0.1-69.9)	0.0133
Foxp3	2.9 (1.0-11.2)	6.1 (0.3-28.7)	0.0208
PD-1	1.5 (0.2-7.8)	5.1 (0.4-16.7)	0.0086
PNAd	3.5 (1.3-12.0)	1.8 (0.3-4.8)	0.0009
Ki-67	3.1 (0.8-19.0)	6.8 (1.5-23.9)	0.0609
CD80	0.47 (0.06-2.25)	0.56 (0.04-15.2)	0.4040
CD163	3.7 (1.3-7.7)	3.7 (0.7-11.7)	0.6715

表 7　SF 群における TLO/Tumor 比高値群と低値群の比較

	High (n=47)	Low (n=41)	p-value
CD4	20.2 (8.2-45.2)	19.2 (3.3-45.0)	0.4391
CD8	13.6 (4.5-47.5)	12.3 (3.0-41.0)	0.6485
CD20	36.8 (3.5-65.4)	46.2 (6.7-71.4)	0.1129
Foxp3	3.3 (0.7-14.8)	4.8 (0.8-13.9)	0.0741
PD-1	4.5 (0.2-18.2)	4.7 (0.7-20.8)	0.8376
PNAd	15.3 (0.4-3.7)	19.3 (0.4-4.7)	0.0518
Ki-67	2.1 (0.4-11.8)	2.9 (0.3-14.3)	0.2433
CD80	0.28 (0.02-3.72)	0.41 (0.04-1.95)	0.5610
CD163	1.6 (0.2-7.3)	2.3 (0.7-6.9)	0.0340

4. NAC 群と SF 群における探索的遺伝子発現解析

術前化学放射線照射療法施行後の腫瘍微小環境における免疫学的メカニズムの変化について調べるために、NAC 群と SF 群において免疫関連遺伝子発現の差があるかどうかを検討した。本項目は探索的研究として NAC 群、SF 群からランダムに 6 症例を選択し、各群のホルマリン固定パラフィン包埋ブロック検体から mRNA を抽出し免疫関連遺伝子発現について比較した。

表 8　抽出した mRNA サンプルのクオリティチェック

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	Sample Type
1	179.5	ng/µl	4.488	2.296	1.95	RNA
2	94	ng/µl	2.351	1.239	1.9	RNA
3	128.4	ng/µl	3.209	1.732	1.85	RNA
4	81.9	ng/µl	2.049	1.036	1.98	RNA
5	84.5	ng/µl	2.113	1.141	1.85	RNA
6	99.3	ng/µl	2.482	1.299	1.91	RNA
7	51	ng/µl	1.274	0.637	2	RNA
8	122.5	ng/µl	3.064	1.527	2.01	RNA
9	31.2	ng/µl	0.78	0.387	2.02	RNA
10	53.9	ng/µl	1.347	0.649	2.08	RNA
11	101.9	ng/µl	2.547	1.426	1.79	RNA
12	32.9	ng/µl	0.822	0.422	1.95	RNA

表 8 に抽出した各検体の mRNA の濃度、吸光度について示した。いずれの症例においても吸光度比 260/280 がおおよそ 1.8～2.0 を示したため検体サンプルの精度としては問題なしと判断し、核酸デジタルカウント法を用いて遺伝子発現解析を行った。

