

博士論文

下部直腸癌、術前化学放射線治療施行例における
癌幹細胞マーカー、腫瘍浸潤T細胞と
臨床病理学的因子、予後の相関の検討

原田 有三

目次

・ 要旨	2
・ 序文	3
・ 第1章 下部直腸癌、術前化学放射線治療施行例における 腫瘍幹細胞マーカーと臨床病理学的因子、予後の相関に関する検討	
1-1 背景と目的	6
1-2 実験方法	8
1-3 実験結果	12
1-4 考察	29
1-5 小括	34
・ 第2章 下部直腸癌、術前化学放射線治療施行例における 腫瘍浸潤T細胞の意義に関する検討	
2-1 背景と目的	35
2-2 実験方法	36
2-3 実験結果	38
2-4 考察	45
2-5 小括	48
・ まとめ	49
・ 謝辞	50
・ 引用文献	51

要旨

下部直腸癌において術前化学放射線療法 (chemoradiotherapy; CRT)は局所再発率の低下等を目的に行われており、治療効果や予後の予測因子として癌幹細胞や腫瘍浸潤T細胞 (tumor infiltrating lymphocyte; TIL)の関与が報告されている。今回、下部直腸癌の切除検体で癌幹細胞マーカーであるDCLK1、LGR5の発現、CRT前の生検検体でCD8+TIL、FoxP3+TILを評価し、臨床病理学的因子や予後との相関を検討した。結果、CRT症例でDCLK1発現は癌特異的生存率と負に相関したがLGR5発現は予後と相関せず、予後予測因子としてDCLK1の有用性が示唆された。また、CRT前生検のCD8+ TIL数、CD8+/FoxP3+ TIL比はCRT奏効と正に相関した。

序文

【直腸癌術前化学放射線療法について】

進行下部直腸癌は、病変が狭い骨盤腔に存在することから、他部位の大腸癌手術に比して切除断端の確保が難しい症例が多くあり、Peeters らによる Dutch trial の結果では手術単独症例で局所再発が 10.9%と高率に認められている¹。また、人工肛門造設となる症例も多く、患者 QOL の低下につながる。術前化学放射線療法 (CRT) は腫瘍の縮小や局所再発率の低下、さらには肛門温存の可能性を高めることを目的として行われている¹⁻³。CRT の組織学的治療効果の予後に関する臨床的意義については現段階でも十分に評価はなされていないが、組織学的治療効果が再発や生存期間に関連するとの報告がある^{4,5}。また、CRT の治療効果は症例によって異なり、効果の乏しい症例も存在する。不必要な治療や費用、副作用を避けるために CRT の効果を予測する方法の探求が行われてきており、近年、癌幹細胞 (CSC) や腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) の解析による試みが報告されている。

【幹細胞について】

癌組織において一部に存在する癌幹細胞が、自己複製能や分化能を持つことで癌の再発、進展に寄与すると報告されている⁶。また、癌幹細胞は化学療法や放射線療法に対して抵抗性を示すと報告されていることから⁷⁻⁹、大腸癌幹細胞マーカーの同定は重要である。過去には Cluster of differentiation (CD)133、Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5)、Doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) など複数のマーカーが推定されている¹⁰。多くの報告では CD133、LGR5 発現は CRT 奏効と負の相関を示し、予

後不良因子であるとされるが¹¹⁻¹⁶、これらは正常腸管の幹細胞でも発現していることが報告されていることから^{17,18}、癌幹細胞に特異的なマーカーとは言えない。一方、DCLK1は前治療のない大腸癌において予後不良因子とする報告がなされているが^{19,20}、Nakanishiらはマウス大腸癌モデルを使用し、DCLK1は正常腸管の幹細胞ではなく大腸癌幹細胞のマーカーである可能性を示している²¹。しかし、現時点では、大腸癌幹細胞の特異的なマーカーは十分な検討がなされておらず、明らかにされていない。

【CRT 治療効果と TIL】

CRTの作用機序は腫瘍に対する直接的な抗腫瘍効果が主体であるが、CRTによって癌細胞がネクロシスを起こし、生じた腫瘍特異抗原を宿主の免疫細胞が認識することで抗腫瘍免疫が賦活化され、腫瘍の縮小につながるという実験的な報告がある²²⁻²⁴。過去の報告では細胞性免疫をつかさどるCD8+ TILとCRT治療効果の正の相関が示唆されている。一方、免疫反応を抑制するFoxP3+ TILとCRT治療効果に関しては十分に明らかにされていない²⁵⁻²⁹。

【本研究に至った経緯】

既報では術前治療のない大腸癌におけるDCLK1発現は予後不良因子であると報告されているが、CRT症例を含め下部直腸癌に関する検討は行われていない。LGR5に関しても十分な検討がされているとはいいがたい。また、CRTの治療効果予測においてTIL、とりわけFoxP3+ TILの関与に関しては十分に明らかにされていない。そこで本研究では、下部直腸癌で免疫組織学的にDCLK1、LGR5の発現、CD8+ TIL、FoxP3+ TILを検討することとした。そして、直腸癌CRT症例においてCRT奏効例や予後不良例を選別する新たな指標を同定すること

を目的とした。

第1章

下部直腸癌、術前化学放射線治療施行例における 癌幹細胞マーカーと臨床病理学的因子、予後の相関に関する検討

1-1. 背景と目的

進行下部直腸癌に対する術前化学放射線療法（CRT）は、局所再発を低減し、腫瘍を縮小して肛門温存の可能性を高めることを目的とする術前補助療法として行われている¹⁻³。さらに近年では、CRT 著効例では、CRT 後に局所切除や経過観察を行い、良好な成績を得たとの報告もなされている³⁰⁻³²。一方で CRT の治療効果は症例によって異なり、効果の乏しい症例も存在する。不必要な治療や費用、副作用を避けるために CRT の効果を予測する方法の探求が行われてきており、その1つとして近年、癌幹細胞（CSC）の解析が行われている。

Hamburger らは、癌組織のうち一部の CSC が自己複製能や分化能を持ち、再発、進展に関与すると報告している⁶。さらに CSC は放射線や抗癌剤など殺細胞性の治療に抵抗性であると報告されている^{8, 9}。よって CSC のマーカーを同定することは重要であり、推定されるマーカーとして、DCLK1、CD133、LGR5 などが報告されてきた¹⁰。詳細な機序は十分に明らかにはされていないが、過去の多くの報告では CD133、LGR5 の発現は CRT 奏効と負の相関を示し、予後不良因子であるとされる^{11-13, 15, 16}。一方で、Liao らは、大腸癌細胞株において CD133 低発現細胞でも腫瘍形成能力を認め、CD133 のみでの評価は不十分である可能性を示している³³。また、CD133、LGR5 は大腸癌組織のみならず、正常腸管の幹細胞でも発現していることが報告されている^{17, 18}。一方、DCLK1 は神経系の発育に関わる microtubule-associated kinase であるが³⁴、癌幹細胞で

の発現も報告されている³⁵。Chandrakesan らは、APC 変異マウスモデルで DCLK1 陽性細胞が自己複製能、多型性をもち、上皮間葉転換 (EMT) が促進され、DCLK1 を阻害することで腫瘍の発育が抑えられたと報告している³⁶。さらに重要なことに、Nakanishi らは、マウス大腸癌モデルで DCLK1 の阻害により腫瘍は縮小したものの正常粘膜には影響を与えなかったことから、DCLK1 は正常腸管の幹細胞ではなく腫瘍幹細胞のマーカーであると述べている²¹。臨床的には、大腸癌以外にも食道癌、直腸神経内分泌腫瘍、肝細胞癌、膵癌、腎癌、乳癌、唾液腺癌などで DCLK1 の発現が報告されている^{37 - 45}。術前治療のない大腸癌患者において、Gagliardi ら、Gao らは、DCLK1 が予後不良因子であったと報告しているが^{19, 20}、CRT 症例含め直腸癌に関する検討は行われていない。よって本研究は、術前 CRT 症例を含む下部直腸癌で免疫組織学的に DCLK1 その他の CSC マーカーの発現を評価し、臨床病理学的因子や予後との相関を明らかにすることを目的とした。更にこれらが、進行直腸癌における予後や CRT 治療効果を予測し、治療法の選択の指標となる可能性について検討することとした。

1-2. 実験方法

1.2.1 対象患者

東京大学医学部附属病院 大腸肛門外科で 2002 年 1 月 - 2011 年 4 月の間に根治切除が行われた連続する Stage I - III の CRT 症例 70 例および手術単独症例 36 例の下部直腸癌において DCLK1 発現の検討を行った。また、2002 年 1 月 - 2009 年 8 月までの間に根治切除が行われた連続する CRT 症例 56 例については LGR5 発現の検討も行った。全症例の深達度、リンパ節転移は CT、MRI にて判定した。CRT の適応は cT3 以深の症例で、治療期間、費用含め、患者本人の同意が得られた場合に施行しているが、病変による高度の腸管狭窄を呈する症例や出血をきたしている症例等、早期の手術が望ましいと判断された場合は術前 CRT を行わずに手術が施行された。CRT 症例では 1.8 Gy x 28 回 (計 50.4 Gy) の放射線照射と同時に経口化学療法を行い (テガフルウラシル 300mg/m²/day + ロイコボリン 75mg/day)、CRT 終了後 6 - 8 週後に手術を行った。すべての患者は術後のフォローアップとして、3 か月おきに腫瘍マーカーを測定し、6 か月おきの胸腹部 CT、1 年おきの下部消化管内視鏡検査を行った。切除標本はすべて 10% ホルマリンで固定後、パラフィンで包埋し、同院病理部において病理診断が行われた。臨床病理学的因子に関し、TNM stage は Union for International Cancer Control (UICC) 第 7 版に準拠し、CRT 後の組織学的奏効は大腸癌取扱い規約第 8 版に準拠した (表 1)。

表 1 組織学的治療効果

Grade 0	無効	癌細胞に治療による変性、壊死などを認めない。
Grade 1a	ごく軽度の効果	癌の約 1/3 未満で癌細胞の変性、壊死がある。
Grade 1b	軽度の効果	癌の 1/3 以上 2/3 未満で癌細胞の変性、壊死、融解がある。
Grade 2	かなりの効果	癌の 2/3 以上で著名な変性、壊死、融解、消失がある。
Grade 3	著効	癌全体がすべて壊死に陥っているか、または融解、消失した状態。 肉芽腫様組織あるいは線維化巣で置き換えられている。

なお、今回の検討では切除検体を用いて免疫染色を行ったため癌が CRT により消失している Grade 3 症例は対象外とした。なお、当研究は東京大学倫理委員会の承認を受けており対象者から文書による同意を得ている(承認番号：10476- (1))。

1.2.2 免疫組織学的手法

10%ホルマリンで固定されパラフィン包埋された検体を $4\mu\text{m}$ の厚さで切り出した。検体をキシレンで脱パラフィンし、段階的にエタノールで水和させた後、内因性ペルオキシダーゼを 0.3% 過酸化水素水に 25 分反応させて不活化させた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、クエン酸バッファー (pH 6) 中でオートクレーブによる抗原賦活化を行った (120°C、5 分)。非特異的反応を 5% ウシアルブミンに 30 分反応させてブロックし、1 次抗体はウサギのポリクローナル抗体である抗 DCLK1 抗体 (Ab31704, Abcam, Cambridge, MA, USA, 希釈 1:80)、ウサギのモノクローナル抗体である抗 LGR5 抗体 (EPR3065Y, Epitomics,

Burlingame, CA, USA, 希釈 1:100)を 4℃で一晩反応させた。その後、Dako Envision kit (Dako, Carpinteria, CA, USA)を推奨プロトコールで使用し、0.3% 過酸化水素水を加えた 2% 3,3'-ジアミノベンジジンで可視化し、対比染色をマイヤー・リリーマイヤーヘマトキシリン溶液で行った。

