

博士論文

膵癌患者の免疫モニタリング  
及び予後予測バイオマーカーの検討

星川 真有美

# 目次

略語一覧	3
要旨	4
<b>第1章：背景</b>	<b>5</b>
<第1節：膵癌について>	5
第1項 疫学	
第2項 治療	
第3項 膵癌術後補助化学療法	
第4項 膵癌に対する免疫療法の導入	
第5項 本研究の意義、目的	
<b>第2章：方法</b>	<b>9</b>
<第1節：対象患者>	9
第1項 選択基準	
第2項 除外基準	
第3項 被験者に説明し同意を得る方法	
<第2節：試験の方法>	11
第1項 試験の種類・デザイン	
第2項 試験のアウトライン	
第3項 被験者の試験参加予定期間	
第4項 併用薬、併用療法に関する規定	
第5項 中止基準	
第6項 被験者の人権及び安全性・不利益に対する配慮	
<第3節：統計解析>	13
第1項 統計解析	
<第4節：末梢血 PBMC 及びサイトカイン解析の実験手法>	14
第1項 実験方法	
<第5節：腫瘍局所環境評価の実験手法>	20
第1項 RNA シーケンスとデータ解析	
第2項 腫瘍浸潤リンパ球の定量化 (In silico)	
第3項 GSEA(Gene set enrichment analysis)法	

## **第3章：結果** **24**

＜第1節：患者背景＞ 24

＜第2節：術前後の比較＞ 27

第1項 PBMC

第2項 サイトカイン・ケモカイン・増殖因子

＜第3節：予後因子の検討＞ 33

第1項 PBMC

第2項 サイトカイン・ケモカイン・増殖因子

＜第4節：腫瘍局所環境の評価＞ 45

第1項 腫瘍浸潤リンパ球評価

第2項 遺伝子発現解析

## **第4章：考察** **50**

＜第1節：研究の概要＞ 50

＜第2節：研究結果に対する考察＞ 51

第1項 膵癌の予後規定因子

第2項 末梢血解析結果について

第3項 免疫抑制環境について

第4項 腫瘍局所環境の解析結果について

＜第3節：本研究の制限＞ 64

＜第4節：今後の展望と総括＞ 66

第1項 これまでの膵癌免疫療法

第2項 GEM 化学療法と免疫細胞（活性化自己 $\gamma$   $\delta$  T細胞）治療の併用による膵癌術後補助療法

第3項 これからの膵癌免疫療法

第4項 総括

引用文献 71

本研究の公表について 82

謝辞 83

## 略語一覧

PBMC; peripheral blood mononuclear cell 末梢血単核細胞

Treg; regulatory T cell 制御性 T 細胞

eTreg; effector regulatory T cell エフェクター制御性 T 細胞

nTreg; naïve regulatory T cell ナイーブ制御性 T 細胞

GEM; Gemcitabine ゲムシタビン

RFS; relapse-free survival 無再発生存期間

GSEA; gene set enrichment analysis

## 要旨

膵癌患者での膵切除術前後の末梢血を採取し、免疫関連細胞や分子を測定した。また、次世代シーケンサーを用いて膵癌組織内の遺伝子発現を解析し、腫瘍局所の免疫環境を評価した。

術後に末梢血中のT細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、制御性T細胞(Treg)の割合が減少し、IP-10が上昇した。予後良好群では術前後のNK細胞割合が高値であり、予後不良群では術後の単球割合が高値であった。腫瘍局所では予後良好群でNK細胞浸潤が多い傾向を認め、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 関連遺伝子の発現が亢進していた。

膵癌に対する腫瘍免疫には、T細胞による獲得免疫より、NK細胞による自然免疫が強く関連する可能性が示された。

# 第1章：背景

## <第1節 膵癌について>

### ●第1項 疫学●

膵癌は、進行が早く、近年の画像検査等の診断技術・治療技術の発展にもかかわらず、早期発見が困難とされ、最も難治性の高い癌の一つに挙げられる。症例の約80%は、診断時には既に治癒切除不能な進行癌であり[1]、本邦での膵癌による死亡患者数は、2015年には約31,900人とされ、これは癌による死因の約8.6%に当たり、肺癌、大腸癌、胃癌に次いで第4位に位置する[2]。膵臓は身体のほぼ中心に位置し多くの臓器に囲まれているため画像診断による確定が難しいこと、初期の段階では膵癌は特徴的な症状を示さず、初発症状は漠然とした腹痛や腰背部痛などの疼痛や食欲不振、体重減少が多いため、早期発見が難しく、予後は極めて不良であり、5年生存率は約5～8%程度と推定されている[3]。

### ●第2項 治療●

膵癌の治療法は主なものとして手術、化学療法、放射線療法があり、進行度と全身状態に応じて決定される。手術は、遠隔転移を認めず原発巣を完全に切除できる場合に施行される。手術による膵癌の治療は、現在、治癒及び長期生存が期待できる唯一の治療法とされているが、手術が行われても術後早期に再発、転移する症例が多く、

術後の5年生存率は一般的には20%程度とされており、他の癌種に比してもその予後は不良である[4]。

### ●第3項 膵癌術後補助化学療法●

膵癌の予後は、治癒切除(R0 resection)が行われた場合でも術後5年生存率約20～25%ときわめて不良であり、再発抑制のための術後補助療法が強く求められてきた。1980年代以降、5FUを中心とした補助療法が試みられてきたものの、十分な成果は得られなかった。1997年Burrissらが切除不能膵癌に対するGemcitabine (GEM)の化学療法が5FUと比較し有意に予後、症状を改善したとの報告を行って以来、同剤が非切除膵癌治療の第一選択となった。同時に、術後補助化学療法としてのGEMの効果を評価する試験も試みられ、2007年1月に発表されたRCTでは、有意な再発抑制効果が認められており、GEMによる補助療法が標準治療として位置づけられてきた[5, 6]。

その後、日本の膵癌補助化学療法研究グループ(JASPAC)は、膵癌切除後の補助化学療法におけるGEMとS-1単独療法の第Ⅲ相比較試験(JASPAC01)を行い、S-1がGEMに比べて、膵癌切除後の全生存及び無再発生存を有意に延長させることを報告した[7]。これにより現在の術後補助化学療法の第一選択薬はS-1となっているが、消化器癌に対する侵襲の大きな手術後、下痢や経口摂取不良を呈する症例も少なくなく、その場合には薬剤の特徴からS-1内服継続は困難である。

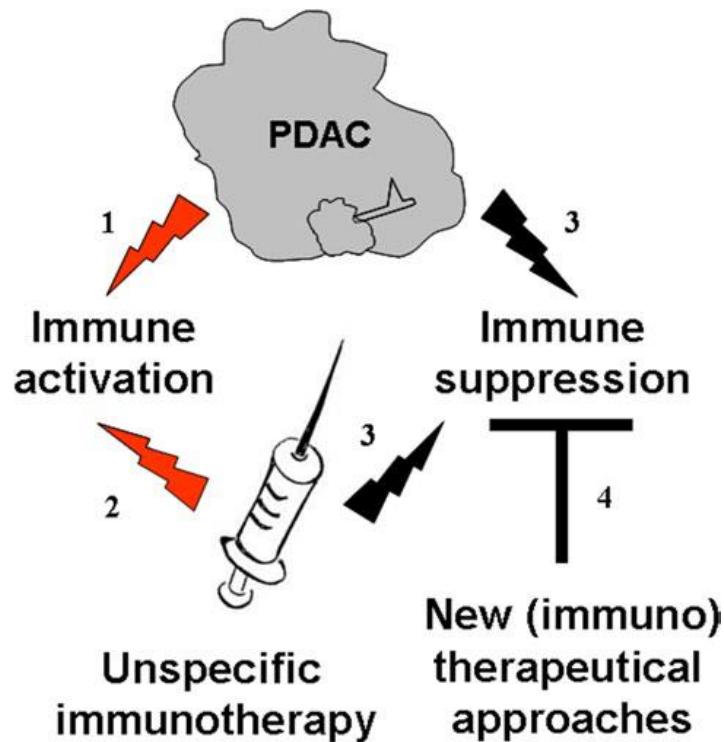
また、近年FOLFIRINOXという新規化学療法レジメンが、GEMに比較し有意に予後

を改善したという報告がなされた。FOLFIRINOXとはoxaliplatin, irinotecan, leucovorin, 5FUの投与から成る化学療法である。しかし、この臨床試験では有害事象も多く認め、全身状態の良い症例でしかこの治療を行うことができなかった[8]。従って、術後の予後を予測するバイオマーカーを確立し、予後に応じた治療戦略の選択を可能にするこ  
とで、患者のリスクとベネフィットに応じた最適の治療選択を可能にすることが求め  
られている。また、膵癌のさらなる予後改善のためには、化学療法のみならず、新し  
い治療法の探索が強く望まれているのが現状である。

#### ●第4項 膵癌に対する免疫療法の導入●

近年、膵癌はその免疫学的動態について着目されるようになってきている。膵癌は一般的な癌種と同様に、宿主の抗腫瘍免疫反応を惹起すると共に、これに抑制的に働  
く免疫システムを同時に誘導すると報告されている[9]。しかしながら、悪性黒色腫や  
肺癌で著名な効果を得ることができたチェックポイント阻害剤が、膵癌では効果が得  
られなかったとの報告がある[10]。従って、腫瘍反応性T細胞の誘導あるいは養子免疫、  
腫瘍特異的抗原に対する癌ワクチン、免疫制御に関わる分子や免疫抑制細胞に対する  
分子標的薬との併用など、抗腫瘍免疫を活性化させる治療法の開発が求められている。





<図1> 膵癌の免疫抑制システム[9]

## ●第5項 本研究の意義、目的●

そこで、当科の膵癌患者において、免疫状態を検討することとした。膵癌に罹患していることによる免疫状態への影響のみならず、膵切除術という侵襲の大きな手術かつ根治切除により、免疫状態が変動する可能性も検討するため、術前と術後の血液サンプルを用いて免疫系の変化を解析した。また、摘出標本から腫瘍組織の一部を採取し、膵癌の腫瘍局所環境を免疫学的に評価した。これらにより、膵癌に特異的な病態解明に加え、予後を予測するバイオマーカーが同定できれば、術後補助療法選択の判断材料や新規治療法開発の契機となる可能性があり、治療成績の向上にもつながる事が期待された。

## 第2章：方法

※本研究は、研究課題『膵癌術後補助療法の治療効果・予後予測免疫バイオマーカーの同定』(3810)として研究倫理審査委員会で2012年7月4日承認を得たものであり、そこで明示した方法に則って施行した。

### <第1節 対象患者>

#### ●第1項 選択基準●

- a. 膵癌に対する切除治療を予定する患者。
- b. 20歳以上
- c. ECOGのPerformance Status(PS)が0-1の患者。
- d. 説明文書により、本人から研究参加への同意が得られている患者。

#### ●第2項 除外基準●

- a. 副腎ステロイドまたは免疫抑制剤の長期投与を受けている患者。
- b. 治療終了3年以内の別の原発性悪性腫瘍の既往歴を有する患者。
- c. その他、担当医師が本研究の対象患者として不適當であると認めた患者。

### ●第3項 被験者に説明し同意を得る方法●

倫理委員会で承認の得られた同意説明文書を患者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、患者の自由意思による同意を文書で得る。

患者の同意に影響を及ぼすと考えられる有効性や安全性等の情報が得られたときや、患者の同意に影響を及ぼすような実施計画等の変更が行われるときは、速やかに患者に情報提供し、研究等に参加するか否かについて患者の意思を確認するとともに、倫理委員会の承認を得て同意説明文書等の改訂を行い、患者の再同意を得る。

患者選択基準にあるように本人から同意を得ることがこの研究に必須のため、代諾者から同意を得ることはない。

## <第2節 試験の方法>

### ●第1項 試験の種類・デザイン●

非対照探索的観察研究である。前向き研究であり、単一施設にて行った。

### ●第2項 試験のアウトライン●

説明、同意取得 ⇒ 登録 ⇒ 採血（術前1週間～術当日）

⇒ 手術、組織採取⇒採血（術後4週間～6週間頃）

### ●第3項 被験者の試験参加予定期間●

手術から5年間

### ●第4項 併用薬、併用療法に関する規定●

禁止薬、療法：

副腎皮質ホルモン剤（デキサメタゾン、プレドニゾロン等）、サイトカイン製剤

を含む抗悪性腫瘍剤（膀胱癌術後補助療法目的の薬剤を除く）、及び未承認薬（開

発中の治験薬、海外での開発品等）

併用制限・注意・可能薬（療法）：

特になし。ただし、担当医師の判断により併用を制限することは可とする。

## ●第5項 中止基準●

担当医師は何らかの理由で研究継続が不可能と判断した場合には、研究を中止する。

以下の項目に該当する理由が発生した場合は、研究参加を中止する。

- ✓ 患者の不来院により研究継続が不可能な場合
- ✓ 患者が死亡した場合
- ✓ 患者あるいは代諾者から本研究への参加を撤回する申し出があった場合
- ✓ その他、担当医師が本研究参加の継続が困難と判断した場合

## ●第6項 被験者の人権及び安全性・不利益に対する配慮●

<人権への配慮（個人情報保護）> 研究実施にかかわる生データ類および同意書を取り扱う際には、被験者の秘密保護に十分配慮するとともに、被験者識別コード等を用いて連結可能匿名化を行う。また、研究結果を公表する際には、被験者を特定できる情報を含まないようにする。さらに、研究の目的以外に、研究で得られた被験者のデータを使用しない。

<安全性・不利益への配慮> 有害事象発生時の対処：速やかに適切な診察と処置を行う。市販後医薬品による保険適応範囲内での臨床研究である。

## <第3節 統計解析>

### ●第1項 統計解析●

サンプルから得たデータは、2群間の比較にあたり、連続変数に対してはWilcoxon検定を、名義変数に対してはFisher正確検定を用いた。生存曲線はKaplan-Meier法で描出し、log-rank検定で評価した。統計解析ソフトはJMP v12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。両側検定でP値<0.05の場合に、統計学的有意差有りと判定した。

## <第4節 末梢血PBMC及びサイトカイン解析の実験手法>

### ●第1項 実験方法●

術前（手術1週間前～術当日朝）、術後（術後4週間～6週間頃）、末梢血約20mLずつを採取した。術後採血は、全ての症例で術後補助療法（GEMやS-1、他免疫療法等）が開始される前に行った。血球分離溶液(Lymphoprep™) (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway)を用いてPBMC及び血漿を分離採取<図2>、PBMCは細胞凍結保存液(Bambanker™) (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan)<図3>に懸濁した後、アッセイ実施時まで液体窒素の細胞凍結保管容器内で凍結保存しておいた。

実験を行う際に、凍結保存したPBMCを、核酸分解酵素(Benzonase™) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)を50 IU/mL含んだRPMI中で融解し、Beckman Coulter (Marseille, France), BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ), BioLegend (San Diego, CA), R&D systems (Minneapolis, Minnesota), Enzo Life Sciences, (Farmingdale, NY)から入手した、ヒト特異的抗体で染色を行った。抗体一覧は<表1>に示す。FITC標識のIgG1 $\kappa$ , anti-CD3, TCR V $\gamma$ 9、PE標識のanti-CD19, CD56, TCR Pan alpha/beta、ECD標識の anti-CD45RA 各抗体は Beckman Coulterより購入した。 FITC標識のanti-CD4はBD Pharmingenより購入した。 FITC標識のanti-PD-1、PE標識のIgG1 $\kappa$ , anti-CD25, PD-1, Tim-3、PerCP Cy5.5標識の anti-CD3, APC標識のanti-CD4, CD45、Alexa Fluor® 488標識のIgG1 $\kappa$ , anti-FoxP3, Pacific Blue標識のanti-CD4, CD8, CD14, CD45、Alexa Fluor® 647標識のanti-CD3はBioLegendより購入した。 Alexa Fluor® 488標識のanti-Tim-3, PE-labeled anti-LAG3はR&D systems

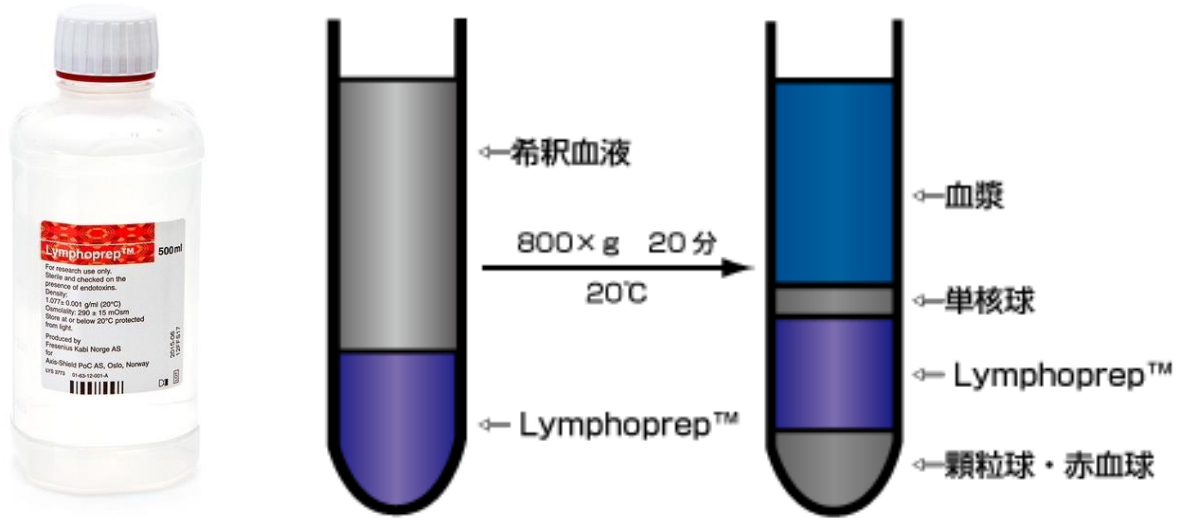
より購入した。FITC標識のanti-LAG3はEnzo Life Sciencesより購入した。解析時に死細胞を除くため、サンプルは7-AAD Viability Dye (Beckman Coulter)あるいはFixable Viability Dye eFluor® 780 (eBioscience, San Diego, CA)で染色した。

これをフローサイトメーターGallios™ (Beckman Coulter)〈図4〉にて測定し、解析ソフトKaluz software™ (Beckman Coulter)を用いて解析を行った。〈図5〉

末梢血中PBMCの分画について、各表面マーカーは、単球 (CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>)、B細胞 (CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>)、T細胞(CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>)、CD4陽性細胞(CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>)、CD8陽性細胞(CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)、 $\gamma\delta$ T細胞 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>V $\gamma$ 9<sup>+</sup>)、NK細胞 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>)、effector Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>high</sup>)、Naïve Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup>) の分画を測定した〈表2〉。また、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞上に発現する免疫チェックポイント分子(PD-1, Tim-3, LAG3)の発現も測定、解析した。

また、サイトカインについては、凍結保存しておいた血漿を融解し、Bio-Plex Pro ヒトサイトカインGI27-plex (Bio-rad)〈図6〉を用いて測定した。





<図2> 血球分離溶液(Lymphoprep™)を用いたPBMC及び血漿の分離



<図3> 細胞凍結保存液(Bambanker™)

<表1> フローサイトメーター用染色抗体一覧

抗体		
抗原名-蛍光色素	メーカー	クローン
CD3-FITC	Beckman Coulter	UCHT1
Vy 9-FITC	Beckman Coulter	IMMU 360
CD19-PE	Beckman Coulter	J3-119
CD56-PE	Beckman Coulter	NKH-1
TCR $\alpha$ $\beta$ -PE	Beckman Coulter	IP26A
CD45RA-ECD	Beckman Coulter	2H4LDH11LDB9
CD4-FITC	BD Pharmingen	RPA-T4
PD-1-FITC	Biolegend	EH12.2H7
FoxP3-Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Biolegend	259D
IgG1-Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Biolegend	MOPC-21
CD25-PE	Biolegend	BC96
PD-1-PE	Biolegend	EH12.2H7
Tim-3-PE	Biolegend	F38-2E2
CD3-PerCP Cy5.5	Biolegend	HIT3a
CD4-APC	Biolegend	RPA-T4
CD45-APC	Biolegend	HI30
CD3-Alexa Fluor <sup>®</sup> 647	Biolegend	HIT3a
CD4-Pacific blue	Biolegend	RPA-T4
CD14-Pacific blue	Biolegend	M5E2
CD45-Pacific blue	Biolegend	HI30
CD8- Pacific blue	Biolegend	HIT8a
Tim-3-Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	R&D Systems	344823
LAG3-PE	R&D Systems	Polyclonal Goat IgG
LAG3-FITC	Enzo Life science	17B4

