

学位論文(博士)

Immature peritumoral tertiary lymphoid structures
indicate poor prognosis

in pancreatic ductal adenocarcinoma after NAC

(未成熟腫瘍周囲三次リンパ様構造は
術前化学療法後の膵管腺癌における
不良な予後と関連する)

氏名 鍋屋 まり

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器・腫瘍外科学講座

令和 8 年 3 月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	5
3. 方法	7
4. 結果	1 3
5. 考察	1 8
6. 結語	2 3
7. 謝辞	2 3
8. 参考文献	2 4
9. 図表	3 2

1. 要旨

【背景/目的】膵管腺癌（pancreatic ductal adenocarcinoma : PDAC）は強い免疫抑制的腫瘍微小環境を特徴とする予後不良の悪性腫瘍である。術前化学療法（neoadjuvant chemotherapy : NAC）を施行された PDAC における三次リンパ様構造（tertiary lymphoid structures : TLS）の予後的意義は、いまだ十分に解明されていない。本研究では、NAC 後に切除を受けた PDAC 患者において、TLS の局在および成熟度と予後との関連を検討した。

【患者と方法】消化器腫瘍外科学講座で外科的切除を受けた PDAC 症例（131 例）を後方視的に解析した（upfront surgery [UpS] : 64 例, NAC : 67 例）。H&E 染色および CD20, CD21, CD23 による免疫組織化学染色を用いて TLS の有無を評価し、局在（腫瘍内/腫瘍周囲）および 3 マーカーの発現パターンに基づく成熟度（未成熟/成熟）により分類した。生存解析には Kaplan–Meier 法を用い、予後因子の検討には Cox 比例ハザードモデルを用いた。

【結果】TLS は UpS 群の 81.3% (52/64) , NAC 群の 83.6% (56/67) に認められた。腫瘍周囲 TLS（peritumoral TLS : periTLS）の頻度は NAC 群で有意に低かった（UpS : 73.4% vs NAC : 50.7%, $p < 0.05$ ）。UpS 群では未成熟 periTLS が 38.3%, 成熟 periTLS が 61.7%であり, NAC 群では未成熟が 38.2%, 成熟が 61.8%であった。NAC 群では未成熟 periTLS を有する患者は, 成熟 periTLS を

有する患者に比べ術後 1 年以内の早期遠隔再発率が高かった (53.8% vs 14.3%, $p<0.05$)。多変量解析では未成熟 periTLS の存在が無再発生存期間

(recurrence-free survival : RFS) 短縮に関する唯一の独立した予後不良因子であった (HR 2.89, 95%CI 1.20–6.91, $p<0.05$)。UpS 群では periTLS の成熟度と予後との有意な関連は認められなかった。NAC 後の CA19-9 低下による生化学的奏効 (biochemical response) は、成熟 periTLS 群では 47.4%で認められたが、未成熟 periTLS 群では 10%のみであった ($p<0.05$)。さらに、予後良好とされる NAC 後 CA19-9 <100 U/mL のサブグループ (22 例) においても、未成熟 periTLS は短い RFS と有意に関連する唯一の因子であった (HR 2.97, 95%CI 1.05–8.36, $p<0.05$)。

【結論】 未成熟 periTLS は NAC を施行された PDAC 患者における RFS 短縮と関連した。

2. 研究の背景

膵管腺癌（pancreatic ductal adenocarcinoma : PDAC）は、根治的手術を施行しても早期の全身再発や免疫抑制的な腫瘍微小環境（tumor microenvironment : TME）により、極めて予後不良な悪性腫瘍である(1-3)。近年では、術前化学療法（neoadjuvant chemotherapy : NAC）を導入することで、腫瘍縮小および微小転移の制御を図る戦略が採用されつつある(4)。しかしながら、NAC の導入によっても治療成績の向上には限界があり、従来の予後因子（切除断端の状態、リンパ節転移の有無、血清 CA19-9 濃度など）では治療後の臨床的多様性を十分に説明しきれないのが現状である(5-7)。そのため、より精緻なリスク分類法および新たな治療ターゲットの開発が求められている(5-7)。

腫瘍微小環境における宿主免疫応答は、腫瘍の進展や患者予後に強く関与していると考えられている(3,8,9)。このような背景において、三次リンパ構造（tertiary lymphoid structures : TLS）は、慢性炎症部位や腫瘍内に形成される異所性リンパ集合体であり、B 細胞および T 細胞が集積し、局所的な抗原提示を介して免疫応答を活性化する構造として注目されている(10,11)。さまざまな固形癌において、TLS の存在は抗腫瘍免疫の亢進および予後良好と関連していることが報告されている一方で、その予後への影響は腫瘍の種類、TLS の成熟度や局在、治療状況によって異なる可能性がある(12-16)。成熟 TLS、とくに腫瘍

内や腫瘍浸潤前縁に位置するものは、B 細胞および T 細胞活性の亢進と免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性の向上を反映し、抗腫瘍免疫の増強および良好な予後と関連している可能性を報告されている(17-19)。一方で、胚中心を欠く未成熟 TLS が豊富である場合や、TLS が主として腫瘍辺縁部の遠位に局在する場合には、癌腫によっては患者生存の不良と相関することが示されている(20-22)。したがって、TLS を予後バイオマーカーとして評価する際には、その成熟度と局在の両方が重要である。

PDAC においては、後ろ向き研究により、TLS を有する腫瘍、特に腫瘍内 TLS を伴う腫瘍は、TLS が存在しない腫瘍と比較して生存期間が有意に長いことが示されている(12, 19, 23)。しかしながら、PDAC において TLS の空間的局在および成熟度が予後に及ぼす影響については、いまだ明らかでない点が多い(19, 23)。さらに、これまでの報告の多くは手術先行症例を対象としている。現在、PDAC に対する標準治療は NAC へと移行しつつあるものの、NAC 施行後症例に関するデータは依然として乏しい。本研究の目的は、NAC 後に切除を受けた PDAC 患者において、TLS の局在および成熟度と予後の関係を明らかにすることである。

3. 方法

研究デザインと対象患者

本研究は、山口大学附属病院消化器・腫瘍外科学講座において 2010 年 1 月から 2024 年 3 月までの間に PDAC に対して切除術を受けた患者 159 例を対象とした後方視的研究である。全ての症例が病理学的に PDAC と診断された。切除可能性は、National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ガイドラインに準拠し、造影 CT を用いて評価した。本研究は山口大学附属病院倫理委員会の審査・承認を受け（承認番号：H2025-097），ヘルシンキ宣言に則って実施された。すべての患者から書面によるインフォームド・コンセントを取得した。

NAC

NAC は 2016 年以降に導入され、治療戦略は患者背景、腫瘍ステージ、その他の臨床的因子を総合的に考慮したうえで、多職種カンファレンスでの合意により決定された。modified FOLFIRINOX (mFFX) レジメンは、oxaliplatin 85 mg/m², irinotecan 150 mg/m², leucovorin 200 mg/m², および 5-fluorouracil 2,400 mg/m² (46 時間持続静注) を投与し、2 週ごとに繰り返した。gemcitabine plus nab-paclitaxel (GnP) レジメンは 28 日サイクルで行い、gemcitabine 1,000 mg/m²

および nab-paclitaxel 125 mg/m²を 1, 8, 15 日目に投与した。原則として 3 コースの化学療法を施行し、忍容性および有害事象に応じて用量調整を行った。

NAC の生化学的奏功は、NAC 後の血清 CA19-9 が 100 U/ml 以下で、かつ NAC 前から 75%以上低下した場合と定義した(24-27)。

臨床データ収集

収集した臨床データには、年齢、性別、腫瘍局在、および腫瘍マーカーを含む血液検査結果が含まれた。腫瘍ステージは、UICC (Union for International Cancer Control) TNM 分類第 8 版に基づき分類した。病理学的因子として、切除断端 (R ステータス)、組織学的分化度、脈管・リンパ管・神経侵襲、および化学療法に対する組織学的治療効果を評価した。組織学的治療効果判定は日本膵臓学会「膵癌取り扱い規約」第 7 版に従って判定した。術後フォローアップは術後 5 年間は 3 か月毎、その後は 6 か月毎に実施した。フォローアップ内容は、身体診察、血清 CA19-9, carcinoembryonic antigen (CEA), protein induced by vitamin K absence or antagonist (PIVKA), Span-1 値、および造影 CT または MRI 検査を含んだ。再発は、新たな病変が画像検査で検出され、同一部位における経時的な増大が確認された時点と定義した。

病理組織学的評価および免疫組織化学

腫瘍境界の同定およびリンパ球集簇のスクリーニングを目的として、免疫組織化学（immunohistochemistry : IHC）に用いた切片に隣接する 4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded : FFPE）切片にヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色と IHC を行った。IHC はキシレンで脱パラフィン後、段階的エタノールで再水和し、10 mM Tris