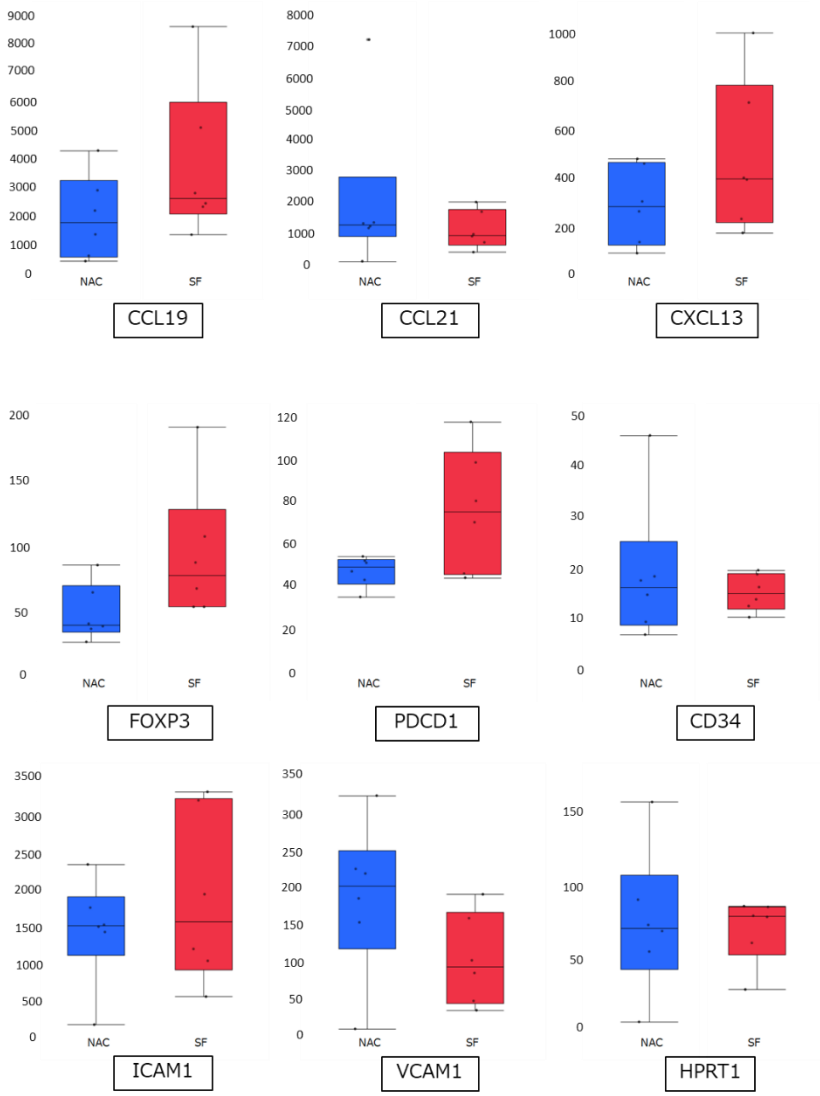

図 9　NAC 群と SF 群における免疫関連遺伝子発現の比較

核酸デジタルカウント法により NAC 群、SF 群において免疫関連遺伝子発現を比較した。赤い箱ひげ図は SF 群、青い箱ひげ図は NAC 群を示し、縦軸は測定された核酸の個数を示す。

リンパ球産生に関するケモカイン誘導遺伝子（*CCL19, CCL21, CXCL13*）、リンパ球遊走に関する遺伝子（*CD34, ICAM1, VCAM1*）、免疫逃避関連遺伝子（*PDCD1*）、ハウスキーピング遺伝子（*HPRT1*）いずれも両群において発現に有意差は認めなかったが、*FOXP3* 発現のみ NAC 群において有意に Down-regulation されていることが分かった（p=0.037）（図 9）。

5. 生存解析

OS に関して NAC 群は SF 群に比較して有意に予後良好であった（p=0.017）（図 10A）。観察期間中央値は 749.5 日、2 年生存率、5 年生存率は NAC 群で 82.0%、44.2%に対して、SF 群では 51.9%、17.7%だった。術後補助化学療法施行の有無については NAC 群、SF 群ともに有意差はなく患者 OS に関して寄与しないことが分かった。サブグループ解析では NAC 群において TLO/Tumor 比高値群が低値群に比較して予後良好であることが示された（p=0.0326）（図 10B）。一方で SF 群では TLO/Tumor 比高値群、低値群に有意差はなかった（p=0.6719）（図 10C）。

臨床病理学的因子に TLO/Tumor 比を加えて単変量解析、多変量解析を行った。単変量解析にて有意差のあった腫瘍局在（膵頭部/膵体尾部）、腫瘍サイズ（2.0cm 以上/2.0cm 未満）、リンパ節転移の有無、TLO/Tumor 比の 4 因子で多変量解析を行うと、リンパ節転移なし（ハザード比 0.029、95%信頼区間 0.003-0.163、p<0.0001）、TLO/Tumor 比高値（ハザード比 0.056、95%信頼区間 0.006-0.297、p<0.0001）が独立した予後良好因子となった（表 9）。

表 9　単変量解析、多変量解析の結果

	Univariate Analysis*		Multivariate Analysis*	
N=47	HR (95%CI)	p-value	HR (95%CI)	p-value
Age (>60/≤60)	1.530 (0.486-6.738)	0.493		
Gender (M/F)	2.539 (0.952-7.476)	0.063		
Location (Ph/Pbt)	3.527 (1.077-16.095)	0.036	1.375 (0.358-6.782)	0.656
Tumor size (>2.0sm/≤2.0cm)	4.019 (1.416-14.310)	0.008	1.017 (0.280-4.258)	0.981
Pathologic node status (N0/N1)	0.152 (0.041-0.457)	<0.001	0.029 (0.003-0.163)	<0.001
Histological grade (G1/G2,G3)	0.633 (0.200-1.719)	0.381		
Evans classification (1,2a/2b,3)	2.160 (0.746-7.766)	0.162		
Lymphatic invasion (+/-)	1.042 (0.322-2.901)	0.940		
Venous invasion (+/-)	1.161 (0.420-3.700)	0.782		
Neural invasion (+/-)	1.794 (0.610-6.501)	0.300		
TLO/Tumor (high/low)	0.306 (0.085-0.884)	0.028	0.056 (0.006-0.297)	<0.001