1.2.3 免疫染色の判定方法

標本内で DCLK1 の染色態度が不均一であったため、DCLK1 発現の評価は染色の強度を 0 : 染色なし、1 : 軽度、2 : 中等度、3 : 高度とし (図 1)、それぞれに染色割合 (%)をかけて足し合わせた (0 - 300 点)。陽性・陰性のカットオフは全症例の中央値とした。また、LGR5 の評価方法としては直腸癌 CRT 症例に関して検討を行った Saigusa らの報告にならい、50%以上の癌細胞で発現を認めた場合を陽性とした¹⁵。病理部医師、外科医師の 2 名によって患者情報を伏せた形で個別に独立して判定が行われた (DCLK1 免疫染色 : Kappa 係数 = 0.70、LGR5 免疫染色 : Kappa 係数 = 0.67)。なお、陽性/陰性の判定が両者で異なった場合、病理部医師の判定を採用した (DCLK1 免疫染色 : 15 例 (14.2%)、LGR5 免疫染色 : 15 例 (26.8%))。そして、DCLK1、LGR5 発現と臨床病理学的因子、予後との相関を検討した。

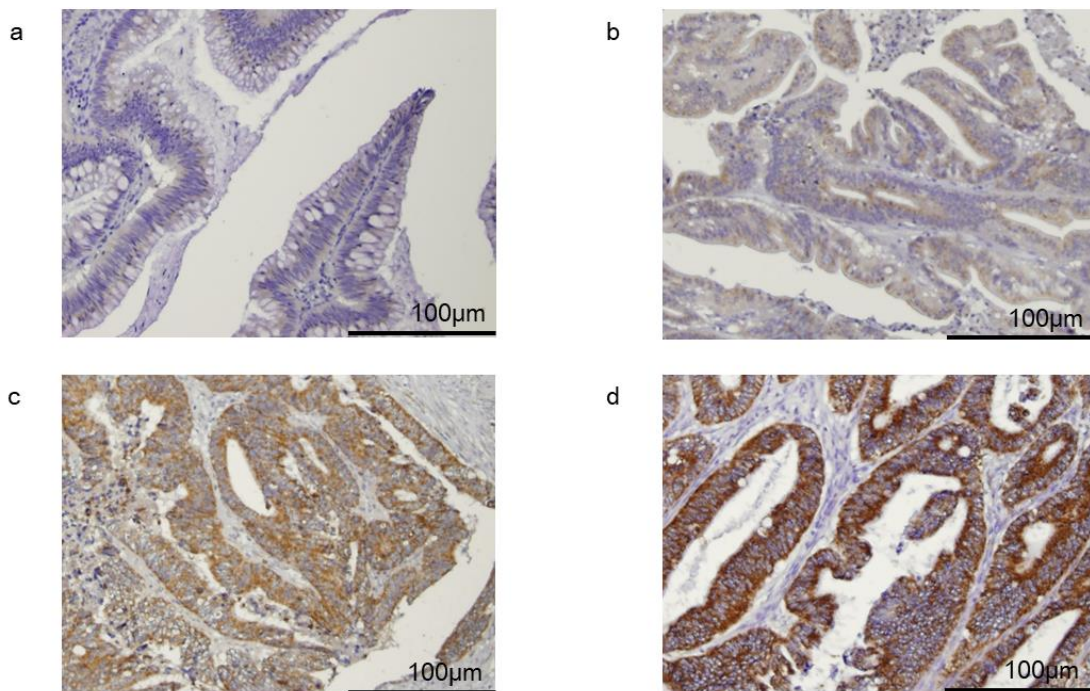


図 1 DCLK1 免疫染色 組織写真 (x 200 倍)

- a) 0 点 : 染色なし、b) 1 点 : 軽度染色、c) 2 点 : 中等度染色
d) 3 点 : 高度染色

DCLK1 は細胞質に染色を認めた。

1.2.4 統計学的解析

DCLK1、LGR5 発現と臨床病理学的因子は χ^2 乗検定、Fisher の正確検定、unpaired t-test を用い、癌特異的生存率 (CSS) や無再発生存率 (RFS) については Kaplan-Meier 法を用いた。P 値は 0.05 未満を統計的に有意であると判断した。全ての検定は JMP 11.0 software (SAS Institute Incorporated, Cary, NC, USA) を用いて行った。

1-3. 結果

1.3.1 DCLK1 発現と臨床病理学的因子、予後の相関の検討

1.3.1.1 臨床病理学的因子

全 106 症例の臨床病理学的因子を表 2 に示す。平均年齢は 61.8 歳 (26 歳 - 89 歳) であり、男性が 64 例 (60.4%) であった。CRT は 70 例 (66.0%) に対して行われており、pT stage は T3-4 が 67 例 (63.2%) で、リンパ節転移は 26 例 (24.5%) に認められた。CRT の組織学的治療効果は Grade 1 が 47 例 (67.1%)、Grade 2 が 23 例 (32.9%) であった。フォローアップ期間は平均 6.3 年 (0.2 年 - 13.0 年) であった。

表 2 DCLK1 解析症例の患者背景

性別	男性	64 (60.4%)	
	女性	42 (39.6%)	
年齢	平均±標準偏差 (歳)	61.8± 10.5	
pT stage*	T1-2	39 (36.8%)	
	T3-4	67 (63.2%)	
組織型	Well	66 (62.3%)	
	Mod	39 (36.8%)	
	Muc	1 (0.9%)	
リンパ管侵襲	あり	12 (11.3%)	
静脈侵襲	あり	67 (63.2%)	
リンパ節転移	あり	26 (24.5%)	
術前化学放射線療法	あり	70 (66.0%)	
	CRT の組織学的治療効果**	Grade 1	47 (44.3%)
		Grade 2	23 (21.7%)

Well: 高分化型管状腺癌、Mod: 中分化型管状腺癌、Muc: 粘液癌

* UICC 第 7 版に準拠、** 大腸癌取扱い規約 第 8 版に準拠

1.3.1.2 DCLK1 免疫染色

以前の多くの報告と同様、DCLK1 は細胞質に発現を認めた (図 1)^{19, 20, 46}。全症例の 57 例 (53.8%) で陽性となった。CRT 症例の 40 例 (57.1%)、手術単独症例の 17 例 (47.2%) が陽性であり、両群の間で DCLK1 発現の有意差は認めなかった ($P=0.33$)。DCLK1 免疫染色の点数の結果から、陽性と陰性の症例数がほぼ均等に分割できるように、DCLK1 陽性/陰性のカットオフ値は中央値 (= 200 点) とした。なお、点数が中央値の症例が 7 例存在した。

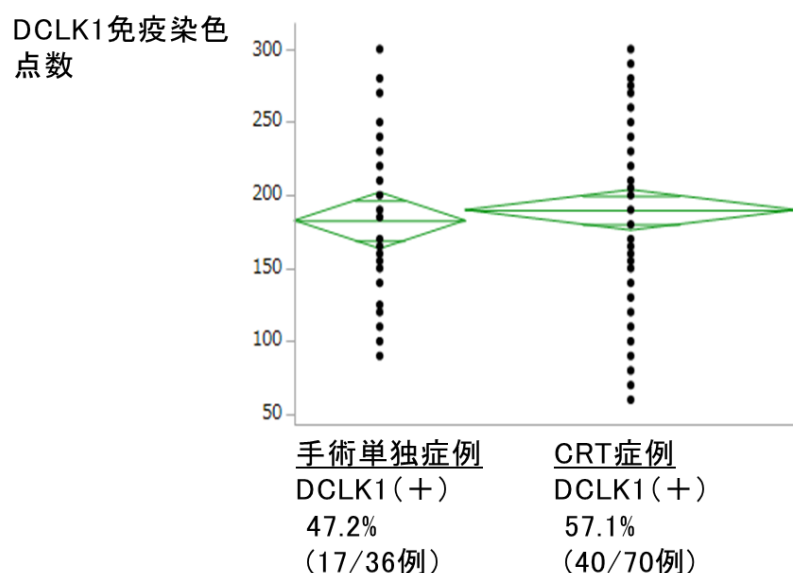


図 2 DCLK1 免疫染色点数の分布

手術単独症例の 47.2%、CRT 症例の 57.1% が DCLK1 陽性となった。

1.3.1.3 CRT 症例における DCLK1 発現と臨床病理学的因子、予後との相関

CRT 症例において DCLK1 陽性例で有意にリンパ節転移が多く ($P=0.02$)、リンパ管侵襲が多い傾向を認めた ($P=0.09$ 、表 3)。CRT の組織学的治療効果とは相関を認めなかった。CRT の組織学的治療効果を Grade 1a (21 例、30%)、Grade 1b-3 (49 例、70%) の 2 群に分けた追加解析も行ったが、同様に相関は認められな

かった (DCLK1 陽性 vs 陰性; 70.3% vs 69.7%、 $P=0.96$)。また DLCK1 陽性例は有意に CSS が不良であったが (5年 CSS:陽性 86.8% vs 陰性 100%、 $P=0.049$ 、図 3)、RFS には有意差を認めなかった (5年 RFS:陽性 64.6% vs 陰性 76.7%、 $P=0.277$ 、図 3)。また、DCLK1 免疫染色の点数は死亡症例 8 例、生存症例 62 例の間で有意差を認めなかった (平均値±標準偏差; 222.5 ± 21.1 vs 185.8 ± 61.0 、 $P=0.10$)。また、再発症例 21 例、無再発症例 49 例の間でも有意差を認めなかった (平均値±標準偏差; 192.6 ± 58.1 vs 188.9 ± 62.0 、 $P=0.81$)。なお、両群における再発形式、再発後の治療に関して検討を行ったところ、以下の結果を得た。DCLK1 陰性群での再発 6 例 (肝肺転移 1 例、肺転移 4 例、鼠径リンパ節転移 1 例)のうち、切除に至った症例が 5 例である一方、陽性群での 12 例 (肝肺転移 1 例、肺転移 5 例、肝転移 1 例、肺転移+腹膜播種 1 例、肝転移+局所再発 1 例、肺転移+局所再発 1 例、局所再発 1 例、吻合部再発 1 例)のうち、切除に至った症例が 6 例のみであった (表 4、表 5)。また今回の検討では、対象症例が含まれる期間が比較的長期であったことから、治療方法の進歩によって予後に影響が生じる可能性が考えられた。よって、手術日をもとに前期/後期の 35 症例ずつの 2 群に分け、予後との相関について検討を加えたが、CSS、RFS ともに有意な相関を認めなかった (5年 CSS: 前期 91.1% vs 後期 94.0%、 $P=0.68$ 、5年 RFS: 前期 60.0% vs 後期 79.1%、 $P=0.07$ 、図 4)。ただし、RFS については後期で良好な傾向がみられるが、前期と後期での症例数に偏りはなく、本検討の結論に対する影響は極めて軽微なものであると考えられた。

表 3 術前化学放射線療法症例における DCLK1 発現と臨床病理学的因子の相関

		DCLK1+ (n=40)		DCLK1- (n=30)		P 値
		n	%	n	%	
性別	男性	27	67.5	17	56.7	0.35
	女性	13	32.5	13	43.3	
年齢, 平均±標準偏差 (歳)		62.5±8.5		60.3±9.4		0.32
ypT stage*	T1-2	14	35.0	15	50.0	0.21
	T3-4	26	65.0	15	50.0	
組織型	Well	21	52.5	21	70.0	0.26
	Mod	18	45.0	9	30.0	
	Muc	1	2.5	0	0.0	
リンパ管侵襲	あり	6	15.0	1	3.4	0.09
静脈侵襲	あり	24	60.0	16	53.3	0.58
リンパ節転移	あり	11	27.5	2	6.7	0.02
CRT の組織学的治療効果**	Grade 1	28	70.0	19	63.3	0.56
	Grade 2	12	30.0	11	36.7	