（hydroxymethyl）aminomethane-EDTA（Tris-EDTA）緩衝液（pH 9.0 ; Agilent Technologies, Tokyo, Japan）を用い、95°Cの電子レンジで 20 分間加熱して抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性は Peroxidase-Blocking Solution（S2023; Agilent Technologies）を用いて 5 分間阻害し、続いて Protein Block, Serum-Free（X0909; Agilent Technologies）により 10 分間の非特異的ブロッキングを行った。

一次抗体として以下を用い、いずれも室温で 30 分間反応させた：抗 CD20 マウスモノクローナル抗体（clone L26, 1:4,000; Cat# 53-0202-82; Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan）, 抗 CD21 ウサギモノクローナル抗体（clone EP3093, 1:2,000; Cat# ab75985; Abcam, Cambridge, UK）, 抗 CD23 マウスモノクローナル

抗体 (clone 4C7C9, 1:1,200; Cat# 60208-2-Ig; Proteintech, Rosemont, IL, USA)。

PBS で洗浄後, EnVision+ System-HRP (Agilent Technologies) を 1 時間反応させ, 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Agilent Technologies) を用いて 30 秒間発色した。切片は Mayer ヘマトキシリンで核染色を行い, 脱水後に封入した。反応性リンパ節を陽性コントロールとして用い, 同型対照抗体により陰性対照を確認した。

TLS は, H&E および CD20 染色に基づいてリンパ球集簇として同定した。腫瘍内 TLS (intratumoral TLS : iTLS) は腫瘍実質内に位置し, 腫瘍周囲 TLS (peritumoral TLS : periTLS) は腫瘍境界もしくは隣接する正常組織内に認められた。成熟段階について, TLS は early TLS (CD20⁺ CD21⁻ CD23⁻), primary follicle-like TLS (CD20⁺ CD21⁺ CD23⁻), secondary follicle-like TLS (CD20⁺ CD21⁺ CD23⁺) に分類された。CD21 および CD23 を共発現する TLS は, secondary follicle 様構造内に濾胞樹状細胞が存在することを示唆し, 成熟 TLS と定義した(13, 28)。各症例について, 腫瘍と隣接する非腫瘍組織を含む全スライド画像を BZ-X710 All-in-One 顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて取得した。病理医と研究者が, 臨床情報および転帰を知らされないブラインドの状態で腫瘍境界を確認し, TLS を評価した。

統計解析

連続変数は中央値および四分位範囲（interquartile range : IQR）で示し，カテゴリ変数は頻度で示した。連続変数の比較には Brunner–Munzel 検定を用い，カテゴリ変数の比較には両側 Fisher の正確確率検定を用いた。生存解析は Kaplan–Meier 法で行い，群間差の検定には log-rank 検定を用いた。多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを用い，ハザード比（hazard ratio : HR）と 95% 信頼区間（confidence interval : CI）を算出した。単変量解析で有意であった因子を多変量解析に投入した。連続変数のカットオフ値は，一般的な基準値および既報に基づき設定した：CA19-9 >100 U/ml(29)，腫瘍径 >20 mm(30)。無再発生存（recurrence-free survival : RFS）は，手術日から初回再発(局所・遠隔を問わない)までの期間と定義し，再発を認めない死亡は打ち切りとした。疾患特異的生存（disease-specific survival : DSS）は手術日から PDAC に起因する死亡までの期間と定義し，他病死は打ち切りとした。全生存（overall survival : OS）は手術日からあらゆる原因による死亡までの期間と定義し，生存例は最終フォローアップ時点で打ち切りとした。NAC 前血清 CA19-9 値が 5 U/ml 以下の症例は CA19-9 非産生例とみなし，生存に関する多変量解析から除外した。す

すべての統計解析は R version 4.5.0 および JMP Pro version 18 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行い、 $p < 0.05$ を両側検定における統計学的有意水準とした。

4. 結果

患者背景

本研究では、図 1 に示すあらかじめ定められた除外基準に基づき 28 例が除外され、最終的に 131 例が解析対象となった。このうち 67 例が NAC 後に手術を受けた症例であり、NAC の内訳は mFFX が 43 例、GnP が 24 例であった。患者の基本的な臨床病理学的特徴は表 1 に示す。

TLS の特徴と臨床病理学的特徴

TLS の代表的な像を図 2 に示す。TLS の陽性率については、手術先行群 (UpS) と NAC 群の間に有意差を認めなかった (UpS : 52/64 (81.3%) , NAC : 56/67 (83.6%) , 表 1) 。UpS 群では、iTLS は 64 例中 30 例 (46.9%) , periTLS は 47 例 (73.4%) に認められた。一方、NAC 群では、iTLS が 67 例中 38 例 (56.7%) , periTLS が 34 例 (50.7%) に認められた。特筆すべきは、periTLS の陽性率が NAC 群では UpS 群に比べて有意に低かった点である (73.4% vs 50.7%, $p < 0.05$) 。

NAC 群においては、periTLS 陽性症例は periTLS 陰性症例と比べて有意に高

い脈管侵襲率を示した ($p < 0.05$) が、このような関連は UpS 群では認められなかった (表 2)。iTLS の有無で層別化した場合には、UpS 群および NAC 群いずれにおいても有意な臨床病理学的因子の差は認められなかった (データ未提示)。

TLS 成熟度と治療成績

TLS は、免疫染色により未成熟 TLS (early/primary follicle-like) と成熟 TLS (secondary follicle-like) に分類された。iTLS 陽性例および periTLS 陽性例のいずれにおいても、成熟 TLS の割合は UpS 群と NAC 群の間で有意差を認めなかった (iTLS : 70.0% [21/30] vs 65.7% (25/38) , periTLS : 61.7% [29/47] vs 61.8% [21/33])。TLS の成熟度別にみた臨床病理学的因子にも差は認められなかった (表 3)。また、TLS 成熟度は mFFX レジメンと GnP レジメンの間でも有意な差を認めなかった (データ未提示)。

TLS 成熟度別に治療成績を層別化したところ、NAC 群においてのみ 2 点の注目すべき所見が認められた。第一に、未成熟な periTLS を有する症例は、1 年以内に遠隔再発を来した症例群のうち 70%と高頻度であり、再発のない症例群

では 25%であった ($p<0.05$)。第二に、未成熟な periTLS を有する症例では、CA19-9 の減少に基づく生化学的治療奏功例が有意に低かった (10.0% vs. 47.4%, $p<0.05$)。一方、Evans 分類に基づく病理学的治療反応については、未成熟群での奏効率が 0%と低く、成熟群の 14.3%に比して低値を示したが、この差は統計学的には有意ではなかった ($p=0.154$, 表 3)。

TLS の局在および成熟度と予後との関連

未成熟な periTLS の存在が 1 年以内の遠隔再発と有意に関連していたことから、その予後的意義についてさらに検討を行った。TLS の有無自体は、UpS 群・NAC 群いずれにおいても予後との有意な関連は認められなかった (データ未提示)。また、iTLS の有無による予後差も両群において認められなかった (データ未提示)。periTLS の存在は、NAC 群において不良な OS および RFS と関連する傾向を示した (それぞれ $p=0.0796$, $p=0.0621$; 図 3A–C) が、UpS 群ではこのような傾向は認められなかった (図 3D–F)。

TLS 成熟度別に症例をさらに層別化したところ、有意な予後差は NAC 群に限って観察された。NAC 治療を受けた患者では、未成熟な periTLS を有する群は、成熟 TLS を有する群と比較して RFS (中央値: 10.1 ヶ月 vs. 24.6 ヶ月) お

よび DSS（中央値：30.6 ヶ月 vs. 67.0 ヶ月）が有意に短かった(いずれも $p<0.05$ ；図 4A–C)。UpS 群ではこのような予後差は認められなかった（図 4D–F）。iTLS の成熟度と予後との間には、UpS 群・NAC 群いずれにおいても有意な関連は認められなかった（データ未提示）。

log-rank 検定により periTLS の成熟度に基づいた RFS および DSS に有意差が認められたことから、多変量 Cox 比例ハザードモデルを用いて独立した予後因子の同定を行った。その結果、未成熟な periTLS のみが RFS 短縮に関連する独立した因子であった（ハザード比：2.89，95%信頼区間：1.21–6.91， $p<0.05$ ，表 IV）。一方，DSS に対しては独立した予後因子は同定されなかった（データ未提示）。

