

博士論文

糖環境が大腸癌に及ぼす影響についての総合的検討

太田（吉川） 善子

目次

要旨	P. 6
序文	
糖尿病合併大腸癌の疫学的背景と課題	P. 7
大腸癌の治療の現状	P. 9
癌の免疫逃避機構	P. 10
局所的飢餓環境の免疫抑制因子としての可能性	P. 12
本研究の概要	P. 15
第 1 章 糖尿病合併大腸癌の疫学的検討	
〈方法〉	
対象	P. 17
糖尿病の定義	P. 18
調査項目	P. 19
統計解析	P. 19

〈結果〉

大腸癌患者の特徴 P. 20

糖尿病合併大腸癌の特徴 P. 21

長期予後 P. 26

〈考察〉 P. 33

第 2 章 糖環境が免疫細胞に及ぼす影響についての検討

〈方法〉

免疫細胞の抽出 P. 39

MTS 法による細胞増殖能の評価 P. 40

フローサイトメトリーによるサイトカイン産生能の評価 P. 41

統計解析 P. 42

〈結果〉

糖環境が免疫細胞増殖能に与える影響 P. 43

糖環境がサイトカイン産生能に与える影響 P. 44

〈考察〉	P. 47
結論	P. 51
謝辞	P. 53
引用文献	P. 54

略語表

略語	内容
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
CR	complete response
CSS	cancer-specific survival
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HbA1c	hemoglobin A1c
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus
IFN	interferon
IL	interleukin
MMP	matrix metalloproteinase
M ϕ	macrophage
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
NIDDM	non-insulin dependent diabetes mellitus
OS	overall survival
PBL	peripheral blood lymphocyte
PBS	phosphate-buffered saline
PE	phycoerythrin
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
RFS	ralapse-free survival
TGF	transforming growth factor
Th	T-helper
TNF	tumor necrosis factor
TSP	thrombospondin
VEGF	vascular endothelial growth factor

糖環境が大腸癌に及ぼす影響についての総合的検討

東京大学医学系研究科外科学専攻 腫瘍外科

指導教員 渡邊 聡明教授

太田（吉川）善子

要旨

我々は大腸癌の根治切除術を受けた患者を対象とした後ろ向きコホート研究を行い、糖尿病合併に伴う臨床病理学的特徴と予後について新たな知見を得た。糖尿病合併例の **cancer-specific survival (CSS)** は非合併例と比べ、全体では差がなかったものの、病期が進行するにつれて悪化する傾向を認めた。糖尿病合併大腸癌の進行度による悪性度の違いが示唆され、さらなる疫学研究の蓄積によって新たな知見が開かれることが期待される。また、糖環境が免疫細胞の増殖能、サイトカイン産生能に及ぼす影響を検討した実験からは、癌増殖過程における局所的飢餓環境が免疫抑制因子の一つである可能性が示唆された。この知見が新たな治療戦略に寄与することを期待する。

序文

糖尿病合併大腸癌の疫学的背景と課題

我が国の癌の死亡率は増加の一途をたどり、1981年以降日本人の死因の第一位となっている。厚生労働省が公表している平成26年人口動態統計によると、癌による死亡数は368,000人を超え、死亡総数に占める割合は28.9%で、第二位の心疾患15.5%を大きく引き離している [1]。部位別では、男性では、大腸癌は肺癌、胃癌につぎ多く、女性では、大腸癌が一番多くなっている [2]。一方、近年我が国では糖尿病の罹患率も増加しており、厚生労働省の平成26年国民健康・栄養調査によると、糖尿病有病率（糖尿病が強く疑われる人の割合）は、男性で15.5%、女性で9.8%であり、増加傾向にある [3]。尚、この調査での「糖尿病有病者」はHbA1c (NGSP) 値が6.5%以上であるか、糖尿病の治療を受けている人とされている。こうした両者の傾向もあり、今後ますます糖尿病合併大

腸癌の頻度が増加することが予想され、その治療戦略の構築、そのために必要な腫瘍学的特徴の把握が重要であると考ええる。

近年、糖尿病と癌の関連性を調べた疫学的研究が多数報告されている。大腸癌との関連を示唆する報告も幾つかある [4-11]。大腸癌の患者では対照に比べ、耐糖能異常あるいは糖尿病が多く認められるという症例対照研究や [4-6]、糖尿病の既往やインスリン抵抗性、糖尿病のある対象で大腸癌のリスクが高くなるとしたコホート研究などである [7-11]。しかし、その多くは糖尿病と癌の発症との間に何らかの関連があることを示しているにすぎない。糖尿病と癌は直接関係しているのではないか [12,13]、糖尿病は癌のリスクを変える潜在的要因の指標なのではないか [14-16]、糖尿病と癌は共通の危険因子を介した間接的な関係にすぎないのではないか [17-19] など、様々な仮説があり結論には至っていない [20]。また、予後に関しても、手術期の短期的な予後などに関する報告が幾つか見られるだけで、十分な検討がなされてこなかった [21-23]。

そこで、本研究の第1章では、待機的に根治的切除術を施行した大腸癌手術症例を対象に、糖尿病を合併した大腸癌の臨床病理学的特徴および術後の長期的予後について検討し、糖尿病合併大腸癌の腫瘍学的特異性を明らかにすることを目的とした研究を行った。

大腸癌の治療の現状

現在、大腸癌の治療戦略の中心は、手術と化学療法である。抗癌剤に関しては、新しい治療に向けた大規模試験の結果が次々と報告され [24-27]、また、従来の代謝拮抗薬、DNA トポイソメラーゼ阻害薬、白金製剤に加え、最近では分子標的薬の登場もあり、治療選択の幅が広がりつつある [28-33]。一方、それらを補完する治療として、免疫療法に取り組んでいる動きはあるものの、現段階では標準的治療として認められるような十分な効果は報告されていない。

癌の免疫逃避機構

一般に、癌の増殖は宿主の免疫反応を引き起こすが、その機能が十分に働いていないことが多い。この免疫不全を説明するために、様々な機序が提唱されてきたが、その中に何らかの要因により、T細胞の機能が抑制されているとする報告がある [34-37]。免疫反応で中心的な役割を果たす白血球は、顆粒球、単球・マクロファージ (M ϕ)、リンパ球からなり、リンパ球には T細胞、B細胞、NK細胞などがある。特にリンパ球は癌に対する免疫応答に深く関わっている [38]。癌細胞を貪食した M ϕ は抗原提示細胞となり、ヘルパーT細胞 (Th) に癌抗原を提示する。ヘルパーT細胞には少なくとも Th1 と Th2 の2種類があり、前者は IL-2、IFN γ 、TNF β などのサイトカインを分泌し、IL-2 は細胞傷害性 T細胞 (CTL) を誘導、IFN γ は M ϕ を活性化させるなど、細胞性免疫を発動し、癌細胞の破壊に貢献する。一方、後者は IL-4、IL-5、IL-6 などのサイトカインを分泌し、B細胞の分化を促し、液性免疫を発動させる [39-43] (図1)。

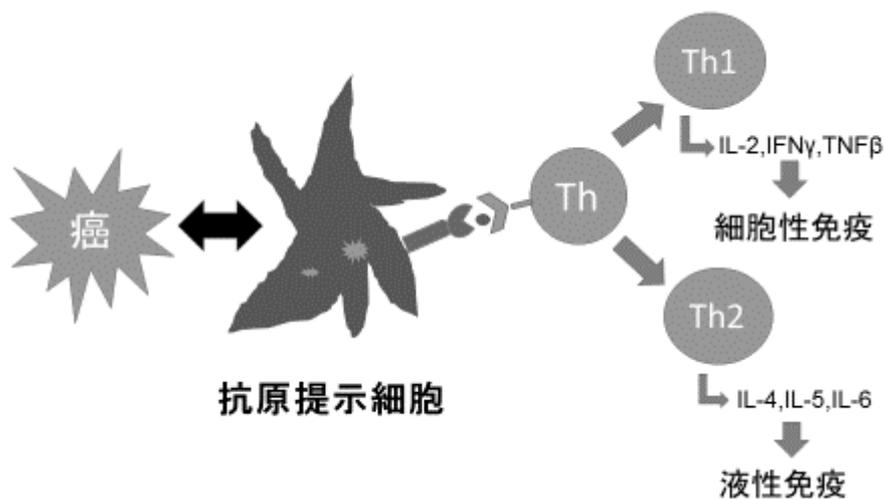


図1 癌に対する免疫応答

癌細胞を貪食したマクロファージは抗原提示細胞となり、ヘルパーT細胞(Th)に癌抗原を提示する。ヘルパーT細胞には、少なくともTh1とTh2がある。Th1は細胞性免疫を、Th2は液性免疫を発動させる。

様々な疾患において、Th1/Th2 imbalance が指摘されており、例えば、Th1優勢の疾患としては、関節リウマチなどがあり [44]、Th2優勢の疾患としては、癌、特に基底細胞癌 [45,46]、多発性骨髄腫 [47]、大腸癌 [48,49] などが報告されている。しかし、その現象の仕組みについてはよく分かっていない。

局所的飢餓環境の免疫抑制因子としての可能性

癌細胞の増殖には大量の栄養が必要であり、癌組織を構成する細胞は血管新生により局所的な血流を確保している [50]。癌の増殖過程では、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) や線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor : FGF) などの血管新生促進因子が、血管新生を盛んに誘導している [51-53]。一方、癌組織の局所的な部分では、しばしば低血糖が認められる [54,55]。癌組織の微小環境内では thrombospondin-1 (TSP-1) などの内因性の血管新生阻害因子が分泌されており [56,57]、癌の血管新生は複数の血管新生促進因子と血管新生阻害因子のバランスによって制御されている [58]。細胞外基質蛋白質である TSP-1 が癌組織において、癌細胞の増殖および血管新生に抑制的に働く仕組みを図 2 に示す。

