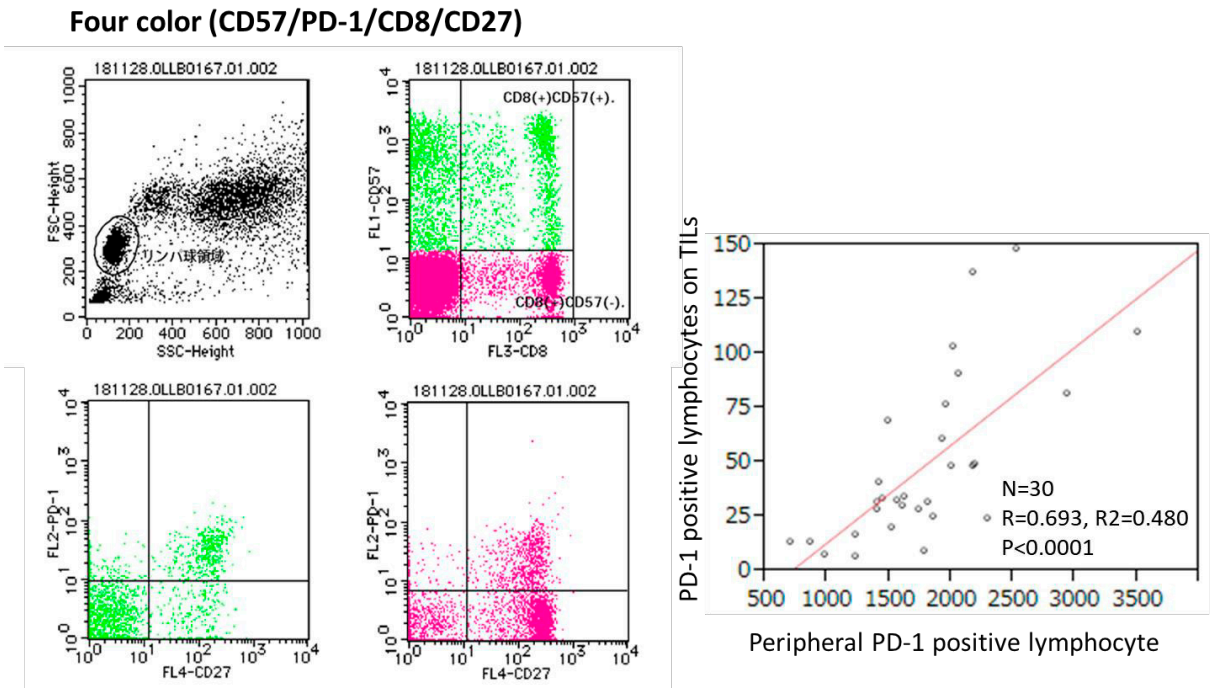
| 67　消化管癌における血中及び腫瘍浸潤リンパ球のPD-1発現 | 馬場　祥史 |
|---|---|

【目的】細胞障害性 T 細胞における PD-1 発現が免疫チェックポイント阻害剤の治療効果に影響を与えることが考えられる。末梢血リンパ球が腫瘍浸潤リンパ球を反映するということが報告されているが、消化器癌症例においてその関係性を検証した研究は皆無である。現状では、PD-L1/PD-1 発現を検証するには侵襲的な処置（切除検体や生検サンプルなど）が必要であり、また、その検体が治療時の患者の状態を正確に反映しているかどうかは不透明なままである。よって、簡便かつ正確に患者の血中及び末梢血リンパ球における PD-1/PD-L1 発現の状態を把握することは喫緊の課題と言える。本研究は、末梢血リンパ球の PD-1 発現は腫瘍局所細胞障害性 T 細胞の PD-1 発現と一致し、簡便に測定可能な革新的バイオマーカーになりうるという我々の仮説を検証するものであり、上部消化管癌患者の臨床検体を用いて下記事項を明らかにすることを目的とする。

【方法】抗 PD-1 抗体（Cell Signaling Technology）を用いて消化器癌切除検体における PD-1 の免疫組織化学染色を行った。また、食道 60 例、胃 16 例、大腸 33 例、肝 13 例、膵 6 例の患者の術前末梢血中の PD-1 陽性リンパ球を評価した。末梢血リンパ球における PD-1 発現は、FITC 標識抗ヒト CD57 マウス抗体、APC 標識抗ヒト CD27 マウス抗体、PE 標識抗ヒト PD-1 マウス抗体、PerCP 標識抗ヒト CD8 マウス抗体を用いた fluorescence activated cell sorter （FACS）により評価した。