NAC レジメン別にみた TLS 成熟度と予後との関係

NAC 群において、レジメン別に TLS 成熟度による RFS を層別化したところ，mFFX 群では未成熟と成熟 periTLS を有する症例間に有意な RFS の差が認められた（中央値：10.1 ヶ月 vs. 27.1 ヶ月， $p<0.05$ ，図 5A）。一方，GnP 群で

は同様の差は認められなかった（中央値：12.0 ヶ月 vs. 18.8 ヶ月， $p=0.215$ ，図 5B）。

NAC 後 CA19-9 値と periTLS 成熟度の関連

NAC 後の CA19-9 値が 100 U/ml 未満であった患者サブセット（ $n=22$ ）において，未成熟な periTLS を有する症例は，成熟 TLS を有する症例と比較して有意に短い RFS を示した（中央値：15.0 ヶ月 vs. 21.2 ヶ月， $p<0.05$ ，図 5C）。このサブセットにおける単変量解析では，未成熟な periTLS のみが RFS の短縮と有意に関連していた（ハザード比：2.97，95%信頼区間：1.05–8.36， $p<0.05$ ，表 5）。他の因子には有意差を認めなかった。

5. 考察

TLS の局在および成熟度は、腫瘍の種類や治療歴によって異なり、空間的および機能的な不均一性が存在することが報告されている(10,11,31,32)。複数の癌種において NAC 施行後は TLS の機能およびその予後的意義が変化することが示されている(33–36)。PDAC においても、NAC は腫瘍と宿主のインターフェイス、特に浸潤辺縁部において免疫細胞や間質成分の構成ならびに細胞間の空間的配置に影響を及ぼすことが報告されている(36–38)。本研究において、NAC 後の症例では UpS 群と比較して periTLS の出現頻度が有意に低下していたという結果は、NAC が PDAC における periTLS の構造的再構築に影響を及ぼしている可能性を示唆するものである。これらの知見を総合すると、NAC 施行後 PDAC における TLS は、未治療例における TLS とは異なる免疫学的価値を有する可能性があり、それぞれ独立して評価されるべきであると考えられる。

本研究における最も重要な知見は、NAC 施行後の PDAC 症例において未成熟な periTLS の存在が早期遠隔再発と関連し、RFS の独立した予後不良因子となった点である。PDAC においては、NAC に対する反応性が予後に大きく寄与することが既に報告されており(7,39)、periTLS は予後を決定する直接因子というよりは、治療効果の組織学的指標として機能している可能性がある。実際、NAC 群において未成熟 periTLS 群では CA19-9 の低下が不十分な症例や病理学

的治療効果が乏しい症例を高頻度に認めたことから、治療反応が不十分であったこととの関係が示唆される（表 3）。食道癌や乳癌の NAC 症例においても、TLS の密度および成熟度が病理学的反応および生存率と正の相関を示すとされている(34,40)。

PDAC における periTLS の臨床的意義は依然として確立されていないが、他癌種では未成熟 TLS を伴う periTLS の形成が予後不良と関連するという報告が存在する(20–22)。PDAC においては、periTLS を NAC 後に評価した先行研究は Zou らによる報告のみであり、同報告では NAC 群・手術先行群いずれにおいても periTLS と予後との有意な関連は認められなかった(13)。これらの報告と本研究の結果から、PDAC における TLS の予後的意義は、未治療状態と NAC 後では異なる可能性がある。Zou らの NAC コフォートでは GnP 療法を受けた症例が大多数を占めていたのに対し、本研究では mFFX 療法施行症例が 64.2% を占めており、治療レジメンに違いがみられた。我々の治療レジメン別解析においては、periTLS の成熟度と RFS との有意な関連は mFFX 群においてのみ認められ、GnP 群では認められなかった。このことは、TLS 成熟度の予後的意義が使用された化学療法レジメンに依存する可能性を示唆している。さらに、TLS の検出法やコフォート構成の違いが、Zou らの報告との相違に寄与した可能性がある。実際、Zou らの報告では UpS 症例における periTLS 陽性率は

47.4% (45/95 例) と比較的低く、これは Hiraoka らによるほぼ全例で検出したという報告(12) や本研究における 74.7% (47/64 例) という結果とは異なっていた。Zou らは H&E 染色により形態的に明瞭な TLS のみを対象とした可能性があり、さらに periTLS の解析対象は腫瘍と正常組織の境界が明瞭な症例に限定されていた。一方、本研究ではすべての症例において腫瘍辺縁部を含む切片を用い、H&E 染色に加え CD20, CD21, CD23 を用いた免疫染色により未成熟なものも含む TLS を同定した。このような手法上の違いおよび対象集団の差異が、TLS の検出率および予後との関連性に影響を及ぼした可能性がある。

未成熟な periTLS が NAC 後の予後不良と関連した理由として、相互に排他的でない 2 つの機序が考えられる。第一に、TLS が未成熟であることにより、化学療法により放出された腫瘍抗原に対する免疫応答が十分に誘導されない可能性である。成熟 TLS は、抗原捕捉、リンパ球の動員、並びに適応免疫の誘導および成熟を促進するが(32,41)、これらが欠如している場合、免疫系が腫瘍の排除に十分に寄与せず、残存腫瘍が多く残ることで早期再発のリスクが高まることが予想される。この仮説は、成熟 TLS の誘導によってゲムシタビンの抗腫瘍効果が増強されることを示す PDAC のマウスモデルや、乳癌において成熟 TLS が病理学的完全奏効と関連するという臨床報告とも一致する(40,42)。特に mFFX は複数の細胞傷害性薬剤を含み、より多くの抗原を放出・提示する可能

性があるため(43,44), TLS の成熟度が RFS の予測因子となったのが mFFX 群のみであったという本研究の所見は, この機序と整合的である。

第二に, 未成熟な periTLS は, NAC 後にも依然として残る免疫抑制的な腫瘍微小環境の存在を反映している可能性がある。近年の研究では, 免疫細胞疲弊や TLS 構造の破綻を伴う免疫環境が固形癌において報告されており(45,46), このような環境では樹状細胞の成熟が抑制され(47,48), T 細胞の活性化が阻害され(49), TLS の形成に必要な細胞間相互作用が阻害される(35,46)。本研究において, 未成熟な periTLS が脈管侵襲の増加と関連していたのが NAC 群のみに限定されていた点も, この仮説と整合的であり, 治療抵抗性の残存が腫瘍の進展性を高めている可能性が示唆される。

さらに, NAC 後に CA19-9 が 100 U/mL 以下という良好な生化学的反応を示した症例においても, 未成熟な periTLS は早期再発の高リスクな層を同定した。これまでの研究においては, NAC 後の CA19-9 低値は生存率の向上と関連することが報告されているが(5,26,50,51), 本研究の結果は, CA19-9 単独では NAC 後のリスク層別化には不十分である可能性を示唆している。したがって, CA19-9 に加えて TLS の空間的背景および成熟度を組み合わせることにより, 補助療法の強化や厳密な経過観察の適応を判断するための新たな指標となる可能性があり, 今後の検証が求められる。

本研究にはいくつかの限界が存在する。単施設による後方視的研究であり、対象症例数が限られていたため、レジメン別解析における統計学的検出力は十分とはいえない。また、TLS の成熟度評価には CD21/CD23 を用いたが、機能的な指標である高内皮細静脈（PNAd/MECA-79）や胚中心 Tfh 細胞のマーカーである BCL6 などを評価しておらず、TLS の機能的意義に関する解釈には限界がある。空間的解析についても、本研究では TLS の有無，局在，および成熟度といったカテゴリカルな指標に基づく解析にとどまり、TLS 密度，占有面積，腫瘍辺縁からの距離といった定量的空間指標は検討していない。将来的な研究では、腫瘍-間質インターフェースにおける勾配的变化を把握するためにも、これらの空間的指標の導入が必要である。さらに、本研究では TLS および B 細胞関連プログラムに関する空間トランスクリプトミクスやデジタル空間プロファイリングといった分子レベルの解析を行っておらず、最近の研究で報告されている NAC 後の PDAC 免疫微小環境の再構築との統合的解析は実施できていない。今後は、NAC 前後の組織サンプルを用いた前向き研究により、CA19-9，TLS 局在，および成熟度を組み合わせた層別化戦略の妥当性を、腫瘍微小環境の動態や交絡因子の影響を考慮しながら検証していく必要がある。

6. 結語

未成熟な腫瘍周囲 TLS は，NAC 後の PDAC 患者における再発無病生存（RFS）の不良と関連する新たな予後マーカーとなり得ることが示された。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり，多大なるご指導を賜りました山口大学大学院医学系研究科消化器・腫瘍外科学講座の永野浩昭教授に心より感謝申し上げます。また研究の指導を頂きました中島正夫先生，恒富亮一先生，病理評価でご指導いただきました病理部星井嘉信先生および研究支援スタッフの皆様にも厚く御礼申し上げます。