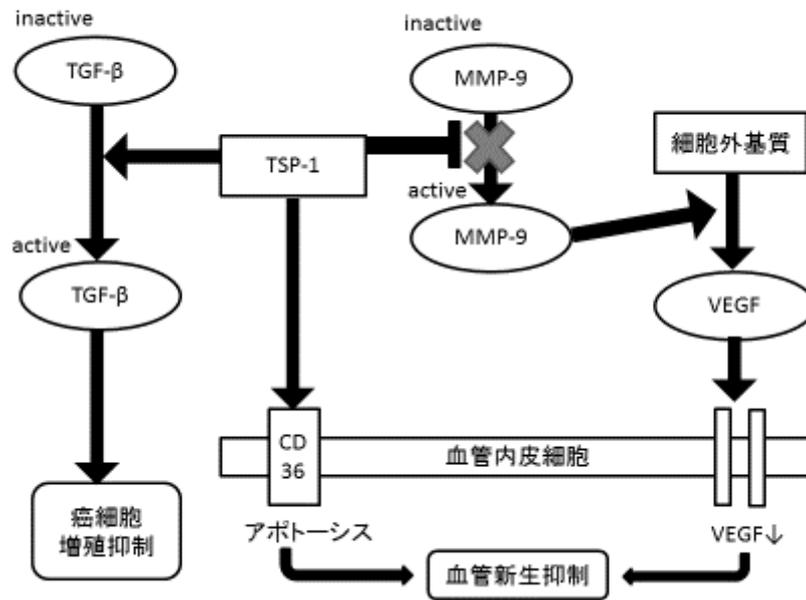


図2 癌組織における TSP-1 の働き

TSP-1 は、血管内皮細胞の CD36 に作用して、アポトーシスを誘導したり、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-9) の活性化を抑制し、VEGF の発現を減らすことで、血管新生を抑制する。トランスフォーミング増殖因子 (TGFβ) を活性化し、癌細胞の増殖抑制を促す作用もある。

TSP-1 は糖の影響を受けることが知られており [59]、糖尿病のラットの血管壁では、高血糖の刺激により TSP-1 の分泌が促進されるという報告もある [60]。癌の微小環境で分泌される TSP-1 が、高血糖によって分泌が促進し、その結果、血管新生が抑制され、一転して微小環境に低血糖状態が生じていると推測される。

増殖過程の癌細胞がこのような低栄養のストレスに曝された場合、どのような反応をするかについては、オートファジーなど、多くの研究報告がある[61-64]。

オートファジーとは、細胞が低栄養環境において、自己の細胞内成分を自己のリソソームで分解し再利用する機構であり、癌細胞が飢餓状態に曝された際にも高率に誘導される [65] (図 3)。

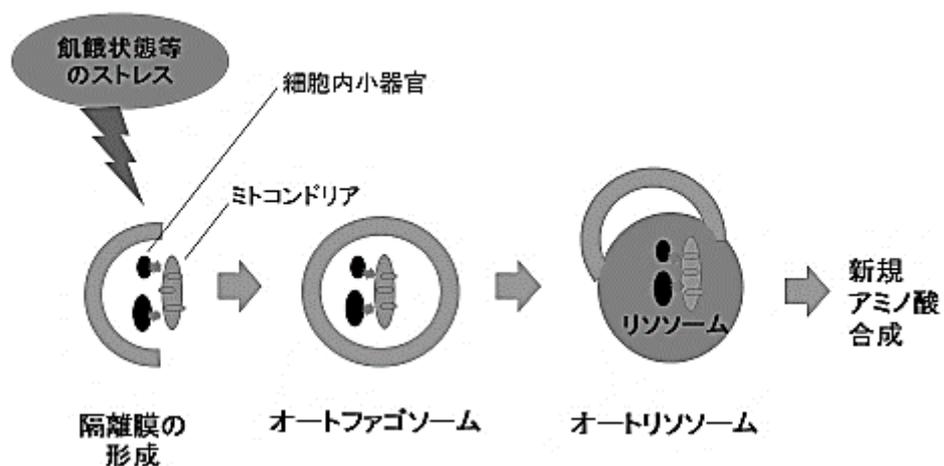


図 3 オートファジーの反応過程

飢餓状態などのストレスを受けた癌細胞では、隔離膜が障害を受けた細胞内小器官を取り囲み、オートファゴソームを形成する。その後リソソームと融合してオートリソソームになり、内容物が分解される。

一方、癌細胞に対峙する免疫細胞も、癌組織の局所においては、同じ飢餓環境に曝されていると推測されるが、飢餓環境が免疫細胞に及ぼす影響について研究した報告は極めて少ない。この癌組織の局所的な飢餓環境が、癌の免疫逃避機構に影響を及ぼしている可能性があると考ええる。

本研究の第2章では、健常者の白血球を用い、糖環境が免疫細胞の増殖能およびサイトカイン産生能に及ぼす影響について検討し、癌の免疫逃避機構の側面を明らかにすることを目的とした研究を行った。

本研究の概要

糖尿病と大腸癌に関する疫学研究は古くから行われてきたが、両者の直接的な関係については結論に至っていない。そこで、本研究では、対象を大腸癌の根治切除術を受けた症例に絞り、臨床病理学的特徴や進行度による予後の違いなど、従来とは違った視点から検討を加え、糖尿病合併大腸癌に腫瘍学的特異性があるかどうか明らかにすることを目的とした。

また、大腸癌の治療において、有効な免疫療法の開発が進んでいないことに関連して、癌細胞の増殖過程において、糖環境が癌細胞だけでなく、免疫細胞にも影響を及ぼしている可能性について検討し、癌の免疫逃避機構の一要因を明らかにすることを目的とした。

第1章 糖尿病合併大腸癌の疫学的検討

〈方法〉

対象

本研究は、2000年1月から2009年12月に当院で待機的に大腸癌の根治的切除術を受けた1216例を対象としたretrospective studyである。緊急手術などで術前の血液データが得られなかった症例と、腸管切除の適応外で人工肛門造設のみに終わった症例および転移巣の切除を行っていない姑息切除症例は対象から除外した。同時性多発癌の症例に関しては、一番進行度の高い病変を対象とした。フォローアップ期間の平均値±標準偏差は74±39か月であった。

本研究は書面による同意を得た症例を対象として、倫理委員会の承認を得て(承認番号3252-(2))施行された。

糖尿病の定義

糖尿病合併の判定には、当院の医療記録に残っている全ての血液検査の結果を参考にした。日本の糖尿病診断基準 [66] に従い、空腹時血糖 126mg/dl 以上を 2 回認めた場合、または、空腹時血糖 126mg/dl 以上かつ HbA1c (NGSP) 6.5% 以上を認めた場合を糖尿病と診断した。今回の対象である待機手術では、全例手術前概ね一か月以内に術前検査の一つとして、中心静脈栄養が投与される前に血液検査が施行されている。この術前データおよび過去のデータで上記の基準を満たしていた場合と、糖尿病の治療を行っている場合を糖尿病と診断した。また、術前検査で空腹時血糖 126mg/dl 以上または HbA1c 6.5% 以上を認めたものの、採血が 1 回しか行われていないために厳格な判定が困難なケースも、極めて強く糖尿病が疑われるため、今回の研究では「糖尿病」と定義した。即ち、空腹時血糖 126mg/dl 以上または HbA1c 6.5% 以上または治療歴があるケースを「糖尿病」と判定し、解析を行った。

調査項目

年齢、性別、血液データ(空腹時血糖値、HbA1c)、既往歴、腫瘍の病理組織学的因子(部位、肉眼型、最大径、組織型、壁深達度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移)、遠隔転移の有無、術前(化学)放射線療法の有無、手術日、術式、術後再発の有無、死亡日または最終生存確認日、死因といった臨床データは、当院の医療記録から入手した。大腸癌の病理学的記述は、基本的に TNM 分類 (第 7 版) [67] に基づいている。

統計解析

統計解析は、SPSS version 16.0 (IBM SPSS, Chicago, IL, U.S.A.)を用いて施行した。糖尿病の有無による臨床病理学的要素の比較には、 χ^2 乗検定と Student-t 検定を行った。患者の予後は、全生存 (overall survival : OS) と癌特異生存 (cancer-specific survival : CSS)、無再発生存 (relapse-free survival : RFS) で比較した。生存率曲線はカプラン・マイヤー法で作成し、差の検定にはログランク

検定を適用した。各生存率に關与する要素に対する多変量解析は、単変量解析で p 値が 0.1 未満の項目についてコックス比例ハザード分析を用いて行われた。上記単変量解析以外の解析においては、p 値が 0.05 未満で統計的に有意と判断した。

〈結果〉

大腸癌患者の特徴

本研究で対象となった結腸直腸癌患者 1216 例の臨床病理学的特徴を表 1 にまとめた。男性が 63%と優勢であり、平均年齢は 66 歳 (範囲 27-94 歳)であった。術前の空腹時血糖値および HbA1c の平均値は 115mg/dl と 5.8%であった。腫瘍の占居部位は直腸が 42%と最も多く、そのうちの 29%が術前(化学)放射線療法を受けていた。腫瘍径の平均値は 41mm であった。組織学的には高分化癌と中分化癌で 94%を占めた。腫瘍の 62%が固有筋層を超えて浸潤していた。34%の症

例に領域リンパ節転移を認め、8%の症例に遠隔転移を認めた。術後に再発した症例は302例(25%)であった。術後、最終生存確認日までのフォローアップ期間中に亡くなった症例200例の死因は、大腸癌によるものが61%であった。

糖尿病合併大腸癌の特徴

前項で示した大腸癌の臨床病理学的特徴について、糖尿病合併例416例(34%)と非合併例800例(66%)の間で比較検討した(表1)。尚、糖尿病合併例のうち、1例は1型糖尿病(IDDM)であり、415例は2型糖尿病(NIDDM)であった。糖尿病と診断されてから手術までの期間の平均値±標準偏差は41±78か月(範囲1-564か月)であり、半数は術前2か月以内に診断されていた。糖尿病合併例の平均年齢は68歳で、非合併例の64歳よりも有意に高かった($p < 0.01$)。糖尿病合併例の方が、非合併例より男性の割合が有意に高かった(73% vs. 58%, $p < 0.01$)。糖尿病合併例の空腹時血糖値、HbA1cはそれぞれ145mg/dl、6.5%であり、非合併例の値(100 mg/dl, 5.5%)より有意に高かった(両者とも $p < 0.01$)。腫瘍

