

論文の内容の要旨

論文題目 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
氏名 原田 有三

【研究の背景と目的】

進行下部直腸癌に対して行われ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を目的とした術前補助治療であるが、治療効果や予後を予測する因子は十分には明らかにされていない。これらの検討において、癌幹細胞の存在や腫瘍免疫、とりわけ腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL)の関与の可能性が報告されている。

癌幹細胞は癌組織の一部に存在し、自己複製能や分化能を持つことで、治療抵抗性や不良な予後との関連が示唆されている。癌幹細胞のマーカーとして Doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) や Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5)等が報告されている。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 の治療効果と腫瘍免疫の関係については、CRT 施行前の CD8+ TIL、FoxP3+ TIL が CRT の奏効に相関するとの報告があるが、報告によって CRT のレジメンが異なるなどの問題点があげられ、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。

【対象および方法】

下部直腸癌の切除検体（術前 CRT 施行例と手術単独例）を用いて DCLK1、LGR5 の発現を免疫組織学的に評価し、臨床病理学的因子や予後との相関を検討した。さらに、CRT 前の生検検体を用い、CD8+ TIL、FoxP3+ TIL を免疫組織学的に評価し、CRT 治療効果、予後との相関を検討した。

【結果】

CRT 施行例において DCLK1 陽性例は有意にリンパ節転移が多く、癌特異的生存率(CSS)が不良であった。一方、手術単独症例では 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。LGR5 陽性例は有意にリンパ管侵襲、リンパ節転移が多いものの、LGR5 発現と予後との相関は認めなかった。また、CD8+ TIL 数が多い症例、CD8+/FoxP3+ TIL 比が高い症例では CRT の組織学的治療効果が有意に高かった。CD8+TIL 数が多い症例は CSS、無再発生存率(RFS)が良好であった。

【考察】

DCLK1 陽性細胞が放射線抵抗性、薬剤抵抗性を示したとする報告があり、癌幹細胞は再発、転移に関与するとされている。よって、直腸癌における DCLK1 陽性細胞は CRT に抵抗性であり、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ると考えられた。CRT 後の標本を用いた検討では推察通り DCLK1 陽性例で CSS 不良であった。前治療のない大腸癌において DCLK1 陽性例は CSS 不良であったとする報告があり、今回の結果と概ね矛盾しないと考えられる。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えていない。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、無再発生存率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。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ところ、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が考えられた。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と考えられる。

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。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、解釈には注意を要すると考えられる。

また、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が報告されている。

しかし、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、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、癌細胞が消失した組織学的完全寛解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。

一方、LGR5 は既報では直腸癌 CRT 症例において全生存率、無病生存率の不良因子であり、CRT 治療抵抗性に相関するとされている。本研究で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ル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と考えられた。さらに、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あり、今後の検討が必要である。

TIL に関して、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の報告がある。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 細胞のマーカールである CD8 に加え、抑制性 T 細胞のマーカールである FoxP3 の発現を検討した。

本研究では過去の多くの報告と同様に CD8+ TIL と CRT 奏効の正の相関が示された。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。本研究と異なり、CRT 後の切除検体を検討し、CRT 治療効果の高い症例で FoxP3+ TIL が少なかったとする報告がある。今回の研究でも CRT 後の組織標本を用いて 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 分布が不均一であったため、TIL 数の計測部位の決定が難しいと判断した。

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。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 奏効の相関を示す報告があるが、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。そこで、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。CRT 奏効の予測因子として CD8+ TIL 数に対する CD8+/FoxP3+ TIL 比の優位性を示すことはできなかったが、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 CD8+ TIL 数、FoxP3+ TIL 数がともに予後良好因子とされているが、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。今回の研究と同様の結果を示す報告がある一方、CRT 後の TIL が予後と相関するとの報告もあり、結果の一致をみておらず、慎重な解釈が必要である。