Well: 高分化型管状腺癌、Mod: 中分化型管状腺癌、Muc: 粘液癌

* UICC 第 7 版に準拠 ** 大腸癌取扱い規約 第 8 版に準拠

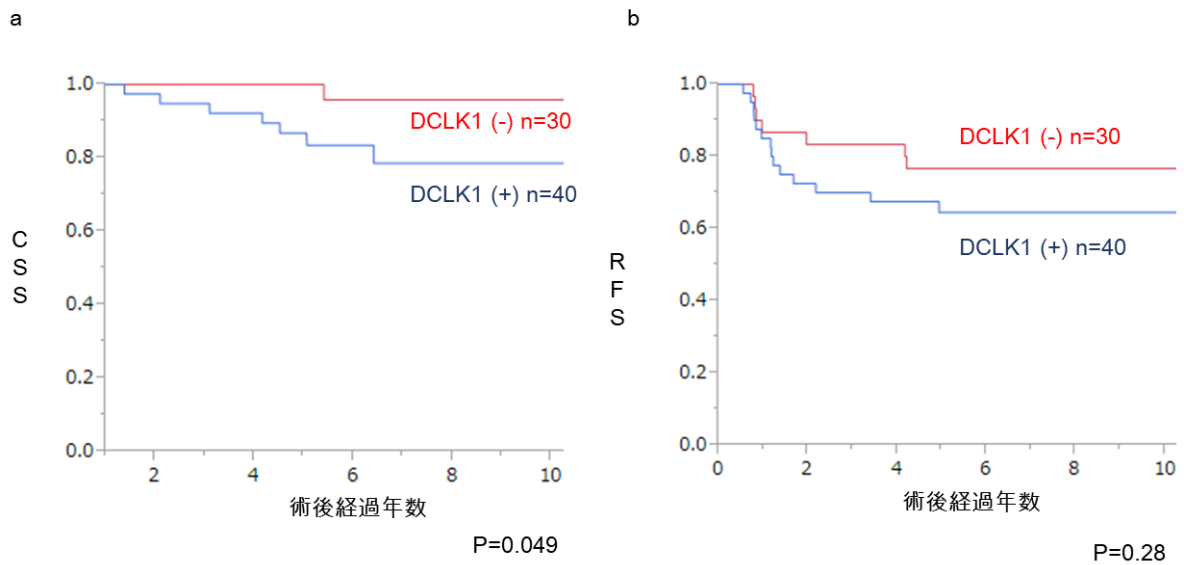


図 3 術前化学放射線療法症例における DCLK1 発現と患者予後の相関

a) 癌特異的生存率 (CSS) に関して、DCLK1 陽性群で有意に不良であった (P=0.049)。

b) 無再発生存率 (RFS) に関しては有意差を認めなかった (P=0.28)。

表 4 術前化学放射線療法症例における再発後の治療方法

	DCLK1 陽性 (n=12)	DCLK1 陰性 (n=6)	P 値
手術	6 (50.0%)	5 (83.3%)	0.32
非手術	6 (50.0%)	1 (16.7%)	

表 5 術前化学放射線療法症例における再発後の経過

	初回転移部位	再発後初回治療	手術後再発の有無と治療	転帰
DCLK1 陽性症例				
症例 1	肺	手術	再発なし	5年7か月 生存
症例 2	肺	化学療法		4年1か月 現病死
症例 3	肺	化学療法		3年 現病死
症例 4	肺	化学療法		2年6か月 現病死
症例 5	肺	手術	肺転移再発にて3回手術	8年9か月 生存
症例 6	肺、局所再発	化学療法		1年3か月 現病死
鼠径リンパ節				
肝門部リンパ節				
症例 7	肝、肺	手術	肝転移再発にて手術 会陰部局所再発にて化学療法	6年4か月 現病死
症例 8	肝	手術	肺転移再発にて2回手術 脳転移再発	6年1か月 以後不明
症例 9	肝、肺、播種	化学療法		2年 現病死
症例 10	播種	手術	播種再発にて手術	8年2か月 生存
症例 11	局所再発	化学療法、放射線		4年6か月 現病死
症例 12	吻合部再発	手術	局所再発にて化学療法	5年 現病死

表 5 術前化学放射線療法症例における再発後の経過（続き）

	初回転移部位	再発後初回治療	手術後再発の有無と治療	転帰
DCLK1 陰性症例				
症例 13	肺	手術	再発なし	7年6か月 生存
症例 14	肺	手術	再発なし	8年9か月 生存
症例 15	肺	手術	再発なし	5年8か月 生存
症例 16	肺	化学療法		5年5か月 現病死
症例 17	肝	手術	肺転移再発にて手術 膵転移再発にて手術 播種再発にて化学療法	7年7か月 生存
症例 18	鼠径リンパ節	手術	再発なし	7年4か月 生存

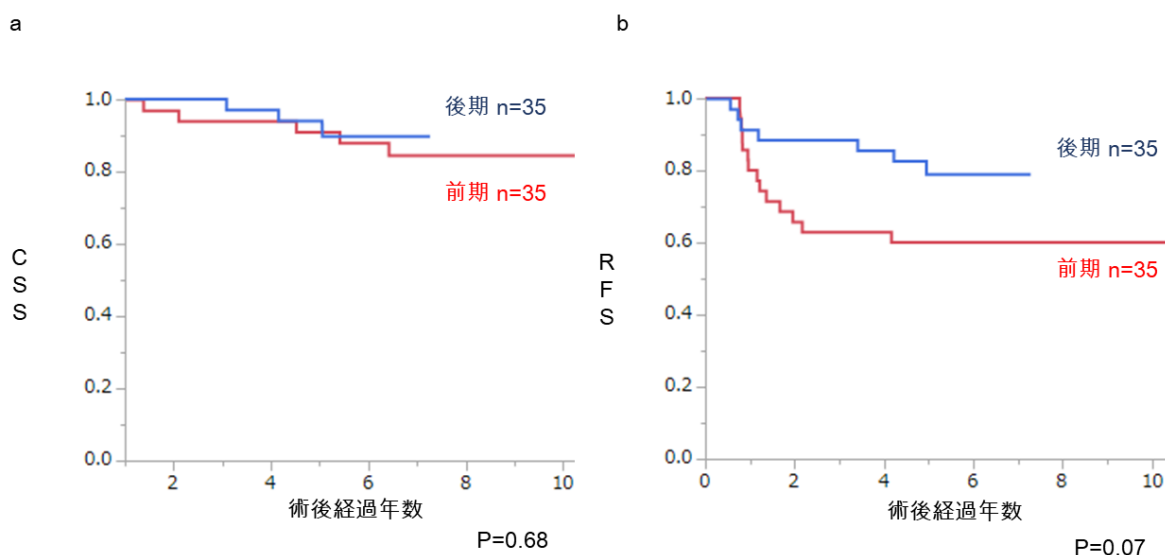


図 4 術前化学放射線療法症例における治療時期と患者予後の相関

a) 癌特異的生存率（CSS）に関して、有意差を認めなかった（ $P=0.68$ ）。

b) 無再発生存率（RFS）に関して、有意差を認めなかった（ $P=0.07$ ）。

1.3.1.4 手術単独症例における DCLK1 発現と臨床病理学的因子、予後の相関

手術単独症例においては DCLK1 発現と有意な相関を示す臨床病理学的因子はなく、予後との相関も認めなかった（5年 CSS：陽性 77.9% vs 陰性 88.9%、 $P=0.67$ 、5年 RFS、陽性 61.4% vs 陰性 52.6%、 $P=0.90$ 、表 6、図 5）。また今回の検討では、対象症例が含まれる期間が比較的長期であったことから、治療方法の進歩によって予後に影響が生じる可能性が考えられた。よって、手術日をもとに前期/後期の 18 症例ずつの 2 群に分け、予後との相関について検討を加えたが、CSS、RFS とともに有意な相関を認めなかった（5年 CSS：前期 87.0% vs 後期 81.3%、 $P=0.91$ 、5年 RFS：前期 40.1% vs 後期 70.1%、 $P=0.22$ 、図 6）。RFS については後期で良好な傾向がみられるが、術前化学放射線治療と同様に集学的治療普及の影響が考えられた。ただし、これについても症例数に偏りはなく、本検討の結論に対する影響は極めて軽微なものであると考えられた。

表 6 手術単独症例における DCLK1 発現と臨床病理学的因子の相関

		DCLK1+ (n=17)		DCLK1- (n=19)		P 値
		n	%	n	%	
性別	男性	9	52.9	11	57.9	0.77
	女性	8	47.1	8	42.1	
年齢, 平均±標準偏差 (歳)		63.8±13.4		61.0±13.2		0.54
pT stage*	T1-2	4	23.5	6	31.6	0.59
	T3-4	13	76.5	13	68.4	
組織型	Well	11	64.7	13	68.4	0.82
	Mod	6	35.3	6	31.6	
リンパ管侵襲	あり	2	11.8	3	15.8	0.73
静脈侵襲	あり	12	70.6	15	78.9	0.56
リンパ節転移	あり	6	35.3	7	36.8	0.92

Well: 高分化型管状腺癌、Mod: 中分化型管状腺癌、 * UICC 第 7 版に準拠

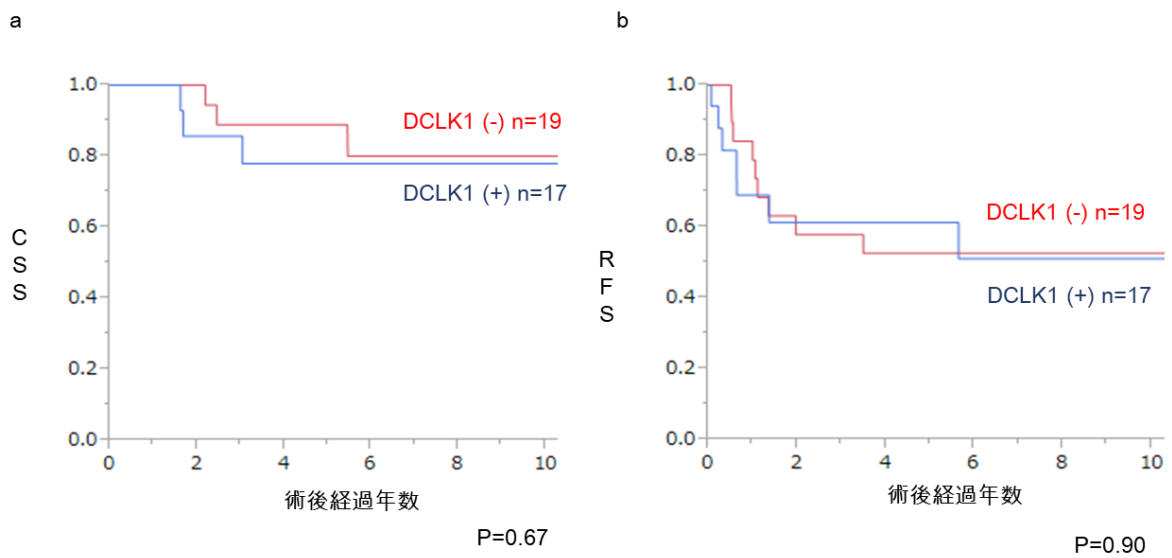


図 5 手術単独症例における DCLK1 発現と患者予後の相関

- a) 癌特異的生存率 (CSS) に関して、有意差を認めなかった (P=0.67)。
- b) 無再発生存率 (RFS) に関して、有意差を認めなかった (P=0.90)。