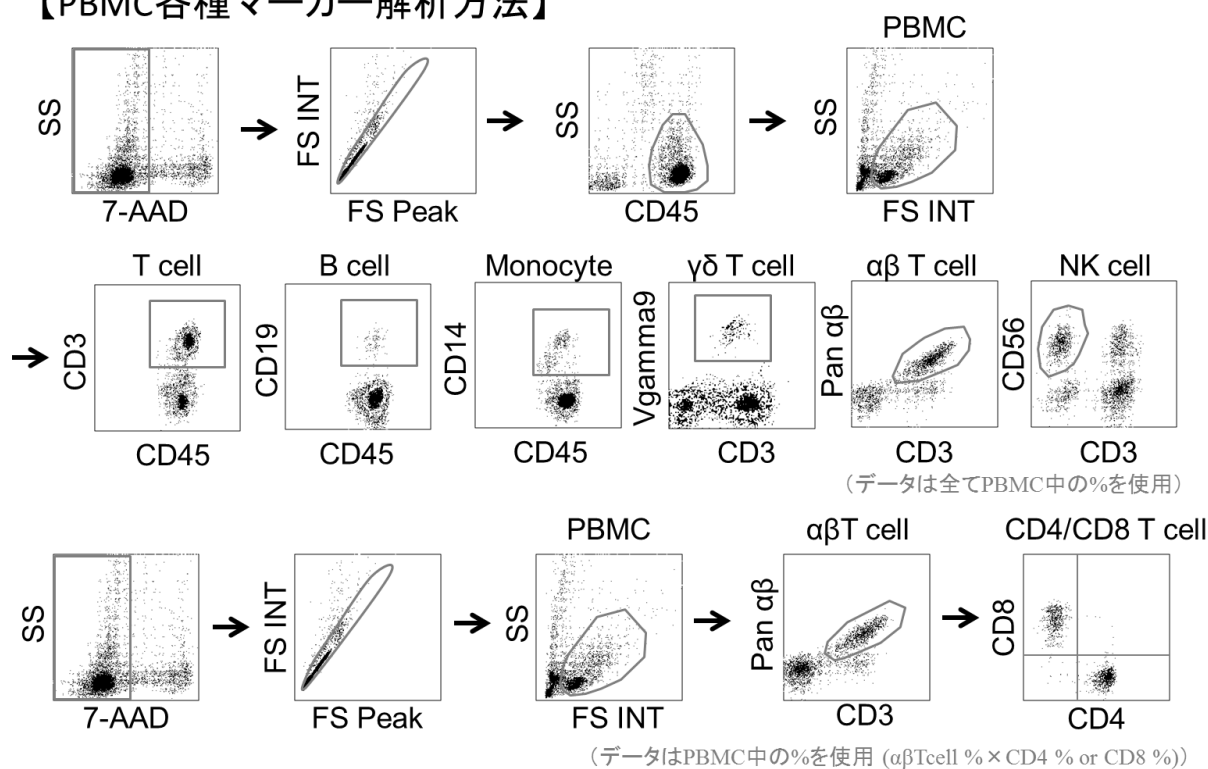


<図4> フローサイトメーターGallios<sup>™</sup> (Beckman Coulter)

<表2> 細胞表面マーカー一覧

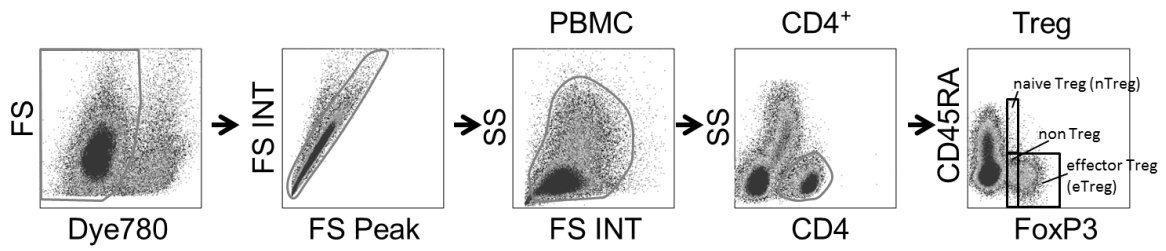
		細胞表面マーカー
PBMC	Monocyte	CD45 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>
	B cell	CD45 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>
	T cell	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>
	CD4T	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>
	CD8T	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>
	γδT	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> Vγ9 <sup>+</sup>
	NK	CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>
	eTreg	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> FOXP3 <sup>high</sup>
	nTreg	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> FOXP3 <sup>low</sup>

【PBMC各種マーカー解析方法】



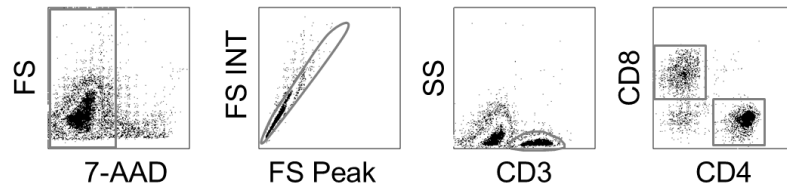
<図5> 解析ソフト Kaluza software™ (Beckman Coulter)を用いた解析

【Treg解析方法】

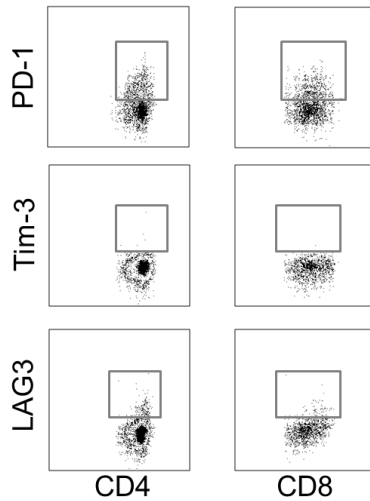


(データはPBMC中の%を使用 (CD4 % × 各Treg %))

【CD4/8 T cellチェックポイント分子解析方法】



CD4/8 checkpoint molecules



(データはPBMC中のCD4/8 Tcell中の%を使用)

<図 5> (続き) 解析ソフト Kaluza software™ (Beckman Coulter)を用いた解析



<図 6> Bio-Plex Pro ヒトサイトカイン GI27-plex (Bio-rad)

## <第5節 腫瘍局所環境評価の実験手法>

### ●第1項 RNAシーケンスとデータ解析●

腫切除手術中、標本摘出直後に腫瘍組織を採取し、5mm以下の切片にカット、速やかにRNA安定化試薬 RNA later® (Qiagen, Hilden, Germany) <図7> を用いて保存した。2°C~8°Cの冷蔵庫で1~3日間浸透させた後、-80°Cの冷凍庫で保存した。こうして保存した検体から、AllPrep DNA/RNA Mini Kit <図8>、あるいはAllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kits (Qiagen)を用いてtotal RNAサンプルを精製した。RNA精製が不十分な症例は、解析から除外した。



<図7> RNA later® (Qiagen, Hilden, Germany)



<図8> AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen)

各100ngのTotal RNAサンプルは、かずさDNA研究所（千葉県木更津市）またはBGI JAPAN 株式会社（兵庫県神戸市）に送付され、次世代シーケンサーによるRNA-Seq解析を実施した。概要を述べると、total RNAからpoly-A selection法によってmRNAライブラリーが調製された後、断片化、ランダムプライマーを用いたcDNA合成の後にインデックス配列の付加等が行われ、シーケンスライブラリーが調整された。シーケンスライブラリーは、HiSeq 1500 または HiSeq 4000 (Illumina, San Diego, CA)の次世代シーケンサーを用いて、50bpシングルリード法 (PK001、PK004、PK005)または100bpペアエンド法 (PK009、PK011、PK013、PK015、PK017、PK018、PK022、PK024、PK025、PK029、PK030、PK045、PK055、PK065)によってシーケンスされた。

Fastq形式で得られたシーケンスリードデータを、hg19を参照配列として解析ソフトウェアTophat (v2.1.1)を用いてマッピングした。マッピングされた平均総リード数は99.9M (50bpシングルエンド症例) および60.1M (100bpペアエンド症例) であった。発現量は、解析ソフトウェアCufflinks (v2.2.1)を用いてfragments per kilobase of transcript per million fragments mapped (FPKM)の単位で定量化した。[11, 12]

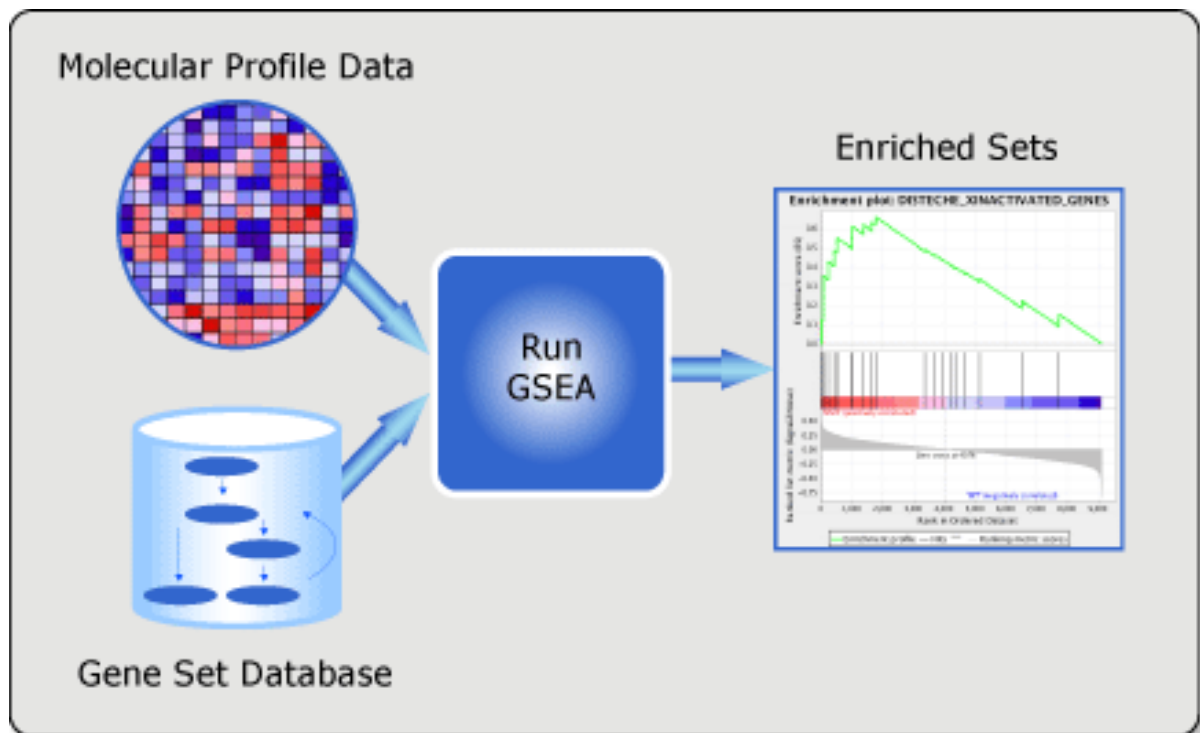
## ●第2項 腫瘍浸潤リンパ球の定量化 (in silico) ●

解析ソフトウェアMCP-counterを用いて、腫瘍浸潤リンパ球を定量化し比較した[13]。このソフトウェアでは、各組織サンプルにおけるT cells、CD8<sup>+</sup> T cells、cytotoxic lymphocytes、NK cells、B lymphocytes、monocytic lineage cells、myeloid dendritic cells、

neutrophils、endothelial cellsとfibroblastsの多寡を、遺伝子発現データから予測しスコア化することが可能であり、得られたスコアを用いて、腫瘍浸潤リンパ球と予後の関連性について検討した。

### ●第3項 GSEA (Gene set enrichment analysis)法●

GSEA法は、網羅的遺伝子発現データを用いて、特定の遺伝子群(Gene set)が、比較する2群間で発現変動しているか評価する解析手法である[14, 15, 16]<図9>。まず、各群において発現変動の大きい遺伝子から順に全遺伝子が並び替えられ、ranked-gene listが作成される。続いて、解析対照のgene setに含まれる遺伝子が、ranked-gene listの中で上位または下位に偏在するかどうかenrichment scoreを与えることで定量化する。ランダムにスコア計算を行う場合と比較することで、スコアが得られる確率の偶然性を計算し、enrichment scoreのfalse discovery rate (q value)を算出する。本解析にはソフトウェアGSEA GenePattern module (v17)を使用した。解析パラメーターはpermutation type: gene\_set とした以外は初期設定を用いた。解析するgene set は、米国Broad研究所の提供するHallmark gene sets (MSigDB v5.1)を用いた[17]。



<图9> GSEA法



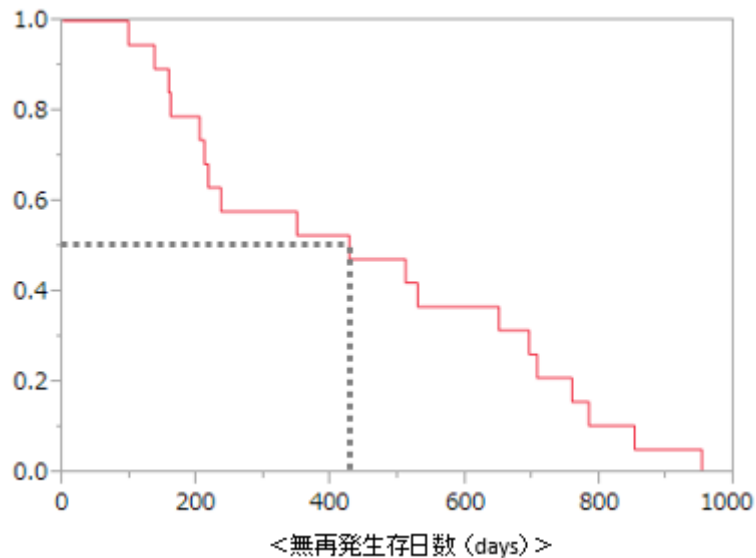
## 第3章：結果

### <第1節 患者背景>

2012年8月から2013年12月まで当科にて膵切除術を施行した症例の内、前術の条件を満たし、術後病理診断で浸潤性膵管癌と診断された、計19症例を対象とした。男性14人(74%)、女性5人(26%)であり、年齢は44～80歳（中央値70歳）であった。また、術式は膵頭十二指腸切除術 9症例(47%)、膵体尾部切除術 9症例(47%)、膵全摘 1症例(6%)であり、術後病理診断での膵癌病期は、Stage III 9例(47%)、Stage IVa 10例(53%)であった。術後補助療法の内訳は、GEM単剤投与 3例(16%)、GEM+ $\gamma\delta$ Tcell免疫療法 6例(32%)、S-1内服 10症例(53%)であった。予後確認は2016年9月に行い、全症例で再発を認め、手術日からの無再発生存期間(Relapse-Free Survival: RFS)は97日～951日（中央値426日）であった。<表3><図10>

<表3> 対象症例の患者背景

項目	免疫モニタリング (n=19)
性別	男性 14人：女性 5人
年齢	44～80歳（中央値 70歳）
術式（腫瘍局在）	膵頭十二指腸切除術：9例 膵体尾部切除術：9例 膵全摘術：1例
病期（pStage）	Stage III 9例、Stage IVa 10例
術後補助療法	GEM：3例 GEM+ $\gamma\delta$ Tcell免疫療法：6例 S-1：10例
手術からの無再発生存期間	97～951日（中央値 426日）



<図10> 対象症例の無再発生存曲線

予後を解析する際には、RFS 426日未満の早期に再発した症例を“**予後不良群**”、RFS 426日以上と再発の遅かった症例を“**予後良好群**”として解析を行った。各群の臨床的な内訳は<表4>の通りであり、各項目両群間で有意差は認めなかった。

予後不良群(n=9例)では、男性5人(56%)、女性4人(44%)であり、年齢は44～80歳（中央値69歳）であった。また、術式は膵頭十二指腸切除術 4例(44%)、膵体尾部切除術 4例(44%)、膵全摘 1例(11%)であり、術後病理診断での膵癌病期は、Stage III 4例(44%)、Stage IVa 5例(56%)であった。術後補助療法の内訳は、GEM単剤投与 1例(11%)、GEM + $\gamma\delta$ Tcell免疫療法 2例 (22%)、S-1内服 6例(67%)であった。手術日からのRFSは97日～348日（中央値203日）であった。

予後良好群(n=10例)では、男性9人(90%)、女性1人(10%)であり、年齢は62～80歳（中央値71歳）であった。また、術式は膵頭十二指腸切除術 5例(50%)、膵体尾部切除術

5例(50%)であり、術後病理診断での膵癌病期は、StageⅢ 5例(50%)、StageⅣa 5例(50%)であった。術後補助療法の内訳は、GEM単剤投与 2例(20%)、GEM+ $\gamma\delta$ Tcell免疫療法 4例(40%)、S-1内服 4例(40%)であった。手術日からのRFSは426日～951日（中央値694日）であった。なお、術後のフォローアップは3~6ヶ月ごとの外来受診で、腫瘍マーカー、CT等の画像検査により行われ、担当医が再発を判断した根拠となる検査施行日を、再発日とした。

<表4> 患者背景（予後不良群 vs 予後良好群）

項目	予後不良群 (n=9)	予後良好群 (n=10)	P値
性別	男性 5人：女性 4人	男性 9人：女性 1人	0.141
年齢	44～80歳（中央値 69歳）	62～80歳（中央値 71歳）	0.539
術式	膵頭十二指腸切除術：4例 膵体尾部切除術：4例 膵全摘術：1例	膵頭十二指腸切除術：5例 膵体尾部切除術：5例 膵全摘術：0例	1.000
病期	StageⅢ 4例、StageⅣa 5例	StageⅢ 5例、StageⅣa 5例	1.000
術後補助療法	GEM：1例 GEM+ $\gamma\delta$ Tcell免疫療法：2例 S-1：6例	GEM：2例 GEM+ $\gamma\delta$ Tcell免疫療法：4例 S-1：4例	0.577
RFS	97~348日（中央値 203日）	426~951日（中央値 694日）	

