

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07008

研究課題名(和文) 膵がん組織3次リンパ装置の形成・維持に関する研究

研究課題名(英文) Formation and maintenance of tertiary lymphoid organs

研究代表者

平岡 伸介 (Hiraoka, Nobuyoshi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・科長

研究者番号：40276217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん微小環境はがんの生物学的特性に寄与する。本研究では膵がん組織内に形成される2タイプの3次リンパ装置について比較検討し、いずれの形成・維持にも神経系との関連性の高いことが示唆された。膵がん組織内神経束変化について検討すると、膵がん組織内で神経束密度は有意に減少し、神経束密度低下は独立した予後不良因子であった。神経束の減少の原因とがん浸潤能との関係が示唆されると共に、3次リンパ装置形成・維持機序との関連性も示唆された。また膵がん組織と膵非腫瘍性慢性炎症組織での3次リンパ装置形成には共通点・非共通点が見出され、各組織に特異的な制御機序の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

がん微小環境はがんの生物学的特性の決定に寄与し、その形成機序の解明はがんの生物学の解明とがん治療の標的探索に重要である。本研究では難治性膵がんを対象に、がん微小環境における3次リンパ装置に注目し、その形成・維持と神経との関係、またがん微小環境の神経変化について検討し、これまで知られていなかった事象を新しく見出した。3次リンパ装置形成は免疫治療奏功性の予測や奏功性指標となる。本研究により発見された事象をさらに深く検討することにより、膵がんの診断・治療効果の向上につながるものが期待される。難治性膵がんの治療選択肢が広がるようになれば、国民の保険・医療に寄与するところが大きい。

研究成果の概要(英文)：The cancer microenvironment contributes to the biological characteristics of cancer. In this study, we compared two types of tertiary lymphoid organs (TLOs) formed in pancreatic cancer tissues, and suggested that the formation and maintenance of both types of TLOs are highly related to the nervous system. Examination of nerve alterations in pancreatic cancer tissues showed that nerve fiber density was significantly decreased in pancreatic cancer tissues, and decreased nerve fiber density was an independent poor prognostic factor. It was suggested that the cause of the decrease in nerve fibers was related to the invasive capacity of the cancer and also to the mechanism of formation and maintenance of the TLOs. In addition, common and uncommon features were found in the formation of the TLOs in pancreatic cancer tissues and non-neoplastic chronic inflammatory tissues, suggesting the possibility of a regulatory mechanism specific to each tissue.

研究分野：がん微小環境

キーワード：膵がん 腫瘍免疫 免疫微小環境 神経 3次リンパ装置

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの重要な生物学的特性は、がん細胞、がん間質、または両者の相互作用によって規定される。がん間質を構成する一員として免疫担当細胞があり、それによるがん微小環境に与える影響は大きく、このがん免疫微小環境が形成される分子機構を理解し、それをコントロールすることが出来れば、新たながん治療に繋がるものと確信される。

研究者はこれまで、がん免疫微小環境に注目し、特にヒト膵がんを中心に進行がんと発がん・進展過程における宿主免疫応答性の変化について、臨床病理学的観点や分子機序の観点から研究を続けてきた。最近 3 次リンパ装置について、膵がん約 500 症例で検討したところ(Br J Cancer 112;1782,2015, Front Immunol 7;244,2016)、3 次リンパ装置は膵がん周囲に組織に高頻度に形成される一方で、膵がん組織内に形成されるものは少数症例であるがハザード比の高い予後良好な因子になることが明らかとなった。また 3 次リンパ装置形成は、その存在が活動的な免疫反応因子と関連し、また有効なワクチン療法により膵がん組織に誘導されることから(Cancer Immunol Res 2;616:2014)、活動性抗腫瘍免疫と深く関連している。興味深いことに、膵組織内の 3 次リンパ装置は、その 90%以上が動静脈の走行する膵小葉間結合織に限って形成されていた。3 次リンパ装置形成には、適当な免疫環境のみならず、基盤となる組織構築が必要と考えられた。

3 次リンパ装置は、がんの他、自己免疫疾患や感染症などの慢性炎症を呈する様々な臓器に誘導され、被膜を有さずリンパ節様構造を呈し、機能的にはリンパ節やパイアーズパッチを含む 2 次リンパ装置と同様に免疫反応を制御していると推定され、またその形成機序も胎生期 2 次リンパ装置形成に準えて推定されている。しかしながら、その形成・維持機序は不明な点が多い。これら形成・維持の理解が深まれば、慢性炎症の病理学的機序の一端に迫れると共に、がん免疫活性化手段の一助となつてがん免疫療法に役立つことが期待される。