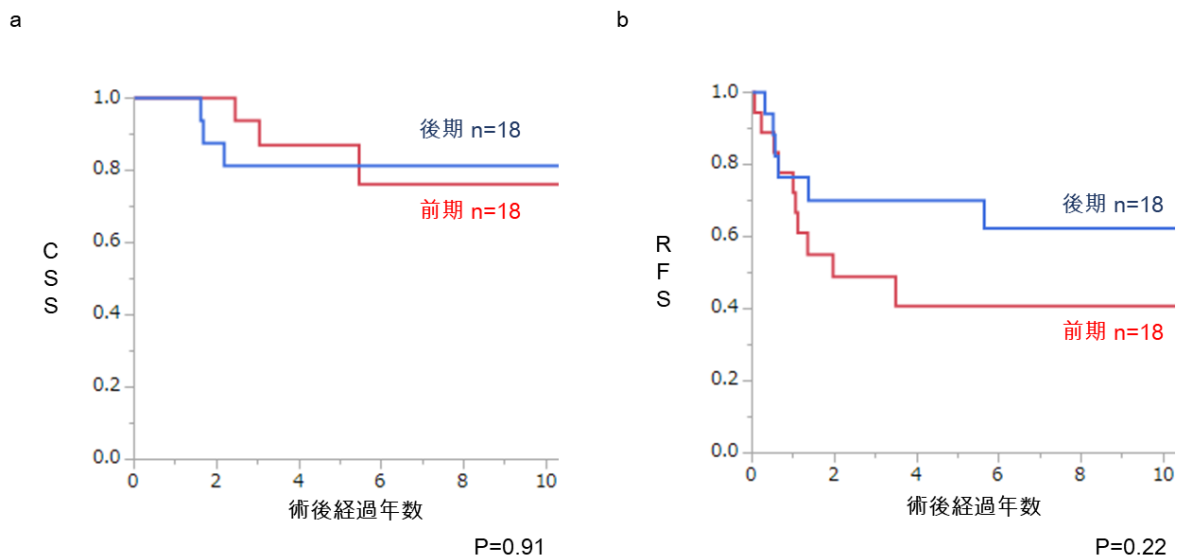


図 6 手術単独症例における治療時期と患者予後の相関

- a) 癌特異的生存率 (CSS) に関して、有意差を認めなかった (P=0.91)。
- b) 無再発生存率 (RFS) に関して、有意差を認めなかった (P=0.22)。

1.3.2 LGR5 発現と臨床病理学的因子、予後の相関

1.3.2.1 患者背景

LGR5 解析症例、56 例の臨床病理学的因子を表 7 に示す。

表 7. LGR5 解析症例の患者背景

性別	男性	37	(66.1%)
	女性	28	(33.9%)
年齢, 平均±標準偏差 (歳)		61.1 ± 9.9	
pT stage *	T1-2	21	(37.5%)
	T3-4	35	(62.5%)
組織型	Well	39	(69.6%)
	Mod	17	(30.4%)
リンパ管侵襲	あり	5	(8.9%)
静脈侵襲	あり	31	(55.4%)
リンパ節転移	あり	9	(16.1%)
CRT の組織学的治療効果 **	Grade 1	35	(62.5%)
	Grade 2	21	(37.5%)

Well: 高分化型管状腺癌、Mod: 中分化型管状腺癌

* UICC 第 7 版に準拠、** 大腸癌取扱い規約 第 8 版に準拠

1.3.2.2 LGR5 免疫染色

過去の報告と同様、LGR5 は細胞質に発現を認め¹⁵、56 症例中 36 例（64.3%）で陽性となった（図 7）。

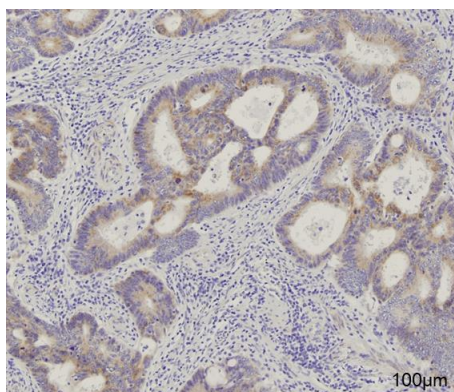


図 7 LGR5 免疫染色 組織写真（x 200 倍）

LGR5 は細胞質に染色を認めた。

1.3.2.3 CRT 症例における LGR5 発現と臨床病理学的因子、予後の相関

LGR5 陽性例でリンパ管侵襲、リンパ節転移が有意に多く、LGR5 陰性例にはリンパ管侵襲、リンパ節転移を認めなかった（各々、 $P=0.03$ 、 $P<0.01$ 、表 8）。CRT の組織学的治療効果とは相関を認めなかった。CRT の組織学的治療効果を Grade 1a（15 例、26.8%）、Grade 1b-3（41 例、73.2%）の 2 群に分けた追加解析も行ったが、同様に相関は認められなかった（LGR5 陽性 vs 陰性；69.4% vs 70.0%、 $P=0.97$ ）。CSS、RFS とは有意な相関を認めなかった（5 年 CSS：陽性 85.1% vs 陰性 85.0%、 $P=0.86$ 、5 年 RFS：陽性 63.9% vs 陰性 70.0%、 $P=0.67$ 、図 8）。DCLK1 の点数は死亡症例 6 例、生存症例 30 例の間で有意差を認めなかった（平均値±標準偏差； 190.0 ± 63.2 vs 181.3 ± 53.0 、 $P=0.73$ ）。また、再発症例 16 例、無再発症例 20 例の間でも有意差を認めなかった（平均値±標準偏

差； 177.8 ± 53.9 vs 186.8 ± 55.1 、 $P=0.63$ ）。リンパ節転移陰性例に限った検討でも、LGR5 発現と CSS（5 年 CSS：陽性 96.0% vs 陰性 85.0%、 $P=0.26$ ）、RFS（5 年 RFS：陽性 70.4% vs 陰性 70.0%、 $P=0.94$ ）との間に有意な相関を認めなかった。また今回の検討では、対象症例が含まれる期間が比較的長期であったことから、治療方法の進歩によって予後に影響が生じる可能性が考えられた。よって、手術日をもとに前期/後期の 28 症例ずつの 2 群に分け、予後との相関について検討を加えたが、CSS、RFS ともに有意な相関を認めなかった（5 年 CSS：前期 85.7% vs 後期 84.4%、 $P=0.85$ 、5 年 RFS：前期 63.9% vs 後期 67.9%、 $P=0.98$ 、図 9）。

表 8 術前化学放射線療法症例における LGR5 発現と臨床病理学的因子の相関

		LGR5+ (n=36)		LGR5- (n=20)		P 値
		n	%	n	%	
性別	男性	25	69.4	12	60.0	0.48
	女性	11	30.6	8	40.0	
年齢, 平均±標準偏差 (歳)		60.2 ± 11.1		62.8 ± 7.1		0.51
pT stage *	T1-2	15	42.0	6	30.0	0.38
	T3-4	21	58.0	14	70.0	
組織型	Well	24	66.7	15	75.0	0.51
	Mod	12	33.3	5	25.0	
リンパ管侵襲	あり	5	13.9	0	0.0	0.03
静脈侵襲	あり	19	52.8	1	60.0	0.60
リンパ節転移	あり	9	25.0	0	0.0	<0.01
CRT の組織学的治療効果 **	Grade 1	22	61.1	13	65.0	0.54
	Grade 2	14	38.9	7	35.0	

Well: 高分化型管状腺癌、Mod: 中分化型管状腺癌

* UICC 第 7 版に準拠 ** 大腸癌取扱い規約 第 8 版に準拠

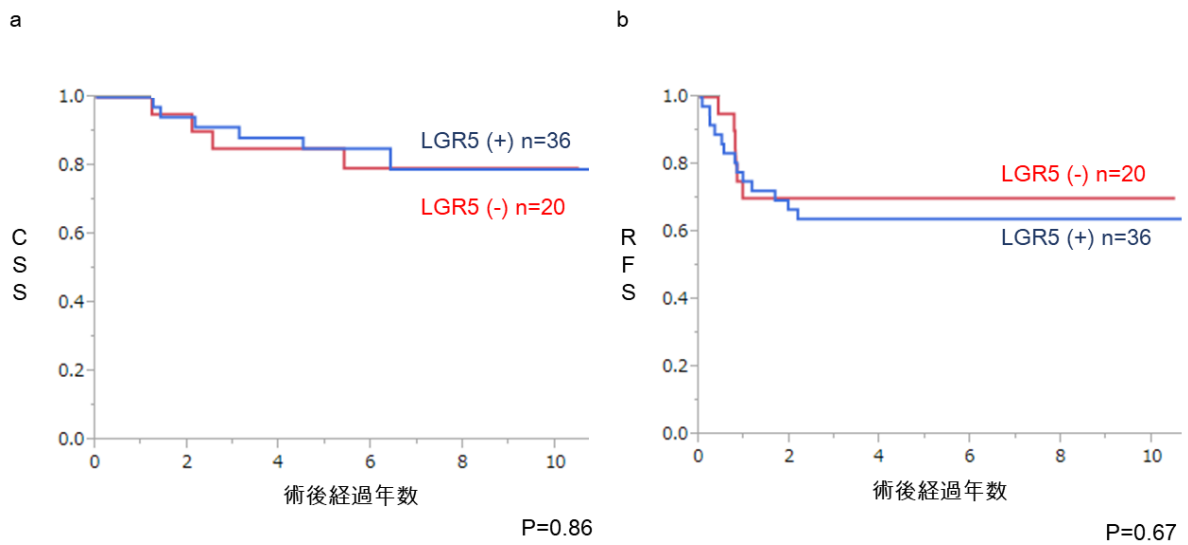


図 8 術前化学放射線療法症例における LGR5 発現と患者予後の相関

- a) 癌特異的生存率 (CSS)に関して、有意差を認めなかった (P=0.86)。
- b) 無再発生存率 (RFS)に関して、有意差を認めなかった (P=0.67)。

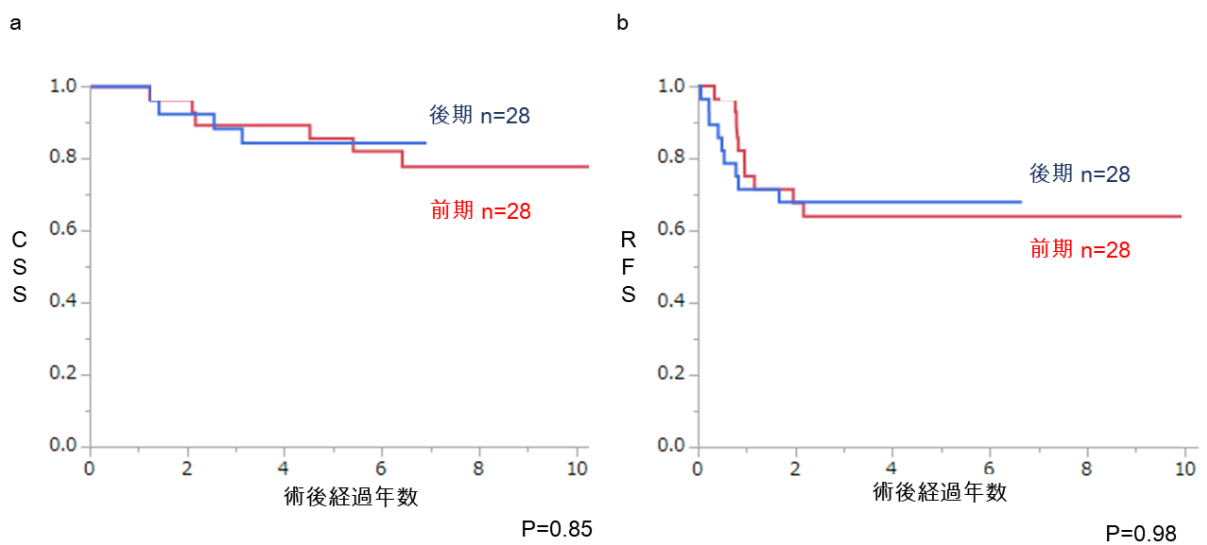


図 9 LGR5 解析症例における治療時期と患者予後の相関

- a) 癌特異的生存率 (CSS)に関して、有意差を認めなかった (P=0.85)。
- b) 無再発生存率 (RFS)に関して、有意差を認めなかった (P=0.98)。