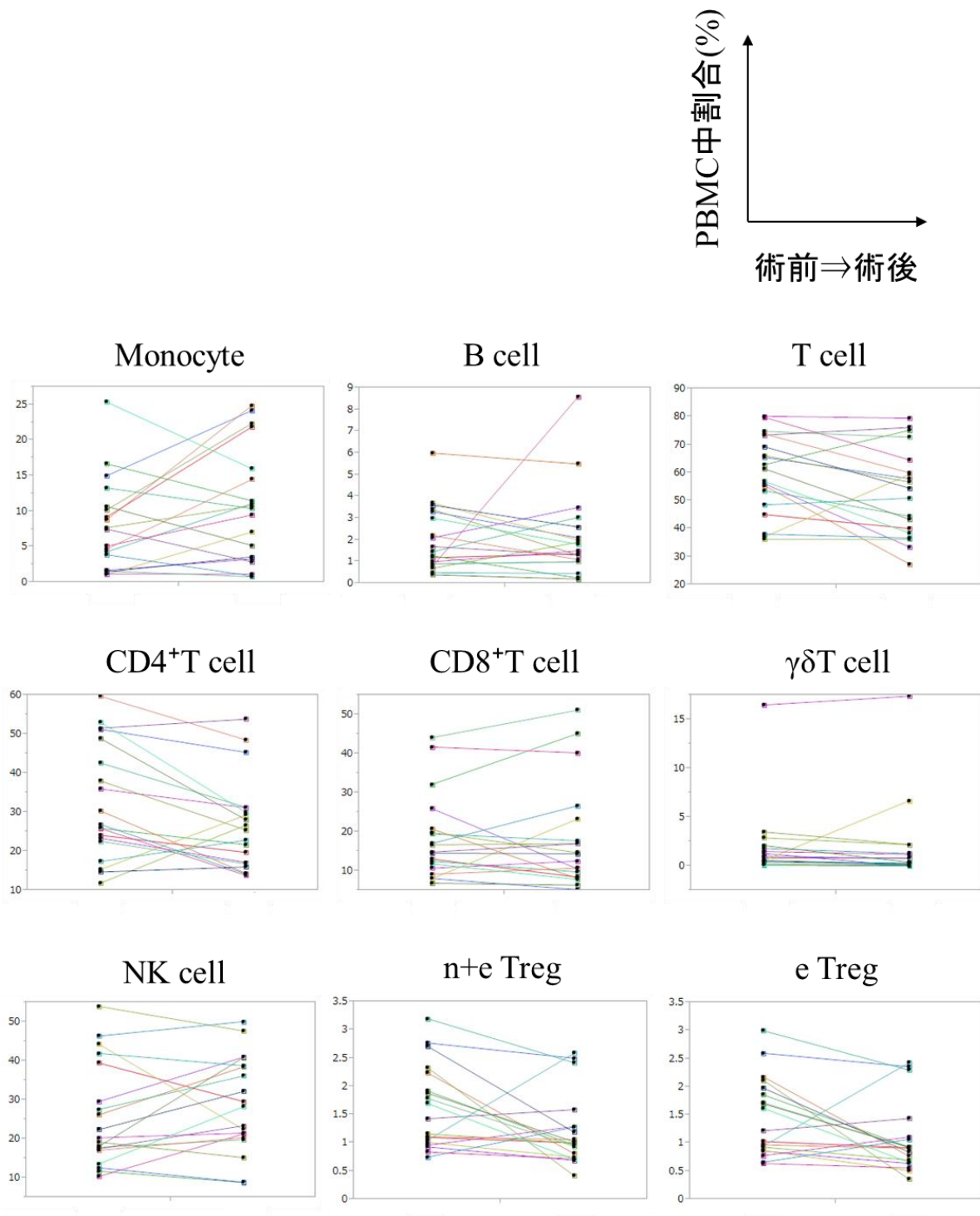
## <第2節 術前後の比較>

### ●第1項 PBMC●

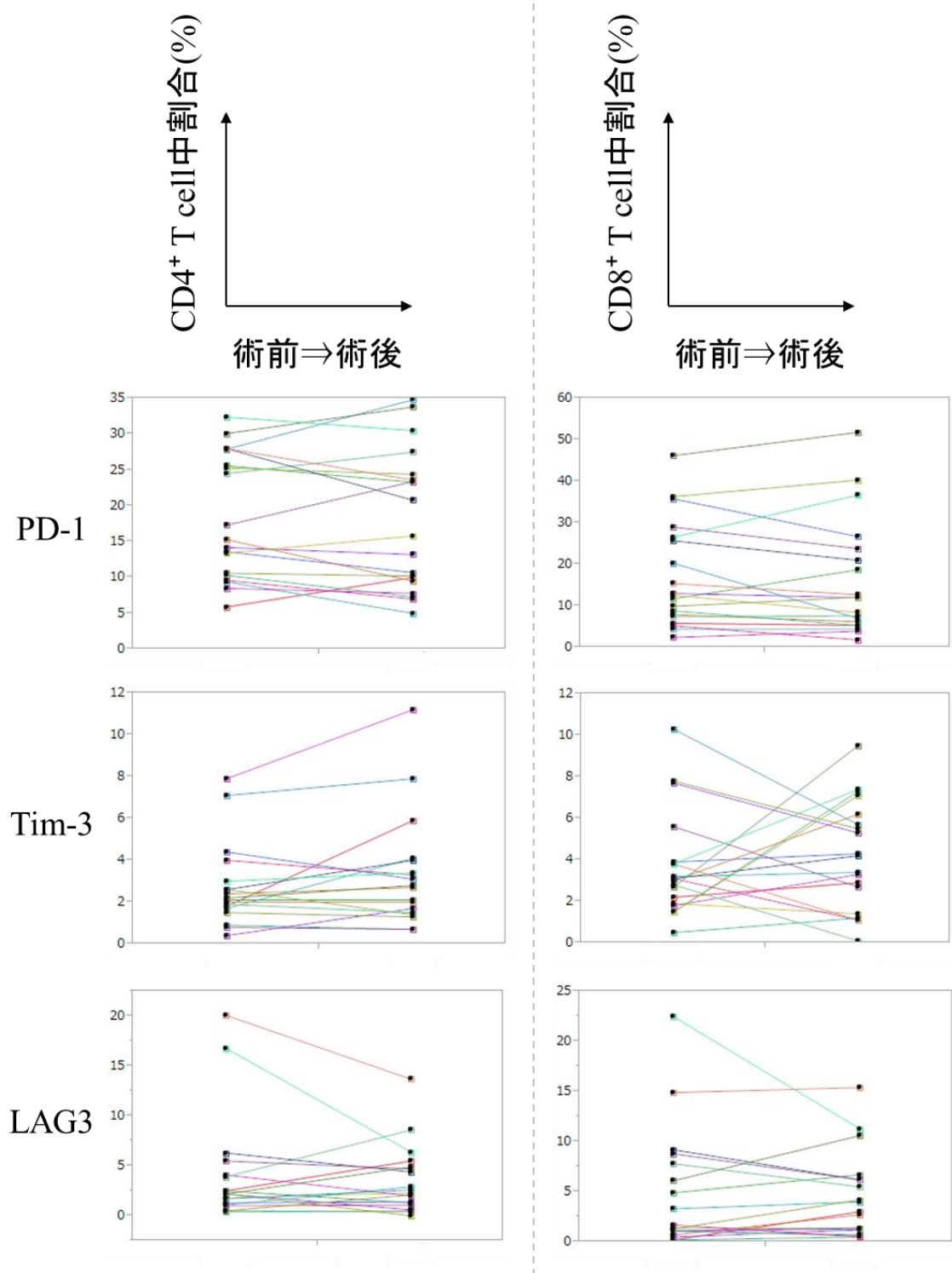
まず、手術による免疫状態への影響を検討するため、末梢血中の各細胞成分（単球 (monocyte)、B細胞(B cell)、T細胞(T cell)、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞、制御性T細胞(n+eTreg)、エフェクター制御性T細胞(eTreg))の末梢血中の割合、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞上に発現する免疫チェックポイント分子(PD-1, Tim-3, LAG3)の発現に関して、手術前後で比較した。結果は<表5><図11>に示した通りとなった。膵切除術後には、PBMC中T cell、CD4<sup>+</sup>T cell、及び $\gamma\delta$ T cell割合が有意に減少した(P=0.029, 0.021, 0.031)。また、n+eTreg及びeTreg割合も有意に減少した(P=0.030, 0.027)。他細胞分画は、術前後で有意な変化を示さなかった。

<表5> 末梢血PBMC中免疫細胞の術前後での変化

		術前	術後	P値
PBMC中の%	Monocyte (%)	7.9 ±6.4	10.6 ±8.1	0.14
	B cell (%)	2.0 ±1.4	2.1 ±0.8	0.55
	T cell (%)	59.7 ±14.1	53.1 ±15.8	<b>0.029</b>
	CD4T(%)	32.6 ±14.8	26.7 ±11.8	<b>0.021</b>
	CD8T(%)	18.3 ±10.8	18.3 ±13.5	0.99
	$\gamma\delta$ T (%)	1.8 ±3.7	1.8 ±4.1	<b>0.031</b>
	NK (%)	25.8 ±13.2	28.7 ±12.2	0.20
	n+eTreg (%)	1.6 ±0.74	1.2 ±0.63	<b>0.030</b>
	eTreg (%)	1.5 ±0.70	1.1 ±0.62	<b>0.027</b>
CD4 <sup>+</sup> 中の%	CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (%)	18.4 ±8.7	17.8 ±9.7	0.50
	CD4 <sup>+</sup> Tim-3 <sup>+</sup> (%)	2.7 ±2.0	3.3 ±2.6	0.17
	CD4 <sup>+</sup> LAG3 <sup>+</sup> (%)	4.0 ±5.4	3.4 ±3.4	0.79
CD8 <sup>+</sup> 中の%	CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (%)	17.1 ±12.7	16.1 ±14.1	0.44
	CD8 <sup>+</sup> Tim-3 <sup>+</sup> (%)	3.7 ±2.5	4.2 ±2.6	0.62
	CD8 <sup>+</sup> LAG3 <sup>+</sup> (%)	4.6 ±5.9	4.4 ±4.2	0.74



<図 11-1> 末梢血 PBMC 中免疫細胞の術前後での変化



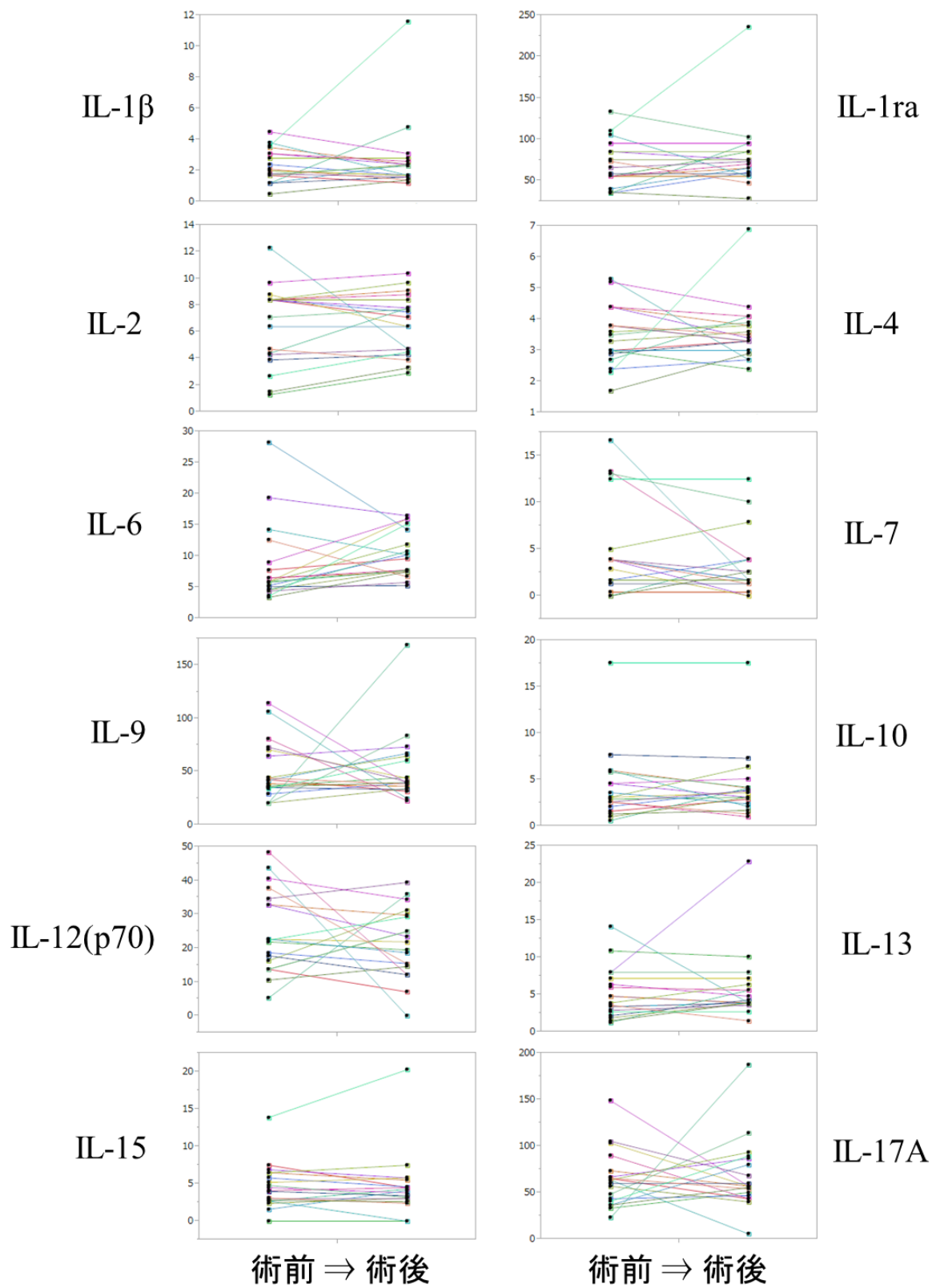
<図 11-2> 末梢血 T 細胞に発現する免疫チェックポイント分子の術前後での変化

## ●第2項 サイトカイン・ケモカイン・増殖因子●

次に、手術による免疫状態への影響を検討するため、手術前後の各サイトカインの変化を比較した。手術前後の血漿中のサイトカイン・ケモカイン・増殖因子（サイトカイン：IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 、ケモカイン：MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, IL-8, IP-10、増殖因子：GM-CSF, FGF basic, VEGF, PDGF-BB, G-CSF) を測定し比較検討した。〈表6〉〈図12〉に示す通りとなり、腭切除術後には、IP-10のみが有意に上昇した(P=0.012)。他サイトカインは、術前後で有意な変化を示さなかった。

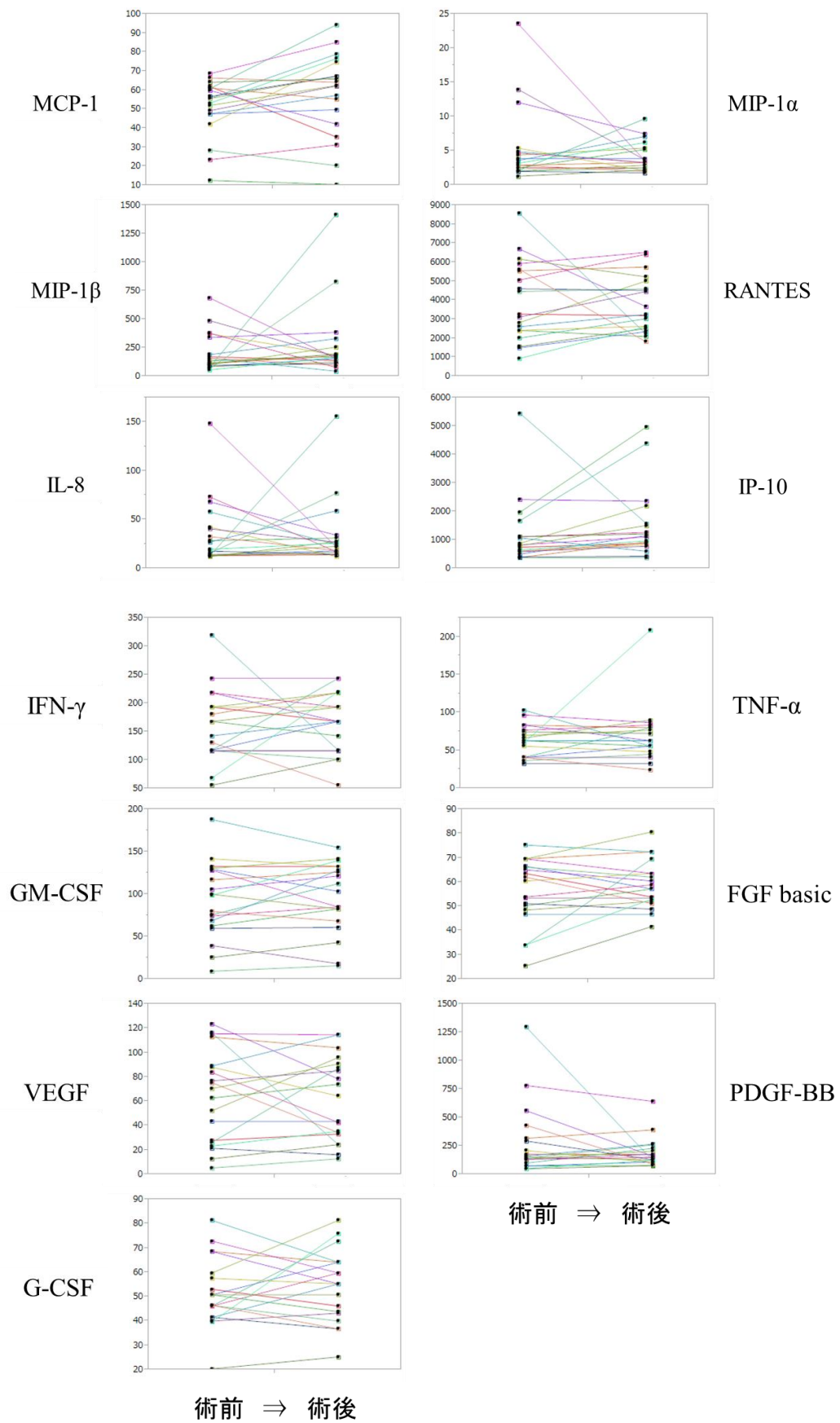
〈表6〉 血漿中サイトカイン・ケモカイン・増殖因子の術前後での変化

		術前	術後	P値
サイトカイン	IL-1 $\beta$	2.3 $\pm$ 1.1	2.7 $\pm$ 2.3	0.84
	IL1ra	69.2 $\pm$ 27.6	78.3 $\pm$ 42.4	0.47
	IL-2	6.6 $\pm$ 3.0	6.6 $\pm$ 2.3	0.57
	IL-4	3.5 $\pm$ 0.94	3.6 $\pm$ 0.96	0.73
	IL-6	8.4 $\pm$ 6.3	10.2 $\pm$ 3.7	0.07
	IL-7	4.8 $\pm$ 5.1	3.1 $\pm$ 3.4	0.13
	IL-9	50.3 $\pm$ 27.6	52.0 $\pm$ 33.0	0.92
	IL-10	4.2 $\pm$ 3.8	4.3 $\pm$ 3.6	0.91
	IL-12(p70)	24.8 $\pm$ 12.3	21.6 $\pm$ 10.4	0.91
	IL-13	5.1 $\pm$ 3.4	5.8 $\pm$ 4.6	0.44
	IL-15	4.6 $\pm$ 3.0	4.7 $\pm$ 4.2	0.79
	IL-17A	64.6 $\pm$ 30.4	68.0 $\pm$ 37.6	0.97
	IFN- $\gamma$	162.2 $\pm$ 63.7	165.9 $\pm$ 53.3	0.69
	TNF- $\alpha$	62.8 $\pm$ 20.6	69.9 $\pm$ 38.5	0.89
ケモカイン	MCP-1	50.9 $\pm$ 15.0	58.0 $\pm$ 22.0	0.066
	MIP-1 $\alpha$	5.3 $\pm$ 5.5	4.1 $\pm$ 2.2	0.79
	MIP-1 $\beta$	204.7 $\pm$ 171.5	274.4 $\pm$ 325.7	0.59
	RANTES	3970.2 $\pm$ 2091.5	3788.6 $\pm$ 1496.7	0.40
	IL-8	35.1 $\pm$ 33.7	33.4 $\pm$ 33.9	0.83
	IP-10	1169.8 $\pm$ 1177.0	1500.1 $\pm$ 1238.7	<b>0.012</b>
増殖因子	GM-CSF	93.1 $\pm$ 44.5	96.7 $\pm$ 41.5	0.67
	FGF basic	56.1 $\pm$ 13.9	58.9 $\pm$ 9.9	0.49
	VEGF	64.7 $\pm$ 38.1	62.0 $\pm$ 34.4	0.90
	PDGF-BB	278.7 $\pm$ 310.9	191.0 $\pm$ 134.7	0.83
	G-CSF	51.7 $\pm$ 14.1	54.3 $\pm$ 14.7	0.63



<図 12-1> 血漿中サイトカイン・ケモカイン・増殖因子の術前後での変化





<図 12-2> 血漿中サイトカイン・ケモカイン・増殖因子の術前後での変化

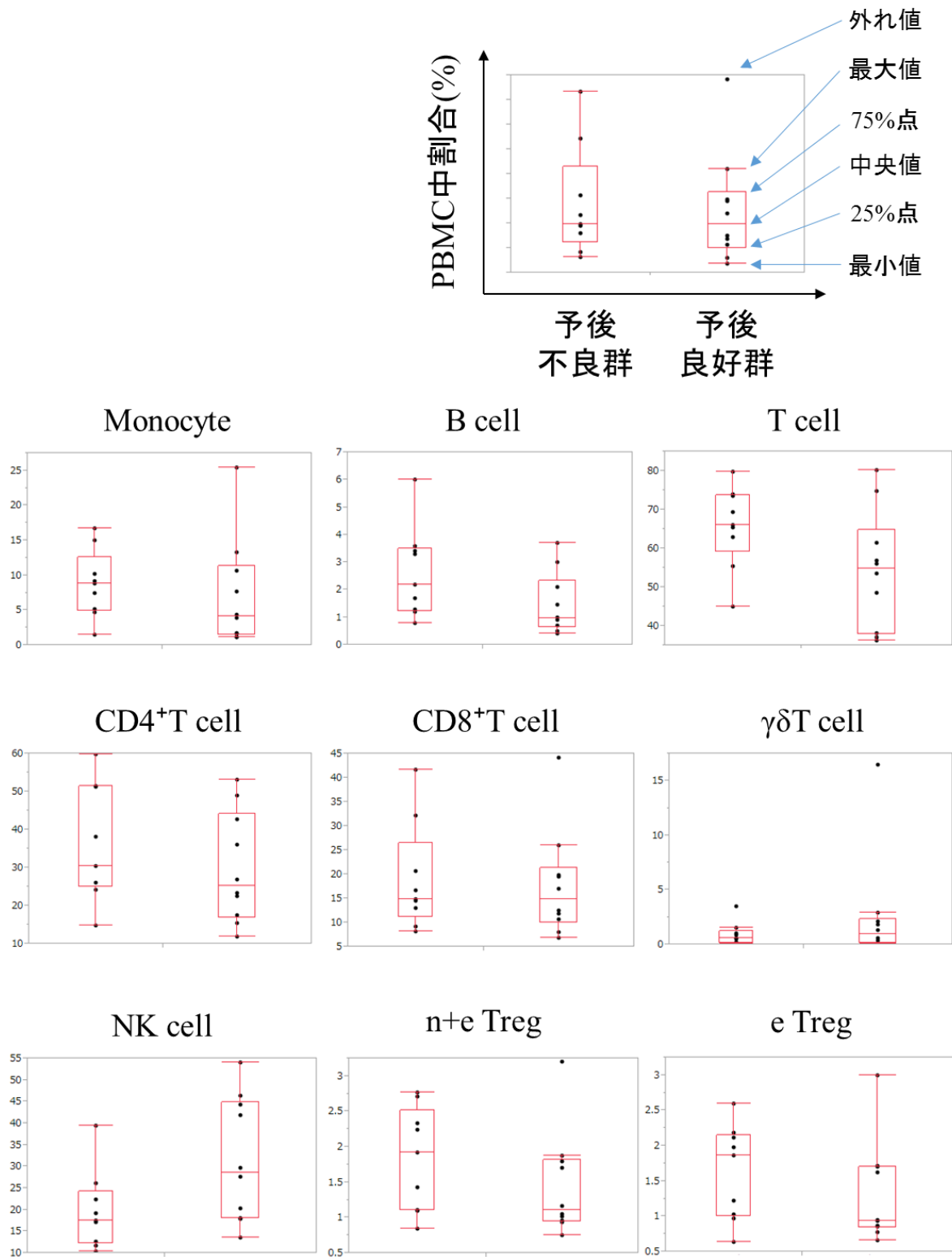
## <第3節 予後因子の検討>

### ●第1項 PBMC●

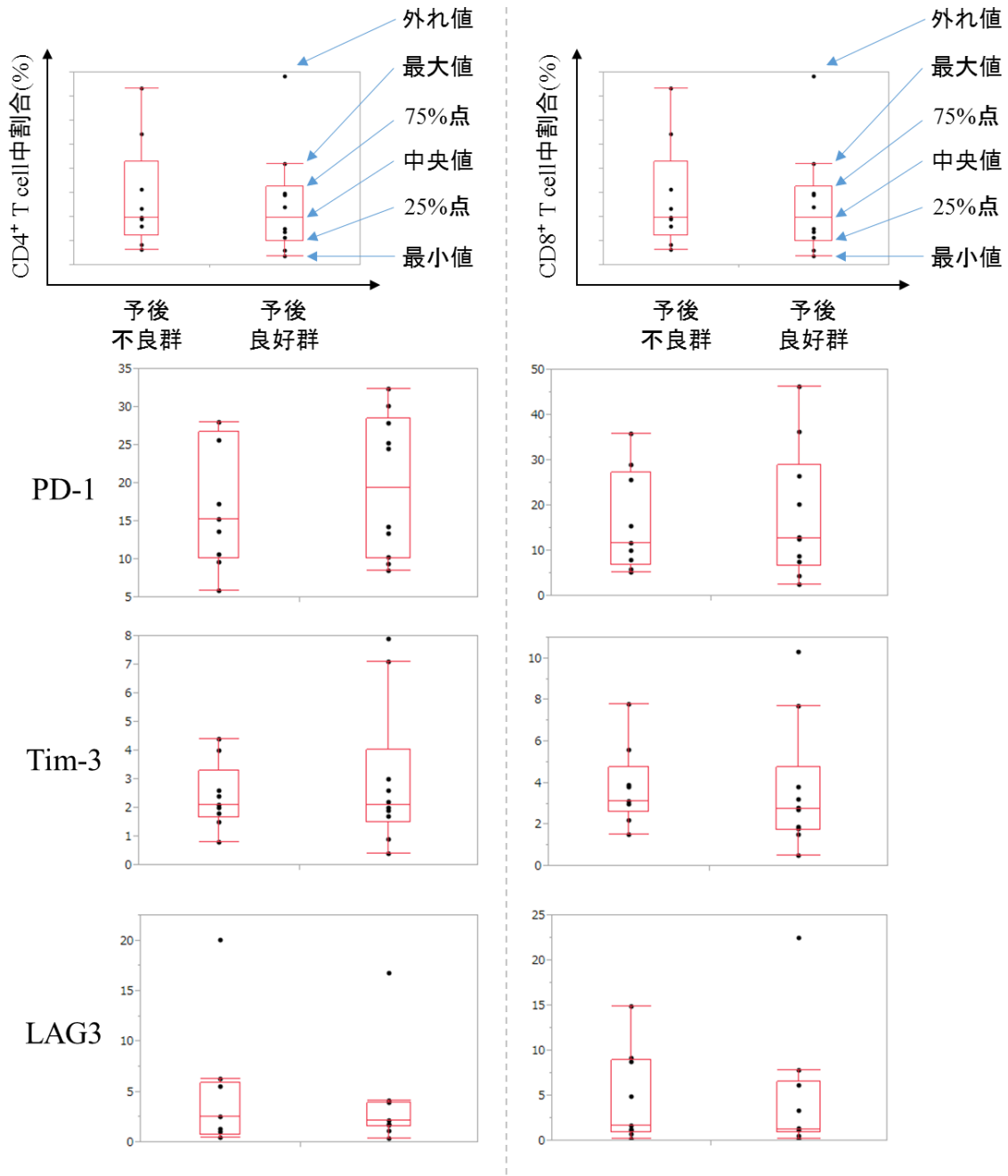
末梢血中の細胞成分と予後との相関を検討した。まず各細胞成分（単球、B細胞、T細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞、制御性T細胞(n+eTreg)、エフェクター制御性T細胞(eTreg))の末梢血中の割合、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞上に発現する免疫チェックポイント分子(PD-1, Tim-3, LAG3)の発現に関して、『術前値』について、予後との相関を検討した<表7><図13>。予後良好群では、『術前』末梢血PBMC中の、NK細胞割合が有意に多かった(P=0.037)。免疫抑制に関わるCD4<sup>+</sup>T細胞やCD8<sup>+</sup>細胞上の免疫チェックポイント分子の発現や、制御性T細胞(Treg)の細胞割合は、両群間で有意差を認めなかった。他細胞分画は、両群間で有意差を認めなかった。

