

## 主論文の要旨

# Profiling the Tumour Immune Microenvironment in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms with Multispectral Imaging Indicates Distinct Subpopulation Characteristics Concordant with WHO 2017 Classification

多重免疫染色法を用いた膵神経内分泌腫瘍における  
免疫微小環境のプロファイリングはWHO2017分類と  
一致した亜集団の特徴を有することを示唆する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

高橋 大五郎

## 【緒言】

膵神経内分泌腫瘍（以下、pNENと略記）は膵腫瘍のうち2-5%を占める稀な疾患であるが、その頻度は近年増加傾向にある。pNENは2017年のWHO分類において細分化され、2010年のWHO分類におけるNEC G3が、形態学的特徴によりNET G3とNECに分けられた。これにより予後が反映され、組織分類に基づいた治療が可能となることが期待されている。

近年、様々ながん種において免疫チェックポイント阻害抗体の有効性が報告され、がん免疫療法は第4のがん治療として注目を浴びているが、通常型膵癌（以下、PDACと略記）においてはその有効性は示されていない。また、これまでにpNENの免疫微小環境についての包括的検討の報告は無く、免疫療法の有効性は示されていない。

今回我々は、pNENの免疫微小環境の特徴を明らかにすることを目的に、多重免疫染色を用いて包括的に解析を行い、PDACと比較検討した。また、pNENの腫瘍内免疫の重要性を評価することを目的に、免疫微小環境と臨床病理学的因子との関連について検討した。

## 【対象および方法】

1994年から2016年に切除されたpNEN52例およびPDAC18例を対象とした。手術検体のホルマリン固定パラフィン包埋標本から未染プレパラートを作成し、Opal IHC kit(Perkin Elmer社)を用いて、TSA増感法によって多重免疫染色を行った。1次抗体として、CD3、CD4、CD8、CD20、CD204、PD-1、PD-L1、Cytokeratinを用いて染色した。

染色したプレパラートは定量的病理画像解析システム：Vectra(Perkin Elmer社)を用いて撮像し、組織標本解析ソフトウェア：InForm(Perkin Elmer社)を用いて画像解析を行い、定量化した。数値データとして収集した免疫細胞浸潤の各因子と臨床病理学的因子との関連を解析した。

## 【結果】

pNEN52例とPDAC18例の特徴を表1に示す。年齢中央値はpNENでは56.0歳、PDACでは69.5歳であった。領域リンパ節転移はpNENでは17例に、PDACでは9例に認められた。pNEN52例のうち、NET G1は32例、G2は15例、G3は3例、NECは2例であった。

免疫細胞の局在と臨床病理学的な特徴との相関を見るために、pNEN52例におけるそれぞれの免疫細胞のパラメーターを上皮領域および間質領域にわけ、発現数を高値群、低値群に中央値で2分し、Grade、Stageとの相関について検討した(表2)。その結果、上皮領域の免疫細胞の発現数が、よりGradeやStageと相関していたため、本研究では上皮領域の免疫細胞発現について着目し、その後の解析を行った。

図1は代表的な多重染色像を示している。個々の免疫細胞および、その共発現が視覚的にもとらえることができる。

pNEN52例およびPDAC18例の免疫細胞発現についての主成分分析を図2に示す。NET(G1-G3)、NEC、およびPDACの3つの集団に分けられることが示され、これは組織

型に基づいた分類と一致していた。

図3は個々の免疫細胞の発現数を、PDAC、NET(G1-G3)、NECに分けて示している。いずれの免疫細胞においてもNETでは発現数が少なくNECで最も多いことが示された。

図4はNETにおける免疫細胞の発現数をGrade別に示している。PD-1<sup>high</sup>T細胞、PD-L1<sup>high</sup>2型マクロファージの発現数はGradeと相関していた。

表3はpNENにおける無再発生存期間(RFS)の単変量解析および多変量解析を示している。単変量解析において、リンパ節転移、Grade、Stage、PD-1<sup>high</sup>T細胞発現高値、PD-L1<sup>high</sup>2型マクロファージ発現高値がリスク因子であり、多変量解析ではStageのみがリスク因子であった。

表4はpNENにおける全生存期間(OS)の単変量解析および多変量解析を示している。単変量解析において、Grade、PD-1<sup>high</sup>T細胞発現高値がリスク因子であり、多変量解析では有意なリスク因子を認めなかった。

図5は、pNENにおけるPD-1<sup>high</sup>T細胞およびPD-L1<sup>high</sup>2型マクロファージの発現数とRFS、OSとの関係についての生存曲線を示している。PD-1<sup>high</sup>T細胞、PD-L1<sup>high</sup>2型マクロファージはRFSと有意に相関し、PD-1<sup>high</sup>T細胞はOSと有意に相関していた。

## 【考察】

pNENの組織分類は最近改訂が行われ、WHO 2017分類においてpNENは形態学的に高分化なNETと低分化なNECに分類され、NETはmitotic indexとKi-67値によりG1からG3に分類されることとなった。pNENの悪性度についてはKi-67値の他にCK19、p27、KITが予後因子であることが知られているが、これらは必ずしも治療効果を反映しているわけではない。

がん免疫療法は第4のがん治療として注目を浴びており、様々ながんにおいて腫瘍免疫微小環境ががんの進展や治療抵抗性に関与していることが示されてきたが、pNENにおいてはこれまでに免疫微小環境についての包括的検討の報告は無く、その特徴はよくわかっていなかった。そこで、本研究においてpNENの免疫微小環境を包括的に解析し、臨床病理学的因子との関連について検討した。

本研究においては免疫細胞の発現について多重免疫染色を用いて検討を行った。PD-1やPD-L1は免疫細胞以外の細胞にも発現するが、多重免疫染色を行うことでCD3とPD-1の共発現や、CD204とPD-L1の共発現をより客観的にとらえることができ、その結果はNETのGradeとの相関やpNENの予後との相関を認めた。

我々の結果は、免疫微小環境の観点からもWHO 2017分類におけるNET G3とNECの違いを示しており、WHO2010分類では一括されていたNEC G3を形態学的特徴によりNET G3とNECに分けた、WHO 2017分類を免疫学的側面からも支持する所見である。現在、NECの薬物療法としてはプラチナベースの化学療法がおこなわれているが、その予後は不良であり、新たな治療法の開発が求められている。本研究結果から、NECの免疫微小環境は豊富な免疫細胞を有しており、今後の免疫チェックポイント阻害薬の開発における対象としても有望と考えられる。

**【結語】**

pNENの免疫微小環境は、PDACと異なり、NETとNECでも異なることが示された。PD-1<sup>high</sup>T細胞、PD-L1<sup>high</sup>2型マクロファージの発現はpNENの予後不良因子であった。pNENの免疫微小環境の特徴を多重染色法を用いて初めて明らかにした。NECの免疫微小環境が pNENと比較して活性化されていることから、がん免疫療法の対象として適切な症例選択に寄与し、生物学的機序を解明する基礎情報となることが期待される。