の占居部位は両者とも直腸が最も多かったが、結腸の近位側（盲腸から横行結腸まで）と遠位側（下行結腸とS状結腸）に注目すると、糖尿病合併例の方が非合併例に比べ近位側に多いという傾向が認められた（49% vs. 43%, $p = 0.09$ ）。腫瘍径を比較すると、糖尿病合併例の方が非合併例よりも腫瘍が有意に大きかった（43mm vs. 39mm, $p = 0.02$ ）。壁深達度は、糖尿病合併例の方が非合併例に比べ深い傾向が認められたが、有意差はなかった（ $p = 0.1$ ）。糖尿病合併例における死因は、大腸癌以外の原因によるものが有意に多かった（42% vs. 24%, $p = 0.02$ ）。他の臨床病理学的因子に関しては明らかな統計学的有意差を認めなかった。

有意差のあった腫瘍径については、糖尿病合併例では、腫瘍径の平均値 43mm, 中央値 40mm, 最頻値 40mm、糖尿病非合併例では、腫瘍径の平均値 39mm, 中央値 35mm, 最頻値 30mm であった。糖尿病合併例を術前の血液データをもとに、空腹時血糖値、HbA1c どちらも正常であった血糖コントロール良好群（ $n = 65$ ）とコントロール不良群（ $n = 340$ ）に分け、腫瘍径に差がないか調べるサブ解析を

行ったところ、血糖コントロール良好群では腫瘍径が 38mm であり、コントロール不良群の 44mm に比べて有意に小さいという結果が得られた ($p = 0.049$)。

表 1 大腸癌患者の糖尿病合併の有無と臨床病理学的因子の関係

	全症例 (n = 1216)	DM+ (n = 416)	DM- (n = 800)	p
年齢, mean ± SD (歳)	66 ± 11	68 ± 10	64 ± 11	< 0.01
性別, n (%)				< 0.01
男性	763 (63)	302 (73)	461 (58)	
女性	453 (37)	114 (27)	339 (42)	
空腹時血糖値, mean ±SD (mg/dl)	115 ± 35	145 ± 44	100 ± 12	< 0.01
HbA1c, mean ± SD (%)	5.8 ± 0.9	6.5 ± 1.2	5.5 ± 0.4	< 0.01
占居部位, n (%)				0.5
結腸	703 (58)	246 (59)	457 (57)	0.09
近位 ^a	315 (45)	121 (49)	194 (42)	
遠位 ^a	388 (55)	125 (51)	263 (58)	
直腸	513 (42)	170 (41)	343 (43)	
肉眼型				0.08
0型 (表在型)	228 (19)	64 (15)	164 (21)	
1型 (隆起腫瘤型)	87 (7)	30 (7)	57 (7)	
2型 (潰瘍限局型)	832 (68)	302 (73)	530 (66)	
3型 (潰瘍浸潤型)	30 (3)	6 (1)	24 (3)	
5型 (分類不能)	39 (3)	14 (3)	25 (3)	
最大腫瘍径, mean ± SD (mm)	41 ± 23	43 ± 23	39 ± 23	0.02
組織型, n (%)				0.2
高分化～中分化	1148 (94)	397 (95)	751 (94)	
低分化, 粘液癌, 印環細胞癌	68 (6)	19 (5)	49 (6)	
壁深達度, n (%)				0.1
T0 or Tis ^b	50 (4)	18 (4)	32 (4)	
T1	206 (17)	57 (14)	149 (19)	
T2	207 (17)	78 (19)	129 (16)	
T3	566 (47)	205 (49)	361 (45)	
T4	187 (15)	58 (14)	129 (16)	
リンパ管侵襲, n (%)				0.7
+	305 (25)	102 (25)	203 (26)	

表 1 大腸癌患者の糖尿病合併の有無と臨床病理学的因子の関係 (continued)

	全症例 (n = 1216)	DM+ (n = 416)	DM- (n = 800)	p
静脈侵襲, n (%)				0.3
+	707 (58)	235 (56)	472 (59)	
領域リンパ節転移, n (%)				0.3
+	411 (34)	132 (32)	279 (35)	
遠隔転移, n (%)				0.6
+	99 (8)	36 (9)	63 (8)	
UICC stage, n (%)				0.5
0 ^b	48 (4)	17 (4)	31 (4)	
I	349 (29)	113 (27)	236 (30)	
II	376 (31)	141 (34)	235 (29)	
III	344 (28)	109 (26)	235 (29)	
IV	99 (8)	36 (9)	63 (8)	
術前(化学)放射線療法, n (%) ^c	149 (29)	52 (30)	97 (28)	0.6
再発, n (%)	302 (25)	102 (25)	200 (25)	0.9
フォローアップ期間, mean ± SD (月)	74 ± 39	71 ± 39	75 ± 39	0.09
死因, n (%)				0.02
大腸癌再発	122 (61)	43 (52)	79 (68)	
大腸癌再発以外	63 (32)	35 (42)	28 (24)	
大腸癌以外の癌 ^d	30 (48)	14 (40)	16 (57)	
肺炎 ^d	11 (17)	5 (14)	6 (21)	
心疾患 ^d	4 (6)	4 (11)	0 (0)	
脳血管疾患 ^d	3 (5)	2 (6)	1 (4)	
その他 ^d	15 (24)	10 (29)	5 (18)	
不明	15 (8)	5 (6)	10 (9)	

DM diabetes mellitus, SD standard deviation, HbA1c hemoglobin A1c

^a 分母は結腸癌の患者の総数である。

^b 術前(化学)放射線療法により、病理学的に完全寛解 (CR) となった症例を含む。

^c 分母は直腸癌の患者の総数である。

^d 分母は大腸癌再発以外の死因で亡くなった患者の総数である。

長期予後

糖尿病の合併による生命予後の違いを生存率曲線によって比較検討した。平均フォローアップ期間は、糖尿病合併例では 71 ± 39 か月、非合併例では 75 ± 39 か月であり、糖尿病合併例の方が短いという傾向があった ($p = 0.09$, 表 1)。図 4 は糖尿病の有無による OS を表しており、糖尿病を合併している症例で OS が低いことが分かる ($p = 0.01$)。更に病期別で比較すると、Stage 0-I と Stage IV で糖尿病合併例の OS が有意に低いことが分かった (各 $p < 0.01$, $p = 0.04$)。OS に関する因子について多変量解析を行うと、糖尿病は独立した予後因子であった (表 2)。多変量解析の結果から、年齢、腫瘍径、分化度、壁深達度、領域リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、静脈侵襲の有無も独立した予後因子であることが分かった。一方、CSS は、糖尿病合併例と非合併例で有意差を認めなかった ($p = 0.6$, 図 5)。但し、病期別では、Stage II の糖尿病合併例で有意差はないが CSS がよい傾向があり ($p = 0.07$)、反対に Stage IV では糖尿病合併例では有意に CSS が不良であった ($p = 0.049$)。そこで有意差のあった Stage IV 症例において、CSS

に
関与する因子の多変量解析を行ったところ、糖尿病合併は Stage IV 症例にお
ける独立した予後因子であった (表 3)。RFS に関しては、全症例、病期別とも
に、糖尿病合併例と非合併例で有意差を認めなかった (図 6)。

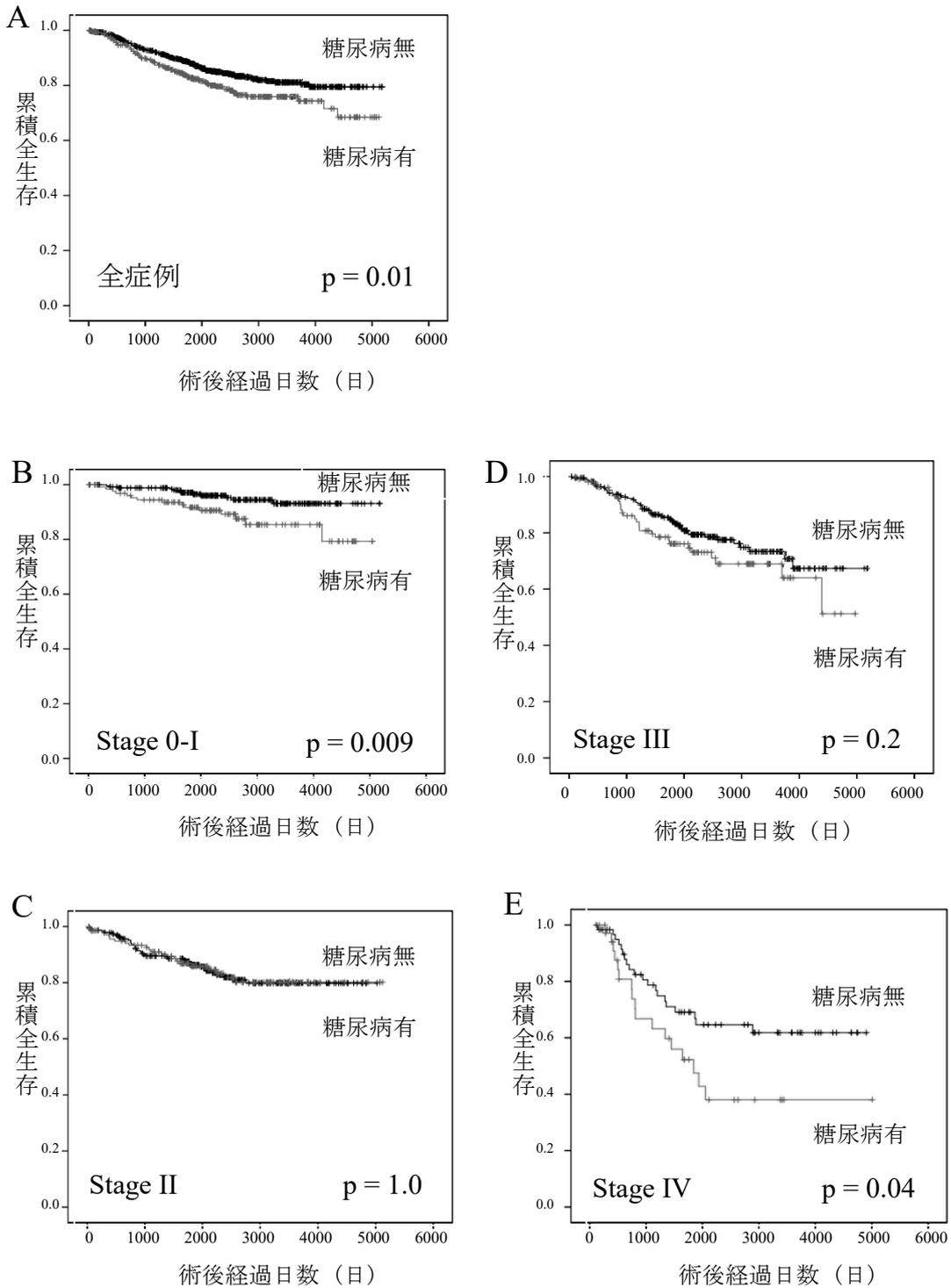


図4 大腸癌患者における糖尿病合併の有無と全生存

(A: 全症例、B: Stage 0-I、C: Stage II、D: Stage III、E: Stage IV)