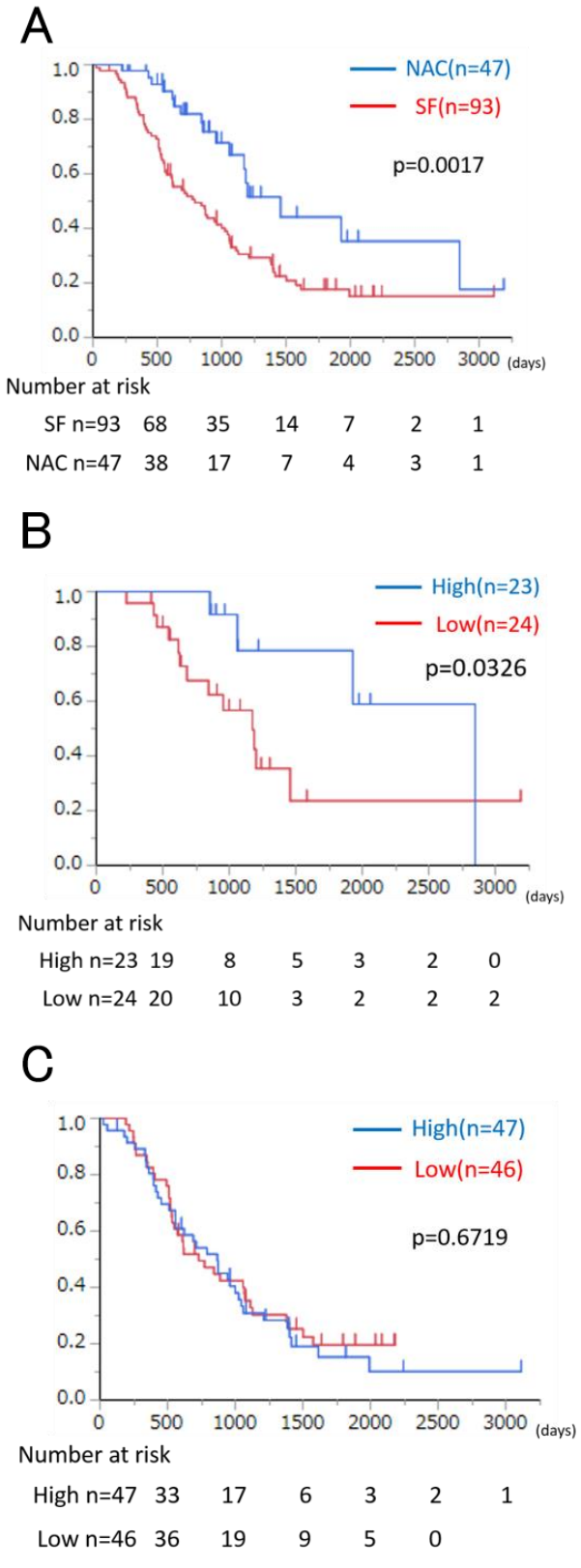

図 10　全生存期間に関する Kaplan-Meier 曲線

(A) NAC 群と SF 群における OS の比較 (B) NAC 群における TLO/Tumor 比高値群と低値群における OS の比較 (C) SF 群における TLO/Tumor 比高値群と低値群における OS の比較。いずれも有意差検定には Log-rank 検定を用いた。

考察

1. TLO の概念

本研究では化学放射線治療後の膵癌患者における TLO の臨床的意義について検討してきた。TLO とは被膜を持たないリンパ球の凝集体として特徴づけられるリンパ器官と定義されている。TLO 形成は被膜を持つ 2 次リンパ器官の発生と関連していると言われているが、2 次リンパ器官のような、あらかじめプログラムされた個体発生過程とは完全に区別されたものであり、すべての患者に起こるわけではない（Drayton DL et al., 2006)。慢性的に炎症反応が持続する場合、リンパ球は蓄積していき B 細胞領域と T 細胞領域が de novo 発生する（van de Pavert SA et al., 2010、 Aloisi F et al., 2006)。この現象は”tertiary lymphoid neogenesis”あるいは”TLO formation”と呼ばれてきた。2 次リンパ器官と TLO の間に構造的違いがあるにもかかわらず、初期発生段階のコントロールや細胞構成、機能維持などさまざまなメカニズムは類似している（Aloisi F et al., 2006、 Drayton DL et al., 2006)。

2. TLO と悪性腫瘍

悪性腫瘍に発現する TLO については癌腫、TLO 構成要素によって患者の生命予後と関連しており、予後良好となるような生体内での抗腫瘍免疫応答であることが示唆されている（Sautes-Fridman C et al., 2016)。近年では膵癌（Hiraoka N et al., 2015、 Lutz ER et al., 2014)、大腸癌（McMullen TPW et al., 2010)、非小細胞肺癌（Goc J et al., 2014a、 Goc J et al., 2014b)、胃癌（Sakimura C et al., 2017)、乳癌（Martinet L et al., 2011、Martinet L et al., 2012）など、さまざまな癌腫で TLO 密度の計測や TLO 関連遺伝子発現など免疫学的アプローチによる解析が行われ TLO 発現の意義に関する報告がなされている。