8. 参考文献

- 1 Sakamoto H, Attiyeh MA, Gerold JM, Makohon-Moore AP, Hayashi A, Hong J, Kappagantula R, Zhang L, Melchor JP, Reiter JG, Heyde A, Bielski CM, Penson AV, Gönen M, Chakravarty D, O'Reilly EM, Wood LD, Hruban RH, Nowak MA, Socci ND, Taylor BS, Iacobuzio-Donahue CA: The evolutionary origins of recurrent pancreatic cancer. *Cancer Discov* 10(6): 792–805, 2020. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-1508
- 2 Sherman MH, Beatty GL: Tumor microenvironment in pancreatic cancer pathogenesis and therapeutic resistance. *Annu Rev Pathol* (18): 123–148, 2023. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-031621-024600
- 3 Hilmi M, Delaye M, Muzzolini M, Nicolle R, Cros J, Hammel P, Cardot-Ruffino V, Neuzillet C: The immunological landscape in pancreatic ductal adenocarcinoma and overcoming resistance to immunotherapy. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 8(12): 1129–1142, 2023. DOI: 10.1016/S2468-1253(23)00207-8
- 4 Springfield C, Ferrone CR, Katz MHG, Philip PA, Hong TS, Hackert T, Büchler MW, Neoptolemos J: Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 20(5): 318–337, 2023. DOI: 10.1038/s41571-023-00746-1
- 5 Seelen LWF, Floortje van Oosten A, Brada LJH, Groot VP, Daamen LA, Walma MS, van der Lek BF, Liem MSL, Patijn GA, Stommel MWJ, van Dam RM, Koerkamp BG, Busch OR, de Hingh I, van Eijck CHJ, Besselink MG, Burkhart RA, Borel Rinkes IHM, Wolfgang CL, Molenaar IQ, He J, van Santvoort HC: Early recurrence after resection of locally advanced pancreatic cancer following induction therapy: An international multicenter study. *Ann Surg* 278(1): 118–126, 2023. DOI: 10.1097/SLA.0000000000005666
- 6 Leonhardt CS, Gustorff C, Klaiber U, Le Blanc S, Stamm TA, Verbeke CS, Prager GW, Strobel O: Prognostic factors for early recurrence after resection of pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 167(5): 977–992, 2024. DOI: 10.1053/j.gastro.2024.05.028
- 7 Newhook TE, Vreeland TJ, Griffin JF, Tidwell RSS, Prakash LR, Koay EJ, Ludmir EB, Smaglo BG, Pant S, Overman M, Wolff RA, Ikoma N, Maxwell J, Kim MP, Lee JE, Katz MHG, Tzeng CD: Prognosis associated

- with CA19-9 response dynamics and normalization during neoadjuvant therapy in resected pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg* 277(3): 484–490, 2023. DOI: 10.1097/SLA.0000000000005184
- 8 Tsunedomi R, Shindo Y, Nakajima M, Yoshimura K, Nagano H: The tumor immune microenvironment in pancreatic cancer and its potential in the identification of immunotherapy biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn* 23(12): 1121–1134, 2023. DOI: 10.1080/14737159.2023.2281482
 - 9 Ho WJ, Jaffee EM, Zheng L: The tumour microenvironment in pancreatic cancer - clinical challenges and opportunities. *Nat Rev Clin Oncol* 17(9): 527–540, 2020. DOI: 10.1038/s41571-020-0363-5
 - 10 Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA: Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 14(7): 447–462, 2014. DOI: 10.1038/nri3700.
 - 11 Teillaud JL, Houel A, Panouillot M, Riffard C, Dieu-Nosjean MC: Tertiary lymphoid structures in anticancer immunity. *Nat Rev Cancer* 24(9): 629–646, 2024. DOI: 10.1038/s41568-024-00728-0
 - 12 Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Kanai Y, Kosuge T, Shimada K: Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* 112(11): 1782–1790, 2015. DOI: 10.1038/bjc.2015.145
 - 13 Zou X, Lin X, Cheng H, Chen Y, Wang R, Ma M, Liu Y, Dai Z, Tasiheng Y, Yan Y, Hou Q, Ding F, Chen H, Yu X, Wang X, Liu C: Characterization of intratumoral tertiary lymphoid structures in pancreatic ductal adenocarcinoma: Cellular properties and prognostic significance. *J Immunother Cancer* 11(6): e006698, 2023. DOI: 10.1136/jitc-2023-006698
 - 14 Shang T, Jiang T, Lu T, Wang H, Cui X, Pan Y, Xu M, Pei M, Ding Z, Feng X, Lin Y, Li X, Tan Y, Feng F, Dong H, Wang H, Dong L: Tertiary lymphoid structures predict the prognosis and immunotherapy response of cholangiocarcinoma. *Front Immunol* (14): 1166497, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1166497
 - 15 Xu W, Lu J, Liu WR, Anwaier A, Wu Y, Tian X, Su JQ, Qu YY, Yang J, Zhang H, Ye D: Heterogeneity in tertiary lymphoid structures predicts distinct prognosis and immune microenvironment characterizations of clear cell renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer* 11(12): e006667,

2023. DOI: 10.1136/jitc-2023-006667
- 16 Zhang Y, Xu M, Ren Y, Ba Y, Liu S, Zuo A, Xu H, Weng S, Han X, Liu Z: Tertiary lymphoid structural heterogeneity determines tumour immunity and prospects for clinical application. *Mol Cancer* 23(1): 75, 2024. DOI: 10.1186/s12943-024-01980-6
 - 17 Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, Yizhak K, Sade-Feldman M, Blando J, Han G, Gopalakrishnan V, Xi Y, Zhao H, Amaria RN, Tawbi HA, Cogdill AP, Liu W, LeBleu VS, Kugeratski FG, Patel S, Davies MA, Hwu P, Lee JE, Gershenwald JE, Lucci A, Arora R, Woodman S, Keung EZ, Gaudreau PO, Reuben A, Spencer CN, Burton EM, Haydu LE, Lazar AJ, Zapassodi R, Hudgens CW, Ledesma DA, Ong S, Bailey M, Warren S, Rao D, Krijgsman O, Rozeman EA, Peeper D, Blank CU, Schumacher TN, Butterfield LH, Zelazowska MA, McBride KM, Kalluri R, Allison J, Petitprez F, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Hacohen N, Rezvani K, Sharma P, Tetzlaff MT, Wang L, Wargo JA: B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature* 577(7791): 549–555, 2020. DOI: 10.1038/s41586-019-1922-8
 - 18 Vanhersecke L, Brunet M, Guégan JP, Rey C, Bougouin A, Cousin S, Moulec SL, Besse B, Loriot Y, Larroquette M, Soubeyran I, Toulmonde M, Roubaud G, Pernot S, Cabart M, Chomy F, Lefevre C, Bourcier K, Kind M, Giglioli I, Sautès-Fridman C, Velasco V, Courgeon F, Oflazoglu E, Savina A, Marabelle A, Soria JC, Bellera C, Sofeu C, Bessede A, Fridman WH, Loarer FL, Italiano A: Mature tertiary lymphoid structures predict immune checkpoint inhibitor efficacy in solid tumors independently of pd-11 expression. *Nat Cancer* 2(8): 794–802, 2021. DOI: 10.1038/s43018-021-00232-6
 - 19 Kinker GS, Vitiello GAF, Diniz AB, Cabral-Piccin MP, Pereira PHB, Carvalho MLR, Ferreira WAS, Chaves AS, Rondinelli A, Gusmão AF, Defelicibus A, Dos Santos GO, Nunes WA, Claro LCL, Bernardo TM, Nishio RT, Pacheco AM, Laus AC, Arantes L, Fleck JL, de Jesus VHF, de Moricz A, Weinlich R, Coimbra FJF, de Lima VCC, Medina TDS: Mature tertiary lymphoid structures are key niches of tumour-specific immune responses in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Gut* 72(10): 1927–1941, 2023. DOI: 10.1136/gutjnl-2022-328697
 - 20 Meylan M, Petitprez F, Lacroix L, Di Tommaso L, Roncalli M, Bougouin