全症例、Stage 0-I、Stage IV で、糖尿病合併例の全生存が有意に低かった。

表 2 全症例における全生存に関する因子の多変量解析

	単変量解析	多変量解析	
	p	HR (95%CI)	p
年齢 (歳)	0.04		0.02
≤ 65		1	
≥ 66		1.40 (1.05-1.88)	
性別	1.0		
男性			
女性			
糖尿病合併	0.01		< 0.01
-		1	
+		1.48 (1.11-1.98)	
占居部位	0.8		
結腸			
直腸			
最大腫瘍径 (mm)	< 0.01		0.04
< 40		1	
≥ 40		1.41 (1.02-1.96)	
組織型	< 0.01		< 0.01
高分化～中分化		0.50 (0.31-0.80)	
低分化, 粘液癌, 印環細胞癌		1	
壁深達度	< 0.01		< 0.01
T0-2		1	
T3,4		1.78 (1.17-2.73)	
リンパ管侵襲	< 0.01		0.1
-		1	
+		1.30 (0.95-1.79)	
静脈侵襲	< 0.01		0.02
-		1	
+		1.51 (1.08-2.12)	
領域リンパ節転移	< 0.01		0.01
-		1	
+		1.50 (1.01-2.06)	
遠隔転移	< 0.01		< 0.01
-		1	
+		2.20 (1.49-3.26)	

HR hazard ratio, CI confidence interval

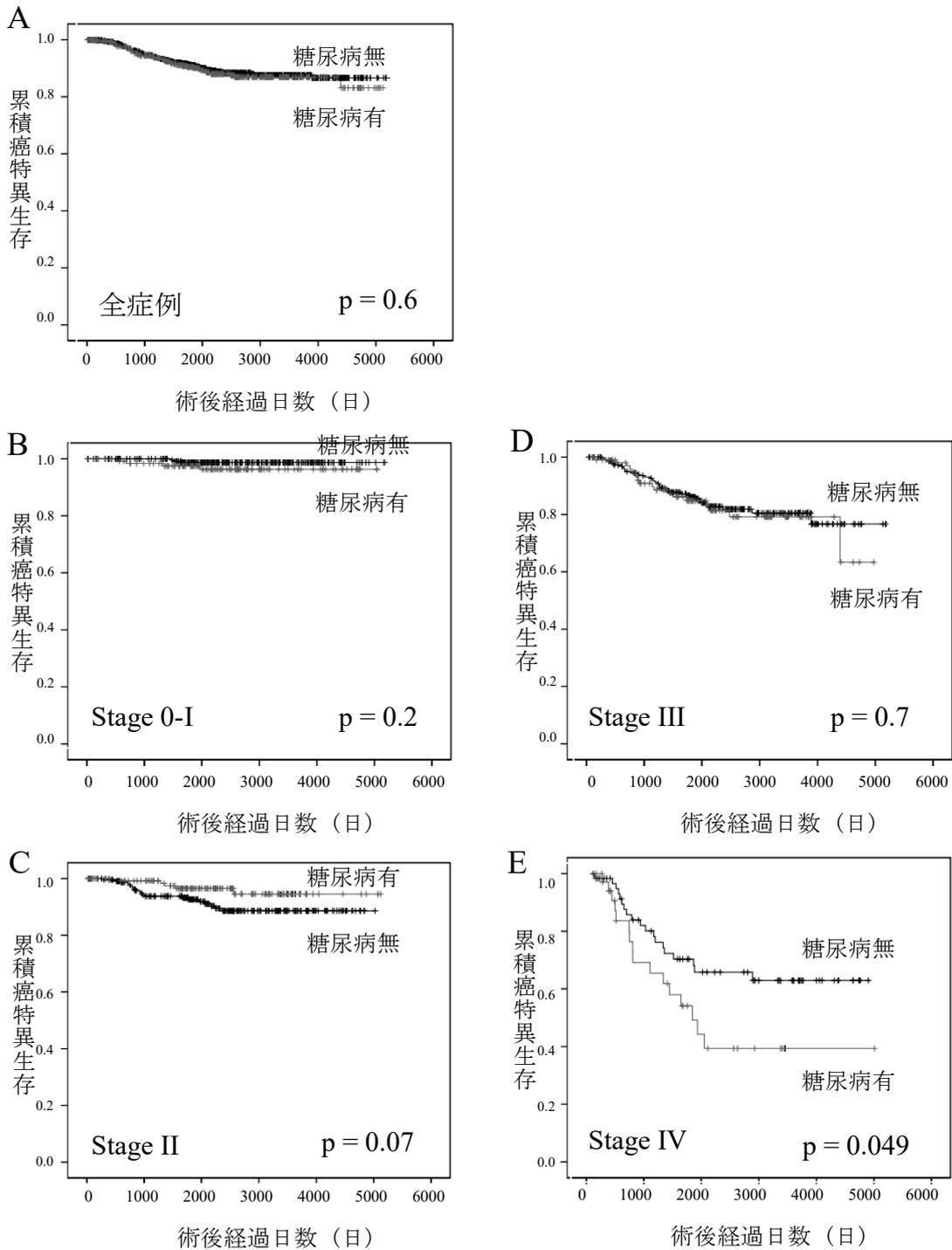


図5 大腸癌患者における糖尿病合併の有無と癌特異生存

(A: 全症例、B: Stage 0-I、C: Stage II、D: Stage III、E: Stage IV)

全症例では、糖尿病合併例と非合併例で癌特異生存に有意差を認めなかった。
 病期別では、Stage IVの糖尿病合併例で、有意に癌特異生存が不良であった。

表3 Stage IV 症例 (99 例) における癌特異生存に関与する因子の多変量解析

	単変量解析	多変量解析	
	p	HR (95%CI)	p
年齢 (歳)	0.9		
≤ 65			
≥ 66			
性別	0.5		
男性			
女性			
糖尿病合併	0.05		< 0.01
-		1	
+		3.13 (1.50-6.55)	
占居部位	0.4		
結腸			
直腸			
最大腫瘍径 (mm)	0.6		
< 40			
≥ 40			
組織型	< 0.01		< 0.01
高分化～中分化		0.07 (0.02-0.18)	
低分化, 粘液癌, 印環細胞癌		1	
壁深達度	0.2		
T0-2			
T3-4			
リンパ管侵襲	0.06		0.02
-		1	
+		2.30 (1.17-4.53)	
静脈侵襲	0.2		
-			
+			
領域リンパ節転移	0.3		
-			
+			

HR hazard ratio, CI confidence interval

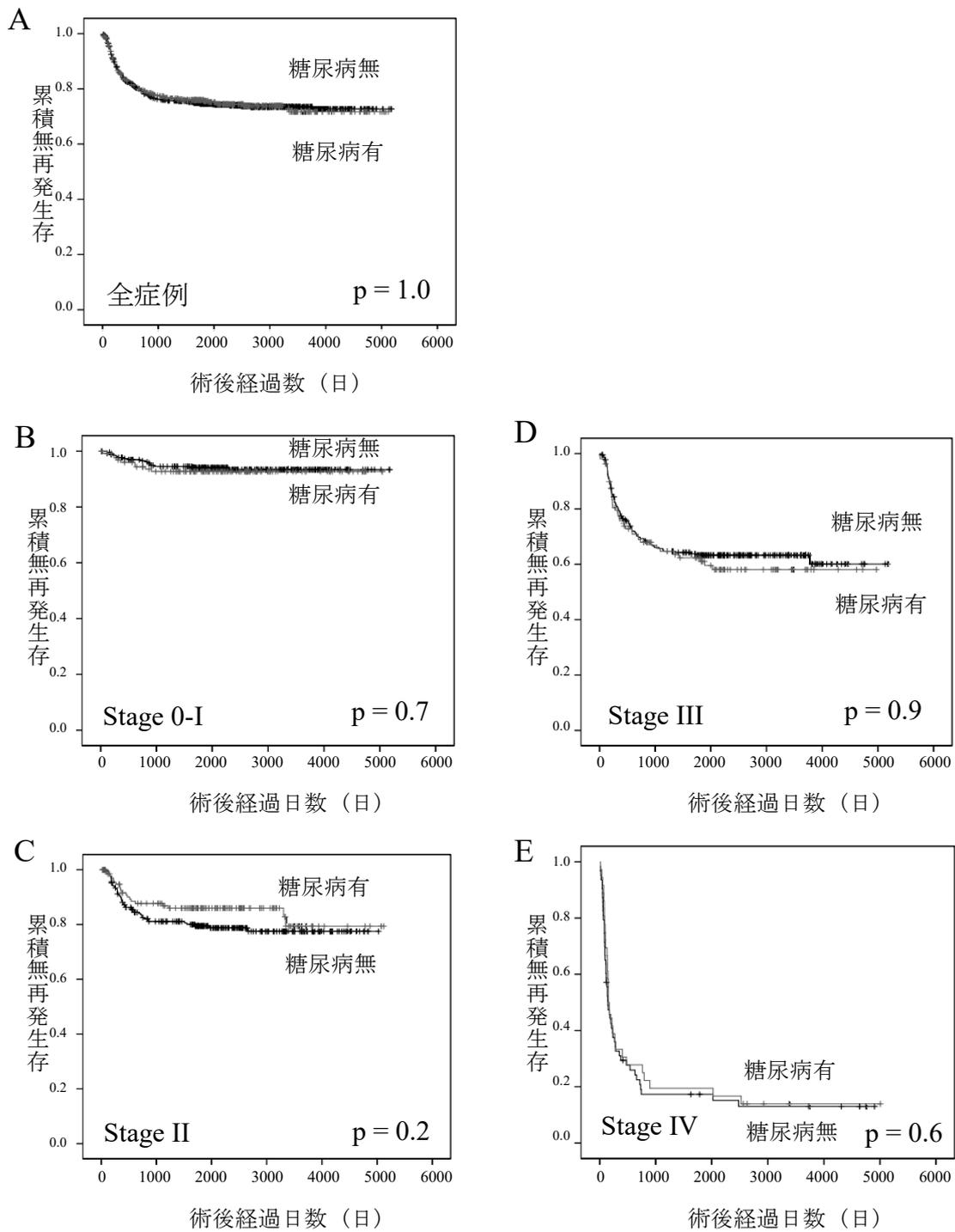


図6 大腸癌患者における糖尿病合併の有無と無再発生存

(A : 全症例、B : Stage 0-I、C : Stage II、D : Stage III、E : Stage IV)