3. TLO と膵癌に関する研究

膵癌において TLO の臨床病理学的意義については平岡らが術前治療をせず手術を先行して施行した膵癌患者を対象にした研究の中で、腫瘍組織内に発現した TLO が TME 内での宿主免疫応答を反映し、独立した予後因子になり得ると報告している（Hiraoka N et al., 2015)。また Lutz ER らは GVAX と呼ばれる同種膵癌ワクチンを用いた免疫治療がエフェクターリンパ球を誘導することで膵癌組織を”non-immunogenic”な状態から”immunogenic”な状態に変え得るかという仮説を検証した。放射線処理を行った顆粒球-マクロファージコロニー分泌刺激因子とともに GVAX を投与することで膵癌組織内に TLO を誘導することを示し、GVAX が腫瘍局所で抗原特異的な免疫反応を引き起こすことを証明した。さらにマイクロダイセクションにより TLO から mRNA を抽出することで遺伝子発現解析を行い抑制性 T 細胞の減少と Th17

エフェクターT リンパ球反応が促進され予後良好となることを報告した（Lutz ER et al., 2014)。

本研究では前述の先行研究結果を踏まえて、術前化学放射線治療後の膵癌患者においてTLO内の免疫学的要素の変化と機能的メカニズムを解析することで、術前化学放射線治療がTMEを免疫促進方向に変化させ、患者に良好な予後をもたらす可能性があることを初めて報告した。以下に過去の文献をもとにして本研究結果について詳細に考察していく。

4. TLOとT細胞

抗原刺激により開始される免疫系ネットワークに関するここ数年の知見では、豊富な腫瘍浸潤免疫細胞、特に細胞傷害性T細胞が多くの癌種の中で予後良好因子であるとされている（Fridman WH et al., 2012)。CD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞の関連については、マウスモデルにおいてCD4陽性T細胞は腫瘍環境内でIFN-γ産生能を有し、CD8陽性T細胞のリクルートメントと増殖作用を持つことが示されている（Bos R et al., 2010)。本研究結果からもTLO内を占めるCD8陽性T細胞はNAC群がSF群に比較して有意に高いことが示されており、術前治療を行った膵癌患者にとって良好な予後をもたらしていることが示唆される。これはCD8陽性となる細胞傷害性T細胞が持つ殺細胞効果が、TME内で活性化された結果であると考察される。CD4陽性T細胞のTLO内を占める割合についてはNAC群、SF群で有意な差はなかったものの、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞の各群内での占有率には相関があることが示された（NAC群；r=0.58、SF群；r=0.55)。本研究からはCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞のTME内での相互作用について直接実証できるデータはないため、今後の検討課題である。今回の我々のデータはCD8陽性T細胞の存在が良好な予後に繋がっているという過去の報告を支持するものであり、NACがTME内での免疫応答をより抗腫瘍的なものに変え得る可能性があることを踏まえると、膵癌患者においてNACの臨床的意義があると考えられる。

5. TLOとB細胞、抗原提示細胞

本研究結果では、TLO/Tumor比高値群（TME内のTLOが高密度に存在）の患者ほどTLO内のCD20陽性B細胞の割合が高いことが示された。これはNAC群においてのみ良好な予後がもたらされた背景要因として考えられる。TLOとB細胞の関連性についても同様にさまざまな癌腫で予後因子としての有効性が報告されてきた。一般的にB細胞は抗腫瘍免疫において抗原提示細胞（Antigen presenting cells、以下APC）と抗原特異的抗体産生細胞の2種類の大きな役割を担っている（Germain C et al., 2015)。胃癌患者を対象とした研究では、CD20陽性B細胞数が多いほど有意に予後良

好であるという報告がある（Sakimura C et al., 2017)。肺癌における研究では、腫瘍細胞内のB細胞濾胞領域のB細胞は抗原特異的な液性免疫に関与し、濾胞性B細胞の密度が高率に患者予後と関連している可能性を報告した（Germain C et al., 2014)。これまでの文献的考察を踏まえると、TLOを構成する濾胞性B細胞の存在は腫瘍局所での抗腫瘍液性免疫の活性化を表す指標になる可能性が高いと考えられる。また、B細胞にはクロスプレゼンテーションによりCD8陽性T細胞に抗原提示を行う機能を有しているとする報告もある。B細胞は癌巣内でAPCに類似した機能を有していることが示され、抗腫瘍免疫応答を促進している。腫瘍浸潤CD20陽性B細胞の近傍にはCD8陽性T細胞が存在しており、両リンパ球の存在が良好な予後と関連していることが、卵巣癌患者における研究において示されている（Nielsen JS et al., 2012)。したがってTME内での高密度のTLO浸潤は、CD20陽性B細胞の発達と関連し、術前化学放射線治療はこれらの現象を促進させている可能性があると示唆される。