<表7> PBMC『術前値』と予後の比較

	『術前値』	予後不良群	予後良好群	P値
PBMC中の%	Monocyte (%)	8.7 ±4.8	7.1 ±7.7	0.27
	B cell (%)	2.6 ±1.6	1.5 ±1.1	0.08
	T cell (%)	65.7 ±10.5	54.3 ±15.2	0.11
	CD4T(%)	35.7 ±15.3	29.8 ±14.5	0.35
	CD8T(%)	19.0 ±11.1	17.7 ±11.0	0.79
	$\gamma\delta$ T (%)	0.93 ±1.1	2.6 ±5.0	0.59
	NK (%)	19.6 ±9.0	31.4 ±14.3	<b>0.037</b>
	n+eTreg (%)	1.8 ±0.73	1.4 ±0.73	0.18
	eTreg (%)	1.6 ±0.67	1.3 ±0.72	0.15
CD4 <sup>+</sup> 中の%	CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (%)	17.1 ±8.3	19.6 ±9.3	0.84
	CD4 <sup>+</sup> Tim-3 <sup>+</sup> (%)	2.4 ±1.2	3.0 ±2.5	0.97
	CD4 <sup>+</sup> LAG3 <sup>+</sup> (%)	4.5 ±6.2	3.6 ±4.8	0.90
CD8 <sup>+</sup> 中の%	CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> (%)	16.3 ±11.2	17.8 ±14.5	0.97
	CD8 <sup>+</sup> Tim-3 <sup>+</sup> (%)	3.8 ±1.9	3.6 ±3.0	0.39
	CD8 <sup>+</sup> LAG3 <sup>+</sup> (%)	4.8 ±5.1	4.5 ±6.8	0.65



<図13-1> PBMC『術前値』と予後の比較

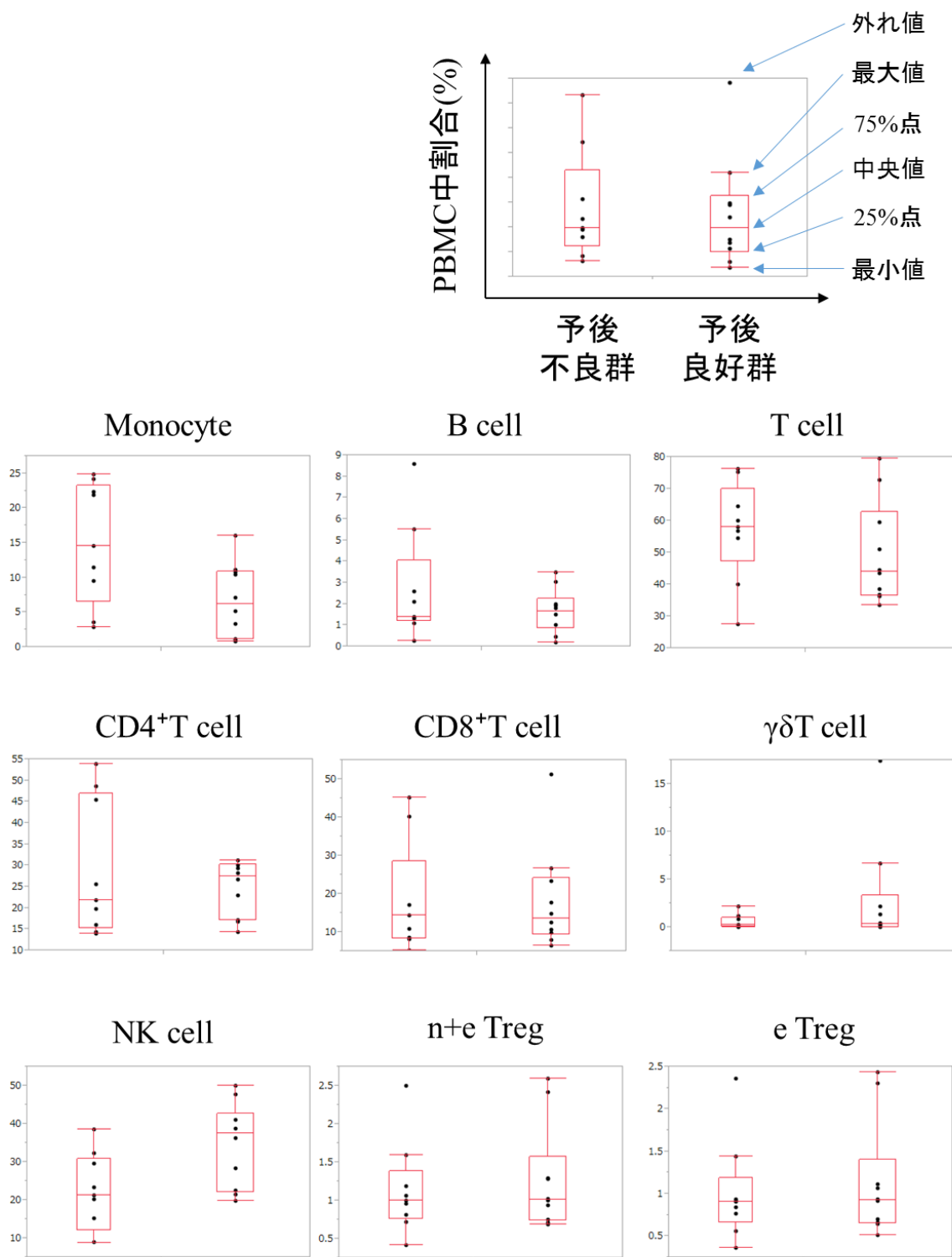


<図13-2> PBMC『術前値』と予後の比較

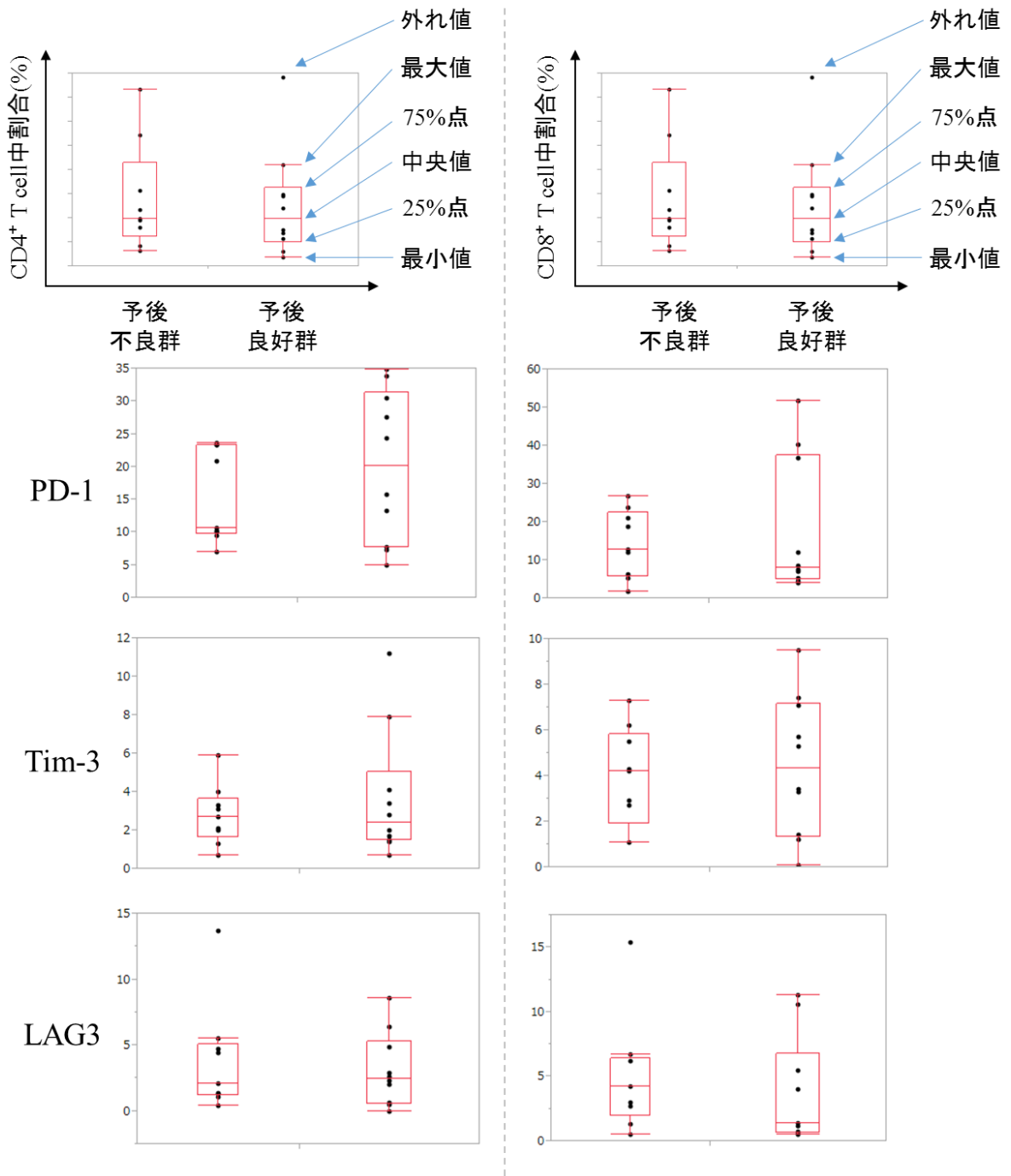
次に『術後値』について、予後との相関を検討した<表8><図14>。T cellやB cell割合に差を認めなかったが、予後良好群では、術前と同様に『術後』末梢血PBMC中の、NK細胞割合が有意に多い(P=0.031)ことに加え、単球割合が優位に少なかった(P=0.037)。またそれ以外の細胞分画は、両群間で有意差を認めなかった。

<表8> PBMC『術後値』と予後の比較

	『術後値』	予後不良群	予後良好群	P値
PBMC中の%	Monocyte (%)	15.0 ±8.7	6.7 ±5.3	<b>0.037</b>
	B cell (%)	2.7 ±2.7	1.6 ±1.1	0.54
	T cell (%)	57.0 ±15.6	49.5 ±16.1	0.27
	CD4T(%)	28.8 ±15.9	24.8 ±6.5	0.84
	CD8T(%)	18.5 ±14.4	18.1 ±13.4	0.90
	γδT (%)	0.63 ±0.72	2.9 ±5.5	0.71
	NK (%)	22.0 ±10.2	34.7 ±11.0	<b>0.031</b>
	n+eTreg (%)	1.14 ±0.60	1.27 ±0.69	0.87
	eTreg (%)	1.0 ±0.56	1.1 ±0.68	0.71
CD4+中の%	CD4+PD-1+ (%)	15.4 ±7.1	20.0 ±11.5	0.35
	CD4+Tim-3+ (%)	2.8 ±1.5	3.7 ±3.3	0.90
	CD4+LAG3+ (%)	3.8 ±4.1	3.1 ±2.8	0.97
CD8+中の%	CD8+PD-1+ (%)	14.3 ±8.8	17.7 ±17.9	0.87
	CD8+Tim-3+ (%)	3.9 ±2.2	4.4 ±3.1	0.65
	CD8+LAG3+ (%)	5.1 ±4.4	3.7 ±4.1	0.33



<図14-1> PBMC 『術後値』 と予後の比較



<図14-2> PBMC 『術後値』 と予後の比較

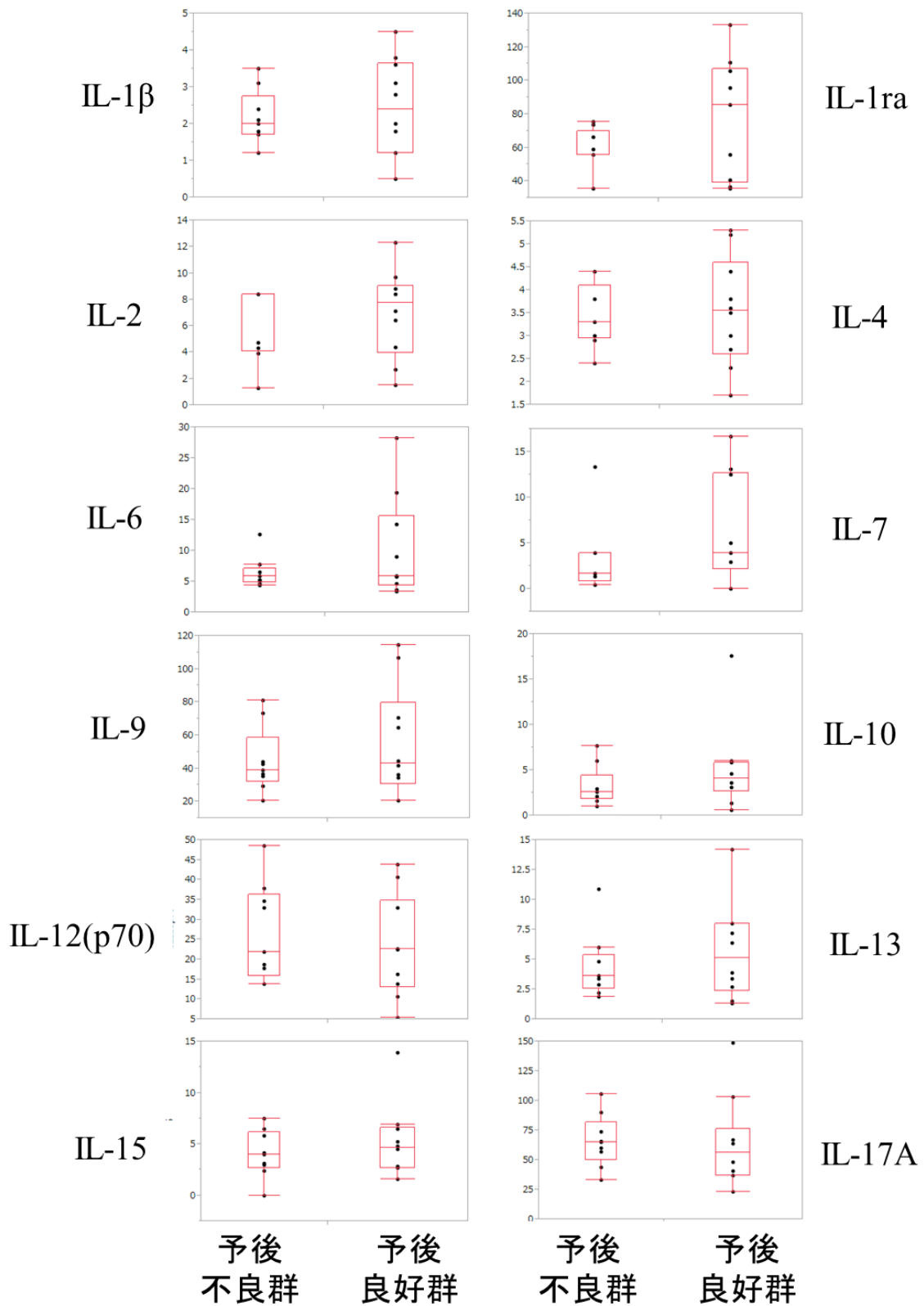
## ●第2項 サイトカイン・ケモカイン・増殖因子●

同様に、免疫制御や腫瘍増殖に関わるサイトカイン・ケモカイン・増殖因子についても予後との相関を検討した。まず『術前値』について、予後との相関を検討した結果は<表9><図15>の通りとなった。両群間で有意差を認めるサイトカイン・ケモカイン・増殖因子は無かった。NK細胞が産生するIFN $\gamma$ も、血漿中のタンパク質としての検出では両群で差を認めなかった。