- A, Laurent A, Amaddeo G, Sommacale D, Regnault H, Derman J, Charpy C, Lafdil F, Pawlotsky JM, Sautès-Fridman C, Fridman WH, Calderaro J: Early hepatic lesions display immature tertiary lymphoid structures and show elevated expression of immune inhibitory and immunosuppressive molecules. *Clin Cancer Res* 26(16): 4381–4389, 2020. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2929.
- 21 Ding GY, Ma JQ, Yun JP, Chen X, Ling Y, Zhang S, Shi JY, Chang YQ, Ji Y, Wang XY, Tan WM, Yuan KF, Yan B, Zhang XM, Liang F, Zhou J, Fan J, Zeng Y, Cai MY, Gao Q: Distribution and density of tertiary lymphoid structures predict clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 76(3): 608–618, 2022. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.10.030
- 22 Sofopoulos M, Fortis SP, Vaxevanis CK, Sotiriadou NN, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Vlachodimitropoulos D, Perez SA, Baxevanis CN: The prognostic significance of peritumoral tertiary lymphoid structures in breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 68(11): 1733–1745, 2019. DOI: 10.1007/s00262-019-02407-8.
- 23 Lehmann J, Thelen M, Kreer C, Schran S, Garcia-Marquez MA, Csicic I, Siepmann K, Hagen EM, Eckel HNC, Lohneis P, Kruger S, Boeck S, Ormanns S, Rudelius M, Werner J, Popp F, Klein F, von Bergwelt-Baildon MS, Bruns CJ, Quaas A, Wennhold K, Schlößer HA: Tertiary lymphoid structures in pancreatic cancer are structurally homologous, share gene expression patterns and B-cell clones with secondary lymphoid organs, but show increased T-cell activation. *Cancer Immunol Res* 13(3): 323–336, 2025. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-24-0299
- 24 Ko AH, Hwang J, Venook AP, Abbruzzese JL, Bergsland EK, Tempero MA: Serum CA19-9 response as a surrogate for clinical outcome in patients receiving fixed-dose rate gemcitabine for advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 93(2): 195–199, 2005. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602687
- 25 Wong D, Ko AH, Hwang J, Venook AP, Bergsland EK, Tempero MA: Serum ca19-9 decline compared to radiographic response as a surrogate for clinical outcomes in patients with metastatic pancreatic cancer receiving chemotherapy. *Pancreas* 37(3): 269–274, 2008. DOI: 10.1097/MPA.0b013e31816d8185
- 26 Miyahara S, Takahashi H, Tomimaru Y, Kobayashi S, Sasaki K, Yamada

- D, Akita H, Noda T, Doki Y, Eguchi H: Prognostic impact of post-neoadjuvant CA19-9 values in pancreatic cancer: More pronounced following neoadjuvant chemotherapy compared to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Pancreatology* 25(5): 728–735, 2025. DOI: 10.1016/j.pan.2025.06.016
- 27 Tzeng CW, Katz MH, Fleming JB, Lee JE, Pisters PW, Holmes HM, Varadhachary GR, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Aloia TA: Morbidity and mortality after pancreaticoduodenectomy in patients with borderline resectable type c clinical classification. *J Gastrointest Surg* 18(1): 146–156, 2014. DOI: 10.1007/s11605-013-2371-6
- 28 Le Rochais M, Hémon P, Ben-Guigui D, Garaud S, Le Dantec C, Pers JO, Cornec D, Uguen A: Deciphering the maturation of tertiary lymphoid structures in cancer and inflammatory diseases of the digestive tract using imaging mass cytometry. *Front Immunol* 14: 1147480, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1147480
- 29 Nakamura T, Asano T, Okamura K, Tsuchikawa T, Murakami S, Kurashima Y, Ebihara Y, Noji T, Nakanishi Y, Tanaka K, Shichinohe T, Hirano S: A preoperative prognostic scoring system to predict prognosis for resectable pancreatic cancer: Who will benefit from upfront surgery? *J Gastrointest Surg* 23(5): 990–996, 2019. DOI: 10.1007/s11605-018-3972-x
- 30 Yamamoto T, Yagi S, Kinoshita H, Sakamoto Y, Okada K, Uryuhara K, Morimoto T, Kaihara S, Hosotani R: Long-term survival after resection of pancreatic cancer: A single-center retrospective analysis. *World J Gastroenterol* 21(1): 262–268, 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i1.262
- 31 Merali N, Jessel MD, Arbe-Barnes EH, Ruby Lee WY, Gismondi M, Chouari T, O'Brien JW, Patel B, Osei-Bordom D, Rockall TA, Sivakumar S, Annels N, Frampton AE: Impact of tertiary lymphoid structures on prognosis and therapeutic response in pancreatic ductal adenocarcinoma. *HPB (Oxford)* 26(7): 873–894, 2024. DOI: 10.1016/j.hpb.2024.04.009
- 32 Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH: Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 19(6): 307–325, 2019. DOI: 10.1038/s41568-019-0144-6
- 33 Huang H, Zhao G, Wang T, You Y, Zhang T, Chen X, Dong J, Gong L, Shang X, Cao F, Tang P, Jiang H, Wang P, Pang Q, Yan C, Zhang W:

- Survival benefit and spatial properties of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma with neoadjuvant therapies. *Cancer Lett* 601: 217178, 2024. DOI: 10.1016/j.canlet.2024.217178
- 34 Hayashi Y, Makino T, Sato E, Ohshima K, Nogi Y, Kanemura T, Honma K, Yamashita K, Saito T, Tanaka K, Yamamoto K, Takahashi T, Kurokawa Y, Miyata H, Nakajima K, Wada H, Morii E, Eguchi H, Doki Y: Density and maturity of peritumoral tertiary lymphoid structures in oesophageal squamous cell carcinoma predicts patient survival and response to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* 128(12): 2175–2185, 2023. DOI: 10.1038/s41416-023-02235-9
 - 35 Wang Q, Zhong W, Shen X, Hao Z, Wan M, Yang X, An R, Zhu H, Cai predict survival and response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. *NPJ Precis Oncol* 8(1): 61, 2024. DOI: 10.1038/s41698-024-00533-w
 - 36 Mota Reyes C, Teller S, Muckenhuber A, Konukiewicz B, Safak O, Weichert W, Friess H, Ceyhan GO, Demir IE: Neoadjuvant therapy remodels the pancreatic cancer microenvironment via depletion of protumorigenic immune cells. *Clin Cancer Res* 26(1): 220–231, 2020. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1864
 - 37 Dias Costa A, Väyrynen SA, Chawla A, Zhang J, Väyrynen JP, Lau MC, Williams HL, Yuan C, Morales-Oyarvide V, Elganainy D, Singh H, Cleary JM, Perez K, Ng K, Freed-Pastor W, Mancias JD, Dougan SK, Wang J, Robinson DA, Dunne RF, Kozak MM, Brais L, Reilly E, Clancy T, Linehan DC, Chang DT, Hezel AF, Koong AC, Aguirre AJ, Wolpin BM, Nowak JA: Neoadjuvant chemotherapy is associated with altered immune cell infiltration and an anti-tumorigenic microenvironment in resected pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 28(23): 5167–5179, 2022. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1125
 - 38 Zwart ES, van Ee T, Dopperberg D, Farina A, Wilmink JW, Versteijne E, Busch OR, Besselink MG, Meijer LL, van Kooyk Y, Mebius RE, Kazemier G: The immune microenvironment after neoadjuvant therapy compared to upfront surgery in patients with pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 149(16): 14731–14743, 2023. DOI: 10.1007/s00432-023-05219-7
 - 39 Truty MJ, Kendrick ML, Nagorney DM, Smoot RL, Cleary SP, Graham

- RP, Goenka AH, Hallemeier CL, Haddock MG, Harmsen WS, Mahipal A, McWilliams RR, Halfdanarson TR, Grothey AF: Factors predicting response, perioperative outcomes, and survival following total neoadjuvant therapy for borderline/locally advanced pancreatic cancer. *Ann Surg* 273(2): 341–349, 2021. DOI: 10.1097/SLA.0000000000003284
- 40 Song IH, Heo SH, Bang WS, Park HS, Park IA, Kim YA, Park SY, Roh J, Gong G, Lee HJ: Predictive value of tertiary lymphoid structures assessed by high endothelial venule counts in the neoadjuvant setting of triple-negative breast cancer. *Cancer Res Treat* 49(2): 399–407, 2017. DOI: 10.4143/crt.2016.215
- 41 Workel HH, Lubbers JM, Arnold R, Prins TM, van der Vlies P, de Lange K, Bosse T, van Gool IC, Eggink FA, Wouters MCA, Komdeur FL, van der Slikke EC, Creutzberg CL, Kol A, Plat A, Glaire M, Church DN, Nijman HW, de Bruyn M: A transcriptionally distinct CXCL13+CD103+CD8+ T-cell population is associated with B-cell recruitment and neoantigen load in human cancer. *Cancer Immunol Res* 7(5): 784–796, 2019. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0517
- 42 Delvecchio FR, Fincham REA, Spear S, Clear A, Roy-Luzarraga M, Balkwill FR, Gribben JG, Bombardieri M, Hodivala-Dilke K, Capasso M, Kocher HM: Pancreatic cancer chemotherapy is potentiated by induction of tertiary lymphoid structures in mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 12(5): 1543–1565, 2021. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2021.06.023
- 43 Gao Z, Kang SW, Erstad D, Azar J, Van Buren G, Fisher W, Sun Z, Rubinstein MP, Lee HS, Camp ER: Pre-treatment inflamed tumor immune microenvironment is associated with folfirinox response in pancreatic cancer. *Front Oncol* (13): 1274783, 2023. DOI: 10.3389/fonc.2023.1274783
- 44 Liang YH, Tsai JH, Cheng YM, Chan KY, Hsu WL, Lee CC, Chen KH, Yeh KH: Chemotherapy agents stimulate dendritic cells against human colon cancer cells through upregulation of the transporter associated with antigen processing. *Sci Rep* 11(1): 9080, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-88648-z
- 45 Tietscher S, Wagner J, Anzeneder T, Langwieder C, Rees M, Sobottka B, de Souza N, Bodenmiller B: A comprehensive single-cell map of t cell