B細胞に加えてAPCの機能とTLO内での抗原提示のメカニズムについても報告されてきた（Hughes CE et al., 2016)。マクロファージは古典的活性化M1マクロファージと選択的活性化M2マクロファージの2つのサブセットに分類されている。一般的にM1マクロファージは炎症促進効果を示す一方で、M2マクロファージは抗炎症効果と組織の創傷治癒に関与していることが知られている（Murray PJ et al., 2014)。本研究結果からは術前放射線治療を行ったNAC群の患者で、TLO内に占めるCD163陽性M2マクロファージがSF群に比べて有意に多いことが示された。これにより術前治療による腫瘍崩壊に伴い放出された腫瘍関連抗原の認識と抗腫瘍免疫応答が促進されたことが示唆された。

6. TLOとHEV

TLOのde novo形成において、HEVは密接に関与している。血中のTリンパ球はHEVを介してTLO内に入ることが知られており、腫瘍内のPNAd陽性HEVは密接にTLOの形成と関連している。HEVの臨床病理学的有用性については、腫瘍内で高密度にHEVが増生していることと、腫瘍浸潤T細胞やセントラルメモリーT細胞数の増加に関連があり、患者の生命予後は有意に良好となることが乳癌患者の研究で示された（de Chaisemartin L et al., 2011)。TME内に多数のリンパ球をリクルートする機能を持つことから、腫瘍内のHEVは癌診断と治療の観点から新規ターゲットになり得ると言われている（Ruddle NH et al., 2016)。本研究結果からは、NAC群患者においてTLO内でPNAd陽性HEVが高密度に発現しており、患者の良好な予後と関連しており臨床病理学的に有用性を示すことが出来た。TLO/Tumor比を用いたサブグループ解析においても、TLO/Tumor比高値群の患者で、HEVが高密度に発現しており有意に

予後良好となることが示された（表6、図11B)。この結果からHEVによるTME内への多数のリンパ球の誘導は細胞性免疫、液性免疫の活性化に重要な役割を成し、新規治療のターゲット分子となり得る可能性が示唆される。

7. TLOと免疫抑制性細胞（抑制性T細胞、PD-1陽性リンパ球）

エフェクター細胞のメカニズムを解析する過程でTLO内の免疫抑制性細胞にも着目した。TME内への抑制性T細胞浸潤は予後不良と関連することが多数の癌腫で報告されているが、詳細なメカニズムについては未だ解明されていないのが現状である。肺癌モデルマウスを用いた研究では抑制性T細胞が抗腫瘍免疫応答をTLO内で抑制することを示した報告がある（Joshi NS et al., 2015)。本研究においてはTLO内を占める抑制性T細胞の比率はNAC群、SF群の間で有意差はなかったものの、TLO内を占めるPD-1陽性リンパ球の比率はNAC群がSF群に比較して有意に低く、予後も良好になることが示された。術前化学放射線照射治療が効果的にTME内で免疫抑制性分子を減らす可能性があることが示唆された。

8. TLOと術前化学放射線治療

化学放射線治療後のTME内へのT細胞浸潤に着目した研究の報告もある。しかしながら、化学放射線治療後のTLO内の構成要素の変化に関する免疫学的、機能的メカニズムについてはほとんど不明である。術前化学放射線治療は抑制性T細胞を減らしTME内でのCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞の蓄積を誘導する観点で有用であるという報告（Tsuchikawa T et al., 2013）やCD8陽性細胞が予後良好因子となり得るという報告がある（Homma Y et al., 2014)。本研究結果からは化学放射線治療による腫瘍崩壊に伴い放出された腫瘍関連抗原によってTLOがTME内に誘導され活性化された可能性があると推察される（図11)。ここまではTLOとTLO内免疫細胞の変化の観点から考察してきたが、本研究においては腫瘍浸潤リンパ球（Tumor infiltrating lymphocyte、以下TIL）とTLOの明確な定義の違いについては解明されておらず今後の検討課題の1つと考えられる。早期大腸癌を対象とした研究では、腫瘍内に発現しているTILとTLOの密度が相関していることを証明し、さらにTME内へのTILのリクルートメントにTLOが関与している可能性を示唆した（Di Caro G et al., 2013)。しかしながら詳細なメカニズムについては未だ不明な点も多く、今後の更なる研究の蓄積が必要と思われる。