1-4. 考察

May らはマウスの照射モデルを使用し正常腸管粘膜において、陰窩の休止期にある細胞が DCLK1 を発現しており、DCLK1 陽性細胞が放射線抵抗性であることを示している⁴⁷。また、Weygant らは腎細胞癌の細胞実験で DCLK1 陽性細胞が薬剤抵抗性を示すことを報告している⁴³。CRT の治療効果や予後を予測するためには、CRT 前生検検体での評価が望ましいと考えられたが、免疫染色で DCLK1 が不均一に染色されたことから、CRT 前の小さな検体では誤った評価、判定となる危険性があった。よって、サイズの大きな CRT 後の標本を用いて検討を行った。直腸癌における DCLK1 陽性細胞は CRT に抵抗性であることから、CRT 前より CRT 後の方が DCLK1 陽性率が高くなり、CRT 後に遺残した DCLK1 陽性細胞の多寡が予後に相関する可能性があり、CRT 後の標本を用いても評価が可能であると推察した。

今回の研究では CRT 後の標本を用いて DCLK1 陽性細胞の評価を行い予後との相関を検討したところ、推察通り DCLK1 陽性例で CSS 不良であった。過去の報告において Gagliardi ら、Gao らは前治療のない大腸癌において DCLK1 陽性例は CSS 不良であったとしており、今回の結果と概ね矛盾しないと考えられる¹⁹。²⁰。しかし、今回の検討では十分なイベント数がなく予後に関する多変量解析を行っていない。DCLK1 陽性例で CSS 不良であった原因としてリンパ節転移が多く認められたという点が想定されるが、RFS に関しては有意差を認めなかったことから、リンパ節転移の有無よりも腫瘍の悪性度がより CSS に関与している可能性を考えた。よって前述のとおり(1.3.1.3、表 4、表 5)、DCLK1 陽性、陰性症例、それぞれの再発、再発後の治療に関して検討を行った。再発後の治療方法に関してはイベント数が十分ではなく、有意差を示すことができなかつ

たが、DCLK1 陽性例は再発時に切除の適応となるものが少なく、腫瘍の悪性度が高い可能性は否定できず、CRT 後の癌組織での DCLK1 発現は直腸癌術後の予後予測に有用な指標となる可能性があるかと推察される。

一方、手術単独症例においては既報と異なり、DCLK1 発現と予後との相関が認められなかった。原因の一つとして、DCLK1 発現の判定方法や陽性/陰性のカットオフ値が報告によって異なっていることがあげられる。今回の評価方法を別コホートで検討することを試みたが、既報においては免疫染色の詳細なデータが記載されておらず、さらに、本研究では長期予後を評価するために術後5年以上経過している症例を対象としているため、含めることができる症例の期間に制限があることから、現時点では別コホートで検討を行うことが困難であり、適切なカットオフ値の設定に関しては今後のさらなる症例の蓄積が望まれる。今回の DCLK1 免疫染色標本を観察したところ、同一検体内でも部位によって DCLK1 発現量に差が生じ、染色の濃淡が生じていた。よって、それぞれの濃度と染色割合を掛けて足し合わせることで不均一に染色される検体でも定量的な評価が行えると考えた。しかし、既報ではこういった判定方法はとられておらず、過去の Gao ら、Gagliardi らの方法でも免疫染色の評価を行ったが、DCLK1 発現と有意な相関を示す臨床病理学的因子はなく、さらに予後とも相関は認められなかったため、解釈には注意を要すると考えられる。よって今回の研究での判定方法を用いた、今後の多数例による検証が望まれる。

今回の研究では CRT を施行した直腸癌において DCLK1 陽性例で有意にリンパ節転移が多く認められた。過去の報告でも Gao らは前治療のない大腸癌症例での検討で DCLK1 発現とリンパ節転移の相関を述べている¹⁹。

また、DCLK1 発現と CRT 治療効果との相関は認めることができなかった。本研究では各標本における DCLK1 の染色態度が不均一であり、切除検体より極めて小さな CRT 前の生検検体では正確な評価が難しいと考えられたため、CRT 後の切除標本にて検討を行った。DCLK1 陽性細胞は治療抵抗性と想定されることから、CRT 治療効果の低かった症例では CRT 後の切除標本において DCLK1 陽性率が高く、CRT 後の標本を用いても治療効果との相関を示せる可能性が高いと予想した。しかし、実際には DCLK1 発現と CRT 治療効果の相関を示すことはできなかった。この原因としては、本研究では免疫染色を行う性質上、癌細胞が消失した Grade 3 症例を除外せざるを得なかったことが症例の選択バイアスとなって影響している可能性が考えられる。また、CRT による DCLK1 発現率の変化に関しては、癌幹細胞である DCLK1 陽性細胞が化学療法、放射線療法に抵抗性であることから、CRT 前より CRT 後の方が DCLK1 陽性率が高くなると推察した。よって、同様に手術単独症例と CRT 症例の比較では、治療が加わった CRT 症例の方が、DCLK1 発現細胞の割合が高くなると予想したが、CRT 症例では 40 例 (57.1%)、手術単独症例では 17 例 (47.2%) が DCLK1 陽性となり、有意差はなかった ($P=0.33$)。このことにより、逆に DCLK1 発現がより信頼性の高いものであることを示す結果となった。本研究では、CRT 症例、手術単独症例において患者背景が異なっており、病変による高度の腸管狭窄を呈する症例や出血をきたしている症例等、早期の手術が望ましいと判断された場合は術前 CRT を行わずに手術が施行されている。しかし、上記のような症例は極めて限られており (4 例)、結果に対する影響は極めて軽微と考えられる。

一方、LGR5 は 7 回膜貫通型の糖タンパクであり、大腸癌以外にも、胃癌、

肝細胞癌、子宮頸癌、皮膚癌、肺癌、乳癌などで広く発現が報告されている⁴⁸
-⁵³。胃癌、乳癌細胞株実験では LGR5 は Wnt/ β -catenin 経路を介して、EMT を
促進すると報告されている^{48, 53}。前治療のない大腸癌において、過去の報告
では LGR5 発現は予後不良因子とされているが^{54, 55}、今回の研究では予後や CRT
治療効果との相関を認めることができなかった。LGR5 陰性例では全例リンパ
節転移、リンパ管侵襲を認めなかったにも関わらず、LGR5 陽性例に比して予
後良好とはならなかったことから、リンパ節転移陰性例に限った検討を行った
が、LGR5 の発現と CSS、RFS に相関を認めなかった。過去に Saigusa らは直腸
癌 CRT 症例において CRT 後切除検体を用いて LGR5 発現を検討している。それ
によると CRT 後の LGR5 発現が全生存率、無病生存率 (DFS) の不良因子であり、
CRT 治療効果に関しては PCR を用いた検討を行い、LGR5 陽性例で CRT の効果が
不良であったと報告している¹⁵。本研究が既報と異なり予後と相関しなかった
要因として、まず LGR5 の癌幹細胞のマーカーとしての特異性が劣っている可
能性が考えられる。LGR5 染色標本を観察したところ、正常腸管の陰窩底部も
染色されており、LGR5 は癌幹細胞のみならず、正常腸管の幹細胞でも発現し
ている可能性が考えられた。CRT 症例での検討は既報においても十分な症例数
で行われているとは言い難く、今後の症例の蓄積が望まれる。さらに、癌幹細
胞は治療抵抗性とされるが、LGR5 発現と放射線、抗癌剤治療効果の相関につ
いて、相反する報告がなされている。Liu らは LGR5 陽性大腸癌細胞株の実験
で、ATP binding cassette family (ABCB1) を介して抗癌剤抵抗性を示すこと
を報告している一方⁵⁶、Planutis らは大腸癌細胞実験において LGR5 陽性細胞
が高い抗癌剤感受性を示したと報告しており⁵⁷、さらなる検討が必要である。

本研究では LGR5 発現が予後や治療効果に関しては有用な指標とはならなかった一方、DCLK1 発現は予後不良因子であるという結果となった。Nakanishi らは、マウス大腸癌モデルで DCLK1 の阻害により腫瘍は縮小したものの正常粘膜には影響を与えなかったことから DCLK1 は正常腸管の幹細胞ではなく腫瘍幹細胞のマーカーであると報告しているが²¹、今回の研究結果はこれを支持するものと考えられる。

1-5. 小括

下部直腸癌 CRT 症例において、DCLK1 陽性例でリンパ節転移が有意に多く、癌特異的生存率は不良であった。また、手術単独症例においては、DCLK1 発現と相関を示す臨床病理学的因子はなく、予後との相関も認められなかった。

一方、LGR5 発現は下部直腸癌 CRT 症例において、リンパ節転移との相関を認めたものの、予後との相関は認めなかった。

第2章

下部直腸癌、術前化学放射線治療施行例における

腫瘍浸潤 T 細胞の意義に関する検討

2-1. 背景と目的

直腸癌に対する術前化学放射線療法（CRT）の治療効果の機序として、CRT によって癌細胞がネクロシスを起こし、生じた腫瘍特異抗原を宿主の免疫細胞が認識して、抗腫瘍免疫が賦活化されることが考えられている²²⁻²⁴。しかし、CRT の治療効果は症例によって異なり、効果の乏しい症例も存在する。不必要な治療や CRT に伴う費用、副作用を避けるために CRT の効果を予測する方法の探求が行われてきた。過去の報告では、細胞性免疫をつかさどる CD8+ 腫瘍浸潤 T 細胞（TIL）と CRT 治療効果の正の相関が示唆されている。一方、免疫反応を抑制する FoxP3+ TIL と CRT 治療効果の相関に関しては十分に明らかにされていない²⁵⁻²⁹。Shinto らは、東京大学医学部附属病院大腸肛門外科で行っている長期照射とは異なる、短期照射の CRT レジメンにおいて CD8+ TIL / FoxP3+ TIL 比が直腸癌に対する CRT 治療効果と正の相関を示したと報告している²⁵。しかし、長期照射と短期照射では照射量や照射から切除までの期間が異なるため、長期照射においても新たに CRT 治療効果における FoxP3+ TIL の相関を検討することは有意義である。よって、本研究では下部直腸癌 CRT 症例において CRT 前の生検標本を用いて、免疫組織学的に CD8+TIL、FoxP3+ TIL と CRT 治療効果との相関を明らかにし、術前 CRT を施行する際に有用な選択基準となりうるか検討することを目的とした。

2-2. 実験方法

2.2.1 対象患者

東京大学医学部附属病院大腸肛門外科で2001年3月 - 2009年8月の間にCRT後に切除が行われた連続する下部直腸癌61症例を対象とし、CRT前生検検体を用いて評価を行った。術前診断やCRTの適応、レジメン、術後フォローアップのスケジュール、標本の診断方法に関しては第1章での記載と同一である。また、TNM stageはUICC第7版に準拠し、CRT後の組織学的奏効は大腸癌取扱い規約第8版に準拠した。当研究は第1章の検討と同じく、東京大学倫理委員会の承認を受けており対象者から文書による同意を得ている（承認番号：10476-(1)）。

2.2.2 免疫組織学的手法

免疫染色の手法は第1章での記載と同一である。1次抗体はマウスのモノクローナル抗体である抗CD8抗体（4B11, Novocastra, CA, USA, 希釈1:50）、マウスのモノクローナル抗体である抗FoxP3抗体（236/E7, Abcam, MA, USA, 希釈1:100）を使用した。陽性コントロールとして扁桃を使用した。