2. 研究の目的

本研究ではがん組織の 3 次リンパ装置形成・維持機序の解明とその制御の理解を目指し、これを通じてがん免疫微小環境の理解を深めることを目的とする。特に本研究では、免疫学的視点のみならず、これまでの形態学的観察に基づく病理学的視点からアプローチしていく。はじめに膵がん組織に誘導される 2 タイプの 3 次リンパ装置における形成・維持機序の比較解析を行い、そこで得られた結果から神経系と 3 次リンパ装置形成の関係性が強いことが示唆されたことから、膵がん組織と神経との関係についての理解が求められた。そこでこれら問いに答えることから検討を実施した。

3. 研究の方法

網羅的遺伝子発現解析：当センターにて外科切除された新鮮膵がん組織を OCT コンパウンドを用いて凍結組織を作成し、10 μ m 厚凍結組織切片の薄切、Hematoxylin & Eosin 染色後、3 次リンパ装置組織をレーザーマイクロダイセクションにより選択的に切り出し回収した。これら 3 次リンパ装置組織から全 RNA を抽出し、Rib-SPIA 増幅法(NuGEN Technologies)により増幅後、SurePrint G3 (Agilent 社)を用いマイクロアレイ解析を実施した。遺伝子発現データは GeneSprings (Agilent 社)により解析した。

免疫組織化学：膵がん組織新鮮凍結切片および膵がん外科切除症例のホルマリン固定・パラフィン包埋組織切片を用いて、ABC 法により免疫組織化学を実施した。神経束は growth

associated protein 43(GAP-43, Merck 社)の発現により同定した。一次抗体(-)を陰性コントロールとした。免疫染色後、組織切片はホールスライドイメージングとして画像ファイルに変換され (NanoZoomer 2.0-HT, 浜松ホトニクス)、必要に応じて画像解析ソフト (Tissue Studio, Definiens, Germany) を用いて画像解析を実施した。

臨床病理学的解析：臨床病理学患者情報を医療記録より取得し、統計学的解析(SPSS, IBM)を用いて対象因子と比較検討した。

4. 研究成果

A. 膵がん組織に形成される2タイプの3次リンパ装置の遺伝子発現様式の比較

膵組織および膵がん組織内に誘導される3次リンパ装置はその大部分が小葉間結合織内に形成されるが、稀に太い膵管の粘膜固有層にも形成される。これらは恰も2次リンパ装置のリンパ節とパイアーズパッチのような粘膜リンパ装置に形態学的・存在部位的に対応が推定され、これら2型を以下、小葉間型と粘膜型と呼ぶ。2型の違いを見るために、各3次リンパ装置を膵がん新鮮凍結組織から microdissection 後、網羅的遺伝子発現解析を実施したところ、免疫関連遺伝子発現には差がなく免疫機能に差がないことが予想された。しかし、粘膜型は小葉間型に比して神経系細胞に関連する遺伝子 X の発現が有意に高いことがわかった。一方で、ほぼ全ての3次リンパ装置には末梢神経が貫通していることが観察され、3次リンパ装置形成・維持と神経との関係性が高いことが示唆される。胎生期2次リンパ装置形成の分子機序は多段階であり、神経や神経からの分泌分子を介する段階が存在し、またリンパ節とパイアーズパッチの形成間で共通機序と特有機序が存在する。遺伝子 X はその既知分子機能も考慮し、膵管粘膜固有層の3次リンパ装置の形成・維持機序等に特有に働く可能性を推定し、現在さらに解析している。

B. 膵がん組織の神経

次に膵がん組織と神経の関係について317症例の膵がん外科切除検体を用いて検討を行った。

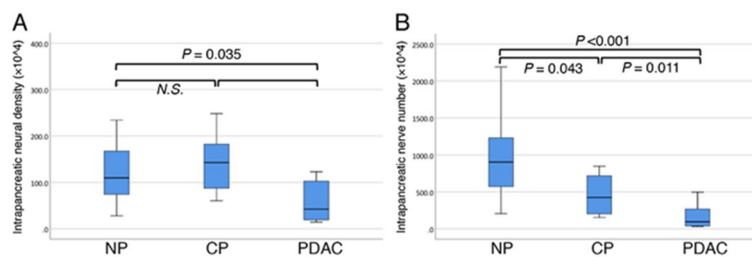


図1 健常膵組織(NP)、慢性膵炎組織(CP)、および膵がん組織(PDAC)における神経束密度(A)、神経束数(B)の比較

膵がん組織内に3次リンパ装置存在症例は有意に多くの神経束が存在していた。膵がん組織・慢性膵炎組織内で小葉間結合織を走行する神経束は過形成を呈する一方で、膵がん組織では特徴的に神経束密度の減少が目立った(図1)。神経束の減少は腫瘍中心部に行くほど顕著であり、腫瘍辺縁部では緩徐であった。