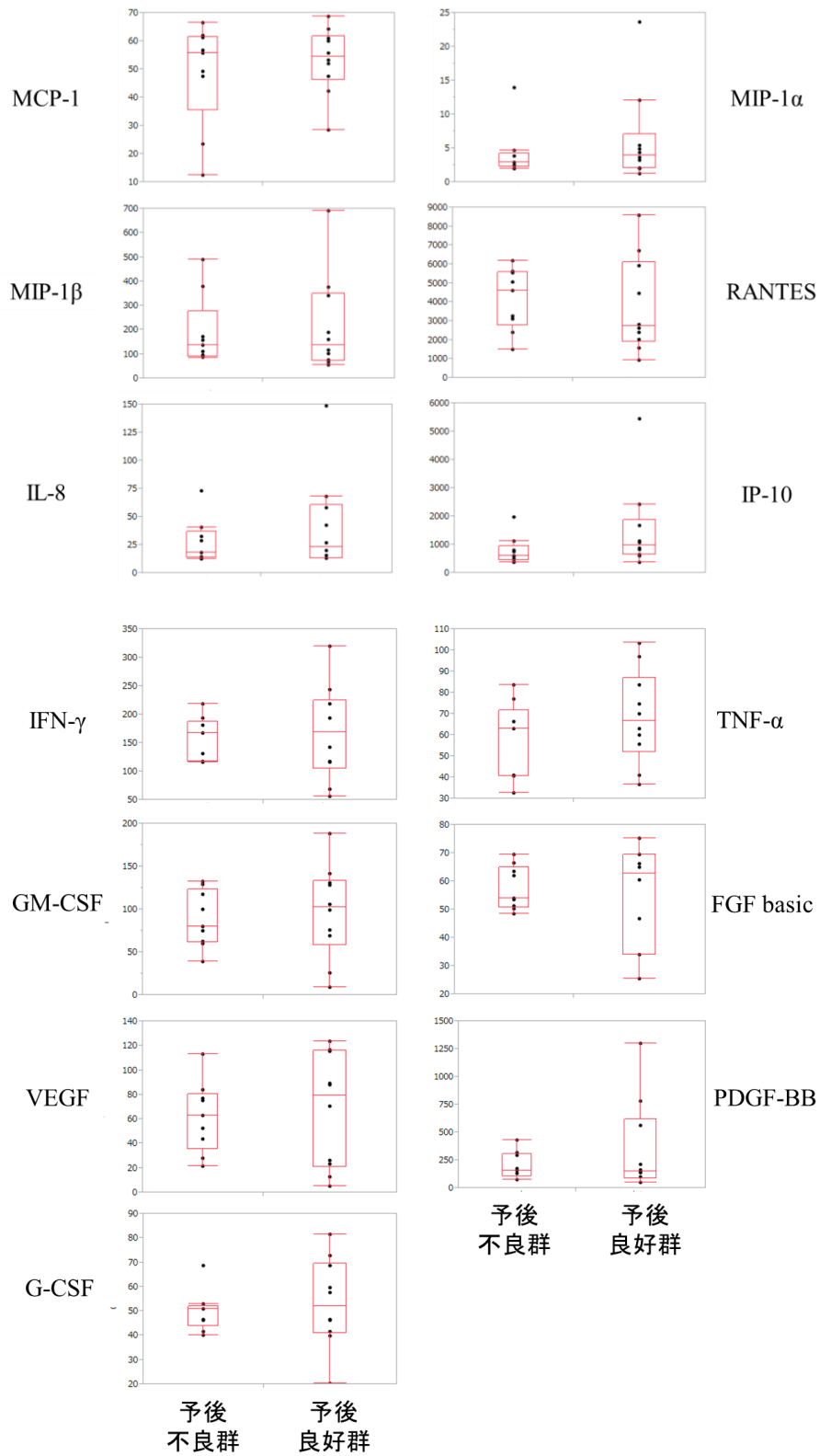
<表9> サイトカイン・ケモカイン・増殖因子『術前値』と予後の比較

	『術前値』	予後不良群	予後良好群	P値
サイトカイン	IL-1 $\beta$	2.2 $\pm$ 0.74	2.5 $\pm$ 1.3	0.68
	IL1ra	59.0 $\pm$ 12.0	78.3 $\pm$ 34.6	0.25
	IL-2	6.3 $\pm$ 2.8	7.0 $\pm$ 0.61	0.53
	IL-4	3.4 $\pm$ 0.67	3.5 $\pm$ 1.2	0.97
	IL-6	6.5 $\pm$ 2.5	10.0 $\pm$ 8.2	0.74
	IL-7	3.2 $\pm$ 4.0	6.2 $\pm$ 5.8	0.23
	IL-9	44.6 $\pm$ 19.8	55.4 $\pm$ 33.3	0.74
	IL-10	3.2 $\pm$ 2.2	5.0 $\pm$ 4.7	0.25
	IL-12(p70)	26.7 $\pm$ 12.2	23.1 $\pm$ 12.7	0.68
	IL-13	4.5 $\pm$ 2.7	5.7 $\pm$ 3.9	0.62
	IL-15	4.1 $\pm$ 2.3	5.2 $\pm$ 3.5	0.74
	IL-17A	66.0 $\pm$ 22.0	63.3 $\pm$ 37.6	0.49
	IFN- $\gamma$	156.8 $\pm$ 37.8	167.2 $\pm$ 82.4	0.77
	TNF- $\alpha$	56.5 $\pm$ 18.2	68.5 $\pm$ 22.0	0.31
ケモカイン	MCP-1	48.4 $\pm$ 18.4	53.3 $\pm$ 11.7	0.84
	MIP-1 $\alpha$	4.2 $\pm$ 3.8	6.3 $\pm$ 6.8	0.49
	MIP-1 $\beta$	190.8 $\pm$ 144.2	217.3 $\pm$ 199.9	0.49
	RANTES	4152.3 $\pm$ 1627.4	3806.2 $\pm$ 2516.2	0.60
	IL-8	27.4 $\pm$ 20.0	42.0 $\pm$ 42.5	0.59
	IP-10	793.2 $\pm$ 496.1	1508.9 $\pm$ 1510.7	0.15
増殖因子	GM-CSF	88.5 $\pm$ 33.1	97.3 $\pm$ 54.3	0.65
	FGF basic	57.7 $\pm$ 7.8	54.6 $\pm$ 18.0	1.00
	VEGF	61.9 $\pm$ 29.0	67.2 $\pm$ 46.3	0.71
	PDGF-BB	199.6 $\pm$ 122.3	349.9 $\pm$ 410.0	0.84
	G-CSF	49.8 $\pm$ 8.3	53.5 $\pm$ 18.2	0.74





<図 15-1> サイトカイン・ケモカイン・増殖因子『術前値』と予後の比較

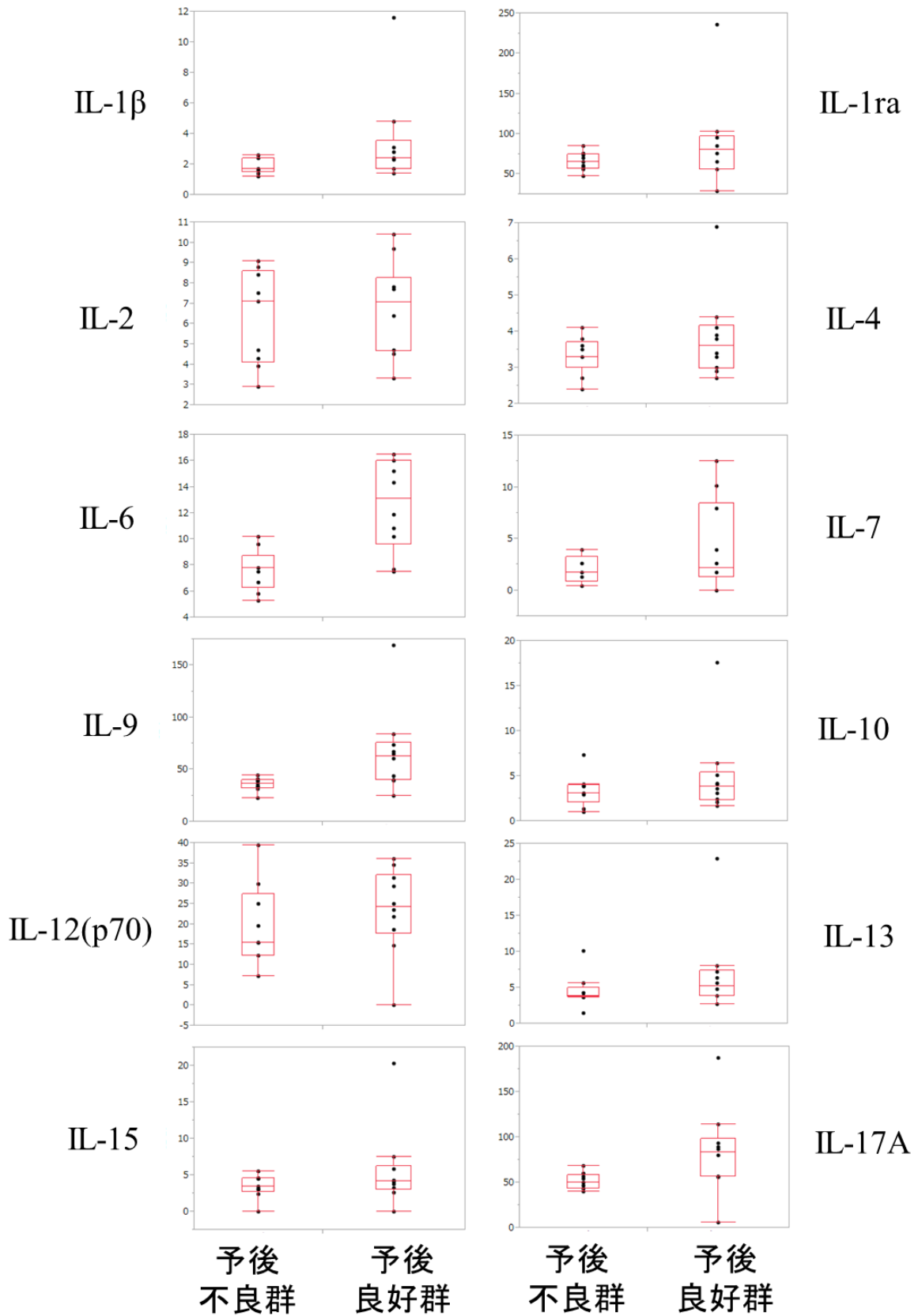


<図 15-2> サイトカイン・ケモカイン・増殖因子『術前値』と予後の比較

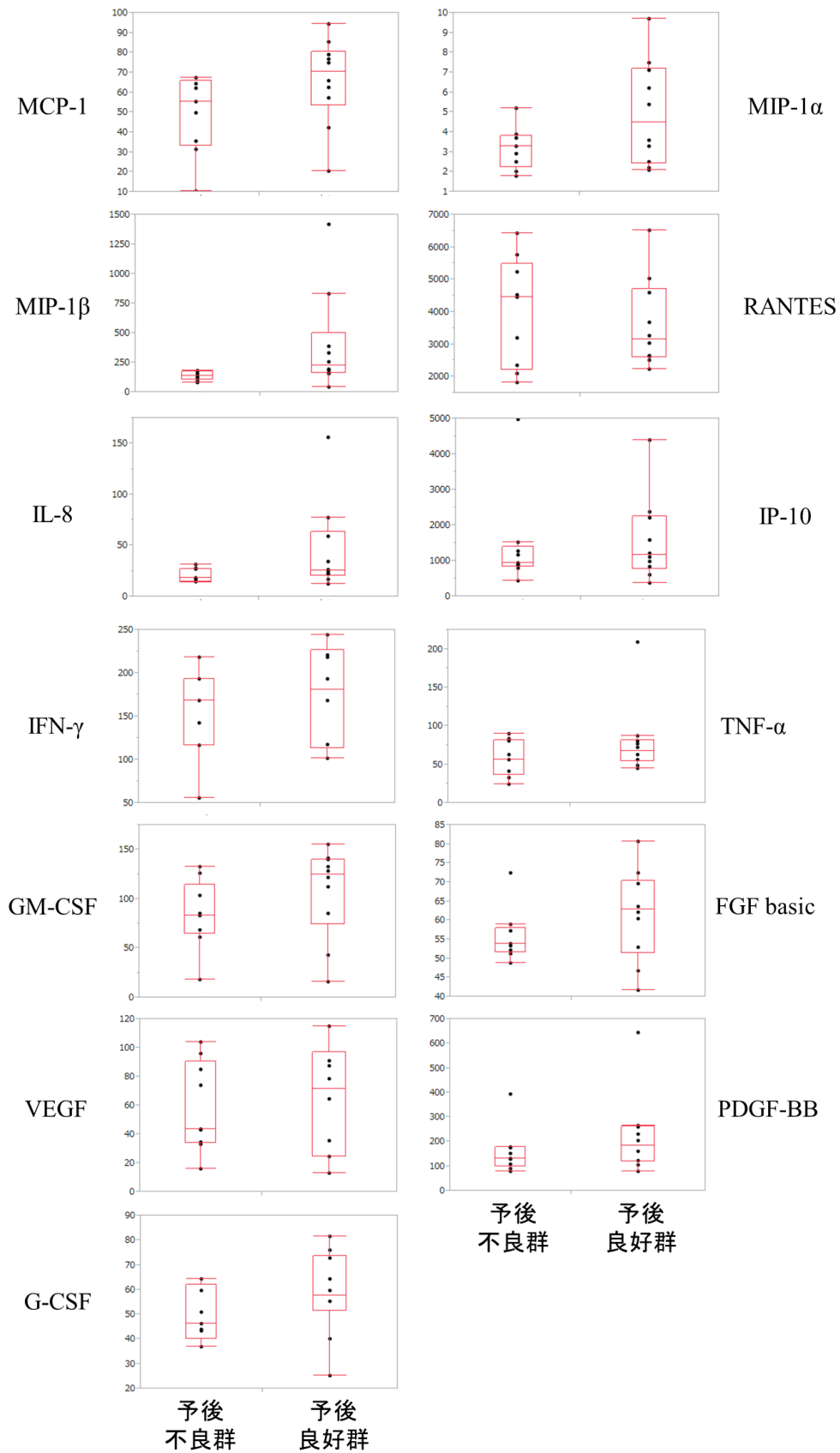
次に『術後値』の血漿中サイトカイン・ケモカイン・増殖因子について、予後との相関を検討した結果は<表 10><図 16>の通りとなった。予後良好群では、『術後』末梢血血漿中の、MIP-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, IL-9 が有意に多かった(P=0.016, 0.0061, 0.024, 0.013)。他の因子は、両群間で有意差を認めなかった。術後の血漿中サイトカインおよびケモカイン産生から、免疫系が活性化した症例で術後の再発が抑制されている可能性が示唆された。しかしながら、両群の数値を比較すると、多くの症例でオーバーラップしており、単一の因子で予後予測に使えるバイオマーカーとしての活用は困難であった。

<表 10> サイトカイン・ケモカイン・増殖因子『術後値』と予後の比較

	『術後値』	予後不良群	予後良好群	P値
サイトカイン	IL-1 $\beta$	1.8 $\pm$ 0.50	3.4 $\pm$ 3.0	0.070
	IL1ra	65.8 $\pm$ 11.6	89.6 $\pm$ 56.4	0.25
	IL-2	6.3 $\pm$ 2.4	6.9 $\pm$ 2.3	0.62
	IL-4	3.3 $\pm$ 0.51	3.8 $\pm$ 1.2	0.39
	IL-6	7.6 $\pm$ 1.6	12.6 $\pm$ 3.5	<b>0.0061</b>
	IL-7	1.9 $\pm$ 1.3	4.2 $\pm$ 4.4	0.36
	IL-9	35.7 $\pm$ 6.3	66.7 $\pm$ 40.4	<b>0.013</b>
	IL-10	3.4 $\pm$ 1.8	5.0 $\pm$ 4.6	0.41
	IL-12(p70)	19.6 $\pm$ 10.2	23.5 $\pm$ 10.7	0.33
	IL-13	4.5 $\pm$ 2.4	6.9 $\pm$ 5.9	0.21
	IL-15	3.5 $\pm$ 1.6	5.8 $\pm$ 5.5	0.33
	IL-17A	51.6 $\pm$ 9.2	82.7 $\pm$ 47.4	<b>0.024</b>
	IFN- $\gamma$	152.6 $\pm$ 50.2	177.8 $\pm$ 55.6	0.32
	TNF- $\alpha$	58.5 $\pm$ 23.2	80.1 $\pm$ 47.3	0.37
ケモカイン	MCP-1	49.3 $\pm$ 19.7	65.9 $\pm$ 21.8	0.08
	MIP-1 $\alpha$	3.2 $\pm$ 1.0	5.0 $\pm$ 2.6	0.16
	MIP-1 $\beta$	137.6 $\pm$ 37.0	397.6 $\pm$ 418.7	<b>0.016</b>
	RANTES	3984.7 $\pm$ 1686.3	3612.3 $\pm$ 1370.8	0.90
	IL-8	20.3 $\pm$ 6.7	45.1 $\pm$ 44.0	0.15
	IP-10	1426.5 $\pm$ 1366.5	1566.2 $\pm$ 1182.6	0.65
増殖因子	GM-CSF	84.6 $\pm$ 34.7	107.6 $\pm$ 45.7	0.13
	FGF basic	56.1 $\pm$ 6.9	61.4 $\pm$ 11.8	0.26
	VEGF	58.9 $\pm$ 31.5	64.8 $\pm$ 38.3	0.84
	PDGF-BB	159.2 $\pm$ 94.0	219.6 $\pm$ 162.9	0.44
	G-CSF	49.5 $\pm$ 10.9	58.6 $\pm$ 16.8	0.19



<図 16-1> サイトカイン・ケモカイン・増殖因子『術後値』と予後の比較



<図 16-2> サイトカイン・ケモカイン・増殖因子『術後値』と予後の比較

## <第4節 腫瘍局所環境の評価>

### ●第1項 腫瘍浸潤リンパ球評価●

末梢血中の細胞性成分や液性因子を用いたsystemicな免疫応答の解析のみでは、腫瘍術後の予後予測は容易ではないため、腫瘍局所の免疫応答を解析した。手術時に採取し凍結保存したサンプルからmRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いてRNA-Seq解析を行い、遺伝子発現による免疫応答の評価を行った。

腫瘍内に浸潤する細胞成分の評価には、MCP counter 解析法を用いた。MCP counter 解析法は、遺伝子の発現量から腫瘍浸潤リンパ球の多寡を推定し score 化する解析手法である。2 群間における腫瘍浸潤リンパ球中の T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、細胞傷害性 T 細胞(CTL), NK 細胞、B 細胞、単球、樹状細胞、好中球、線維芽細胞を比較したところ、予後良好群では、統計学的な有意差は認めないものの、腫瘍浸潤 NK 細胞が多い傾向を認めた(P=0.058)。他、免疫関連細胞については、両群間で有意差を認めなかった。<表 11>

<表 11> 局所浸潤リンパ球(MCP counter 解析)

Score	予後不良群	予後良好群	P value (Welch T-test)	P value (Mann-Whitney U-test)
T cells	4.02±1.15	4.51±2.51	0.606	1.000
CD8 T cells	4.36±1.45	3.63±3.47	0.574	0.248
Cytotoxic lymphocytes	2.20±0.76	2.57±1.95	0.605	0.700
NK cells	0.16±0.04	0.24±0.11	<b>0.058</b>	<b>0.068</b>
B lineage	3.14±2.65	4.51±5.9	0.542	0.923
Monocytic lineage	14.93±2.95	18.45±14.02	0.481	0.773
Myeloid dendritic cells	4.37±2.67	3.29±1.36	0.329	0.178
Neutrophils	5.31±1.11	5.07±2.34	0.789	0.248
Endothelial cells	5.98±2.55	5.17±1.36	0.439	0.630
Fibroblasts	511.26±90.34	430.24±279.14	0.430	0.124

## ●第2項 遺伝子発現解析●

GSEA法を用いて、膵癌腫瘍組織内の遺伝子発現パターンから、腫瘍内の免疫応答および、腫瘍の増殖にかかわる因子を評価した。解析する gene set(遺伝子群)には、米国 Broad 研究所の提供する 50 種の gene set からなる Hallmark gene sets (MSigDB v5.1) を採用した。この 50 種の gene set うち、予後良好群で有意に高発現である gene set は 9 種(E2F TARGETS, G2M CHECKPOINT, INTERFERON ALPHA RESPONSE, INTERFERON GAMMA RESPONSE, MYC TARGETS V2, MTORC1 SIGNALING, MYC TARGETS V1, MITOTIC PROTEIN RESPONSE, UNFOLDED PROTEIN RESPONSE)であり、予後不良群で有意に高発現である gene set は 9 種だった。(UV RESPONSE DN, PANCREAS BETA CELLS, EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION, COAGULATION, MYOGENESIS, XENOBIOTIC METABOLISM, BILE ACID METABOLISM, ADIPOGENESIS, ANDROGEN RESPONSE) <表 12>

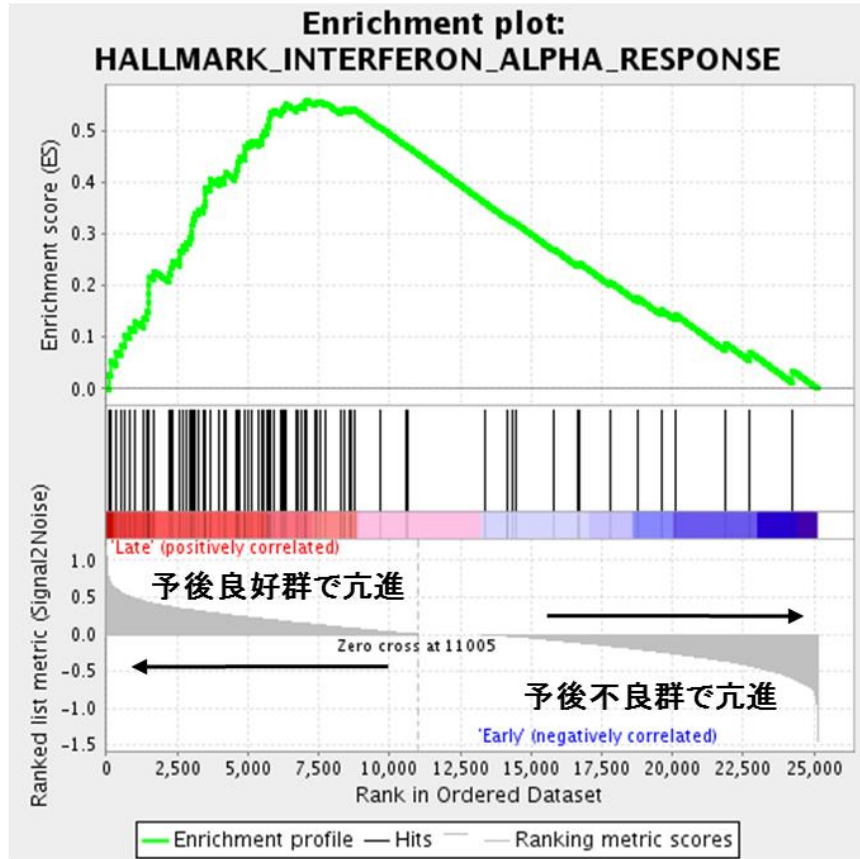
予後良好群では、IFN- $\alpha$  及び IFN- $\gamma$  の免疫応答に関連する遺伝子群が、有意に高発現を呈していた(いずれも  $q < 0.001$ ) <図 17-1 A, B>。一方、予後不良群では、癌の転移能と関連すると言われる上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition)に関連する遺伝子群が、有意に高発現を呈していた( $q = 0.002$ ) <図 17-2 C>。膵癌の発癌に深く関与している KRAS シグナル亢進に関連する遺伝子群は、有意ではないが発現が高い傾向を認めた( $q = 0.063$ ) <図 17-2 D>。

