

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15811

研究課題名（和文）超音波内視鏡下穿刺吸引生検による膵癌局所リンパ球の解析

研究課題名（英文）Analysis of locally infiltrative lymphocytes in pancreatic cancer collected by endoscopic ultrasonography guided fine needle aspiration.

研究代表者

吉岡 鉄平（Yoshioka, Teppei）

大阪大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：60814605

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌は予後不良で化学療法・免疫療法の確立が急務である。免疫チェックポイント阻害薬は膵癌に効果が乏しいとされているが、一部の膵癌では免疫原性があり、その効果が期待できる可能性が示唆されている。今回、超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診で得られた膵癌の残余検体から、腫瘍浸潤リンパ球を単離し、免疫チェックポイント分子の発現を解析した。これまでに9例で同意を取得し、末梢血リンパ球とFNA検体からリンパ球を単離した同一症例において、PD-1の発現は末梢血リンパ球に比べて局所リンパ球で高かった。引き続きEUS-FNA検体の収集し解析を継続することで、免疫原性の強い膵癌を同定する一助になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診で得られた膵癌検体から腫瘍に浸潤するリンパ球を単離し、免疫チェックポイント分子の発現を解析した。さらに症例を集積することで、免疫チェックポイント阻害薬の効果が期待できる可能性のある免疫原性膵癌の同定につながる可能性がある。また、末梢血リンパ球とFNA検体からリンパ球を単離した同一症例において、PD-1の発現は末梢血に比べて局所で高かった。同一個体における末梢血リンパ球と膵癌局所のリンパ球を単一細胞解析などを追加し比較することで、膵癌の病態解明に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer has a poor prognosis and there is an urgent need to establish chemotherapy and immunotherapy. Immune checkpoint inhibitors are said to be poorly effective against pancreatic cancer, but some pancreatic cancers are immunogenic, suggesting that their effects can be expected. In this study, we isolated tumor-infiltrating lymphocytes from residual specimens of pancreatic cancer obtained by EUS-FNA and analyzed the expression of immune checkpoint molecules. Up to now, we have obtained consent in 9 cases. PD-1 expression was higher in tumor-infiltrating lymphocytes than in peripheral blood lymphocytes. It was suggested that the subsequent collection and analysis of EUS-FNA samples may help identify pancreatic cancer with high immunogenicity.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 EUS-FNA PD-1

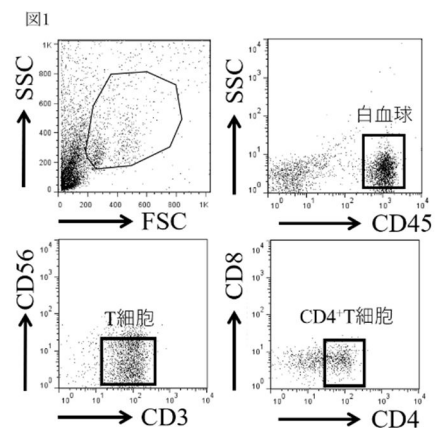
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は極めて予後不良な悪性腫瘍で、手術症例を含めても5年生存率は5-10%とされている。化学療法に対する抵抗性も強く、強力な多剤併用化学療法 (FOLFIRINOX 療法) でも、遠隔転移を有する症例において生存期間中央値は11.1か月 (J Clin Oncol 2013) と、満足な効果は得られておらず、新たな治療法の開発が急務である。

近年、癌免疫編集という概念が提唱され、腫瘍による宿主免疫からの回避機構の一部が明らかにされている。その回避機構の一つである免疫チェックポイント分子を標的とした免疫療法が開発され、2014年の悪性黒色腫に対するニボルマブの保険承認をはじめとして、様々な癌種で注目されている。本薬剤は悪性黒色腫や腎細胞癌などの免疫原性が高度な癌種に対して効果を発揮しやすい。また大腸癌の10-20%にみられるミスマッチ修復遺伝子欠損例では、腫瘍の免疫原性が高度で、本薬剤の効果が発揮されやすいことも報告されている (N Engl J Med 2015)。すなわち、同じ癌種でも免疫チェックポイント阻害薬の効果が発揮されやすい患者群が存在する可能性があり、その効果は腫瘍の免疫原性に関連している。