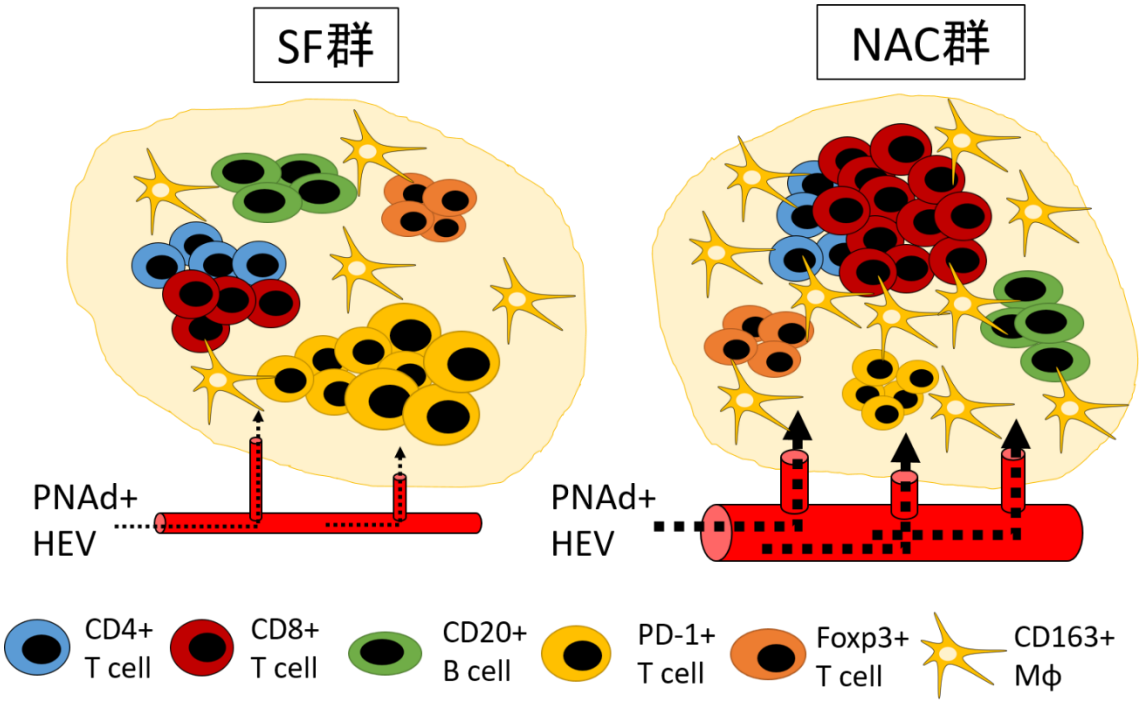

図 11　術前化学放射線治療による腫瘍微小環境における TLO 内の変化

NAC により TLO 内の CD8 陽性 T 細胞、CD163 マクロファージの増加、PNAd 陽性 HEV の増加、PD-1 陽性リンパ球の減少がみられ、TME 内を免疫促進的なものにする可能性が示唆された。

9. TLO に関する遺伝子解析（探索的研究結果からの考察）

免疫組織化学染色による解析結果を踏まえて、術前化学放射線照射によって TME 内での TLO の免疫学的構成要素の変化についてメカニズムを解析するために探索的研究として遺伝子発現解析を行った。図 9 に示すように NAC 群において *FOXP3* のみ Down-regulation された結果となり、免疫染色の解析結果とは解離した。要因として Foxp３タンパク発現レベルに関しては TLO 内の Foxp3 陽性抑制性 T 細胞は術前治療によって影響を受けない可能性や、TLO だけでなく TME 全体から mRNA を抽出してきたため結果にバイアスを与えた影響が考えられた。詳細については今後症例を増やした解析が必要と思われた。

結論

本研究結果から以下のような新知見が得られた。
・膵癌に対して術前化学放射線療法を施行した患者は手術先行した患者に比較して TLO を構成する CD8 陽性 T リンパ球、CD163 陽性マクロファージ、PNAd 陽性 HEV、Ki-67 陽性細胞の占める割合が高くなる一方で、PD-1 陽性リンパ球の割合が低くなる。
・膵癌に対して術前化学放射線照射療法をした患者は手術先行した患者に比較して全生存期間が有意に延長する。
・膵癌に対して術前化学放射線照射療法をした患者において多変量解析を施行するとリンパ節転移の有無に加えて、TLO/Tumor 比が独立した予後規定因子となる。

術前化学放射線照射療法による腫瘍崩壊に伴い、腫瘍関連抗原が腫瘍微小環境内に放出されることでマクロファージによる抗原提示、免疫担当細胞の増殖能の増加、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の活性化、リンパ球遊走のための高内皮細静脈の誘導が活性化される一方で、免疫逃避機構に関与する PD-1 陽性リンパ球が抑制され、術前化学放射線照射療法施行患者における腫瘍微小環境を予後良好な方向に変化させる可能性があることが示唆された。また多変量解析の結果から、腫瘍微小環境に浸潤する TLO の存在が予後規定因子となり得る点で臨床病理学的に意義のあるものと言える。