<表 12> Hallmark gene sets を用いた GSEA 法による解析結果

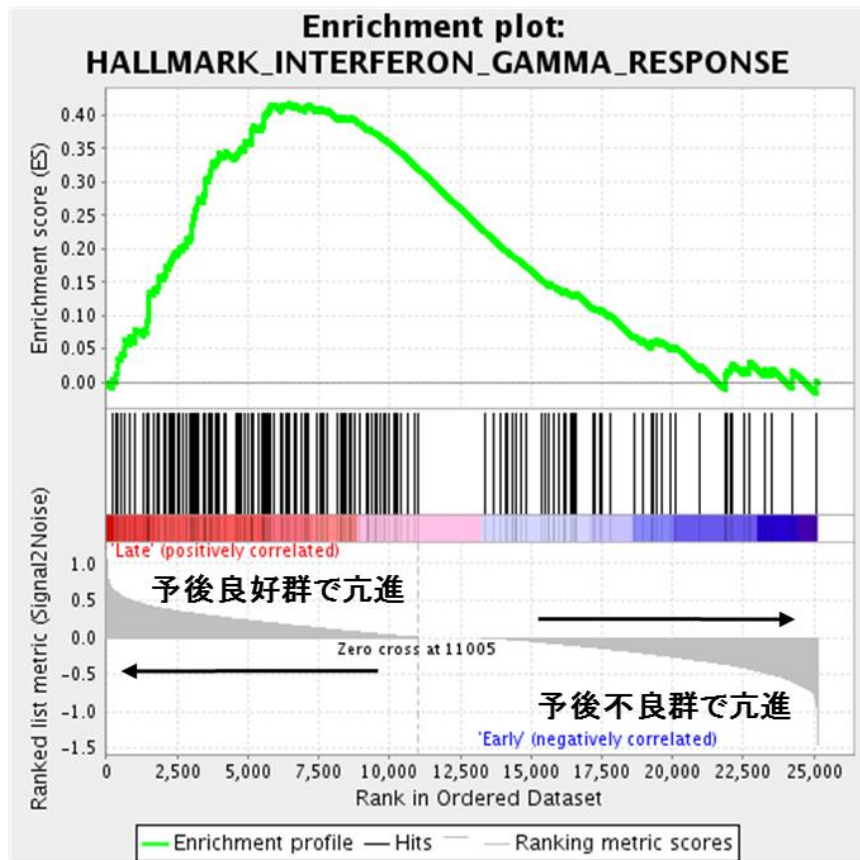
Gene set	NES	FDR q-val
<b>HALLMARK_E2F_TARGETS</b>	<b>2.65</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>HALLMARK_G2M_CHECKPOINT</b>	<b>2.54</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE</b>	<b>2.34</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE</b>	<b>1.97</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>HALLMARK_MYC_TARGETS_V2</b>	<b>1.88</b>	<b>0.001</b>
<b>HALLMARK_MTORC1_SIGNALING</b>	<b>1.75</b>	<b>0.001</b>
<b>HALLMARK_MYC_TARGETS_V1</b>	<b>1.64</b>	<b>0.005</b>
<b>HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE</b>	<b>1.47</b>	<b>0.019</b>
<b>HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE</b>	<b>1.36</b>	<b>0.045</b>
HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION	1.13	0.303
HALLMARK_GLYCOLYSIS	1.06	0.498
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	1.03	0.553
HALLMARK_DNA_REPAIR	0.87	1.000
HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	0.81	1.000
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	0.74	1.000
HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	0.72	1.000
HALLMARK_NOTCH_SIGNALING	0.65	1.000
HALLMARK_WNT_BETA_CATENIN_SIGNALING	0.58	0.999
HALLMARK_REACTIVE_OXIGEN_SPECIES_PATHWAY	-0.56	1.000
HALLMARK_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING	-0.61	1.000
HALLMARK_APICAL_SURFACE	-0.74	1.000
HALLMARK_APICAL_JUNCTION	-0.93	0.696
HALLMARK_HEME_METABOLISM	-0.94	0.694
HALLMARK_P53_PATHWAY	-0.94	0.704
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_DN	-1.00	0.549
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_LATE	-1.00	0.568
HALLMARK_UV_RESPONSE_UP	-1.03	0.508
HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	-1.04	0.524
HALLMARK_COMPLEMENT	-1.14	0.276
HALLMARK_HYPOXIA	-1.14	0.288
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_EARLY	-1.21	0.180
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	-1.21	0.190
HALLMARK_PEROXISOME	-1.25	0.143
HALLMARK_ANGIOGENESIS	-1.25	0.149
HALLMARK_APOPTOSIS	-1.26	0.143
HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING	-1.27	0.140
HALLMARK_SPERMATOGENESIS	-1.29	0.129
HALLMARK_PROTEIN_SECRETION	-1.32	0.107
HALLMARK_HEDGEHOG_SIGNALING	-1.32	0.109
HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM	-1.37	0.071
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	-1.40	0.063
<b>HALLMARK_ANDROGEN_RESPONSE</b>	<b>-1.43</b>	<b>0.045</b>
<b>HALLMARK_ADIPOGENESIS</b>	<b>-1.45</b>	<b>0.045</b>
<b>HALLMARK_BILE_ACID_METABOLISM</b>	<b>-1.49</b>	<b>0.032</b>
<b>HALLMARK_XENOBIOTIC_METABOLISM</b>	<b>-1.53</b>	<b>0.023</b>
<b>HALLMARK_MYOGENESIS</b>	<b>-1.62</b>	<b>0.010</b>
<b>HALLMARK_COAGULATION</b>	<b>-1.78</b>	<b>0.002</b>
<b>HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION</b>	<b>-1.81</b>	<b>0.002</b>
<b>HALLMARK_PANCREAS_BETA_CELLS</b>	<b>-1.91</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>HALLMARK_UV_RESPONSE_DN</b>	<b>-1.91</b>	<b>&lt;0.001</b>



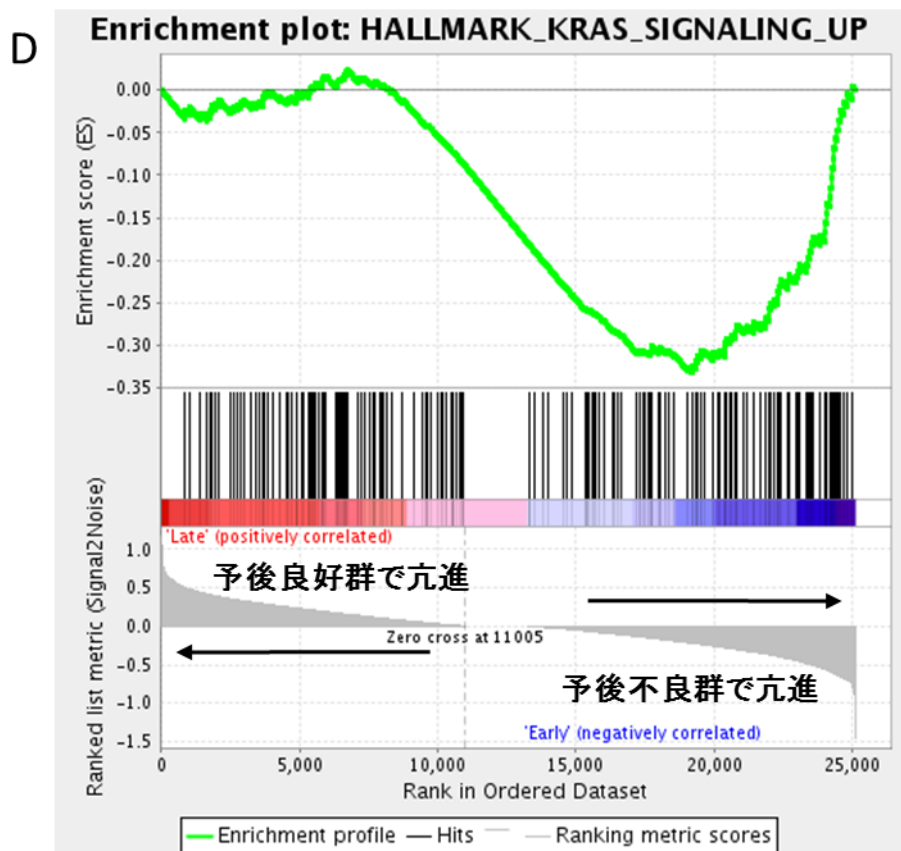
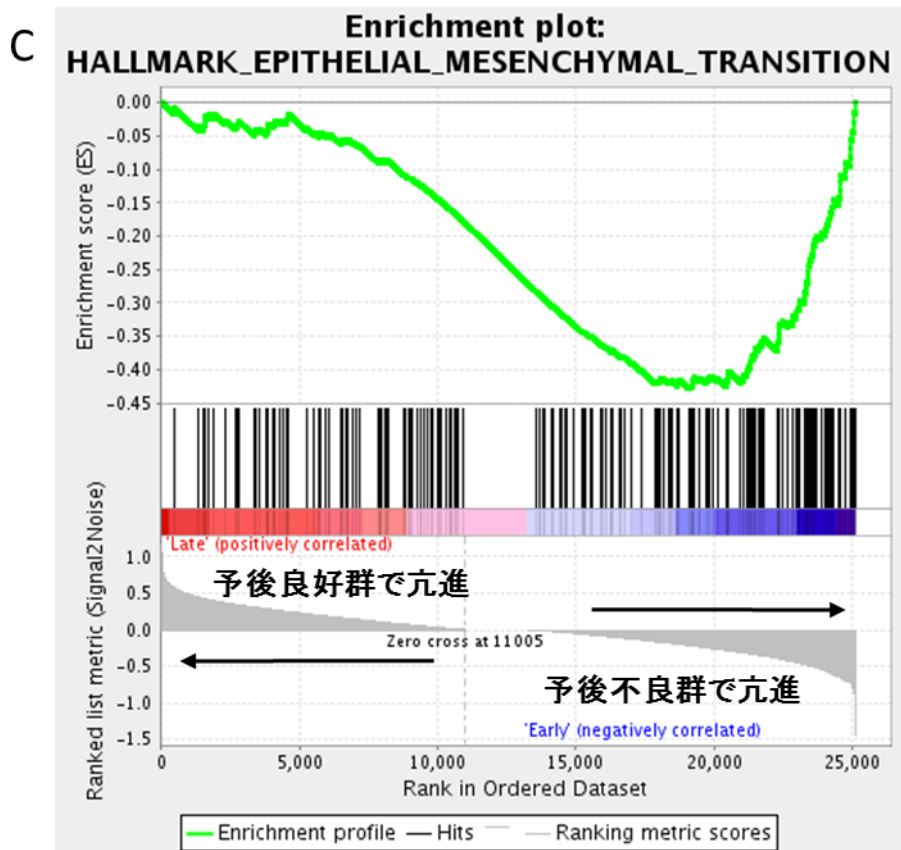
A



B



<図 17-1> GSEA 解析 A : IFN $\alpha$  Response、B : IFN $\gamma$  Response



<図 17-2> GSEA 解析 C : Epithelial mesenchymal transition、D : KRAS signaling

## 第4章：考察

### <第1節 研究の概要>

膵癌患者に対する膵切除術前後の末梢血を採取し、免疫関連細胞成分をフローサイトメーターで解析し、サイトカインやケモカインなどの免疫関連分子をマルチプレックスビーズアッセイで検出し、膵癌患者の手術前後の免疫状態を検討した。また、切除標本から膵癌腫瘍組織を一部採取し、次世代シーケンサーを用いて腫瘍内の遺伝子発現を解析し、膵癌の腫瘍局所における免疫環境を評価した。

まず、手術前後を比較すると、末梢血中の免疫細胞ではPBMC中のT細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞割合、及び制御性T細胞(n+eTreg)、とりわけエフェクター型制御性T細胞(eTreg)割合が術後に有意に減少し、血漿中のケモカインはIP-10が術後有意に上昇していた。

また、『術前』のNK細胞割合、『術後』のNK細胞割合、MIP-1 $\beta$ , IL-6, IL-9, IL-17Aが、予後良好群で有意に高値であり、『術後』のmonocyte割合は、予後不良群で有意に高値であった。

腫瘍内の遺伝子発現解析から腫瘍浸潤細胞の構成を解析したところ、予後良好群でNK cell浸潤が多い傾向を認め、さらに腫瘍内でIFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 関連遺伝子の発現が有意に亢進していた。一方で予後不良群では、EMT関連遺伝子は有意に高発現、KRASシグナル亢進に関連する遺伝子群も高発現である傾向を認めた。

## <第2節 研究結果に対する考察>

### ●第1項 膵癌の予後規定因子●

今回我々は、腫瘍免疫に着目して、膵癌術後再発の予後予測因子を検討した。

膵癌発症のリスクファクターは、膵癌家族歴、Lynch症候群等の遺伝性疾患、糖尿病や慢性膵炎、膵管内乳頭粘液性腫瘍、膵のう胞、肥満等の合併疾患、喫煙や大量飲酒の嗜好である[18]。

切除適応のある症例では根治手術が第一選択となるが、再発率は高い。実際に、本検討での予後観察期間は2年9ヶ月～4年1ヶ月であったが、全症例で再発を認めた。

これまで膵癌術後の予後予測手段として、術後病理診断基準が設定されている。世界的にはUICC 第7版(2009年)によるTNM分類が用いられ、日本では膵癌取扱い規約(第6版補訂版2013年8月⇒第7版2016年7月)による病期分類が用いられている。隣接臓器、血管浸潤などの局所進行、あるいはリンパ節転移が指標となるが、再発の形式や時期を予測する明確な因子は定まっていない。膵癌診療ガイドライン2016年度版(なお本研究での病期分類は、手術施行時期から、膵癌取扱い規約第6版補訂版を使用した。)

### ●第2項 末梢血解析結果について●

今回の検討で予後規定因子となった各免疫細胞、サイトカインの役割や相関を示す。

抗腫瘍免疫応答において、T細胞はその抗原特異的認識機構をもって獲得免疫として、NK細胞は自然免疫として重要であり、NK cellは初期防御だけでなく転移抑制に

も関与している。[19, 20]

術後に上昇したIP-10は、CXCL10としても知られるケモカインであり、IFN- $\gamma$ またはその他の炎症性サイトカインや刺激に応答して単球、血管内皮細胞、線維芽細胞で誘導され、単球、マクロファージ、T細胞、NK細胞、樹状細胞の化学誘引など走化性因子としての役割に加えて、血管新生の強力な阻害因子として抗腫瘍活性を示すことが知られている。[21-23]

また、『術後』の血漿中で高値である事が予後良好因子の一つとなっていた、MIP-1 $\beta$ は、CCL4としても知られるケモカインであり、急性炎症反応に働く分泌型タンパク質であり、単球、好中球、好酸球、NK細胞、CD4<sup>+</sup> T細胞に対する化学誘引物質である。[24-26]

IL-6は、炎症性サイトカインの一つであり、IL-1刺激単核食細胞や血管内皮細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、Th2細胞、B細胞、メサンギウム細胞など様々な細胞から産生され、T細胞の分化、活性化（Th17細胞の分化誘導、Tregの分化・機能抑制）に携わる。IL-8やMCP-1などのケモカインの産生を亢進させ、また、ICAM-1、VCAM-1などの細胞接着分子の発現を亢進させる。IL-6受容体はgp130と会合してJAK1/2, MAPKシグナルを伝達する。[27]

IL-9は、主にTh細胞（Th9細胞）から産生され、IL-9受容体はJAK-STAT経路を活性化する。CD4<sup>+</sup> T細胞におけるTh17とTregの分化、B細胞におけるIgE産生及び肥満細胞の分化と増殖を誘導し、血小板前駆細胞など造血細胞の増殖・生存を促進する。

[28-30]

IL-17Aは、適応免疫および自己免疫性炎症性疾患において、中心的な役割を果たすサイトカインの一つで、特定の細胞外感染細菌に対する生体防御において重要な役割を果たすことが示唆されている。近年、Th1 や Th2 細胞とは異なる新たなヘルパーT細胞サブセットとして、IL-17 産生性 CD4<sup>+</sup>ヘルパーT (Th17) 細胞が同定され、Th17 細胞は、IL-17A、IL-17F、IL-21 および IL-22 を主に産生する。IL-17 および IL-22 のレセプターは様々な上皮系組織に発現しているため、Th17 細胞は免疫系と組織との相関において重要と考えられている。またその他にCD8<sup>+</sup>T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK 細胞、好中球、単球からも産生される。様々な細胞に対して、IL-6やIL-8, MCP-1, GM-CSF, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインやケモカインの産生を増強し、ICAM-1など細胞接着因子の発現を増強するとともに、炎症反応に寄与しており、好中球の遊走、増加、活性化にも寄与する。[31, 32]

以上を踏まえて各因子の相互関係を検討する。

まず、腭切除術前後での免疫状態をフローサイトメーターおよびマルチプレックスビーズアッセイを用いて詳細に比較検討したところ、術後に末梢血中の免疫細胞ではPBMC中のT cell, CD4<sup>+</sup> T cell,  $\gamma\delta$ T cell割合が有意に減少し、血漿中のサイトカインはIP-10が術後有意に上昇した事が分かった。T細胞の減少は、制御性T細胞の減少も伴

い、相対的にNK細胞の増加として観察された。血漿中のIFN- $\gamma$ 値では明らかな変化が認められなかったにもかかわらず、IP-10が増加しているのは、IP-10がIFN- $\gamma$ の下流に存在するケモカインで、IFN- $\gamma$ によって誘導され、IFN- $\gamma$ のシグナルをさらに増幅して大量に発現することから、より鋭敏にその変化を捉えることが可能であったと考えられる。これらの結果から、手術により、腫瘍による免疫抑制環境が改善され、Th1反応が誘導された可能性を示唆していると考えられる。

次に、本検討で予後に寄与した因子を考える。『術前』のNK cell割合、『術後』のNK cell割合、MIP-1 $\beta$ , IL-6, IL-9, IL-17Aが、予後良好群で有意に高値であり、『術後』のmonocyte割合は、予後不良群で有意に高値であった。

膵癌患者で、末梢血中単球割合は一つの予後予測因子として多く報告されており[33, 34]、本検討で得た結果も矛盾しない結果であった。他癌腫で、『術前』末梢血単球割合が多いと予後不良であるという報告も知られている[35, 36]。ヒト骨髓球系由来抑制細胞(Myeloid-derived Suppressor Cell: MDSC)は、CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>lo</sup> (単球系MDSC) 或いは、CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD15<sup>-</sup> (顆粒球系MDSC) 細胞として検出される。本研究では、末梢血CD14陽性細胞を単球として分類し、その頻度を比較したが、CD14陽性細胞中には、CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>lo</sup>のMDSCが含まれており、末梢血単球が多いと判定した症例では、MDSCが増加しており、NK細胞やT細胞を中心とした免疫応答が妨げら

れている可能性もあり、単球系、顆粒球系それぞれのMDSCについて、検討の追加が必要であると考えられる。

また、術後の血漿中サイトカイン及びケモカイン産生から、免疫系が活性化した症例で術後の再発が抑制されている可能性が示唆された。両群の数値を比較すると、多くの症例でオーバーラップしており、単一の因子で予後予測に使えるバイオマーカーとしての活用は現時点では困難であったが、『術前値』では差が無いものの、『術後値』ではいくつかの因子が予後因子として挙がってくることから、膵癌根治切除による免疫状態の変化によって、予後が反映されてくる可能性はあると考えられる。

その中で、やはり術前後共に予後因子として挙がってきたNK cellは、膵癌免疫を考える上で重要な役割を担っている可能性が高いと考える。末梢血中NK cellが予後因子となっていることは、血液腫瘍、胃癌、大腸癌、肝臓癌など他癌腫でも報告されてきた[37-41]。膵癌では、その予後因子としての動態はあまり知られておらず、Davis Mらが16症例でGEM+pemetrexed併用療法の効果を検討した結果、治療前末梢血NK cell割合が高いことが予後良好因子となったと報告されるのみである[42]。

本検討では術前後値共にNK cell割合高値が予後良好因子となっており、重要な結果だと考える。



### ●第3項 免疫抑制環境について●

膵癌患者では、末梢血中にTregやMDSCといった免疫抑制性細胞が増加しており、腫瘍による免疫抑制作用に関与していると言われている[43-45]。

このため、末梢血では一般的な免疫担当細胞の分画と共に、免疫抑制性の細胞についても検討した。最近、担癌宿主において注目されている腫瘍免疫抑制性細胞の1つは、Tregである。膵癌術後の患者で末梢血中Tregの割合が高いと予後が悪いことが報告されている[46]。

Tregは、T細胞サブセットの一つであり、CD4、CD25及び転写因子であるforkhead box P3 (FOXP3)を発現している。他の免疫担当細胞に直接働いたり、免疫抑制性のサイトカインを放出したりすることにより、免疫を抑制する機能を有する。さらにCD45RAの発現を加えてTregをエフェクター型のTreg (e Treg)とナイーブTreg (n Treg)に分類すると、e Tregが強い免疫抑制活性を持つが、n Tregは免疫抑制活性が弱いことが知られている。Tregの主たる機能は自己免疫疾患の発生を抑えることと考えられているが、腫瘍に対する免疫応答を抑制することも知られている。

また、T細胞の免疫応答を抑制する分子として、CD4<sup>+</sup> T cellやCD8<sup>+</sup> T cell上の免疫チェックポイント分子である、PD-1, Tim-3, LAG3の発現割合についても検討した。これらの免疫チェックポイント分子は、特に免疫治療の観点から注目されているが、本研究では、いずれも術前後での変化や、予後との関連は認めなかった。

癌細胞と免疫システムとのメカニズムが解明されるに従って、癌細胞が抗腫瘍免疫システムから逃れるような仕組みがいくつか知られるようになった。細胞レベルでは前述のTregや、他に骨髄由来抑制細胞(myeloid-derived suppressor cell: MDSC)、分子レベルではTGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )やIDO (indoleamine 2,3-dioxygenase)などの抑制性サイトカインや代謝関連酵素の過剰産生、さらに免疫チェックポイント分子の発現が挙げられる。