- exhaustion-associated immune environments in human breast cancer. *Nat Commun* 14(1): 98, 2023. DOI: 10.1038/s41467-022-35238-w
- 46 Su GL, Zhang MJ, Li H, Sun ZJ: Dissecting tertiary lymphoid structures in cancer: Maturation, localization and density. *Theranostics* 15(18): 9459–9485, 2025. DOI: 10.7150/thno.113940
- 47 Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V: Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12(4): 253–268, 2012. DOI: 10.1038/nri3175
- 48 Ruffell B and Coussens LM: Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* 27(4): 462–472, 2015. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.02.015
- 49 Batlle E and Massagué J: Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer. *Immunity* 50(4): 924–940, 2019. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.024
- 50 Michelakos T, Pergolini I, Castillo CF, Honselmann KC, Cai L, Deshpande V, Wo JY, Ryan DP, Allen JN, Blaszkowsky LS, Clark JW, Murphy JE, Nipp RD, Parikh A, Qadan M, Warshaw AL, Hong TS, Lillemoe KD, Ferrone CR: Predictors of resectability and survival in patients with borderline and locally advanced pancreatic cancer who underwent neoadjuvant treatment with folfinox. *Ann Surg* 269(4): 733–740, 2019. DOI: 10.1097/SLA.0000000000002600
- 51 Homma Y, Miyake K, Kikuchi Y, Yabushita Y, Matsuyama R, Endo I: Prognostic significance of post-neoadjuvant chemotherapy carbohydrate antigen 19-9 levels in patients with resectable pancreatic cancer treated with s-1 and gemcitabine: A retrospective cohort study. *World J Oncol* 16(3): 269–275, 2025. DOI: 10.14740/wjon2563

9. 図表

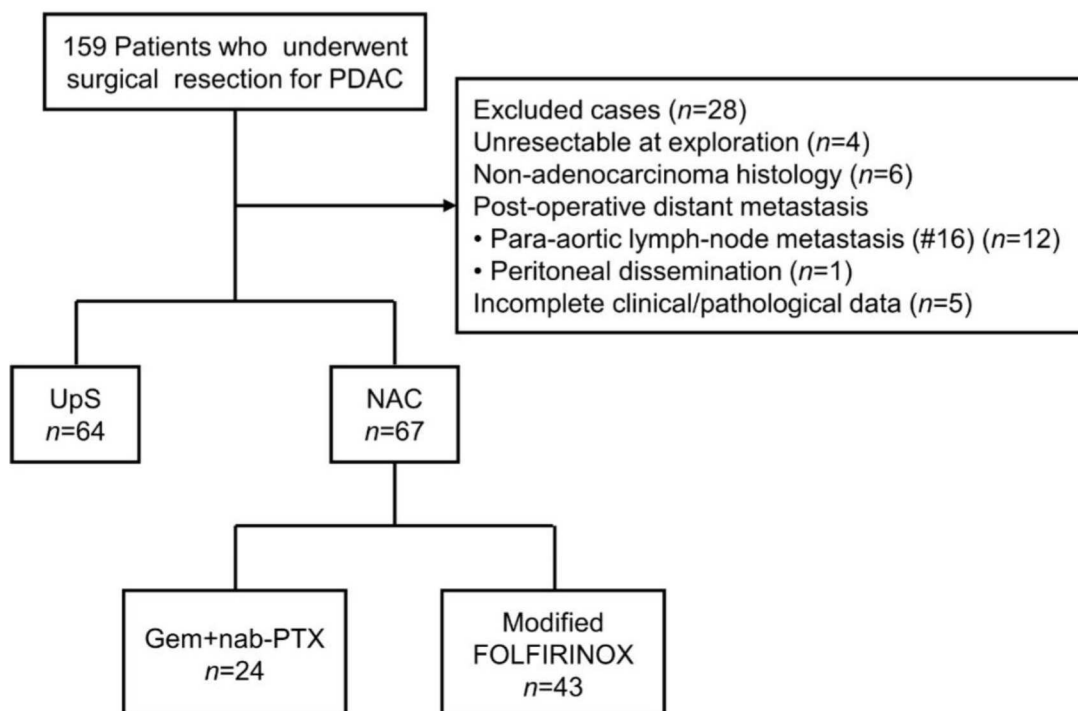
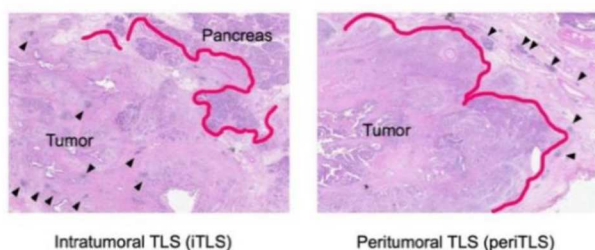


図 1. 本研究のフローチャート

患者の登録期間は 2010 年 1 月から 2024 年 3 月までであり，術前化学療法(NAC は 2016 年より導入された。切除を受けた 159 例のうち，28 例は除外された。内訳は，術中に切除不能と判定された 4 例，腺癌以外の病理組織であった 6 例，術中または最終病理で遠隔転移が確認された 13 例（傍大動脈リンパ節#16 転移 12 例，腹膜播種 1 例），および臨床病理所見が不完全であった 5 例であった。最終的な解析対象は 131 例であり，Upfront surgery (UpS) 群 (n=64) と NAC 群 (n=67) に分けられた。NAC 群においては，mFOLFIRINOX (n=43) またはゲムシタビン

＋ナブパクリタキセル（GnP, n=24）のレジメンが使用された。

A)



B)

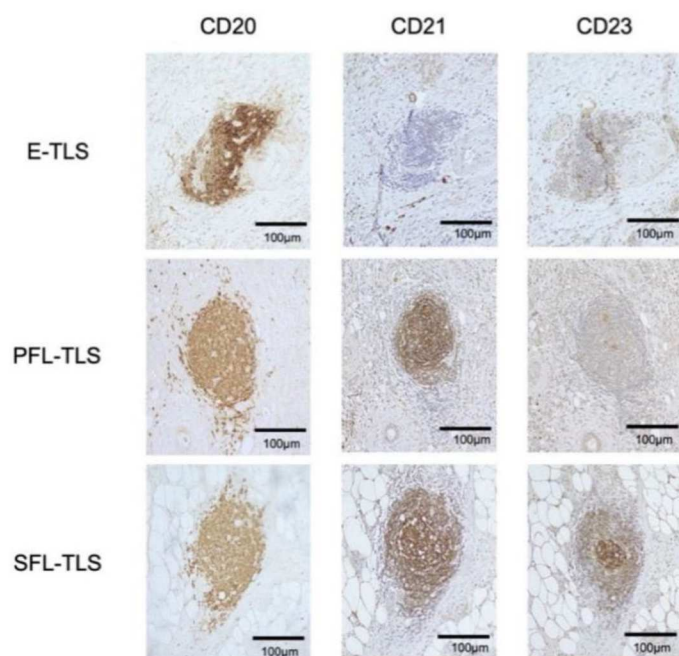


図 2.切除された PDAC 症例における H&E 染色および免疫染色の代表例

A) H&E 染色画像では、赤線が腫瘍辺縁を示し、黒矢頭は腫瘍内 TLS（左）および腫瘍周囲 TLS（右）を示す。B) 三次リンパ構造（TLS）の免疫染色像。左から CD20, CD21, CD23 の各マーカーを用いた染色を示す。TLS の成熟度は以下のように分類された：未成熟 TLS（E-TLS）：CD20⁺ CD21⁻ CD23⁻、一次リンパ濾胞様 TLS（PFL-TLS）：CD20⁺ CD21⁺ CD23⁻、二次リンパ濾胞様 TLS（SFL-TLS）：CD20⁺ CD21⁺ CD23⁺。