【結果】血中及び腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現両方を検討可能であった食道 30 例において、血中及び腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現の関係を検討した。切除検体における腫瘍浸潤リンパ球数と血中 PD-1 陽性リンパ球数は有意に相関していた（P＜0.0001、R＝0.693）。現在、PD-1 発現を検証するには侵襲的な処置（切除検体や生検サンプルなど）が必要であり、また、その検体が治療時の患者の状態を正確に反映しているかどうかは不透明なままである。今回の結果により、血中リンパ球における PD-1 発現が腫瘍浸潤リンパ球における PD-1 発現の状態を反映することが示唆された。この点において、本研究はかなりの臨床的意義を有すると考えられる。

PD-1 発現評価のためのフローサイトメトリー及び血中及び腫瘍浸潤リンパ球における PD-1 発現の関係



# 67. 消化管癌における血中及び腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現

馬場　祥史

熊本大学 次世代外科治療開発学寄附講座

Key words：食道癌，腫瘍免疫，PD-1，腫瘍浸潤リンパ球，バイオマーカー

## 緒　言

人体には癌に対する防御機能として癌免疫サイクルと呼ばれる免疫システムが備わっている。通常、癌細胞に発現している変異抗原を樹状細胞が認識し、抗原を T 細胞に提示、その結果細胞傷害性 T 細胞の活性化が誘導され、腫瘍微小環境内に T 細胞が浸潤する。癌細胞と T 細胞が結合することでサイトトキシンが放出され、癌細胞にアポトーシスを引き起こす。しかし癌細胞はある段階になると、この免疫サイクルから逸脱し、免疫系からの排除を免れる。例えば癌細胞に発現した program death ligand-1（PD-L1）と細胞傷害性 T 細胞に発現した program death-1（PD-1）が結合すると、T 細胞からのサイトカインの産生が低下し、T 細胞の活動を抑制するシグナルが伝達され、腫瘍細胞は T 細胞からの認識を逃れる。この PD-1/PD-L1 経路を阻害する抗 PD-1 抗体は様々な癌種において有望な治療成績を挙げており、免疫チェックポイント阻害剤は現在最も注目されている治療の一つである。近年注目されている免疫チェックポイント阻害薬が食道癌に対しても有効であることが示され、近い将来臨床の現場で使用されるようになることを考慮すると本研究は極めて臨床的重要性が高い。

抗PD-1抗体を始めとした免疫チェックポイント阻害剤の治療効果は一部の限られた集団のみに認められるのが現状であり、治療効果を予測するバイオマーカーの開発が進んでいる。例えば PD-1/PD-L1 阻害剤の治療効果は、mutation burden に影響を受けることが示されている。また、抗 PD-1 抗体は PD-1/PD-L1 経路を遮断する特性上、腫瘍細胞の PD-L1 発現及び腫瘍浸潤リンパ球（TILs）がバイオマーカーになることが報告されている。我々は、食道癌において PD-L1、TILs、及びその組み合わせが食道がんの予後予測バイオマーカーになりえることを 300 例以上のデータバンクを用いて証明している［1］。

細胞障害性T細胞における PD-1 発現も免疫チェックポイント阻害剤の治療効果に影響を与えることが考えられる。末梢血リンパ球が腫瘍浸潤リンパ球を反映するということが報告されているが、消化器癌症例においてその関係性を検証した研究は皆無である。現状では、PD-L1/PD-1 発現を検証するには侵襲的な処置（切除検体や生検サンプルなど）が必要であり、また、その検体が治療時の患者の状態を正確に反映しているかどうかは不透明なままである。よって、簡便かつ正確に患者の血中及び末梢血リンパ球における PD-1/PD-L1 発現の状態を把握することは喫緊の課題と言える。

本研究は、末梢血リンパ球の PD-1 発現は腫瘍局所細胞障害性 T 細胞の PD-1 発現と一致し、簡便に測定可能な革新的バイオマーカーになりうるという我々の仮説を検証するものであり、上部消化管癌患者の臨床検体を用いて下記事項を明らかにすることを目的とする。