2.2.3 免疫染色の判定方法

Yasudaらの報告と同様に、無作為に顕微鏡の400倍で3視野を選びTILの個数を数えた²⁶。臨床情報を伏せた上で2名によって個別に計測が行われ、両者の平均値をTIL数として解析を行った。

2.2.4 統計学的解析

CD8、FoxP3 TIL 数と CRT の組織学的治療効果の相関は Wilcoxon' s test を使用した。CSS や RFS については Kaplan-Meier 法を用いた。P 値は 0.05 未満を統計的に有意であると判断した。全ての検定は JMP 11.0 software (SAS Institute Inc.)を用いて行った。

2-3. 結果

2.3.1 臨床病理学的因子

検討症例の臨床病理学的因子を表 9 に示す。年齢は中央値 61.4 歳（33 - 78 歳）であり、男性が 39 例（63.9%）であった。CRT 後の深達度は pT3 以深が 35 例（57.4%）で、リンパ節転移は 9 例（14.8%）に認められ、遠隔転移は 7 例（11.5%）に認められた（肝転移 3 例、肺転移 2 例、脳転移 1 例、傍大動脈リンパ節転移 1 例）。CRT の組織学的治療効果は以下であった：Grade 0：0 例（0%）、Grade 1：35 例（57.4%）、Grade 2：21 例（34.4%）、Grade 3：5 例（8.2%）。

表9 腫瘍浸潤T細胞解析症例の患者背景 (n = 61)

性別	男性	39 (63.9%)
	女性	22 (36.1%)
年齢, 平均±標準偏差 (歳)		61.4 ± 9.6
pT stage *	T0-2	26 (42.6%)
	T3-4	35 (57.4%)
組織型	Well	42 (77.8%)
	Mod	11 (20.3%)
	Muc	1 (1.9%)
リンパ管侵襲	あり	5 (8.2%)
静脈侵襲	あり	31 (50.8%)
リンパ節転移	あり	9 (14.8%)
遠隔転移	あり	7 (11.5%)
pTNM Stage *	0-II	49 (80.3%)
	III-IV	12 (19.7%)
CRT の組織学的治療効果 **	Grade 1	35 (57.4%)
	Grade 2	21 (34.4%)
	Grade 3	5 (8.2%)

Well: 高分化型腺癌、Mod: 中分化型腺癌、Muc: 粘液癌

* UICC 第7版に準拠 ** 大腸癌取扱い規約 第8版に準拠

2.3.2 TIL免疫染色

過去の報告と同様に CD8、FoxP3 はそれぞれ細胞膜、核に発現を認めた (図 10)。

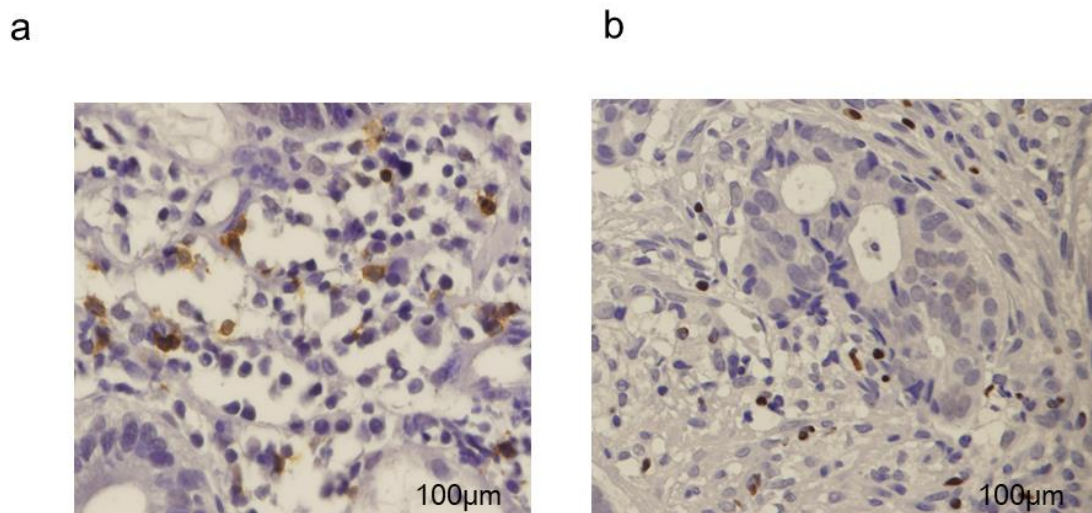


図 10 腫瘍浸潤 T 細胞免疫染色 組織写真 (x 400 倍)

- a) CD8+ 腫瘍浸潤 T 細胞：細胞膜に染色を認めた。
- b) FoxP3+ 腫瘍浸潤 T 細胞：核に染色を認めた。

2.3.3 TIL と CRT 治療効果の相関

CD8+ TIL 数、CD8+/FoxP3+ TIL 比は CRT の組織学的治療効果と有意な相関を認めたが (P=0.03、0.04)、FoxP3+ TIL 数は CRT の組織学的治療効果との相関を認めなかった (P=0.20) (図 11)。また、CRT の組織学的治療効果を Grade 1a (17 例、27.9%)、Grade 1b-3 (44 例、72.1%) の 2 群に分けた追加解析を行ったところ、CD8+TIL、FoxP3+ TIL、CD8+/FoxP3+ TIL 比と CRT の組織学的治療効果と有意な相関は認められなかった (各々、P=0.18、P=0.90、P=0.21)。

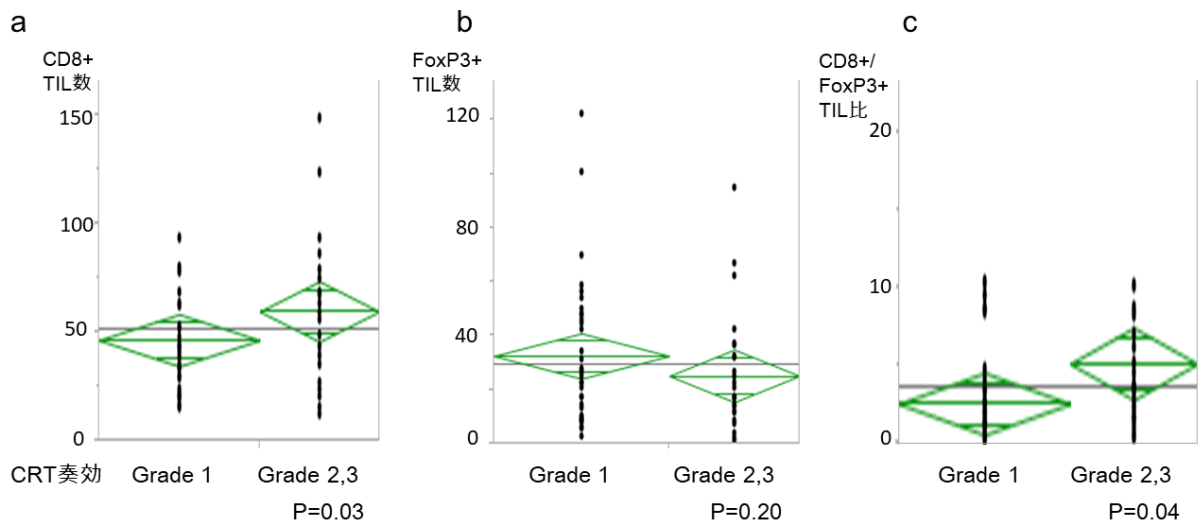


図 11 腫瘍浸潤 T 細胞数と化学放射線療法奏効の相関

a) CD8+腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) 数と化学放射線療法 (CRT) 奏効

: CD8+ TIL 高浸潤の症例で CRT 奏効が高かった (P=0.03)。

b) FoxP3+TIL 数と CRT 奏効 : FoxP3+ TIL 数と CRT 奏効は相関を認めなかった (P=0.20)。

c) CD8+/FoxP3+ TIL 比と CRT 奏効 : CD8+/FoxP3+ TIL 比が高い症例で CRT 奏効が高かった (P=0.04)。

2.3.4 TIL と予後の相関

患者予後に対して遠隔転移の存在が極めて大きな影響を持つため、今回の研究は比較的少数例での検討であることから、遠隔転移を伴った7例を除く54例で予後との相関を検討した。

CD8+TIL 高浸潤例で有意に CSS、RFS が良好であった (5年 CSS : CD8+TIL 高浸潤 100% vs CD8+TIL 低浸潤 74.4%、P=0.004、図 8; 5年 RFS : CD8+TIL 高浸潤 84.8% vs CD8+TIL 低浸潤 48.3%、P=0.006、図 9)。しかし、FoxP3+ TIL、CD8+/FoxP3+ TILs 比は予後と相関を認めなかった (5年 CSS : FoxP3+TIL 高浸潤 89.7% vs FoxP3+TIL 低浸潤 82.0%、P=0.14、図 8; 5年 RFS : FoxP3+TIL 高浸潤 71.9% vs FoxP3+TIL 低浸潤 62.1%、P=0.58、図 9; 5年 CSS :

CD8+/FoxP3+TIL 比高値 86.5% vs CD8+/FoxP3+TIL 比低値 85.7%、P=0.82、図 12; 5年 RFS : CD8+/FoxP3+TIL 比高値 81.0% vs CD8+/FoxP3+TIL 比低値 63.3%、P=0.36、図 13)。また今回の検討では、対象症例が含まれる期間が比較的長期であったことから、治療方法の進歩によって予後に影響が生じる可能性が考えられた。よって、手術日をもとに前期/後期の 27 症例ずつの 2 群に分け、予後との相関について検討を加えたが、CSS、RFS ともに有意な相関を認めなかった(5年 CSS: 前期 88.9% vs 後期 92.0%、P=0.43、5年 RFS: 前期 66.7% vs 後期 81.5%、P=0.27、図 14)。

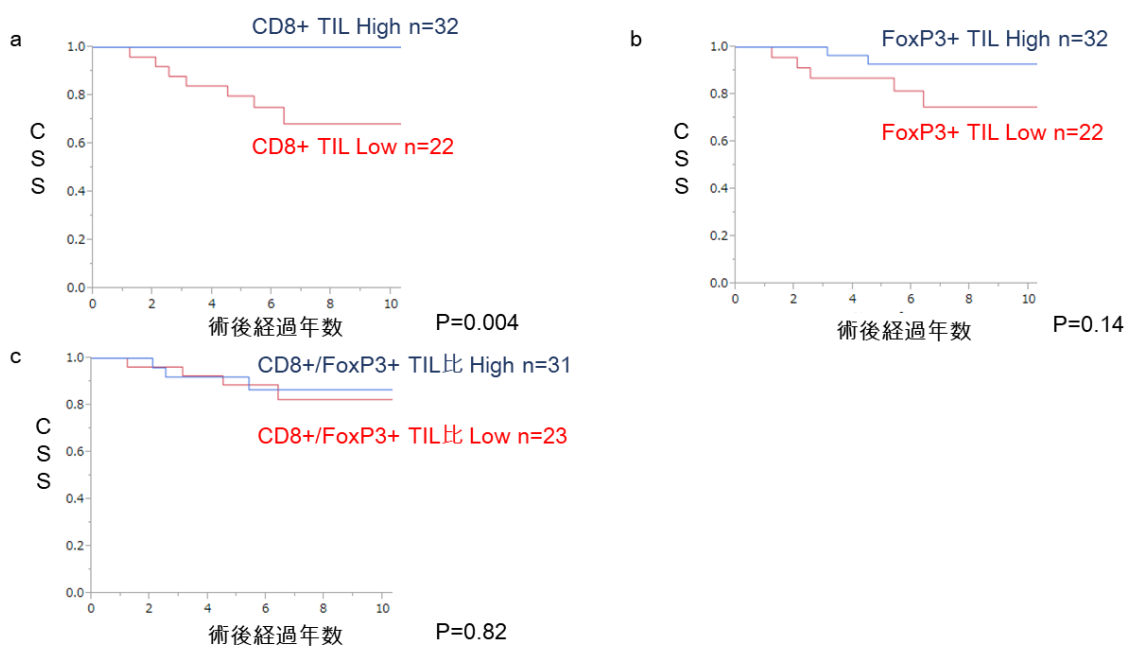


図 12 腫瘍浸潤 T 細胞数と癌特異的生存率の相関

a) CD8+ 腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) 数 (/視野) と癌特異的生存率 (CSS)