全症例、病期別ともに、糖尿病合併例と非合併例で無再発生存に有意差を認めなかった。

〈考察〉

本研究で、我々は糖尿病合併大腸癌の臨床病理学的特徴と長期予後について、当院で過去 10 年間に根治手術を施行された患者のデータベースを基に比較検討した。糖尿病合併大腸癌の臨床病理学的特徴としては、非合併例に比べて男性の割合が高く、より高齢であり、腫瘍径が有意に大きかった。また、糖尿病は全体として OS を悪くしたが、CSS、RFS には影響を与えなかった。CSS に関して病期別に検討したところ、Stage II 症例では糖尿病合併例で CSS が良い傾向があり、Stage IV では有意に CSS が不良であり、病期が進むにつれて糖尿病の CSS に対する負の影響が強くなる傾向を認めた。

糖尿病合併大腸癌が高齢の男性に多いという結果については同様の報告が見られるが [5,9]、これは糖尿病が高齢男性に多いことが主な原因であると考えられる。腫瘍径に関しては、糖尿病のマウスと糖尿病でないマウスに大腸癌を移植したところ、糖尿病マウスの腫瘍は、糖尿病でないマウスの腫瘍よりも 5

週間で有意に大きく成長したという実験報告がある [68]。高血糖が大腸癌の発症に関与している可能性を示唆する報告があり [12,69]、嫌気性代謝に傾いている癌細胞にとって、高血糖は豊富なエネルギー源となることにより癌の成長に有利な環境である可能性がある。糖尿病と腫瘍径についての考察を深めるために行ったサブ解析では、糖尿病合併例において、血糖コントロール良好群の腫瘍径は、コントロール不良群の腫瘍径に比べて有意に小さいという結果が得られた。つまり糖尿病合併例の中でも血糖コントロール不良例で腫瘍が大きいという結果であった。これは、癌が進行して大きくなると耐糖能を悪くするという機序に基づくと考えられる。一方でコントロール不良の糖環境が癌の発育を促進するという機序も想定され、今後の検証が必要である。また、結腸癌のみを対象とした腫瘍の占居部位の比較では、糖尿病合併例は近位側に多いという傾向が認められた。これに関しては同様の報告をしている論文がある [70]。糖尿病患者では前癌状態である大腸ポリープが近位側で高率に見られるという報告もある [71]。その機序につき、DNA メチレーションなど、遺伝子レベル

で関心を寄せているものもあったが [72,73]、詳細は不明であり、今後の研究が待たれるところである。

全症例を対象とした生存率の解析からは、糖尿病合併例で OS が有意に低いという結果が得られた。一方で、CSS、RFS に差がなかった。つまり、OS が悪いのは癌死以外の死因によるもので、糖尿病の合併症や併発症の影響と考えられる。実際に糖尿病合併例で、心疾患など大腸癌以外の死因が有意に多かったことも、その推論の裏付けとなる。同様の報告としては、根治的手術後の 5 年生存率に有意差があったものの、CSS には差がなく、その原因として高齢と心疾患の頻度の多さを指摘しているものもあった [74]。全生存に負に作用した因子について確かめるため、多変量解析を行った結果では、糖尿病は独立した予後因子であった。高齢、低分化癌、大きな腫瘍、深く浸潤した腫瘍、領域リンパ節転移、遠隔転移、リンパ管侵襲があることが全生存に負に作用するのはよく知られているが、それらとは独立して糖尿病が関与していることは注目に値する。

病期別の検討結果では、Stage 0-I の糖尿病合併例で OS が有意に低かったが、早期癌の症例ではそもそも癌死が非常に少なく、実際 CSS、RFS には糖尿病合併の有無による有意差がないことから、糖尿病の合併症や併発症による癌以外の死因が大きく影響したと考えられる。Stage II では、糖尿病合併例で CSS が良い傾向があった。糖尿病による大腸癌以外の死因による影響は Stage 0-I と変わらないとすると、OS が低くなることが予想されるが、実際は OS において全く有意差を認めておらず、これは糖尿病合併例の CSS が良好である傾向があったことが影響していると考えられる。Stage II 症例では一律に術後補助化学療法を行うことが推奨されておらず、糖尿病の有無にかかわらず術後補助化学療法が行なわれている症例が少ないことが予想され、CSS が腫瘍そのものの悪性度を反映している可能性はあるが、明らかではない。つまり糖尿病合併大腸癌は進行度が低い段階では悪性度が低い可能性も考えられるが、今後の検証が必要である。一方で Stage IV 症例では CSS が糖尿病合併例で有意に不良であった。これは二つの可能性を示唆していると考えられる。一つはより進行度の高い段階

では糖尿病合併大腸癌はより悪性度が高く、そのために CSS が不良となっている可能性である。もう一つは糖尿病合併による術後の治療の差が影響している可能性である。より進行度の高い大腸癌は術後に補助化学療法が行われる場合が多く、また再発の頻度も高く、その後に抗癌剤治療が行われることが多い。

糖尿病の合併症などにより、積極的な抗癌剤治療ができなかった可能性も考えられる。RFS に差がないことを考慮すると、再発後の病勢あるいは治療に差が出た可能性があるが、Stage IV の再発後は他院に移って治療を継続するケースもあり、そのことが検証を困難にしている要因の一つとなっている。Stage IV のみ CSS に有意差があったため、多変量解析を行ったところ、糖尿病合併は低分化腺癌やリンパ管侵襲といった予後不良因子と独立した予後因子であることが分かった。

最近、特定の糖尿病治療薬が癌リスクに影響を与えるという報告も出てきた。例えばメトホルミンが癌リスク低下に [75,76]、インスリン製剤が癌リスク上昇に関連することを示唆したものなどである [77]。本研究で対象となった糖

尿病合併大腸癌の患者は、糖尿病に関しては、術前からのかかりつけ医など、近医でフォローされているケースが多い。そのため、術後の血糖コントロールはどうであったか、どのような糖尿病の治療薬が使われてきたか、などといった糖尿病関連の情報で不十分なところがあり、そこが **retrospective study** である本研究の限界である。また、この分野の研究における根本的な **limitation** として、癌発症時期の特定が困難であるため、糖尿病と大腸癌が合併している場合、そもそもどちらが先に発症しているか分からないということがある。糖尿病が癌に及ぼす影響と、癌が糖尿病に及ぼす影響、両方の側面を考察する必要があると考える。

糖尿病合併大腸癌の予後改善のためには、大腸癌再発のみならず、糖尿病とその合併症の治療が重要であり、同時に、大腸癌と糖尿病、両者の相互作用を考慮した研究がなされることにより、糖尿病合併大腸癌の腫瘍学的特徴がより明らかになるものと思われる。

第2章 糖環境が免疫細胞に及ぼす影響についての検討

〈方法〉

免疫細胞の抽出

男性3人と女性2人、平均年齢39歳（範囲32-53歳）の健康な成人5人（ボランティア）から、末梢静脈血を採取した。赤血球を分離除去した検体を、Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) の上に重ね、遠心分離することで、末梢血リンパ球 (PBL) を分離し、更に3回洗浄し (250 ×g, 180 ×g, and 120 ×g, 各10分)、精製した。得られた細胞を、0.1% bovine serum albumin (BSA) と抗生物質(ペニシリンとストレプトマイシン) が添加された Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, St Louis, MO, USA) を様々な糖濃度に調整した培養液で懸濁し、T細胞の選択性を高めるため、5 μg/ml のマ

ウス抗ヒト CD3 抗体 (Bay bioscience, Kobe, Japan) でコーティングされた 96 ウェルプレートまたは 6 ウェルプレートに注入し、各実験を行った。

MTS 法による細胞増殖能の評価

前項のとおり抽出した PBL を、0.1% BSA と抗生物質を添加された様々な糖濃度 (0, 25, 50, 100, 225, 450 mg/dl) の DMEM で懸濁し、抗 CD3 抗体でコーティングされた 96 ウェルプレートに 2×10^5 cells/well となるよう調整し、5% CO₂、37 °C の環境下で 3 日間培養した。

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, Promega KK, Tokyo, Japan) を最終濃度が 10% となるように加え、2 時間培養した後、microplate reader (ImmunoMini NJ-2300; Japan Inter Med Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、490nm の吸光度を測定し、細胞の活性を定量化した。

フローサイトメトリーによるサイトカイン産生能の評価

前述のとおり抽出した PBL を、0.1% BSA と抗生物質を添加された、450 mg/dl の糖濃度の DMEM と糖フリーの DMEM で懸濁し、抗 CD3 抗体でコーティングされた 6 ウェルプレートに 1×10^7 cells/well となるよう調整し、5% CO₂、37 °C の環境下で 3 日間培養した。3 日後、0.1% BSA と抗生物質が添加された 450 mg/dl 糖濃度の DMEM または糖フリーの DMEM に、最終濃度が 2 μM となるように細胞内蛋白質輸送阻害薬 monensin を含んだ GolgiStop (Becton Dickinson) を加えた培養液と交換し、更に 6 時間培養した。6 時間後、50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) と 250 ng/ml ionomycin (Sigma-Aldrich) を加え、更に 6 時間刺激培養した。6 時間後、細胞を抽出し、phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した。まず、FITC 標識マウス抗ヒト CD4 モノクローナル抗体 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用い、細胞表面抗原である CD4 の免疫染色を行った。その後、細胞内抗原である IL-4 や IFN-γ の免疫染色のための固定や膜透過処理を行った。固定のため、細胞を Fixation Buffer