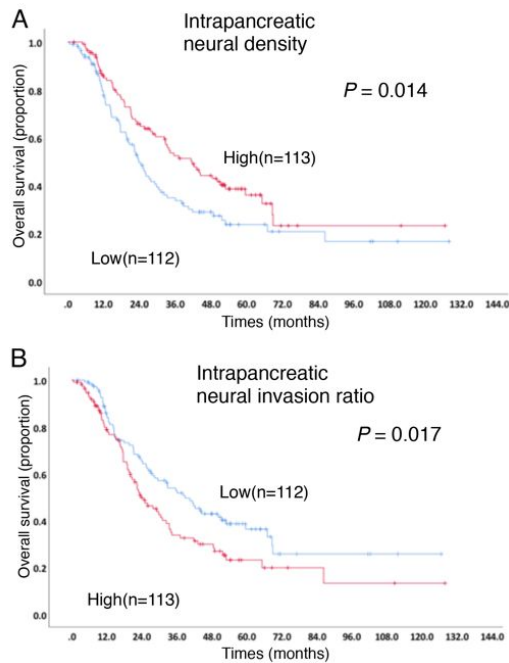


図2 Kaplan-Meier 生存曲線。症例を各因子の高値群(赤)・低値群(青)の2群に中央値で分けて比較検討した。

膵がん 256 症例コホートを用いて Kaplan-Meier 生存解析の結果、膵がん組織内神経束密度の低い症例は高い症例に比して有意に全生存が短く ($P = 0.014$)(図 2 A)、また膵がん組織内の神経束でがん細胞浸潤の割合が高い症例は低い症例に比して有意に全生存が短かった($P = 0.017$)(図 2 B)。次に臨床病理学的 19 因子について Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析の結果、血清 CA19-9 値、リンパ節転移、膵外神経束浸潤、組織学的膵がん細胞グレード、外科切除断端状態、アジュバント化学療法、膵がん組織内

神経束密度($P = 0.04$; HR = 1.496; 95% CI 1.018-2.199)が独立した予後因子であった。神経束密度の低い症例は高い症例に比して無病生存が短い傾向にあった($P = 0.089$)が、その他の神経関連因子と予後との関係性は見られなかった。また膵がん組織内神経束密度と臨床病理学的因子との関係性を調べたところ、組織学的膵がん細胞グレード、膵内神経浸潤、膵内神経束数、膵がん組織内の神経束でがん細胞浸潤の割合と有意に高い関連性を示した。以上の結果は膵がん 81 症例の別コホートにて確認された。神経束の減少は腫瘍中心部で顕著、腫瘍辺縁部で緩徐の傾向にあり、神経束の減少の原因とがん浸潤能との関係が示唆されると共に、3 次リンパ装置形成・維持機序との関連性も示唆された。

C. 膵慢性炎症組織における 3 次リンパ装置形成

3 次リンパ装置形成と組織構築との関係を更に検討するため、3 次リンパ装置形成を伴う非腫瘍性慢性炎症組織について解析した。慢性炎症巣において形成される 3 次リンパ装置は膵がん同様に神経と動静脈の走行する膵小葉間結合織に形成されるものが多く観察された。さらに、炎症の中心が膵管である炎症では膵管壁にも 3 次リンパ装置が形成されること、太い膵管粘膜内にも 3 次リンパ装置が形成されることがわかった。

今後さらに膵がん組織の 3 次リンパ装置形成・維持機序の解明とその制御の理解を深めるため検討を続ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hiraoka N, Ino Y, Hori S, Yamazaki-Itoh R, Naito C, Shimasaki M, Esaki M, Nara S, Kishi Y, Shimada K, Nakamura N, Torigoe T, Heike Y.	4. 巻 111
2. 論文標題 Expression of classical HLA class I antigens, HLA-E, and HLA-G is adversely prognostic in pancreatic cancer patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3057-3070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14514.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Iwasaki T, Hiraoka N, Ino Y, Nakajima K, Kishi Y, Nara S, Esaki M, Shimada K, Katai H.	4. 巻 110
2. 論文標題 Reduction of intrapancreatic neural density in cancer tissue predicts poorer outcome in pancreatic ductal carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1491-1502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ino Y, Oguro S, Yamazaki-Itoh R, Hori S, Shimada K, Hiraoka N	4. 巻 10
2. 論文標題 Reliable evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in pancreatic cancer tissue biopsies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1149-1159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima K, Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Naito C, Shimasaki M, Takahashi M, Esaki M, Nara S, Kishi Y, Shimada K, Hiraoka N.	4. 巻 9
2. 論文標題 IAP inhibitor, Embelin increases VCAM-1 levels on the endothelium, producing lymphocytic infiltration and antitumor immunity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncoimmunology	6. 最初と最後の頁 1838812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2020.1838812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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
研究分担者	中嶋 幸生 (Nakajima Kosei) (80785775)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員 (82606)	
研究分担者	石川 義典 (猪野義典) (Ishikawa Yoshinori) (90291137)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員 (82606)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------