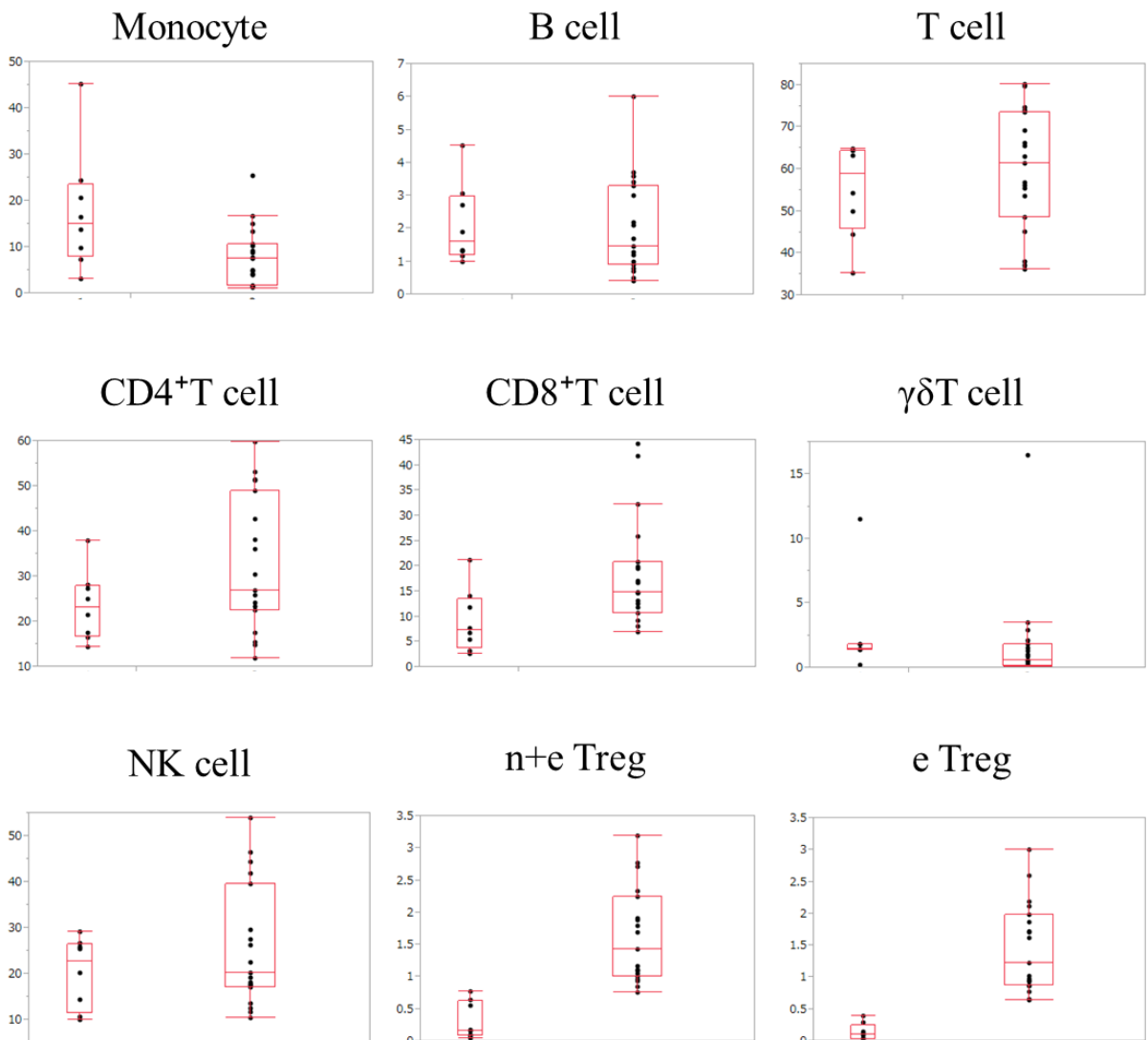
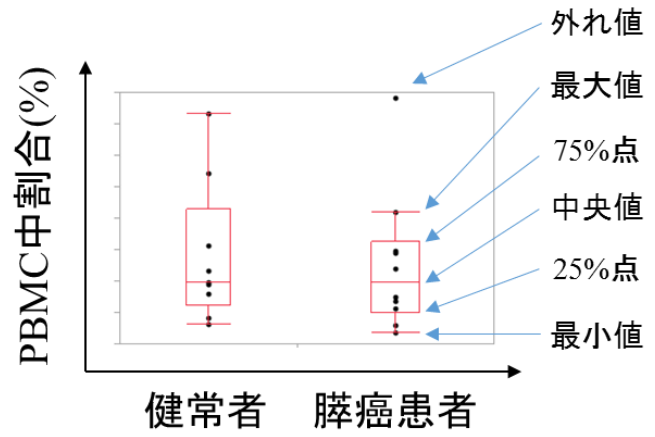
膵癌に特徴的な免疫抑制的な環境が、腫瘍そのものにより引き起こされているのであれば、根治切除により腫瘍を完全に取り除く事で、前述の免疫抑制因子を除去することができれば、末梢血中の免疫抑制性細胞も減少するのではないかと期待された。実際にTregの減少を認め、さらに手術後に、血漿中の様々なサイトカイン、ケモカインの濃度の上昇、とりわけIP-10の上昇を認めたことから、少なくとも手術により免疫抑制が増強したと考えるより、免疫抑制状態が解除されたと考えられる。また一方で、膵切除術は侵襲の大きな手術であることから、術後に患者の免疫状態が低下することも考えられ、末梢血中のT細胞の割合の減少は、一時的な免疫低下を反映しているかもしれない。本研究では、術後1か月程度の採血しか観察していないことから、その後より長期間の観察でT細胞数の回復を確認することが困難であった。さらに、GEMやS-1の術後補助療法の有害事象による骨髄抑制が加わるため、手術侵襲によるわずかな変化の回復の有無の確認はできなかった。

なお、膵癌患者では免疫状態が抑制されているという報告は多いが、細胞数などの具体的な数字を表示した報告は無く、また、健常者のデータもあまり報告されていなかったため、健常者8人のデータと比較検討した。(倫理委員会にて承認されたプロトコールに従い、同意を取得し、採血を行った。Protocol ID: 2223-(1))

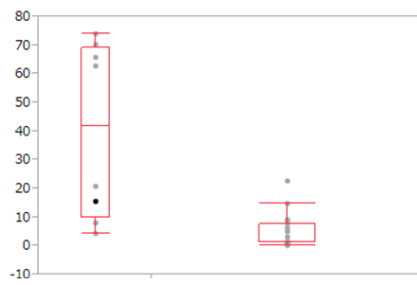
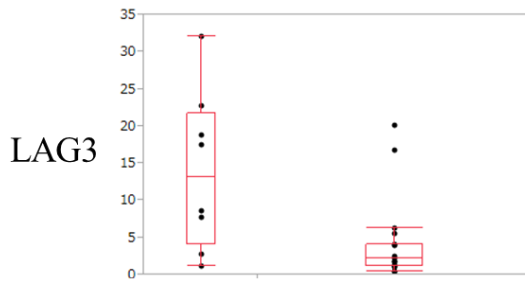
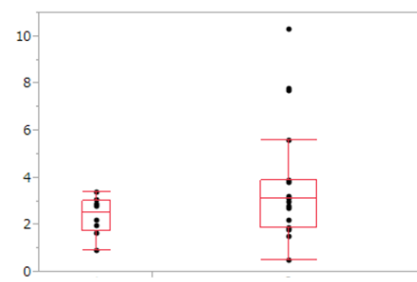
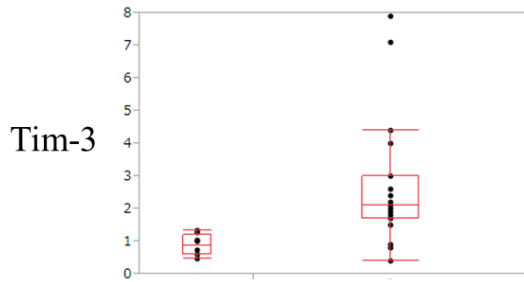
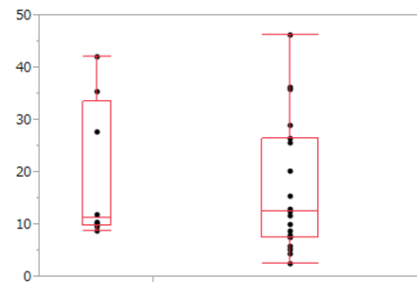
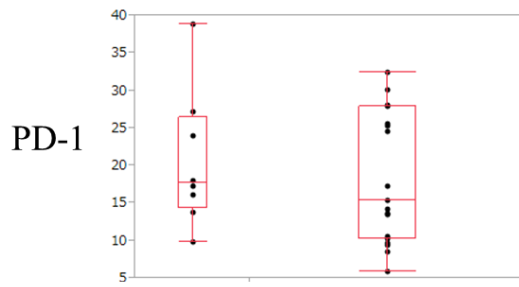
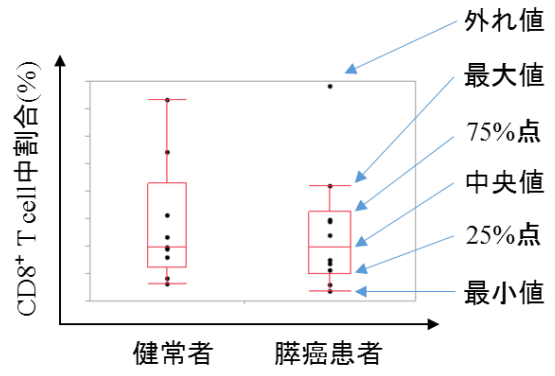
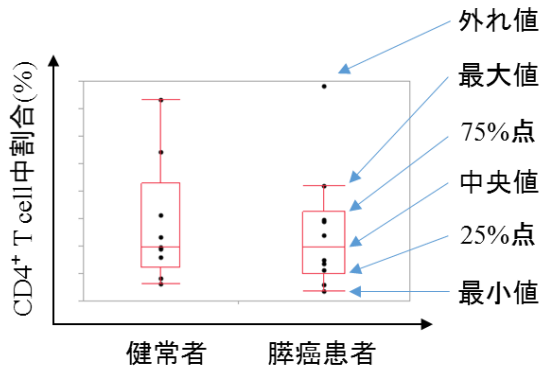
この結果、健常者と膵癌患者では免疫状態に明らかな差がある事が分かった。本研究で対象となった膵癌患者では健常者と比較して、単球割合が有意に少なく( $P=0.041$ )、 $CD8^+$  T細胞割合、 $n+eTreg$ 割合、 $eTreg$ 割合が有意に多かった( $P=0.0135$ ,  $<0.0001$ ,  $<0.0001$ ) <表13> <図18-1>。また、PD-1, Tim-3, LAG3といったマーカーも検討したところ、膵癌患者では、 $CD4^+$  T細胞に発現するTim-3割合が有意に高く( $P=0.0016$ )、 $CD4^+$  T細胞及び $CD8^+$  T細胞に発現するLAG3割合が有意に低かった( $P=0.0085$ ,  $0.0009$ ) <図18-2>。これらは膵癌患者の免疫状態を解明するのに重要なデータであり、更なる検討が必要と考えられた。

<表13> 健常者、膵癌患者での末梢血PBMC中免疫細胞の比較

		健常者	膵癌患者 (術前値)	P値
PBMC中の%	Monocyte (%)	17.6 ±13.1	7.9 ±6.4	<b>0.041</b>
	B cell (%)	2.1 ±1.2	2.0 ±1.4	0.58
	T cell (%)	55.1 ±11.1	59.7 ±14.1	0.35
	CD4T(%)	23.5 ±7.7	32.6 ±14.8	0.19
	CD8T(%)	9.1 ±6.3	18.3 ±10.8	<b>0.0135</b>
	γδT (%)	2.6 ±3.6	1.8 ±3.7	0.13
	NK (%)	20.3 ±7.7	25.8 ±13.2	0.44
	n+eTreg (%)	0.32 ±0.30	1.6 ±0.74	<b>&lt;0.0001</b>
	eTreg (%)	0.14 ±0.14	1.5 ±0.70	<b>&lt;0.0001</b>
CD4+中の%	CD4+PD-1+ (%)	20.6 ±9.2	18.4 ±8.7	0.58
	CD4+Tim-3+ (%)	0.88 ±0.33	2.7 ±2.0	<b>0.0016</b>
	CD4+LAG3+ (%)	13.9 ±10.7	4.0 ±5.4	<b>0.0085</b>
CD8+中の%	CD8+PD-1+ (%)	19.5 ±13.5	17.1 ±12.7	0.58
	CD8+Tim-3+ (%)	2.4 ±0.83	3.7 ±2.5	0.21
	CD8+LAG3+ (%)	40.1 ±30.6	4.6 ±5.9	<b>0.0009</b>



<図18-1> 健常者、膵癌患者での末梢血PBMC中免疫細胞の比較



<図18-2> 健常者、膀胱癌患者での末梢血PBMC中免疫細胞の比較

## ●第4項 腫瘍局所環境の解析結果について●

続いて、膵癌腫瘍局所について、どのような免疫応答が生じ、どのような免疫学的環境になっているかを検討した。

これまで文献的には、様々な癌種で、腫瘍組織内のCD8<sup>+</sup> T cell浸潤が予後に関連しているという報告があり[47]、膵癌でも同様の報告を複数認める[48, 49]。しかし、NK cellの局所浸潤を示した報告は無いが、本研究結果では、有意ではなかったものの、腫瘍局所においてもNK cellsが多い方が予後良好である傾向が示唆された。さらに、GSEA解析結果においても、IFN- $\alpha$ 及びIFN- $\gamma$ の免疫応答に関連する遺伝子群が、有意に高発現を呈していた。NK cellはIFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ を産生し、IFN- $\gamma$ はIP-10などのケモカインを誘導し、そのケモカインによりNK細胞が腫瘍内に誘導されるというpositive feedbackが期待される。末梢血中のNK cellと膵癌患者の予後が関連していたという末梢血解析結果が、腫瘍局所の遺伝子解析からも裏付けられたと考える。膵癌ではT細胞を中心とした獲得免疫より、NK細胞を中心とした自然免疫系が抗腫瘍効果に関与している可能性が示唆された。

また、昨今腫瘍内におけるIFN関連遺伝子の発現は化学療法、分子標的治療、免疫治療、腫瘍溶解ウイルス治療で不可欠であるといわれている[50]。今回、術後の予後にかかわる因子としても腫瘍内でのIFN関連遺伝子の発現が重要であることを示した。

膵癌組織は他癌腫に比較して線維化が強く、その中に多くの免疫細胞を含んでいるにも関わらず、免疫抑制の強い局所環境が特徴とされる[51]。今回我々の解析でも、腫瘍局所でFibroblastに関連する遺伝子発現が著明であった。また、癌の転移能と関連すると言われる上皮間葉移行（epithelial-mesenchymal transition）に関連する遺伝子群が高発現である方が予後不良であり、また、膵癌の発癌に深く関与しているKRASシグナル亢進に関連する遺伝子群は、有意ではないが、予後不良群で発現が高い傾向を認め、妥当な結果であると考えられた。



### <第3節 本研究の制限>

本研究では、約1年5ヶ月の症例集積期間で、採血追加という侵襲に対しての不同意や、同意を得たものの、術前膵癌と診断していたが術後診断が胆管癌など浸潤性膵管癌では無かった症例、また術中肝転移や播種などにより試験開腹となってしまった症例などが存在したため、解析できた症例数は19人分であり、少なかった。

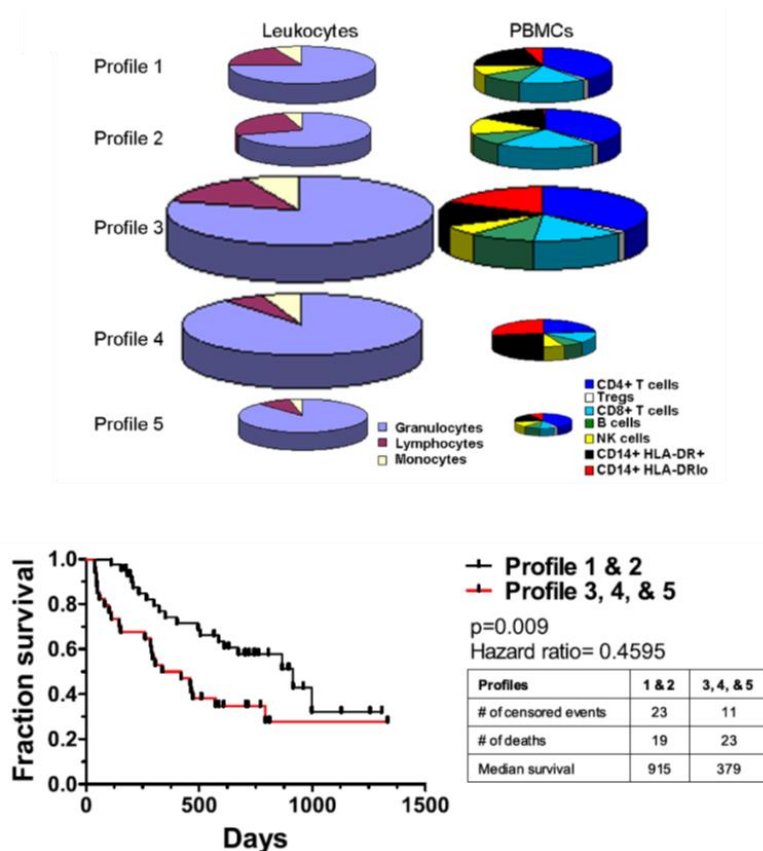
また、末梢血、膵癌組織をサンプルとする上で、検体採取や処理について注意を払って行った。末梢血は、採取後長時間放置してしまうと、細胞が傷んだり、液性因子が放出されたり、データが不安定化する可能性がある。また、特に膵癌腫瘍組織は、切除後経過時間と共にRNA破壊が進むため、可及的速やかに、解剖学的に小さな事が多い膵癌組織から一部を正確に採取し、RNA安定化試薬を浸透させる事が重要である。

本研究では、採血や手術など検体採取の場となる肝胆膵外科と、保存や解析の場となる免疫細胞治療学講座と、単施設内での連携により速やかに検体処理を行っており、解析症例数は少ないが、正確なデータを解析できたと考える。

なお、今回は術前1週間～術直前、及び、術後約4～6週間の2ポイントの末梢血を解析したが、術後さらに時間が経過した頃、各種術後補助療法の開始後、あるいは再発時など、更に経時的変化を追うことで、新しい情報を得ることができる可能性がある。

また、今回PBMC分画、血漿サイトカインについては単項目ごとに予後因子としての検討を行ったが、“免疫状態”の評価手法についても議論があり、各項目のバランスを検討する[52]等、多角的な分析も考えて行かなければならない。〈図19〉 今後は、さらに症例数を増やし、解析手法を工夫して比較、検討を行うことで、膵癌患者の免疫状態をより明確に特徴づけることが期待されるが、

遺伝子解析については今回GSEA法での解析を行ったが、今後は、National Cancer Institute (NCI) and the National Human Genome Research Institute (NHGRI)から提供されるThe Cancer Genome Atlas - Cancer Genome – TCGAなどのビッグデータを活用した検証が必要だと考えられる。



〈図19 免疫状態の評価手法例〉

## <第4節 今後の展望と総括>

### ●第1項 これまでの膵癌免疫療法●

膵癌組織には、免疫関連細胞が多く浸潤し、局所で免疫抑制的な環境が作られており、他癌腫とは異なるとされてきた。しかし、その免疫を抑制する細胞こそが、免疫治療の標的となり得るもので、悪性黒色腫や肺癌では免疫治療が大きな治療効果を得ている。

しかし膵癌では、免疫治療として抗CTLA-4や抗PD-1抗体を投与した臨床試験が行われてきたが、残念ながら予後改善の効果は得られなかった[10, 53]。膵がんでは、T細胞より、NK細胞が腫瘍内の免疫応答に深く関与しており、NK細胞が産生するIFN- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ が予後に相関していたことから、T細胞の免疫チェックポイント分子を標的とした治療より、NK細胞を活性化する治療による抗腫瘍効果の誘導が効果的かもしれない。ポリICやCpGなどの自然免疫系を活性化するTIRリガンドや、NK細胞を活性化する樹状細胞などを用いた免疫療法の効果が期待される。