## 方　法

### 1. 切除検体における PD-1 の免疫組織化学染色

熊本大学消化器外科で根治的切除術が施行された消化管癌症例を対象とした。ホルマリン固定された切除検体を 4μm に薄切し、脱パラフィン処理後にオートクレーブ（121℃、15 分、pH9、Histofine ; Nichirei Biosciences、Tokyo、Japan）で抗原賦活化した。一次抗体として抗 PD-1 抗体（1 : 200 ; clone D4W2J、rabbit mAb、86163S ; Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA）、二次抗体として anti-rabbit EnVisionTM＋／horseradish peroxidase（HRP）

（DAKO Japan、Tokyo、Japan）を、染色にはDABを使用した。BZ-X700 digital microscope（Keyence、Osaka、Japan）で腫瘍先進部を 400 倍、3 視野で観察し、hybrid cell count software（BZ-3HC；Keyence）を用いて、各視野における腫瘍先進部の PD-1 陽性リンパ球数をそれぞれカウントし、3 視野の平均値を PD-1 陽性リンパ球数とした。PD-1 陽性リンパ球数の中央値をカットオフとし、PD-1 高発現群と PD-1 低発現に分類した。

**2. 末梢血中の PD-1 陽性リンパ球数の評価**

熊本大学消化器外科で根治的切除術を施行された消化管癌症例について前向きに術前末梢血を採取。末梢血リンパ球における PD-1 発現を fluorescence activated cell sorter（FACS）にて評価した。患者から得られた血液検体は、SRL Inc.（Tokyo、Japan）に送られ、リンパ球分離からフローサイトメトリーまでの一連の工程が行われた。詳細は下記の通りである。Ficoll-Hypaque solution（GE HealthCare Japan、Tokyo、Japan）20 ml を 50 ml の遠心チューブに入れ、その後、抗凝固処理血液検体 10 ml を等量のリン酸緩衝塩（PBS）と混合し、Ficoll-Hypaque solution に加えた。サンプルを 22℃、400 g で 30 分間遠心分離し、血漿（上層）と Ficoll-Hypaque 層（下層）の間に蓄積した単核細胞を、回収し、15 ml チューブに移した。1%γグロブリンで 15 分間ブロッキングした後、FITC 標識抗ヒト CD57 マウス抗体（clone NK-1；cat. no.347393、Nippon Becton Dickinson）、APC 標識抗ヒト CD27 マウス抗体（clone M-T271；cat. no. B09983、Beckman Coulter、Tokyo、Japan）、PE 標識抗ヒト PD-1 マウス抗体（clone EH12.1；cat. no. 557946、Nippon Becton Dickinson）、PerCP 標識抗ヒト CD8 マウス抗体（clone SK1；cat. no.347314、BD Pharmingen、San Jose、CA、USA）を用い、4℃で 30 分間インキュベートした。その後、BD FACSCalibur（Nippon Becton Dickinson、Tokyo、Japan）で、フローサイトメトリーを行った。解析は BD CellQuest software version 5.1（BD Bioscience、Tokyo、Japan）を用いた。

## 結果および考察

**1. PD-1 免疫染色**

食道癌 30 例の切除検体を用いて、免疫染色を行った。図 1 のように PD-1 はリンパ球において明瞭に染色され、hybrid cell count software でカウント可能であった。PD-1 は明瞭に染色されることから、今後臨床の現場にも応用可能であると考えられた。免疫チェックポイント阻害薬が食道癌に対しても有効であることが示され、臨床の現場で使用されるようになったことを考慮すると本研究は極めて臨床的重要性が高い。