: CD8+ TIL 高浸潤の症例で CSS が良好であった (P=0.004)。

b) FoxP3+TIL 数 (/視野) と CSS : FoxP3+ TIL 数と CSS は相関を認めなかった (P=0.14)。

c) CD8+/FoxP3+ TIL 比と CSS : CD8+/FoxP3+ TIL 比と CSS は相関を認めなかった (P=0.82)。

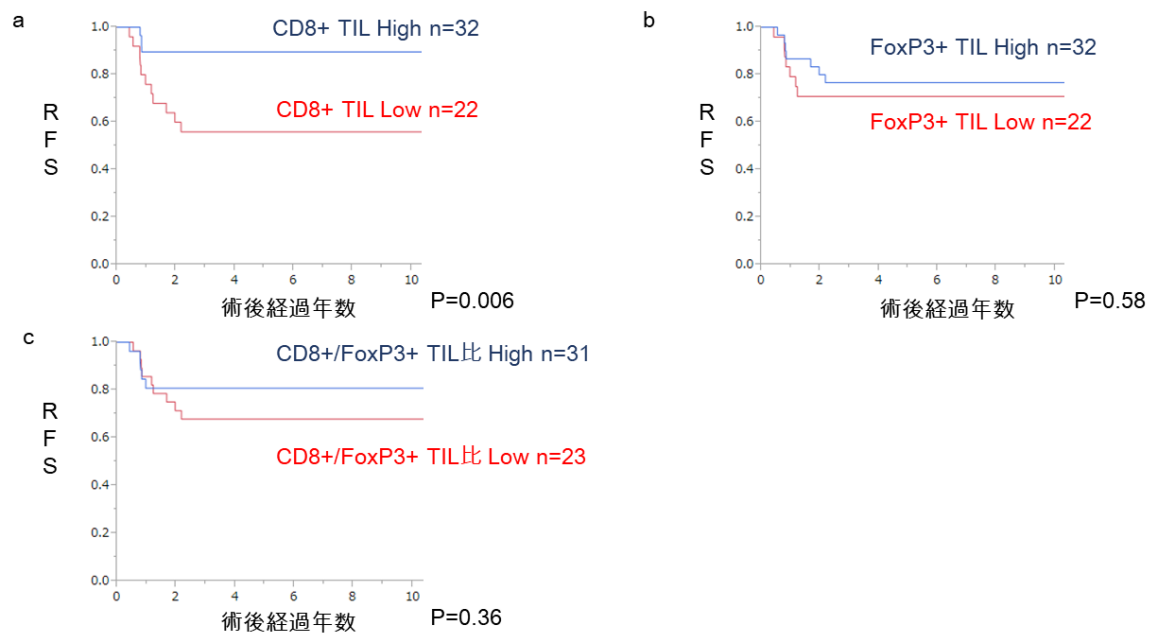


図 13 腫瘍浸潤 T 細胞数と無再発生存率の相関

a) CD8+ 腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) 数と無再発生存率 (RFS)

: CD8+ TIL 高浸潤の症例で RFS が良好であった (P=0.006)。

b) FoxP3+TIL 数と CSS : FoxP3+ TIL 数 RFS とは相関を認めなかった (P=0.58)。

c) CD8+/FoxP3+ TIL 比と CSS : CD8+/FoxP3+ TIL 比と RFS は相関を認めなかった (P=0.36)。

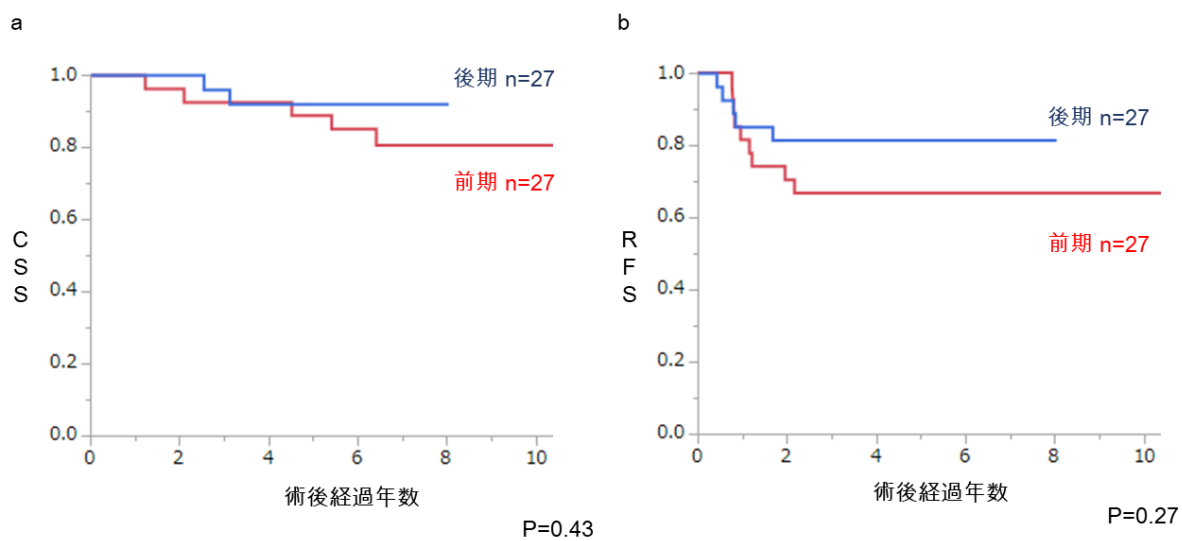


図 14 腫瘍浸潤 T 細胞数解析症例における治療時期と患者予後の相関

a) 癌特異的生存率 (CSS) に関して、有意差を認めなかった (P=0.43)。

b) 無再発生存率 (RFS) に関して、有意差を認めなかった (P=0.27)。

2-4. 考察

Yasuda らは CRT 前の生検検体を用いて CD8+ TIL 数、CD4+ TIL 数が CRT 治療効果と相関したと報告している²⁶。一方、CD4+ TIL には、細胞性免疫をつかさどる Th1 細胞と免疫反応を抑制する抑制性 T 細胞という、相反する機能を持つ T 細胞が含まれている。よって本研究では、腫瘍免疫に大きく関与する細胞障害性 T 細胞のマーカーである CD8 に加え、抑制性 T 細胞のマーカーである FoxP3 の発現を検討した。なお、CRT の治療効果を判定するためには CRT 前生検検体での評価が有用と考え、生検検体で十分に TIL の評価が可能であった。一方、CRT 後の検体は CRT による組織変性を受けていたため評価が難しく、CRT 前標本での解析を行った。

本研究では CD8+ TIL と CRT 奏効の正の相関が示されたが、これは過去の多くの報告と同様である。しかし、FoxP3+ TIL と CRT 奏効の相関については、意見の一致をみていない。本研究と同様、Teng ら、Anitei らは相関を認めなかったとしているが^{28, 29}、McCoy らは CRT 後の切除検体を使用した検討で、CRT 治療効果の高い症例で FoxP3+ TIL が少なかったと報告している²⁷。今回の研究でも CRT 後の組織標本を用いて CD8+ TIL、FoxP3+ TIL の評価を試みた。しかし、非腫瘍部分にも相当量の T 細胞浸潤を認め、かつ CRT によって惹起された線維化により標本内部で TIL 分布が不均一であり、観察範囲によって値の差が大きく、また正常粘膜にも多くの炎症細胞浸潤を認めたことから、TIL 数の計測部位の決定が難しいと判断した。また、McCoy らの研究は CRT 後の検体での評価のため、CRT による影響で FoxP3+ TIL が減少したか、FoxP3+ TIL が少ない症例で CRT 奏効が高かったかが判断できず、慎重な解釈が必要と考えられ

る。

CD8+TIL、FoxP3+ TILは腫瘍免疫において相反する働きをもつため、それぞれの絶対数よりも、両者のバランスが重要であると考えた。Tabachnykらは、頭頸部癌においてCRTによってCD8+/FoxP3+ TIL比が上昇し、CD8+/FoxP3+TIL比が患者予後と正に相関したと報告している⁵⁸。Shintoらは直腸癌において、短期照射のCRTレジメンでCD8+ TIL、CD8+/FoxP3 TIL比とCRT奏効の相関を報告しているが、CRT照射から手術までの期間が短いため、照射量、手術までの期間が異なる長期照射のレジメンには外挿できない可能性があるとして述べている²⁵。そこで東京大学医学部附属病院大腸肛門外科で行っている長期照射のレジメンにおいて検討を行ったが、CD8+/FoxP3+ TILs比とCRT治療効果に正の相関を認めた。Shintoらの報告ではCD8+ TIL数より、CD8+/FoxP3+ TIL比がCRT治療効果とより強く相関することが示されているが、本研究ではCRT奏効の予測因子としてCD8+ TIL数に対するCD8+/FoxP3+ TIL比の優位性は認めることはできなかった。今回の検討では症例によって生検検体のサイズや個数が異なっていることもあり、今後より多くの症例での検討が望まれる。

予後に関しては、前治療のない大腸癌においてmeta-analysisが報告されておりCD8+ TIL数、FoxP3+ TIL数がともに予後良好因子とされているが⁵⁹⁻⁶¹、CD8+/FoxP3+ TIL比と予後の相関に関しては、予後良好の因子とする報告^{62, 63}と予後との相関を認めなかったとする報告⁶⁴がある。さらに、直腸癌CRT症例に関しては報告が少なく、十分な検討がなされていない。Tengらは今回の研究と同様に、CD8+ TILとDFSは相関するもののFoxP3+ TILとDFSは相関しなかったと報告している²⁸。一方ShintoらはCRT後のCD8+ TILがRFS良好因

子であるとし²⁵、McCoyらはCRT後のFoxP3+ TILがCSS、RFS不良因子であったと報告しており²⁷、結果の一致をみていない。今回の検討では前述のとおり、CRT後標本でのTIL評価は困難であると考えており、慎重な解釈が必要である。

2-5. 小括

直腸癌 CRT 前生検における CD8+ TIL 数が多い症例、CD8+/FoxP3+ TIL 比が高い症例で CRT 組織学的治療効果が高かった。また、CD8+ TIL 数が多い症例で有意に CSS、RFS が良好であった。

まとめ

今回、下部直腸癌 CRT 症例における検討で、DCLK1 発現はリンパ節転移に関連し、CRT 後に残存した DCLK1 陽性細胞の存在が CSS 不良因子となりうる可能性が示された。また、CRT 治療効果には CRT 前の CD8+ TIL 数、CD8+/FoxP3+ TIL 比が関連し、CRT 前生検における CD8+TIL 高浸潤症例は CSS、RFS が良好である可能性が示された。本研究が発端となり、DCLK1 発現による直腸癌 CRT 症例におけるさらなる精度の高い予後予測や CD8+ TIL、CD8+/FoxP3+ TIL 比による治療効果、予後予測が行われるようになることを期待する。