上記の結果を踏まえて今後は腫瘍微小環境に発現する TLO が膵癌免疫治療のターゲットとなり得る可能性が考えられる。すでに分子標的治療薬として腫瘍血管新生阻害剤などが実臨床において使用されているが、宿主側因子として腫瘍微小環境に T リンパ球を遊走し TLO 形成に必要不可欠である高内皮細静脈の誘導を促進させるような分子のさらなる解明が新規治療薬開発の一助となることが期待される。

しかしながら腫瘍微小環境に発現する TIL と TLO の定義の明確な違いについては未だ解明されておらず、今後の検討課題の一つである。腫瘍微小環境内で活躍する免疫担当細胞の機能や役割についての詳細なメカニズムの解明が求められる。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科学研究費補助金 JP17K10532 の助成を受けたものである。

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 平野　聡 教授に深く感謝いたします。

また、研究において，多大なご指導をいただいた北海道大学医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 土川貴裕 診療准教授、中村　透 診療講師、免疫組織化学染色において研究協力をいただきました北海道大学病院　ゲノム・コンパニオン診断研究部門　畑中豊 特任准教授、遺伝子解析において研究協力をいただきました北海道大学病院　臨床研究開発センター　畑中　佳奈子　特任講師に深く感謝いたします。

最後に、本研究を支えてくださった、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱの全ての皆様に心より御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Aloisi, F., Pujol-Borrell, R. (2006). Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. Nat Rev Immunol. *6*:205-217.

Ansari, D., Chen, B.C., Dong, L., Zhou, M.T., Andersson, R. (2012). Pancreatic cancer: translational research aspects and clinical implications. World J Gastroenterol. *18*:1417-1424.

Bos, R., Sherman, L.A. (2010). CD4+ T-Cell Help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. Cancer Res. *70*:8368-8377.

Brown, J.R., Wimberly, H., Lannin, D.R., Nixon, C., Rimm, D.L., Bossuyt, V. (2014). Multiplexed quantitative analysis of CD3, CD8, and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Clin Cancer Res. *20*:5995-6005.

Chen, D.S., Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer immunity cycle. Immunity. *39*:1-10.

Chun, Y.S., Milestone, B.N., Watson, J.C., Cohen, S.J., Burtness, B., Engstrom, P.F., Haluszka, O., Tokar, J.L., Hall, M.J., Denlinger, C.S. et al. (2010). Defining venous involvement in borderline resectable pancreatic cancer. Ann Surg Oncol. *17*:2832-2838.

Colbeck, E.J., Ager, A., Gallimore, A., Jones, G.W. (2017). Tertiary lymphoid structures in cancer: drivers of antitumor immunity, immunosuppression, or bystander sentinels in disease. Front Immunol. *8*:1830.

de Chaisemartin, L., Goc, J., Damotte, D., Validire, P., Magdeleinat, P., Alifano, M., Cremer, I., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., Dieu-Nosjean, M.C. (2011). Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. Cancer Res. *71*:6391-6399.

Di, Caro, G., Bergomas, F., Grizzi, F., Doni, A,. Bianchi, P., Malesci, A., Laghi, L., Allavena, P., Mantovani, A., Marchesi, F. (2014). Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. Clin Cancer Res. Apr 15;*20*(8).

Dieu-Nosjean, M.C., Giraldo, N.A., Kaplon, H., Germain, C., Fridman, W.H., Fridman, C.S. (2016). Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. Immunol Rev. *271*:260-275.

Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H., Ruddle, N.H. (2006). Lymphoid organ development from ontogeny to neogenesis. Nat Immunol. *7*:344-353.

Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer. *12*:298-306

Germain, C., Gnjatic, S., Tamzalit, F., Knockaert, S., Remark, R., Goc, J., Lepelley, A., Becht, E., Katsahian, S., Bizouard, G. et al. (2014). Presence of B Cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. Am J Respir Crit Care Med. *89*:832-844.

Germain, C., Gnjatic, S., Dieu-Nosjean, M.C. (2015). Tertiary lymphoid structure-associated B cells are key players in anti-tumor immunity. Front Immunol. *6*:67.

Goc, J., Fridman, W.H., Hammond, S.A., Sautes-Fridman, C., Dieu-Nosjean, M.C. (2014a). Tertiary lymphoid structures in human lung cancers, a new driver of antitumor immune responses. Oncoimmunology. *3*:e28976.

Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K.D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M. et al. (2014b). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. Cancer Res. *74*:705-715.

Hayashi, H., Kohno, T., Ueno, H., Hiraoka, N., Kondo, S., Saito, M., Shimada, Y., Ichikawa, H., Kato, M., Shibata, T. et al. (2017). Utility of assessing the number of mutated KRAS, CDKN2A, TP53, and SMAD4 genes using a targeted deep sequencing assay as a prognostic biomarker for pancreatic cancer. Pancreas. *46*:335-340.