膵癌はKRAS, CDKN2A, TP53, SMAD4の変異が高率である一方、比較的均一な遺伝学的背景をもつ癌で、そのため免疫チェックポイント阻害薬の効果が乏しいと考察されている。一方、膵癌に対する全ゲノム解析により、膵癌は扁平上皮型・膵前駆細胞型・内外分泌異常分化型・免疫原性型に分類され、特に免疫原性型では腫瘍浸潤リンパ球における免疫チェックポイント分子の発現が高い場合、予後不良であることが報告されている (Nature, 2016)。これらの既報から、膵癌にも免疫療法の効果が発揮されやすい症例群が存在する可能性があり、末梢や腫瘍局所のリンパ球解析を行うことで、予後予測や個別化治療につながる可能性がある。しかし膵癌は進行が非常に早く、発見時には肝転移等で切除不能である症例が過半数を占め、切除検体を採取できないため、膵癌局所のリンパ球を解析することは困難であった。



### 2. 研究の目的

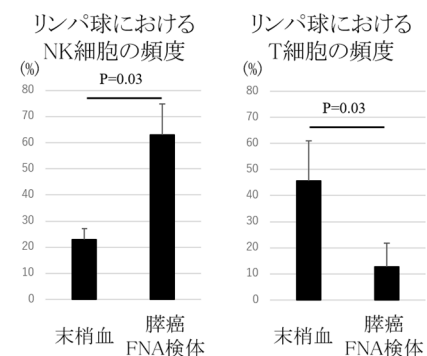
超音波内視鏡下穿刺吸引生検 (EUS-FNA) の進歩によって、膵癌治療前に組織を採取して病理学的悪性の診断を行うことが一般的となっている。本検討では、膵癌 FNA 検体を用いて腫瘍局所に浸潤するリンパ球を単離し、免疫チェックポイント分子の発現を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) CD45 をターゲットとする磁気分離法による positive selection に加えてフローサイトメトリーの死細胞除去、ソーティングシステムを用いることで、安定して膵癌 FNA 検体より腫瘍局所リンパ球が抽出できるかを検証した。

(2) 単離した腫瘍局所リンパ球と、従来法 (比重遠心分離法) で単離したヒト末梢血単核球において、リンパ球マーカーである CD3/CD56/CD4/CD8 及び免疫チェックポイント分子である PD-1/Tim-3 の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。

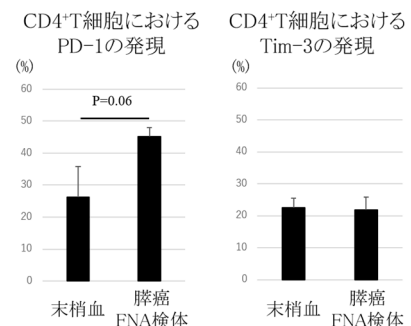
図2



### 4. 研究成果

(1) 溶血処理時間によっては細胞の回収が困難な場合があったが、コラゲナーゼ処理や DNase の添加、7-AAD による死細胞除去を加えることで、比較的安定して CD45<sup>+</sup>白血球を単離することができた (図1)。これまでに9例で同意を取得し、単離できた腫瘍局所リンパ球とヒト末梢血由来単核球を超低温フリーザーで保存している。今後、同一症例由来の腫瘍局所と末梢血のリンパ球を集積し、膵癌の免疫回避機構の病態解明を目指してマイクロアレイや単一細胞解析で比較することを検討している。

図3



(2) 実際に表面抗原や免疫チェックポイント分子を測定した検体は一部であるが、リンパ球を分母とした CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK 細胞の頻度は膵癌 FNA 検体の方が末梢血よりも高かった。逆に CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>T 細胞の頻度は末梢血よりも膵癌 FNA 検体で低下していた (図2)。また、CD4<sup>+</sup>T 細胞における免疫チェックポイント分子の解析で、Tim-3 の発現は末梢血と膵癌 FNA 検体

で有意差は認めなかったが、PD-1 の発現は末梢血よりも腫瘍 FNA 検体で増加傾向にあり、癌局所において、宿主免疫応答が抑制されている可能性が示唆された (図 3)。今後は腫瘍局所リンパ球において細胞傷害活性マーカーである CD107a や細胞内染色を用いた IFN- $\gamma$  などの測定を行うことで、リンパ球の機能解析も検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----