謝辞

本研究をすすめるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 渡邊聡明教授にはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝いたします。そして、腫瘍外科学・血管外科学 野澤宏彰准教授、自治医科大学 消化器・一般外科学 北山丈二教授、日本赤十字社医療センター 大腸肛門外科 須並英二先生、国際医療福祉大学 消化器外科 石原聡一郎教授には、具体的な実験方法、実験手技の習得、データの解釈、研究の進め方など、多岐に渡る詳細な御指導を頂きました。さらに、実際の実験に際しては、埼玉県立がんセンター 消化器外科 風間伸介先生、東京大学医学部附属病院 病理部 森川鉄平准教授、同愛記念病院 外科 安田幸嗣先生、国立国際医療研究センター 下部消化管外科 清松知充先生、自治医科大学 消化器・一般外科学 山口博紀准教授、東京大学 腫瘍外科学 江本成伸先生、室野浩司先生、金子学先生、佐々木和人先生、大谷研介先生、西川武司先生、田中敏明先生、川合一茂先生、畑啓介先生には多大なるご協力を頂きました。

ここに深甚なる謝意を表します。

引用文献

1. Peeters KC, Marijnen CA, Nagtegaal ID, et al. The TME trial after a median follow-up of 6 years: increased local control but no survival benefit in irradiated patients with resectable rectal carcinoma. *Annals of surgery* 2007;246(5):693-701.
2. Folkesson J, Birgisson H, Pahlman L, et al. Swedish Rectal Cancer Trial: long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23(24):5644-50.
3. Crane CH, Skibber JM, Feig BW, et al. Response to preoperative chemoradiation increases the use of sphincter-preserving surgery in patients with locally advanced low rectal carcinoma. *Cancer* 2003;97(2):517-24.
4. Topova L, Hellmich G, Puffer E, et al. Prognostic value of tumor response to neoadjuvant therapy in rectal carcinoma. *Diseases of the colon and rectum* 2011;54(4):401-11.
5. Tomono A, Yamashita K, Kanemitsu K, et al. Prognostic significance of pathological response to preoperative chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer. *International journal of clinical oncology* 2016;21(2):344-9.
6. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science (New York, NY)* 1977;197(4302):461-3.
7. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote

radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444(7120):756-60.

8. Zeki SS, Graham TA, Wright NA. Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2011;8(2):90-100.

9. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature reviews Cancer* 2008;8(7):545-54.

10. Ong BA, Vega KJ, Houchen CW. Intestinal stem cells and the colorectal cancer microenvironment. *World journal of gastroenterology* 2014;20(8):1898-909.

11. Hongo K, Kazama S, Sunami E, et al. Immunohistochemical detection of CD133 is associated with tumor regression grade after chemoradiotherapy in rectal cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2012;29(4):2849-57.

12. Hiroishi K, Inomata M, Kashima K, et al. Cancer stem cell-related factors are associated with the efficacy of pre-operative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Experimental and therapeutic medicine* 2011;2(3):465-70.

13. Kawamoto A, Tanaka K, Saigusa S, et al. Clinical significance of radiation-induced CD133 expression in residual rectal cancer cells after chemoradiotherapy. *Experimental and therapeutic medicine* 2012;3(3):403-09.

14. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, et al. CD133 expression in rectal cancer

- after preoperative chemoradiotherapy. *Cancer science* 2010;101(4):906-12.
15. Saigusa S, Inoue Y, Tanaka K, et al. Clinical significance of LGR5 and CD44 expression in locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *International journal of oncology* 2012;41(5):1643-52.
 16. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, et al. Gene expression profiles of tumor regression grade in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Oncology reports* 2012;28(3):855-61.
 17. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007;449(7165):1003-7.
 18. Todaro M, Francipane MG, Medema JP, et al. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology* 2010;138(6):2151-62.
 19. Gao T, Wang M, Xu L, et al. DCLK1 is up-regulated and associated with metastasis and prognosis in colorectal cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2016;142(10):2131-40.
 20. Gagliardi G, Goswami M, Passera R, et al. DCLK1 immunoreactivity in colorectal neoplasia. *Clinical and experimental gastroenterology* 2012;5:35-42.
 21. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, et al. *Dclk1* distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nature genetics* 2013;45(1):98-103.
 22. Lugade AA, Sorensen EW, Gerber SA, et al. Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*

2008;180(5):3132-9.

23. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature medicine* 2007;13(9):1050-9.

24. Plotnikov A, Niego B, Ophir R, et al. Effective treatment of mouse metastatic prostate cancer by low electric field enhanced chemotherapy. *The Prostate* 2006;66(15):1620-30.

25. Shinto E, Hase K, Hashiguchi Y, et al. CD8+ and FOXP3+ tumor-infiltrating T cells before and after chemoradiotherapy for rectal cancer. *Annals of surgical oncology* 2014;21 Suppl 3:S414-21.

26. Yasuda K, Nirei T, Sunami E, et al. Density of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer. *Radiation oncology (London, England)* 2011;6:49.

27. McCoy MJ, Hemmings C, Miller TJ, et al. Low stromal Foxp3+ regulatory T-cell density is associated with complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *British journal of cancer* 2015;113(12):1677-86.

28. Teng F, Meng X, Kong L, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes, forkhead box P3, programmed death ligand-1, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 expressions before and after neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*

2015;166(6):721-32.e1.

29. Anitei MG, Zeitoun G, Mlecnik B, et al. Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*

2014;20(7):1891-9.

30. Habr-Gama A, Sabbaga J, Gama-Rodrigues J, et al. Watch and wait approach following extended neoadjuvant chemoradiation for distal rectal cancer: are we getting closer to anal cancer management? *Diseases of the colon and rectum* 2013;56(10):1109-17.

31. Yu CS, Yun HR, Shin EJ, et al. Local excision after neoadjuvant chemoradiation therapy in advanced rectal cancer: a national multicenter analysis. *American journal of surgery* 2013;206(4):482-7.

32. Pozo ME, Fang SH. Watch and wait approach to rectal cancer: A review. *World journal of gastrointestinal surgery* 2015;7(11):306-12.

33. Liao Y, Hu X, Huang X, et al. Quantitative analyses of CD133 expression facilitate researches on tumor stem cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2010;33(5):738-42.

34. Burgess HA, Martinez S, Reiner O. KIAA0369, doublecortin-like kinase, is expressed during brain development. *Journal of neuroscience research* 1999;58(4):567-75.

35. Li L, Bellows CF. Doublecortin-like kinase 1 exhibits cancer stem cell-like characteristics in a human colon cancer cell line. *Chinese journal of*

cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu 2013;25(2):134-42.

36. Chandrakesan P, Weygant N, May R, et al. DCLK1 facilitates intestinal tumor growth via enhancing pluripotency and epithelial mesenchymal transition.

Oncotarget 2014;5(19):9269-80.

37. Vega KJ, May R, Sureban SM, et al. Identification of the putative intestinal stem cell marker doublecortin and CaM kinase-like-1 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. Journal of gastroenterology and hepatology 2012;27(4):773-80.

38. Whorton J, Sureban SM, May R, et al. DCLK1 is detectable in plasma of patients with Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. Digestive diseases and sciences 2015;60(2):509-13.

39. Ikezono YU, Koga H, Abe M, et al. High expression of the putative cancer stem cell marker, DCLK1, in rectal neuroendocrine tumors. Oncology letters 2015;10(4):2015-20.

40. Sureban SM, Madhoun MF, May R, et al. Plasma DCLK1 is a marker of hepatocellular carcinoma (HCC): Targeting DCLK1 prevents HCC tumor xenograft growth via a microRNA-dependent mechanism. Oncotarget 2015;6(35):37200-15.

41. Ito H, Tanaka S, Akiyama Y, et al. Dominant Expression of DCLK1 in Human Pancreatic Cancer Stem Cells Accelerates Tumor Invasion and Metastasis. PloS one 2016;11(1):e0146564.

42. Qu D, Johnson J, Chandrakesan P, et al. Doublecortin-like kinase 1 is

- elevated serologically in pancreatic ductal adenocarcinoma and widely expressed on circulating tumor cells. *PloS one* 2015;10(2):e0118933.
43. Weygant N, Qu D, May R, et al. DCLK1 is a broadly dysregulated target against epithelial-mesenchymal transition, focal adhesion, and stemness in clear cell renal carcinoma. *Oncotarget* 2015;6(4):2193-205.
44. Liu YH, Tsang JY, Ni YB, et al. Doublecortin-like kinase 1 expression associates with breast cancer with neuroendocrine differentiation. *Oncotarget* 2016;7(2):1464-76.
45. Kadletz L, Aumayr K, Heiduschka G, et al. Overexpression of DCLK1 is predictive for recurrent disease in major salivary gland malignancies. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 2017;274(1):467-75.
46. Gagliardi G, Moroz K, Bellows CF. Immunolocalization of DCAMKL-1, a putative intestinal stem cell marker, in normal colonic tissue. *Pathology, research and practice* 2012;208(8):475-9.
47. May R, Riehl TE, Hunt C, et al. Identification of a novel putative gastrointestinal stem cell and adenoma stem cell marker, doublecortin and CaM kinase-like-1, following radiation injury and in adenomatous polyposis coli/multiple intestinal neoplasia mice. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008;26(3):630-7.

48. Xi HQ, Cai AZ, Wu XS, et al. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 is associated with invasion, metastasis, and could be a potential therapeutic target in human gastric cancer. *British journal of cancer* 2014;110(8):2011-20.
49. Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, et al. Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2003;37(3):528-33.
50. Sun B, Ye X, Li Y, et al. Lgr5 is a potential prognostic marker in patients with cervical carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015;8(2):1783-9.
51. Tanese K, Fukuma M, Yamada T, et al. G-protein-coupled receptor GPR49 is up-regulated in basal cell carcinoma and promotes cell proliferation and tumor formation. *The American journal of pathology* 2008;173(3):835-43.
52. Gao F, Zhou B, Xu JC, et al. The role of LGR5 and ALDH1A1 in non-small cell lung cancer: Cancer progression and prognosis. *Biochemical and biophysical research communications* 2015;462(2):91-8.
53. Yang L, Tang H, Kong Y, et al. LGR5 Promotes Breast Cancer Progression and Maintains Stem-Like Cells Through Activation of Wnt/beta-Catenin Signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2015;33(10):2913-24.
54. Chen Q, Zhang X, Li WM, et al. Prognostic value of LGR5 in colorectal cancer: a meta-analysis. *PloS one* 2014;9(9):e107013.
55. Han Y, Xue X, Jiang M, et al. LGR5, a relevant marker of cancer stem

cells, indicates a poor prognosis in colorectal cancer patients: a meta-analysis.

Clinics and research in hepatology and gastroenterology 2015;39(2):267-73.

56. Liu YS, Hsu HC, Tseng KC, et al. Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2013;67(8):791-9.

57. Planutis AK, Holcombe RF, Planoutene MV, et al. SW480 colorectal cancer cells that naturally express Lgr5 are more sensitive to the most common chemotherapeutic agents than Lgr5-negative SW480 cells. *Anti-cancer drugs* 2015;26(9):942-7.

58. Tabachnyk M, Distel LV, Buttner M, et al. Radiochemotherapy induces a favourable tumour infiltrating inflammatory cell profile in head and neck cancer. *Oral oncology* 2012;48(7):594-601.

59. Mei Z, Liu Y, Liu C, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *British journal of cancer* 2014;110(6):1595-605.

60. Huang Y, Liao H, Zhang Y, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ T cells in gastrointestinal cancers: a meta analysis. *PloS one* 2014;9(5):e94376.

61. Shang B, Liu Y, Jiang SJ, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports* 2015;5:15179.

62. Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, et al. Intratumoral CD8(+) T/FOXP3

(+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 2010;59(5):653-61.

63. Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, et al. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology* 2009;137(4):1270-9.

64. Nosho K, Baba Y, Tanaka N, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *The Journal of pathology* 2010;222(4):350-66.