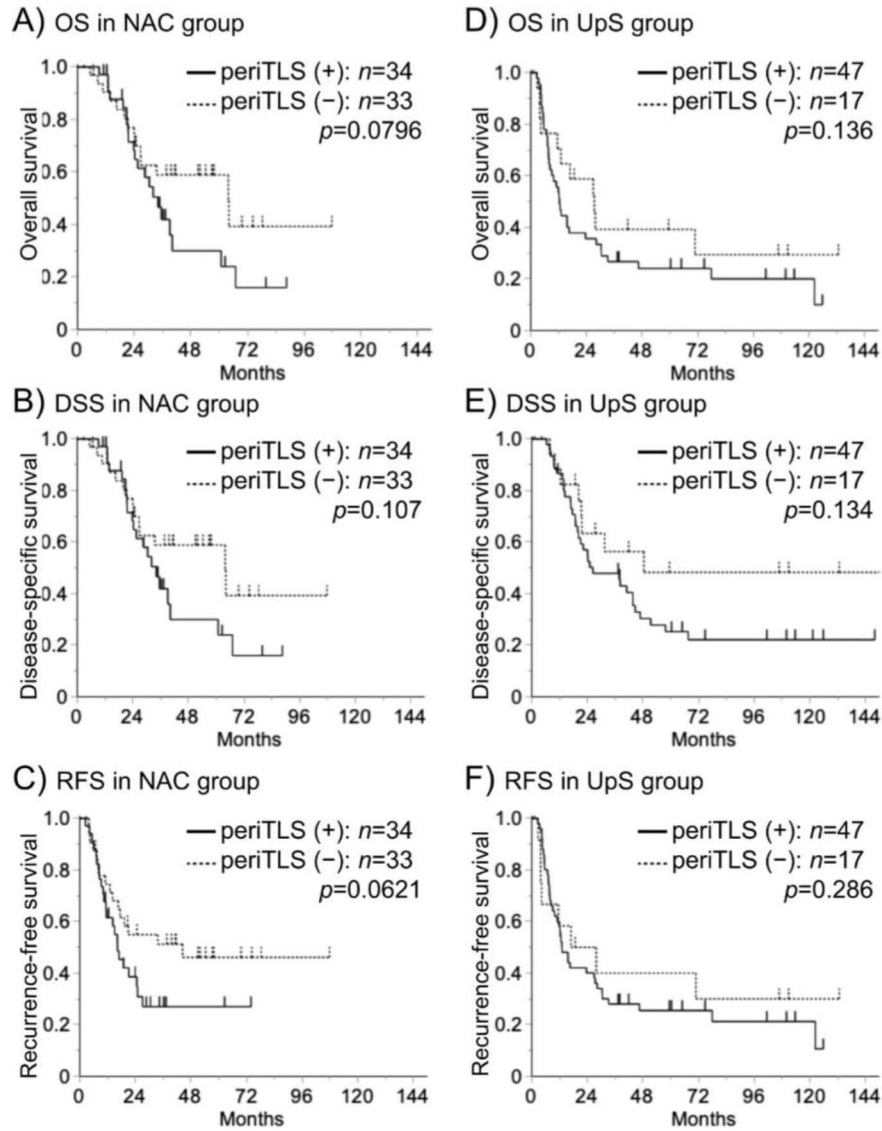


図 3. 腫瘍周囲 TLS の有無による Kaplan-Meier 生存曲線解析

A～C) NAC 群, D～F) UpS 群。A および D は全生存期間 (OS), B および E は疾患特異的生存期間 (DSS), C および F は無再発生存期間 (RFS) を示す。生存曲線は Kaplan-Meier 法により算出され, p 値は全て両側 log-rank 検定により求めた。

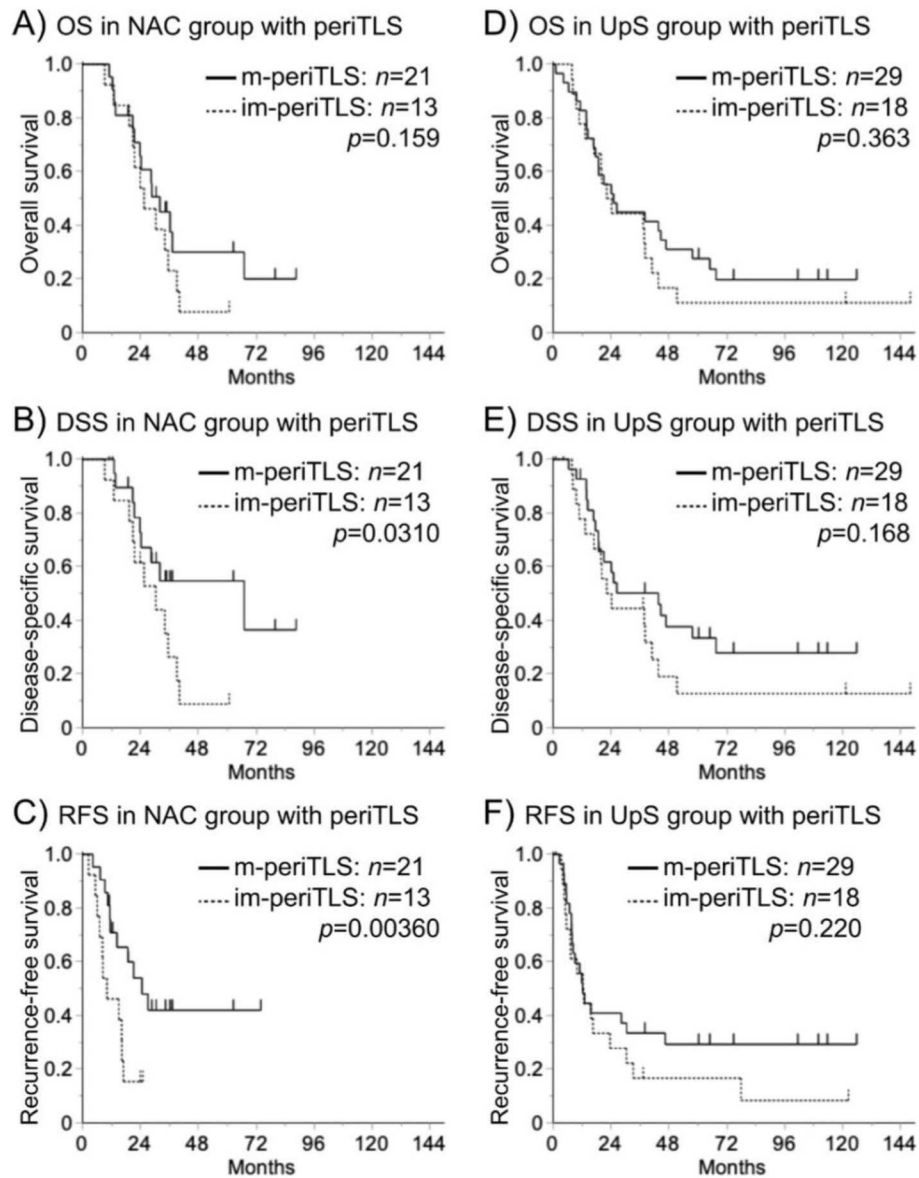


図 4. 腫瘍周囲 TLS(periTLS) の成熟度による Kaplan-Meier 生存曲線解析

A～C) NAC 群, D～F) UpS 群。A および D は OS, B および E は DSS, C および F は RFS を示す。生存曲線は Kaplan-Meier 法により算出され, p 値は全て両側 log-rank 検定により求めた。

