

論文の内容の要旨

<論文題目> 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

<氏名> 星川 真有美

<要旨>

【目的】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である。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、術後早期に再発、転移する症例が多く、術後補助化学療法が進歩した現在でも、他の癌種に比して予後は不良である。近年S-1やFOLFIRINOXという化学療法による予後改善が示されたが、有害事象も多く、膵癌のさらなる予後の改善のためには、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。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おり、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。そこで今回、膵癌患者の免疫状態を術前と術後にモニタリングし、末梢血及び膵癌腫瘍組織における各免疫学的マーカーの予後との関連を検討した。

【方法】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、本研究参加に同意を得られ、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。

術前後2点で末梢血を採取し、PBMC(peripheral blood mononuclear cell)中の免疫細胞（単球、B細胞、T細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞、effector Treg、Naïve Treg）、の分画を測定した。

CD4⁺T細胞およびCD8⁺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、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 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IFN- γ , TNF- α 、ケモカイン: MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-8, IP-10、増殖因子: GM-CSF, FGF basic, VEGF, PDGF-BB, G-CSF)について測定し、手術前後での変化と、また各項目の測定結果と予後との相関を解析した。

さらに、切除した膵癌組織の一部を採取し、十分量のRNAを抽出できた17症例において、次世代シーケンサーを用いたRNA-Seq解析による遺伝子発現の解析を行い、腫瘍浸潤リンパ球を評価、また、GSEA法で遺伝子発現の特徴を評価した。

【結果】 全19症例の内訳は、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例であった。術後補助療法の内訳は、GEM(gemcitabine)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。2016年9月の予後確認時、全症例で再発を認め、手術日からの無再発生存期間(RFS)は97～951日（中央値426日）であった。予後解析において、RFS 426日未満の早期再発症例を予後不良群(n=9)、RFS 426日以上での再発の遅い症例を予後良好群(n=10)として解析を行った。

まず術前後を比較すると、術後には、末梢血PBMC中T細胞、CD4⁺T細胞、及び $\gamma\delta$ T細胞割合が、術前より有意に減少した(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)。サイトカイン・ケモカイン・増殖因子については、IP-10のみが、術後有意に上昇した(P=0.012)。

次に予後を検討すると、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く(P=0.037)、

『術後』では末梢血PBMC中のNK細胞割合が有意に多い(P=0.031)ことに加え、単球割合が有意に少なかった(P=0.037)。末梢血血漿中のサイトカイン・ケモカイン・増殖因子について、予後良好・不良両群間で有意差を認める『術前』値は無かったが、『術後』では、予後良好群で、血漿中のMIP-1 β 、IL-6、IL-17a、IL-9濃度が有意に高かった(P=0.016, 0.0061, 0.024, 0.013)。他の因子は予後と関連しなかった。

さらに、腫瘍局所の遺伝子発現の解析法として、MCP counterを用いて算出した腫瘍浸潤リンパ球 scoreにおいて、予後良好群では、腫瘍浸潤NK細胞が多い傾向を認めた(P=0.058)。GSEA法により、膀胱癌腫瘍組織内の遺伝子発現パターンについて検討した結果、予後良好群で、IFN- α 及びIFN- γ の免疫応答に関連する遺伝子群が、有意に高発現を呈し、予後不良群では、上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition: EMT)に関連する遺伝子群が、有意に高発現を呈していた。膀胱癌の発癌に関与している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。

【結語】本研究の結果から、膀胱癌に対する腫瘍免疫には、T cellによる獲得免疫に比し、NK cellによる自然免疫がより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、膀胱癌免疫治療として期待されるかもしれない。