Hiraoka, N., Yamazaki-Itoh, R., Kanai, Y., Kusuge, T., Shimada, K. (2015). Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. Br J Cancer. *112*:1782-1790.

Homma, Y., Taniguchi, K., Murakami, T., Nakagawa, K., Nakazawa, M., Matsuyama, R., Mori, R., Takeda, K., Ueda, M., Ichikawa, Y. et al. (2014). Immunological impact of neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Ann Surg Oncol. *21*:670-676.

Hughes, C.E., Benson, R.A., Bedaj, M., Maffia, P. (2016). Antigen-presenting cells and antigen presentation in tertiary lymphoid organs. Front Immunol. *7*:481.

Joshi, N.S., Akama-Garren, E.H., Lu, Y., Lee, D.Y., Chang, G.P., Li, A., DuPage, M., Tammela, T., Kerper, N.R., Farago, A.F. et al. (2015). Regulatory T Cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures suppress anti-tumor T Cell responses. Immunity. *43*:579-590.

Lutz, E.R., Wu, A.A., Bigelow, E., Sharma, R., Mo, G., Soares, K., Solt, S., Dorman, A., Wamwea, A., Yager, A. et al. (2014). Immunotherapy converts nonimmunogenic pancreatic tumors into immunogenic foci of immune regulation. Cancer Immunol Res *2*:616-631.

Martinet, L., Garrido, I., Filleron, T., Guellec, S.L., Bellard, E., Fournie, J.J., Rochaix, P., Girard, J.P. (2011). Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. Cancer Res. *71*:5678-5687.

Martinet, L., Garrido, I., Girard, J.P. (2012) . Tumor high endothelial venules (HEVs) predict lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast

cancer. Oncoimmunology. *1*:789-790.

McMullen, T.P.W., Lai, R., Dabbagh, L., Wallace, T.M., de Gara, C.J. (2010). Survival in rectal cancer is predicted by T cell infiltration of tumour-associated lymphoid nodules. Clin Exp Immunol. *161*:81-88.

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T. et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity. *41*:14-20.

Nielsen, J.S., Sahota, R.A., Milne, K., Kost, S.E., Nesslinger, N.J., Watson, P.H., Nelson, B.H. (2012). CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. Clin Cancer Res. *18*:3281-3292.

Pitzalis, C., Jones, G.W., Bombardieri, M., Jones, S.A. (2014). Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. Nat Rev Immunol. *14*:447-462.

Quail, D.F., Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med. *19*:1423-1437.

Ruddle, N.H. (2016). High endothelial venules and lymphatic vessels in tertiary lymphoid organs: characteristics, functions, and regulation. Front Immunol. *7*:491.

Sakimura, C., Tanaka, H., Okuno, T., Hiramatsu, S., Muguruma, K., Hirakawa, K., Wanibuchi, H., Ohira, M. (2017). B cells in tertiary lymphoid structures are associated with favorable prognosis in gastric cancer. J Surg Res. *215*:74-82.

Sato, D., Tsuchikawa, T., Mitsuhashi, T., Hatanaka, Y., Marukawa, K., Morooka, A., Nakamura, T., Shichinohe, T., Matsuno, Y., Hirano, S. (2016). Stromal palladin expression is an independent prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. PLoS One *11*:e0152523.

Sautes-Fridman, C., Lawand, M., Gilardo, N.A., Kaplon, H., Germain, C., Fridman, W.H., Dieu-Nosjean, M.C. (2016). Tertiary lymphoid structures in cancers: Prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention. Front Immunol. *7*:407.

Siegel, R., Miller, K.D., Jemal, A. (2016). Cancer statistics 2016. CA Cancer J Clin *66*:7-30.

Sobin, L., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C. (2011). TNM Classification of Malignant Tumors, 7th Ed. USA: Wiley-Blackwell.

Tsuchikawa, T., Hirano, S., Tanaka, E., Matsumoto, J., Kato, K., Nakamura, T., Ebihara, Y., Shichinohe, T. (2013). Novel aspects of preoperative chemoradiation therapy improving anti-tumor immunity in pancreatic cancer. Cancer Sci. *104*:531-535.

Tzeng, C.W., Balachandran, A., Ahmad, M., Lee, J.E., Krishnan, S., Wang, H., Crane, C.H., Wolff, R.A., Varadhachary, G.R., Pisters, P.W. et al. (2014). Serum carbohydrate antigen 19-9 represents a marker of response to neoadjuvant therapy in patients with borderline resectable pancreatic cancer. HPB. May *16*: 430-438.

Van de Pavert, S.A., Mebius, R.E. (2010). New insights into the development of lymphoid tissues. Nat Rev Immunol. *10*:664-674.