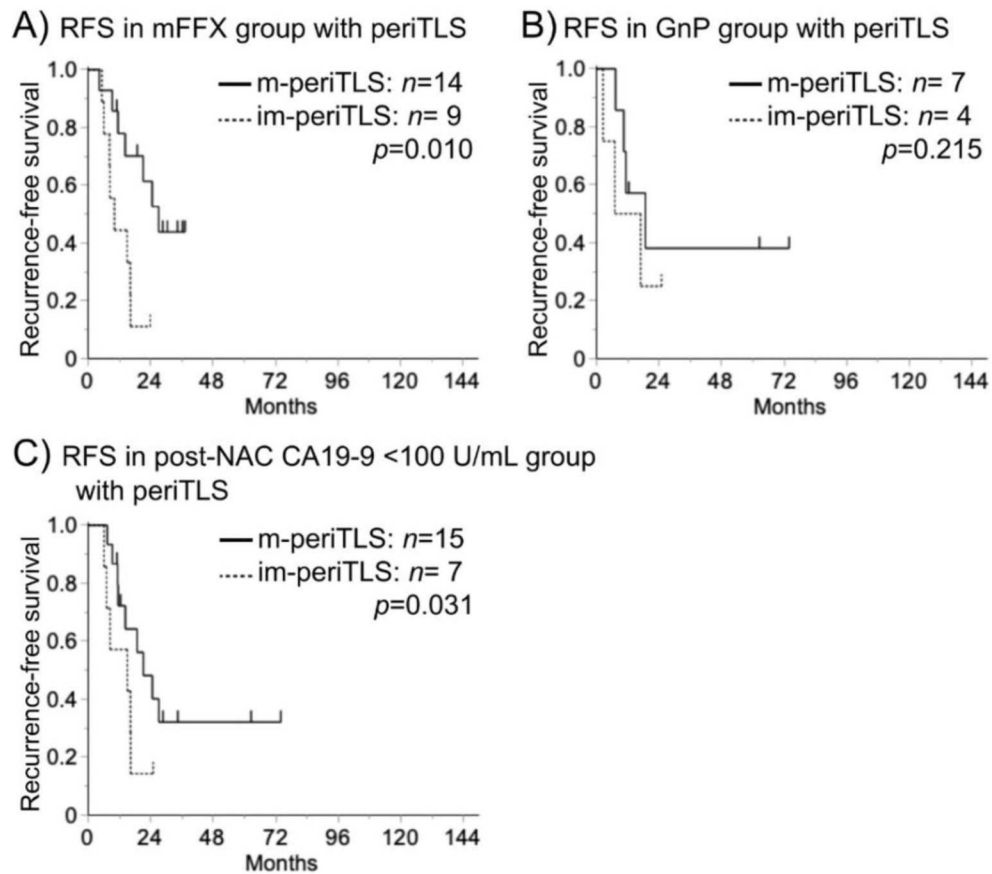


図 5. periTLS の成熟度別に層別化した無再発生存期間(RFS) の

Kaplan–Meier 解析

A) mFOLFIRINOX サブ群における成熟 TLS と未成熟 TLS の RFS。 B) GnP サブ群における成熟 TLS と未成熟 TLS の RFS。 C) 術前 CA19-9 が 100 U/ml 未満のサブ群における成熟 TLS と未成熟 TLS の RFS。生存曲線は Kaplan–Meier 法により算出され、 p 値は全て両側 log-rank 検定により求めた。

表 1. 患者の臨床病理学的特徴

Factor	NAC (n=67)	UpS (n=64)	p-Value
Age (years)	71.0(65–77)	71.0(63–76)	0.700
Sex			
Male	32	36	0.383
Female	35	28	
Preoperative CA19-9 (U/ml)			
<100	52	31	<0.001
≥100	15	33	
Tumor location			
Head	64	61	1.000
Body/Tail	3	3	
Tumor size			
<20 mm	41	23	0.005
≥20 mm	26	41	
Histological differentiation			
well/moderate	59	58	1.000
poor	4	5	
Vascular invasion			
Negative	21	4	<0.001
Positive	46	60	
Pathological nodal metastasis			
N0	49	25	<0.001
N+	18	39	
R status			
R0	63	50	0.011
R1	4	14	
Pathological Stage			
<2B	49	27	<0.001
≥2B	18	37	
TLS			
absent	11	12	0.296
present	56	52	
iTLS			
absent	29	34	0.820
present	38	30	
periTLS			
absent	33	17	0.011
present	34	47	
Distant metastasis recurrence			
Yes (≤1 year)	18	25	0.192
No (>1 year)	49	39	

データは中央値（四分位範囲）または症例数で示した。Vascular invasion には、リンパ管侵襲および神経周囲侵襲を含む。病理学的病期は UICC TNM 分類第 8 版に基づいて分類した。p 値は、Fisher の正確検定または Brunner–Munzel 検定を用いて算出した。

表 2. periTLS と臨床病理学的特徴との関連

Factor	NAC (n=67)			UpS (n=64)		
	periTLS (-)	periTLS (+)	p-Value	periTLS (-)	periTLS (+)	p-Value
Age (years)	71(65.5-76)	70.5(65-79)	0.513	72(61.5-76)	71(63-76)	0.612
Sex						
Male	17	15	0.628	11	25	0.570
Female	16	19		6	22	
Preoperative CA19-9 (U/ml)						
<100	25	27	0.776	5	26	0.091
≥100	8	7		12	21	
Tumor location						
Head	24	17	0.080	11	29	1.000
Body/Tail	9	17		6	18	
Tumor size						
<20 mm	21	20	0.803	6	17	1.000
≥20 mm	12	14		11	30	
Histological differentiation						
well/moderate	28	31	0.618	16	42	1.000
poor	1	3		1	4	
Vascular invasion						
Negative	15	6	0.019	2	2	0.631
Positive	18	28		16	27	
Pathological nodal metastasis						
N0	5	13	0.053	11	28	0.778
N+	28	21		6	19	
R status						
R0	31	32	1.000	13	37	1.000
R1	2	2		4	10	
Pathological Stage						
<2B	5	13	0.053	9	28	0.776
≥2B	28	21		8	19	
Distant metastasis recurrence						
Yes (≤1 year)	8	10	0.784	5	20	0.397
No (>1 year)	25	14		12	27	

データは中央値（四分位範囲）または症例数で示した。p 値は Fisher の正確検定または Brunner–Munzel 検定により算出した。

表 3.NAC 群における periTLS の成熟度と臨床病理学的因子との関連

Factor	Immature eriTLS (n=13)	Mature (n=21)	periTLS	p- value
Age (years)	74.0 (68.5-79.5)	70.0 (64-77)		0.118
Sex				
Male	4	11		0.296
Female	9	10		
Preoperative CA19-9 (U/ml)				
<100	10	17		1.000
≥100	3	4		
Tumor location				
Head	13	19		0.513
Body/Tail	0	2		
Tumor size				
<20 mm	7	13		0.728
≥20 mm	6	8		
Histological differentiation				
well/moderate	11	20		0.269
poor	2	1		
Vascular invasion				
Negative	1	5		0.370
Positive	12	16		
Pathological nodal metastasis				
N0	7	14		0.491
N+	6	7		
R status				
R0	12	20		1.000
R1	1	1		
Pathological Stage				
<2B	7	7		0.491
≥2B	6	14		
Pathological Response				
Responder	0	3		0.154
Non-responder	13	18		
Biochemical (CA19-9) Response				
Responder	1	9		0.044
Non-responder	9	10		
Distant metastasis recurrence				
Yes (≤1 year)	7	3		0.022
No (>1 year)	6	18		

データは中央値（四分位範囲）または症例数で示した。

p 値は Fisher の正確検定または Brunner–Munzel 検定を用いて算出した。

表 4. 無再発生存期間(RFS) に関する単変量および多変量解析.

Factor	Univariate		Multivariate	
	HR (95%CI)	p-Value	HR (95%CI)	p-Value
<i>Patients with periTLS (n=34)</i>				
Age (≥ 60)	3.08 (0.74–12.8)	0.122		
Sex (male)	1.28 (0.68–2.40)	0.431		
Preoperative CA19-9 (≥ 100 U/ml)	1.92 (0.91–4.01)	0.085		
Tumor location (body/tail)	1.46 (0.78–2.75)	0.238		
Tumor size (≥ 20 mm)	2.03 (1.08–3.82)	0.028	1.28(0.54-3.01)	0.577
Histological differentiation (poor)	1.93 (0.59–6.34)	0.277		
Vascular invasion (positive)	3.32 (1.51–7.29)	0.003	3.00(0.67-13.4)	0.150
Pathological nodal metastasis (N+)	1.40 (0.71–2.82)	0.343		
R status (R1)	1.95 (0.60–6.39)	0.268		
Pathological Stage ($\geq 2B$)	1.40 (0.70–2.83)	0.343		
Immature periTLS (present)	3.37 (1.42–7.97)	0.006	2.89(1.21-6.91)	0.017
<i>Patients with periTLS (CA19-9 <100 U/ml, n=22)</i>				
Age (≥ 60)	1.56 (0.35–6.90)	0.560		
Sex (male)	2.63 (0.93–7.47)	0.068		
Tumor location (body/tail)	1.17 (0.42–3.23)	0.767		
Tumor size (≥ 20 mm)	2.03 (0.61–6.76)	0.247		
Histological differentiation (poor)	6.48 (0.67–62.4)	0.106		
Vascular invasion (positive)	3.72 (0.83–16.7)	0.087		
Pathological nodal metastasis (N+)	0.51 (0.17–1.49)	0.219		
R status (R1)	4.73 (0.53–42.4)	0.165		
Pathological Stage ($\geq 2B$)	1.96 (0.67–5.72)	0.219		
Immature periTLS (present)	2.97 (1.05–8.36)	0.040		