## ●第2項 GEM化学療法と免疫細胞（活性化自己 $\gamma\delta$ T細胞）治療の併用による膵癌術後補助療法●

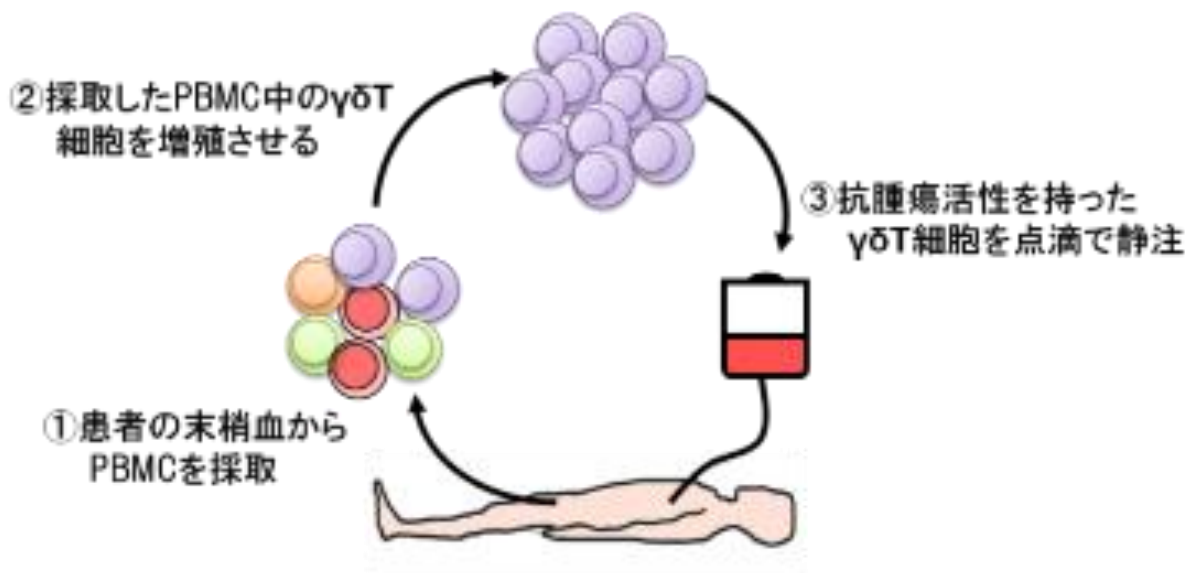
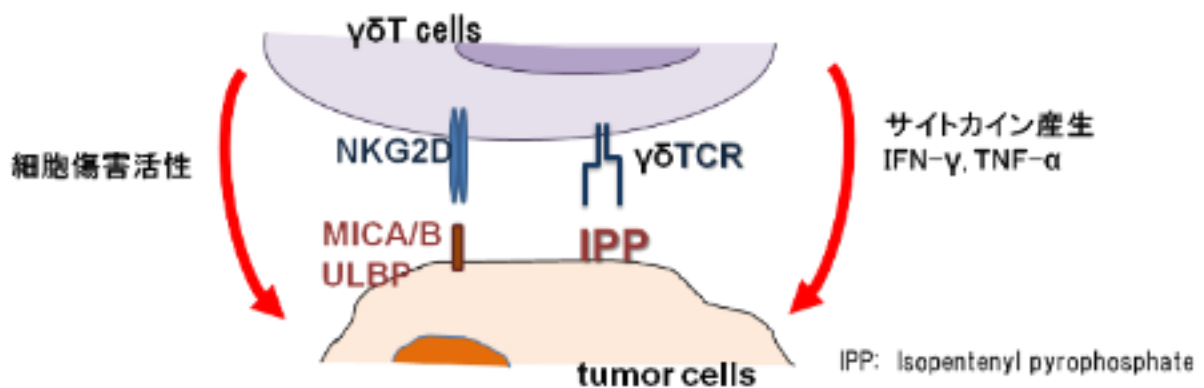
また、当科では、膵癌に対する新しい治療法として、抗癌剤であるGEMと、免疫細胞である活性化自己 $\gamma\delta$ T細胞を組み合わせた投与について、臨床試験を行った[54]。<

図20>

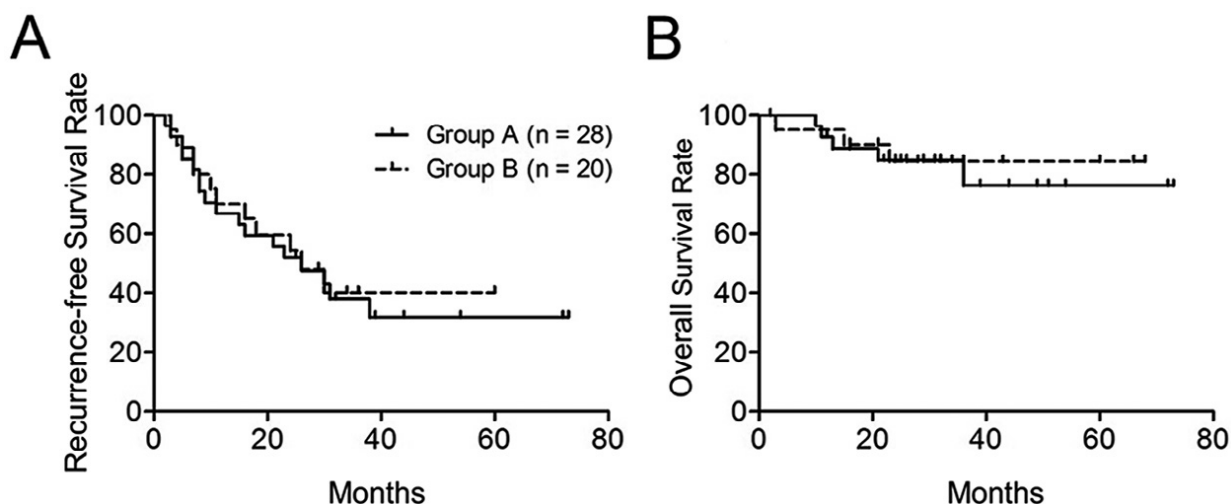
$\gamma\delta$ T細胞は、自らサイトカインを産生し、また抗腫瘍効果を有するサイトカインを産生する細胞を活性化するなど、従来の $\alpha\beta$ T細胞と似た機能を有しているが、抗原提示細胞のプロセッシングを受けない抗原をMHC非拘束的に認識するなど、 $\alpha\beta$ T細胞と異なる性質も有している。さらに、 $\gamma\delta$ T細胞は、サイトカインの産生を通して、 $\alpha\beta$ T細胞の反応を直接的或いは間接的にコントロールするものと考えられている。化学療法剤であるGEMは独自の殺細胞作用を示すが、癌細胞表面に $\gamma\delta$ T細胞が認識するストレス蛋白(MICA/BやULBPs)の発現をもたらし、 $\gamma\delta$ T細胞による腫瘍の認識と抗腫瘍活性を増強することが期待されることから、我々はGEMと活性化自己 $\gamma\delta$ T細胞の併用療法を臨床試験で行ってきた。更に、GEMには、抑制性T細胞などの癌が誘導する免疫抑制を解除する作用も知られていることから、免疫細胞治療との組み合わせに適した薬剤と考えられた[55-57]。（なお、この臨床試験は、GEMが術後補助化学療法として1st lineであった2012年に開始しており、2013年には新たにS-1の有用性が報告され[58]、こちらが1st lineとなった。しかし、消化器癌に対する、侵襲の大きな手術後、下痢や経口摂取不良を呈する症例も少なくなく、その場合には薬剤の特徴からS-1内服継続

は困難であるため、消化器系の副作用が少なく、また経静脈的投与であるGEMは引き続き膵癌治療のkey drugの一つではある。)

この結果、この臨床試験で、十分な $\gamma\delta$ T細胞の増殖が約60%の症例でしかみられないことが判明し、やはり膵癌患者では $\gamma\delta$ T細胞数あるいは活性化が抑制されている可能性があることが示唆されたが、免疫細胞治療併用による予後の改善は残念ながら得られなかった。<図21>



<図20>  $\gamma\delta$ T細胞治療併用療法



<図21>  $\gamma\delta$ T細胞治療併用療法(GroupA)とGEM単剤投与(GroupB)との予後比較

### ●第3項 これからの膵癌免疫療法●

膵癌腫瘍局所において、免疫細胞は周囲の間質や癌細胞と相互作用するため、これを解明していくことが、膵癌免疫治療の発展のために重要だと考えられる。

本研究の結果から、膵癌に対する腫瘍免疫には、T cellによる獲得免疫より、NK cellによる自然免疫が強く関連している可能性が示された。予後予測因子だけではなく、NK cellを中心とした自然免疫系を積極的に活性化する方法が、膵癌免疫治療として期待されるかもしれない。

### ●第4項 総括●

膵癌患者に対する膵切除術前後の末梢血を採取し、免疫関連細胞成分をフローサイトメーターで解析し、サイトカインやケモカインなどの免疫関連分子をマルチプレックスビーズアッセイで検出し、膵癌患者の手術前後のSystemicな免疫状態を検討した。

また、切除標本から膵癌腫瘍組織を一部採取し、次世代シーケンサーを用いて腫瘍内の遺伝子発現を解析し、膵癌の腫瘍局所の免疫環境を評価した。

まず、手術前後を比較すると、末梢血中の免疫細胞ではPBMC中のT細胞, CD4<sup>+</sup>T細胞,  $\gamma\delta$ T細胞割合、及びn+eTregとeTreg割合が術後に有意に減少し、血漿中のケモカインはIP-10が術後有意に上昇していた。

また、『術前』のNK細胞割合、『術後』のNK細胞割合、MIP-1 $\beta$ , IL-6, IL-9, IL-17Aが、予後良好群で有意に高値であり、『術後』のmonocyte割合は、予後不良群で有意に高値であった。

腫瘍内の遺伝子発現解析でも、予後良好群でNK cell浸潤が多い傾向を認め、IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 関連遺伝子の発現が有意に亢進していた。一方で予後不良群では、EMT関連遺伝子は有意に高発現、KRASシグナル亢進に関連する遺伝子群も高発現である傾向を認めた。

本研究の結果から、膵がんに対する腫瘍免疫には、T cellによる獲得免疫より、NK cellによる自然免疫が強く関連している可能性が示された。予後予測因子だけではなく、NK cellを中心とした自然免疫系を積極的に活性化する方法が、膵癌免疫治療として期待されるかもしれない。

## 引用文献

1. Niederhuber JE, Brennan MF, Menck HR. *The National Cancer Data Base report on Pancreatic cancer*. *Cancer*. 76(9): p.1671-7; 1995.
2. 最新がん統計 [http://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html)
3. Sharma C, Eltawil KM, Renfrew PD, Walsh MJ, Molinari M. *Advances in diagnosis, treatment and palliation of pancreatic carcinoma: 1990-2010*. *World J Gastroenterol*. 17(7): p.867-97; 2011.
4. 膵癌登録委員会. 膵癌全国登録調査報告. 膵臓. 16: p.115-47; 2001.
5. Burris III HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial*. *J Clin Oncol*. 15: p.2403-13; 1997.
6. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Guberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein WO, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H. *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial*. *JAMA* 297(3): p.267-277; 2007.



7. Uesaka K, Boku N, Fukutomi A, Okamura Y, Konishi M, Matsumoto I, Kaneoka Y, Shimizu Y, Nakamori S, Sakamoto H, Morinaga S, Kainuma O, Imai K, Sata N, Hishinuma S, Ojima H, Ojima H, Yamaguchi R, Hirano S, Sudo T, Ohashi Y, JASPAC 02 Study Group. *Adjuvant chemotherapy of S-1 versus gemcitabine for resected pancreatic cancer: a phase 3, open-label, randomized, non-inferiority trial (JASPAC 01)*. *Lancet*. 388: p.248-57; 2016.
8. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Inter-group. *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. *N Engl J Med*. 364(19): p.1817-1825; 2011.
9. Dougan M, Dranoff G. *Immune therapy for cancer*. *Annu Rev Immunol*. 27: p.83-117; 2009
10. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM. *Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer*. *N Engl J Med*. 366(26): p.2455-65; 2012.

11. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. *TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions.* Genome Biol. 14(4): R36; 2013.
12. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. *Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation.* Nat Biotechnol. 28: p.511-5; 2010.
13. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F, Selves J, Laurent-Puig P, Sautès-Fridman C, Fridman WH, de Reyniès A. *Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression.* Genome Biol. 17(1): p.218; 2016.
14. Reich M, Liefeld T, Gould J, Lerner J, Tamayo P, Mesirov JP. *GenePattern 2.0.* Nat Genet. 38(5): p.500-1; 2006.
15. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. *Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.* Proc Natl Acad Sci USA. 102(43): p.15545-50; 2005.
16. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesivov JP,

- Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. *PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately down-regulated in human diabetes*. *Nat Genet.* 34(3): p.267-273; 2003.
17. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. *The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection*. *Cell Syst.* 1(6): p.417-425; 2015.
18. 日本膵臓学会, 膵癌診療ガイドライン CQ DC1, p.48-53, 2016.
19. Perussia B. *Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines*. *Curr Opin Immunol.* 3(1): p.49-55; 1991.
20. Ksienzyk A, Neumann B, Nandakumar R, Finsterbusch K, Grashoff M, Zawatzky R, Bernhardt G, Hauser H, Kröger A. *IRF-1 expression is essential for natural killer cells to suppress metastasis*. *Cancer Res.* 71(20): p.6410-8; 2011.
21. Loos, T, Mortier A, Gouwy M, Ronsse I, Put W, Lenaerts JP, Van Damme J, Proost P. *Citrullination of CXCL10 and CXCL11 by peptidylarginine deiminase: a naturally occurring posttranslational modification of chemokines and new dimension of immunoregulation*. *Blood.* 112(7): p.2648–2656; 2008.
22. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. *Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins*. *Nature.* 315(6021): p.672–6; 1985.

23. Xu W, Joo H, Clayton S, Dullaers M, Herve MC, Blankenship D, De La Morena MT, Balderas R, Picard C, Casanova JL, Pascual V, Oh S, Banchereau J. *Macrophages induce differentiation of plasma cells through CXCL10/IP-10*. J Exp Med. 209(10): p.1813–23; 2012.
24. Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW and Goeddel DV. *Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes*. J Exp Med. 177(6): p.1821-26; 1993.
25. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. *Macrophage inflammatory protein-1*. Cytokine Growth Factor Rev. 13(6): p.455-81; 2002.
26. Mueller A, Strange PG. *The chemokine receptor, CCR5*. Int J Biochem Cell Biol. 36(1): p.35-8; 2004.
27. Rose-John S, Neurath MF. *IL-6 trans-signaling: the heat is on*. Immunity. 20(1): p.2-4; 2004.
28. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B. *Transforming growth factor- $\beta$  'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. Nat Immunol. 9(12): p.1341-6; 2008.

29. Matsuzawa S, Sakashita K, Kinoshita T, Ito S, Yamashita T, Koike K. *IL-9 enhances the growth of human mast cell progenitors under stimulation with stem cell factor*. J Immunol. 170(7): p.3461-7; 2003.
30. Nicolaides NC, Holroyd KJ, Ewart SL, Eleff SM, Kiser MB, Dragwa CR, Sullivan CD, Grasso L, Zhang LY, Messler CJ, Zhou T, Kleeberger SR, Buetow KH, Levitt RC. *Interleukin 9: a candidate gene for asthma*. Proc Natl Acad Sci USA. 94(24): p.13175-80; 1997.
31. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol. 25: p.821–52; 2007.
32. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. *The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation*. Immunity 28(4): p.454–67; 2008.
33. Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Mayer A, Deshpande AD, Carpenter D, Mitchem JB, Plambeck-Suess SM, Worley LA, Goetz BD, Wang-Gillam A, Eberlein TJ, Denardo DG, Goedegebuure SP, Linehan DC. *Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis*. Clin Cancer Res. 19(13): p.3404-15; 2013.
34. Stotz M, Szkandera J, Stojakovic T, Seidel J, Samonigg H, Kornprat P, Schaberl-Moser R, Seggewies F, Hoefler G, Gerger A, Pichler M. *The lymphocyte to monocyte ratio in pe-*

- ripheral blood represents a novel prognostic marker in patients with pancreatic cancer.*  
Clin Chem Lab Med. 53(3): p.499-506; 2015.
35. Sasaki A, Kai S, Endo Y, Iwaki K, Uchida H, Tominaga M, Okunaga R, Shibata K, Ohta M, Kitano S. *Prognostic value of preoperative peripheral blood monocyte count in patients with colorectal liver metastasis after liver resection.* J Gastrointest Surg. 11(5): p.596-602; 2007.
36. Sasaki A, Iwashita Y, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Kitano S. *Prognostic value of preoperative peripheral blood monocyte count in patients with hepatocellular carcinoma.* Surgery. 139(6): p.755-64; 2006.
37. Najera Chuc AE, Cervantes LA, Retiguin FP, Ojeda JV, Maldonado ER. *Low number of invariant NKT cells is associated with poor survival in acute myeloid leukemia.* J Cancer Res Clin Oncol. 138(8): p.1427-32; 2012.
38. Shafer D, Smith MR, Borghaei H, Millenson MM, Li T, Litwin S, Anad R, Al-Saleem T. *Low NK cell counts in peripheral blood are associated with inferior overall survival in patients with follicular lymphoma.* Leuk Res. 37(10): p.1213-5; 2013
39. Akagi J, Baba H. *Prognostic value of CD57(+) T lymphocytes in the peripheral blood of patients with advanced gastric cancer.* Int J Clin Oncol. 13(6): p.528-35; 2008.
40. Qiu H, Xiao-Jun W, Zhi-Wei Z, Gong C, Guo-Qiang W, Li-Yi Z, Yuan-Fang L, Rajiv-Prasad K. *The prognostic significance of peripheral T-lymphocyte subsets and nat-*

- ural killer cells in patients with colorectal cancer. Hepatogastroenterology. 56(94-95): p.1310-5; 2009.*
41. Che YQ, Feng L, Rong WQ, Shen D, Wang Q, Yang L, Qi J, Huang CZ. *Correlation analysis of peripheral blood T cell subgroups, immunoglobulin and prognosis of early hepatocellular carcinoma after hepatectomy. Int J Clin Exp Med. 7(11): p.4282-90; 2014.*
  42. Davis M, Conlon K, Bohac GC, Barcenas J, Leslie W, Watkins L, Lamzabi I, Deng Y, Li Y, Plate JM. *Effect of pemetrexed on innate immune killer cells and adaptive immune T cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. J Immunother. 35(8): p.629-40; 2012.*
  43. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. Annu Rev Immunol. 30: p.531-64; 2012.*
  44. Erdman SE, Rao VP, Olipitz W, Taylor CL, Jackson EA, Levkovich T, Lee CW, Horwitz BH, Fox JG, Ge Z, Poutahidis T. *Unifying roles for regulatory T cells and inflammation in cancer. Int J Cancer. 126(7): p.1651-65; 2010.*
  45. Gabrilovich DI, Nagaraj S. *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol. 9(3): p.162-174; 2009.*
  46. Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, Toyokawa H, Hirooka S, Yamaki S, Yui R, Yamao J, Kim S, Kwon AH. *Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer. Pancreas. 41: p.409-15; 2012.*

47. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science. 313(5795): p.1960-1964; 2006.
48. Ryschich E, Nötzel T, Hinz U, Autschbach F, Ferguson J, Simon I, Weitz J, Fröhlich B, Klar E, Büchler MW, Schmidt J. *Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma*. Clin Cancer Res. 11: p.498-504; 2005.
49. Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, Kato K, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. *CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma*. Pancreas. 28(1): e26-31; 2004.
50. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. *Type I interferons in anticancer immunity*. Nat Rev Immunol. 15(7): p.405-14; 2015.
51. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y, Hiraoka N. *Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer*. Br J Cancer. 108(4): p.914–23; 2013.



52. Gustafson MP, Lin Y, LaPlant B, Liwski CJ, Maas ML, League SC, Bauer PR, Abraham RS, Tollefson MK, Kwon ED, Gastineau DA, Dietz AB. *Immune monitoring using the predictive power of immune profiles*. J Immunother Cancer. 27: p.1-7; 2013.
53. Royal RE, Levy C, Turner K, Mathur A, Hughes M, Kammula US, Sherry RM, Topalian SL, Yang JC, Lowy I, Rosenberg SA. *Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma*. J Immunother. 33(8): p.828–833; 2010.
54. Aoki T, Mtsushita H, Hoshikawa M, Hasegawa K, Kokudo N, Kakimi K. *Adjuvant combination therapy with gemcitabine and autologous  $\gamma\delta$  T-cell transfer in patients with curatively-resected pancreatic cancer*. Cytotherapy. (Epub ahead of print) 2017.
55. Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zöller M. *Potential of human T lymphocytes for immunotherapy of cancer*. Int J Cancer. 112: p.727-32; 2004.
56. Kakimi K, Matsushita H, Murakawa T, Nakajima J.  *$\gamma\delta$ T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer*. Transl Lung Cancer Res. 3(1): p.23-33; 2014.
57. Miyashita T, Miki K, Kamigaki T, Makino I, Nakagawara H, Tajima H, Takamura H, Kitagawa H, Fushida S, Ahmed AK, Duncan MD, Harmon JW, Ohta T. *Low-dose gemcitabine induces major histocompatibility complex class I-related chain A/B expression and enhances an antitumor innate immune response in pancreatic cancer*. Clin Exp Med. 17(1): p.19-31; 2017.

58. Maeda A, Boku N, Fukutomi A, Kondo S, Kinoshita T, Nagino M, Uesaka K. *Randomized phase III trial of adjuvant chemotherapy with gemcitabine versus S-1 for patients with resected pancreatic cancer (JASPAC-01 study)*. J Clin Oncol. 38(3): p.227-9; 2008.

## 本研究の公表について

本研究の結果は以下の形で公表した（筆頭著者・演者は申請者）。

1) 2015年4月16日 第115回日本外科学会 口演

「膵癌患者の免疫モニタリング及び予後予測バイオマーカーの検討」

共著者：青木琢、松下博和、金子順一、阪本良弘、菅原寧彦、長谷川潔、垣見和宏、

國土典宏

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、ご指導を頂いた指導教官である、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻 肝胆膵外科学/人工臓器・移植外科学 教授 國土典宏先生に深く感謝致します。

また、同じく本研究の遂行、論文作成に際し、獨協医科大学医学部第二外科学 教授 青木琢先生に、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。さらに、不慣れだった実験作業や免疫学的解析や議論に関して、東京大学医学部附属病院 免疫細胞治療学講座 特任教授 垣見和宏先生にも様々なご指導を頂きました。ここに感謝の意を表します。

なお、実験作業や免疫学的解析においては、垣見先生のご指導の下、免疫細胞治療学講座 特任講師 松下博和先生を始めとする講座研究員及びスタッフの皆様に、貴重なお時間を割いてご協力頂き、感謝申し上げます。また、國土先生のご指導の下、リサーチカンファレンス等では多くの知識や経験に基づき客観的かつ的確なアドバイスを頂いた、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻 肝胆膵外科学/人工臓器・移植外科学の長谷川潔准教授、阪本良弘准教授、有田淳一講師、赤松延久講師、金子順一講師を始めとする、医局員の皆様に感謝致します。