(BioLegend, San Diego, CA, USA) で懸濁し、室温、暗所で 20 分間放置し、遠心し (350 ×g, 5 分) 、その後、膜透過処理として、Permeabilization Wash Buffer (BioLegend) で懸濁し、2 回遠心した (350 ×g, 5 分)。以上の処理を終えた細胞を、PE 標識マウス抗ヒト IL-4 モノクローナル抗体や PE 標識マウス抗ヒト IFN- γ 抗体を用い (Becton Dickinson)、細胞内染色を行い、フローサイトメトリー (FACSCalibur; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) で測定した。リンパ球を forward scatter と side scatter より同定し、FITC 陽性分画を CD4 陽性細胞と同定した。CD4 陽性細胞のうち、PE 陽性分画を IL-4 や IFN- γ 産生能のある細胞と判断した。

統計解析

統計解析は、SPSS version 16.0 (IBM SPSS)を用い、Tukey's test と Student-t 検定によって、解析された。p 値が 0.05 未満で統計的に有意と判断した。

〈結果〉

糖環境が免疫細胞増殖能に与える影響

MTS 法によって明らかになった、糖環境の違いによる PBL の増殖能の違いを図 7 に示した。糖濃度が低い (0、25、50 mg/dl) 培養液で培養した PBL の増殖能は、100 mg/dl 以上の高い糖濃度の培養液で培養された PBL よりも有意に低かった ($p < 0.01$)。25 mg/dl および 50 mg/dl の糖濃度の培養液で育てられた PBL の増殖能は、糖フリーの培養液で育てられた PBL の増殖能と同じレベルまで低下していた。糖濃度が 0、25、50 mg/dl の培養液で育てられた PBL の間では、増殖能に有意差はなかった。同様に、糖濃度が 100、225、450 mg/dl の培養液で育てられた PBL の間でも、増殖能に有意差はなかった。

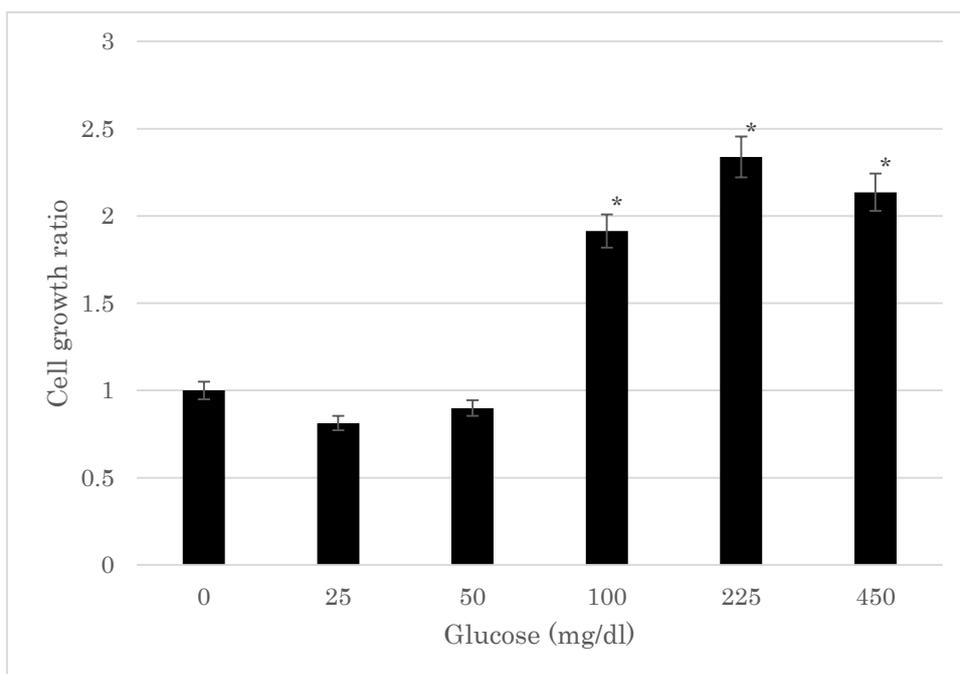


図7 様々な糖濃度の培養液で育てられた末梢血リンパ球の増殖能

細胞の増殖率は、糖フリーの培養液で育てられた細胞の増殖率との比率で表している。各データは、平均値±標準偏差を表している (n = 5)。

* 糖フリーのデータとの比較で $p < 0.05$

糖環境がサイトカイン産生能に与える影響

高糖濃度の培養液で培養された PBL と糖フリーの培養液で培養された PBL との間で、PMA と ionomycin の刺激で誘導された細胞内サイトカインの分泌能に違いがないか、フローサイトメトリーを用いて検討した。細胞内サイトカイン分泌細胞を dot plot で表した図が、図 8 である。

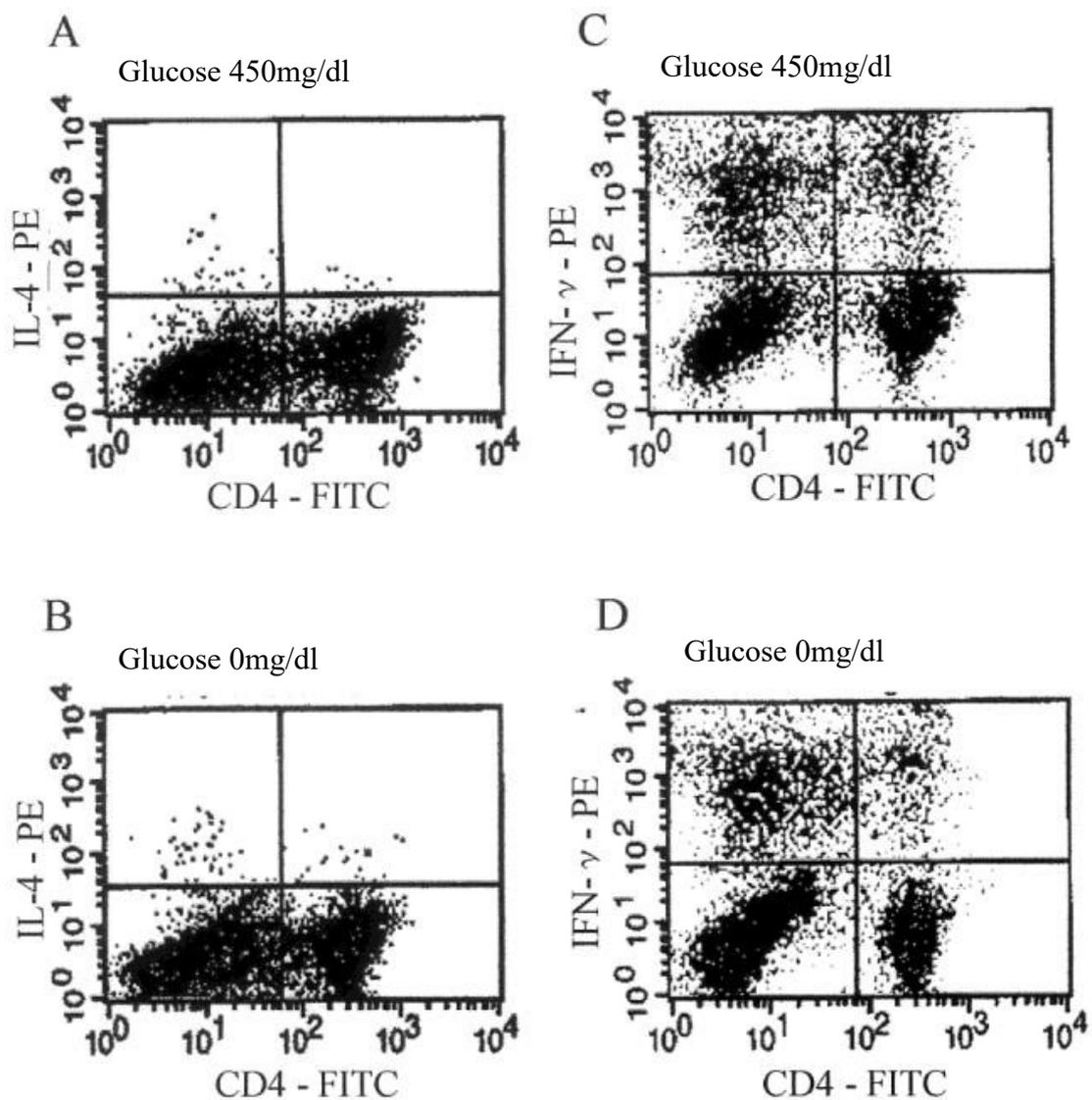


図 8 細胞内サイトカイン分泌細胞の dot plot 図

FITC 標識 CD4 の強度を X 軸に、PE 標識 IL-4 (A, B) と IFN- γ (C, D) の強度を Y 軸に示す。A と C は、450mg/dl の高糖濃度の培養液で培養された PBL であり、B と D は、糖フリーの培養液で培養された PBL である。右上の分画が CD4(+) かつ IL-4 /IFN- γ (+) で、各サイトカインを産生している CD4 陽性細胞を示す。
CD cluster of differentiation, *IL* interleukin, *IFN* interferon, *PE* phycoerythrin, *FITC* fluorescein isothiocyanate

CD4 陽性細胞のうち、細胞内サイトカイン陽性細胞の割合を表 4 に示した。

糖フリーの培養液で培養された細胞は、高糖濃度の培養液で培養された細胞に比べ、IL-4 分泌能が有意に高く (0.30 ± 0.05 vs. $0.12 \pm 0.10\%$; $p = 0.049$)、IFN- γ の分泌能が有意に低かった (6.39 ± 0.56 vs. $15.37 \pm 3.14\%$; $p < 0.01$)。

表 4 高糖濃度培養液と糖フリー培養液で培養され、phorbol 12-myristate 13-acetate と ionomycin で刺激後、サイトカインを分泌した CD4 陽性細胞の割合

Glucose	Percentage of positive cells	
	Interleukin-4	Interferon- γ
High	0.12 ± 0.10	15.37 ± 3.14
No	$0.30 \pm 0.05^*$	$6.39 \pm 0.56^*$