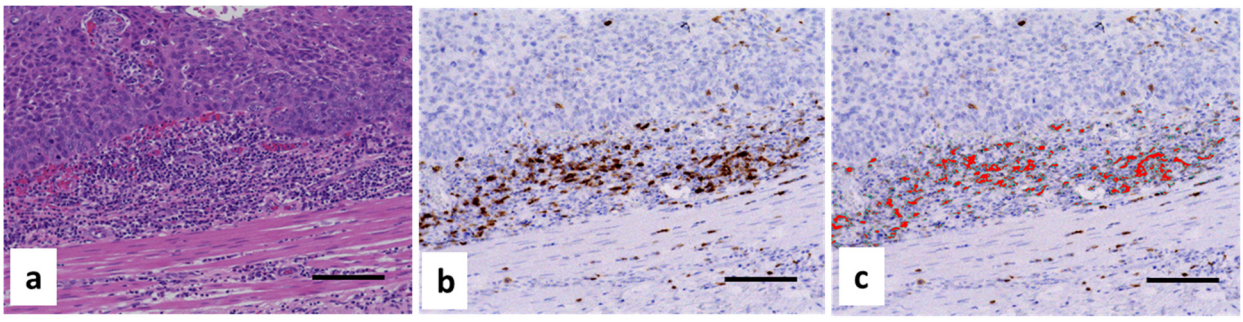



図 1. 食道癌における PD-1 染色

a）食道癌組織の HE 染色。

b）PD-1 免疫染色。

c）hybrid cell count software でのカウントの実際。

スケールバー：100 μm。

## 2. 末梢血中の PD-1 陽性リンパ球数の評価

食道 60 例、胃 16 例、大腸 33 例、肝 13 例、膵 6 例の患者から術前末梢血中の PD-1 陽性リンパ球を評価可能であった。フローサイトメトリーの実際のデータを図 2 に示す。今後は、同一患者における術前末梢血中の PD-1 陽性リンパ球を経時的に測定していく予定である。

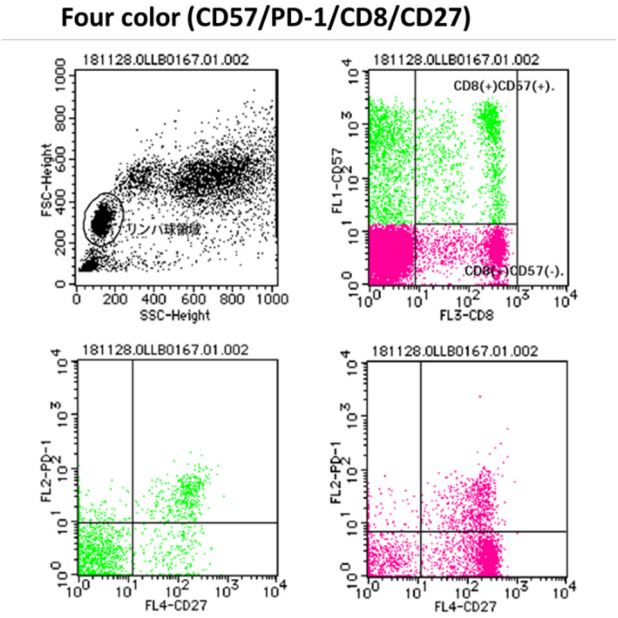



図 2. PD-1 発現評価のためのフローサイトメトリー
FITC 標識抗ヒト CD57 マウス抗体、APC 標識抗ヒト CD27 マウス抗体、PE 標識抗ヒト PD-1 マウス抗体、PerCP 標識抗ヒト CD8 マウス抗体により選別した。

## 3. 血中及び腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現の関係

血中及び腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現両方を検討可能であった食道 30 例において、血中及び腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現の関係を検討した。切除検体における腫瘍浸潤リンパ球数と血中 PD-1 陽性リンパ球数は有意に（P＜0.0001）相関していた（図 3）。現在、PD-1 発現を検証するには侵襲的な処置（切除検体や生検サンプルなど）が必要であり、また、その検体が治療時の患者の状態を正確に反映しているかどうかは不透明なままである。今回の結果により、血中リンパ球における PD-1 発現が腫瘍浸潤リンパ球における PD-1 発現の状態を反映することが示唆された。この点において、本研究はかなりの臨床的意義を有すると考えられる。

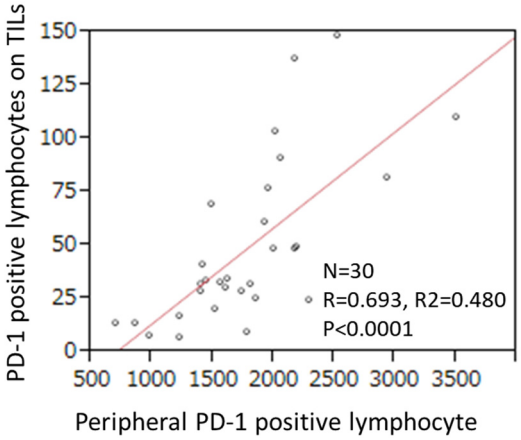



図 3. 血中及び腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現の関係
切除検体における腫瘍浸潤リンパ球数と血中 PD-1 陽性リンパ球数は有意に相関していた（Spearman の順位相関係数 P＜0.0001）。

## 文　献

1）　Yagi T, Baba Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Yoshida N, et al. PD-L1 Expression, Tumor-infiltrating Lymphocytes, and Clinical Outcome in Patients With Surgically Resected Esophageal Cancer. Annals of surgery. 2019;269(3):471-8. PMID: 29206673 doi: 10.1097/SLA.0000000000002616.