細胞内サイトカインの産生は、フローサイトメトリーで解析された。データは、CD4陽性細胞の中での割合を示し、平均値 \pm 標準偏差を表す。(* $p < 0.05$)

CD cluster of differentiation

〈考察〉

本研究により、低糖濃度環境は、PBL の増殖を妨げることが分かった。今までの研究の大半は、栄養枯渇状態が癌細胞の増殖に及ぼす影響について論じたものだが [62,63]、同じ環境に曝されてはずの免疫細胞については対象とされてこなかった。今回のデータによると、標準血糖値未満の糖濃度の培養液で育てられた PBL の増殖は、標準血糖値以上の糖濃度の培養液で育てられた PBL と比べ、有意に抑制されていた。PBL の増殖率は、培養液の糖濃度と正比例の関係ではなかった。標準血糖値より高い糖濃度環境の PBL と低い糖濃度環境の PBL では、それぞれ異なる増殖率を示し、標準血糖値が境界となっているように思われた。

更に、今回の研究では、低血糖環境が PBL のサイトカイン産生能にも影響を及ぼしていることが明らかとなった。過去の研究で、ある種の疾患では、Th1/Th2 imbalance が生じていることが報告されている。Th2 優勢の疾患としては、大腸

癌など、幾つかの癌も報告されている [48,49]。過去には、胃癌と大腸癌の患者の PBL で、IL-2 と IFN- γ が抑制されていたという報告がある [78]。別の研究では、様々な癌患者の CD4 陽性末梢血単核球で僅かに IL-4 が増えており、一方、IFN- γ が減っていたと報告している [79]。今回の実験からは、健康なドナーの CD4 陽性 PBL において、糖の枯渇が IL-4 の分泌を促進し、IFN- γ の分泌を抑制することが分かった。Th2 は IL-4 を分泌しているため、IL-4 産生細胞の増加は Th2 の増加を示していると推測される。一方、Th1 は IFN- γ を分泌しているため、IFN- γ 産生細胞の減少は Th1 の減少の結果と捉えることができる。即ち、健康なドナーの CD4 陽性 PBL では、糖の枯渇が Th2 優勢をもたらすと考えられる。この結果は、悪性疾患で Th2 優勢を認めるという結果と合致している。悪性疾患における Th2 優勢の理由はまだ分かっていないが、癌組織の局所において糖枯渇環境ができることが、悪性疾患の Th2 優勢という現象と関係している可能性がある。Th2 優勢あるいは Th1 劣勢は、細胞性免疫が十分に働いていないことを示し、それは癌の増殖に有利に働くと推測される。

癌は増殖の過程において、血管新生で栄養補給を試みているが [50]、癌組織の局所においては低血糖を認めている [54,55]。従って、この局所的な低血糖環境が免疫細胞の機能を妨げ、免疫逃避機構が働いている可能性がある (図 9)。

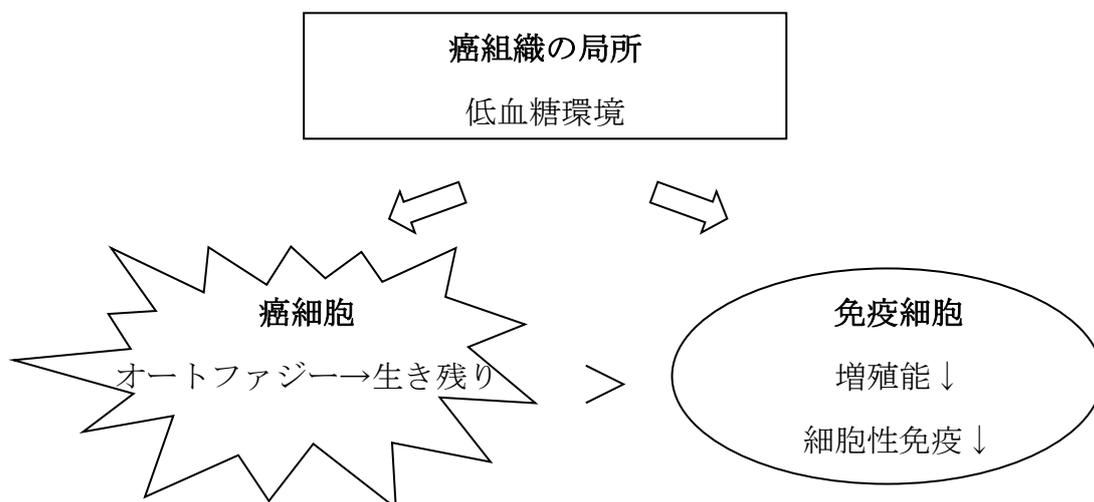


図 9 癌の免疫逃避機構の一概念

癌組織の局所においては、低血糖環境となる部分が存在する。癌細胞はオートファジーなどで生き残る一方、免疫細胞では増殖能、細胞性免疫が抑制され、免疫逃避機構が働いていると考えられる。

第1章の研究より、病期が進んだ大腸癌患者において、糖尿病合併例は非合併例に比べて癌特異死亡が多いという結果が得られたが、その原因の一つとして、糖尿病患者の高血糖が血管新生抑制因子の発現を増やし [60]、癌組織の局所的低血糖環境が進行し、癌の免疫逃避機構が強まり、更なる癌増殖につながったという機序も想定しうるが、今後の検証が必要である。

今回の研究では、免疫細胞とそれを取り巻く環境、特に糖抑制との関係に着目した。しかし、免疫細胞を取り巻く環境は、低栄養、低酸素など、様々な条件が関係している。低栄養も、糖に限らず、アミノ酸、脂質、蛋白質など幾つかの要因がある。これら様々な要因が、免疫細胞の増殖と機能に影響していると考えられ、従って、糖の欠如だけで、免疫不全の説明をすることには限界がある。更に、本研究の根本的な限界として、健康なドナーからの PBL は癌患者の PBL とは異なっている可能性があるということを挙げておく。

結論

①糖尿病合併大腸癌の臨床病理学的特徴は、高齢、男性、腫瘍径が大きいことであった。糖尿病合併大腸癌の根治切除後は、大腸癌以外の死因による予後の悪化が認められるため、大腸癌再発の予防・監視・治療のみならず糖尿病とその合併症に対する治療が予後改善のために重要であると考えられた。また Stage IV 大腸癌では糖尿病合併例で大腸癌による死亡が多く、これはより悪性度が高いという可能性と、糖尿病による合併症などのために術後の治療が手控えられた可能性の両方が考えられる。予後を改善するためには糖尿病とその合併症をコントロールし、より有効な治療を選択できるようにすることが重要であると考えられた。糖尿病合併大腸癌においては、糖尿病と大腸癌の両者が連携して治療される必要があると同時に、両者の相互作用を考慮した研究がなされることによって、糖尿病合併大腸癌の腫瘍学的特徴がより明らかになるものと思われる。

②糖環境と免疫細胞の研究からは、糖欠乏環境により免疫細胞の増殖能が低下し、サイトカイン分泌能がより Th2 優勢に傾くことが分かった。即ち、癌組織の局所的な糖欠乏状態が、癌の免疫逃避機構の一つの要因であると考えられた。更なる研究によって癌免疫療法の有効性の向上に寄与できる可能性がある。

謝辞

本研究を遂行する機会を頂き、ご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻腫瘍外科 渡邊聡明教授、自治医科大学臨床研究支援センター 北山丈二教授、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻腫瘍外科 石原聡一郎講師に深謝致します。

自治医科大学臨床研究支援センター 北山丈二教授からは、テーマの設定や実験方法のご指導を頂き、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻腫瘍外科 石原聡一郎講師からは、データの解釈、研究のまとめ方に至るまで、懇切丁寧なご指導を賜りました。そして、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻腫瘍外科 渡邊聡明教授には終始にわたり、全面的なご支援を賜りました。ここに、多大なる謝意を表します。

引用文献

1. 厚生労働省. 平成 26 年 (2014) 人口動態統計 (確定数) の概況. 統計表 第 6 表 性別にみた死因順位 (第 10 位まで) 別 死亡数・死亡率 (人口 10 万対) ・構成割合. http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei14/dl/10_h6.pdf
2. 厚生労働省. 平成 26 年 (2014) 人口動態統計 (確定数) の概況. 統計表 第 7 表 死因簡単分類別にみた性別死亡数・死亡率 (人口 10 万対) .
http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei14/dl/11_h7.pdf
3. 厚生労働省. 平成 26 年 国民健康・栄養調査結果の概要.
<http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/0000106547.pdf>
4. Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Hankin JH, Lyu LC. Associations of sedentary lifestyle, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 57:4787-4794:1997.

5. La Vecchia C, Negri E, Decarli A, Franceschi S. Diabetes mellitus and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:1007-1010:1997.
6. Zhan YS, Feng L, Tang SH, Li WG, Xu M, Liu TF, Zhou YF, Ma YL, Zhang Y, Pu XM. Glucose metabolism disorders in cancer patients in a Chinese population. *Med Oncol* 27:177-184:2010.
7. Will JC, Galuska DA, Vinicor F, Calle EE. Colorectal cancer: another complication of diabetes mellitus? *Am J Epidemiol* 147(9):816-825:1998.
8. Hu FB, Manson JE, Liu S, Hunter D, Colditz GA, Michels KB, Speizer FE, Giovannucci E. Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type2) and risk of colorectal cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 91(6):542-547:1999.
9. Schoen RE, Tangen CM, Kuller LH, Burke GL, Cushman M, Tracy RP, Dobs A, Savage PJ. Increase blood glucose and insulin, body size, and incident colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 91(13):1147-1154:1999.

10. Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, Petrelli J, Thun MJ. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *Am J Epidemiol* 159(12):1160-1167:2004.
11. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 97(22):1679-1687:2005.
12. Chang CK, Ulrich CM. Hyperinsulinaemia and hyperglycemia: possible risk factors of colorectal cancer among diabetic patients. *Diabetologia* 46:595-607:2003.
13. Saydah SH, Loria CM, Eberhardt MS, Brancati KL. Abnormal glucose tolerance and the risk of cancer death in the United States. *Am J Epidemiol* 157(12):1092-1100:2003.
14. McKeown-Eyssen G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3:687-695:1994.

15. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, Stampfer MJ.

Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF-1) and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst*

91(7):620-625:1999.

16. Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR, Liu K. Colorectal cancer mortality

and factors related to the insulin resistance syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers*

Prev 11:385-391:2002.

17. Howe GR, Aronson KJ, Benito E, Castelleto R, Cornée J, Duffy S, Gallagher RP,

Iscovich JM, Deng-ao J, Kaaks R, Kune GA, Kune S, Lee HP, Lee M, Miller AB,

Peters RK, Potter JD, Riboli E, Slattery ML, Trichopoulos D, Tuyns A, Tzonou A,

Watson LF, Whittemore AS, Shu Z, et al. The relationship between dietary fat intake

and risk of colorectal cancer: evidence from the combined analysis of 13

case-control studies. *Cancer Causes Control* 8(2):215-218:1997.

18. Giocosa A, Franceschi S, La Vecchia C, Favero A, Andreatta R. Energy intake, overweight, physical exercise and colorectal cancer risk. *Eur J Cancer Prev* 8(Suppl 1):S53-60:1999.
19. Bruce WR, Giacca A, Medline A. Possible Mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:1271-1279:2000.
20. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* 33:1674-1685:2010.
21. Davila JA, Rabeneck L, Berger DH, El-Serag HB. Postoperative 30-day mortality following surgical resection for colorectal cancer in veterans: changes in the right direction. *Dig Dis Sci* 50(9):1722-1728:2005.
22. Jullumstro E, Kollind M, Lydersen S, Edna TH. Diabetes mellitus and outcomes of colorectal cancer. *Acta Oncologica* 48:361-367:2009.

23. Barone BB, Yeh HC, Snyder CF, Peairs KS, Stein KB, Derr RL, Wolff AC, Brancati

FL. Postoperative mortality in cancer patients with preexisting diabetes. *Diabetes Care* 33(4):931-939:2010.

24. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, Hill M,

Gilberg F, Rittweger K, Schmoll HJ. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 29:1465-1471:2011.

25. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Österlund P, Greil R, Van Cutsem E, von Moos R,

Viéitez JM, Bouché O, Borg C, Steffens CC, Alonso-Orduña V, Schlichting C, Reyes-Rivera I, Bendahmane B, André T, Kubicka S, ML18147 Study Investigators. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14:29-37:2013.

26. Yamada Y, Takahari D, Matsumoto H, Baba H, Nakamura M, Yoshida K, Yoshida

M, Iwamoto S, Shimada K, Komatsu Y, Sasaki Y, Satoh T, Takahashi K, Mishima

H, Muro K, Watanabe M, Sakata Y, Morita S, Shimada Y, Sugihara K. Leucovorin, fluorouracil, and oxaliplatin plus bevacizumab versus S-1 and oxaliplatin plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer (SOFT): an open-label, non-inferiority, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14:1278-86:2013.

27. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, Yoshino T, Garcia-Carbonero R, Mizunuma N, Yamazaki K, Shimada Y, Tabernero J, Komatsu Y, Sobrero A, Boucher E, Peeters M, Tran B, Lenz HJ, Zaniboni A, Hochster H, Cleary JM, Prener H, Benedetti F, Mizuguchi H, Makris L, Ito M, Ohtsu A, RECURSE Study Group. Randomized Trial of TAS-102 for Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 14;372:1909-19:2015.

28. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 358:2039-2049:2008.

29. Jubb AM, Harris AL. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. *Lancet Oncol* 14:1278-86:2013.

30. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5:341-54:2005.
31. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zobel A, Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27(5):663-71:2009.
32. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360(14):1408-17:2009.
33. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is

required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J*

Clin Oncol 26(10):1626-34:2008.

34. Naor D. Suppressor cells: permitters and promoters of malignancy? *Adv Cancer Res*

29:45-125:1979.

35. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya D, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW,

Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P. Interleukin-2 production by tumor cells

bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell*

60:397-403:1990.

36. Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, Shimizu J, Fujiwara

H, Hamaoka T. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell

function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions

and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol*

146:1077-1082:1991.

37. Gallimore A, Sakaguchi S. Regulation of tumour immunity by CD25⁺T cells.

Immunology 107:5-9:2002.

38. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD.

IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape

tumour immunogenicity. Nature 410:1107-11:2001.

39. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of

murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine

activities and secreted proteins. J Immunol 136:2348-2357:1986.

40. Bottomly K. A functional dichotomy in CD4⁺ T lymphocytes. Immunol Today

9:268-273:1988.

41. Mossman TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine

secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol

7:145-173:1989.

42. Kupfer A, Singer SJ. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions. *Annu Rev Immunol* 7:309-337:1993.
43. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease state. *Annu Rev Immunol* 12:227-257:1994.
44. Berner B, Akca D, Jung T, Muller GA, Reuss-Borst MA. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. *J Rheumatol* 27:1128-1135:2000.
45. Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ, Uyemura K. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinoma. *J Immunol* 155:2240-2247:1995.
46. Elsasser-Beile U, von Kleist S, Stahle W, Schurhammer-Fuhrmann C, Monting JS, Gallati H. Cytokine levels in whole blood cell cultures as parameters of the cellular immunologic activity in patients with malignant melanoma and basal cell carcinoma. *Cancer* 71:231-236:1993.

47. Hata H, Xiao H, Petrucci MT, Woodliff J, Chang R, Epstein J. Interleukin-6 gene expression in multiple myeloma: a characteristic of immature tumor cells. *Blood* 81:3357-3364:1993.
48. Pellegrini P, Berghella AM, Del Beato T, Cicia S, Adorno D, Casciani CU. Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression. *Cancer Immunol Immunother* 42:1-8:1996.
49. Berghella AM, Pellegrini P, Del Beato T, Marini M, Tomei E, Adorno D, Casciani CU. The significance of an increase increase in soluble interleukin-2 receptor level in colorectal cancer and its biological regulating role in the physiological switching of the immune response cytokine network from TH1 to TH2 and back. *Cancer Immunol Immunother* 45:241-249:1998.
50. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-6:1971.

51. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT and De Bruijn

EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*

56:549-580:2004.

52. Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Bar-Shavit R, Fuks Z.

Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in

tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 9(3):203-26:1990.

53. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular

endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity,

metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*

55(18):3964-3968:1995.

54. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685-693:2003.

55. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of

hypoxia and anemia. *Med Oncol* 18:243-259:2001.

56. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J.Cell.Mol.Med* 6(1):1-12:2002.
57. Armstrong LC, Bornstein P. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol* 22:63–67:2003.
58. Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Kruttsch HC, Lawler J, Roberts DD. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation* 100:1423-1431:1999.
59. Poczatek MH, Hugo C, Darley-Usmar V, Murphy-Ullrich JE. Glucose Stimulation of Transforming Growth Factor- β Bioactivity in Mesangial Cells Is Mediated by Thrombospondin-1. *Am J Pathol* 157(4):1353–1363:2000.
60. Stenina OI, Krukovets I, Wang K, Zhou Z, Forudi F, Penn MS, Topol EJ, Plow EF. Increased expression of thrombospondin-1 in vessel wall of diabetic Zucker rat. *Circulation* 107:3209-3215:2003.

61. Park HR, Tomida A, Sato S, Tsukumo Y, Yun J, Yamori T, Hayakawa Y, Tsuruo T, Shin-ya K. Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. *J Natl Cancer Inst* 96:1300-1310:2004.
62. He L, Li X, Luo HS, Rong H, Cai J. Possible mechanism for the regulation of glucose on proliferation, inhibition and apoptosis of colon cancer cells induced by sodium butyrate. *World J Gastroenterol* 13:4015-4018:2007.
63. Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T, Atomi Y, Ueno T, Ochiai A, Esumi H. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res* 67:9677-9684:2007.
64. Ferraro E, Cecconi F. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 462:210-219:2007.
65. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21:2861-2873:2007.
66. Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T; Committee of the Japan

Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 55(1):65-85:2002.

67. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (eds). *TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th edition. Wiley, New York, 2009.
68. Cao H, Jin C, Huang, Liu C, Sun D, Tan C, Zhu X, Fei Y. Changes in serum IGF-1 level and tumor VEGF expression in mice with colorectal cancer under hyperglycemic conditions. *Mol Med Rep* 7(4):1361-1365:2013.
69. Saydah SH, Platz EA, Rifai N, Pollak MN, Brancati FL, Helzlsouer KJ. Association of markers of insulin and glucose control with subsequent colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent* 12:412-418:2003.
70. Limburg PJ, Anderson KE, Johnson TW, Jacobs DR Jr, Lazovich D, Hong CP, Nicodemus KK, Folsom AR. Diabetes mellitus and subsite-specific colorectal

cancer risks in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(1):133-137:2005.

71. Nishii T, Kono S, Abe H, Eguchi H, Shimazaki K, Hatano B, Hamada H. Glucose intolerance, plasma insulin levels and colon adenomas in Japanese men. *Jpn J Cancer Res* 92(8):836-840:2001.

72. Tanaka J, Watanabe T, Kanazawa T, Tada T, Kazama Y, Tanaka T, Nagawa H. Left-Sided microsatellite unstable colorectal cancers show less frequent methylation of hMLH1 and CpG island methylator phenotype than right-sided ones. *J Surg Oncol* 96(7):611-8:2007

73. Phelip JM, Robin X. Type2 Diabetes Mellitus and Colorectal Cancer Risk: Is Homocysteine the Missing Link? *Am J Gastroenterol* 102(2):466-467:2007.

74. Jullumstro E, Kollind M, Lydersen S, Edna TH. Diabetes mellitus and outcomes of colorectal cancer. *Acta Oncol* 48(3):361-367:2009.

75. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330:1304-1305:2005.
76. Zaafar DK, Zaitone SA, Moustafa YM. Role of metformin in suppressing 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in diabetic and non-diabetic mice: effect on tumor angiogenesis and cell proliferation. *PLoS One* 9(6):e100562:2014.
77. Currie CJ, Poole CD, Gale EAM. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia* 52:1766-1777:2009.
78. Nakayama H, Kitayama J, Muto T, Nagawa H. Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 30:301-305:2000.
79. Sato M, Goto S, Kaneko R, Ito M, Sato S, Takeuchi S. Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients. *Anticancer Res* 18:3951-3955:1998.